Physiology and Pharmacology, 12 (2), 109 - 114
Summer 2008 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Expression and purification of the luciferase enzyme and *in vivo* ATP Assay

Mojtaba Mortazavi, Saman Hosseinkhani*, Abdorrahman Emamzadeh

Dept. Biochemistry, Faculty of Basic Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Received: 30 Dec 2007 Revised: 4 June 2008 Accepted: 9 June 2008

Abstract

Introduction: In this study, gene expression and purification of luciferases from the firefly, *Lampyris turkestanicus*, and optimization of cellular ATP measurements were performed.

Methods: cDNA encoding luciferases from *Lampyris turkestanicus* was transferred from pQE30 vector into pET28a expression vector and pLtu28 was built. Newly constructed vector was expressed in *E. coli* XL1 Blue and the recombinant luciferase was purified using Ni-NTA Sepharose column. Enzymatic properties (Km and Vmax) for ATP were measured using luminescence assay. Standard curve of ATP was obtained by Promega ATP detection kit and the designed method based on the *L. turkestanicus* luciferase and ATP serial dilution. Moreover, bacterial ATP was measured by Promega kit and the designed method using *L. turkestanicus* luciferase.

Results: Results showed that ligation of *L. turkestanicus* luciferase encoding cDNA into pET28a and transformation of competent cells induced by the recombinant vector was performed efficiently. Using luciferin, positive colonies were screened and cultured. SDS-PAGE showed that recombinant luciferase was efficiently purified by Ni-NTA Sepharose column. ATP standard curve and measurement of bacteria, using Promega and the designed method by *L. turkestanicus* luciferases showed high similarities.

Conclusion: A method based on *L. turkestanicus* luciferases was designed. Comparison of the developed assay with promega kits in identification of bacterial concentration show its high quality and potent ability in ATP detection.

Keywords: Bioluminescence, *Lampyris turkestanicus*, Luciferase, ATP.

* Corresponding author e- mail: saman_h@modares.ac.ir
Available online @: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۲ (۲)، ۱۰۹ - ۱۱۴
تابستان ۱۳۸۷

بیان ژن و تخلیص آنزیم لوسیفراز و سنجش ATP سلولی

مجتبی مرتضوی، سامان حسینخانی*، رحمان امامزاده
گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

دریافت: بهمن ۸۶ بازبینی: خرداد ۸۷ پذیرش: خرداد ۸۷

چکیده

مقدمه: لوسیفراز آنزیم کلیدی نشر نور در موجودات نورافشان می باشد. این آنزیم واکنش نشر نور را با استفاده از سوبستراهای لوسیفرین و ATP انجام می دهد. در این مطالعه، بیان ژن و تخلیص آنزیم لوسیفراز از حشره شبتاب گونه ایرانی *Lampyris turkestanicus* و راه اندازی سنجش ATP سلولی انجام شد.

روش‌ها: cDNA کدکننده لوسیفراز گونه *L. turkestanicus* از ناقل pQE30 به ناقل بیانی pET28a منتقل و ناقل نوترکیب بیانی pLtu28a ساخته شد. این ناقل در باکتری E. coli سویه XL1Blue بیان و تخلیص لوسیفراز نوترکیب با استفاده از ستون نیکل سفارُز و در یک مرحله انجام شد. فعالیت آنزیم با استفاده از دستگاه لومینومتر بررسی و مقدار Km و Vmax آنزیم نسبت به ATP اندازه گیری گردید. با استفاده از کیت شرکت پرومگا و روش طراحی شده به کمک آنزیم لوسیفراز و سریال رقت از ATP، یک منحنی استاندارد رسم شد. سپس به کمک محیط کشت حاوی باکتری، منحنی سنجش غلظت باکتری‌ها برای کیت شرکت پرومگا و روش طراحی شده رسم گردید.

یافته‌ها: نتایج این پژوهش نشان میدهد که انتقال cDNA کدکننده لوسیفراز *L. turkestanicus* به داخل وکتور pET28 و ترانسفورم کردن آن به درون باکتری‌های مستعد به طور کامل انجام شده است. پس از رشد باکتری‌های نوترکیب، کلونی‌های مثبت به سهولت و به کمک لوسیفرین انتخاب و کشت داده شد. تصویر ژل SDS-PAGE نشان می‌دهد که تخلیص آنزیم لوسیفراز به کمک رزین نیکل سفاروز با خلوص بالائی انجام شده است. منحنی‌های استاندارد سنجش ATP و سنجش غلظت باکتری‌ها با استفاده از کیت شرکت پرومگا و کیت طراحی شده به کمک آنزیم لوسیفراز نشان‌دهنده همسانی بالای این دو روش در تشخیص میزان ATP می باشند.

نتیجه‌گیری: مطالعه منحنی‌های حاصل از سنجش ATP و سنجش غلظت باکتری‌ها در مورد کیت پرومگا با کیت طراحی شده نشان‌دهنده کیفیت بالای کیت طراحی شده و قابلیت آن در سنجش ATP و استفاده‌های دیگر از این کیت را تایید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: بیولومینسانس، لوسیفراز، *Lampyris turkestanicus*، ATP

مقدمه

بیولومینسانس (BL) یا نشر نور توسط موجودات زنده از پدیده‌های جالب توجه در علوم زیستی می‌باشد. این فرایند در دسته وسیعی از موجودات خشکی‌زی و آبزی مشاهده و گزارش شده است. آنزیم‌های کلیدی کاتالیز کننده این دسته از واکنشها، با نام عمومی لوسیفراز شناخته می‌شوند. لوسیفراز حشره‌ای شبتاب (Firefly) و لوسیفراز باکتریایی شناخته شده‌ترین لوسیفرازها می باشند و از لحاظ نوع سوبسترا و مکانیسم عمل با یکدیگر متفاوت هستند.

لوسیفراز حشره‌ی شبتاب (Firefly) دو مرحله آنزیمی اساسی را برای بیولومینسانس کاتالیز می‌کند. در مرحله اول لوسیفراز فعال شدن D-لوسیفرین طی آدنیلاسیون گروه کربوکسیل توسط $Mg^{2+}ATP$ را کاتالیز می‌کند و در مرحله دوم، لوسیفراز به عنوان یک اکسیژناز عمل می‌کند و با اکسیداسیون آدنیل – لوسیفرین تشکیل یک حد واسط دی‌اکسی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: saman_h@modares.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj