لوسیفراز و کاربردهای نوین آن در زیست فناوری

آرش قهرودی تالی[۱]، مجتبی سعادتی[۲]، محمد دورودیان[۳]، محمدابراهیم مینایی[۴]

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۲۱
تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۲۶

چکیده

آنزیم لوسیفراز به‌همراه پیش‌ماده خود یعنی لوسیفرین، مسئول پدیده بیولومینسانس در موجودات زنده هستند. همه لوسیفرازهای شناخته شده، اکسیژناز می‌باشند و با استفاده از اکسیژن مولکولی، لوسیفرین خود را اکسید می‌نمایند که در نتیجه این اکسیداسیون نور تولید می‌شود. لوسیفرازها بر اساس نوع موجودی که در آن یافت می‌شوند به چهار نوع مرجانی، باکتریایی، داینوفلاژل و کرم شب‌تاب تقسیم می‌شوند که از لحاظ ساختار بیوشیمیایی و ژنتیکی کاملاً متفاوت هستند و از منشأهای تکامل‌یافته مشخص به‌وجود آمده‌اند. امروزه از لوسیفراز به‌عنوان آنزیمی مهم در زیست فناوری استفاده می‌شود و کاربردهای نوین آن در حال گسترش است. کاربردهای آن عبارتند از: ۱- عکسبرداری از سلول‌ها و بافت‌های مختلف به‌واسطه تغییر خاصیت نشر نور آن ۲- استفاده به عنوان آشکارکننده زیستی در مطالعه بیان ژن‌ها از طریق بیان همزمان با ژن لوسیفراز ۳- تعیین میزان فعالیت راه‌اندازهای مختلف ژن بوسیله قرار دادن ژن لوسیفراز تحت کنترل راه‌انداز موردنظر ۴- تولید زیست حسگر برای شناسایی ترکیبات سمی، عناصر سنگین (ازجمله جیوه و کادمیم)، تولوئن و مشتقات آن مثل TNT و هم‌چنین اندازه‌گیری تغییرات مقدار کلسیم درون سلولی و ATP.

کلیدواژه‌ها: لوسیفراز، بیولومینسانس، عکسبرداری از بافت‌ها، آشکارکننده زیستی، زیست حسگر

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی گرایش علوم سلولی مولکولی دانشگاه جامع امام حسین(ع)- دانشکده علوم پایه- مرکز تحقیقات زیست شناسی
E-mail: ghahroudi.arash@gmail.com
۲- دانشیار و عضو هیأت علمی دانشگاه جامع امام حسین(ع)- دانشکده علوم پایه- مرکز تحقیقات زیست شناسی
۳- عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز ۱۵۶۵۵/۴۶۱
۴- پژوهشگر دانشکده و پژوهشکده علوم پایه دانشگاه جامع امام حسین(ع)

۱- مقدمه

بیولومینسانس[1] حالت خاصی از نورافشانی است که در طی یک واکنش آنزیمی در موجودات زنده صورت می‌گیرد. هدف از انجام این عمل در بین موجودات متفاوت می‌باشد؛ از قبیل دفاع در برابر شکارچی، شکارکردن یا برای ارتباط با جفت. این پدیده توسط گروه‌های متنوعی از موجودات انجام می‌شود، البته تعداد آنها در مقایسه با کل موجودات شناخته شده جهان بسیار کم است[۱].

آنزیم لوسیفراز به همراه پیش‌ماده خود (لوسیفرین) و مولکول اکسیژن، واکنش تولید نور را در موجودات زنده کاتالیز می‌کند. همه لوسیفرازهای شناخته شده اکسیژناز هستند و با استفاده از اکسیژن مولکولی، لوسیفرین را اکسید می‌کنند. لوسیفرین در حضور اکسیژن به لوسیفراز متصل و یک حد واسط پر انرژی (اکسی لوسیفرین[2]) به وجود می‌آورد؛ در مرحله بعد اکسی لوسیفرین تجزیه و نشر نور صورت می‌گیرد. مکانیسم کلی نشر نور در موجودات زنده در زیر آورده شده است.

نور لوسیفراز $\rightarrow$ اکسی لوسیفرین $\rightarrow$ O_2 + لوسیفرین

موجودات نورافشان از لحاظ تفاوتشان در چگونگی بروز این پدیده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. اختلاف آنها عمدتاً در ساختار لوسیفراز و لوسیفرین است، هر چند در بعضی جزئیات با هم مشابه هستند.

در سال ۱۹۹۱ هستینگز و مورین[3] تخمین زدند که موجودات نورافشان از ۳۰ منشأ تکاملی متفاوت مشتق شده‌اند[۱]. مکانیسم فیزیولوژیک و شیمیایی نورافشانی در بین موجودات مختلف متفاوت است. هستینگز و مورین در همان سال گزارش دادند که ژن‌ها و پروتئین‌های مسئول در نورافشانی از لحاظ تکاملی حفاظت شده نیستند. این ژن‌ها و پروتئین‌ها مستقل بروز می‌کنند و به یکدیگر شباهتی ندارند[۱]. درسال ۱۹۶۲ شیمومورا[4] و همکاران برای اولین بار لوسیفراز را کشف کردند. آنها از ستاره دریایی Aequorea aequorea پروتئین در حال نشری را استخراج کردند و ترکیبی یافتند که به‌جای نور سبز مورد انتظار، نور آبی منتشر می‌کرد. این پروتئین آکواورین[5] نامیده شد. نور سبز توسط پروتئین دیگری منتشر می‌شد که نور آبی منتشر شده از آکواورین را جذب می‌کرد و سپس نوری با طول موج بلندتر را منتشر می‌کرد. این پروتئین بعداً GFP[6] نامگذاری شد[۲].

مطالعات بسیاری بر روی آنزیم لوسیفراز در موجودات نورافشان مختلفی انجام شده و کاربردهای بسیاری از این آنزیم و مولکول‌های مرتبط با آن وجود دارد. در این تحقیق به انواع مختلف این آنزیم، سازماندهی ژن آنها و کاربردهای نوین آنها در زیست فناوری خواهیم پرداخت.

۲- انواع لوسیفراز

لوسیفرازها بر اساس نوع موجودی که در آن یافت شده‌اند به چهار گروه تقسیم می‌شوند:

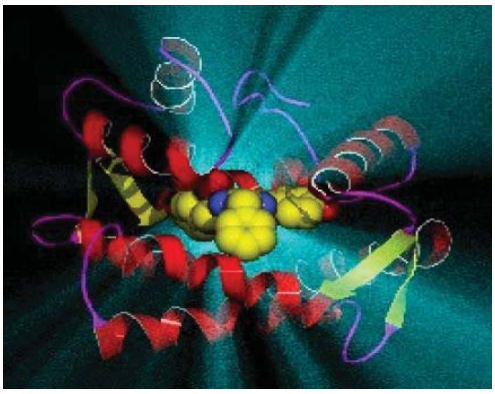
- لوسیفراز مرجانی[7]
- لوسیفراز باکتریایی[8]
- لوسیفراز داینوفلاژل[9]
- لوسیفراز کرم شب‌تاب[10]

۲-۱- لوسیفراز مرجانی

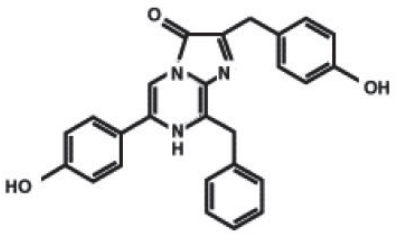
لوسیفراز و لوسیفرین مرجانی[11] (کوالنترازین) در حضور اکسیژن به هم متصل می‌شوند و یک واحدی به نام فوتوپروتئین آکواورین[12] را تشکیل می‌دهند. این فوتوپروتئین وقتی یون کلسیم حضور داشته باشد، واکنش تولید نور را راه‌اندازی می‌کند (شکل ۱).

کوالنترازین معروف‌ترین لوسیفرین دریایی است که در برخی مرجان‌ها یافت می‌شود. این لوسیفرین از لحاظ شیمیایی شبیه مولکول‌های نورافشان سایر بی‌مهره‌گان آبی است و دارای یک اسکلت ایمیدازوپیرازین[13] است که به طور گسترده‌ای در میان بی‌مهره‌گان آبی وجود دارد. شکل (۲) ساختار کوالنترازین را نشان می‌دهد.

1- Bioluminescence
2- Oxyluciferin
3- Hastings and Morin
4- Shimomura
5- Aequorin
6- Green fluorescence protein
7- Coelenterate luciferase
8- Bacterial luciferase
9- Dinoflagellate luciferase
10- Firefly luciferase
11- Coelenterate luciferin (Coelenterazine)
12- Aequorin photoprotein
13- Imidazopyrazine



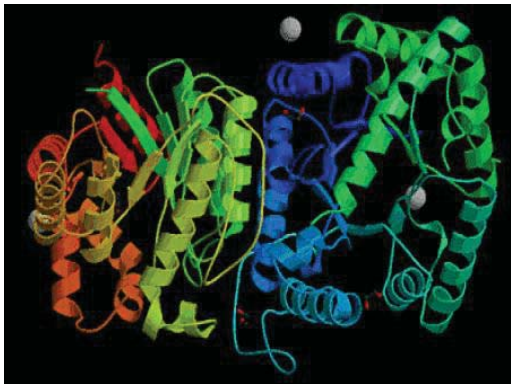
شکل ۱- ساختار سه بعدی فوتوپروتئین آکواورین و انتشار نور در حضور یون کلسیم



شکل۲- لوسیفرین مرجانی (کوالنترازین)

۲-۲- لوسیفراز باکتریایی

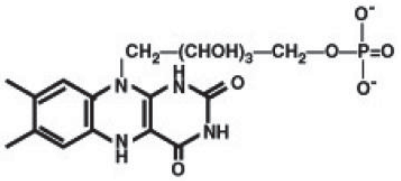
تمام لوسیفرازهای باکتریایی یک هترودایمر از دو پلی‌پپتید آلفا (α) و بتا (β) هستند. بررسی‌ها نشان‌دهنده خاصیت کاتالیتیکی آنزیم لوسیفراز باکتریایی به‌وسیله زیرواحد آلفا می‌باشد. در سال ۱۹۹۵ ساختار سه بعدی لوسیفراز باکتریایی از طریق کریستالوگرافی اشعه ایکس[1] تعیین شد (شکل ۳).



شکل ۳- ساختار سه بعدی لوسیفراز باکتریایی

1- X-ray Crystallography

لوسیفرین باکتریایی یک ریبوفلاوین فسفات احیا شده[2] است که در حضور اکسیژن و آلدهید زنجیره بلند به‌وسیله لوسیفراز اکسید می‌شود (شکل ۴).



شکل ۴- لوسیفرین باکتریایی

باکتری‌های نورافشان در نمونه‌های آب دریاها حاضر هستند و نسبت به سایر موجودات نورافشان از گستردگی بیشتری برخوردارند، به‌طوری که در گونه‌های پنج جنس زیر نشر نور گزارش شده است.

- Vibrio
- Photobacterium
- Photorhabdus
- Xenorhabdus
- Shewanella

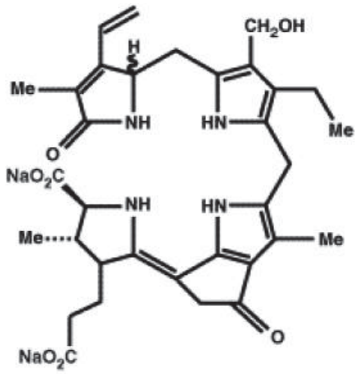
۲-۳- لوسیفراز داینوفلاژل

عملکرد لوسیفراز داینوفلاژل وابسته به pH محیط است. در جنس *Gonyaulax* مولکول لوسیفرین در pH=۸ توسط پروتئین‌های اتصال‌یابنده به لوسیفرین[3] از اثر لوسیفراز محافظت می‌شود، اما وقتی pH پایین می‌آید و به محدوده ۶ می‌رسد، آنگاه لوسیفرین آزاد می‌تواند با لوسیفراز واکنش دهد و نور تولید شود.

شکل تغییر یافته‌ای از این نوع لوسیفرین در میگوهای گیاه‌خوار یافت شده است که می‌تواند اشاره به زنجیره غذایی برای اکتساب لوسیفرین در طول تکامل داشته باشد.

لوسیفرین داینوفلاژل یک حلقه تتراپیرول[4] شبیه به کلروفیل[5] است (شکل ۵).

2- Reduced riboflavin phosphate
3- Luciferin binding protein (LBP)
4- Tetrapyrrole
5- Chlorophyll



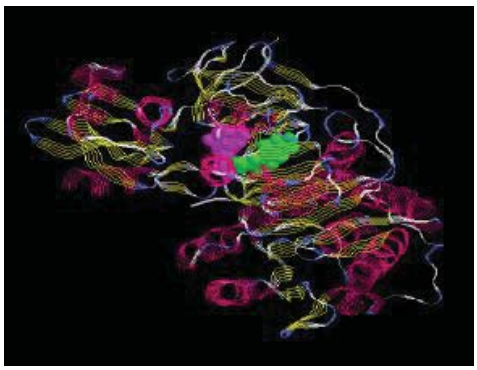
شکل ۵- لوسیفرین داینوفلاژل

۲-۴- لوسیفراز کرم شب‌تاب

واکنش لوسیفراز کرم شب‌تاب با لوسیفرین از دو مرحله تشکیل شده است. در مرحله اول که وجود ATP ضروری است حد واسط لوسیفریل آدنیلات[1] تشکیل می‌شود و در مرحله دوم لوسیفریل آدنیلات با اکسیژن مولکولی واکنش می‌دهد و اکسی لوسیفرین، دی اکسیدکربن و نور حاصل می‌شود.

لوسیفرین + ATP → لوسیفریل آدنیلات + PPi

لوسیفریل آدنیلات + O_2 → اکسی لوسیفرین + CO_2 + AMP + نور

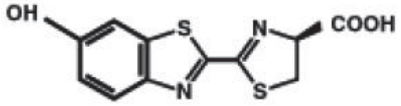


شکل ۶- ساختار سه بعدی لوسیفراز کرم شب‌تاب در حضور ATP

وود[2] در سال ۱۹۹۵ گزارش داد که لوسیفراز کرم شب‌تاب و زنجیره بلند آسیل کو آ سنتاز[3] همولوگ هستند که بیانگر منشأ تکاملی آنها از یک ژن است[۳].

1- Luciferyl adenylate
2- Wood
3- Acyl-CoA synthase

لوسیفرین کرم شب‌تاب یک حلقه بنزوتیازولتات[4] است (شکل ۷).



شکل ۷- لوسیفرین کرم شب‌تاب

۳- سازماندهی ژن لوسیفراز

۳-۱- ژن لوسیفراز باکتریایی

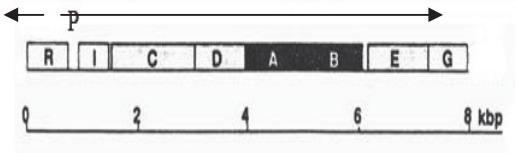
در سال ۱۹۹۰ زیتنر[5] برای اولین بار ژن‌های لوسیفراز سرده‌های *Vibrio*، *Photobacterium* و *Xenorhabdus* را کلون و توالی‌یابی نمود[۴].

زیرواحدهای α و β لوسیفراز باکتریایی به‌ترتیب توسط دو ژن *luxA* و *luxB* کد می‌شوند. ژن لوسیفراز باکتریایی از یک اپرون تشکیل شده است که علاوه بر آنزیم لوسیفراز، پروتئین‌های دیگری را نیز کد می‌کند که مرتبط با فعالیت لوسیفراز هستند و در تولید مریستیک آلدهید[6] دخالت دارند[۵]. هم‌چنین این اپرون دارای ژن‌هایی است که بیان و ایجاد پدیده بیولومینسانس را از طریق مکانیسم autoinduction کنترل می‌کنند[۵]. اپرون لوسیفراز از حدود ۱۰ ژن تشکیل شده است که این ژن‌ها فقط در حضور ترکیبات تحریک‌کننده‌ای موسوم به autoinducer رونویسی می‌شوند. این ترکیبات تحریک‌کننده از طریق ژن *luxI* واقع در اپرون تولید می‌شوند. نوع ترکیبات تحریک‌کننده در باکتری‌های گرم منفی ترکیبات هموسرین لاکتون[7] و در باکتری‌های گرم مثبت پپتیدهای کوچک است. ژن *luxR* مولکول‌گیرنده‌ای را کد می‌کند که با اتصال به autoinducer فعال می‌شود و بیان ژن‌های سمت راست اپرون را سبب می‌شود (شکل ۸).

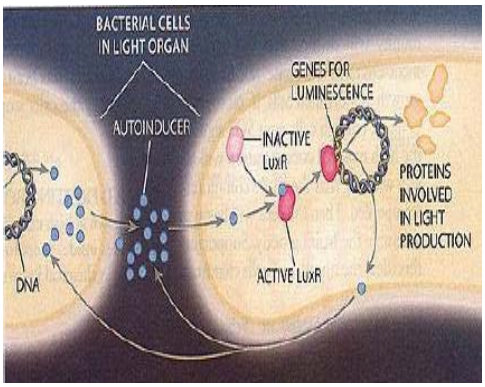
در سال ۱۹۹۴ فوکوآ[8] و همکاران پدیده اکولوژیک مهمی را کشف کردند که منطبق بر عملکرد دو ژن *luxI* و *luxR* در کنترل بیان ژن‌های ثانویه است. آنها این پدیده را Quarum sensing نامیدند که در آن ترکیبات تحریک‌کننده،

4- Benzothiazolethat
5- Szittner
6- Myristic aldehyde
7- Homoserine lactone
8- Fuqua

مسئول انتقال پیام در بین باکتری‌ها برای انجام عملی خاص (مثلاً تولید نور، ترشح آنزیمی خاص، فرار از شکارچی و...) هستند (شکل ۹)[۵].



شکل ۸- ژن لوسیفراز در *Vibrio Fischeri*
luxA* و *luxB* برای زیرواحدهای α و β لوسیفراز، *luxC*، *luxD
و *luxE* برای تولید آلدهید، *luxI* و *luxR* برای کنترل بیان اپرون



شکل ۹- ارتباط بین باکتری‌های نورافشان به‌وسیله autoinduction

۳-۲- ژن لوسیفراز داینوفلاژل

ژن لوسیفراز متعلق به سرده *Gonyaulax polyedra* اولین ژن لوسیفراز داینوفلاژلی بود که در سال ۱۹۹۳ توسط لی[۱] و همکاران کلون و یک سال بعد توسط بائه و هستینگز[۲] توالی‌یابی شد[۶ و ۷]. توالی یابیcDNA LBP مشخص کرد که از ۲۰۰۴ نوکلئوتید که مجموعاً ۶۸۸ اسیدآمینه (۷۵ kDa) را کد می‌کند تشکیل شده است. هم‌چنین مشخص شد که ژن LBP فاقد اینترون و نواحی پلی آدنیلیشن است. نکته جالب این است که رونویسی از این ژن روزی یک بار صورت می‌گیرد و پروتئین LBP هرروز تخریب می‌شود[۷]. اندازه ژن لوسیفراز داینوفلاژل ۴/۱ kb و همانند ژن LBP فاقد اینترون است. وزن مولکولی آنزیم لوسیفراز آن ۱۳۰ kDa می‌باشد.

مطالعات نشان داد که LBP در اتصال وابسته به pH لوسیفرین، و لوسیفراز در اکسیداسیون لوسیفرین و تولید نور دخالت دارند. در سال ۲۰۰۱ اوکاموتو[۳] و همکاران سه کلاس جدید از ژن لوسیفراز را در گونه‌های جدید داینوفلاژل *Pyrocystis lunula* و *Lingulodinium polyedrum* گزارش دادند[۸]. این ژن‌ها *lcfA*، *lcfB* و *lcfC* نامیده شدند که منحصر به فرد هستند و ارتباطی با ژن‌های لوسیفراز داینوفلاژل‌های دیگر ندارند. ژن‌های *lcfA* و *lcfB* از طریق یک رابط ژنی ۲/۲kb به یکدیگر متصل هستند. آنها هم‌چنین دریافتند که ژن *lcfC* در *P. lunula* دارای یک اینترون است.

۳-۳- ژن لوسیفراز کرم شب‌تاب

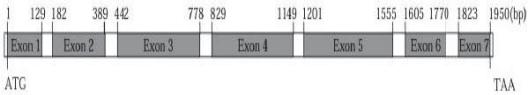
ژن لوسیفراز کرم شب‌تاب اولین بار در سال ۱۹۸۵ توسط وت[۴] و همکاران از گونه *Photuris pennsylvanica* متعلق به زیرخانواده *Photurinea* کلون شد. اندازه این ژن در حدود kb ۱/۸ است که ۵۴۵ اسید آمینه را کد می‌کند. ناحیه ´۵ نان‌کدینگ آن ۶۱bp و ناحیه ´۳ نان‌کدینگ آن ۱۳۵bp است. دم پلی‌آ[۵](ی) آن ۲۴ نوکلئوتید طول دارد[۹].

وود[۶] و همکاران در سال ۱۹۹۵ همولوژی توالی اسید آمینه‌ای لوسیفراز کرم شب‌تاب را با توالی سایر آنزیم‌های شناخته شده مقایسه کردند و نشان دادند که با آنزیم‌های زیر شباهت دارد:[۱۰]

- آدنیلات کیناز[۷]
- لوسیفرین ۴- مونواکسیژناز[۸]
- ۴- کومارات کوآ لیگاز[۹]
- زنجیره بلند اسید چرب کوآ لیگاز[۱۰]
- ۲- اسیل گلیسرول فسفات اتانول آمین آسیل ترانسفراز[۱۱]
- آنزیم‌های سنتز آسیل آدنیلات[۱۲]

در سال ۲۰۰۳ چوئی[۱۳] و همکاران سازماندهی ژن لوسیفراز را در گروه *Hotaria*کرم شب‌تاب مطالعه کردند (شکل ۱۰) [۱۱].

1- Lee
2- Bae and Hastings
3- Okamato
4- Wet
5- PolyA tail
6- Wood
7- Adenylate kinase
8- Luciferin 4-monooxygenase
9- 4-coumarate CoA ligase
10- Long-chain fatty acid CoA ligase
11- 2-acylglycerophosphoethanolamine acyltransferase
12- Acyladenylate-synthesizing enzymes
13- Choi

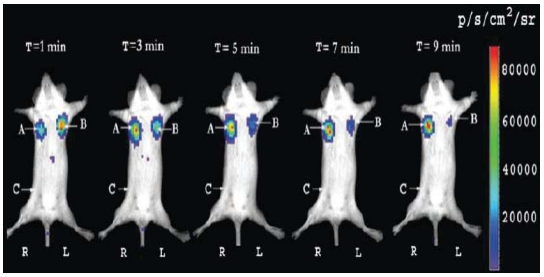


شکل ۱۰- اگزون و اینترون‌ها در ساختار ژن لوسیفراز کرم شب‌تاب گروه *Hotaria*، (عددها بیانگر طول هستند.)

۴- کاربردهای لوسیفراز در زیست فناوری

۴-۱- عکسبرداری از بافت‌ها

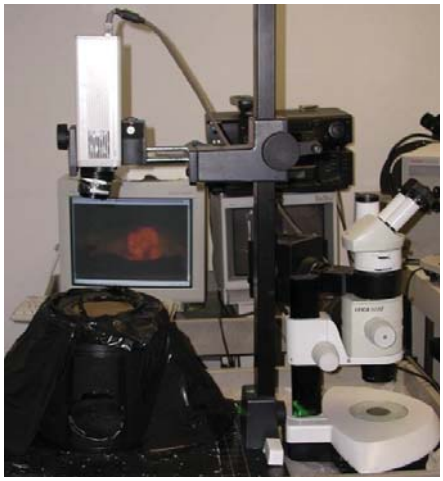
از ویژگی‌های مهم لوسیفراز تغییر خاصیت نشر نور در آن است، لذا با فرستادن آن به بافت‌های مختلف و تولید نور به‌وسیله آن می‌توان از آن بافت‌ها تصویربرداری کرد. در سال ۲۰۰۲ بهامیک و گامبهیر[1] بیان کردند که لوسیفراز رنیلا[2] و کرم شب‌تاب، هر دو می‌توانند از طریق به‌کارگیری پیش‌ماده‌هایشان و مطالعه سینتیک آنها برای عکسبرداری در بافت مورد استفاده قرار گیرند. آنها آزمایشی در موش طراحی کردند که در آن از طریق انتقال ژن به داخل سلول (transfection)، سلول‌های C6 جدیدی دارای ژن لوسیفراز کرم شب‌تاب (*fluc*) و ژن لوسیفراز رنیلا (*rluc*) ایجاد کردند و آنها را به نواحی مختلف موش تزریق کردند (شکل ۱۱)[۱۲ و ۱۳].



شکل ۱۱- سینتیک تولید نور موش حامل سلول‌های C6-*Fluc* و C6-*Rluc* بعد از تزریق همزمان لوسیفرین و کوالنترازین به سیاهرگ دمی. سلول‌های C6-*Fluc*(A)، C6-*Rluc*(B) و C6 control(C) به ترتیب به بازوی راست، بازوی چپ و ران راست تزریق شده‌اند. سیگنال بیولومینسانس در ناحیه بازوی راست، با سینتیک افزایشی و در ناحیه چپ با سینتیک کاهشی همراه است. در ناحیه ران راست که سلول‌های کنترل C6 تزریق شده‌اند، سیگنالی دریافت نشده است.

1- Bhaumik and Gambhir
2- Renilla

شکل (۱۲) دستگاه عکسبرداری بیولومینسانس را نشان می‌دهد.



شکل ۱۲- دستگاه عکسبرداری بیولومینسانس

۴-۲- آشکارکننده زیستی در بیان ژن‌ها

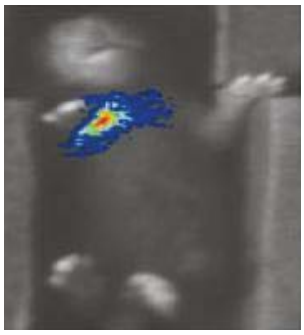
در سال ۲۰۰۱ هال[3] و همکاران از لوسیفراز برای مطالعه نحوه بیان شبانه‌روزی ژن فیتوکروم A[4] در گیاه *Arabidopsis* استفاده کردند. آنها ژن لوسیفراز را با ژن فیتوکروم A ممزوج کردند و از طریق بیان همزمان این دو ژن توانستند الگوی بیان فیتوکروم A را در بافت‌های گیاه بررسی نمایند (شکل ۱۳)[۱۴].

شکل ۱۳- نورافشانی گیاه *Arabidopsis* در مناطقی که فیتوکروم A بیان می‌شود.

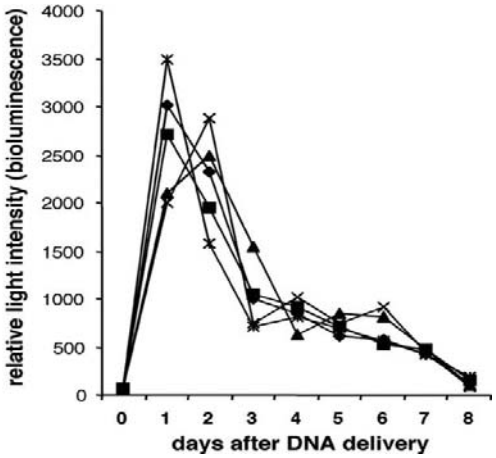
3- Hall
4- Phytochrome A

آشکارسازی بیان ژن‌های درمانی گزارشگر[1] می‌تواند نقش مهمی در کنترل رسیدن موثر ژن‌ها به سلول‌های هدف داشته باشد. لوسیفرازها نقش مهمی در گزارش سطح، موقعیت و مدت زمان بیان ژن دارند.

در سال ۲۰۰۰ ونگ[2] و همکاران با استفاده از انتقال ژنی سلول سوماتیکی[3]، ژن هم‌اکسیژناز-۱(*HO-1*) متصل به ژن *fluc* را با استفاده از تزریق ریوی[4] به شش نوزاد موش وارد کردند. زمانی که ژن *HO-1* بیان می‌شود، ژن *fluc* متصل به آن نیز بیان می‌گردد و در نتیجه، آنها توانستند در هر لحظه شدت و موقعیت بیان ژن هدف را مشخص نمایند (شکل ۱۴)[۱۵].



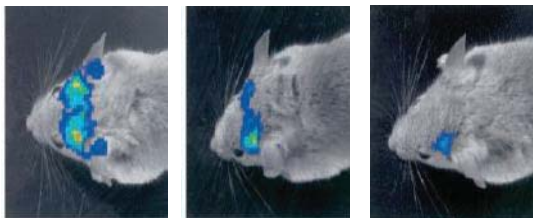
شکل ۱۴- تصویربرداری پس از تزریق لوسیفرین و ۲۴ ساعت بعد از دریافت ژن. رنگ آبی کمترین شدت، و رنگ قرمز بیشترین شدت سیگنال را بیان می‌کند.



نمودار ۱- نمودار شدت سیگنال از شش راست پنج نوزاد موش، هریک از اشکال بیانگر یک نمونه موش است.

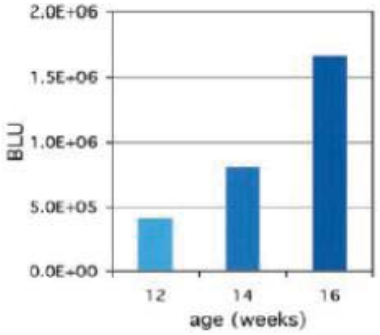
1- Reporter therapeutic genes
2- Weng
3- Somatic cell gene transfer
4- Transpulmonary injection

در تحقیقی که در سال ۲۰۰۲ توسط ووجیس[5] و همکاران انجام شد، پیشرفت سرطان غده هیپوفیز وابسته به ژن سرکوبگر رتینوبلاستوما[6] از طریق بیان همزمان با ژن *fluc* مورد بررسی قرار گرفت[۱۶]. با تصویربرداری بیولومینسانس می‌توان اندازه تومور و هم‌چنین پیشرفت روند شیمی‌درمانی را ارزیابی کرد (شکل ۱۵).



(الف) هفته۱۲ (ب) هفته۱۴ (ج) هفته۱۶

شکل ۱۵- اندازه‌گیری شدت سیگنال بیولومینسانس در هفته‌های ۱۲، ۱۴و ۱۶. نشان دهنده رشد نمایی تومور سرطانی بین هفته ۱۲ تا ۱۶ است.

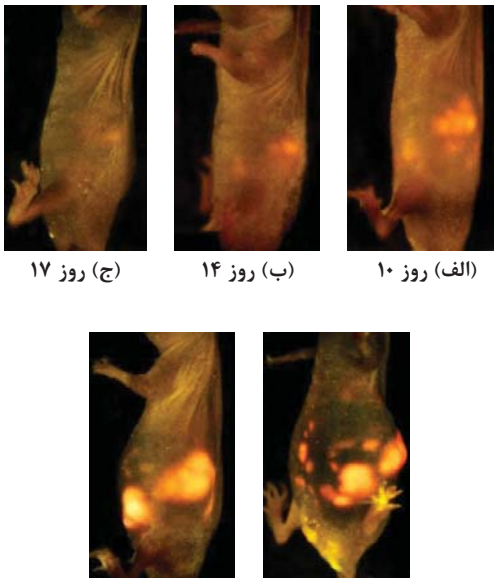


نمودار ۲- نمودار شدت لومینسانس در هفته‌های ۱۲، ۱۴ و ۱۶

در سال ۲۰۰۴ دویل[7] و همکاران پیشرفت سرطان پانکراس موش و متاستازی شدن آن را از طریق بیان همزمان ژن دخیل در سرطان و ژن *fluc* مورد مطالعه قرار دادند (شکل۱۶)[۱۷]. طول موج‌های کوتاه‌تر نور (سبز و آبی) عمدتاً به‌وسیله بافت‌ها جذب می‌شوند، در حالی که طول موج‌های بلندتر (قرمز) کمتر جذب می‌شوند. هموگلوبین و ملانین، جذب‌کننده‌های اصلی نور در بدن هستند. امروزه از طریق جهش‌های هدفمند در ژن لوسیفراز کرم شب‌تاب، لوسیفراز جهش یافته‌ای ایجاد کرده‌اند

5- Voojis
6- Retinoblastoma suppressor gene
7- Doyle

که نور قرمز منتشر می‌کند. نور قرمز می‌تواند از میان چند سانتیمتر بافت عبور کند و به دلیل جذب بسیار کمتر نسبت به نور سبز و آبی آسان‌تر نمایان شود[۱۸].



(الف) روز ۱۰ (ب) روز ۱۴ (ج) روز ۱۷

(د) روز ۲۴ (ه) روز ۲۸

شکل ۱۶- عکسبرداری بیولومینسانس از موش مبتلا به سرطان پانکراس. از روز ۱۴ متاستاز مشاهده می‌شود.

۴-۳- تعیین میزان فعالیت راه‌انداز ژن

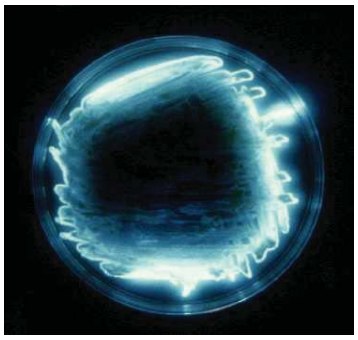
از آنزیم لوسیفراز برای تعیین میزان فعالیت راه‌انداز ژن استفاده می‌شود. در این روش، ژن لوسیفراز را تحت کنترل راه‌انداز مورد نظر قرار می‌دهند و به‌وسیله پلاسمید وارد سلول نمونه می‌کنند. هرچقدر راه‌انداز فعال‌تر باشد، میزان رونویسی از ژن لوسیفراز بیشتر است. در مرحله بعد با استفاده از محلول بافر غشاء، سلول‌های نمونه را می‌شکنند و پروتئین‌های موجود در سلول‌ها از جمله لوسیفراز را خارج می‌کنند. سپس با به‌کار بردن مقدار مناسبی از لوسیفرین، نورافشانی آن را اندازه می‌گیرند. هر چقدر نورافشانی لوسیفرین در اثر واکنش با لوسیفراز تولید شده بیشتر باشد، میزان فعالیت راه‌انداز ژن در پلاسمید بیشتر است.

در سال ۲۰۰۲ مطالعه ای توسط کارلسن[1] و همکاران بر روی موش ترنس‌ژنیک[2] انجام شد، که در آن ژن *fluc* تحت کنترل راه‌انداز Nuclear factor 6B (NF-6B) بیان می‌شود. آنها از این طریق میزان فعالیت راه‌انداز NF-6B را در موش تعیین کردند[۱۹]. در رابطه با سایر راه‌اندازها نیز می‌توان این کار را انجام داد و میزان فعالیت راه‌اندازهای مختلف را از طریق سنجش با لوسیفراز به‌دست آورد.

۴-۴- لوسیفراز به عنوان زیست حسگر

۴-۴-۱- زیست حسگر برای ترکیبات سمی

از باکتری‌های نورافشان به‌عنوان زیست حسگر برای شناسایی طیف وسیعی از آلوده‌کننده‌ها و هم‌چنین برای ارزیابی زیست آمادگی[3] در نمونه‌های محیطی استفاده می‌شود. *Photobacterium phosphoreum* یک باکتری نورافشان است که کلنی‌های آن نور مرئی از خود ساطع می‌کنند (شکل ۱۷). میزان سمیت ترکیبات با تولید انرژی سلولی (ATP) رابطه عکس دارد. بنابراین هرچه ترکیب سمی‌تر باشد میزان تولید ATP و نورافشانی لوسیفراز کاهش می‌یابد.

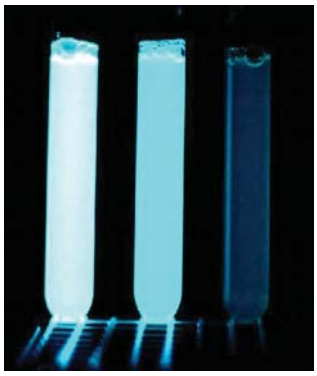


شکل ۱۷- کلنی‌های *P. phosphoreum*

با اندازه‌گیری میزان نور ساطع شده از این باکتری می‌توان میزان سمیت ترکیبات مختلف را به‌دست آورد (شکل ۱۸).

در سال ۱۹۹۹ هولیس[4] و همکاران ژن لوسیفراز کرم شب‌تاب *Photinus pyralis* را وارد مخمر *Saccharomyces cerevisiae* کردند و از آن به عنوان زیست حسگر برای ترکیبات سمی استفاده کردند. ترکیبات سمی، میزان تنفس سلولی و تولید ATP را کاهش می‌دهند بنابراین باعث کاهش نورافشانی لوسیفراز کرم شب‌تاب می‌شوند[۲۰].

1- Carlsen
2- Transgenic
3- Bioavailability
4- Hollis



شکل ۱۸- نورافشانی P. phosphoreum در حضور ترکیبات سمی. ترکیبی که کمترین روشنایی را دارد از بیشترین سمیت برخوردار است.

۴-۴-۲- زیست حسگر برای عناصر سنگین

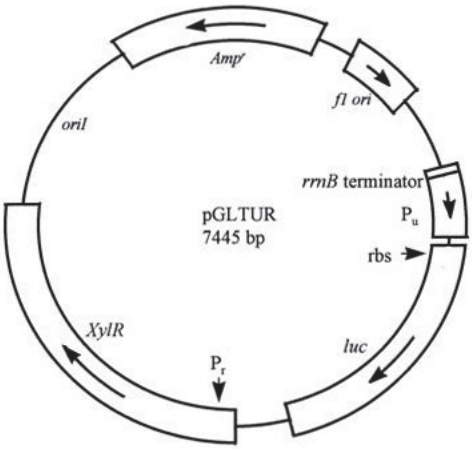
برخی از باکتری‌ها دارای ژن‌های مقاوم در عناصر سنگین هستند. با استفاده از بیان همزمان این ژن‌ها و ژن لوسیفراز می‌توان زیست حسگرهای کارآمدی برای تشخیص این عناصر ساخت.

باکتری *Serratia marcescens* با داشتن اپرون *mer* در برابر عنصر جیوه و باکتری *Staphylococcus aureus* با داشتن اپرون *cad* در برابر عنصر کادمیم مقاومت نشان می‌دهند. می‌توان اپرون‌های فوق را به وکتور بیانی حاوی ژن‌های *lux* باکتریایی وارد کرد و سپس وکتور را به باکتری *E. coli* انتقال داد. هنگامی که این باکتری نوترکیب در معرض عناصر سنگین فوق قرار می‌گیرد، اپرون‌های مذکور را روشن می‌کند و در نتیجه، ژن‌های *lux* نیز بیان می‌شوند. با بیان شدن ژن‌های *lux* لوسیفراز باکتریایی تولید می‌شود و نور ساطع می‌کند.

۴-۴-۳- زیست حسگر برای ترکیبات تولوئنی

بعضی از باکتری‌های خاک‌زی دارای اپرون‌هایی برای تجزیه هیدروکربن‌های حلقوی هستند. یکی از آنها *Pseudomonas putida* است که با داشتن پلاسمید pWWO قادر است ترکیبات تولوئنی و مشتقاتش را تجزیه کند. این پلاسمید دارای اپرون *tol* است که آنزیم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات فوق را کد می‌کنند. در حضور ترکیبات تولوئنی راه‌انداز P_r فعال شده و ژن *XylR* روشن می‌شود. پروتئین XylR یک فعال‌کننده رونویسی است و باعث فعال شدن راه‌انداز P_u می‌شود. ژن‌های آنزیم‌های تجزیه‌کننده تحت کنترل P_u می‌باشند. فعال شدن این راه‌انداز باعث تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده و تجزیه ترکیبات تولوئنی می‌شود. با وارد کردن ژن گزارشگر *fluc* در اپرون *tol* و بیان آن تحت کنترل راه‌انداز P_u می‌توان زیست حسگری برای ترکیبات تولوئنی مختلف مثل تری‌نیتروتولوئن (TNT) ساخت (TNT در ساخت ترکیبات منفجره مثل مین[1] کاربرد دارد).

در سال ۱۹۹۸ ویلاردسون[2] و همکاران زیست حسگری برای شناسایی ترکیبات تولوئنی ابداع کردند. آنها پلاسمید نوترکیب pGLTUR را که حاوی ژن لوسیفراز کرم شب‌تاب بود وارد باکتری *E. coli* کردند. در حضور ترکیبات تولوئنی ازجمله TNT راه‌انداز P_u توسط XylR فعال شده و رونویسی از ژن لوسیفراز صورت می‌گیرد (شکل ۱۹)[۲۱ و ۲۲].



شکل ۱۹- پلاسمید نوترکیب pGLTUR ژن‌های *fluc* و *XylR* به ترتیب تحت کنترل راه‌اندازهای P_u و P_r هستند.

در سال ۲۰۰۳ برامه[3] و همکاران زیست حسگر کارآمدتری برای شناسایی مین‌ها ساختند. آنها پلاسمید فوق را وارد باکتری *P. putida* کردند با این تفاوت که به جای ژن *fluc* از ژن GFP استفاده کردند (شکل ۲۰)[۲۳]. لوسیفراز کرم شب‌تاب یک آنزیم نیازمند به ATP و سوبسترا است و تنها در حضور آنها نشر می‌کند، در حالی که GFP بی نیاز از آنهاست و با طول موج‌های بلند UV و یا خودبه‌خود در نور روز تهییج می‌شود و نورافشانی می‌کند. علاوه بر این، چون باکتری *P.*

1- Mine
2- Willardson
3- Brahme

putida به‌طور طبیعی در محیط خاکی زندگی می‌کند و هیچ مورد بیماری‌زایی از آن گزارش نشده است، انتخاب مناسب‌تری نسبت به باکتری *E. coli* در شرایط محیطی محسوب می‌شود.

شکل ۲۰- شناسایی مین‌ها با استفاده از زیست حسگر

۴-۴-۴- زیست حسگر برای سنجش میزان کلسیم درون سلولی

از آنجایی‌که نورافشانی لوسیفراز مرجانی وابسته به یون کلسیم است، از این نوع لوسیفراز به عنوان زیست حسگر برای سنجش میزان کلسیم درون‌سلولی و تغییرات آن در برابر تحریک cAMP استفاده می‌شود. در سال ۱۹۹۵ جانسون[1] و همکاران از لوسیفراز مرجانی برای سنجش میزان تغییرات شبانه‌روزی کلسیم آزاد در کلروپلاست دو گونه گیاهی *Tobacco* و *Arabidopsis* استفاده کردند[۲۴و۲۵].

۴-۴-۵- زیست حسگر برای سنجش میزان ATP

واکنش لوسیفراز کرم شب‌تاب با لوسیفرین خود فقط در حضور ATP صورت می‌پذیرد. به همین دلیل از این نوع لوسیفراز برای سنجش میزان ATP استفاده می‌شود و امروزه کیت‌های سنجش ATP بر همین اساس ساخته می‌شوند. در سال ۱۹۹۷ هستینگز[2] و همکاران از لوسیفراز کرم شب‌تاب برای اندازه‌گیری میزان ATP استفاده کردند[۲۶].

1- Johnson
2- Hastings

۵- نتیجه‌گیری

این آنزیم امروزه به طور وسیعی در همه رشته‌های ممکن علوم به کار گرفته می‌شود و به یک تکنولوژی قدرتمند در تحقیقات تبدیل شده است. کاربردها و دانش درباره این آنزیم و پدیده بیولومینسانس هر روز در حال پیشرفت است.

مراجع

1. Hastings J W and Morin J G. Bioluminescence in neural and integrative animal physiology, Prosser, C.L. ed., Wiley-interscience, New York, pp. 99-104; **(1991).**
2. Shimomura O, Johnson F H and Saiga Y. Extraction , purification and propertie sof aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. J. Cell comp. Physiol. 59: 223-240; **(1962)**
3. Wood K V. The chemical mechanism and the evolutionary development of beetle luminescence. Photochem. Photobiol. 62: 662-673; **(1995).**
4. Szittner R and Meighen E. Nucleotide sequence, expression, and properties of luciferase coded by lux genes from a terrestrial bacterium J. Biol. Chem. 265: 16581-16587**;(1990).**
5. Karen L V, Foster J, Doino J, McFall-Ngai M, and Ruby E G. Vibrio fischeri lux Genes Play an Important Role in Colonization and Development of the Host Light Organ J Bacteriol. August; 182 (16): 4578–4586; **(2000).**
6. Lee D H., Mittag M, Sczekan S, Morse D, and Hastings J W. Molecular cloning and genomic organization of a gene for luciferin-binding protein from dinoflagellate Gonyaulax polyedra. J. Biol. Chem. 268, 8842-8850; **(1993).**
7. Bae, Y M and Hastings J W. Cloning, sequencing and expression of dinoflagellate luciferase DNA from a marine alga, Gonyaulax polyedra. Biochim. Biophys. Acta, 1219: 449-456. Seeing fundamental biological processes in a new light. Genes & development 17: 545–580; **(1994).**
8. Okamoto O K, Liu L, Deborah L. Robertson, and Hastings J W. Members of a Dinoflagellate Luciferase Gene Family Differ in Synonymous Substitution Rates. Biochemistry, 40, 15862-15868; **(2001).**
9. Wet D J. Wood K, Helinski D, and DeLuca M. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7870-7873 ;(1985).
10. Wood K V. The chemical mechanism and the evolutionary development of beetle luminescence. Photochem. Photobiol. 62: 662-673**;(1995).**

11. Choi Y S, Bae J S, Lee K S, Kim S R, Kim I, Kim J G, Kim K Y, Kim S E, Suzuki H, Lee S M, Sohn H D and Jin B R. Genomic structure of the luciferase gene and phylogenetic analysis in the Hotaria-group fireflies Comparative Biochemistry and Physiology Part B 134: 199–214; **(2003).**
12. Bhaumik S and Gambhir S S. Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in livingmice. Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 377–382; **(2002).**
13. Roda, A., Guardigli, M., Michelini, E., and Mirasoli, M. Bioluminescence in Analytical Chemistry and in Vivo Imaging. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 28, 307-322; (2009).
14. Hall A, Kozma-Bognar L, Reka T, Nagy F, and Millar A J, Conditional Circadian Regulation of PHYTOCHROME A Gene Expression Plant Physiology, , Vol. 127, 1808– 1818; **(2001).**
15. 15. Weng Y H, Tatarov A, Bartos B P, Contag C H., and Dennery P A. HO-1 expression in type II pneumocytes after transpulmonary gene delivery. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 278: L1273–L1279**;(2000).**
16. 2002, Vooijs M, Jonkers J, Lyons S, and Berns A. Noninvasive Imaging of Spontaneous Retinoblastoma Pathway-dependent Tumors in Mice1 CANCER RESEARCH 62, 1862–1867
17. Doyle, T.C., Burns, S.M. and Contag, C.H. Cell. Microbiol, 6, 303-317; **(2004).**
18. Branchini, B. R., Southworth, T. L., Khattak, N. F., Michelini, E., and Roda, A. Red- and Green-Emitting Firefly Luciferase Mutants for Bioluminescent Reporter**; (2005).**
19. Carlsen H, Moskaug J O, Fromm, S H, and Blomhoff, R. In vivo imaging of NF-6B activity. J. Immunol.168: 1441–1446; **(2002).**
20. Hollis R P, Killham K and Glover L A. Design and Application of a Biosensor for Monitoring Toxicity of Compounds to Eukaryotes Appl Environ Microbiol 66 (4): 1676–1679; **(2000).**
21. Willardson BM, Wilkins JF, Rand TA, Schupp JM, Hill KK, Keim P, Jackson PJ. Development and testing of a bacterial biosensor for toluene-based environmental contaminants. Appl Environ Microbiol 64:1006–1012; **(1998).**
22. Garmendia J, de las Heras A, Galva˜o TC, de Lorenzo V. Tracing explosive in soil with transcriptional regulators of Pseudomonas putida evolved for responding to nitrotoluenes. Microb Biotechnol 1:236–246; **(2008).**
23. Brahme C. Development and Testing of Pseudomonas putida as TNT fluorescent Biosensor. Biosensors 2:132-212**; (2003).**
24. Johnson C H, Knight M R, Kondo T, Masson P, Sedbrook J, Haley A and Trewavas A. Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. Science 269: 1863-1865**; (1995).**
25. Saran S, Nakao H, Tasaki M, Iida H, Nanhundiah V, and Takeuchi I. Intracellular free calcium level and its response to cAMP stimulation in developing Dictyostelium cells transformed with jellyfish apoaequorin cDNA. FEBS Lett. 337: 43-47**(1994).**
26. Hastings J W, Kricka L and Stanley P. Bioluminescence and; Chemiluminescence: Molecular reporting by photons. J. Wiley, Chicester, UK. **(1997).**

Luciferase and its New Applications in Biotechnology

Arash Ghahroudi-Tali[1]

Mojtaba Saadati[2]

Mohamad Doroudian[3]

Mohamad Ebrahim Minaii

Abstract

Luciferase and its substrate (luciferin) are responsible for bioluminescence in living organisms. All known luciferases are oxygenases and they oxidize the luciferin using molecular oxygen, producing light as a result of oxidation. Luciferases are classified into four types based on the organisms from which they originated: Coelenterate luciferase, Bacterial luciferase, Dinoflagellate luciferase, and Firefly luciferase, they are quite different biochemically and genetically and have been derived from distinct evolutionary origins. Nowadays luciferase is used in biotechnology as an important enzyme and its new applications are developing. These applications are: 1- Imaging of different cells and tissues by changing their property of light emission, 2- Used as biological detector in the study of genes expression through simultaneous expression with luciferase gene, 3- Determining the activity of different gene promoters by putting luciferase gene under the control of the promoter, and 4- Production of biosensors for detecting poisonous compounds, heavy metals (such as Cadmium and Mercury), toluene and its derivatives like TNT as well as measuring intracellular calcium changes and ATP.

Key Words: *Luciferase, Bioluminescence, Imaging of Tissues, Biological Detector, Biosensor*

1- Biology Researches Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran Email: ghahroudi.arash@gmail.com
2- Biology Researches Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran
3- Young Researchers Club, Islamic Azad University, Tehran Markaz 15655/461