

کلون سازی مولکولی ژن های *luxA* و *luxB* باکتری *Vibrio fischeri*

- گلناز اسعدی تهرانی: واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران صندوق پستی: ۱۴۵۱۵-۷۷۵
 - سینا میرزا احمدی: واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران صندوق پستی: ۱۴۵۱۵-۷۷۵
 - مژگان بنده پور: مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
 - فرامرز لالویی: پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری صندوق پستی: ۹۶۱
 - بهرام کاظمی*: مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
 - اکرم عیدی: واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران صندوق پستی: ۱۴۵۱۵-۷۷۵
 - تورج ولی نسب: موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۱۶
- تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۰

چکیده

پروتوافکنی زیستی در باکتری ها پدیده ای است که توسط آنزیم های لوسی فراز سازماندهی می گردد. این آنزیم ها بصورت هتروداایمری متشکل از زیر واحدهای α و β هستند که توسط ژنهای *luxA* و *luxB* رمز شده و همراه با ژنهای *luxCDE* رمز کننده پروتئین های مورد نیاز جهت سنتز سوبسترای آلدئیدی، اپران *lux* باکتری *Vibrio fischeri* را تشکیل می دهند. در تحقیق حاضر ناحیه کروموزومی واجد ژنهای *luxA* و *luxB* باکتری *Vibrio fischeri* تکثیر شده و متعاقباً قطعات تزايد پافته در وکتور pTZ57R کلون گردیدند. تائید کلونینگ ژنهای *luxA* و *luxB* بواسطه روشهای PCR و هضم آنزیمی صورت پذیرفت. سرانجام تائید نهایی ژن های کلون شده *luxA* و *luxB* توسط روش تعیین توالی انجام گرفت که بترتیب به میزان ۹۵ و ۸۹ درصد همسانی با توالی های مرتبط در بانک ژنی را نشان دادند.

کلمات کلیدی: پروتوافکنی زیستی، لوسی فراز، اپران *lux*، *Vibrio fischeri*



مقدمه

پرتو افکنی زیستی در باکتری‌ها پدیده‌ای است که توسط آنزیمهای لوسی فراز (*Lux*) سازماندهی می‌گردد. این آنزیم‌ها قادر به کاتالیز نمودن واکنش اکسیداسیون فلاوین منونوکلئوتید FMN₂ و آلدئید آلیفاتیک زنجیره بلند در حضور اکسیژن مولکولی می‌باشند، در نتیجه این واکنش علاوه بر فرم اکسید FMN، آب و اسید چرب، نور آبی- سبز با طول موج ۴۹۰ نانومتر نیز ساطع می‌شود (۶) (شکل ۱).

این واکنش اساساً در سه جنس *Photobacterium*، *Vibrio* و *Xenorhabdus* شناسایی شده است و آنزیم لوسی فراز از پنج گونه جداسازی و مورد مطالعه قرار گرفته است:

Vibrio (photobacterium) fischeri، *Vibrio (Bencekea) harveyi*، *Photobacterium phosphoreum*، *P. leiognathi* و *Xenorhabdus luminescens* (۱۰). چهار گونه اول در محیطهای آبی یافت می‌شوند و گونه آخر خشکی‌زی می‌باشد. کلیه این آنزیم‌ها واکنشهای شیمیایی یکسانی را کاتالیز می‌کنند (۱۱ و ۱۵).

باکتری *Vibrio fischeri* یکی از بهترین نمونه‌های باکتریهای نورزای آبی مورد مطالعه قرار گرفته است، که ممکن است بصورت آزادزی پلانکتونیک یا به فرم همزیست در اورگان‌های نوری برخی از ماهی‌ها یا اسکوئیدها مانند *Euprymna scolopes* رشد نماید. در این باکتری رگولان لوکس متشکل از دو اپران با جهات رونویسی متفاوت می‌باشد: اپران سمت راست شامل هفت ژن (*luxICDABEG*) بوده که ژنهای مورد نیاز برای سنتز خود القاء کننده (*luxI*)، زیرواحدهای α و β آنزیم لوسی فراز (*luxAB*)، ژنهای دخیل در سنتز آلدئید آلیفاتیک زنجیره بلند (*luxCDE*) و افزایش سنتز فلاوین منو نوکلئوتید (*luxG*) را کد می‌نمایند. اپران سمت چپ تنها از یک ژن *luxR* تشکیل شده است که کدکننده پروتئین تنظیم کننده رونویسی اپران است. تنها در شرایط چگالی بالای سلولی، مولکول سیگنال کد شده توسط ژن *luxI* (N3-oxo-C6-HSL) به حد آستانه مورد نیاز جهت اتصال به پروتئین *luxR* می‌رسد، متعاقباً کمپلکس *luxR*-AHL مستقیماً از طریق فعال نمودن رونویسی ژنهای اپران (*luxICDABEG*) منجر به نورزایی می‌گردد (۱۴).

بررسی هتروداایمر $\alpha\beta$ رمز شده توسط ژنهای *luxA* و *luxB* آنزیم لوسی فراز نشان داد که بترتیب واجد وزن مولکولی ۵۲-

۴۰ و ۳۶-۴۱ کیلودالتونی بوده و هومولوژی مشاهده شده در توالی دو زیر واحد مذکور بر این فرض دلالت دارد که دو ژن به لحاظ تکاملی، محصول مضاعف شدگی ژنی می‌باشند (۳). یک جایگاه فعال آنزیمی در زیر واحد α مستقر می‌باشد که به مولکول فلاوین احیاء شده متصل می‌گردد. نقش زیر واحد β دقیقاً مشخص نمی‌باشد اما چنین به نظر می‌رسد که برای افزایش محصول کوآنزیمی ضروری باشد میزان درجه هومولوژی مشاهده شده از طریق تطبیق و مقایسه توالی‌های آمینواسیدی بین دو زیر واحد ۳۲ درصد و در بین گونه‌های مختلف ۵۰-۶۰ درصد می‌باشد (۱). با این وجود کینتیک ایجاد نور در بین لوسی فرازهای گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد. بطوریکه باکتری *Vibrio harveyi* پایین‌ترین میزان کینتیک ($0.12s^{-1}$ در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد) را نشان داده در حالیکه سایر باکتریها از نرخ کینتیک نسبتاً بالاتری برخوردار هستند ($1s^{-1}$ در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد) (۱۳). طبق گزارشات بعمل آمده در باکتری *Vibrio fischeri* سویه Y-1 وجود یک پروتئین فلورسانت زرد (YEP) بعنوان یک پروتئین کمکی قادر به تشکیل یک کمپلکس موقتی با ژنهای لوکس می‌باشد که این امر سبب افزایش طول موج پرتوهای ساطع شده می‌گردد (۲). پروتئین کمکی مشابهی نیز تحت عنوان لومازین Lumazine در گونه‌های *P. phosphoreum* و *P. leiognathi* شناسایی شده است که بر خلاف YEP نور ساطع شده را به سمت طول موج‌های پایین‌تری سوق می‌دهد (۹).

در باکتری *Vibrio harveyi* زیرواحدهای α و β بترتیب واجد ۳۵۵ و ۳۲۴ اسید آمینه می‌باشند که جایگاه قرارگیری ۲۹- اسید آمینه اضافه موجود در زیر واحد α ، بین ریشه‌های ۲۵۹- ۲۵۸ از زیر واحد β می‌باشد. این ناحیه از زیر واحد α در شرایط فقدان سوبسترا به شدت نسبت به هضم توسط آنزیم‌های پروتئاز حساس می‌باشد بطوریکه یک برش پروتئولیتیک منفرد در آمینواسیدهای ۲۹۱-۲۷۴ در زیر واحد α آنزیم را به کلی غیرفعال می‌سازد. البته طی چرخه کاتالیتیکی اتصال FMN₂ به زیر واحد α حساسیت نسبت به پروتئازها را کاهش می‌دهد. مطالعات انجام گرفته نشان داده است که برخلاف زیر واحد α ، زیر واحد β فاقد حساسیت پروتئازی بوده و در نتیجه تشکیل کمپلکس α - β از هضم پروتئازی ممانعت بعمل می‌آورد.





شکل ۱: واکنش عمومی نورافکنی زیستی باکتری‌ها

پس از مشاهده کلنی‌های نورزا در محیط کشت، بخشی از محیط توسط آنس به یک میکروتیوپ استریل انتقال یافته و به آن مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز اضافه گردید و نمونه به مدت ۲ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد، DNA ژنومی از طریق روش فنل - کلروفرم تخلیص شده (۱۲) و کیفیت و کمیت DNA استخراج گردیده جهت انجام PCR تأیید گردید. پرایمرهای مورد نظر جهت تکثیر ژنهای *luxA* و *luxB* براساس انتهای ۵' و ۳' توالی ژنهای مورد نظر توسط نرم‌افزار Gene Runner طراحی شده و برای تسهیل مراحل بعدی کلونینگ در انتهای ۵' هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse ژن *luxA* بترتیب جایگاه آنزیم‌های محدودالانر BamHI و EcoRI و در انتهای ۵' هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse ژن *luxB* بترتیب جایگاه آنزیم‌های محدودالانر KpnI و BglII تعبیه شدند (جدول ۱).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای هر یک از ژنهای *luxA* و *luxB* طی ۳۰ سیکل انجام گرفت. هر واکنش PCR مشتمل بر ۳۰ میکرولیتر و متشکل از بافر PCR (۱۰X) با غلظت ۰/۳، ۱X، MgCl_2 با غلظت ۱/۵ میلی مولار، dNTP با غلظت ۰/۳ میلی مولار، پرایمرهای Forward و Reverse (هر کدام ۰/۲ میکرو مولار)، DNA الگو (۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و آنزیم Taq DNA پلی‌مراز با غلظت ۱ واحد بود. مراحل انجام واکنش PCR برای هر یک از ژنهای *luxA* و *luxB* در جدول ۲ آمده است.

هدف از این تحقیق، تکثیر و متعاقباً کلون‌سازی ژنهای *luxA* و *luxB* رمزکننده زیرواحدهای α و β آنزیم لوسی فراز باکتری *Vibrio fischeri* بصورت جداگانه در یک وکتور مناسب کلونینگ می‌باشد، که پس از تعیین توالی و تأیید صحت توالی‌های کلون شده به وکتورهای بیانی مناسب انتقال یافته و پس از ترانسفکت به سلولهای یوکاریوتی بعنوان یک سازه ژنتیکی گزارشگر نو ترکیب در مطالعات آتی جهت ردیابی آبریان مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روشها

در این تحقیق باکتری *Vibrio fischeri* (ATCC7744) از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران (IROST) خریداری گردید. جهت کشت سلول‌های باکتری از محیط کشت (DSMZ246) استفاده شد. مقدار ۱۰۰۰ میلی‌لیتر از محیط مذکور واجد ۷۵۰ میلی‌لیتر آب دریایی مصنوعی، ۱۰ گرم پپتون، ۱۰ گرم عصاره بیف و ۲۵۰ میلی‌لیتر آب شیر (لوله‌کشی) می‌باشد. اجزاء تشکیل دهنده آب دریایی مصنوعی نیز شامل: ۲۸/۱۳ گرم NaCl، ۰/۱۷ گرم KCl، ۱/۶۰ گرم $(\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O})$ ، ۴/۸۰ گرم $(\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O})$ ، ۰/۱۱ گرم NaHCO_3 و ۳/۵۰ گرم $(\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O})$ می‌باشند. رشد باکتری در این محیط در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتیگراد پس از ۲۴ ساعت انجام صورت پذیرفت.

جدول ۱: توالی پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای تکثیر ژنهای *luxA* و *luxB* پرایمرها از سمت ۵' به ۳' نشان داده شده‌اند و جایگاه‌های برش آنها توسط خطوطی در زیر هر کدام مشخص گردیده است.

Forward <i>luxA</i>	5' <u>GGATCC</u> ATGAAGTTTGGAAATATTTG
Reverse <i>luxA</i>	5' <u>GAATTC</u> TTTAGGTCCTTTTAAGAAAG
Forward <i>luxB</i>	5' <u>AGATCT</u> TATGAAATTTGGATTATTTT
Reverse <i>luxB</i>	5' <u>GGTACC</u> TTAAGGCAGATTCTTTTC



جدول ۲: شرایط انجام واکنش PCR برای هر یک از ژنهای *luxA* و *luxB*

مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	زمان
دنا تورا سیون اولیه	۹۴	۵ دقیقه
دنا تورا سیون	۹۴	۴۰ ثانیه
اتصال	۴۹ (<i>luxB</i>) ۵۱ (<i>luxA</i>)	۱ دقیقه
ادامه	۷۲	۱ دقیقه
طویل شدن نهایی	۷۲	۵ دقیقه

محیط LB مایع و آمپی سیلین بصورت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شده و در روز بعد پلاسمیدهای کلنی‌های منتخب از طریق روش قلبیایی استخراج گردیدند.

هر یک از پلاسمیدهای نو ترکیب pTZ57R/*luxA* و pTZ57R/*luxB* خالص گردیدند و با سه روش مورد بررسی قرار گرفتند: PCR توسط پرایمرهای اختصاصی، PCR توسط پرایمرهای یونیورسال و کتور و روش هضم آنزیمی. انجام PCR توسط پرایمرهای اختصاصی با شرایط PCR اولیه هر یک از ژنهای *luxA* و *luxB* انجام گرفت که در جداول ۱ و ۲ ملاحظه می‌گردد. جهت انجام PCR توسط پرایمرهای یونیورسال توالی این پرایمرها و شرایط انجام واکنش PCR بترتیب در جداول ۳ و ۴ آمده است. پرایمرهای یونیورسال و کتور pTZ57R بصورتی طراحی گشته‌اند که قادرند دو طرف جایگاه چندگانه کلونینگ آنزیم (MCS) را تکثیر نمایند به همین جهت پس از انجام مراحل PCR حدود ۱۵۰ bp به توالی تکثیر شده اضافه می‌گردد. در روش هضم آنزیمی نیز از آنزیم‌های (BamHI/EcoRI) برای ژن *luxA* و (KpnI/BglII) برای ژن *luxB* استفاده گردید.

پس از اتمام مراحل PCR مقدار ۱۰ میکرولیتر محصولات PCR به همراه ۲ میکرولیتر از مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ bp در ژل آگارز ۱/۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز گردیدند. محصولات PCR ژنهای *luxA* و *luxB* در مقایسه با مارکر وزن مولکولی بترتیب باندهای ۱۰۶۲ و ۹۸۰ جفت‌بازی را نشان دادند. پس از اتمام الکتروفورز جهت بازیافت قطعات تکثیر یافته مورد نظر از کیت مخصوص تخلیص ژل شرکت Bioneer (Gel Purification Kit Cat No.K3035-1) استفاده گردید. محصولات PCR خالص شده تعیین توالی شدند.

اتصال محصولات PCR هر یک از ژنهای *luxA* و *luxB* با وکتور کلونینگ pTZ57R توسط آنزیم T4 لیگاز انجام گرفت (۴). واکنش به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد به سلولهای مستعد شده اشرشیاکولی سویه Top10 انتقال داده شد (۵). سویه‌های ترانس فرم شده در محیط LB حاوی X-gal، IPTG و آمپی سیلین بصورت شبانه‌روزی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد درجه کشت داده شدند. در روز بعد کلنی‌های سفید و آبی روی پلیت‌ها نمایان گشتند. تعدادی از کلنی‌های سفید که احتمالاً واجد قطعات ژنی مورد نظر بودند در لوله‌های واجد

جدول ۳: پرایمرهای یونیورسال طراحی شده در دو طرف MCS پلاسمید pTZ57R

جهت تأیید ژن کلون شده در این پلاسمید، پرایمرها از سمت ۵' به ۳' نشان داده شده‌اند.

ptzSeq F	5'AGTTGGGTAACGCCAGGG
ptzSeq R	5' TTTCACACAGGAAACAGC



جدول ۴: شرایط دمایی مورد نیاز جهت انجام PCR توسط پرایمرهای یونیورسال

مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	زمان
دناتوراسیون اولیه	۹۴	۵ دقیقه
دناتوراسیون	۹۴	۴۰ ثانیه
اتصال	۴۸	۱ دقیقه
ادامه	۷۲	۱ دقیقه
طویل شدن نهایی	۷۲	۵ دقیقه

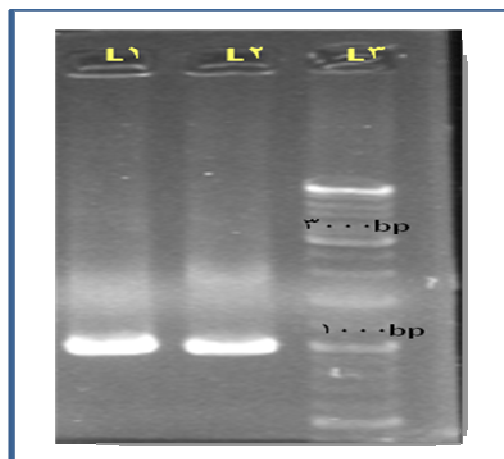
نتایج

باکتری *Vibrio fischeri* (ATCC7744) در محیط کشت اختصاصی تهیه شده در آزمایشگاه (DSMZ246) و در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد کشت داده شده و پس از گذشت ۲۴ ساعت روی پلیت کلنی‌های نورزا ظاهر شدند که در تاریکی بصورت نور آبی-سبز قابل رویت بودند.

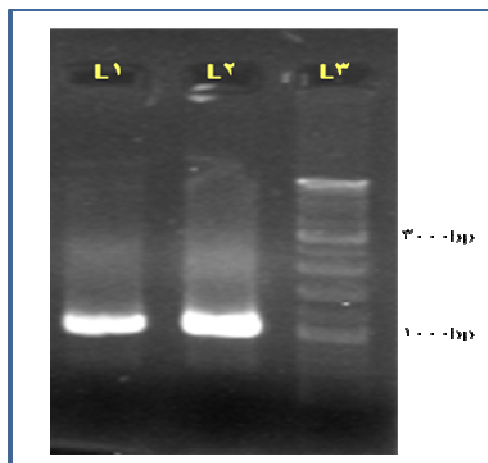
هر یک از ژنهای *luxA* و *luxB* توسط پرایمرهای اختصاصی خود و از طریق PCR تکثیر گردیدند که نتایج حاصل از PCR برای ژن *luxA* یک قطعه ۱۰۶۰ bp و برای ژن *luxB* یک قطعه

۹۸۰ bp بود که در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردیدند (شکل ۱).

پس از انجام مراحل PCR نمونه‌ها از ژل خالص شده و برای تعیین توالی ارسال گردیدند. نتایج حاصل از این توالی‌یابی بترتیب برای ژنهای *luxA* و *luxB* ۹۵ و ۸۹ درصد یکسانی را با توالی‌های مربوط به ژنهای *luxA* (NC-006841.1) و *luxB* (NC-006841.2) در بانک ژن نشان دادند.



B



A

شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد

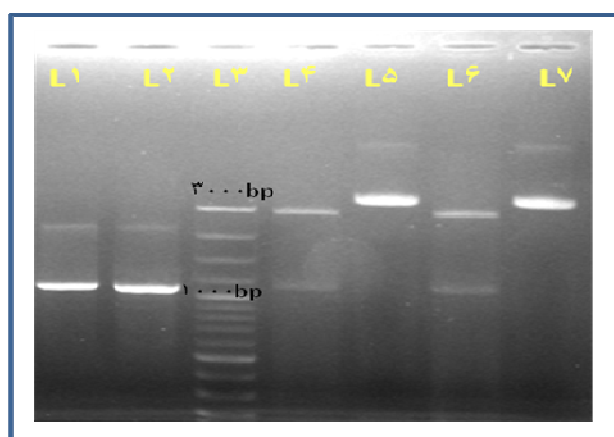
در شکل A ستون ۱ و ۲ محصولات PCR ژن *luxA* با اندازه ۱۰۶۰ bp، ستون ۳: مارکر وزن مولکولی ۱۰۰. در شکل B ستون ۱ و ۲ محصولات PCR ژن *luxB* با اندازه ۹۸۰ bp، ستون ۳: مارکر وزن مولکولی ۱۰۰



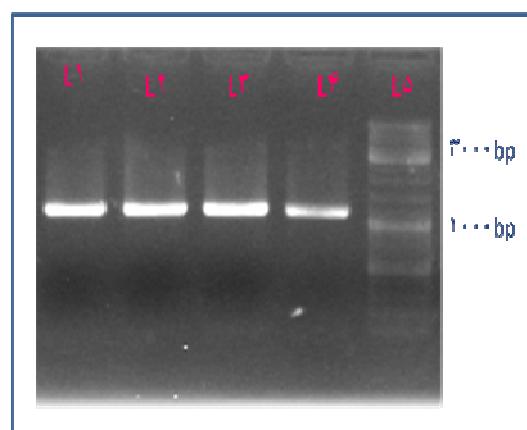
پس از خالص سازی محصولات PCR حاصل از تکثیر ژنهای *luxA* و *luxB* واکنش اتصال بین آنها و T-vector طبق شرایط ذکر گردیده انجام گرفت. محصول واکنش اتصال pTZ57R/*luxA* و pTZ57R/*luxB* روی پلیت های آگار حاوی IPTG، X-gal و آمپی سیلین پخش گردیدند. در روز بعد کلنی های سفید (نوترکیب) و آبی (غیرنوترکیب) روی پلیت نمایان گشتند. کلنی های سفید حاوی پلاسمیدهایی هستند که در آنها بعلت قرار گرفتن ژنهای *luxA* یا *luxB* در محل ژن β - گالاکتوزیداز این ژن غیرفعال شده و در حضور القاء کننده IPTG نمی تواند X-gal را متابولیزه نماید، اما در کلنی های آبی رنگ ژن β - گالاکتوزیداز دست نخورده بوده و در حضور القاء کننده IPTG می تواند X-gal را متابولیزه نماید.

پس از کشت کلنی های سفید و تخلیص پلاسمیدهای آنها از طریق روش لیز قلیایی برای تأیید پلاسمیدهای صحیح نوترکیب pTZ57R/*luxA* و pTZ57R/*luxB* از روشهای متعددی مانند

PCR توسط پرایمرهای اختصاصی هر یک از ژنها، PCR پرایمرهای یونیورسال وکتور و همچنین روش هضم آنزیمی انجام گردید (اشکال ۳ و ۴). PCR توسط پرایمرهای اختصاصی ژنهای *luxA* و *luxB* با شرایط ذکر گردیده قبل بترتیب تکثیر باندهای ۱۰۶۰bp و ۹۸۰bp و پس از انجام PCR توسط پرایمرهای یونیورسال طبق شرایط ذکر گردیده بترتیب تکثیر باندهای ۱۲۰۰bp و ۱۱۰۰bp را تأیید نمود. شرایط واکنش های هضم آنزیمی روی پلاسمید pTZ57R/*luxA* شامل: استفاده از آنزیم های EcoRI و BamHI (شرکت Takara) بود که در نتیجه استخراج یک قطعه ۱۰۶۰bp وجود ژن *luxA* را تأیید نمود. روی پلاسمید pTZ57R/*luxB* نیز هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم های BglII و KpnI (شرکت Takara) انجام گرفت که در نتیجه آن خارج گردیدن یک قطعه ۹۸۰bp وجود ژن *luxB* را تأیید نمود.



B

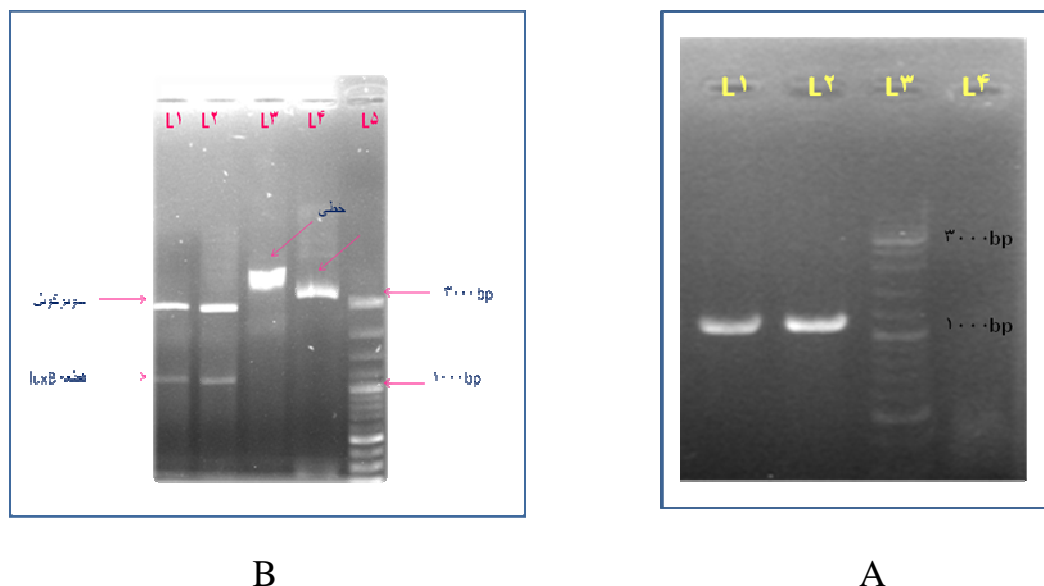


A

شکل ۳: تأیید کلونینگ در پلاسمیدهای pTZ57R/*luxA*

شکل A: تأیید کلونینگ در پلاسمید pTZ57R/*luxA* از طریق PCR بواسطه پرایمرهای یونیورسال را نشان می دهد که در نتیجه آن یک قطعه با طول ۱۲۰۰bp ایجاد گردیده است.

شکل B: تأیید کلونینگ در پلاسمید pTZ57R/*luxA* از طریق PCR بواسطه پرایمرهای اختصاصی و همچنین هضم آنزیمی را نشان می دهد. ستونهای L1 و L2 مربوط به PCR یک قطعه ۱۰۶۰bp، ستون L3 مارکر وزن مولکولی، ستونهای L4 و L6 خارج گردیدن قطعه *luxA* پس از برش با آنزیم های BamHI و EcoRI، ستونهای L5 و L7 پلاسمید نوترکیب pTZ57R/*luxA* قبل از هضم آنزیمی می باشند.



B

A

شکل ۴: تائید کلونینگ در پلاسمیدهای pTZ57R/luxB

شکل A: تائید کلونینگ در پلاسمید pTZ57R/luxB از طریق PCR بواسطه پرایمرهای یونیورسال را نشان می‌دهد که در نتیجه آن یک قطعه با طول ۱۱۰۰ bp ایجاد گردیده است.

شکل B: تائید کلونینگ در پلاسمید pTZ57R/luxB از طریق هضم آنزیمی را نشان می‌دهد. ستونهای L1 و L2 خارج گردیدن قطعه luxB پس از برش با آنزیمهای BglII و KpnI، ستون L3 فرم خطی پلاسمید را نشان می‌دهد. ستون L4 پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/luxB قبل از هضم آنزیمی و ستونهای L5 مارکر وزن مولکولی می‌باشند.

بحث

ژنهای گزارشگر بعنوان ژنهایی با فنوتیپ قابل اندازه‌گیری هستند که می‌تواند در بستری از پروتئین‌های داخلی به سهولت شناسایی گردند. این ژنها قادرند سیگنال را از سطح سلول تکثیر نموده و یک پاسخ سریع، بسیار حساس، قابل تکثیر و به سهولت قابل تشخیص را تولید نمایند. متداول‌ترین ژنهای گزارشگر مورد استفاده شامل: β گالاکتوزیداز، کلرامفنیکل استیل ترانسفراز، لوسی فراز، پروتئین فلورسانت سبز و آلكالین فسفاتاز می‌باشند (۷ و ۸).

در بین تمام ژنهای گزارشگری که تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته‌اند لوسی فرازهای باکتریایی بعنوان شناخته شده‌ترین، فراوانترین و منتشرترین ژنهای نورزا می‌باشند. سیستم نورافکنی باکتریایی تحت عنوان اپران لوکس بعنوان یک ژن گزارشگر در مقایسه با سایرین دارای مزایای متعددی می‌باشد: برخلاف انواع جدا گشته لوسی فراز از نمونه‌های شب‌تاب و رنیل‌ها به تنهایی توانایی سنتز کلیه سوبستراهای مورد نیاز جهت نورزایی خود را

دارا بوده و بوجود هیچگونه ترکیب اگزوژنی نیازی ندارد. بعلاوه این سیستم در مقایسه با سایر سیستم‌های نورزایی واجد حساسیت بالا، وابستگی خطی شدت نورزایی به میزان لوسی فراز و زمان آزمایش کوتاه در حد ثانیه یا دقیقه می‌باشد. فاقد فعالیت اندوژنوسی در سایر اورگانسیم‌های غیرنورزا و سلولها بوده که این مساله امکان استفاده وسیع از ژنهای لوسی فراز باکتریایی را بعنوان گزارشگرهای بیان ژنی فراهم می‌سازد. همچنین سیستم لوکس باکتریایی واجد زمینه میزبانی نامحدودی بوده، نیازمندی‌های محیط رشد آن به سهولت قابل تامین می‌باشد بعلاوه حضور و عدم حضور مارکر در ارتباط با انجام پرتوافکنی در اندازه‌گیری بیان ژن در *in vivo* بصورت غیرتهاجمی قابل اندازه‌گیری می‌باشد. به بیانی میزان پرتوافکنی به سهولت از طریق روشهای اندازه‌گیری نور قابل سنجش است (۱۰).

مزایای متعدد ذکر گردیده سیستم لوکس باکتریایی را به یک سیستم گزارشگر ایده‌آل و منحصر بفرد مبدل ساخته است. بنابراین در



- DNA ligase. Methods in molecularbiology, Vol. 2. Humana press, 32:225-230.
- 5-Hanahan, D., 1983. Studies on transformation on *E. coli* with plasmids. J. Mol. Biol., pp.503-517.
- 6-Hastings, J.W., 1996. Chemistries and colors of bioluminescent reactions: A review. Gene, 173:5-11.
- 7-Jiang, T., Xing, B. and Rao, J., 2008. Recent developments of biological reporter technology for detecting gene expression. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 25:41-76.
- 8-Köhler, S., Belkin, S. and Schmid R.D., 2000. Reporter gene bioassays in environmental analysis. Fresenius J. Anal. Chem., 366:769-779.
- 9-Lin, J.W., Chao, Y.F. and Weng, S.F., 1993. The lumazine protein-encoding gene in photo-bacterium leiognathi is linked to the lux operon. Gene, 126:153-154.
- 10-Meighen, E.A., 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. Microbiol. Rev., Vol. 55, No. 1, pp.123-142.
- 11-Meighen, E.A., 1994. Genetics of bacterial bioluminescence. Annu. Rev. Genet, 28:17-139.
- 12-Sambrook, J. and Russell, D., 2001. Molecular cloning. A Laboratory Manual in Molecular Biomethods Handbook. Humana Press.
- 13-Suadee, C., Nijvipakul, S., Svasti, J., Entsch, B., Ballou, D.P. and Chaiyen, P., 2007. Luciferase from *Vibrio campbellii* is more thermostable and binds reduced FMN better than its homologues. J. Biochem., 142:539-552.
- 14-Visick, K.L., Foster, J., Doino, J., Mcfall-Ngai, M. and Ruby, E.G., 2000. *Vibrio fischeri* lux genes play an important role in colonization and development of the host light organ. J. Bacteriol., 182:4578-4586.
- 15-Wilson, T. and Hastings, J.W., 1998. Bioluminescence. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 14:197-230.
- تحقیق حاضر به کلون سازی ژنهای *luxA* و *luxB* رمز کننده زیر واحدهای α و β آنزیم لوسی فراز باکتری *Vibrio fischeri* پرداخته شد که در مطالعات بعدی با توجه به جایگاههای آنزیمی تعبیه گشته در انتهای ژن *luxA* و ابتدای ژن *luxB* امکان ادغام دو ژن و ساب کلون آنها در یک وکتور بیانی مناسب وجود خواهد داشت. بدین ترتیب امکان بیان زیرواحدهای آنزیم لوسی فراز در سلولهای پروکاریوتی و هم یوکاریوتی را خواهد داشت و می تواند بعنوان یک مارکر گزارشگر زیستی در زمینه های بیوتکنولوژی و تحقیقاتی مانند ژن درمانی، تصویربرداری مولکولی سلولهای زنده، مطالعات حیوانات و گیاهان ترانس ژن و بعنوان بیوسنسور حائز اهمیت باشند.
- در تحقیقات آینده انتقال ژن های لوسی فراز کلون شده به وکتورهای بیانی مناسب می تواند بعنوان سازه های ژنی گزارشگر نو ترکیب در زمینه های متنوع بیوتکنولوژی و تحقیقاتی حائز اهمیت باشند.
- ### تشکر و قدردانی
- این مطالعه با پشتیبانی مالی مرکز تحقیقات اکولوژی دریای خزر و کارهای عملی آن در مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است.
- ### منابع
- 1-Baldwin, T.O., Christopher, J.A., Raushel, F.M., Sinclair, J.F., Ziegler, M.M., Fisher, A.J. and Rayment, I., 1995. Structure of bacterial luciferase. Current Opinion in Structural Biology, 5:798-809.
- 2-Eckstein, J.W., Cho, K.W., Colepicolo, P., Ghisla, S., Hastings, J.W. and Wilson, T., 1990. A time-dependent bacterial bioluminescence emission spectrum in an *in vitro* single turnover system: Energy transfer alone cannot account for the yellow emission of *Vibrio fischeri* Y-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:1466-1470.
- 3-Fisher, A.J., Thompson, T.B., Thoden, J.B., Baldwin, T.O. and Rayment, I., 1996. The 1.5-Å resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions. J. Biol. Chem., Vol. 271, No. 36, pp.21956-21968.
- 4-Gaastera, W. and Hansen, K., 1984. In: (Walker ed.), Nucleic Acids. Ligation of DNA with T4

