مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷

بررسی نقش چپرونی پروتئین Hsp70 از ماهی *Rutilus frisii kutum* در غیرفعال سازی حرارتی لوسیفراز در شرایط *in vivo*

زهره جهانگیری زاده .Ph.D. Student[۱] ، حسین غفوری .Ph.D[۲]*، رضاحسن ساجدی .Ph.D[۳]

۱- دانشجوی دکتری بیوشیمی، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، رشت، ایران
۲- دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، رشت، ایران
۳- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: h.ghafoori@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۲۰

چکیده

هدف: نقش چپرونی پروتئین Hsp70 از ماهی Rutilus frisii kutum در غیرفعال سازی حرارتی لوسیفراز در سلول باکتری E. coli کوترنسفرم شده حامل ژن‌های لوسیفراز و چپرون مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: انتقال هم‌زمان دو وکتور بیانی حاوی ژن‌های Hsp70 و لوسیفراز به سلول‌های باکتری E. coli انجام شد. سپس بیان سلول‌های کوترنسفرم شده تحت شرایط بهینه انجام پذیرفت. بعد از افزودن تتراسایکلین، نمونه‌های باکتری در دماهای ۴۰، ۴۲، ۴۴، ۴۶، ۴۸ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد در طی زمان ۶۰ دقیقه انکوبه شدند و در نهایت فعالیت لوسیفراز نمونه‌ها اندازه گیری شد.

نتایج: در دماهای ۴۰ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد با گذشت زمان ۳۰ دقیقه، فعالیت لوسیفرازی در نمونه‌های کنترل تقریبا به صفر می‌رسد، در صورتی‌که در نمونه‌های کوترنسفرم به‌ترتیب حدود ۷۲ درصد و ۶۰ درصد فعالیت لوسیفرازی نسبت به نمونه‌های کنترل (قبل از تیمار حرارتی) حفظ شد و حتی پس از ۶۰ دقیقه نیز تا ۳۶ درصد و ۲۲ درصد فعالیت همچنان باقی ماند. همچنین در استرس دماهای ۴۴ و۴۶ درجه سانتی‌گراد، اختلاف قابل ملاحظه‌ای بین فعالیت لوسیفرازی نمونه کوترنسفرم و کنترل در زمان‌های اولیه پس از اعمال استرس مشاهده شد. در صورتی‌که در دماهای ۴۸ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت لوسیفرازی نمونه کوترنسفرم نسبت به نمونه کنترل حتی در زمان‌های اولیه استرس اندک بود.

نتیجه گیری: تجمع حرارتی لوسیفراز به عنوان یک پروتئین گزارش‌گر مهم، در دماهای بالا با توجه به فعالیت چپرون Hsp70 در سلول باکتری مهار شود که این امر می‌تواند در صنایع غذایی، داروسازی و تهیه‌ی کیت‌های تشخیص سرطان کاربردهای فراوانی داشته باشد.

واژگان کلیدی: Hsp70، Rutilus frisii kutum، لوسیفراز، in vivo ، غیرفعال سازی حرارتی

مقدمه

شوک حرارتی بیان ژن‌های بیشماری از جمله Hsp70 را افزایش می‌دهد. سازش سلولی به شوک حرارتی مکانیسم بسیار پیچیده ای می‌باشد. چگونگی پاسخ سلول به شوک حرارتی به سکانس ژن و مقاومت نسبت به گرما بستگی دارد و سلول را وادار به تحریک بقا می‌کند و یا القای آپوپتوزیس در آن را سبب می‌شود (۲-۱). پروتئین‌های خانواده Hsp70 در محدوده وزنی ۶۸ تا ۷۴ کیلودالتون می‌باشند و تقریبا در همه ارگانیسم‌ها و ارگانل‌ها یافت می‌شوند. در پستانداران و اغلب یوکاریوت‌ها این پروتئین‌ها در تمام اجزای سلولی نظیر سیتوزول، میتوکندری و شبکه اندوپلاسمیک یافت می‌شوند و در اعمالی نظیر تاخوردن پروتئین‌ها، انتقال پروتئین‌ها از غشا و تجزیه پروتئین‌ها دخالت دارند (۴-۳). نقش Hsp70 در تا شدن پروتئین‌های غیر طبیعی به سه فعالیت مرتبط با یکدیگر تقسیم می‌شود: جلوگیری از تجمع پروتئین‌ها، تا کردن پروتئین به شکل طبیعی و تا کردن مجدد پروتئین‌های تجمع یافته. همچنین اشکال تحریک شده‌ی Hsp70، نقش مرکزی را در کنترل هومئوستاز پروتئین‌ها دارند (۵). افزایش سطح Hsp70 در جلوگیری از تجمعات پروتئینی در برخی از بیماری‌ها مانند پارکینسون، آلزایمر، هانتینگتون و سرطان ثابت شده است (۷-۶). از آنجایی‌که چپرون‌ها قادر به کاهش میزان تجمع پروتئین‌های دناتوره و افزایش راندمان تاخوردگی مجدد پروتئین‌ها می‌باشند، به‌منظور مطالعه‌ی فعالیت چپرونی در شرایط *in vivo* از تکنیک‌های مختلفی در این راستا استفاده می شود، اما بسیاری از این روش‌ها مستلزم لیز سلولی و استخراج پروتئین کل از سلول می باشد. به‌منظور رفع این مشکل و توسعه‌ی روشی که بتوان به‌صورت Real Time به بررسی تغییرات اعمال شده پروتئینی درون سلول پی برد، سیستم بیان هم‌زمان چپرون و ژن گزارش‌گر برای اولین بار توسط Schroder در سال ۱۹۹۳ برای سلول های .E coli پیشنهاد شد (۸)، پس از آن نیز فرضیه‌ی نقش sHsp ها در حفاظت از پروتئین‌های گزارش‌گر در سال ۱۹۹۷ توسط Forreiter و همکاران در مورد Hsp17.6 آرابیدوپسیس در شرایط *in vivo* مورد حمایت قرار گرفت (۹) سرانجام به سایر سلول‌ها نیز تعمیم داده شد (۱۰). در بررسی‌های صورت گرفته در این خصوص تاکنون، از الحاق ژن گزارش‌گر و نیز چپرون مورد نظر به ژنوم سلول میزبان و یا از جایگیری درون سلولی ژن گزارش‌گر و چپرون ویژه در یک وکتور استفاده شده است و وکتور نوترکیب مشتق شده جهت ایجاد شرایط هم القایی و هم بیانی به میزبان مناسب انتقال یافته است (۱۱و۹). آنزیم لوسیفراز به‌طور وسیعی در زیست فناوری و بیوتکنولوژی برای مثال در تهیه‌ی کیت‌های تشخیص سرطان، تصویربرداری از سلول‌های زنده، غربال‌گری داروها و همچنین مطالعه‌ی حیوانات ترانس ژن کاربردهای فراوان دارد (۱۳و۱۲). در دهه‌های اخیر این آنزیم در زیست حسگرها، ژن‌های گزارش‌گر، بررسی روابط برهم‌کنشی پروتئین‌ها و سنجش‌های آنزیمی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۵و۱۴). مطالعات نشان داده که لوسیفراز یک پروتئین مونومر حساس به دما است که در جهت بررسی نقش چپرون‌ها در ممانعت و تعمیر پروتئین‌های دناتوره شده گرمایی در شرایط *in vivo* به‌عنوان یک سوبسترای مناسب عمل می‌کند (۱۶). برای مثال در مطالعات پیشین از لوسیفراز به‌عنوان یک گزارش‌گر جهت مطالعه‌ی مکانیسم عملکرد sHspها در شرایط *in vivo* استفاده شد (۱۷). لوسیفراز به‌دلیل داشتن ویژگی‌هایی مانند سنجش بسیار حساس و تکرارپذیر بودن آن کاندیدای بسیار مناسبی در سیستم‌های گزارش‌گر و تصویربرداری‌های بیولومینسانس در شرایط سیستم زنده و بدون انجام لیز سلولی می‌باشد (۸). بیولومینسانس یکی از انواع شیمی لومینسانس است که در آن دو ترکیب شیمیایی به نام‌های لوسیفرین (سوبسترا) و لوسیفراز (آنزیم) در این فرایند دخیل هستند. واکنش لوسیفرین با اکسیژن توسط لوسیفراز کاتالیز شده و در نهایت منجر به تولید نور می‌شود. با استفاده از دستگاه لومینومتر می‌توان فعالیت لوسیفراز را بر پایه اندازه‌گیری نور مورد سنجش قرار داد.

حساسیت بیولومینسانس نسبت به فوتولومینسانس (فلورسانس) بیشتر می‌باشد زیرا در فلورسانس ذرات و آلودگی‌های محیطی می‌توانند فوتون را جذب کنند و پراش داشته باشند. علاوه بر این در غلظت‌های بالا متوسط فاصله بین مولکول‌های جذب‌کننده کاهش می‌یابد و مانع جذب فوتون در مولکول‌های دیگر می‌شود. اما از آن‌جا که بیولومینسانس یک واکنش شیمیایی است و برخورد فوتونی وجود ندارد لذا این مشکلات هم در آن دیده نمی‌شود. فقدان نقش فیزیولوژیکی لوسیفراز در باکتری E. coli امکان مطالعات غیرفعال سازی دمایی و بازیابی فعالیت آن را در شرایط *in vivo* بدون به خطر انداختن اعمال متابولیک ضروری سلول ایجاد می‌کند (۱۸و۸). بنابراین از آن‌جاکه سنجش فعالیت لوسیفراز توسط دستگاه لومینومتر بسیار حساس و دقیق می‌باشد و در ثانی اندازه‌گیری فعالیت لوسیفراز را می‌توان توسط سلول‌های زنده باکتری E. coli بیان کننده لوسیفراز و بدون انجام لیز سلولی و با افزودن سوبسترای آن صورت داد، لذا لوسیفراز به‌عنوان یک پروتئین گزارش‌گر مناسب در باکتری معرفی می شود. علاوه بر این همان‌طور که اشاره شد بیان پروتئین Hsp70 در شرایط استرس دمایی به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد لذا گرچه لوسیفراز یک پروتئین باکتریایی نیست اما به‌دلیل اینکه یک پروتئین مونومر حساس به دما است (طبق مطالعات قبلی صورت گرفته بر سینتیک غیرفعال سازی لوسیفراز تحت شرایط in vitro نیمه عمر آن در ۴۲ درجه سانتی‌گراد کمتر از ۳ دقیقه است) به‌همین دلیل به‌عنوان سوبسترای مناسب حساس به دما انتخاب شد (۱۹و ۸). از آنجا که فعالیت لوسیفراز بسیار حساس به دما می‌باشد و با افزایش دما فعالیت خود را از دست می‌دهد بنابراین با هم انتقالی وکتورهای حاوی ژن‌های Hsp70 و لوسیفراز در سلول باکتری E. coli و بیان هم‌زمان هر دو پروتئین درسلول، انتظار می‌رود که تحت شرایط استرس‌های دمایی درصد فعالیت لوسیفراز در سلول‌های کوترنسفرم شده تفاوت قابل ملاحظه‌ای نسبت به لوسیفراز بدون چپرون در سلول‌های کنترل داشته باشد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه قبل وکتورهای PET16b (مقاوم به آنتی بیوتیک آمپی سیلین) حاوی ژن لوسیفراز و PET28a (مقاوم به آنتی بیوتیک کانامایسین) حاوی ژن Hsp70 فراهم شد (۲۰).

انتقال هم‌زمان وکتورهای نوترکیب به باکتری E. coli سویه‌ی بیانی BL21: بعد از آماده سازی سلول‌های مستعد، انتقال شیمیایی وکتورها به سلول‌ها انجام پذیرفت. به‌منظور غربال‌گری کلونی‌های حاصل از کوترنسفرماسیون (حاوی وکتورهای حامل ژن Hsp70 و لوسیفراز)، کلونی PCR و سنجش فعالیت لوسیفرازی صورت گرفت. در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمر اختصاصی Hsp70 و بر اساس شرایط بهینه‌ای که در تحقیقات قبلی طراحی و تعیین شده بود انجام گرفت. با این تفاوت که در کلونی PCR از کلونی‌های باکتری حاوی ژن مورد نظر به‌عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده می‌شود و در صورتی‌که کلونی مزبور حاوی وکتور ناقل ژن باشد، نتیجه PCR مثبت خواهد بود. در واکنش کلونی PCR چون به جای DNA از کلونی‌های باکتری به‌عنوان الگو استفاده می‌شود، مدت زمان واسرشت سازی اولیه طولانی‌تر است (۱۰ دقیقه). به‌منظور اندازه گیری فعالیت بیولومینسانسی آنزیم لوسیفراز در سلول ها ۵ میکرولیتر از نمونه باکتری زنده حاوی لوسیفراز به ۵ میکرولیتر از کوکتل 5X سوبسترای آن (شامل لوسیفرین5mM، 4 mM ATP ، 100 mM MgSO4 و تریس 50 mM) اضافه شد و با کمک دستگاه بیولومینومتر (Sirius L tube luminometer, Germany) خوانده شد. جهت سنجش فعالیت لوسیفرازی لازم است که در ابتدا بیان پروتئین در سلول باکتری صورت گیرد.

بررسی اثر مهاری تتراسایکلین بر بیان از نو پروتئین‌ها (De novo synthesis of proteins) در شرایط in vivo. جهت اطمینان از کارایی عملکرد چپرونی Hsp70، عدم سنتز مجدد لوسیفراز در سلول زنده باکتری پس از اعمال استرس ضروری می‌باشد. بنابراین می‌بایست سیستم بیان در باکتری را سرکوب نمود. بدین‌منظور از آنتی بیوتیک تتراسایکلین استفاده شد. پس از بیان نمونه باکتری کوترنسفرم شده (حاوی سازه‌های ژنی pET28a:Hsp70 و pET16b:luciferase)، در محیط LB دارای ۵۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر کانامایسین و ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ ساعت، ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه‌های باکتری در لوله‌های آزمایش تقسیم شد و فعالیت لوسیفرازی آن‌ها در حضور و عدم حضور تتراسایکلین ۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر در دمای۴۲ درجه سانتی‌گراد در طی یک ساعت تعیین شد. واکنش با افزودن نسبت‌های برابر سوبسترای آنزیم لوسیفراز (شامل کمپلکس لوسفرین و ATP) و نمونه باکتری صورت گرفت و تغییرات توسط دستگاه لومینومتر (Sirius L tube luminometer, Germany) اندازه‌گیری شد.

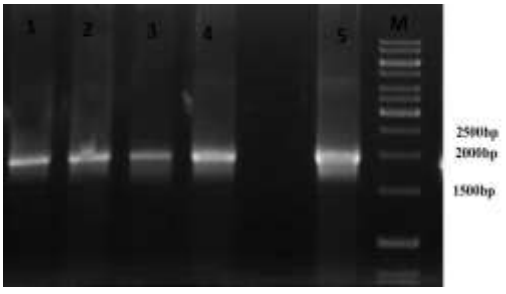
شوک حرارتی و سنجش فعالیت لوسیفراز: جهت سنجش استاندارد فعالیت لوسیفرازی در شرایط *in vivo*، باکتری E. coli کوترنسفرم شده حاوی وکتور نوترکیب pET28a:Hsp70 و pET16b:luciferase پس از کشت شبانه در محیط LB دارای ۵۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر کانامایسین و ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ ساعت تحت القای بیان پروتئین‌ها قرار گرفت. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه باکتریایی برداشته شد و پس از افزودن تتراسایکلین ۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر، ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های باکتریایی برداشته شد و در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتر در حجم ۵۰ میکرولیتر الیکوت شدند. نمونه‌ها در گرادیان دمایی دستگاه ترموسایکلر (PCR) تحت استرس دمایی قرار گرفتند. پس از تیمار دمایی، در زمان‌های (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه)، ۵ میکرولیتر از الیکوت‌ها برداشته شد و فعالیت لوسیفرازی آن‌ها توسط دستگاه لومینومتر تعیین شد. درصد فعالیت لوسیفراز نمونه‌های تیمار حرارتی با توجه به‌میزان فعالیت اولیه‌ی لوسیفراز قبل از اعمال استرس حرارتی سنجیده شد و درصد فعالیت لوسیفراز قبل از تیمار حرارتی ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد.

در این آزمایش نیز از نمونه باکتری حاوی سازه ژنی pET16b:luciferase به‌عنوان کنترل استفاده و فعالیت لوسیفرازی آن با نمونه کوترنسفرم شده مطابق روش فوق مقایسه شد.

نتایج

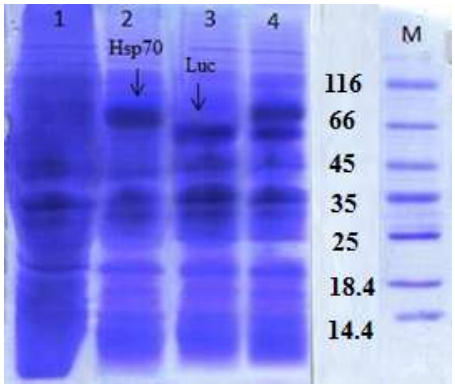
کوترنسفورماسیون و بیان هم‌زمان ژن Hsp70 و لوسیفراز

برای انجام کوترنسفرماسیون، از غلظت‌های برابر سازه‌های ژنی pET16b:Luciferase و pET28a: Hsp70 جهت انتقال به سلول‌های مستعد BL21 استفاده شد. به‌منظور غربالگری کلونی‌های حاوی ژن Hsp70 از روش کلونی PCR استفاده شد و نتیجه‌ی آن بر روی ژل آگارز مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱: آنالیز محصولات کلونی PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز به‌منظور غربال کلونی‌های BL21 کوترنسفرم حاوی وکتور نوترکیب Hsp70، کلونی‌های BL21 حاوی وکتور نوترکیب بیانیHsp70 ۵) محصول PCR مربوط به ژن Hsp70 به‌عنوان کنترل و M مارکر وزن مولکولی (#SM0322, Fermentas)

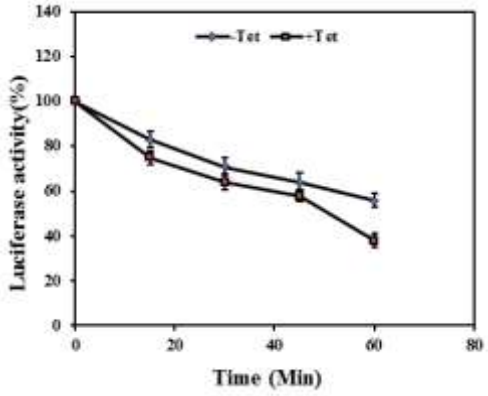
به‌منظور تایید نتایج حاصل از کلونی PCR واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصیHsp70 با وکتور استخراج شده Hsp70 به‌عنوان کنترل انجام گرفت. ازآنجاکه از پرایمرهای خود ژن استفاده شده است لذا طول حدود ۲۰۰۰ باز مشاهده می‌شودکه مطابقت با ژن Hsp70 دارد. شرایط بیان بهینه هم‌زمان دو پروتئین در سلول‌های E. coli سویه BL21 مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به انجام برخی شرایط هم بیانی و مشاهده نتایج تکرار پذیر آن، در نهایت بیان نمونه کوترنسفرم در E. coli سویه BL21 توسط القاءگر mM IPTG ۱ و با توجه به انتخاب دمای بهینه‌ی بیان در ۳۰ درجه سانتی‌گراد و پس از گذشت ۴ ساعت از زمان شروع القاء با هوادهی مطلوب انجام گرفت. در حالی‌که تحت این شرایط نمونه لوسیفرازی فاقد بیان آن ناموفق است. آنالیز بیان توسط SDS-PAGE ۱۲/۵ درصد انجام شد و باند پروتئینی مربوط به‌هریک از آن‌ها مشاهده شد. حضور باند پروتئینی در ناحیه ۶۶ و ۶۱ کیلودالتون به‌ترتیب مربوط به پروتئین‌های Hsp70 و لوسیفراز نسبت به نمونه کنترل حاکی از بیان پروتئین‌هایHsp70 و لوسیفراز می‌باشد شکل (۲).



شکل ۲: آنالیز بیان ژن Hsp70 و لوسیفراز در سلول های *E. coli* سویه BL21 توسط القاگر mM IPTG ۱ با استفاده از ژل SDS-PAGE ۱۲/۵ درصد. M. مارکر وزن مولکولی (#SM0431, Fermentas) ۱) نمونه کنترل بدون وکتورهای بیانی، نمونه کنترل حاوی وکتور نوترکیب Hsp70، ۳) نمونه کنترل حاوی وکتور نوترکیب لوسیفراز، ٤) نمونه کوترنسفرم شده

بررسی اثر مهاری تتراسایکلین بر بیان از نو پروتئین‌ها (De novo synthesis of proteins) طی اعمال استرس حرارتی

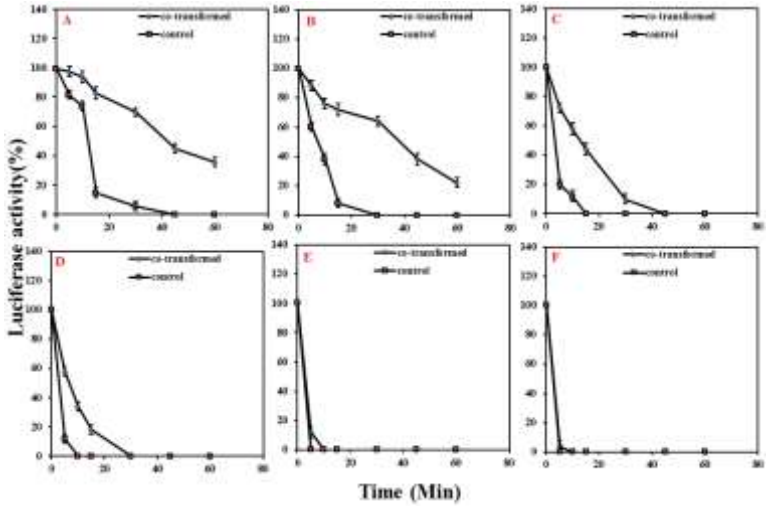
پس از بیان۴ ساعته نمونه کوترنسفرم تحت القایIPTG mM ۱ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ml از نمونه‌های باکتری در لوله‌های آزمایش الیکوت شد و فعالیت لوسیفرازی آن‌ها در حضور و عدم حضور تتراسایکلین ۲۵ میکرولیتر برمیلی‌لیتر در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد در طی یک ساعت تعیین شد. واکنش با افزودن نسبت‌های برابر سوبسترای آنزیم لوسیفراز (شامل کمپلکس لوسفرین و ATP) و نمونه باکتری صورت گرفت. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود اختلاف در میزان فعالیت لوسیفرازی دو نمونه وجود دارد، به‌طوری که در عدم حضور تتراسایکلین درصد بالاتری از فعالیت لوسیفرازی دیده می‌شود که این افزایش ناشی از بیان مجدد پروتئین در عدم حضور تتراسایکلین باشد.



شکل ۳: اثر تتراسایکلین بر مهار بیان مجدد پروتئین در حین اعمال استرس در نمونه کوترنسفرم حاوی ژن Hsp70 در مقایسه با نمونه کنترل. پس از بیان ٤ ساعته نمونه کوترنسفرم تحت القای mM IPTG ۱ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، فعالیت لوسیفرازی نمونه‌ها در حضور و عدم حضور تتراسایکلین µg/ml ۲۵ در دمای ٤۲ درجه سانتی‌گراد در طی یک ساعت تعیین گردید. در عدم حضور تتراسایکلین درصد بالاتری از فعالیت لوسیفرازی دیده می‌شود که این افزایش ناشی از بیان مجدد پروتئین در عدم حضور تتراسایکلین باشد.

شوک حرارتی و سنجش فعالیت لوسیفراز

پس از بیان ۴ ساعته نمونه کوترنسفرم تحت القای IPTG ۱ میلی‌مولار در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه باکتریایی برداشته شد و پس از افزودن تتراسایکلین ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، در دماهای ۴۰، ۴۲، ۴۴، ۴۶، ۴۸ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد در طی زمان یک ساعت انکوبه شدند. فعالیت لوسیفرازی آنها در شرایط in vivo و بدون لیز سلولی در زمان‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه توسط دستگاه لومینومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت لوسیفراز نمونه‌های کوترنسفرم شده در دماها و زمان‌های تعیین شده نسبت به نمونه‌ی فاقد چپرون Hsp70 مقایسه گردید و درصد فعالیت لوسیفراز نمونه‌ها با توجه به میزان فعالیت اولیه‌ی لوسیفراز قبل از اعمال استرس حرارتی سنجیده شد. شکل ۴ نشان می‌دهد در دماهای ۴۰، ۴۲ و ۴۴ درجه سانتی‌گراد در زمان ۱۵ دقیقه اختلاف ملاحظه‌ای در میزان فعالیت آنزیم در دو نمونه وجود دارد به‌طوری‌که در دمای ۴۴ درجه سانتی‌گراد بعد از ۱۵ دقیقه درصد فعالیت لوسیفراز در نمونه کنترل به صفر می‌رسد این در حالی است که در نمونه کوترنسفرم ۴۴ درصد فعالیت حفظ می‌شود. از طرفی در دماهای ۴۰ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان ۳۰ دقیقه نیز تفاوت قابل ملاحظه‌ای در فعالیت لوسیفرازی همچنان مشاهده می‌شود به‌طوری که با گذشت زمان ۳۰ دقیقه، در دمای ۴۰ و ۴۲ سانتی‌گراد به‌ترتیب حدود ۷۲ درصد و ۶۰ درصد فعالیت لوسیفرازی در نمونه کوترنسفرم حفظ می‌شود، درصورتی‌که در نمونه فاقد چپرون این میزان به صفر می‌رسد. علاوه بر این شکل ۴ نشان می‌دهد در نمونه کوترنسفرم، تحت استرس دماهای ۴۰ و۴۲ درجه سانتی‌گراد با گذشت ۴۵ دقیقه پس از اعمال استرس به‌ترتیب تا حدود ۵۰ و ۳۸ درصد فعالیت اولیه لوسیفرازی حفظ می‌شود و حتی پس از۶۰ دقیقه نیز تا ۳۶ درصد و ۲۲ درصد فعالیت همچنان باقی می‌ماند. در استرس دمای ۴۶ درجه سانتی‌گراد با گذشت تنها ۵ دقیقه پس از اعمال استرس، فعالیت لوسیفرازی نمونه فاقد Hsp70 تنها حدود ۱۲ درصد فعالیت آن حفظ می‌شود، در صورتی‌که این تغییرات برای نمونه کوترنسفرم در حدود ۶۰ درصد فعالیت اولیه می‌باشد. از طرفی در دماهای ۴۸ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد در نمونه فاقدچپرون با گذشت ۵ دقیقه اولیه پس از اعمال استرس، فعالیت لوسیفرازی نمونه به‌طور کامل از بین می‌رود اما در نمونه‌های کوترنسفرم در زمان ۵ دقیقه به‌ترتیب ۱۲ و ۴ درصد فعالیت لوسیفراز حفظ می‌شود.



شکل ٤: نمودارهای تغییرات فعالیت لوسیفرازی نمونه کوترنسفرم حاوی ژن Hsp70 در دماهای (A) ٤٠ و (B) ٤٢،(C) ٤٤، (D) ٤٦، (E) ٤٨ و (F) ٥٠ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های ٠، ٥، ١٠، ١٥، ٣٠، ٤٥ و ٦٠ دقیقه. پس از بیان٤ ساعته نمونه‌های کوترنسفرم تحت القای mM IPTG ١ در دمای٣٠ درجه سانتی‌گراد و افزودن تتراسایکلین ٢٥ میکروگرم بر میلی‌لیتر، نمونه‌ها در دماهای تعیین شده به‌مدت یک ساعت انکوبه شدند و فعالیت لوسیفرازی نمونه‌ها تنسبت به نمونه‌های قبل از تیمار حرارتی اندازه‌گیری شد. در دماهای ٤٠، ٤٢ درجه سانتی‌گراد با گذشت زمان ٣٠ دقیقه، فعالیت لوسیفرازی در نمونه فاقد چپرون تقریبا به صفر می‌رسد در صورتی‌که در نمونه کوترنسفرم به ترتیب حدود ٧٢ درصد و ٦٠ درصد فعالیت لوسیفرازی حفظ می‌شود و حتی پس از٦٠ دقیقه نیز تا ٣٦ درصد و ٢٢ درصد فعالیت همچنان باقی می‌ماند. همچنین در استرس دماهای ٤٤ و٤٦ درجه سانتی‌گراد، در زمان‌های اولیه پس از اعمال استرس اختلاف قابل ملاحظه‌ای بین فعالیت لوسیفرازی نمونه‌های کوترنسفرم و کنترل مشاهده می‌شود، در صورتی‌که در دماهای ٤٨ و ٥٠ درجه سانتی‌گراد تغییرات فعالیت لوسیفرازی نمونه کوترنسفرم نسبت به کنترل حتی در زمان‌های اولیه استرس ناچیز بود.

بحث

پروتئین‌های شوک حرارتی (Hspها)، مولکول‌هایی با حفاظت بین گونه‌ای بالا در طول تکامل می‌باشند. Hspها تحت شرایط طبیعی در سلول به میزان مشخصی بیان می‌شوند ولی در پاسخ به محرک‌های استرس مانند شوک گرما و سرما، عفونت، نمک، پرتوهای یونیزان و استرس‌های اکسیداتیو میزان آن‌ها افزایش می‌یابد (٢٢و٢١). Hspها به‌عنوان چپرون عمل کرده و در فرآیندهای سلولی شامل تا شدن پروتئین و حفظ ساختار آن، تسهیل انتقال پروتئین از غشای سلول و جلوگیری از تجمع برگشت پذیر پروتئین‌ها نقش دارند (٢٣). پروتئین‌های خانواده Hsp70 در محدوده وزنی ٦٨ تا ٧٤ کیلودالتون می‌باشند و تقریبا در همه ارگانیسم‌ها و ارگانل‌ها یافت می‌شوند. در پستانداران و اغلب یوکاریوت‌ها این پروتئین‌ها در تمام اجزای سلولی نظیر سیتوزول، میتوکندری و شبکه اندوپلاسمیک یافت می‌شوند و در اعمالی نظیر تاخوردن پروتئین‌ها، انتقال پروتئین‌ها از غشا و تجزیه پروتئین‌ها دخالت دارند (٢٥-٢٣). چپرون‌ها قادر به کاهش میزان تجمع پروتئین‌های دناتوره و افزایش راندمان تاخوردگی مجدد پروتئین‌ها می‌باشند و در مطالعات قبل نشان داده شد که چپرون Hsp70 ماهی Rutilus frisii kutum در شرایط in vitro در جلوگیری از تجمع لوسیفراز و تاخوردگی مجدد آن در شرایط استرس حرارتی تاثیر به‌سزایی داشت (٢٠). همچنین در مطالعات قبل تاثیر این گونه Hsp70 بر بقای سلول باکتری E. coli در شرایط *in vivo* مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که این پروتئین با اثر حفاظتی خود بر انواع سوبستراهای پروتئینی درون سلولی نرخ بقا

را در این سلول به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد (۲۰). در مطالعه حاضر در جهت تایید نتایج قبلی و بررسی مستقیم نقش حفاظتی Hsp70 از پروتئین‌ها، تغییرات فعالیت لوسیفرازی تحت شرایط استرس دمایی در شرایط *in vivo* بررسی شد. از آنجایی‌که چپرون‌ها قادر به کاهش میزان تجمع پروتئین‌های دناتوره و افزایش راندمان تاخوردگی مجدد پروتئین‌ها می‌باشند، به‌منظور مطالعه‌ی فعالیت چپرونی تکنیک‌های مختلفی از قبیل اندازه گیری میزان بقای سلول‌های پروکاریوت و یوکاریوت در حضور و عدم حضور چپرون مورد نظر و تعیین میزان پروتئین‌های تجمع یافته و همچنین پروتئین‌های محلول پس از اعمال استرس با استفاده از روش‌های عمومی تعیین غلظت پروتئین وجود دارد. روش‌های فوق گرچه این قابلیت را دارند که شرایط درون سلولی حاکم بر تغییرات القا شده بر پروتئین‌ها را در حضور و عدم چپرون مورد نظر گزارش دهند اما این روش‌ها مستلزم لیز سلولی و استخراج پروتئین کل از سلول می‌باشند (۲۷و۲۶). به‌منظور رفع این مشکل در بررسی‌های صورت گرفته در این خصوص تاکنون، از الحاق ژن گزارش‌گر و نیز چپرون مورد نظر به ژنوم سلول میزبان و یا از جایگیری درون سلولی ژن گزارش‌گر و چپرون ویژه در یک وکتور استفاده شده است و وکتور نوترکیب مشتق شده جهت ایجاد شرایط هم القایی و هم بیانی به میزبان مناسب انتقال یافته است (۱۱-۸). سیستم بیان هم‌زمان چپرون و ژن گزارش‌گر برای اولین بار توسط Schroder (۸) برای سلول‌های .E coli پیشنهاد شد ، پس از آن نیز فرضیه‌ی نقش Hspsها در حفاظت از پروتئین‌های گزارش‌گر توسط Forreiter و همکاران (۹) در مورد Hsp17.6 آرابیدوپسیس در شرایط *in vivo* مورد حمایت قرار گرفت. لوسیفراز به دلیل سنجش کمی بسیار حساس و دقیق آن و فقدان نقش فیزیولوژیکی در سلول .E coli کاندیدای بسیار مناسبی در سیستم‌های گزارش‌گر در شرایط سیستم زنده و بدون انجام لیز سلولی می‌باشد. در این مطالعه جهت سنجش فعالیت چپرونی در شرایط in vivo، لوسیفراز حشره شب تاب (Firefly) (Luc) از گونه photinus pyralis به‌عنوان گزارش‌گر مورد استفاده قرار گرفت (۲۸). به‌منظور کارایی بالای انتقال هم‌زمان وکتورهای حاوی ژن Hsp70 و لوسیفراز باید توجه داشت که دو وکتور با ناحیه ori متفاوت استفاده شود زیرا در غیر این‌صورت دو وکتور برای حفظ پایداری خود رقابت می‌کنند و معمولا هریک به سلول‌های جداگانه وارد می‌شوند. به‌طور معمول برای افزایش کارایی هم‌انتقالی، غلظت‌های بالا و برابر وکتورها استفاده می‌شود. همچنین سلول میزبان جهت عمل انتقال نیز نقش مهمی را ایفا می‌کند. .E coli مناسب‌ترین میزبان جهت تهیه‌ی سلول مستعد در نظر گرفته می‌شود (۳۱-۲۹). با در نظر گرفتن نکات فوق برای انجام کوترنسفرماسیون، از غلظت‌های برابر سازه‌های ژنی pET16b: Luciferase و pET28a: Hsp70 جهت انتقال به سلول‌های مستعدBL21 استفاده شد. بیان نمونه کوترنسفرم در سلول‌های .E coli سویه BL21 توسط القاگر یک میلی مولار IPTG و با توجه به انتخاب دمای بهینه‌ی بیان در۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و پس از گذشت ۴ ساعت از زمان شروع القای با هوادهی مطلوب انجام گرفت. به جهت اینکه اطمینان شود که فعالیت لوسیفراز مشاهده شده منحصرا بازتابی از فعالیت چپرونی در شرایط *in vivo* است و به‌واسطه بیان و سنتز آن نیست از آنتی بیوتیک تتراسایکلین استفاده شد. حضور تتراسایکلین در غلظت‌های بالا از سنتز مجدد هر گونه پروتئین اضافی در باکتری طی زمان اندازه‌گیری فعالیت لوسیفراز پس از اعمال استرس ممانعت ایجاد می‌کند (۳۲). سلول های نوترکیب القا شده با IPTG در معرض شوک حرارتی در دماهی ۴۰، ۴۲، ۴۴، ۴۶، ۴۸ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک ساعت انکوبه شدند. در دماهای ۴۰ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان ۳۰ دقیقه تفاوت قابل ملاحظه‌ای در فعالیت لوسیفرازی مشاهده می‌شود به‌طوری که با گذشت زمان ۳۰ دقیقه، در دمای ۴۰ و ۴۲

سانتی‌گراد به ترتیب حدود ۷۲ درصد و ۶۰ درصد فعالیت لوسیفرازی در نمونه کوترنسفرم نسبت به نمونه قبل از تیمار حرارتی حفظ می‌شود، در صورتی‌که در نمونه‌ی فاقد چپرون این میزان فعالیت تقریبا از بین می‌رود. لازم به ذکر است که در نمونه‌های کوترنسفرم در دماهای ۴۰ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد حتی پس از۶۰ دقیقه نیز تا ۳۸ درصد و ۲۲ درصد فعالیت همچنان باقی می‌ماند. از طرفی در دمای ۴۴ درجه سانتی‌گراد بعد از ۱۵ دقیقه درصد فعالیت لوسیفراز در نمونه کنترل به صفر می‌رسد این در حالی است که در نمونه کوترنسفرم ۴۴ درصد فعالیت حفظ می‌شود. در استرس دمای ۴۶ درجه سانتی‌گراد با گذشت تنها ۵ دقیقه پس از اعمال استرس، فعالیت لوسیفرازی نمونه فاقد Hsp70 تنها حدود ۸ درصد حفظ می‌شود، در صورتی‌که این تغییرات برای نمونه کوترنسفرم در حدود ۶۰ درصد فعالیت اولیه می‌باشد. در دماهای بالاتر ۴۸ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد کاهش در فعالیت لوسیفرازی به‌طور قابل ملاحظه‌ای در مورد نمونه Hsp70 دیده می‌شود به‌طوری که در دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد ۱۲ درصد فعالیت حفظ می‌شود و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تقریبا فعالیت لومینسانس از بین می‌رود. با توجه به نتایج حاصل، غیرفعال‌سازی دمایی لوسیفراز در نمونه کوترنسفورم نسبت به نمونه کنترل با سرعت کمتری با گذشت زمان دنبال می‌شود. داده‌های فوق نشان می‌دهد که بیان موقت Hsp70 در سلول باکتری E. coli حفاظت لوسیفراز را از دمای افزایش یافته برعهده دارد. در واقع تحت دناتوراسیون دمایی لوسیفراز، Hsp70 با لوسیفراز تعامل ایجاد کرده و آن را در یک حالت حدواسط تاخوردگی پیش از انباشته شدن آن تثبیت می‌کند و لوسیفراز را از آسیب‌های دمایی حفظ می‌کند. لوسیفراز یک پروتئین گزارش‌گر حساس به دما می‌باشد که در مطالعات بیوتکنولوژی و زیست فناوری کاربردهای فراوان دارد. طبق مطالعات قبلی این پروتئین تحت شرایط *in vitro* نیمه عمر آن در ۴۲ درجه سانتی‌گرادکمتر از ۳ دقیقه است (۳۱و ۸) اما با توجه به داده‌ها این پروتئین در سلول باکتری E. coli حاوی چپرون Hsp70 ماهی Rutilus frisii kutum در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد حتی بعد از گذشت یک ساعت فعالیت دارد. بنابراین این چپرون نقش مهمی در پایدارسازی حرارتی لوسیفراز دارد که این امر می‌تواند به کاربردهای صنعتی Hsp70 ختم شود.. در دهه‌های اخیر لوسیفراز به‌عنوان یک پروتئین گزارش‌گر در سیستم‌های زنده در گستره وسیعی از علوم پزشکی مانند ژن درمانی و غربال گری داروها مورد توجه محققین قرار گرفته است (۱۳و۱۲). در نتیجه این کار تحقیقاتی باید اشاره داشت که یکی از مشکلات اساسی بیان پروتئین نوترکیب لوسیفراز در سلول میزبان برای مثال جهت انجام غربالگری داروها تشکیل تجمعات پروتئینی و عدم بیان آن‌ها به‌صورت محلول و فعال می‌باشد. مشابه این پدیده در این مطالعه می‌توان به بیان موفقیت آمیز پروتئین لوسیفراز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد اشاره نمود. به این دلیل که لوسیفراز از جمله پروتئین‌های القا شونده در دماهای پایین (۱۷ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد) است که در صورت القای بیان آن در دماهای بالاتر مستعد مجتمع شدن می‌باشد و در نتیجه میزان قابل قبولی از فعالیت آنزیمی را از خود نشان نخواهد داد این در حالی‌است که در حضور القای هم‌زمان آن همراه با چپرون Hsp70 در سلول در دماهای بالاتر (۳۰ درجه سانتی‌گراد) پس از گذشت مدت زمان بسیار کوتاهتر در سطح بالایی به فرم فعال بیان می‌شود. بنابراین می‌توان از این چپرون و یا سایر چپرون‌های مشابه جهت بیان پروتئین‌های مستعد مجتمع شدن در سلول میزبان بهره گرفت (۳۳).

نتیجه گیری

چپرون Hsp70 ماهی *Rutilus frisii kutum* قادر به ممانعت و تعمیر لوسیفراز دناتوره شده گرمایی در شرایط *in vivo* می‌باشد. لوسیفراز یک پروتئین گزارش‌گر حساس به دما می‌باشد که در جهت بررسی نقش

چپرون‌ها در شرایط *in vivo* به‌عنوان یک سوبسترای مناسب عمل می‌کند. یکی از مشکلات اساسی بیان پروتئین نوترکیب لوسیفراز در سلول میزبان برای مثال جهت انجام غربالگری داروها تشکیل تجمعات پروتئینی و عدم بیان آن‌ها به‌صورت محلول و فعال می‌باشد. بنابراین می‌توان از این چپرون و یا سایر چپرون‌های مشابه جهت بیان پروتئین‌های مستعد مجتمع شدن در سلول میزبان بهره گرفت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت های دانشگاه گیلان و تربیت مدرس در انجام این پژوهش کمال تشکر را دارند.

منابع

1. Ritossa F. Discovery of the heat shock response, Cell Stress and Chaperones .1996; 1 (2): 97-98.

2. Murphy ME. The Hsp70 family and cancer, Carcinogenesis. 2013, 34(6): 1181–1188.

3. Young JC, Barral JM, Ulrich Hartl F. More than folding: localized functions of cytosolic chaperones, Trends Biochem. 2003; 28: 541–547.

4. Park C, Seo Y. Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones for plant immunity, Plant Pathol. J. 2015; 31(4): 323–333.

5. Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, Singh SM, et al. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. Microbial Cell Factories. 2015; 14(1): 24.

6. Meriin AB, Sherman MY. Role of molecular chaperones in neurodegenerative disorders, Int J Hyperthermia. 2005; 21(5):403-19.

7. Lianos GD, Alexiou GA, Mangano A, Mangano A, et al. The role of heat shock proteins in cancer, Cancer Lett. 2015; 360(2): 114–118.

8. Schröder H, Langer T, Hartl F, Bukau B. DnaK, DnaJ and GrpE from a Cellular chaperone machinery capple of repairing heat induced protein damage. The EMBO Journal. 1993; 12(11): 4137-4144

9. Forreiter C. Stable transformation of an arabidobsis cell suspension culture with firefly Lusiferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity in vivo, The plant cell. 1977; 9(12): 2171-2181.

10. Nollen EA, Brunsting JF, Roelofsen H, Weber LA, et al, In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. Molecular and Cellular Biology.1999;19(3): 2069-2079.

11. Nollen EA, Brunsting JF, Song J, Kampinga HH, et al. Bag1 functions in vivo as a negative regulator of Hsp70 chaperone activity. Molecular and Cellular Biology. 2000; 20(3): 1083-1088.

12. Hauke H, H, Mona CW. Whole-cell living biosensors - Are they ready for environmental application? Applied Microbiology and Biotechnology. 2006; 70(3): 273-280.

13. Leeuwen WV, Hagendoorn MJM, Ruttin T, Poecke RV, et al. The use of the luciferase reporter system for in Planta gene expression studies. Plant Molecular Biology Reporter. 2000; 18: 143a-143t.

14. Brasier AR, Ron D: Luciferase reporter gene assay in mammalian cells. Methods in enzymology. 1992; 216: 386-397.

15. Ozawa T, Kaihara A, Sato M. Split luciferase as an optical probe for detecting protein-protein interactions in mammalian cells based on protein splicing. [J] Anal Chem. 2001; 73(11): 2516-21.

16. Giese KC, Basha E, Catague BY, Vierling E. Evidence for an essential function of the N terminus of a small heat shock protein *in vivo*, independent of in vitro chaperone activity. PNAS. 2005; 102(52): 18896–18901.

17. Massoud TF, Paulmurugan R, De A, Ray P, et al. Reporter gene imaging of protein-protein interactions in living subjects". Current Opinion in Biotechnology. 2007; 18(1):. 31–37.

18. Gamer J, Multhaup G, Tomoyasu T, Mccarty JS, et al. A cycle of Binding and release of DnaK, Dnaj and GrpE Chaperone regulates activity of the *E. coli* heat shock protein transcription factor 2. The EMBO journal.1996; 15(3); p. 607-617.

19. Giese KC, Basha E, Catague BY, Vierling E. Evidence for an essential function of the N terminus of a small heat shock protein in vivo, sensitivity. Photochem Photobiol Sci. 2010; 9(8): 1167-77.

29. Roychoudhury A, Basu S. Analysis of comparative efficiencies of different transformation methods of *E. coli* using two common plasmid vectors. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics. 2009; 46(5): 395-400.

30. Tolia NH, Joshna-Tor L. Strategies for protein co-expression in *E. coli*. Published in Association with cold spring harbor laboratory press, Nature Methods. 2006;3(1): 55-64.

31. Chopra I, Roberts M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2001; 65(2): 232–260.

32. Phadtare S. Recent Developments in Bacterial Cold-Shock Response. Curr. Issues Mol. Biol. 2004; 6(2): 125-136.

independent of in vitro chaperone activity. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005; 102(52), 18896-18901.

20. Jahangirizadeh Z , Ghafouri H, Sajedi RH, S. Sarikhan, et al. Molecular cloning, prokaryotic expression, purification, structural studies and functional implications of Heat Shock Protein 70 (Hsp70) from Rutilus frisii kutum. International Journal of Biological Macromolecules, Int J Biol Macromol. 2018; 108: 798-807.

21. Orreniu A, Samali S. "Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis." Cell Stress and Chaperones. 1998; 3(4): 228–236.

22. Samali A, Holmberg CI, Sistonen L, Orrenius S. "Thermotolerance and cell death are distinct cellular responses to stress: dependence on heat shock proteins." FEBS Letters. 1999; 461(3): 306–310.

23. Mohd N. "Immunogenicity and protective efficacy of DnaJ (hsp40) of Streptococcus pneumoniae against lethal infection in mice", Vaccine. 2006; 24(37-39): 6225-6231.

24. Vabulas RM, Raychaudhuri S, Hayer-Hartl M, Hartl FU. Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010; 2(12): 1–18.

25. Santoro M. Heat shock factors and the control of the stress response, Biochem. Pharmacol. 2000; 59(1): 55–63.

26. Christ D, Chin JW. Engineering Escherichia coli heat-resistance by synthetic gene amplification. Protein Engineering, Design & Selection. 2008; 21(2): 121–125.

27. Song NH, Ahn YJ. DcHsp17.7, a small heat shock protein in carrot, is tissue-specifically expressed under salt stress and confers tolerance to salinity. New Biotechnology. 2011; 28(6): 698-704.

28. Imani M, Hosseinkhani S, Ahmadian S, Nazari M. Design and introduction of a disulfide bridge in firefly luciferase: increase of thermostability and decrease of pH

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2018; 9(2)

Original Article

Investigating the role of Hsp70 chaperone from Rutilus frisii kutum in vivo in the thermal inactivation of luciferase

Jahangirizadeh Z, Ph.D. Student.[1], Ghafouri H, Ph.D.[2*], Sajedi RH, Ph.D. [3]

1. Ph.D. Graduated Student, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University,Tehran, Iran

* Email corresponding author: h.ghafoori@guilan.ac.ir

Received: 17 Jul. 2018 Accepted: 11 Sep. 2018

Abstract

Aim: The role of Hsp70 chaperone from Rutilus frisii kutum in the thermal inactivation of luciferase in E. coli cell carrying Hsp70 and firefly luciferase was investigated.

Material and Methods: Co-transformation of E. coli cell was carried out with two expression vectors containing Hsp70 and firefly luciferase. The co-transformed cells carrying Hsp70 and luciferase were expressed under optimum conditions. After adding tetracycline, the cells were then incubated for 60 min at 40, 42, 44, 46, 48 and 50°C treatments. Finally, the luminescence activity of samples was calculated.

Results: After 30 min at 40 and 42°C temperatures, the luciferase activity in control samples reached almost zero, while in the co-transformed samples, about 72% and 60% of the luminance activity maintained compared with control samples (before heat treatment), and even after 60 min, up to 36% and 22% of the activity remained. Also, at 44 and 46°C temperatures in the initial times after stress, a significant difference was observed between the luciferase activity of the co-transformed and the control samples. In contrast, at 48 and 50°C temperatures, the changes of the luciferase activity of co-transformed samples were small compared with control samples even in the early stages of stress.

Conclusion: The thermal aggregation of luciferase as a significant reporter protein is inhibited at high temperatures via the activity of Hsp70 in the bacterial cell, which this process can be widely used in the food and pharmaceutical industries and the providing cancer diagnostic kits.

Key words: Hsp70, Rutilus frisii kutum, luciferase, in vivo, thermal inactivation