

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

زهرة جهانگیری زاده<sup>۱</sup> Ph.D. Student، حسین غفوری<sup>۲\*</sup> Ph.D.، رضاحسن ساجدی<sup>۳</sup> Ph.D.

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](mailto:h.ghafoori@guilan.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۲۶

### چکیده

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

**مواد و روش‌ها:** انتقال هم‌زمان دو وکتور بیانی حاوی ژن‌های Hsp70 و لوسیفرز 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 لوسیفرز نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

**نتایج:** در دماهای ۴۰ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد با گذشت زمان ۳۰ دقیقه، فعالیت لوسیفرزی در نمونه‌های کنترل تقریباً به صفر می‌رسد، در صورتی‌که در نمونه‌های کوترنسفرم به ترتیب حدود ۷۲ درصد و ۶۰ درصد فعالیت لوسیفرزی 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 و ۴۶ درجه سانتی‌گراد، اختلاف قابل ملاحظه‌ای بین فعالیت لوسیفرزی نمونه کوترنسفرم و کنترل در زمان‌های اولیه پس از اعمال استرس مشاهده شد. در صورتی‌که در دماهای ۴۸ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت لوسیفرزی نمونه کوترنسفرم نسبت به نمونه کنترل حتی در زمان‌های اولیه استرس اندک بود.

**نتیجه‌گیری:** تجمع حرارتی لوسیفرز 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 تهیه کیت‌های تشخیص سرطان کاربردهای فراوانی داشته باشد.

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

۱۹۹۷ توسط Forreiter و همکاران در مورد Hsp17.6 آراییدوپسیس 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 نو ترکیب مشتق شده جهت ایجاد شرایط هم القایی و هم بیانی به میزبان مناسب انتقال یافته است (۱۱ و ۹). آنزیم لوسیفرز به‌طور وسیعی در زیست فناوری و بیوتکنولوژی برای مثال در تهیه کیت‌های تشخیص سرطان، تصویربرداری از سلول‌های زنده، غربال‌گری داروها و همچنین مطالعه حیوانات ترانس ژن کاربردهای فراوان دارد (۱۳ و ۱۲). در دهه‌های اخیر این آنزیم در زیست حسگرها، ژن‌های گزارش‌گر، بررسی روابط برهم‌کنشی پروتئین‌ها و سنجش‌های آنزیمی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۵ و ۱۴). مطالعات نشان داده که لوسیفرز 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 سوپسترای مناسب عمل می‌کند (۱۶). برای مثال در مطالعات پیشین از لوسیفرز به‌عنوان یک گزارش‌گر جهت مطالعه مکانیسم عملکرد Hsp sها در شرایط *in vivo* استفاده شد (۱۷). لوسیفرز 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 (سوپسترا) و لوسیفرز (آنزیم) در این فرایند دخیل هستند. واکنش لوسیفرین با اکسیژن توسط لوسیفرز کاتالیز شده و در نهایت منجر به تولید نور می‌شود. با استفاده از دستگاه لومینومتر می‌توان فعالیت لوسیفرز را بر پایه اندازه‌گیری نور مورد سنجش قرار داد.

شوک حرارتی بیان ژن‌های بیشماری از جمله Hsp70 را افزایش می‌دهد. سازش سلولی به شوک حرارتی مکانیسم بسیار پیچیده‌ای 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 تقریباً در همه ارگانیزم‌ها 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 آنجایی که چپرون‌ها قادر به کاهش میزان تجمع پروتئین‌های دناتوره و افزایش راندمان تاخوردگی مجدد پروتئین‌ها می‌باشند، به‌منظور مطالعه فعالیت چپرونی در شرایط *in vivo* از تکنیک‌های مختلفی در این راستا استفاده می‌شود، اما بسیاری از این روش‌ها مستلزم لیز سلولی و استخراج پروتئین کل از سلول می‌باشد. 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 سلول‌های E. coli پیشنهاد شد (۸)، پس از آن نیز فرضیه‌ی نقش sHsp ها در حفاظت از پروتئین‌های گزارش‌گر در سال

قابل ملاحظه‌ای نسبت به لوسیفرز بدون چپرون در سلول‌های کنترل داشته باشد.

#### مواد و روش‌ها

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

#### انتقال هم‌زمان وکتورهای نوترکیب به باکتری *E. coli*

*coli* سویه بیانی *BL21* بعد از آماده سازی سلول‌های مستعد، انتقال شیمیایی وکتورها به سلول‌ها انجام پذیرفت. به‌منظور غربال‌گری کلونی‌های حاصل از کوترانسفرماسیون (حاوی وکتورهای حامل ژن Hsp70 و لوسیفرز)، کلونی PCR و سنجش فعالیت لوسیفرازی صورت گرفت. در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 پلیمرز استفاده می‌شود و در صورتی که 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 اندازه‌گیری فعالیت بیولومینسانسی آنزیم لوسیفرز در سلول‌ها ۵ میکرولیتر از نمونه باکتری زنده حاوی لوسیفرز به ۵ میکرولیتر از کوکتل 5X سوبسترای آن (شامل لوسیفرین 5mM، 4 mM ATP، 100 mM MgSO<sub>4</sub> و تریس 50 mM) اضافه شد و با کمک دستگاه بیولومینومتر (Sirius L tube luminometer, Germany) خوانده شد. جهت سنجش فعالیت لوسیفرزی لازم است که در ابتدا بیان پروتئین در سلول باکتری صورت گیرد.

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 لوسیفرز در باکتری *E. coli* امکان مطالعات غیرفعال سازی دمایی و بازبایی فعالیت آن را در شرایط *in vivo* بدون به خطر انداختن اعمال متابولیک ضروری سلول ایجاد می‌کند (۱۸ و ۸). بنابراین از آن‌جاکه سنجش فعالیت لوسیفرز توسط دستگاه لومینومتر بسیار حساس و دقیق می‌باشد و در ثانی اندازه‌گیری فعالیت لوسیفرز را می‌توان توسط سلول‌های زنده باکتری *E. coli* بیان‌کننده لوسیفرز و بدون انجام لیز سلولی و با افزودن سوبسترای آن صورت داد، لذا لوسیفرز به‌عنوان یک پروتئین گزارش‌گر مناسب در باکتری معرفی می‌شود. علاوه بر این همان‌طور که اشاره شد بیان پروتئین Hsp70 در شرایط استرس دمایی به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد لذا گرچه لوسیفرز یک پروتئین باکتریایی نیست اما به‌دلیل اینکه یک پروتئین مونومر حساس به دما است (طبق مطالعات قبلی صورت گرفته بر سینتیک غیرفعال سازی لوسیفرز 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 (۱۹ و ۸). از آنجا که فعالیت لوسیفرز بسیار حساس به دما می‌باشد و با افزایش دما فعالیت خود را از دست می‌دهد بنابراین با هم انتقالی وکتورهای حاوی ژن‌های Hsp70 و لوسیفرز در سلول باکتری *E. coli* و بیان هم‌زمان هر دو پروتئین در سلول، انتظار می‌رود که تحت شرایط استرس‌های دمایی درصد فعالیت لوسیفرز در سلول‌های کوترانسفرم شده تفاوت

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 لوسیفراز آن‌ها توسط دستگاه لومینومتر تعیین شد. درصد فعالیت لوسیفراز نمونه‌های تیمار حرارتی با توجه به میزان فعالیت اولیه 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 لوسیفراز آن با نمونه کوترنسفرم شده مطابق روش فوق مقایسه شد.

### نتایج

#### کوترنسفرماسیون و بیان هم‌زمان ژن Hsp70 و

#### لوسیفراز

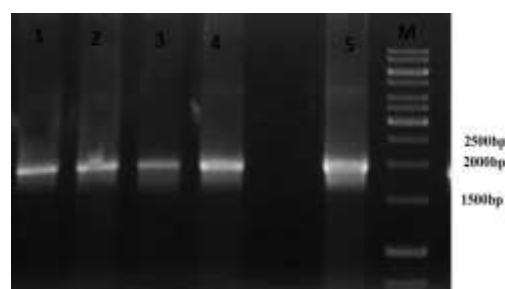
برای انجام کوترنسفرماسیون، از غلظت‌های برابر سازه‌های ژنی pET28a: Hsp70 و pET16b:Luciferase جهت انتقال به سلول‌های مستعد BL21 استفاده شد. به‌منظور غربالگری کلونی‌های حاوی ژن Hsp70 از روش کلونی PCR استفاده شد و نتیجه‌ی آن بر روی ژل آگارز مشاهده شد (شکل ۱).

#### بررسی اثر مهارى 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 به مدت ۴ ساعت، ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه‌های باکتری در لوله‌های آزمایش تقسیم شد و فعالیت لوسیفراز آن‌ها در حضور و عدم حضور تتراسایکلین ۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد در طی یک ساعت تعیین شد. واکنش با افزودن نسبت‌های برابر سوسترای 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

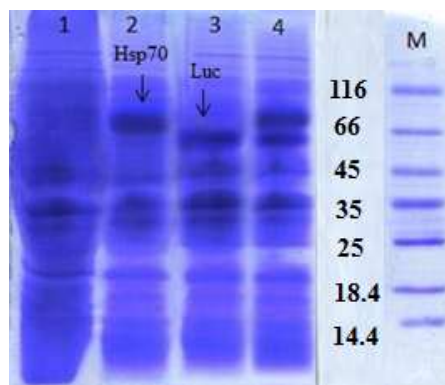
سنجش استاندارد فعالیت لوسیفراز در شرایط *in vivo*، باکتری *E. coli* کوترنسفرم شده حاوی وکتور نوترکیب pET28a:Hsp70 و pET16b:luciferase پس از کشت شبانه در محیط LB دارای ۵۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر کانامایسین و ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت تحت القای



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 بیانی Hsp70 (۵) محصول PCR مربوط به ژن Hsp70 به‌عنوان کنترل و M مارکر وزن مولکولی (#SM0322, Fermentas)

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 به هر یک از آن‌ها مشاهده شد. حضور باند پروتئینی در ناحیه ۶۶ و ۶۱ کیلودالتون به ترتیب مربوط به پروتئین‌های Hsp70 و لوسیفراز نسبت به نمونه کنترل حاکی از بیان پروتئین‌های Hsp70 و لوسیفراز می‌باشد (شکل ۲).

به‌منظور تایید نتایج حاصل از کلونی PCR واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی Hsp70 با وکتور استخراج شده Hsp70 به‌عنوان کنترل انجام گرفت. از آنجاکه از پرایمرهای خود ژن استفاده شده است لذا طول حدود ۲۰۰۰ باز مشاهده می‌شود که 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 هم‌بیانی و مشاهده نتایج تکرار پذیر آن، در نهایت بیان نمونه کوترانسفرم در *E. coli* سویه BL21 توسط القاء گر ۱ mM IPTG و با توجه به انتخاب



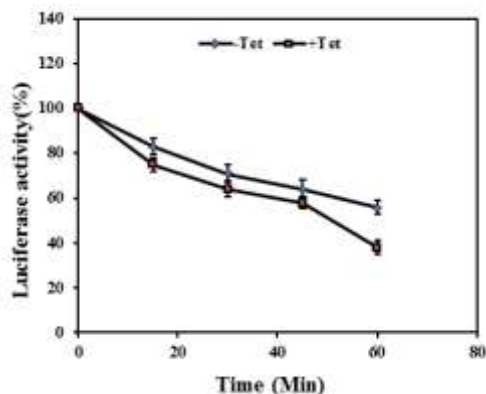
شکل ۲: آنالیز بیان ژن Hsp70 و لوسیفراز در سلول‌های *E. coli* سویه BL21 توسط القاگر ۱ mM IPTG با استفاده از ژل SDS-PAGE ۱۲/۵ درصد. M. مارکر وزن مولکولی (#SM0431, Fermentas) (۱) نمونه کنترل بدون وکتورهای بیانی، نمونه کنترل حاوی وکتور نو ترکیب Hsp70، (۳) نمونه کنترل حاوی وکتور نو ترکیب لوسیفراز، (۴) نمونه کوترانسفرم شده

تتراسایکلین ۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر 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، به‌طوری‌که در عدم حضور تتراسایکلین درصد بالاتری از فعالیت لوسیفرازی دیده می‌شود که این افزایش ناشی از بیان مجدد پروتئین در عدم حضور تتراسایکلین باشد.

### بررسی اثر مهارى تتراسایکلین بر بیان از نو پروتئین‌ها (De novo synthesis of proteins)

#### طی اعمال استرس حرارتی

پس از بیان ۴ ساعته نمونه کوترانسفرم تحت القای IPTG ۱ mM در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ ml از نمونه‌های باکتری در لوله‌های آزمایش الیکوت شد و فعالیت لوسیفرازی آن‌ها در حضور و عدم حضور

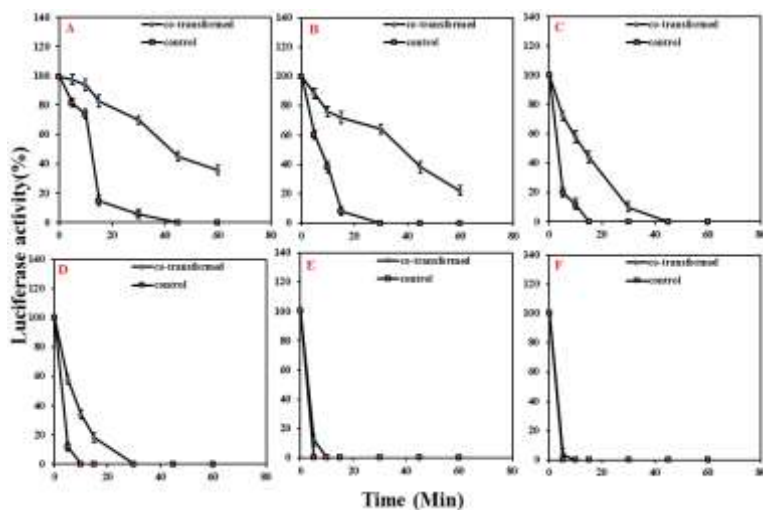


شکل ۳: اثر تتراسایکلین بر مهار بیان مجدد پروتئین در حین اعمال استرس در نمونه کوترنسفرم حاوی ژن Hsp70 در مقایسه با نمونه کنترل. پس از بیان ۴ ساعته نمونه کوترنسفرم تحت القای IPTG ۱ mM در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، فعالیت لوسیفرازی نمونه‌ها در حضور و عدم حضور تتراسایکلین ۲۵ µg/ml در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد 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

زمان ۳۰ دقیقه نیز تفاوت قابل ملاحظه‌ای در فعالیت لوسیفرازی همچنان مشاهده می‌شود به طوری 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 حفظ می‌شود، در صورتی که در نمونه فاقد چپرون این میزان به صفر می‌رسد. علاوه بر این شکل ۴ نشان می‌دهد در نمونه کوترنسفرم، تحت استرس دماهای ۴۰ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد با گذشت ۴۵ دقیقه پس از اعمال استرس به ترتیب تا حدود ۵۰ و ۳۸ درصد فعالیت اولیه لوسیفرازی حفظ می‌شود و حتی پس از ۶۰ 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 صورتی که این تغییرات برای نمونه کوترنسفرم در حدود ۶۰ درصد فعالیت اولیه می‌باشد. از طرفی در دماهای ۴۸ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد در نمونه فاقد چپرون با گذشت ۵ دقیقه اولیه پس از اعمال استرس، فعالیت لوسیفرازی نمونه به طور کامل از بین می‌رود اما در نمونه‌های کوترنسفرم در زمان ۵ دقیقه به ترتیب ۱۲ و ۴ درصد فعالیت لوسیفراز حفظ می‌شود.

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 به طوری که 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



شکل ۴: نمودارهای تغییرات فعالیت لوسیفرازای نمونه کوترانسفرم حاوی ژن Hsp70 در دماهای (A) ۴۰ و (B) ۴۲، (C) ۴۴، (D) ۴۶، (E) ۴۸ و (F) ۵۰ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه. پس از بیان ۴ ساعته نمونه‌های کوترانسفرم تحت القای ۱ mM IPTG در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و افزودن تتراسایکلین ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، نمونه‌ها در دماهای تعیین شده به مدت یک ساعت انکوبه شدند و فعالیت لوسیفرازای نمونه‌ها نسبت به نمونه‌های قبل از تیمار حرارتی اندازه‌گیری شد. در دماهای ۴۰، ۴۲ درجه سانتی‌گراد با گذشت زمان ۳۰ دقیقه، فعالیت لوسیفرازای در نمونه فاقد چپرون تقریباً به صفر می‌رسد در صورتی‌که در نمونه کوترانسفرم به ترتیب حدود ۷۲ درصد و ۶۰ درصد فعالیت لوسیفرازای حفظ می‌شود و حتی پس از ۶۰ دقیقه نیز تا ۳۶ درصد و ۲۲ درصد فعالیت همچنان باقی می‌ماند. همچنین در استرس دماهای ۴۴ و ۴۶ درجه سانتی‌گراد، در زمان‌های اولیه پس از اعمال استرس اختلاف قابل ملاحظه‌ای بین فعالیت لوسیفرازای نمونه‌های کوترانسفرم و کنترل مشاهده می‌شود، در صورتی‌که در دماهای ۴۸ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد تغییرات فعالیت لوسیفرازای نمونه کوترانسفرم نسبت به کنترل حتی در زمان‌های اولیه استرس ناچیز بود.

### بحث

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 (۲۵-۲۳). 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 (۲۰). 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

پروتئین‌های شوک حرارتی (Hspها)، مولکول‌هایی با حفاظت بین‌گونه‌ای 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 (۲۱ و ۲۲). 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 (۲۳). پروتئین‌های خانواده Hsp70 در محدوده وزنی ۶۸ تا ۷۴ کیلودالتون می‌باشند و تقریباً در همه ارگانیزم‌ها و ارگانل‌ها یافت می‌شوند. در پستانداران و اغلب یوکاریوت‌ها

فعالیت چپرونی در شرایط *in vivo*، لوسیفراز حشره شب تاب (Firefly) (Luc) از گونه *photinus pyralis* به عنوان گزارشگر مورد استفاده قرار گرفت (۲۸). به منظور 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 این صورت دو وکتور برای حفظ پایداری خود رقابت می کنند و معمولا هر یک به سلول های جداگانه وارد می شوند. به طور معمول برای افزایش کارایی هم انتقالی، غلظت های بالا و برابر وکتورها استفاده می شود. همچنین سلول میزبان جهت عمل انتقال نیز نقش مهمی را ایفا می کند. *E. coli* مناسب ترین میزبان جهت تهیه ی سلول مستعد در نظر گرفته می شود (۲۹-۳۱). با در نظر گرفتن نکات فوق برای انجام کوترانسفر ماسیون، از غلظت های برابر سازه های ژنی pET28a: Hsp70 و pET16b: Luciferase جهت انتقال به سلول های مستعد BL21 استفاده شد. بیان نمونه کوترانسفرم در سلول های *E. coli* سویه BL21 توسط الفاکر یک میلی مولار IPTG و با توجه به انتخاب دمای بهینه ی بیان در ۳۰ درجه ی سانتی گراد 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 به واسطه بیان و سنتز آن نیست از آنتی بیوتیک تتراسایکلین استفاده شد. حضور تتراسایکلین در غلظت های بالا از سنتز مجدد هر گونه پروتئین اضافی در باکتری طی زمان اندازه گیری فعالیت لوسیفراز پس از اعمال استرس ممانعت ایجاد می کند (۳۲). سلول های نو ترکیب القا شده با IPTG در معرض شوک حرارتی در دمای ۴۰، ۴۲، ۴۴، ۴۶، ۴۸ و ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت انکوبه شدند. در دماهای ۴۰ و ۴۲ درجه سانتی گراد در مدت زمان ۳۰ دقیقه تفاوت قابل ملاحظه ای در فعالیت لوسیفرازی مشاهده می شود به طوری که با گذشت زمان ۳۰ دقیقه، در دمای ۴۰ و ۴۲

را در این سلول به طور قابل توجهی افزایش می دهد (۲۰). در مطالعه حاضر در جهت تایید نتایج قبلی و بررسی مستقیم نقش حفاظتی Hsp70 از پروتئین ها، تغییرات فعالیت لوسیفرازی تحت شرایط استرس دمایی در شرایط *in vivo* بررسی شد. از آنجایی که چپرون ها قادر به کاهش میزان تجمع پروتئین های دناتوره و افزایش راندمان تا خوردگی مجدد پروتئین ها می باشند، به منظور مطالعه ی فعالیت چپرونی تکنیک های مختلفی از قبیل اندازه گیری میزان بقای سلول های پروکاریوت و یوکاریوت در حضور و عدم حضور چپرون مورد نظر و تعیین میزان پروتئین های تجمع یافته و همچنین پروتئین های محلول پس از اعمال استرس با استفاده از روش های عمومی تعیین غلظت پروتئین وجود دارد. روش های فوق گرچه این قابلیت را دارند که شرایط درون سلولی حاکم بر تغییرات القا شده بر پروتئین ها را در حضور و عدم چپرون مورد نظر گزارش دهند اما این روش ها مستلزم لیز سلولی و استخراج پروتئین کل از سلول می باشند (۲۶ و ۲۷). به منظور رفع این مشکل در بررسی های 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 نو ترکیب مشتق شده جهت ایجاد شرایط هم القایی و هم بیانی به میزبان مناسب انتقال یافته است (۸-۱۱). سیستم بیان همزمان چپرون و ژن گزارشگر برای اولین بار توسط Schroder (۸) برای سلول های *E. coli* پیشنهاد شد، پس از آن نیز فرضیه ی نقش Hspها در حفاظت از پروتئین های 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 سیستم های گزارشگر در شرایط سیستم زنده و بدون انجام لیز سلولی می باشد. در این مطالعه جهت سنجش



دقیقه است (۳۱ و 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 پایداری حرارتی لوسیفرز دارد که این امر می‌تواند به کاربردهای صنعتی Hsp70 ختم شود. در دهه‌های اخیر لوسیفرز به‌عنوان یک پروتئین گزارش‌گر در سیستم‌های زنده در گستره وسیعی از علوم پزشکی مانند ژن درمانی و غربال‌گری داروها مورد توجه محققین قرار گرفته است (۱۳ و ۱۲). در نتیجه این کار تحقیقاتی باید اشاره داشت که یکی از مشکلات اساسی بیان پروتئین نوترکیب لوسیفرز 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 لوسیفرز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد اشاره نمود. به این دلیل که لوسیفرز 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 حالی است 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).

#### نتیجه‌گیری

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

سانتی‌گراد به ترتیب حدود ۷۲ درصد و ۶۰ درصد فعالیت لوسیفرازی در نمونه کوترنسفرم نسبت به نمونه قبل از تیمار حرارتی حفظ می‌شود، در صورتی که در نمونه‌ی فاقد چپرون این میزان فعالیت تقریباً از بین می‌رود. لازم به ذکر است که در نمونه‌های کوترنسفرم در دماهای ۴۰ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد حتی پس از ۶۰ 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 لوسیفرز 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 صورتی که 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 تقریباً فعالیت لومینسانس از بین می‌رود. با توجه به نتایج حاصل، غیرفعال‌سازی دمایی لوسیفرز در نمونه کوترنسفرم 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 لوسیفرز را از دمای افزایش یافته برعهده دارد. در واقع تحت دنا تورا سیون دمایی لوسیفرز، Hsp70 با لوسیفرز تعامل ایجاد کرده و آن را در یک حالت حد واسط تاخوردگی پیش از انباشته شدن آن تثبیت می‌کند و لوسیفرز را از آسیب‌های دمایی حفظ می‌کند. لوسیفرز یک پروتئین گزارش‌گر حساس به دما می‌باشد که در مطالعات بیوتکنولوژی و زیست‌فناوری کاربردهای فراوان دارد. طبق مطالعات قبلی این پروتئین تحت شرایط *in vitro* نیمه عمر آن در ۴۲ درجه سانتی‌گراد کمتر از ۳

8. Schröder H, Langer T, Hartl F, Bukau B. DnaK, DnaJ and GrpE from a Cellular chaperone machinery capable of repairing heat induced protein damage. The EMBO Journal. 1993; 12(11): 4137-4144
9. Forreiter C. Stable transformation of an arabidopsis cell suspension culture with firefly Luciferase 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.

چپرون‌ها در شرایط *in vivo* به‌عنوان یک سوبسترای مناسب عمل می‌کند. یکی از مشکلات اساسی بیان پروتئین نو ترکیب لوسیفرز 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 حمایت‌های 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.

- 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
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.

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

Jahangirizadeh Z, Ph.D. Student.<sup>1</sup>, Ghafouri H, Ph.D.<sup>2\*</sup>, Sajedi RH, Ph.D.<sup>3</sup>

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