بیان ژن، تخلیص و بررسی کاهش لومینسانس لوسیفراز باکتریایی *Xenorhabdus luminescence* بر اثر جایگزینی گلوتامات ۱۷۵ توسط گلایسین در زیر واحد آلفا

علی ریاحی مدوار، سامان حسینخانی*، خسرو خواجه و بیژن رنجبر

تهران ، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه بیوشیمی

تاریخ دریافت: ۸٤/۰۹/۰۹ تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۲/۱٤

چکیده

بهینه سازی بیان لوسیفراز جهش یافته و طبیعی، تخلیص، و خاموش شدگی فلورسانس آنها در حضور غلظتهای مختلف FMN مورد بررسی قرار گرفت. لوسیفراز باکتریها دارای دو زیرواحد آلفا و بتا می باشد. خصوصیات کاتالیتیکی آنزیم لوسیفراز باکتریایی بوسیله زیرواحد آلفا دیکته، و نشر نور در باکتریها (با طول موج ٤۹۰ nm) در حضور سوبستراهای $FMNH_2$، آلدئید و اکسیژن مولکولی توسط آنزیم لوسیفراز کاتالیز می شود. لوسیفراز باکتریها را، بر پایه سرعت کاهش لومینسانس در یک بار سنجش با روش استاندارد، به دو گروه، لوسیفراز با سرعت کاهش کند و لوسیفراز با سرعت کاهش سریع طبقه‌بندی می‌کنند. مطالعات انجام شده بروش جهش زایی اتفاقی بر روی زیرواحد آلفا در باکتری *Xenorhabdus luminescence* (با سرعت کاهش کند لومینسانس) نشان داد، که اگر در جهش یافته گلوتامات ۱۷۵ بوسیله گلایسین جایگزین شود، سرعت کاهش لومینسانس آن نسبت به لوسیفراز طبیعی سریعتر می گردد. در این مطالعه ضمن بهینه سازی بیان و تخلیص آنزیم طبیعی و جهش یافته مشخص شد یکی از دلایل اصلی تفاوت کاهش لومینسانس بین لوسیفراز جهش یافته و لوسیفراز طبیعی، کاهش قدرت اتصال FMN به آنزیم، در لوسیفراز جهش یافته است.

واژه های کلیدی: بیولومینسانس، لوسیفراز، FMN، خاموش شدگی.

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۸۸۰۰۹۷۳۰-۰۲۱، پست الکترونی: saman_h@modares.ac.i

مقدمه

نشر نور توسط موجودات زنده (بیولومینسانس) از جالب‌ترین پدیده‌های زیستی در طبیعت بوده که در موجودات مختلفی از قبیل حشرات، کیسه تنان، قارچها، ماهیها و باکتریها مشاهده می‌شود. بیولومینسانس یک واکنش آنزیمی است که با واسطه آنزیم لوسیفراز و سوبسترای لوسیفرین و مولکول اکسیژن در سلولهای زنده صورت می‌گیرد. لوسیفرین در حضور اکسیژن مولکولی به لوسیفراز متصل و یک حدواسط پر انرژی (اکسی لوسیفرین) به وجود می آورد، در مرحلهٔ بعد اکسی لوسیفرین تجزیه و نشر نور صورت می گیرد. مکانیسم کلی نشر نور در موجودات زنده در زیر آورده شده است (۱۰،۱۱).

$$\text{Luciferin} + O_2 \xrightarrow[\text{Luciferase}]{} \text{Oxyluciferin}^* \longrightarrow \text{Light}$$

باکتریهای لومینسانس نسبت به سایر موجودات لومینسانس از گستردگی بیشتری برخوردارند، بطوریکه در ۱۱ گونه از چهار سرده (جنس) Shewanella (Alteromonas), Vibrio, Photobacterium و Xenorhabdus قرار گرفته در دو خانواده Vibriaceace و Entrobacterieceae نشر نور گزارش شده است (۱۱).

Archive of SID
www.SID.ir

لوسیفراز باکتریها دارای دو زیرواحد آلفا و بتا بوده، که دارای ساختاری بشکه مانند $(\beta/\alpha)_8$ هستند، و بترتیب بوسیله ژنهای LuxA و LuxB کد می‌شوند (٤). بررسیها و آزمایشهای اولیه بیانگر تعیین خصوصیات کاتالیتیکی آنزیم لوسیفراز باکتریایی بوسیله زیرواحد آلفا می‌باشد (۱۲، ۲). سوبستراهای واکنش بیولومینسانس در باکتریهای لومینسانس؛ فلاوین مونو نوکلوتید احیا شده ($FMNH_2$)، آلدئید و اکسیژن است. نشر نور در باکتریهای لومینسانس با طول موج ٤۹۰ nm صورت می گیرد. سنجش فعالیت آنزیم لوسیفراز باکتریایی به سه روش استاندارد،دی تیونات و کوپل (همراه) انجام می‌شود. در روش سنجش استاندارد (معمول ترین روش سنجش) تزریق سریع $FMNH_2$ به داخل محلول حاوی لوسیفراز و آلدئید انجام می‌شود، بدنبال آن نشر نور به سرعت به حد ماکزیمم رسیده و سپس کاهش می‌یابد (۱۱).

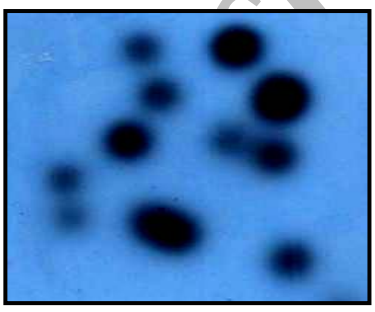
بر پایه سرعت کاهش لومینسانس در یک بار سنجش (Single turnover assay) در روش سنجش استاندارد، لوسیفراز باکتریها را به دو گروه لوسیفراز با سرعت کاهش کند و لوسیفراز با سرعت کاهش سریع طبقه‌بندی می‌کنند.

باکتری *Xenorhabdus luminescence* (Xl) دارای لوسیفرازی با سرعت کاهش لومینسانس کندتر و پایداری حرارتی بالاتر نسبت به سایر لوسیفرازهای باکتریهای لومینسانس است (٦، ١٤). جهش زایی اتفاقی (Random mutagenesis) بر روی زیرواحد آلفا باکتری (Xl) بین اسیدآمینه های ۲۳۳-١٦٦یعنی ناحیه دخیل در کنترل سرعت کاهش لومینسانس می باشد (۱۵)، نشان می دهد. در یکی از جهش یافته‌ها (E175G) که در آن گلوتامات ۱۷۵ توسط گلایسین جایگزین شده است، خصوصیاتی مشابه لوسیفراز *Photobacterium phosphoreum* (Pp) با سرعت کاهش سریع لومینسانس، نشان می‌دهد (۷).

برای پی بردن بعلت تغییر سرعت کاهش لومینسانس بر اثر تغییر این اسیدآمینه، ابتدا پلاسمید حاوی ژن لوسیفراز طبیعی و جهش یافته به باکتری *E. coli* انتقال یافت. پس از بهینه سازی بیان آنزیمها و تخلیص آنها، خاموش شدگی آنزیمها در حضور غلظتهای مختلف FMN (برای بررسی میزان قدرت اتصال FMN به آنزیم) مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روشها

انتقال ژن: ژن لوسیفراز طبیعی (Xl) و جهش یافته (E175G) که در پلاسمید pT 7-5 کلون شده بود (این پلاسمید دارای ژن مقاومت به آمپی سیلین می باشد) بروش شوک حرارتی به باکتری *E. Coli* BL_{21} انتقال داده شد. (ژن لوسیفراز طبیعی (Xl) و جهش یافته (E175G) در دانشگاه مک گیل کانادا در پلاسمید pT 7-5 کلون شده است). برای اطمینان از انتقال پلازمید به باکتری (غربال باکتریهای حاوی ژن لوسیفراز)، ابتدا باکتریهای ترانسفورم شده، روی پلیت حاوی آمپی‌سیلین ۵۰ µg/ml بصورت تک کلون کشت داده شد. سپس مقدار بسیار کمی آلدئید (دکانال) در شرایط استریل روی درب پتری‌دیشهای فوق قرار گرفت. باکتریهای حاوی ژن لوسیفراز در حضور آلدئید نوری تولید می کنند، که بر روی فیلم رادیولوژی بصورت نقاط سیاه رنگی قابل مشاهده می‌باشند (شکل ۱).



شکل ۱: کلونی باکتریهای نشر کننده نور (لومینسانس) بر روی فیلم رادیولوژی.

افزایش بیان: از محیط کشت 2XYT (Trypton ١٦ g/lit- Bacto، Bacto-Yeast extract ١٠g/lit و NaCl ٥ g /lit) درحضور IPTG (D Thiogalacto pyranosid, dioxan free)

www.SID.ir

–β– Isopropyl)، دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و سرعت ۲۵۰ rpm (دور در دقیقه) برای بیان بالای آنزیمهای لوسیفراز طبیعی و جهش یافته مورد استفاده قرار گرفت.

لیز سلولی: لیزسلولی در بافر لیز (۱۰ mM EDTA، mM ۱۰ بتامرکاپتواتانل و ۵۰ mM بافر فسفات pH ۷) توسط امواج ماورای صوت سونیکاتور، در ٤ مرحله ٤۵ ثانیه‌ای با فواصل یک دقیقه ای و در یخ انجام شد.

تخلیص پروتئین: تخلیص آنزیمها با استفاده از ستونهای DEAE –Sepharose و Sephacryl –S –200 انجام گرفت.

از ستون DEAE –Sepharose (حجم ستون ml ۸، سرعت جریان (flow rate) برابر یک میلی‌لیتر در دقیقه و طول موج جذب nm ۲۸۰) با استفاده از FPLC UPC در دمای (۲۵ درجه سانتی گراد) آزمایشگاه برای حذف پروتئینهای با وزن کمتر از ۳۷ کیلو دالتون استفاده شد. ابتدا ستون توسط بافر mM ۵۰ فسفات، mM ۱۰ بتا مرکاپتواتانل و۷ pH به تعادل رسید. سپس نمونه روی ستون برده شد و عمل شستشو توسط گرادیان ۰/٦ M بافر فسفات، mM ۱۰ بتامرکاپتواتانل و ۷ pH انجام گرفت، نمونه خارج شده از ستون به میزان یک میلی‌لیتر در لوله‌های آزمایش جمع آوری شد. سپس نمونه‌ها را روی ژل SDS–PAGE برده و نمونه‌های حاوی پروتئین مورد نظر جمع آوری و بوسیله سولفات آمونیوم تغلیظ شد. در ادامه محلول پروتئین تغلیظ شده روی ستون ژل فیلتراسیون (Sephacryl –S –200) برده شد.

ستون Sephacryl –S –200 (حجم ستون ml ۱۲۰، سرعت جریان (flow rate) برابر یک میلی‌لیتر در دقیقه) در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی گراد) برای جداسازی پروتئینهای مختلف و بدست آوردن پروتئین خالص استفاده شد. ابتدا ستون توسط بافر فسفات mM ۵۰، ۱۰mM بتامرکاپتواتانل، ۷ pH به میزان ۱/۵ برابر حجم ستون شسته و سپس نمونه تغلیظ شده روی ستون برده شد. عمل جداسازی بوسیله بافر فوق انجام، و نمونه‌ها در لوله‌های آزمایش به میزان یک میلی‌لیتر جمع آوری شد. سنجش مقدار پروتئین با روش برادفورد انجام شد (۱).

الکتروفورز: در تمام آزمایشات از الکتروفورز PAGE– SDS در شرایط احیایی استفاده شد. ژل بصورت ۱۰ درصد ژل جدا کننده (Separating gel) و ۵ درصد ژل متراکم کننده(Stacking gel) تهیه گردید.

فلورسانس: این مطالعات توسط اسپکتروفتومتر PERKIN ELMER انجام شد.

مطالعات خاموش کنندگی دینامیک فلورسانس: برای بررسی میزان تمایل (affinity) آنزیمهای طبیعی و جهش یافته لوسیفراز به FMN، مطالعات مقایسه خاموش کنندگی فلورسانس ذاتی آنها در غلظتهای مختلف FMN مورد بررسی قرار گرفت. طول موج تابش، ۲۹۵ نانومتر و اندازه گیری شدت فلورسانس در طول موج نشری ۳٤۰ نانومتر (مربوط به باقی‌مانده تریپتوفان) انجام گرفت. برای آماده سازی نمونه‌ها محلول آنزیمی با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر و FMN با غلظت ۲ مولار تهیه و در محلول نهایی غلظت مورد نظر بدست آمد. میزان تمایل آنزیمهای به FMN از رابطه زیر محاسبه شد.

$$(1-f/fo)^{-1}= (1- Ø)^{-1}+ K_d(1-Ø)^{-1}[FMN]^{-1}$$

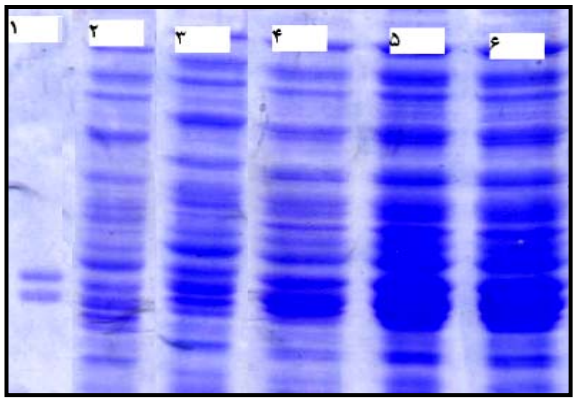
در این رابطه f و fo فلورسانس آنزیمهای لوسیفراز به ترتیب در حضور و عدم حضور FMN، Ø نشان دهنده کارایی Fluorescence quantum کمپلکس آنزیم– FMN و K_d ثابت تفکیک آنزیمها برای FMN می‌باشد. K_d برای لوسیفراز طبیعی برابر ۱۱/۹۱ و برای لوسیفراز جهش‌یافته برابر ۳۹/۱ می‌باشد.

نتایج

بیان بالای پروتئین (Over expression) : برای پیدا کردن غلظت مناسب IPTG (برای بیان بالای آنزیمها) از باکتریهای غربال شده یک تک کلون برداشته و در ۵ ml

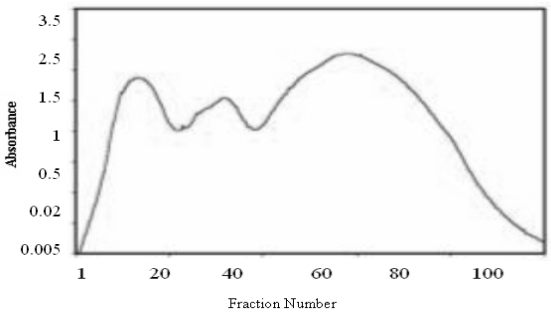
Archive of SID
www.SID.ir

محیط 2XYT کشت داده و بمدت ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با دور ۱۸۰ rpm قرار گرفت (در این شرایط $OD_{٦٦٠nm}$ حدوداً ۲ می‌باشد). سپس باکتریهای رشد یافته به نسبت یک به سی(۱:۳۰) به محیط کشت 2XYT (حاوی ۵۰ µg/ml آمپی‌سیلین) اضافه شد و تا $OD_{٦٦٠nm}$ برابر (۰/۸-۰/٦) در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و با دور ۲۵۰rpm در انکوباتور قرارگرفت، سپس از غلظتهای مختلف IPTG (۰/۲- ۰/٤- ۰/٦- ۰/۸ میکرو مولار) برای پیدا کردن غلظت مناسب IPTG برای بیان بالای آنزیمها استفاده شد. بعد از اضافه کردن IPTG، محیط کشت در همان شرایط بمدت ۳ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس محیط کشت حاوی باکتریها سانتریفیوژ و رسوب باکتری در بافر لیز حل و لیز سلولی انجام گرفت. محلول لیز شده را سانتریفیوژ کرده، محلول رویی را روی ژل الکتروفورز برده، میزان بیان آنزیمها در غلظتهای مختلف IPTG با هم مقایسه شد (شکل ۲). همانطور که مشاهده می شود غلظت ۰/٦ میکرومولار IPTG مناسب ترین غلظت برای افزایش بیان آنزیمها مورد نظر می باشد.



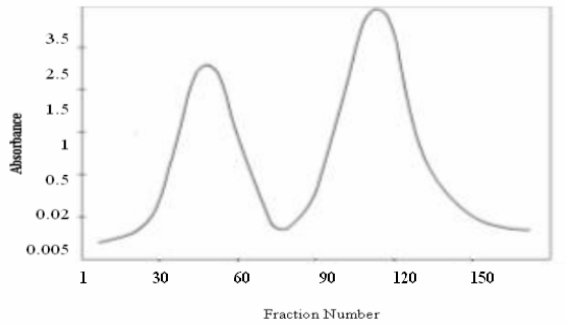
شکل ۲: ژل مربوط به بدست آوردن غلظت مناسب IPTG . ۱- کنترل (آنزیم لوسیفراز، تخلیص شده) ۲- بدون IPTG ۳ - غلظت ۰/۲ IPTG ٤- غلظت ۰/٤ IPTG ۵- غلظت ۰/٦ IPTG ٦- غلظت ۰/۸ IPTG

از باکتریهای غربال شده در محیط کشت 2XYT در حضور غلظت ۰/٦ mM IPTG برای بیان بالای آنزیمهای لوسیفراز طبیعی و جهش یافته استفاده شد. سپس محیط کشت حاوی باکتری را سانتریفیوژ کرده و رسوب باکتری لیز شد. محلول لیز شده را سانتریفیوژ نموده سپس محلول رویی از ستون DEAE –Sepharose عبور داده شد. کروماتوگرام مربوط به این ستون در (شکل ۳) نشان داده شده است.



شکل ۳: کروماتوگرام مربوط به ستون DEAE – Sepharose.

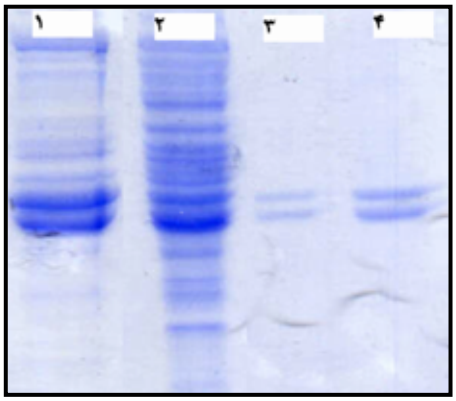
نمونه های عبور یافته را روی ژل الکتروفورز برده (شکل ۵ - نمونه ۱) نمونه های مورد نظر (نمونه های شماره ٤۵ - ۲۰) را جمع آوری و توسط سولفات آمونیم تغلیظ شد.



شکل ٤: کروماتوگرام مربوط به ستون Sephacryl–S –200.

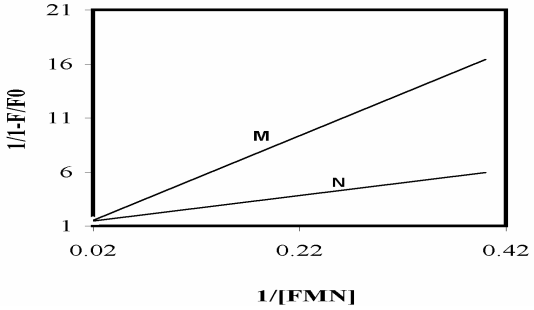
نمونه های تغلیظ شده از ستون ژل فیلتراسیون Sephacryl –S –200 (برای تخلیص و جداسازی آنزیم لوسیفراز از پروتیئنهائی با وزن مولکولی بزرگتر از ٤۰ کیلودالتون) عبور داده شد. کروماتوگرام مربوط به این ستون در (شکل ٤) نشان داده شده است. نمونه های عبور یافته را روی ژل الکتروفورز برده (شکل ۵ - نمونه ٤) نمونه‌های خالص (نمونه های حد فاصل لوله آزمایش ۱۲۵-۱۰۰) را جمع آوری و در حضور گلیسرول ۲۰ درصد در فریز ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۵: نمایش کلی مراحل تخلیص آنزیمهای لوسیفراز طبیعی و جهش یافته بر روی ژل SDS-PAGE . ۱- نمونه خارج شده از ستون DEAE –Sepharose (نمونه- ۳۵). ۲- نمونه قبل از بردن روی ستون کروماتوگرافی. ۳- کنترل (آنزیم لوسیفراز، تخلیص شده). ٤- نمونه‌های تخلیص شده از ستون Sephacryl-S-200.

مطالعات خاموش کنندگی دینامیک فلورسانس: فلورسانس ذاتی لوسیفراز در حضور FMN کاهش می یابد. هر چه اتصال بین آنزیم و FMN بیشتر باشد میزان خاموش شدگی (کاهش فلورسانس) بیشتر و ثابت تفکیک کمتر می شود. مشخص شد در لوسیفراز جهش یافته، میزان خاموش شدگی با FMN کمتر و میزان تفکیک بیشتر از لوسیفراز طبیعی (Xl) می‌باشد. این کاهش خاموش شدگی مربوط به اتصال ضعیف تر FMN به لوسیفراز جهش یافته است که می‌تواند با افزایش غلظت FMN افزایش یابد (شکل ٦).



شکل ٦: مقایسه خاموش شدن فلورسانس ذاتی لوسیفراز طبیعی (N) و جهش یافته (M) با FMN.

بحث

لوسیفراز باکتریایی یک آنزیم اکسیداز بوده که با اکسید کردن آلدئید، تولید اسید چرب و با اکسید کردن $FMNH_2$، تولید آب وFMN می نماید (۵).

مکانیسم نشر نور در باکتریهای لومینسانس به این صورت است که ابتدا یک مولکول $FMNH_2$ به آنزیم لوسیفراز متصل و (EF) را تشکیل می‌دهد که در ادامه با اکسیژن (O_2) واکنش و تولید پراکسی فلاوین (EFO) را می‌نماید (این حدواسط دارای پایداری کافی می‌باشد). درعدم حضور آلدئید این حدواسط در مسیر تاریکی (k_D) قرار گرفته و تولید FMN و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌نماید. درحضور آلدئید این حدواسط با آلدئید ترکیب و تولید حدواسط آنزیم - فلاوین – اکسیژن-آلدئید(EFOA) را نموده که حالت برانگیخته داشته و در مسیر روشنایی (k_L) تولید FMN، آب، اسیدچرب و نوری با طول موج ٤۹۰ nm می‌نماید. کمپلکس (EFOA) همچنین می‌تواند با جدا شدن آلدئید از طریق مسیر تاریکی پیش رود. شمای کلی مکانیسم نشر نور در باکتریهای لومینسانس در زیر نشان داده شده است (۵).

$$\begin{array}{ccccccc} & & O_2 & & A & & \\ E+F & \leftrightarrow & EF & \rightarrow & EFO & \leftrightarrow & EFOA \\ & & \downarrow k_D & & \downarrow k_L & & \\ & & \text{Dark Path} & & \text{Light Path} & & \end{array}$$

سرعت کاهش سریع لومینسانس به خاطر افینته پایین به آلدئید و همچنین تجزیه سریع کمپلکس EFO از طریق مسیر تاریکی می‌باشد (۱۵).

بررسیهای اخیر با موتاسیون بر روی ۲۰۰ نوکلئوتید در ناحیهٔ مرکزی زیرواحد آلفای (که در مکانیسم کاهش نشر نور در باکتریها دخالت دارد) لوسیفراز باکتری Xl مشخص شد، یکی از جهش یافته‌ها که در آن گلوتامات ۱۷۵ بوسیله گلیسین جایگزین شده بود، دارای خصوصیاتی با سرعت کاهش سریع لومینسانس در مقایسه با لوسیفراز طبیعی

Archive of SID
www.SID.ir

(سرعت کاهش کند لومینسانس) می باشد. تفاوت بین کاهش سریع لومینسانس در لوسیفراز جهش یافته و کاهش کند لومینسانس در لوسیفراز طبیعی احتمالا بعلت دخالت گلوتامات ۱۷۵ (Glu_{175}) در اتصال آلدئید و مکانیسم تحلیل حدواسطه‌های EFO و EFOA می‌باشد (۷).

با مطالعات ساختاری و مدل سازی مولکولی (Molecular modeling) مشخص شده است که گروه فسفات از $FMNH_2$ در یک شبکه با ۷ پیوند هیدروژنی به زیر واحد آلفا آنزیم: سه پیوند هیدروژنی با گروه گوانیدین آرژنین ۱۰۷ (Arg_{107})، دو پیوند هیدروژنی با گروه NH زنجیره اصلی از گلوتامات ۱۷۵ (Glu_{175}) و سرین ۱۷٦ (Ser_{176}) و دو باند هیدروژنی با گروه کربوکسیل سرین ۱۷٦ (Ser_{176}) و ترئونین ۱۷۹ (Thr_{179}) (۹)متصل می‌باشد.

اتصال فسفات (FMN و آنالوگهای آن) به لوسیفراز باعث القایی یک آرایش ساختاری موقت در زنجیره جانبی گلوتامات ۱۷۵ (Glu_{175}) می شود که در نتیجه خروج گروه کربوکسیل گلوتامات ۱۷۵(Glu_{175}) از جایگاه اتصال فسفات می شود و در معرض حلال قرار می گیرد (۳، ۸).

خاموش شدن (Quenching) فلورسانس ذاتی لوسیفراز حضور FMN نشان داده که خاموش شدگی بوسیله FMN برای لوسیفراز جهش یافته کمتر از لوسیفراز طبیعی (Xl) است. این کاهش خاموش شدگی مربوط به اتصال ضعیفتر FMN به لوسیفراز جهش یافته است و می‌تواند با افزایش غلظت FMN افزایش یابد (شکل ٦).

مشاهدات نشان می دهد که تبدیل گلوتامات به گلیسین باعث تغییر انعطاف پذیری زنجیره پلی‌پپتیدی شده (۱۳) که این مساله باعث ضعیف شدن میانکش فلاوین و زیرواحد آلفا شده، در نتیجه تضعیف اتصال فلاوین به زیر واحد آلفا باعث افزایش سرعت کاهش EFO از طریق مسیر تاریکی می‌شود.

منابع

1- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254.

2- Cline, T. W. and Hastings, J. W. (1974) Mutated luciferases with altered bioluminescence emission spectra. J. Biol. Chem., 249, 4668-4679.

3- Fisher, A.J. Raushel, F.M. Baldwin, T.O. and Rayment, I. (1995) Three dimensional structure of bacterial luciferase from vibrio harveyi at 2.4 ºA resolution. Biochemistry., 34, 6581-6586.

4- Fisher, A.J. Thopmpson, T.B. Thoden, J.B. Baldwin, T. O. and Rayment, I. (1996) The 1.5 °A resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions. J. Biol. Chem., 271, 21956-21968.

5- Gibson, Q.H. and Hastings, J.W. (1962) The oxidation of reduced flavin mononucleotide by molecular oxygen. Biochem. J., 83, 368-377.

6- Gunsalus-Miguel, A. Meighen, E.A. Nicoli, M. Z. Nealson, K. H. and Hastings, J. W. (1972) Purification and properties of bacterial luciferases. J. Biol. Chem., 247, 398-404.

7- Hosseinkhani, S. Szittner, R. and Meighen, E. (2005) Random mutagenesis of bacterial luciferase: Critical role of Glu175 in control of luminescence decay. Biochem. J., 385, 575-580.

8- Lin, L.Y. Sulea, T. Szittner, R. Vassilyev, V. Kor, C. Purisima, E.O. and Meighen, E.A. (2002) Implications of the reactive thiol and the proximal non-proline cis-peptide bond in the structure and function of vibrio harveyi luciferase. Biochemistry., 41, 9938-9945.

9- Lin, L.Y. Sulea, T. Szittner, R. Vassilyev, V. Purisima, E.O. and Meighen, A. (2001) Modeling of bacterial luciferase-flavin mononucleotide complex combining flexible docking with structure-activity data. Protein Sci., 10, 1563-1571.

10- Meighen, E. A. (1991). Molecular biology of bacterial bioluminescence. Microbiological, Reviews. 55(1), 123-142.

11- Meighen, E. A and Dunlap, P. V. (1993) Physiological, biochemical and genetic control of bacterial bioluminescence. Advances in microbial physiology., 34, 1-67. Review.

12- Meighen, E.A. and Hastings, J. W. (1971) Binding site determination from kinetic data.

Archive of SID
www.SID.ir

Reduced flavin mononucleotide binding to bacterial luciferase. J. Biol. Chem., 246, 7666-7674.

13- Riahi, A.M., Hosseinkhani, S., Khajeh, K., Ranjbar, B. and Asoudeh, A. (2005). Implication of a critical residue (Glu175) in structure and function of bacterial luciferase. FEBS_Letters., 579, 4701-4706.

14- Szittner, R. and Meighen, E. (1990) Nucleotide sequence, expression, and properties of luciferase coded by lux genes from a terrestrial bacterium. J. Biol. Chem., 265, 16581-16587.

15- Valkova, N. Szittner, R. and Meighen E.A. (1999) Control of luminescence decay and flavin binding by the LuxA carboxyl-terminal regions in chimeric bacterial luciferases. Biochemistry., 38,13820-13828.

Expression, Purification and Investigation of luminescence Decay in Bacterial Luciferase *Xenorhabdus luminescence* by Replacement of Glu175 by Gly on α Subunit

Riahi Madvar A., Hosseinkhani S., Khajeh Kh., Ranjbar B.

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

Abstarct

Expression, purification and comparison of fluorescence quenching in native and mutant bacterial luciferase at different concentration of FMN has been investigated. Bacterial luciferase consists of two-subunit α and β. that are encoded by the *LuxA* and *LuxB* genes, respectively. Kinetic properties of bacterial luciferase are determined by α subunit. Bacterial luciferases catalyzes the light emission reaction (Wavelength 490 nm) utilizing $FMNH_2$, fatty aldehyde and O_2 substrates. Bacterial luciferases (Lux AB) can be readily classed as slow or fast decay luciferases based on their rates of luminescence decay in a single turnover assay. Recent studies using random mutagenesis on α subunit in the "slow decay" bacterial luciferase *Xenorhabdus luminescence*, showed one of the mutants contains Glu175 replacement by Gly has a significantly more rapid decay rate luminescence than native luciferase. Expression, purification and kinetic studies of native and mutant luciferase indicated that difference between native and mutant luciferase in luminescence decay rate may occur of weaker binding of FMN to enzyme in mutant luciferase.

Key word: Bioluminescence, Luciferase, FMN, Quenching.

Archive of SID

www.SID.ir