انتقال ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب گونه ایرانی *Lampyris turkestanicus* با نشر نور قرمز به گیاه بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia ionantha*)

آرش رزمی[۱]، مختار جلالی جواران[۱،*] و سامان حسینخانی[۲]

[۱] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی

[۲] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۲۲

چکیده

آنزیم لوسیفراز حشره شب‌تاب (*luc*) یکی از مهم‌ترین آنزیمهای صنعتی است که به طور وسیع در زمینه‌های مختلف پزشکی، بیوتکنولوژی و بیولوژی سلولی و مولکولی کاربرد دارد. این آنزیم، به دلیل داشتن خصوصیاتی هم چون حساسیت بالا، تکرارپذیر بودن و قابلیت اندازه‌گیری کمی آن، کاندیدای بسیار مناسبی در زمینه تصویربرداریهای بیولومینسانس در شرایط طبیعی و در سیستمهای گزارشگر می‌باشد. تحقیق حاضر جهت ساب‌کلونینگ و انتقال ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب گونه ایرانی *L. turkestanicus* با نشر نور قرمز در گیاه بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia ionantha*) انجام گرفت. بدین منظور ژن لوسیفراز (*luc*) با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با آغازگرهای اختصاصی از ناقل pET 28a جداسازی و در ناقل بیانی pCAMBIA1304 اتصال گردید. ناقل نوترکیب جدید (pCAMLUC) با استفاده از بررسیهای Colony PCR، PCR، هضم آنزیمی، توالی‌یابی و هم ردیف‌سازی آن در بانک اطلاعاتی (GenBank)، مورد تأیید قرار گرفت. ژن هدف به کمک آگروباکتریوم سویه *LBA4404* به گیاه بنفشه آفریقایی منتقل گردید و گیاهان تراریخت بر روی محیطهای کشت انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیکهای هیگرومایسین و سفوتاکسیم باززا شدند. آنالیزهای PCR و RT-PCR حضور ژن در ژنوم گیاه و نسخه‌برداری از آن را تأیید کرد. همچنین نتایج حاصل از سنجش لومینومتری، فعالیت آنزیم لوسیفراز را در بافتهای برگی بعضی از گیاهان نشان داد. در این سنجش حداکثر نور نشر شده RLU/sec ۲۰۰۰۰ بود در حالی که در گیاهان شاهد نشر نوری سنجیده نشد.

واژهای کلیدی: لوسیفراز حشره شب‌تاب، ساب‌کلونینگ، انتقال ژن، بنفشه آفریقایی

*نویسنده مسئول، تلفن: ۴۸۲۹۲۱۰۴-۰۲۱، پست الکترونیکی: m_jalali@modares.ac.ir

مقدمه

پدیده بیولومینسانس یا واکنش شیمیایی نشر نور توسط موجودات زنده، یکی از جالب‌ترین پدیده‌های زیستی است که در طیف وسیعی از موجودات زنده از قبیل باکتریها، حشرات، بسیاری از نرم‌تنان و جانوران آبی دیده شده است. آنزیمهای درگیر در این فرآیند با نام کلی لوسیفراز نامگذاری شده‌اند. به دلیل کاربرد فراوان لوسیفراز حشره شب‌تاب (Firefly luciferase)، بیشتر مطالعات بر روی این آنزیم صورت گرفته است. این آنزیم در *Photinus pyralis* در طی واکنش با لوسیفرین، ATP و اکسیژن، نوری با طول موج ۵۶۲nm را نشر می‌کند که در محدوده نور مرئی (سبز- زرد) است (۴). لوسیفراز حشره شب‌تاب از مهم‌ترین آنزیمهایی است که در زمینه‌های مختلف به ویژه در سنجش مقدار ATP از طریق لومینومتری در تشخیص آلودگیهای میکروبی، اندازه‌گیری میزان حیات سلولی، تهیه کیتهای تشخیص سرطان و زیست‌حسگرها، غربالگری داروها، بررسی روابط

Archive of SID
www.SID.ir

برهمکنش و تاخوردگی پروتئینها، توالی‌یابی DNA به روش Pyrosequencing، تصویربرداریهای بیولومینسانس و در سیستمهای گزارشگر کاربرد فراوان دارد (۵، ۸، ۹، ۲۸،۱۸ و ۲۹).

ژن لوسیفراز (*luc*) گونه آمریکای شمالی (*Photinus pyralis*) در سال ۱۹۸۵ کلون (۱۱) و در سال ۱۹۸۶ به عنوان ژن گزارشگر به گیاه توتون منتقل شد (۲۶). با اسپری کردن لوسیفرین به بافتهای گیاهی در شرایط طبیعی و مجاورت آن به فیلم عکاسی، در اثر واکنش آنزیم-سوبسترا، می‌توان فعالیت لوسیفراز را ردیابی نمود و امروزه امکان ردیابی خفیف‌ترین نورها از طریق لومینومتری و دوربینهای CCD وجود دارد.

در شمال ایران دو گونه حشره شب‌تاب به نامهای *Lampyris turkestanicus* و گونه نادر *Lampyroidea maculata* شناسایی شده است. همسانه‌سازی و تعیین توالی ژن لوسیفراز *Lampyris turkestanicus* در سال ۲۰۰۴ انجام شده است (۶). این توالی دارای طولی معادل ۱۶۴۴ جفت باز است که ۵۴۷ اسید آمینه را کد می‌کند (شماره دستیابی GenBank، AY742225). نشر نور آن تنها با یک پیک، با طول موج ۵۵۵ nm، در محدوده سبز قرار گرفته است. این ژن در سال ۱۳۸۸ به منظور تولید آنزیم لوسیفراز در قالب کشاورزی مولکولی به گیاه توتون انتقال و آنالیز گیاهان تراریخت در سطح DNA با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفته است (۲).

به طور کلی عواملی مانند؛ پایداری پایین آنزیم در دمای فیزیولوژیک بدن، نامناسب بودن طول موج ساطع شده از آنزیم (به دلیل جذب امواج کوتاه توسط بافتها و کروموفورها برای استفاده در محیط طبیعی و حسگرهای بیولوژیک)، حساسیت به pH و غیر فعال شدن برگشت ناپذیر آنزیم موقع ذوب (دفریز) شدن، می‌توانند کاربرد لوسیفراز را محدود نمایند (۳۴). بنابراین تلاشهای زیادی با استفاده از جهش‌زایی تصادفی و هدفمند در جهت ایجاد لوسیفرازهایی که محدودیتهای فوق را نداشته باشند صورت گرفته است؛ از جمله جایگزینی اسیدهای آمینه S284T, H245N وH431Y که باعث تغییر پیک به ۶۱۵nm، در محدوده نور قرمز شده است (۳۳). نور قرمز انرژی کمتری نسبت به نور سبز دارد و جذب آن توسط بافتها کمتر است. به همین دلیل این ژن پتانسیل خوبی برای استفاده در علوم مختلف را دارد.

بنفشه آفریقایی (African violet) گیاهی چند ساله با نام علمی *Saintpaulia ionantha* از خانواده Gesneriaceae است. خصوصیاتی همچون داشتن رنگ و شکل متنوع، قابلیت رشد در شرایط اتاق، توانایی گل‌دهی تحت نور مصنوعی و تکثیر رویشی آسان در تمام فصول سال باعث محبوبیت این گل از میان گلهای زینتی شده است (۱۷). با بهره‌گیری از روشهای متداول اصلاح نباتات، هر ساله چندین واریته جدید از این گیاه آزاد می‌شود (۱۵) و دست‌آوردهای نوین مهندسی ژنتیک به عنوان یک ابزار قدرتمند و تکمیل کننده روشهای سنتی اصلاح نباتات، در افزایش صفات مطلوب در گیاهان بسیار مؤثر است. در این گیاه می‌توان از قسمتهای مختلف برگی و دمبرگی بر روی محیطهای حاوی هورمونهای اکسین و سیتوکنین ساقه‌های نابه جا ایجاد کرد (۷ و ۳۱) و از این توانایی می‌توان جهت تراریختی با آگروباکتریوم استفاده نمود. بررسیهای صورت گرفته نشان می‌دهد که امکان انتقال ژن توسط آگروباکتریوم از طریق ریزنمونه‌های دمبرگ (۲۰) و سوسپانسیون سلولی (۲۲) به گیاه بنفشه آفریقایی امکان پذیر است.

هدف از انجام این تحقیق، تهیه یک سازه حاوی ژن جهش‌یافته لوسیفراز حشره شب‌تاب (با نشر نور قرمز) و انتقال آن به گل زینتی بنفشه آفریقایی است. گیاهان تراریخت در حضور لوسیفرین نور مرئی از خود ساطع خواهند کرد که با استفاده از روشهای گوناگون قابل ردیابی است. همچنین در صورت نسخه‌برداری مناسب از ژن و

Archive of SID

www.SID.ir

تغییرات صحیح بعد از ترجمه امکان مشاهده چشمی نور ساطع شده در تاریکی وجود دارد. با توجه به محبوبیت گیاه بنفشه آفریقایی در میان گلهای زینتی، در صورت موفقیت و دست‌یابی به اهداف فوق، گیاه زینتی مورد نظر از لحاظ تجاری بسیار با ارزش خواهد بود. همچنین در مطالعات پایه مرتبط با تأثیر عوامل مختلف بر رشد و نمو و سایر خصوصیات این گیاه امکان استفاده از این سازه ژنی گزارشگر فراهم خواهد بود.

مواد و روشها

در این پژوهش ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب پس از تکثیر از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با آغازگرهای اختصاصی، در ناقل pCAMBIA1304، مابین پیشبرنده CaMV35S و خاتمه‌دهنده NOS با استفاده از آنزیمهای برشی *Nco*I و *Bst*EII همسانه‌سازی گردید و به باکتری *Escherichia coli* انتقال یافت. سازه ژنی تهیه شده با استفاده از آزمونهای Colony PCR، PCR، واکنش هضم آنزیمی و در نهایت توالی‌یابی و هم ردیف‌سازی آن در بانکهای اطلاعاتی مورد تأیید قرار گرفت. سپس سازه ژنی حاصل به آگروباکتریوم *Agrobacterium tumefaciens* منتقل شده و در نهایت از آگروباکتریوم به منظور تلقیح گیاهان بنفشه آفریقایی استفاده شد. گیاهان بنفشه آفریقایی حاوی ژن لوسیفراز با استفاده از محیطهای کشت انتخابی، باززایی شده و بر روی گیاهان تراریخت، آزمون PCR، RT-PCR و سنجش لومینومتری انجام گرفت.

باکتری‌ها: در این تحقیق از دو باکتری *E. coli* سویه *DH5α* و *A. tumefaciens* سویه *LBA4404* استفاده شد. از باکتری *E. coli* به عنوان میزبان برای نگهداری و تکثیر سازه تهیه شده و از باکتری *A. tumefaciens* جهت انتقال ژن هدف به گیاه بنفشه آفریقایی استفاده شد.

آغازگرها: آغازگرهای مناسب ژن لوسیفراز با توجه به توالی جایگاههای برشی آنزیمهای *Nco*I و *Bst*EII در ناقل pCAMBIA1304 و توالیهای کناری ژن لوسیفراز طراحی گردیدند. توالی این آغازگرها عبارتند از:

آغازگر پیشرو:

Lux1F: 5′- CC^C **ATG** GAA GAT GCA AAA AAT ATT ATG -3′

آغازگر معکوس:

Lux1R: 5'- GG^G TCA CC**T CAT TA**C AAT TTG GAT TTT TTT CC -3'

ناقل‌ها: در مطالعه حاضر از دو ناقل استفاده شد. ناقل pET 28a حاوی cDNA ژن لوسیفراز که از حسینخانی و همکاران از دانشگاه تربیت مدرس دریافت گردید و ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 (اهدایی معماری و همکاران) که دارای ژن مقاومت به کانامایسین برای گزینش باکتریایی، ژن مقاومت به هیگرومایسین-B جهت انتخاب در گیاه، محلهای برشی *Nco*I و *Bst*EII، پیشبرنده CaMV35S و توالی خاتمه‌دهنده NOS است.

مواد گیاهی: در این تحقیق از قطعات برگی و دمبرگ گیاه بنفشه آفریقایی (*Sainpaulia ionantha* Wendl) حاصل از کشت بافت (۳۱) استفاده گردید. برگها به قطعات mm ۵×۵ و دمبرگها mm ۱۰-۳ تقسیم شدند و به‌عنوان ریزنمونه جهت تلقیح مورد استفاده قرار گرفتند.

تکثیر ژن لوسیفراز با PCR و ساب‌کلونینگ آن در ناقل pCAMBIA1304: تکثیر قطعه DNA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی‌شده انجام شد. مواد واکنش‌دهنده در PCR (در حجم µl ۲۵) عبارت بودند از: µM ۲۰۰ از هر کدام از dNTPها، mM ۲ $MgCl_2$، pmol ۱۰ از هر کدام از آغازگرها، ng ۱۰۰ DNA (ناقل pET 28a) به عنوان الگو و یک واحد از آنزیم *Taq* DNA Polymerase. شرایط PCR برای تکثیر ژن لوسیفراز شامل دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۷ درجه سانتی گراد برای ۴۵ ثانیه و دمای طویل‌شدن ۷۲ درجه

Archive of SID
www.SID.ir

سانتی گراد به مدت ۱۰۰ ثانیه، به تعداد ۲۷ دور بود. جهت تخلیص محصول PCR از کیت تخلیص QIAGEN استفاده گردید. سپس محصول PCR تخلیص‌شده و همچنین ناقل pCAMBIA1304 با آنزیمهای *Nco*I و *Bst*EII هضم گردیده و مجدداً خالص‌سازی شدند. در نهایت ژن لوسیفراز در ناقل بیانی گیاهی pCAMBIA1304 همسانه‌سازی شد و سازه به دست آمده pCAMLUC نامگذاری گردید.

تراریختی *E. coli* و *A. tumefaciens* با سازه تهیه شده: برای تراریختی باکتری *E. coli* از روش شوک حرارتی استفاده شد (۳۰). محلول باکتری تراریخت شده بر روی محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) کشت گردید. همچنین برای تراریختی تک کلونی آگروباکتریوم که در ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) رشد کرده بود از روش استاندارد انجماد و ذوب با استفاده از کلریدکلسیم استفاده شد (۳۰). محلول حاصل بر روی محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیکهای استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) کشت شد.

تعیین آستانه تحمل ریزنمونه‌های بنفشه آفریقایی به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسن: از آنجا که کارآیی تولید گیاهان تراریخته وابسته به انتخاب دقیق سلولها و بافتهای تراریخته است، لازم است که آستانه تأثیر آنتی بیوتیکها مشخص شود. جهت تعیین غلظت مناسب آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین از ۴ غلظت مختلف آنتی بیوتیک (۰،۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار و ۴ نمونه داخل هر تکرار (پتری دیش) استفاده شد.

تراریخت نمودن گیاهان بنفشه آفریقایی با استفاده از آگروباکتریوم: سویه آگروباکتریوم حاوی ناقل نوترکیب در ۱۰ میلی‌لیتر محلول LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیکهای استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ساعت با ۲۰۰ rpm رشد داده شدند. بعد سوسپانسیون آگروباکتریوم (OD_{600nm} =0.8) با محیط تلقیح با تراکم ۱:۱۰ رقیق گردیده و اسیتوسرینگان با غلظت ۱۰۰ میکرو مولار به آن اضافه گردید (۲۰). قطعات برگ و دمبرگ (۱۵۰ ریزنمونه از هر یک) با سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰ دقیقه با تکان آرام تلقیح گردید و بر روی کاغذ خشک گردیدند. قطعات برگی بر روی محیط هم‌کشتی (Co-cultivation) (شامل محیط پایه MS (۲۳) حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و۳ میلی‌گرم در لیتر BAP) و قطعات دمبرگی بر روی محیط هم‌کشتی (شامل محیط پایه MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر BAP) منتقل شده و در دمای ۱ ± ۲۴ درجه سانتی گراد در تاریکی به‌مدت دو روز قرار داده شدند. بعد از هم‌کشتی، ریز نمونه‌ها بر روی محیطهای کشت ذکر شده حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم برای کشتن آگروباکتریوم و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین-B با یک دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی برای ساقه‌زایی منتقل گردیدند و هر دو هفته یکبار واکشت گردیدند. کشتهای شاهد بدون تلقیح با آگروباکتریوم و تلقیح با آگروباکتریوم بدون سازه pCAMLUC در روی محیط کشتهای یاد شده حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم به همراه هیگرومایسین نیز همزمان کشت گردیدند. بعد از ساقه‌زایی، گیاهچه‌ها به محیط II (MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۰/۰۸ میلی‌گرم بر لیتر BAP) با شرایط یاد شده برای رشد بیشتر قرار داده شدند. ریشه‌زایی نمونه‌ها در روی محیط کشت B5 (۱۳) بدون هورمون و با ۳ گرم بر لیتر زغال فعال صورت گرفت. در نهایت گیاهان پس از ریشه‌دار شدن به گلدانهای حاوی ورمیکولایت منتقل شدند.

استخراج DNA و آنالیز PCR: برگهای جوان گیاهان باززایی‌شده بر روی محیط کشت انتخابی برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند و استخراج DNA به روش

Archive of SID

www.SID.ir

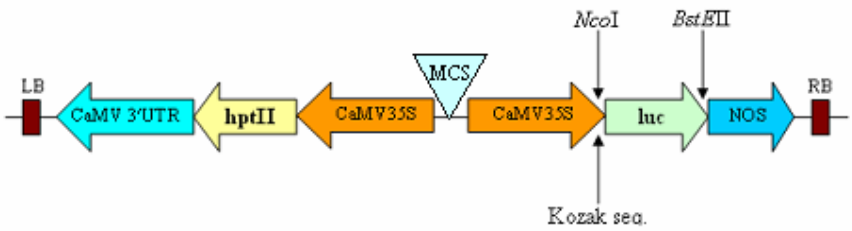
CTAB انجام شد (۲۴). آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد (شرایط ذکر شده با ۳۵ چرخه) و گیاهان حاوی ژن لوسیفراز شناسایی و انتخاب شدند.

استخراج RNA و آنالیز RT-PCR: از برگ گیاهان تراریخت RNA کل استخراج (۹) و برای ساخت cDNA استفاده شد. برای این منظور مقدار ۲µl از RNAی کل استخراج شده به همراه ۲۰ pmol از آغازگر معکوس (Lux1R) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. بلافاصله تیوبها بر روی یخ انتقال داده شدند و به هر کدام مخلوطی شامل ۴ µl بافر ۵ x RT (250 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 250 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$, 50 mM DTT)، ۲۰۰ µM از هرکدام از dNTPها، ۲۰۰ واحد از آنزیم M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Lithuania) و ۲۰ واحد RNAsin اضافه شد. تیوبها ابتدا به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سپس به‌مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در نهایت برای غیرفعال کردن آنزیم ترانس کریپتاز معکوس یک مرحله ۷۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه به چرخه‌های دمایی فوق اضافه شد. برای ساخت رشته دوم و تکثیر cDNA از واکنش PCR استفاده گردید. به این منظور ۲/۵ میکرولیتر از محصول واکنش RT با ۱۰ میکرولیتر مخلوط PCR شامل ۲۰۰ µM از هر کدام ازdNTP ها، ۲ mM $MgCl_2$، ۱۰ pmol از هر کدام از آغازگرها و ۱ واحد از آنزیم *Taq* DNA polymerase مخلوط و در دستگاه ترموسایکلر (شرایط ذکر شده با ۳۵ چرخه) قرار داده شد.

آنالیز گیاهان با دستگاه لومینومتر: اندازه‌گیری کمی فعالیت لوسیفراز با استفاده از دستگاه لومینومتری (Orion microplate luminometer, Berthold Detection System) انجام گرفت (۱۸). به این صورت که قطعات کوچک برگی در اپندورف قرار گرفت و روی آنها ۰/۵ ml بافر استخراج سرد (0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7, 1 mM Dithiothreitol اضافه و بافت برگی کاملاً در آن له گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ، و مایع رو شناور سریعاً برای سنجش مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه تیوب لومینومتر ۳۶۰ µl از بافر سنجش (14 mM gly-gly buffer (pH 7.8, 14 mM MgCl2, 1 mg. ml^{-1} BSA) و ۴۰ µl از محلول ۶۰ mM ATP استفاده شد. جهت سنجش فعالیت لوسیفراز ۴۰ µl از عصاره برگی به همراه ۱۰۰ µl از لوسیفرین ۱ mM استفاده گردید.

نتایج

تکثیر ژن لوسیفراز از طریق PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی: ژن لوسیفراز از ناقل pET28a با استفاده از آغازگرهای اختصاصی که بر اساس توالیهای انتهای ´۳ و ´۵ ژن لوسیفراز و محلهای برشی *Nco*I (در آغازگر پیشرو) و *Bst*EII (در آغازگر معکوس) طراحی شده بود، از طریق PCR تکثیر گردید.

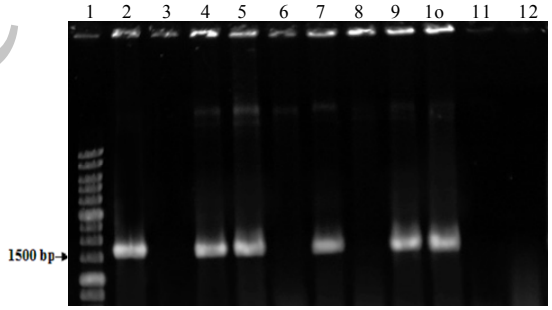


شکل ۱– طرح شماتیک سازه pCAMLUC. این سازه دارای ژن مقاومت به هیگرومایسن (*hptII*)، محلهای برشی *Nco*I و *Bst*EII، پیشبرنده CaMV35S ، توالی خاتمه‌دهنده نسخه‌برداری (NOS)، توالی افزایش‌دهنده بیانی (Kozak sequence)، توالیهای مرزی چپ (LB) و راست (RB) و ژن *luc* می‌باشد.

Archive of SID

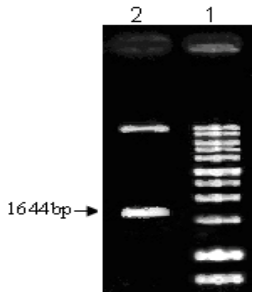
www.SID.ir

ساب‌کلونینگ ژن لوسیفراز در ناقل بیانی گیاهی (pCAMBIA1304): محصول PCR ژن لوسیفراز و همچنین ناقل pCAMBIA1304 با آنزیمهای *Nco*I و *Bst*EII برش، و واکنش اتصال بین آنها صورت پذیرفت و در نهایت ژن لوسیفراز در ناقل گیاهی pCAMBIA1304 ساب‌کلون شد. سازه ایجاد شده (pCAMLUC) (شکل ۱) به روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* نژاد *DH5α* منتقل گردید. جهت تأیید همسانه‌سازی از واکنشهای PCR (شکل ۲)، هضم آنزیمی با آنزیمهای *Nco*I و *Bst*EII (شکل۳) و تعیین توالی استفاده شد. انتقال سازه pCAMLUC به آگروباکتریوم با استفاده از روش ذوب و انجماد انجام گرفت. آگروباکتریوم حاوی ژن لوسیفراز روی محیط کشت LB دارای آنتی‌بیوتیکهای استرپتومایسین و کانامایسین رشد داده شد. آنالیز Colony PCR با آغازگرهای اختصاصی، حضور قطعه ۱۶۵۰ جفت بازی را در آگروباکتریوم تأیید کرد (شکل ۴).

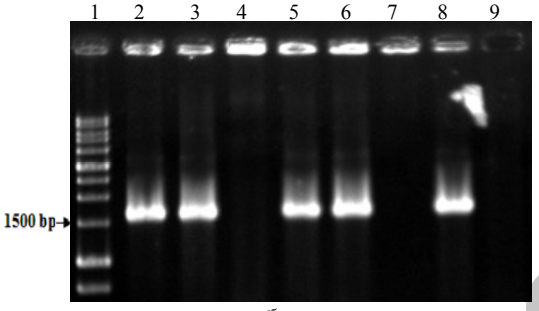


شکل ۲- انتخاب کلنی‌های مثبت و تأیید ساب‌کلونینگ با استفاده از تکنیک Colony PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *luc*. چاهک ۱: نشانگر مولکولی تعیین اندازه 1Kb، چاهک۲: کنترل مثبت (ناقل pET 28a حاوی ژن *luc*)، چاهک۳: کنترل منفی(بدون DNA). چاهک ۴ تا ۱۱ نتایج حاصل ازColony PCR ، چاهک ۱۲: ناقل غیرنوترکیب pCAMBIA1304 (فاقد ژن *luc*)

تعیین آستانه تحمل سلول‌های تراریخت به آنتی‌بیوتیک: بر اساس نتایج آزمایش تعیین غلظت آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین میزان ۲۰ میلی‌گرم در لیتر به طور کامل از باززایی ریزنمونه‌های بنفشه آفریقایی جلوگیری کرد در حالی که در سطح صفر میلی‌گرم در لیتر ۱۰۰ درصد باززایی و در سطح ۱۰ میلی‌گرم در لیتر به طور کاملاً مؤثری از باززایی نوساقه‌ها جلوگیری نشد.



شکل ۳ - هضم آنزیمی ناقل نوترکیب با دو آنزیم *Nco*I و *Bst*EII. چاهک۱: نشانگر مولکولی تعیین اندازه 1Kb. چاهک ۲: ناقل نوترکیب هضم شده.

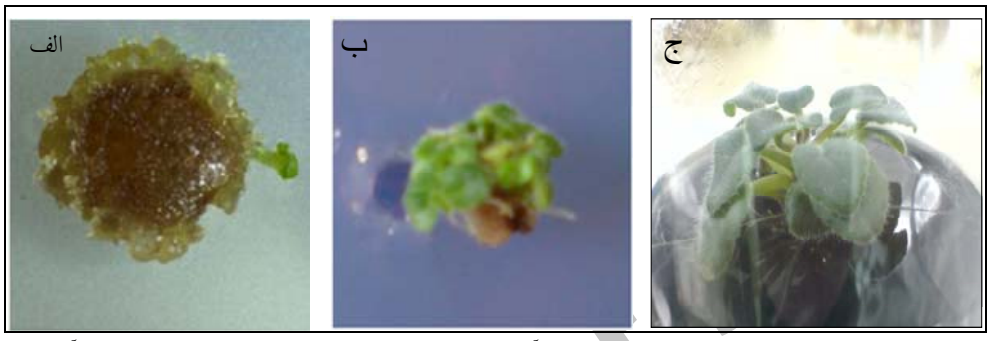


شکل۴- تایید حضور ژن *luc* در آگروباکتریوم با استفاده از تکنیک Colony PCRو آغازگرهای اختصاصی. چاهک۱: نشانگر مولکولی تعیین اندازه 1Kb، چاهک‌های ۲ تا ۶: نتایج حاصل از Colony PCR بر روی آگروباکتریوم، چاهک۷: آگروباکتریوم بدون ناقل pCAMBIA1304 (و بدون *luc*)، چاهک ۸: کنترل مثبت (باکتری *E. coli* حاوی سازه pCAMLUC)، چاهک ۹: کنترل منفی (آب مقطر بدون DNA)،

انتقال ژن لوسیفراز به گیاه بنفشه آفریقایی: عمل تراریخت نمودن گیاهان بنفشه آفریقایی با استفاده از تلقیح با آگروباکتریوم نژاد *LBA4404* صورت گرفت. قطعات برگی و دمبرگ که با آگروباکتریوم (حاوی سازه pCAMLUC) تلقیح شدند، بر روی محیط‌کشت انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیکهای هیگرومایسین (۲۰ میلی‌گرم در لیتر) و سفوتاکسیم (۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر) قرار داده شدند. پس از چند هفته در انتهای بعضی از ریزنمونه‌های دمبرگی تلقیح‌شده، کالوسهای کوچک سفید رنگ به همراه جوانه‌های سبز رنگ شروع به باززایی نمودند (شکل ۵

Archive of SID
www.SID.ir

الف). تعداد نمونه‌های باززا شده بر روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک هیگرومایسن ۱۰ تا از ۱۵۰ریزنمونه دمبرگ بود در حالی که بر روی ریزنمونه‌های برگی و شاهد (بدون تلقیح با آگروباکتریوم و تلقیح با آگروباکتریوم بدون سازه pCAMLUC) هیچ‌گونه باززایی مشاهده نشد. در واکشتهای بعدی با انتقال جوانه‌های باززا شده بر روی محیط II، کالوسهای کوچک سفید، تیره شده و از بین رفتند ولی جوانه‌های سبز رنگ شروع به رشد کردند (شکل ۵ ب). ریشه‌زایی نمونه‌ها در روی محیط کشت B5 بدون هورمون و با ۳ گرم بر لیتر زغال فعال صورت گرفت (شکل ۵ ج).



شکل ۵- باززایی گیاهان تراریخت بر روی محیط حاوی هورمون و آنتی‌بیوتیک. الف) باززایی ریزنمونه‌های دمبرگ تلقیح شده با آگروباکتریوم، ب) رشد ریزنمونه‌های باززا شده بر روی محیط II، ج) ریشه‌زایی گیاهان بر روی محیط بدون هورمون و با ۳ گرم بر لیتر زغال فعال

بررسی گیاهان تراریخت: گیاهان باززایی شده (یا تراریخت احتمالی) از محیطهای کشت انتخابی حاوی هیگرومایسین، در روی محیط کشت II بعد از اینکه به حد کافی رشد کردند از طریق PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. استخراج DNA ژنومی از برگهای جوان گیاهان باززایی شده انجام شد. آنالیز PCR بر روی DNA ژنومی این گیاهان با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، وجود قطعه ۱۶۵۰ جفت بازی را نشان داد؛ در حالی که در گیاهان شاهد هیچ‌گونه باندی مشاهده نشد (شکل ۶). آنالیز RT-PCR از روی RNA استخراج شده از گیاهان تراریخت با استفاده از آغازگر معکوس، در بعضی از گیاهان وجود قطعه ۱۶۵۰ جفت بازی را نشان داد (شکل۷). چون ژن مورد نظر فاقد اینترون است، آلودگی با DNA ژنومی در این مرحله می‌تواند باعث جواب مثبت کاذب شود، لذا با استفاده از واکنش کنترل منفی، یعنی واکنش RT-PCR در غیاب آنزیم Reverse Transcriptase مشخص شد که RNA استخراجی فاقد آلودگی با DNA است همچنین برای واکنش کنترل مثبت از آغازگرهای اختصاصی 18S RNA استفاده گردید و با مشاهده قطعه bp ۷۰۰ مورد نظر، کیفیت RNA و واکنش RT- PCR مورد تأیید قرار گرفت. در نهایت از گیاهان که در هر دو آزمون فوق مثبت بودند نمونه برگی تهیه شد و فعالیت آنزیم با اندازه‌گیری شدت نور نشر شده به وسیله دستگاه لومینومتر سنجیده شد. در این سنجش حداکثر نور نشر شده به عنوان سرعت اولیه اندازه گیری و برحسب واحد نسبی نور (RLU) بیان می‌شود. نتایج حاصل از سنجش لومینومتری، ترجمه صحیح ژن لوسیفراز را در بافتهای برگی بعضی از گیاهان نشان می‌داد. در این سنجش حداکثر نور نشر شده RLU/sec ۲۰۰۰۰ بود در حالی که در گیاهان شاهد نشر نوری سنجیده نشد.

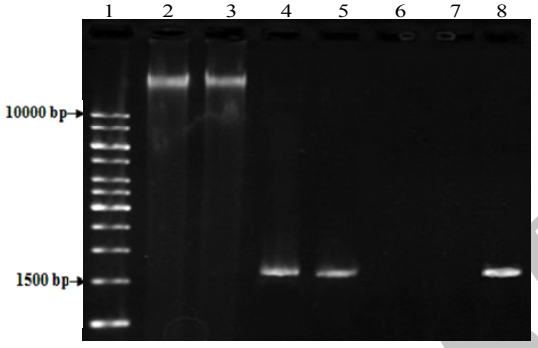
بحث

به فرآیند تولید نور در سیستمهای زیستی اصطلاحاً بیولومینسانس گفته می‌شود. آنزیمهای درگیر در این فرآیند را با نام کلی لوسیفراز نامگذاری کرده‌اند. با توجه به حساسیت بالای پروتئین لوسیفراز، کاربرد این آنزیم در

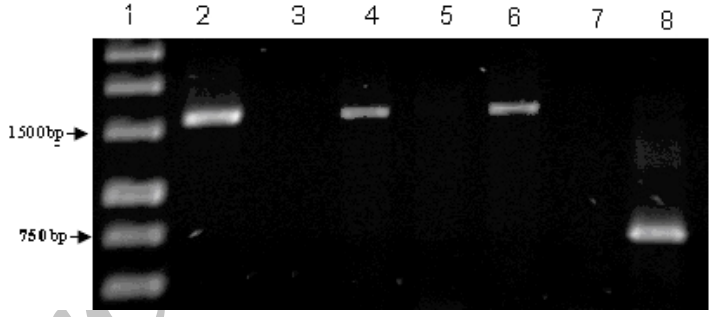
Archive of SID

www.SID.ir

تکنولوژیهای بر پایه اندازه‌گیری نور (Ligh-measuring) در حال افزایش است. از میان لوسیفرازها، لوسیفراز حشره شب‌تاب یکی از مهم‌ترین آنزیمهایی است که در زمینه‌های مختلف علوم پایه، پزشکی و صنعت، کاربردهای فراوان دارد (۲). با توجه به گرایش گسترده به جایگزینی روشهای قدیمی غربالگری با تکنولوژیهای بر پایه بیولومینسانس، استفاده از گیاهان به عنوان یک منبع ارزان برای تولید انبوه و کم‌هزینه آنزیم فعال در قالب کشاورزی مولکولی بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۱ و ۳).



شکل ۶- بررسی DNA ژنومی استخراج شده از گیاهچه‌های باززایی‌شده و شاهد با استفاده از تکنیک PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن لوسیفراز. چاهک ۱: نشانگر مولکولی تعیین اندازه 1Kb، چاهک ۲ و ۳ DNAی ژنومی استخراج شده از گیاهان، چاهک ۴ و ۵: نتایج حاصل از PCR، چاهک ۶: گیاه شاهد (غیرتراریخت)، چاهک۷: کنترل منفی (آب مقطر بدون DNA) ۸: کنترل مثبت (سازه pCAMLUC تخلیص شده).



شکل ۷- بررسی RNA استخراج شده از گیاهچه‌های تراریخت و شاهد با استفاده از تکنیک RT-PCR و آغازگر معکوس ژن لوسیفراز. چاهک ۱: نشانگر مولکولی تعیین اندازه 1Kb،چاهک ۲: کنترل مثبت PCR (سازه pCAMLUC تخلیص شده)، چاهک ۳: کنترل منفی PCR (آب مقطر بدون DNA)، چاهک ۴ تا ۶: نتایج حاصل از RT-PCR بر روی گیاهان تراریخت، چاهک ۷: کنترل منفی از گیاهان تراریخت بدون آنزیم RT، چاهک ۸: کنترل مثبت با آغازگر 18 S

تحقیق حاضر اولین گزارش انتقال ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب گونه ایرانی با نشر نور قرمز به گیاه می‌باشد که در آن از ناقل بیانی دوتایی pCAMBIA1304 جهت ساب‌کلونینگ و انتقال ژن *luc* به گیاه استفاده شده است. از مزایای این ناقل می‌توان به اندازه کوچک آن، تعدد نسخه‌ها و پایداری در آگروباکتریوم اشاره نمود. بعد از حذف ژنهای بتا-گلوکورونیداز (*GUS*) و *GFP* از ناقل pCAMBIA1304، ژن *luc* به‌جای آنها و مابین پیشبرنده CaMV35S و خاتمه‌دهنده NOS جایگزین گردید. در گیاهان دو لپه‌ای پیشبرنده CaMV35S یک انتخاب مناسب و عمومی می‌باشد، زیرا باعث بیان قوی و دائمی ژن مورد نظر، در بافتهای مختلف گیاه هدف و در مراحل متفاوت رشد گیاه می‌شود (۳۲). عامل مهم دیگر در بیان بالای ژن، سیگنال قوی پلی‌آدنیلاسیون می‌باشد که جهت پایداری نسخه‌های ساخته شده با پیشبرنده CaMV35S، خاتمه دهنده ژن NOS، مناسب و عمومی می‌باشد (۱۲ و ۳۲).

www.SID.ir

همچنین این تحقیق اولین گزارش انتقال ژن، به گیاه بنفشه آفریقایی در ایران می‌باشد که در آن از ریزنمونه‌های برگی و دمبرگ در تلقیح با آگروباکتریوم استفاده شد. از میان روشهای مختلف انتقال ژن به گیاهان، انتقال ژن به‌واسطه آگروباکتریوم به دلیل برتری الگوی الحاق ژن، سادگی و کم هزینه بودن آن مورد استفاده قرار گرفت (۱۴). استفاده از آگروباکتریوم اگرچه وابسته به دامنه میزبانی‌است، اما پیشرفتهای اخیر در ساخت و توسعه ناقل‌ها و کاربرد استوسرینگون، که بیماری‌زایی را القاء می‌کند، باعث افزایش دامنه میزبانی حتی در بعضی از تک‌لپه‌ایها شده است (۱۶و۱۹). از میان سویه‌های مختلف آگروباکتریوم، سویه *LBA4404* از کارآیی خوبی برای تراریختی گیاه بنفشه آفریقایی برخوردار است (۲۰).

در این تحقیق از ریزنمونه‌های برگی کشت شده بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک هیچ‌گونه باززایی مشاهده نشد. این سطح پایین تراریختی احتمالاً ناشی از مواد ضد باکتریایی ناشناخته‌ای است که در برگها حضور دارد (۲۵). ازدیاد باکتری بر روی قطعات برگی بنفشه آفریقایی کشت شده در محیط هم‌کشتی در مقایسه با توتون بسیار به تأخیر می‌افتد (۲۰) و وقتی این قطعات در روی محیط ساقه‌زایی قرار می‌گرفتند از ناحیه بریده شده، بطور آهسته شروع به قهوه‌ای شدن می‌کردند و هیچ گونه باززایی مشاهده نگردید. این واکنش می‌تواند به دلیل پاسخ فوق حساسیت یا واکنش نکروز شدگی در مقابل استقرار آگروباکتریوم باشد یا به عبارتی به دلیل شناسایی آگروباکتریوم به‌عنوان پاتوژن گیاهی است که در مقابل آن واکنش نشان می‌دهد (۱۰).

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR نشان می‌دهد که در اکثر گیاهان باند مورد نظر مشاهده شده است، بنابراین حداقل یک کپی از ژن *luc* را دارند در حالی که تعدادی از گیاهان فاقد این ژن بودند. عدم دارا بودن ژن *luc* در گیاهان انتخابی می‌تواند بدلیل حفاظت تقاطعی باشد که در آن بافتهای تراریخت غلظت آنتی‌بیوتیک را در اطراف بافتهای غیر تراریخت کاهش داده و امکان رشد بافت غیر تراریخت در روی محیط حاوی آنتی بیوتیک فراهم می‌شود (۲۷).

برای بررسی بیان ژن در سطح RNA از آزمون RT-PCR استفاده شد و نتایج آن نشان می‌دهد که در اکثر گیاهانی که در آزمون PCR جواب مثبت داشتند، در آزمون RT-PCR نیز مثبت بودند با این حال در مواردی عدم بیان ژن در سطح رونویسی مشاهده شد. عواملی مانند اثرات مکانی (Positional effect)، متیله شدن DNA انتقالی و خاموشی ژن، بیان ژن انتقال یافته را تحت تأثیر قرار می‌دهند. همچنین T-DNA می‌تواند نزدیک یا دور از عناصر فعال کننده رونویسی و یا در درون مناطق هتروکروماتینی الحاق شود (۱۴). بررسی گیاهان تراریخت با دستگاه لومینومتری ترجمه صحیح mRNA و تغییرات بعد ترجمه را نشان می‌دهد با این حال در بعضی از گیاهان خاموش شدن ژن انتقالی می‌تواند به دلیل وقایع پس از رونویسی باشد در این صورت به دلیل الحاق کپیهای چندگانه ژن انتقالی به درون یک سلول، ژن انتقالی رونویسی می‌شود ولی RNA تولید شده ناپایدار است (۲۱).

در مجموع به نظر می‌رسد جهت حصول به اهداف کامل این تحقیق و تولید گیاهان زینتی تراریخت باید به گونه‌ای بیان این ژن در گیاه افزایش یابد. برای افزایش بیان در سلولهای پستانداران و گیاهان تغییراتی از قبیل استفاده از کدونهای کاربردی، برداشتن سایتهای اضافی polyA و برداشتن توالی فاکتورهای متصل شونده در نسخه‌برداری در ژن لوسیفراز ضروری است (۲۹). از طرفی با توجه به تفاوتهای مورفولوژیک گیاهان زینتی از قبیل ضخامت دیواره کوتیکول و تأثیر آن در نور ساطع شده، باید گیاهان مختلفی را برای این منظور انتخاب و جهت انتقال ژن به کار برد.

Archive of SID

www.SID.ir

تشکر و قدردانی

از حمایتهای مادی و معنوی مسئولین آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس که زمینه این تحقیق را فراهم نموده‌اند و همچنین از همکاریهای ارزشمند آقایان مهندس اژدری، مهندس محب‌الدینی، مهندس لطیف و خانم مهندس آزموده سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

۱. باقری، خ.، جلالی جواران، م.، مهبودی، ف.، معینی، احمد و زبرجدی، ع. (۱۳۸۹). طراحی و تهیه سازه حاوی ژن اینترفرون گاما و بیان آن در بذر گیاه کلزا، مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۳، شماره ۲

۲. لطیف، ب.، جلالی جواران، م.، رجبی معماری، ح و اژدری، ح. (۱۳۸۸). همسانه‌سازی و انتقال ژن لوسیفراز حشره شبتاب گونه ایرانی *Lampyris turkestanicus* به گیاه توتون، گیاهپزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۲، شماره ۲

۳. معصومی اصل، اسد.، جلالی جواران، م.، مهبودی، ف و علیزاده، ه. (۱۳۸۸). همسانه سازی و انتقال ژن فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (**tPA**) با منشاء انسانی به گیاه توتون، مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۲، شماره ۳

4. Aflalo, C. (1991). Biologically localized firefly luciferase: A tool to study cellular processes, Int. Rev. Cytol., 130: 267-323.

5. Aldo, R., Massimo, G., Patrizia, P. and Mara, M. (2003). Bioluminescence and chemiluminescence in drug screening, Anal. Chem., 377: 826-33.

6. Alipour, B., Hosseinkhani, S., Nikkhah, M., Naderi-Manesh, H., Chaichi, M.J. and Kazempour, S. (2004). Molecular cloning, sequence analysis, and expression of a cDNA encoding the luciferase from the glow-worm, *Lampyris turkestanicus*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 325: 215-22.

7. Bilkey, p.c., Mc Cown, B.H. and Hildebrandet, A. C. (1978). Micropropagation of African violet from petiole cross-section., Hort- Science, 13(1): 37-38.

8. Chen, H., Zou, Y., Shang, Y., Lin, H., Wang, Y., Cai, R., Tang, X. and Zhou, J.M. (2008). Firefly luciferase complementation imaging assay for protein-protein interactions in plants, Plant Physiol, 146: 368-76.

9. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, Anal. Biochem., 162: 156-9.

10. Deng, W. X. Pu, R.N. Goodman, M.P. Gordon, E. and Nester, W. (1995). T-DNA genes responsible for inducing a necrotic response on grape vines, Mol. Plant-Microbe Interact, 8: 538–48.

11. DeWet, J.R., Wood, K.V., Helinski.D.R. and DeLuca. M. (1985). Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82: 7870-73.

12. Fischer, R. and Schillberg, S. (2004). Molecular Farming, plant made pharmaceuticals and technical proteins, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KgaA, 114 p.

13. Gamborg, O.L., Miller, R.A, Ojima, K., (1968). Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells, Exp. Cell Res., 50: 151–8.

14. Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 67: 16–37.

15. Ghisleni, P.L. and Martinetti, L. (1995). *Saintpaulia*. In: Annali Accademia di Agricoltura di Torino (pp. 158–266).

16. Gould, J. M., Devey, O., Hsegawa, C.E., Ulian, G., Peterson, H.and Smith, R. (1991).Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex, Plant Physiolo, 95: 426– 434.

17. Grout, B.W.W. (1990). African Violet. In: Handbook of Plant Cell Culture. Vol.5. (Eds.): P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp and Y.P.S. Bajaj. McGraw-Hill, Inc. pp. 181-2.

18. Harwood, W.A., Ross, S.M., Bulley, S.M., Travella, S., Busch, B., Harden, J. and Snape, J.W. (2002). Use of the Firefly luciferase gene in a barley (*Hordeum vulgare*) transformation system, Plant Cell Rep., 21: 320-26.19

19. Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro. T. (1994). Efficient transformation of rice (Oryza sativa L.) madiated by Agrobacterium

Archive of SID

www.SID.ir

and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA, Plant J, 6: 271–82.

20. Kushikawa, S., Hoshino,Y. and Mii, M. (2001). Agrobacterium-mediated transformation of Saintpaulia ionantha Wendl, Plant Sci, 161: 953–60.
21. Meins, F. (2000). RNA degradation and models for post-transcriptional gene silencing, Plant Mol. Biol., 43: 261–73.
22. Mercuri, A., Benedetti, L.D., Burchi, G. and Schiva, T. (2000). Agrobacterium-mediated transformation of African violet. Plant Cell Tissue Organ Cult., 60: 39–46.
23. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant, 15: 473–97.
24. Murray, M.G. and Thampson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, Nucleic Acids Res., 8: 4321-25.
25. Osbourn, A.E. (1996). Preformed anti-microbial compounds and plant defence against fungal attack, Plant Cell Rep., 8: 1821–31.
26. Ow, D. W., Wood, K. V., DeLuca, M., DeWey, J. R., Helinski, D. R., and Howell, S. H. (1986). Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 84: 4870-74.
27. Park, S. H., Rose, S. C., Zapata, C., Srivatanakul, M. and mith, R. H. (1998). Cross-protection and selectable marker enes in plant transformation, In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 34: 117-21.
28. Ronaghi, M., Karamohamed, S., Petterson, B., Uhlen, M. and Nyren, P. (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release, Anal. Biochem., 242: 84–89.
29. Ruijter, N.C.A., Verhees, J., Leeuwen, W.V. and van der Krol, A.R. (2003). Evaluation and comparison of the GUS, LUC and GFP reporter system for gene expression studies in plants, Plant Biol, 5: 103-15.
30. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual (2nd). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 858 p.
31. Starts, N.D. and Cummings, B.G. (1976). In vitro propagation of *saintpaulia ionantha* wendl, Hort- Science, 11: 204–6.
32. Sunil Kumar, G.B., Ganapathi, T.R., Revathi, C.J., Prasad, K.S. and Bapat, V.A. (2003). Expression of hepatitis B surface antigen in tobacco cell suspension cultures, Protein Expr. Purif., 32: 7-10.
33. Tafreshi, N. Kh., Sadeghizadeh, M., Emamzadeh, R., Ranjbar, B., Naderi, H. and Sadeghizadeh, M. (2008). Site-directed mutagenesis of firefly luciferase: implication of conserved residue (s) in bioluminescence emission spectra among firefly luciferases, Biochem. J., 412: 27–33.
34. Tisi, C.L., White, P.J., Squirrell, D.J., MurpHy, M.J., Lowe, C.R., Murray, J.A.H., Murray. (2002). Development of a thermostable firefly luciferase, Anal. Chim. Acta, 457: 115–23.

Archive of SID

www.SID.ir

Transformation of iranian firefly *Lampyris turkestanicus* luciferase gene with red emitting light into african violet plant

Razmi A.[1], Jalali Javaran M.[1].and Hosseinkhani S.[2].

[1] **Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran**

[2] **Biochemistry Dept., Faculty of Basic Science, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran**

Abstract

Firefly luciferase (*luc*) is one of the most important industrial enzymes which have various applications in medicine, biotechnology and molecular biology. *luc* is also a suitable candidate both in *in vivo* bioluminescence imaging and reporter systems, due to having interesting features such as high sensitivity, reproducibility, and being measured quantitatively. In this study, Iranian firefly *Lampyris turkestanicus* luciferase gene with red emitting light was subcloned and introduced into African violet (*Saintpaulia ionantha*) plants. The *luc* gene was isolated by PCR, and was subcloned in pCAMBIA1304 vector. The construct was confirmed by several methods: colony PCR, PCR, digestion, sequencing and BLAST analysis. The *Agrobacterium*–mediated transformation method was used to introduce *luc* into African violet genome and putative transgenic plants were selected on the selective medium containing hygromycin and cefotaxim. Finally, transgenic plants were confirmed by PCR, RT-PCR and Luminometric analysis. The results of luminometric assay showed the activity of luciferase enzyme in the leaves of some plants. In this study, the maximum emitted light was 20000 RLU/sec, while in the control plant, the light emission was not detected.

Keywords: Firefly luciferase, Subcloning, Gene transformation, African violet

Archive of SID

www.SID.ir