# انتقال ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب (*Lampyris turkestanicus*) به کلزا (*Brassica napus* L.)

# Transformation of the Rapeseed (*Brassica napus* L.) with Firefly Luciferase Gene

حسین خسروی[۱]، مختار جلالی جواران[۲*]، سامان حسینخانی[۳] و آرش رزمی[۴]

**چکیده**

پیشرفت‌های اخیر در زیست شناسی مولکولی و زیست فناوری گیاهی تصور عمومی را در مورد کاشت گیاهان به‌صورت سنتی و فقط به‌عنوان یک منبع غذایی به سمت این‌که گیاهان به‌عنوان کارخانه‌های زیستی جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب و دارویی استفاده شوند تغییر داده است. زراعت مولکولی"Molecular farming" به تولید پروتئین‌های نوترکیب (اعم از دارویی و آنزیم‌های صنعتی ارزشمند) در گیاهان از طریق مهندسی ژنتیک اطلاق می‌شود. آنزیم لوسیفراز حشره شب‌تاب یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی است که به‌طور وسیعی در زمینه‌های مختلف زیست فناوری و زیست شناسی سلولی و مولکولی به‌ویژه در تشخیص میزان ATP به‌منظور تشخیص آلودگی‌های میکروبی، تهیه کیت‌های تشخیص سرطان، غربال‌گری داروها، زیست‌حس‌گرها، سنجش‌های آنزیمی به‌عنوان ژن گزارشگر و در توالی‌یابی DNA (Pyrosequencing) استفاده می‌شود. پژوهش حاضر جهت انتقال ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب جدایه ایرانی *Lampyristurkestanicus* به گیاه کلزا انجام گرفت. در این پژوهش ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب (*LUC*) که تحت پیش‌برنده 35S ویروس موزائیک کلم (*CaMV35S*) در پلاسمید *pCAMBIA1304* همسانه سازی شده بود، به اگروباکتریوم سویه *LBA4404* منتقل و به‌وسیله Colony PCR و با آغازگرهای اختصاصی تایید شد. سپس پلاسمید نوترکیب شامل ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب (*LUC*) به روش مبتنی بر اگروباکتریوم به گیاه کلزا منتقل گردید. برای تراریخت سازی، ریزنمونه‌های لپه‌ای گیاه کلزا رقم PF4570/91 مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین آستانه تحمل گیاه کلزا به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین، غلظت‌های مختلف این آنتی‌بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان تراریخت بر روی محیط MS حاوی آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین انتخاب شدند و سپس به محیط‌های طویل شدن شاخه و ریشه زایی انتقال یافتند. آنالیز PCR گیاهان حضور ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب را در گیاهان کلزای تراریخت تایید نمود.

**واژه‌های کلیدی**:باززایی، بیو راکتور، آگروباکتریوم، زراعت مولکولی، ژن لوسیفراز

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه تربیت مدرس
۲. دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه تربیت مدرس
۳. دانشیار گروه بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس
۴. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشگاه تربیت مدرس
*: نویسنده مسوول Email: m_jalali@modares.ac.ir

## مقدمه

گیاهان تراریخت می‌توانند به‌عنوان بیوراکتورهای زنده برای تولید ارزان و انبوه مواد شیمیایی، زیست داروها و پروتئین‌های با ارزش عمل نمایند که این پدیده به زراعت مولکولی (Molecular Farming) معروف می‌باشد. با استفاده از روش زراعت مولکولی می‌توان کربوهیدرات‌ها، اسیدهای چرب، پلی پپتیدها، واکسن‌ها، آنزیم‌های صنعتی و پلاستیک‌های تجزیه پذیر زیستی را در سیستم‌های گیاهی تولید نمود. (Fischer *et al*. 1999).

آنزیم لوسیفراز به‌طور وسیعی در زیست فناوری و زیست شناسی سلولی و مولکولی استفاده می‌شود. لوسیفراز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی است. این آنزیم، گستره وسیعی از تکنیک‌های تشخیصی را تشکیل می‌دهد. تولید نور توسط آنزیم لوسیفراز یکیاز حساس‌ترین ابزارهای تشخیص مقدار ATP از طریق لومینومتری (حساس‌ترین روش سنجش ATP) است که از آن، جهت تشخیص آلودگی‌های میکروبی، ارزیابی فسفاتازها، توالی‌یابی DNA به روش Pyrosequencing، اندازه‌گیری میزان حیات سلولی (Viability)، تهیه کیت‌های تشخیص سرطان و زیست‌حس‌گرها، غربال‌گری داروها، بررسی روابط برهمکنشی و تاخوردگی پروتئین‌ها، سنجش‌های آنزیمی و به‌عنوان ژن گزارش‌گر به وفور استفاده می‌شود (Thore *et al*. 1983, Hauke and Mona, 2006 and Leeuwen *et al*. 2000).

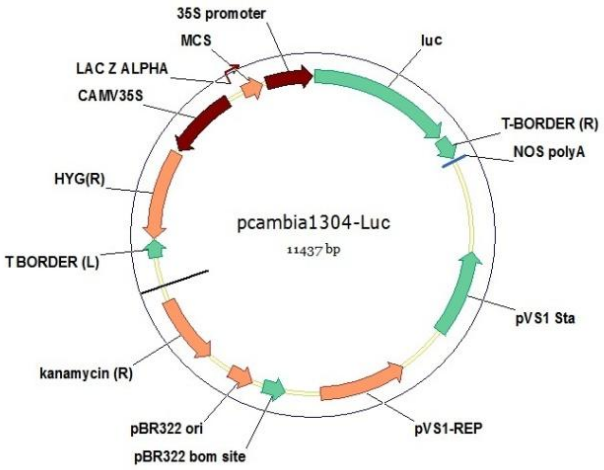
لوسیفرین حشره شب‌تاب درسال ۱۹۴۹ جداسازی و تخلیص گردید (McElroy and Strehler, 1957). درسال۱۹۸۶ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب آمریکایی *Photinus* (*pyralis*) به گیاه توتون منتقل و بدین ترتیب توانایی گیاه در ساختن لوسیفراز مشخص گردید (Ow *et al*. 1986). در سال ۱۹۹۰ طی آزمایشی، الگوی متغیر بیان لوسیفراز در برگ‌های توتون تراریخت، با استفاده از ترکیب ژن‌های لوسیفراز حشره شب‌تاب و نئومایسین فسفوترانسفراز (عامل مقاومت به کانامایسین)، تحت پیش‌برنده (*CaMV35S*) و به کمک نوعی سیستم تصویربرداری، مورد مطالعه قرار گرفت (Barnes. 1990). استفاده از سیستم لوسیفراز به‌عنوان یک گزارش‌گر برای مطالعات بیان ژن در گیاهان با سایر ژن‌های گزارش‌گر مرسوم نظیر GUS و GFP مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفته است (Ruijter *et al*. 2003).

ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب جدایه ایرانی (*Lampyris turkestanicus*) برای اولین بار توسط علیپور و همکاران شناسایی، جداسازی و در ناقل باکتریایی همسانه‌سازی شد و به‌منظور افزایش خصوصیات کاربردی آن مورد ارزیابی قرار گرفت (Alipour *et al*. 2003). جهت کارایی بهتر با استفاده از جای‌گزینی اسیدهای آمین H245N، S284T و H431Y لوسیفرازهای با نشر نور قرمز تولید گردید (Tafreshi *et al*. 2008). پروتئین لوسیفراز دارای ۵۴۸ اسید آمینه و توالی نوکلئوتیدی cDNA این ژن به‌طول ۱۶۴۴bp می‌باشد. هدف این پژوهش، بررسی امکان انتقال ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب جدایه ایرانی (*Lampyristurkestanicus*) که توسط رزمی و همکاران (۱۳۸۸) در ناقل*pCAMBIA1304* همسانه سازی شده بود با توجه به امکان تجمع آن در اجسام روغنی این گیاه، جهت سهولت در تخلیص آن و هم‌چنین ایجاد زمینه تولید ارزان آن، برای اولین بار به گیاه کلزا بود.

## مواد و روش‌ها

از باکتری *Escherichia coli* سویه *DH5α* جهت تهیه سلول‌های مستعد (Competent cell) و نگهداری پلاسمیدهای اصلی و نوترکیب استفاده گردید. از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه *LBA440* نیز به‌منظور انتقال ژن به سلول‌های گیاهی استفاده شد. برای تایید کلون‌های نوترکیب اگروباکتریوم، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، واکنش PCR برای کلون‌ها (پلاسمید pCAMBIA1304 نوترکیب) انجام و محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱٪ بار گذاری گردید. انتخاب سویه اگروباکتریوم، مدت زمان تلقیح و رقم کلزا با توجه به نتایجی که زبرجدی و همکاران (۱۳۸۵) گزارش نمودند، انجام شد. از پلاسمید *pCAMBIA1304* به‌عنوان یک ناقل بیانی گیاهی و جهت انتقال قطعات همسانه‌سازی شده ژن هدف در گیاه استفاده شد. در شکل یک بخش‌های مهم پلاسمید *pCAMBIA1304* همراه با ژن LUC نمایش داده شده است.

از کانامایسین (Kanamycin) به‌عنوان عامل انتخاب ناقل‌های *pCAMBI1304* در کشت باکتریایی به‌میزان ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و از هیگرومایسین (Hygromycin) به‌عنوان عامل انتخاب ریزنمونه‌های تراریخت (سلول‌هایی که قطعه T-DNA را دریافت کرده‌اند) میزان ۱۰-۵ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت MS استفاده گردید. در کشت‌های باکتریایی جهت انتخاب اگروباکتریوم سویه *LBA4404* از آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (Streptomycin) به‌میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. سفوتاکسیم (Cefotaxime) نیز به‌منظور جلوگیری از رشد اگروباکتریوم و آلودگی محیط کشت گیاهی MS (به‌جز محیط هم‌کشتی) به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر اضافه گردید.




شکل۱: نقشه ناقل بیانی گیاهی pCAMB IA1304 به همراه ژن *LUC*
Figure1: The map of pCAMB IA1304 plant expression vector with luc gene

**آغازگرها**

آغازگرهای Lux1F و Lux1R مورد استفاده برای تکثیر DNA (رزمی و همکاران، ۱۳۸۸) از شرکت سیناژن دریافت شدند.

**انتقال ناقل *pCAMBIA1304* حامل ژن لوسیفراز (*pCAMLUC*) به اگروباکتریوم**

استخراج پلاسمید به روش Mini-Preparation و تراریختی اگروباکتریوم، به روش استاندارد انجماد و ذوب انجام شد (Sambrook and Russel, 2001). حضور این سازه در باکتری‌ها، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن لوسیفراز و انجام Colony PCR اثبات شد.

**مواد گیاهی و تهیه ریز نمونه**

به‌منظور تهیه ریزنمونه، بذرهای کلزای رقم PF4570/91 با استفاده از مایع ظرفشویی (سه قطره در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به مدت پنج دقیقه شستشو داده شدند و سپس با استفاده از محلول وایتکس (هیپوکلریت سدیم) سه درصد به‌مدت ۱۷- ۱۵ دقیقه به همراه تکان دادن ملایم ضد عفونی شدند. پس از سه مرتبه شستشو با آب مقطر استریل (هر بار به مدت حداقل پنج دقیقه)، بذرها برای مدت ۶۰-۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد، استریل و سه تا پنج مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذرهای ضد عفونی شده بعد از خشک شدن بر روی کاغذ صافی در شرایط کاملا استریل، در محیط کشت جوانه‌زنی (Germination medium) که حاوی محیط کشت Murashige and Skoog, MS (1962) با غلظت ۵۰٪ نمک‌ها و بدون هورمون‌های گیاهی بود، کشت و در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت باززایی ریزنمونه‌های تلقیح شده و به‌دست آوردن گیاه تراریخت، محیط‌های کشت متفاوتی بر اساس نتایج زبرجدی و همکاران (۱۳۸۵) شامل محیط هم کشتی (Germination medium)، محیط القاء شاخه‌زایی (Shoot Induction Medium)، محیط طویل شدن شاخه (Shoot Elongation Medium) و محیط القاء ریشه‌زایی (Root Induction Medium) استفاده شد.

**تعیین آستانه مقاومت کلزا به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین**

جهت تعیین آستانه مقاومت این گیاه به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین از محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین استفاده شد.

**تراریخت نمودن ریز نمونه‌های برگ لپه‌ای (Cotyledonary petiole) کلزا**

به‌منظور تراریخت نمودن گیاه کلزا از ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای و روش تراریخت سازی استفاده گردید (Molony *et al.* 1989). در پژوهش حاضر جهت بهبود کارایی تراریخت و تحریک انتقال T-DNA از محیط القای حاوی ۵۰ گرم در لیتر گلوکز با (pH 5.2) استفاده شد.

ریزنمونه‌ها از برگ‌های لپه‌ای پنج تا هفت روزه تهیه، و پس از آلوده سازی با اگروباکتریوم حاوی پلاسمید دارای

ژن LUC (در طول موج ۶۰۰ نانومتر با OD ۰/۶- ۰/۸)، به مدت ۴۸ ساعت در محیط هم‌کشتی (MS + هفت گرم در لیتر آگار+ ۳۰ گرم در لیتر ساکارز + پنج میلی‌گرم در لیتر BAP +۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول، pH=۵/۲) قرار گرفتند. پس از مرحله هم‌کشتی، ریز نمونه‌ها به محیط القای شاخه‌زایی (ترکیبات محیط هم‌کشتی + ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفوتاکسیم و ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین) منتقل و هر سه هفته یکبار در محیط جدید واکشت شدند. پس از حدود ۴ تا ۵ هفته، شاخه‌های باززایی شده از قاعده دمبرگ‌های لپه‌ای جدا و به محیط طویل شدن شاخه (MS ۱/۲ + هفت گرم در لیتر آگار+ ۲۰ گرم در لیتر ساکارز + ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول) و دو تا سه هفته بعد، نوساقه‌های باززایی شده جهت ریشه زایی به محیط القای ریشه‌زایی (MS ۱/۲ + هفت گرم در لیتر آگار + دو میلی‌گرم در لیتر IBA + ۲۰ گرم در لیتر ساکارز + ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول) منتقل شدند. پس از تشکیل ریشه‌ها، گیاهچه‌های ریشه‌دار به گلدان‌های حاوی پرلایت و سپس به خاک انتقال یافتند (شکل ۴).

**آنالیز گیاهان باززایی شده کلزا در سطح محیط کشت انتخابگر**

**استخراج DNAی ژنومی از گیاه کلزا و واکنش PCR**: جهت تهیه DNA ژنومی، از برگ‌های جوان و سبز گیاه کلزا استفاده شد و DNA ژنومی به روش *دلاپورتا* و همکاران (Dellaporta *et al.* 1983)استخراج گردید. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز تائید شد. حضور ژن لوسیفراز با استفاده از واکنش PCR با شرایط و مواد جدول‌های یک و دو مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱: مواد مورد مصرف و مقدار آن‌ها برای PCR

Table1: Materials and amount of them that used for PCR

| material of used | Amunt (µl) |
|---|---|
| Tempelate (Plant genomi DNA and pCAMBIA1304) | 1 |
| *LUC* F (10 pmol) | 1 |
| *LUC*R (10 pmol) | 1 |
| $MgCl_2$ | 2 |
| *Taq* DNA Ploymerase Buffer | 2.5 |
| dNTP (10 mM) | 0.7 |
| *Taq* DNA polymerase | 0.3 |
| DDW | 16.25 |
| Total volume | 25 |

جدول۲: برنامه و شرایط PCR

Table2: program and conditions of PCR

| Number of cycle | stage | Temperature (°C) | Time (second) |
|---|---|---|---|
| 1 cycle | DNA Hot start | 94 | 300 |
| 35 cycles | DNA Denaturation | 94 | 30 |
| | Annealing | 57 | 45 |
| | DNA Extension | 72 | 100 |
| 1 cycle | DNA Final Extension | 72 | 300 |

## نتایج و بحث

### تأیید کلون‌های نوترکیب (حاوی پلاسمید *pCAMBIA1304*) اگروباکتریوم

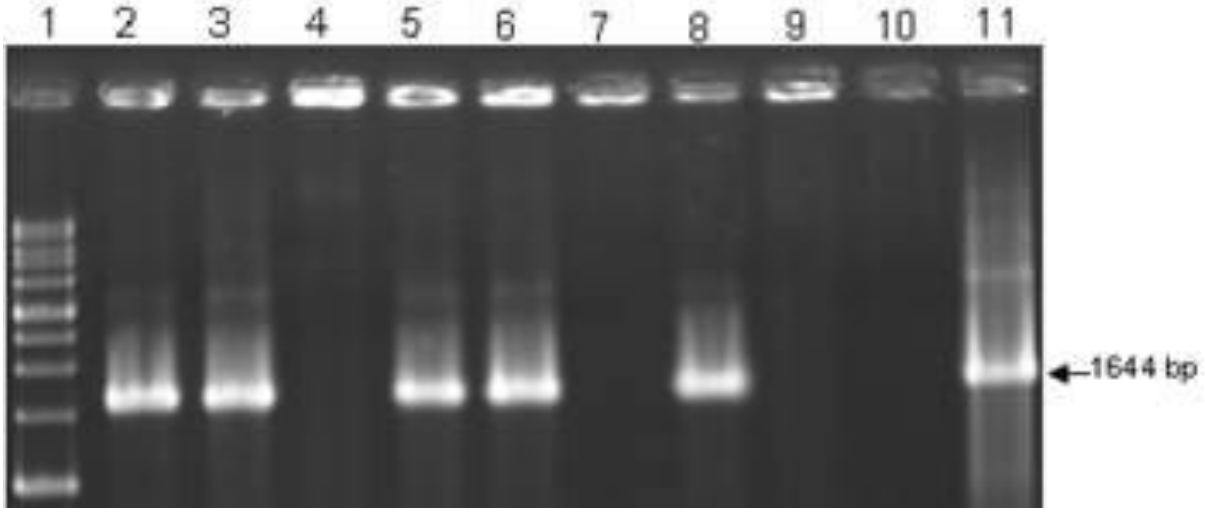
برای تایید کلون‌های نوترکیب اگروباکتریوم، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، واکنش PCR برای کلون‌ها (پلاسمید *pCAMBIA1304* نوترکیب) انجام شد. بر روی ژل، تک باند حدود ۱۶۴۴bp مشاهده شد که دلیلی بر وجود ژن مورد نظر در کلون‌های باکتری حاوی ناقل‌های *pCAMBIA1304* بود (شکل ۲).

### انتقال ژن *LUC* به کلزا

ریز نمونه‌های مختلفی جهت انتقال ژن و باززایی استفاده شده است که در گزارش‌ها، ریزنمونه برگ لپه‌ای میزان باززایی بیش‌تری (۷۰٪) نسبت به محور زیر لپه (۲۶/۴٪) داشته است (زبرجدی و همکاران، ۱۳۸۴) به همین دلیل، ریز نمونه‌های برگ لپه‌ای پنج تا هفت روزه‌ی کلزا بر ریز نمونه‌های دیگر ترجیح داده شد. در هنگام آماده سازی ریز نمونه‌ها، باید دقت شود تا مریستم انتهایی در انتهای دمبرگ باقی نماند زیرا به‌دلیل رشد سریع، با آنتی بیوتیک کنترل نمی‌شوند و ممکن است جوانه‌های نابجا با جوانه‌های باززایی شده تراریخت اشتباه گرفته شوند. همچنین اگر انتهای دمبرگ بیش از حد قطع گردد، از توان باززایی کاسته می‌شود. برای حصول نتایج بهتر، بعد از تلقیح ریزنمونه‌ها با اگروباکتریوم، ریز نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط MS حاوی هورمون مناسب و فاقد آنتی‌بیوتیک (در دمای ۲۸°C و تاریکی) رشد داده شدند (پیش تیمار). زیرا حداقل زمان لازم برای فعالیت پروتئین‌های *Vir* و انتقال T-DNA به ژنوم سلول‌های گیاهی، ۱۶ ساعت می‌باشد و در شرایط فوق اگروباکتریوم با سهولت بیشتری ژن را به گیاه منتقل می‌کند.

جهت تعیین آستانه مقاومت این گیاه به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین پس از بررسی غلظت‌های مختلف این آنتی‌بیوتیک، غلظت بین پنج تا ده میلی‌گرم در لیتر جهت گزینش گیاهان تراریخت مناسب تشخیص داده شد و در نهایت مقدار ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر برای گزینش جوانه‌های تراریخت باززایی شده استفاده شد. میزان مقاومت یک سلول گیاهی تراریخت شده بستگی کامل به تعداد نسخه‌های منتقل شده ژن مقاومت به هیگرومایسین و جایگاه قرارگیری آن در ژنوم هسته‌ای دارد (Chawla, 2000).

برخی از ریزنمونه‌های تلقیح شده در محیط کشت انتخابی (حاوی هیگرومایسین ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر و سفوتاکسیم ۲۰۰میلی‌گرم در لیتر) پس از سه تا چهار هفته باززایی شدند. تعدادی از جوانه‌های باززایی شده بر روی محیط گزینش‌گر حاوی هیگرومایسین، سبز و زنده ماندند و بقیه به علت عدم دریافت ژن مقاومت از بین رفتند نسبت باززایی نوساقه در ریزنمونه‌های تراریخت کمتر از ۱۰ درصد بود. این نتیجه در مقایسه با نتایج به‌دست آمده توسط زبرجدی و همکاران (۱۳۸۵) و کهریزی و همکاران (۱۳۸۳) که از آنتی‌بیوتیک کانامایسین جهت انتخاب گیاهان تراریخت استفاده کردند مقدار کمتری بود که احتمالا علت آن سمیت بیش‌تر عامل انتخاب‌گر ژن لوسیفراز (هیگرومایسین) بوده که باعث از بین رفتن گیاهان تراریخت شد (شکل ۳). تراریخته نبودن گیاه می‌تواند به عدم توانایی سوش اگروباکتریوم جهت انتقال ساختارهای ژنی، ژنوتیپ گیاه مورد استفاده، خاموشی ژن، نوع بافت هدف و یا سمیت بیان بالای باشد.احتمالا نوساقه‌های زنده مانده؛ ژن *LUC* و مقاومت به آنتی‌بیوتیک را از پلاسمید *pCAMBIA1304* دریافت نموده‌اند (شکل ۳). ریز نمونه‌هایی که در این شرایط سبز باقی ماندند، به محیط کشت طویل سازی ساقه (حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۵ میلی‌گرم در لیتر هورمونBAP) منتقل شدند. می‌توان برای افزایش تراریخته بودن در گیاه کلزا از آزمون‌های مکمل نظیر استفاده از سایر ژنوتیپ‌های کلزا، سایر سویه‌های اگروباکتریوم، افزایش مدت زمان نگهداری انتهای برگ لپه در محلول اگروباکتریوم و به کارگیری سایر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی برای باززایی بیشتر و نگهداری گیاهان مادری در شریط مناسب‌تر برای تشکِل برگ‌لپه قوی اشاره کرد.

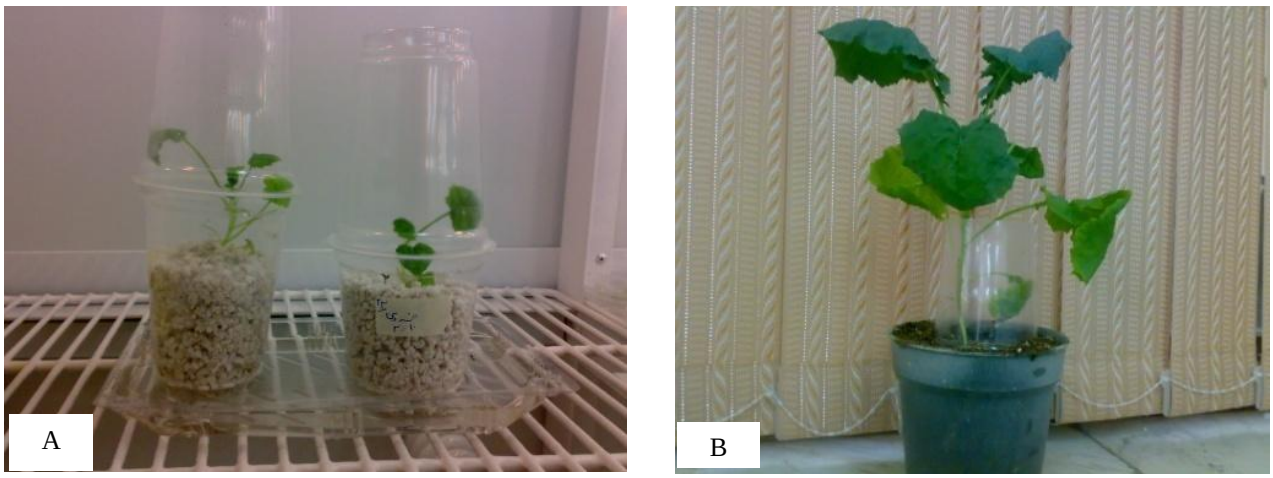



شکل۲: تایید حضور ژن *LUC* در آگروباکتریوم بااستفاده از تکنیک Colony PCR و آغازگرهای اختصاصی. چاهک۱: نشانگر مولکولی 1Kb از شرکت Fermentase، چاهک‌های۲تا ۸: نتایج حاصل از Colony PCR بر روی آگروباکتریوم، چاهک‌های ۴، ۷ و ۹: آگروباکتریوم بدون ناقل pCAMBIA1304 (و بدون ژن *LUC*)، چاهک ۱۰: کنترل منفی (بدون DNA)، چاهک ۱۱:کنترل مثبت (باکتری *E. coli* حاوی سازه pCAMLUC)

Figure2: Confirm of the presence LUC gene in *Agrobacterium tumefaciens* by specific primers and C PCR olony lane technique1: 1Kb ladder, Fermentase CO. molecular marker, lanes 2 to 8: Results of Colony PCR on *Agrobacterium* tumefaciens, lanes 4, 7 and 9: *Agrobacterium* tumefaciens without pCAMBIA1304 vector (without LUC gene), lane 10: negative control (no DNA), lane 11: positive control (*E.coli* containing pCAMLUC construct)

شکل۳: باززایی بر سطح محیط انتخابی حاوی هیگرومایسین: جوانه‌های غیر تراریخت سفید شده (A) و جوانه‌های احتمالا تراریخت مقاوم به آنتی‌بیوتیک (B)

Figure 3: Regeneration on selective medium containing Hygrvmaysyn: non-transgenic white seedlings (A) and probably transgenic seedlings resistant to antibiotics (b)

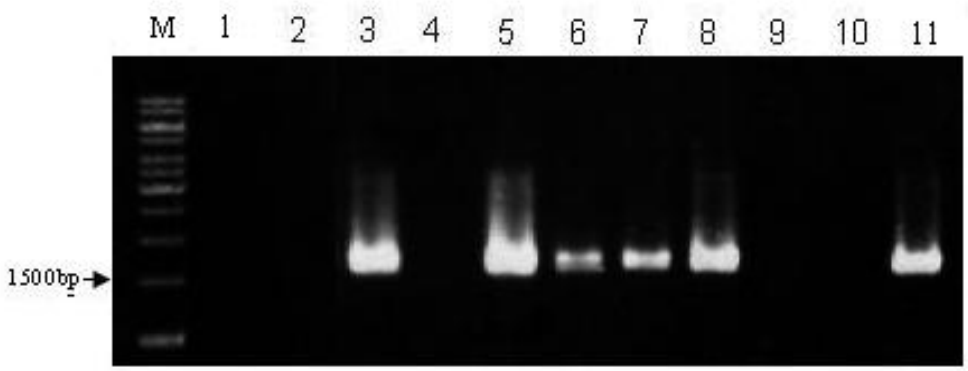



شکل۴: گیاه باززایی شده (احتمالا تراریخت) در پرلیت (A) و گلدان (B)
Figure4: Regenerated plants (probably transgenic) in perlite (A) and pot (B)

**بررسی تراریختی گیاهان باززایی شده با استفاده از تکنیک PCR**

DNA ژنومی، به روش دلاپورتا و همکاران (Dellaporta *et al.* 1983) استخراج و در غلظت‌های مناسب تهیه شد. نتایج واکنشPCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *LUC* بر روی نمونه‌های DNA استخراج شده از گیاهان به‌دست آمده از محیط‌های کشت بافت انتخابی، وجود یک قطعه حدود ۱۶۵۰ جفت باز را نشان داد که دلیلی بر تراریخت بودن آن‌ها و تایید حضور ژن می‌باشد در حالی‌که در گیاه شاهد (غیر تراریخت) هیچ‌گونه باندی مشاهده نشد (شکل ۵).

در طی دهه گذشته گرایش اقتصادی و تجاری گسترده‌ای برای توسعه فناوری‌های بیولومینسانس به‌عنوان جای‌گزینی برای روش قدیمی غربال‌گری به‌وجود آمده است. البته فرم‌های تجاری و پایدار آن بسیار گران‌قیمت و استفاده از آن‌ها مقرون به صرفه نیست و با توجه به اهمیت روز افزون این آنزیم پایدار سازی و تولید انبوه آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به کاربردها و توانایی گیاهان در تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس انبوه، ایمن و ارزان، سیستم گیاهی جای‌گزین مناسبی جهت تولید پروتئین های نوترکیب نسبت به سایر سیستم‌های تولید سنتی به خصوص میکروارگانیزم‌ها و فرمانتورها می‌تواند باشد.




شکل ۵: آنالیز گیاهان تراریخت با استفاده از تکنیک PCR: چاهکM: نشانگر مولکولی ۱۰۰bp، چاهک۱: گیاه شاهد (غیرتراریخت)، چاهک۲: کنترل منفی (آب مقطر بدون DNA). چاهک۳: کنترل مثبت (سازه LUC 1304) حاوی ژن هدف، چاهک‌های ۵، ۶، ۷، ۸ و ۱۱: گیاهان تراریخت، چاهک‌های ۴، ۹ و ۱۰گیاهان فاقد ژن لوسیفراز.
Figure 5: Analysis of transgenic plants by PCR technique: M: 100 bp molecular marker, lane1: control plants (non-transgenic), lane 2: negative control (distilled water without DNA). lane 3: positive control (construct *LUC* .1304) with target gene, lanes 5, 6, 7, 8, and 11: transgenic plants, lanes 4, 9 and 10 plants without luciferase gene.

در سال‌های اخیر گزارش‌های متعددی در مورد انتقال ژن‌های مختلف توسط اگروباکتریوم به گیاه کلزا با اهدافی مانند بهبود ترکیب روغن،(Knutzon *et al*. 1992 و زبرجدی و همکاران، ۱۳۸۴) مقاومت به علف‌کش، (De Block *et al*. 1989)، تغییر در ترکیب پروتئین، (Altenbach *et al*. 1992)، مقاومت به حشرات، (Stewart *et al*. 1996) و انتقال ژن اینترفرون گامای انسانی (باقری وهمکاران، ۱۳۸۸ و طاهری جوان و همکاران، ۱۳۸۷) ارائه شده است. در این تحقیق ژن لوسیفراز حشره شب‌تاب ایرانی به گیاه کلزا انتقال داده شد. وجود ژن فوق در این گیاه از طریق آنالیز PCR به اثبات رسید که با توجه به استفاده‌های فراگیر این آنزیم، کاربردهای وسیع‌تری از آن قابل تصور است. با تولید این پروتئین آنزیمی در گیاه کلزا و با توجه به امکان تجمع آن در اجسام روغنی در جهت سهولت تخلیص آن، با ادامه این تحقیق افق‌های جدیدی در تولید این آنزیم ارزشمند با قیمت ارزان‌تر و در مقیاس بیش‌تر باز خواهد شد. با انجام این تحقیق برای اولین بار و اثبات امکان انتقال این ژن در کلزا مقدمات تحقیقات هدفمند بعدی فراهم گردیده است. پیش‌بینی می‌شود با بهینه سازی سیستم بیان ژن لوسیفراز در کلزا و روش استخراج آن از کلزای تراریخت زمینه تولید انبوه و ارزان این آنزیم ارزشمند فراهم گردد.

# Transformation of the Rapeseed (*Brassica napus* L.) with Firefly Luciferase Gene

**Khosravi[1], H., Jalali Javaran[2*], M., Hosseinkhani[3], S. and Razmi[4], A.**

**Abstract**

Recent advances in molecular biology and plant biotechnology have shifted the concept of using crops as a food source to recruiting them as a bioreactor for the production of therapeutic recombinant proteins. "Molecular Farming" refers to producing valuable industrial enzymes and pharmaceutical proteins in plants through genetic engineering. Firefly Luciferase enzyme is one of the most important industrial enzymes being widely used in the various fields of Biotechnology and Cell and Molecular Biology, particularly in the detection rate of ATP to determine microbial pollution, the cancer identification kits, screening drugs, bioassay, sequencing of DNA (Pyrosequencing) and enzyme measuring. Luciferase gene has many applications, it is also ideal as a reporter gene in genetic engineering in order to optimize gene transfer systems. This study was done to transfer Iranian Firefly Luciferase gene (*Lampyris turkestanicus)* to Canola. In this study, Firefly Luciferase gene (*luc*) under the S35 promoter cauliflower virus (*CaMV 35S*) transferred to Agrobacterium strain *LBA4404*. Transformation was confirmed by Colony PCR with specific primers. recombinant plasmid bearing Firefly Luciferase genes (*luc*), was transferred to Canola by Agrobacterium-mediated transformation method. Cotyledon explants of Canola (cultivar PF4570/91) were used for transformation. For determining canola tolerance threshold, different concentrations of Hygromycin were analyzed. The transformed plants were screened on MS medium containing 7.5 $mg.L^{-1}$ Hygromycin and 200 $mg.L^{-1}$then transferred to regeneration and rooting medium. PCR analysis of transgenic palnts verified the presence of Firefly Luciferase (*Lampyris turkestanicus*)gene.

**Keywords**: Regeneration, Bioractor, *Agrobacterium*, Cocultivation, Molecular Farming

**References**

Alipour, B. S., 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, 215–222

Altenbach, S. B., Kuo, C., Staraci, L. C., Pearson, K. W., Wainwright, C., Georgescu, A. and Townsend, J. (1992). Accumulation of a Brazil nut albumin in seed of trabsgenic canola result in enhanced levels of seed protein methionone. Plant Molecular Biology, 18:235-242

Bagheri Kh , Jalali Javaran M , Mahboudi F , Moeini A., Zebarjadi A. Designing and development of Gamma Interferon construct and transformation to *Brassica napus*.(20۰۸). Modern Genetics Journal, Vol۳, Number۳

Barnes, M.W. (1990). Variable patterns of expression of luciferase in transgenic tobacco leaves.Proceedings of the National Academy of Sciences, 87: 9183-9187.

Chawla. H. S. (2000). Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers Inc. Enfield, NH, USA. Chapters:8,9,13,18,22.

De Block, M., De Brouwer, D. and Tenning, P. (1989).Transformation of *Brassica naous* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and expression of bar and neo genes in transgenic plants. Plant Physiology, 91: 694-701.

Dellaporta, SL., Wood J., Hicks JB (1983). A plant DNA minipreprationversion II. Plant Molecular Biology Reporter. 1: 19-21.

Fischer. R., Drossard. J., Commandeur. U., Schillberg. S and Emans. N.,(1999), Towards molecular farming in the future: moving from diagnostic protein and antibody production in microbes to plants , Biotechnol. Appl. Biochem, 30:101-108

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

1. M.Sc graduate student Plant Breeding, Department of Plant Breeding, University of Tarbiat Modares
2. Associate Professor in Department of Plant Breeding and Biotechnology University of Tarbiat Modares
3. Associate Professor in Department of Biochemistry University of Tarbiat Modares
4. M.Sc graduate student Biotechnology, Department of Biotechnology, University of Tarbiat Modares
*: Corresponding author Email: m_jalali@modares.ac.ir

kahrizi., D. Salmanian., A. Mousavi., A. Afshari., A. Isolation,molecular analysis and site directed mutagenesis in E. coli EPSPS gene in order to make glyphosate tolerant rapeseed *(Brassica napus* L.).(2004). Pajouhesh & Sazandegi No:64 pp: 94-103

Knutzon, D. Z. Thompson, G. A. Radke, S. E. Johnson, W. B., Knauf, V. C. and Kridl, J. C. (1992). Modification of Brassica seed oil by antisense of a stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene. The Proceeding of the National Academy of Science USA, 89:2624-2628.

Leeuwen, W.V., Hagendoorn, M.J.M., Ruttink, T., Poecke, R.V., Vanderplas, L.H.W. and Vanderklor, A.R. (2000).The use of the luciferase reporter system for in Planta gene expression studies. Plant Molecular Biology Reporter, 18: 143a-143t.

McElroy, W.D., and Strehler, B.L., (1957). Assay of adenosine triphosphate. Method Enzymology, 3: 871-873.

Molony, M. M., Walker, J., Sharma, K. (1989). High efficiency transformation of Brassica napus using Agrobacterium vectors. Plant Cell Report, 8: 238-242.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15(3): 473-497.

Ow, D.W., Wood, K.V., Deluca, M., De WET, J.R., Helinski, D.R. and Howell, S.H. (1986). Transient and stable expression of the Firefly luciferse gene in plant cells and transgenic plants. Science, 234: 856-859.

Razmi, A., Jalali Javaran M. Hosseinkhani, S. Azhdari, H. Latif, B. (2009) cloning of *ff-LUC* gene with the publication of the red light in pCAMBIA1304 expression vector for Agrobacterium-mediated transformation of plants. Sixth National Biotechnology ongress of Iran 13-15 Aug, 2009

Ronaghi, M., Karamohamed, S., Petterson, B., Uhlen, M. and Nyren, P. (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. Analytical Biochemistry, 242: 84–89.

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 Biology, 5: 103-115

Sambrook, J. and Russell, D.W.(2001) Molecular Cloning. A Laboratory manual.3rd Edition. Cold Spring Harhor Press. New York, USA.

Stewart, C. N., Adang, M. J., All, J. A., Raymer, P. L., Ramachandran, S. and Parrott, W. A. (1996).Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a syntjetic *Bacillus thuringiensis* cryIAC gene. Plant Physiology, 112: 115-120.

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, Biochemical Journal, 412: 27–33.

Taheri javan N (2008) Human IFN gene transfer to canola and regeneration of the transgenic plants. M. Sc. thesis. Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University. Tehran - Iran

Thore, A., Lundin, A. and Ansehn, S. (1983). Firefly luciferase ATP assay as a screening method for Bacteriuria. Clinical Microbiology, **2:** 218-224.

Zebarjadi, A. R., Jalali, M., Salmanian, A., Karimzadeh, G., Moieni, A., Jafari, A., Mousavi, A. (2005). RNA Antisense Technique Use for Genetic Manipolation in Fatty Acid Profile of *Brassica napus*. fourth National Biotechnology Congress of Iran

Zebarjadi, A. R., Jalali, M., Salmanian, A., Karimzadeh, G., Moieni, A., Jafari, A., Mousavi, A. (2006). Isolation and development of fae gene antisense structure and transfer to canola *(Brassica napus).* IRANIAN JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES Vol1, Number2