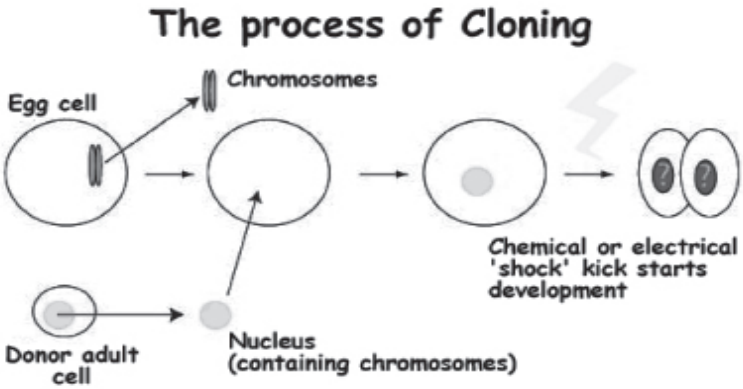
شاهین اسعدی- (دانشجوی ژنتیک مولکولی)
علیرضا میرزائی- صدیق (دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک)
شادی مسیب پور- (دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)
الهام علیزاده میلانی- نگین باقرپور- دریا طراوتی- وحید قربانی دانشجویان ژنتیک

کوچک ترین مهندس ژنتیک در جهان

مهندسی ژنتیک را می توان انتقال DNA میان میزبان ها یا گونه ها از راه دستکاری های آنزیمی در آزمایشگاه تعریف کرد. در این جابجایی DNA فرستاده شده در میزبان تازه، تکثیر خواهد شد. از آنجایی که بیشترتکه های DNA در E.coli یا هر سلول میزبان دیگر توانایی خود همانندسازی را ندارد باید تکه DNA دیگری که توانایی همانندسازی مستقل دارد ، به تکه ی دلخواه پیوند شود تا کلون شود. این تکه دارای توانایی همانندسازی مستقل , حامل کلون کردن مولکولی است و بنا به تعریف نقش مرکزی را در فن آوری DNA نوترکیب بازی می کند.



بیشتر حامل های کلون کردن در آغاز از عنصر های برون کروموزومی که به گونه ی طبیعی وجود ندارد، مانند پلاسمیدها و باکتریوفاژها، برخاسته است. استنلی کهن و همکارانش نخستین بار استفاده از پلاسمیدهای باکتریایی به عنوان حاملهای کلون کردن مولکولی را گزارش نمودند. از زمان این گزارش تاکنون هزاران حامل کلون سازی به وجود آمده اند، و به نظر می رسد تغییر آنها از نظر جایگاه های همانندسازی ، دامنه میزبانی و فعالیت به مهارت و ابتکار سازنده آنها بستگی دارد.

امروزه حامل های اختصاصی وجود دارند که به پژوهشگران این توانایی ها را می دهند :

۱.شناسایی و استخراج توالی های تنظیمی DNA مثل راه اندازها و پایان دهنده ها.

۲.شناسایی چارچوب های خواندن ترجمه ای بازهای نوکلئوتیدی.

۳. ساخت اندازه ی فراوان RNA ها و پروتئین های سودمند.

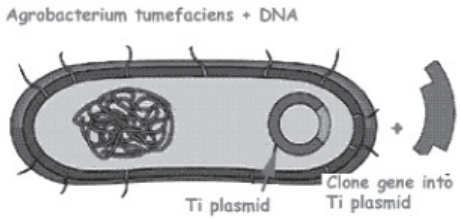
۴. شناخت ترتیب نوکلئوتیدی ژن ها و تکه های DNA.

ویژگی های مشترک همه ی حامل ها به شرح زیر است :

۱.حامل باید توانایی همانندسازی در سلول میزبان را داشته باشد. بنابراین حامل باید یک مبداء همانندسازی داشته باشد. مبداء همانندسازی یک توالی است که بوسیله دستگاه همانندسازی سلول میزبان شناسایی می شود و بنابراین می تواند در سلول میزبان تکثیر یابد.

۲.حامل باید دارای یک نشانگر انتخابی برای شناسایی و استخراج از زیرجمعیت باکتری دارای حامل باشد. در کار، کارایی انتقال خیلی کم است و سلول های ویژه یا کمیابی از جمعیت، DNA خارجی را پذیرفته و نگه می دارند. نشانگر در درون حامل، در شناسایی کلونی باکتریایی تغییر شکل یافته (تراریخت) کمک می کند.

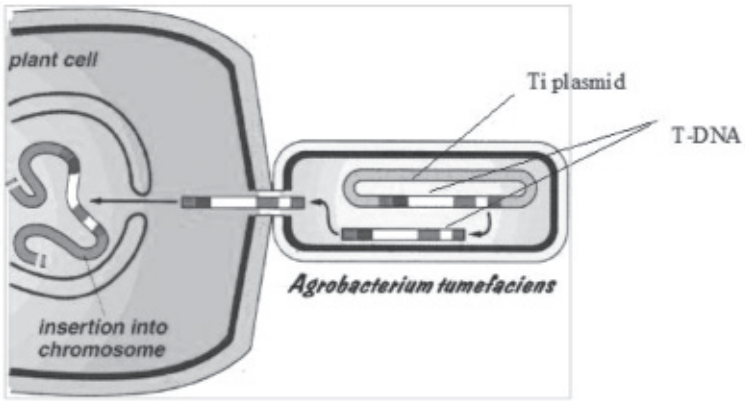
۳.بیشتر حامل هایی که به گونه روزمره به کار می روند، شامل یک توالی DNA کوتاه با تعداد زیادی جایگاه های برش بوسیله آنزیم های ویژه د که به عنوان جایگاه های



کلـــون کـــردن چندگانـــه (MCS) یا رابط های چندتایی شناخته شده است. MCS ها را می توان به صورت شیمیایی در یک حامل ساخت. آنها در فرآیند به درون بردن ژن خارجی بسیار سودمند اســـت. هردو جایگاه موجود در MCS می تواننـــد به طور همزمـــان به کمک دامنه ای از انزیم هـــای ویژه برش زده شـــوند بدون اینکه توالـــی های حامل گسسته شوند.

در ایـــن نوشـــته، بـــه بررســـی کوچک تریـــن مهندس ژنتیک در جهان خواهیم پرداخت. ایـــن مهندس ژنتیک کوچک از جنس باکتری بوده و یکی از مهم ترین حامل های سلول های گیاهی است.

نام این باکتری Agrobacterium tumefaciens یکـــی از مهـــم ترین ابزارهای مهندســـی ژنتیـــک در گیاهان اســـت. این باکتـــری تنها عامـــل ایجاد بیمـــاری کـــرون گال (تـــاج پینه) در گیاهـــان دولپه ای اســـت و در گیاهان تک لپـــه ای این توانایـــی را ندارد. نام کرون گال به گال ها یا تومورهایی گفته مـــی شـــود کـــه بیشـــتر در کـــرون



(پیوند میان ســـاقه و ریشه) گیاهان آلوده تشکیل می شوند. از آنجایی که کرون گیاهان بیشتر در سطح جای دارد، گمان برآمدن زخمی در گیاه، برای نمونه در هنگام سایش خاک در یک وزش باد سخت و آلوده شدن با باکتری های خاک مانند آگروباکتریوم تومفاسینس، زیاد است.

روشـــی که باکتری در ایجـــاد بیماری دارد جالـــب و مورد توجه مهندســـین ژنتیک است، چراکه مراحلی که باکتری در فرایند بیمارسازی گیاه دنبال می‌کند همانند مراحل کلون کردن ژن در مهندســـی ژن است. به راستی ارگوباکتری همانند یک مهندس ژنتیک کار می‌کندو سلول را برپایه ی نیازهای خود مهندسی می‌کند.

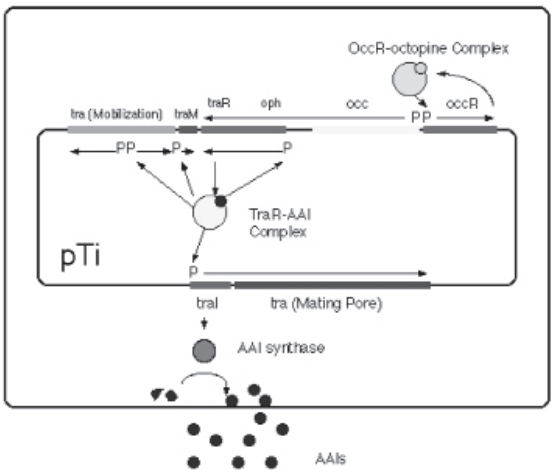
توانایی باکتری در ایجاد بیماری گال درارتباط با وجود پلاســـمیدی است به نام القا کننده‌ی تومور یا Ti. این پلاسمید حامل ژن‌هایی است که در چرخه‌ی بیماری نقش دارند. زمانی که گیاه با آرگوباکتریوم آلوده شد، باکتری پلاســـمید T i را وارد سلول می‌کند. این کار باکتری برابر است با وارد کردن وکتور به سلول میزبان، که سخت‌ترین مرحله برای معرفی ژن جدید به سلول در طی فرایندهای مهندسی ژن است.

Ti بعد از رفتن به هســـته ســـلول میزبان، به کمـــک تکه‌ای به نام TDNA بـــه DNA کروموزوم ســـلول گیاهی پیوســـته ودر آن ماندگار می‌شـــود. TDNA دارای حدود ۸ ژن اســـت که ایـــن ژن‌ها همراه ژنوم ســـلول میزبان همانندسازی می‌شوند و با توانایی های سلول میزبان بیان می‌شوند.

پروتیین برآمده ازآنها در ســـنتز ماده‌ای به نـــام opin که مورد نیاز باکتری است، نقش دارند، و ژن‌های روی TDNA هستند که سلول را به سوی سرطانی شدن رهنمود می‌کنند. چالش پیوستن ژن به ژنوم که نیاز به آزمایش و تلاش دراز مدت مهندسین ژنتیک است، برای این باکتری به آسانی با داشتن TDNA در پلاسمید Ti حل شده است.

ســـلول های آلوده در محل آلودگی تکثیر می شـــوند، و یک گال یا تومور ســـاخته می شود. سلولهای تراریخت می توانند در محیط کشت بی آگزین و سیتوکینین با منشاء خارجی رشد کنند. سرانجام سلول های

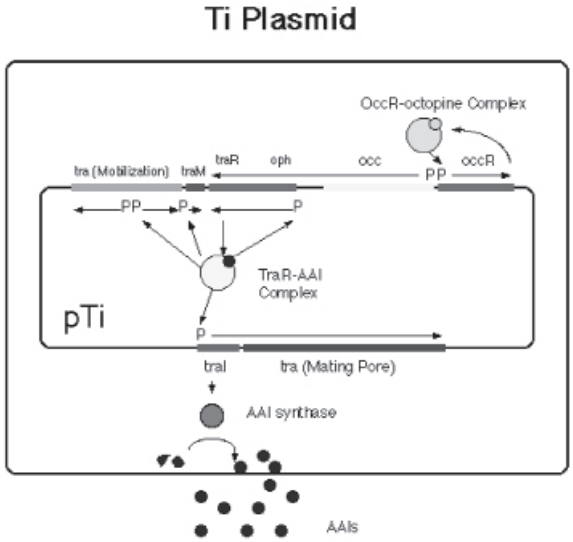
Ti Plasmid



تراریخت اوپاین ها مانند اکتوپاین و نوپالاین را می سازند. اکتوپاین از آرژنین و آلانین ساخته میشود و نوپالاین از آرژنین و گلوتامین سنتز می شوند.

TDNA (DNA انتقال یافته)

در فرآیند تراریختی، T-DNA از پلاسمید Ti جدا شده به یک سلول گیاهی انتقال یافته و سرانجام به DNA سلول گیاهی می پیوند. پیوستن T-DNA در جایگاه های تصادفی از کروموزوم انجام می شود. همچنین در برخی از نمونه ها چندین T-DNA به DNA یک سلول می پیوندد. در Ti پلاسمید گونه نوپالاین, T-DNA یک تکه با ۲۳۰۰۰جفت نوکلئوتید است که ۱۳ ژن شناخته شده را در بر دارد. در Ti پلاسمید نوع اکتوپاین, دو تکه T-DNA جدا ازهم وجود دارد. برخی از ژن های تکه T-DNA وابسته به Ti پلاسمید آنزیم هایی را رمز می کنند، که ساخت فیتوهورمون ها (IAA- آگزین و سیتوکینین ایزوپنتنیل آدنوزین) را شتاب می ورزد. این فیتوهورمون ها مسوول رشد توموری سلول ها در کرون گال ها هستند. در کناره های بخش T-DNA ، تکرارهای ناقص ۲۵ نوکلئوتیدی جای دارند, که این تکرارها باید به گونه ی سیس باشند،تا برش و جابجایی T-DNA انجام شود. ستردن هریک از این توالیهای مجاور بطور کامل از انتقال T-DNA به سلول های گیاهی جلوگیری می کند.



حامل های مورد استفاده در آگروباکتریوم تومی فاسینس

بیشتر از یک حامل دوکاره استفاده می شود که بتواند در E.coli همانندسازی کند . دستکاریهای نوترکیبی را می توان به آسانی در آنجا انجام دهد و آنگاه به آگروباکتریوم تومی فاسینس که آماده انتقال به گیاهان است منتقل کرد. دوروش اساسی برای نگهداری حامل های دوکاره در آگروباکتریوم وجود دارد :

۱.بوسیله الحاق به پلاسمید Ti به کمک نوترکیبی در یک ناحیه همسانی (هومولوژی) DNA.

۲.به وسیله همانندسازی خودکار ترانس نسبت به پلاسمید Ti.

کاستی ها

هرگونه کاستی در دامنه ی میزبان، فرآیند انتقال ژن بر مبنای آگروباکتریوم تومی فاسینس، را ناکام می کند. این کاستی ها به ویژه زمانی که هدف انتقال ژن به غلات و یا دیگر گرامینه های تک لپه ای است نگران کننده است.

سیستم های انتقال مصنوعی

برای فرار از کاستی های دامنه میزبان می توان از انتقال مستقیم ژن ها به سلول های گیاهی بدون استفاده از هر نوع حامل زیستی استفاده نمود. دیواره سلولی مانعی موثر در برابر عبور مولکول های DNA تشکیل می دهد و پروتوپلاست ها (سلول های گیاهی برهنه) سیستم های آزمایشی مطلوب برای بررسی انتقال ژن بدون استفاده از حامل ها است.

انتقال ژن با استفاده از بمباران ذره

پایه ی بنیادین بمباران ذره برای انتقال ژن، بکار گیری ریزپرتابه ها با شتاب بالا برای فرو بردن ژنهای دلخواه به درون سلول است. در لایه های سلولی خارجی منافذی ایجاد می شود تا مواد وراثتی وارد سلول های زنده شود. ریزپرتابه ها بیشتر ذرات طلا یا تنگستن هستند که با DNA پوشیده شده اند و با شتاب بسیاری پرتاب می شوند (۱۴۰۰ فوت بر ثانیه). این ریزپرتابه ها بیشتر ۳-۱میکرومتر

قطـــر دارنـــد و بوســـیله یک درشـــت پرتابـــه یا گلوله حمل شـــده و به درون سلول های هدف زنده شلیک می شوند. این روش نـــام هـــای گوناگونی دارد همانند: روش شـــتاب دادن ذره- روش بیولســـتر- بمبـــاران ریزپرتابه- روش تفنگ ذره- روش تفنگ ژنی.

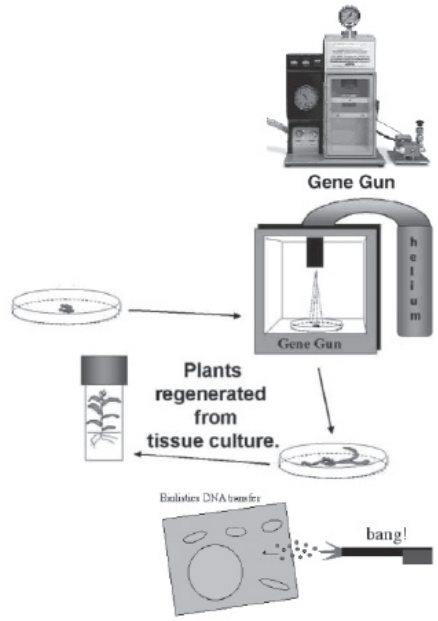
از انجایـــی کـــه DNA بـــه درون سلول ها شلیک می شود، در حقیقت از نوعی موشک زیســـتی استفاده می شود و بـــه همین دلیل اصطلاح بیولســـتیک (موشک زیستی) بکار می رود.

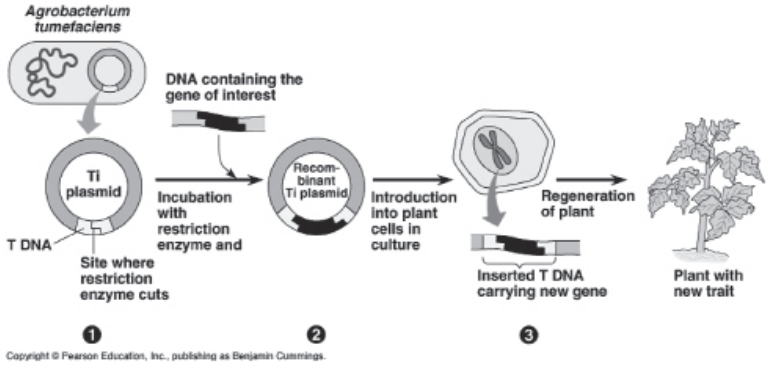
اهـــداف انتقـــال ژن از راه ریزپرتابه ها عبارتند از :

۱.تلقیـــح موثر اســـیدهای نوکلئیک بیماریزا.

۲.بررســـی تنظیـــم ژن بـــر مبنای بیـــان موقـــت DNA معرفی شـــده به سلول های هدف.

۳.تجزیـــه و تحلیل دودمان ســـلول با اســـتفاده از تراریختهای کیمریک که ژن های نشـــانگر قابل رویـــت را بروز





می دهند.

۴.تراریختی قابل تکثیر اندامک های سلولی.

۵.تکثیر موجودات زنده که مهندسی ژنتیک شده و ژنهای مفید را بروز می دهند و سپس انتخاب ســـلول های هدفی که بطور دائمی تراریخت شده اند.

افزون براین بیشتر سیستم ها به تجهیزات پیشرفته و گران قیمت نیاز دارند. همچنین با استفاده ی همزمان آنها، نمی توان هم برآوردهای کمی دقیق از بیان ژنی انجام داد و هم گیاهان مهندسی ژنتیک شده را باکارایی بالا ســـاخت. اما در شمار کمی از روش های بالا انتقال ژن موفقیت آمیز گزارش شده است و پژوهش های بیشتر در این زمینه در حال گسترش است.

منابع

[1].Genetic engineering and Its applications:Joshi, Preeti text book 2003.

[2]..Bayer,R.Homosexuality and American Psychiatry. Princeton uni,U.S.A

[3]..Williams,J.G.and Patient,R.K.(1989)Geneti Engineering.IRL Press,oxford.

[4]..Lennon,G.and Lehrach,H.(1991)Trends Genet,7,314.

[5]..Frischauf,A.M.Lhrach,ii,poutska,A. and Murray,N.(1983)J.Mol.biol.170.827.

[6].. Praitis, Vida (2006). "Creation of Transgenic Lines Using Microparticle Bombardment Methods". C. elegans 351. pp. 93–108. doi:10.1385/1-59745-151-7:93. ISBN 1-59745-151-7.

[7].. Gan, Wen-Biao; Grutzendler, Jaime; Wong, Wai Thong; Wong, Rachel O.L; Lichtman, Jeff W (2000). "Multicolor "DiOlistic" Labeling of the Nervous System Using Lipophilic Dye Combinations". Neuron 27 (2): 219–25.