

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



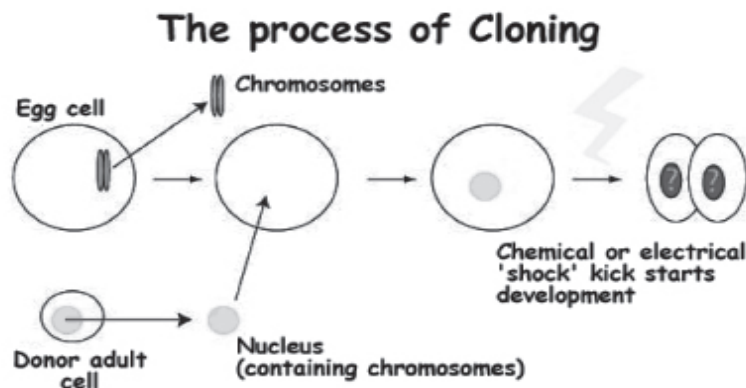
ویژگی های مشترک همه ی حامل ها به شرح زیر است :

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 از انتخابی برای شناسایی و استخراج از زیرجمعیت باکتری دارای حامل باشد. در کار، کارایی انتقال خیلی کم است و سلول های ویژه یا کمپایی 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

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 بیشتر تکه 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 نو ترکیب بازی می کند.

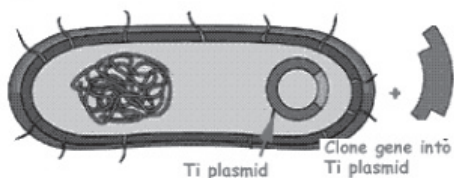


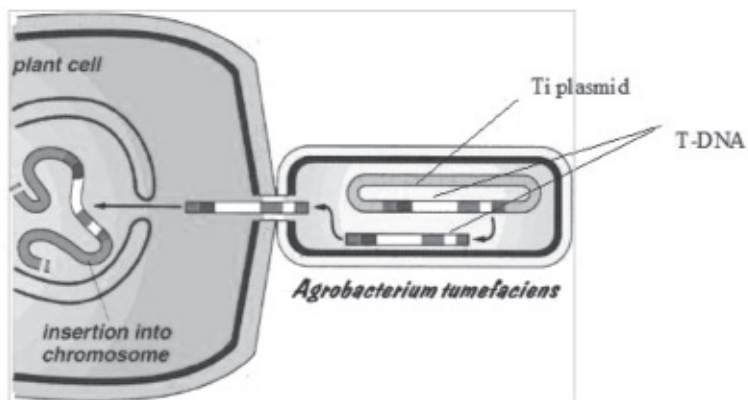
بیشتر حامل های کلون کردن در آغاز از عنصر های برون کروموزومی که به گونه ی طبیعی وجود ندارد، مانند پلاسمیدها و باکتریوفازها، برخاسته است. استتلی کهن و همکارانش نخستین بار استفاده از پلاسمیدهای باکتریایی به عنوان حامل های کلون کردن مولکولی را گزارش نمودند. از زمان این گزارش تاکنون هزاران حامل کلون سازی 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.

Agrobacterium tumefaciens + DNA





(پیوند میان ساقه 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.

روشی که باکتری در ایجاد بیماری دارد جالب و مورد توجه مهندسی ژنتیک است، چراکه مراحل که باکتری در فرایند بیمار سازی گیاه دنبال می کند همانند مراحل کلون کردن ژن در مهندسی ژن است. به راستی ارگوباکتری همانند یک مهندس ژنتیک کار می کند و سلول را برپایه ی نیازهای خود مهندسی می کند.

توانایی باکتری در ایجاد بیماری گال در ارتباط با وجود پلاسמידی است به نام القا کننده ی تومور یا **Ti**. این پلاسמיד حامل ژنهایی است که در چرخه ی بیماری نقش دارند. زمانی که گیاه با آگروباکتریوم آلوده شد، باکتری پلاسמיד **Ti** را وارد سلول می کند. این کار باکتری برابر است با وارد کردن وکتور به سلول میزبان، که سخت ترین مرحله برای معرفی ژن جدید به سلول در طی فرایندهای مهندسی ژن است.

Ti بعد از رفتن به هسته سلول میزبان، به کمک تکه ای به نام **TDNA** به **DNA** کروموزوم سلول گیاهی پیوسته و در آن ماندگار می شود. **TDNA** دارای حدود ۸ ژن است که این ژن ها همراه ژنوم سلول میزبان همانند سازی می شوند و با توانایی های سلول میزبان بیان می شوند.

پروتیین برآمده از آنها در سنتز ماده ای به نام **opin** که مورد نیاز باکتری است، نقش دارند، و ژن های روی **TDNA** هستند که سلول را به سوی سرطانی شدن رهنمود می کنند. چالش پیوستن ژن به ژنوم که نیاز به آزمایش و تلاش دراز مدت مهندسی ژنتیک است، برای این باکتری به آسانی با داشتن **TDNA** در پلاسמיד **Ti** حل شده است.

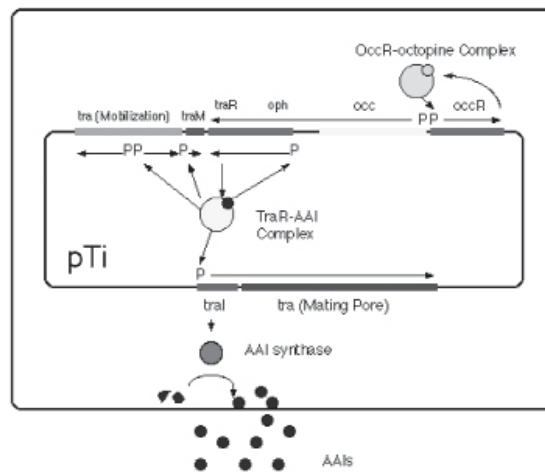
سلول های آلوده در محل آلودگی تکثیر می شوند، و یک گال یا تومور ساخته می شود. سلولهای تراریخت می توانند در محیط کشت بی آگزین و سیتوکینین با منشاء خارجی رشد کنند. سرانجام سلول های

کلون کردن چندگانه (**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 است. هر دو جایگاه موجود در **MCS** می توانند به طور همزمان به کمک دامنه ای از انزیم های ویژه برش زده شوند بدون اینکه توالی های حامل گسسته شوند.

در این نوشته، به بررسی کوچک ترین مهندس ژنتیک در جهان خواهیم پرداخت. این مهندس ژنتیک کوچک از جنس باکتری بوده و یکی از مهم ترین حامل های سلول های گیاهی است.

نام این باکتری **Agrobacterium tumefaciens** یکی از مهم ترین ابزارهای مهندسی ژنتیک در گیاهان است. این باکتری تنها عامل ایجاد بیماری کرون گال (تاج پینه) در گیاهان دولپه ای است و در گیاهان تک لپه ای این توانایی را ندارد. نام کرون گال به گال ها یا تومورهایی گفته می شود که بیشتر در کرون

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.

دوکاره در آگروباکتریوم وجود دارد :
۱. بوسیله الحاق به پلاسمید Ti به کمک نو ترکیبی در یک ناحیه همسانی (هومولوژی) DNA.

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

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 پیوندد. 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 ۲۳۰۰۰ جفت نوکلئوتید است که ۱۳ ژن شناخته شده را در بر دارد. در Ti پلاسمید نوع اکتوپاین، دو تکه T-DNA جدا از هم وجود دارد. برخی از ژن های تکه T-DNA وابسته به Ti پلاسمید آنزیم هایی را رمز می کنند، که ساخت فیتوهورمون ها (IAA- آگزن 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.

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 گرمینه های تک لپه ای است نگران کننده است.

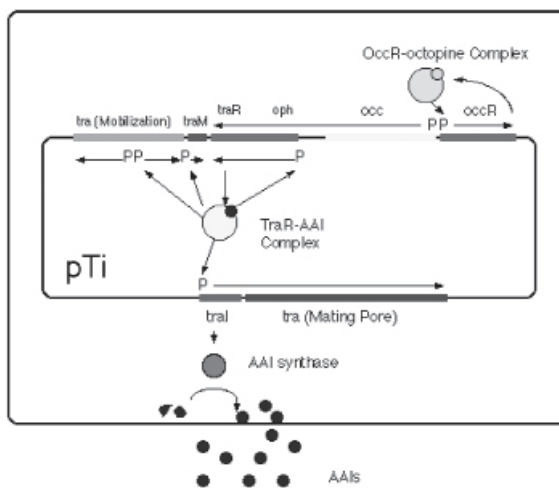
سیستم های انتقال مصنوعی

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

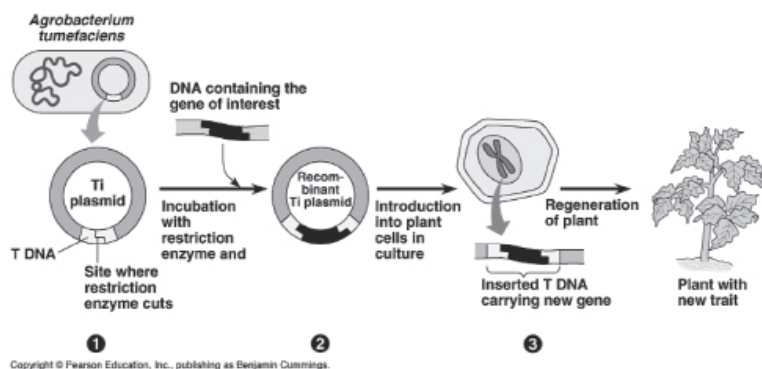
پایه ی بنیادین بمباران ذره برای انتقال ژن، بکار گیری ریزپرتابه ها با شتاب بالا برای فرو بردن ژنهای دلخواه به درون سلول است. در لایه های سلولی خارجی منافذی ایجاد می شود تا مواد وراثتی وارد سلول های زنده شود. ریزپرتابه ها بیشتر ذرات طلا یا تنگستن هستند که با DNA پوشیده شده اند و با شتاب بسیاری پرتاب می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

Ti Plasmid



حامل های مورد استفاده در آگروباکتریوم تومی فاسینس

بیشتر از یک حامل دوکاره استفاده می شود که بتواند در E.coli همانندسازی کند. دستکاریهای نو ترکیبی 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



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 سلول های هدفی که بطور دائمی تراریخت شده اند.

افزون بر این 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 با کارایی بالا ساخت. 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.

قطر دارند و بوسیله یک درشت پرتابه یا گلوله حمل شده و به درون سلول های هدف زنده شلیک می شوند. این روش نام های گوناگونی دارد همانند: روش شتاب دادن ذره- روش بیولستر- بمباران ریزپرتابه- روش تفنگ ذره- روش تفنگ ژنی.

از آنجایی که DNA به درون سلول ها شلیک می شود، در حقیقت از نوعی موشک زیستی استفاده می شود و به همین دلیل اصطلاح بیولستیک (موشک زیستی) بکار می رود.

اهداف انتقال ژن از راه

ریزپرتابه ها عبارتند از :

۱. تلقیح موثر اسیدهای نوکلئیک

بیماریزا.

۲. بررسی تنظیم ژن بر مبنای

بیان موقت DNA معرفی شده به سلول های هدف.

۳. تجزیه و تحلیل دودمان سلول

با استفاده از تراریختهای کیمریک که ژن های نشانگر قابل رویت را بروز

