شبنم بهرامی- دانشجوی مقطع دکترای سلولی و مولکولی

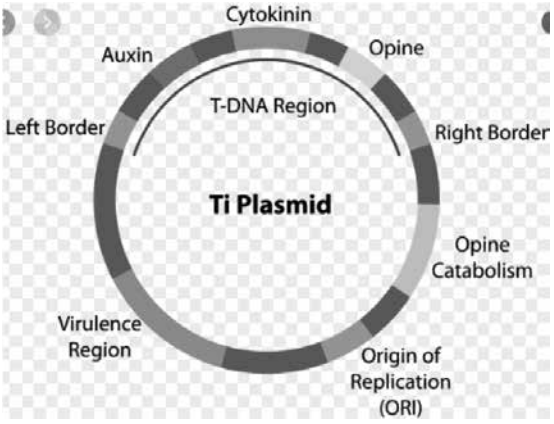
مهندسی ژنتیک و روش های انتقال ژن

غلبه بر موانع دست ورزی ژن های گیاهی با شناخت خصوصیات و بهره برداری از پلاسمید هایی که توسط دو باکتری بیماریزای گیاهی یعنی Agrobacterium tumefaciens و A.rhizogenes حمل می شود، محقق شد. این پلاسمید ها امکان انتقال طبیعی ژن، بیان ژن و سیستم های گزینش را فراهم می آورند. امروزه، A. tumefaciens به عنوان مؤثرترین مهندسی ژنتیک گیاهی در طبیعت مطرح شده است.

اساس ایجاد تومور و پلاسمید Ti

اسمیت (Smith) و تانسند (Townsend) در سال ۱۹۰۷ نشان دادند که عامل ایجاد تومور های گال طوقه، یک باکتری است. آزمایشات بران (Braun) و همکارانش نشان دادکه برای حفظ تومور، نیازی به حضور مداوم باکتری های زنده نیست(Braun and Stonier ۱۹۵۸). باکتری ها به درون سلول گیاهی که به تومور تبدیل می شوند، نفوذ نمی نمایند، بلکه به فضای بین سلولی و سلول های زخمی رخنه کرده و فقط خود را به دیواره سلول های گیاهی سالم می چسبانند. بنابراین توجه محققان به شناسایی یک عامل فرضی ایجاد تومور معطوف شد.

اولین بار زانن Zaenene و همکاران در ۱۹۷٤ اعلام کردند که نژادهای بیماریزای A. tumefaciens پلاسمیدهای بزرگی در خود جای داده اندو صفت بیماریزایی در پلاسمید وجود دارد. وقتی که پلاسمید را از باکتری حذف می نمایند، بیماریزایی نیزبه طبع از آن حذف می شود.



A. tumefaciens تومور هایی به نام گال طوقه ایجاد می نماید، در حالیکه A.rhizogenes عامل بیماری ریشه موئی است. پلاسمید های بزرگ موجود در این آگروباکتریوم ها را به ترتیب پلاسمید تومورزا (پلاسمید Ti) و پلاسمید ریشه زا (Ri پلاسمید) می نامند، که توانایی بیماریزایی را به باکتری های ناقل اعطا می کنند. هر دو بیماری فوق، از انتقال و تلفیق کاربردی بخش ویژه ای از پلاسمید Ti یا Ri به درون کروموزوم های گیاه نتیجه می شود. بعداً مشخص شد که فقط بخش کوچکی از پلاسمید Ti که T-DNA یا DNA منتقل شونده نام دارد به ژن هسته ای گیاه منتقل و در آنجا تلفیق می شود.

انتقال T-DNA

انتقال T-DNA با ورود باکتری ها به یک زخم گیاهی شروع می شود. ایجاد زخم، حداقل در ناحیه ای از گیاه، یک رویداد الزامی برای فرآیند انتقال است و ممکن است تا حدی برای ساخته شدن ترکیبات خاصی توسط گیاه که بیان ژن های را تحریک می نمایند مورد نیاز باشد. دو تا از فعال ترین مواد شناسایی شده، استوسیرینگون(Acetosyringone) و بتاهیدروکسی استوسیرینگون(β-hydroxy-Acetosyringone)است.

انتقال T-DNA شباهت زیادی به وقایع دخیل در همیوغی باکتریایی دارد که در طی آن کروموزوم E.coli به صورت تک رشته ای از یک سلول باکتری به سلول دیگر منتقل می شود. یک تفاوت این است که انتقال T-DNA معمولاً توسط توالی تکرار شونده مرزی سمت چپ محدود می شود، در حالیکه که انتقال DNA باکتریایی نامحدود است. هنوز نحوه تلفیق DNA انتقال یافته به درون ژنوم گیاه چندان روشن نیست.

ناقل های مبتنی بر آگروباکتریوم

سیستم پلاسمید Ti آگروباکتریوم، از عناصر مکانیزم تراریختی آگروباکتریوم بهره می گیرد، اما به دلیل ویژگی های زیر نمی توان از پلاسمید Ti به طور مستقیم استفاده کرد:

(۱) اندازه بزرگ (۲) خاصیت تومورزایی (۳) فقدان مکان های برشی منحصر بفرد برای آنزیم های برشی. پلاسمید های آگروباکتریوم را با حذف توالی T-DNA طبیعی که مواد سرطان زا را کد می نماید و جایگزین کردن ژن های خارجی مورد نظر به جای آن خلع سلاح می نمایند. علاوه بر این، مکان های برشی ویژه آنزیم های برشی نیز به پلاسمید ها اضافه می گردد.

تکنیک های تراریختی با استفاده از آگروباکتریوم

امروزه برای تولید گیاهان تراریخت، از تکنیک تراریختی گیاهی با استفاده از آگروباکتریوم استفاده گسترده ای می شود. مهمترین لازمه ها برای انتقال ژن با استفاده از آگروباکتریوم به گیاهان عالی عبارتند از:

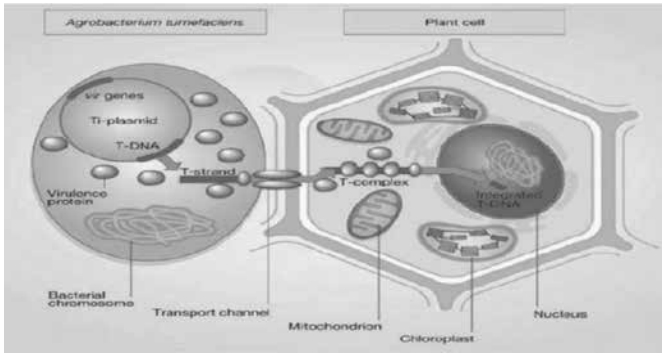
۱-تولید استوسیرینگون یا دیگر ترکیبات مرتبط با آن توسط ریز نمونه گیاهی برای فعال شدن ژن های vir نیاز است. یا بایستی آگروباکتریوم از قبل توسط استوسیرینگون مصنوعی تحریک شده باشد. آگروباکتریوم های تحریک شده بایستی به سلول های گیاهی مستعد برای ترانسفورماسیون دسترسی داشته باشند.

۲-سلول ها و بافت های مستعد برای ترانسفورماسیون بایستی از توانایی باززایی گیاهان کامل برخوردار باشند.

۳-ریز نمونه ای که برای تلقیح یا کشت توأم با آگروباکتریوم ناقل ناقلین دوتایی یا تلفیقی مورد نظر مورد استفاده قرار می گیرد می تواند سلول پرتوپلاست،کالوس، قطعاتی از بافت یا اندام های کامل باشد.

سه روش عمومی برای تلقیح آگروباکتریوم

۱-آلوده سازی گیاهان زخمی: تلقیح این ویووی گیاهچه ها و یا گیاهان کاملی که در این ویترو و تحت شرایط استریل تکثیر یافته اند، روشی سنتی بدیت آوردن سلول ها تراریخت با آگروباکتریوم است. گیاهچه ها را سربرداری کرده و سطح زخمی را که بتازگی بریده شده است با یک کشت شبانه از آگروباکتریوم تلقیح می کنند. تومور حاصل قطع می شود و به صورت یک بافت کالوس رشد داده می شود. کالوس های تراریخت جدا شده و باززایی می شوند.



۲- کشت توأم : پرتوپلاست ها جداسازی شده و در مرحله تشکیل مجدد دیواره سلولی به مدت ۲٤ تا ٤۰ ساعت در سوسپانسیونی ازآگروباکتریوم به غلظت ۱۰۰ باکتری به ازای هر پرتوپلاست کشت داده می شوند. چند روز پس از کشت توأم و قرار گرفتن در برابر عامل گزینش، ترانسفورماسیون رخ می دهد.

۳- روش دیسک برگی: در این عمل، این روش برای هر بافت ریز نمونه ای که منبع خوبی برای شروع نمو و تمایز گیاه کامل است، قابل اجرا است. بدین منظور کوتیلدون هایی که به تازگی خارج شده اند، مواد بسیار سودمندی است. در روش دیسکی یا ریز نمونه ای، قطعه ای از بافت را قطع کرده و آن را به مدت چند ساعت تا سه روزدر سوسپانسیونی از آگروباکتریوم فرو برده و سپس بر روی یک محیط کشت مناسب برای رشد باکتری کشت می دهند. سپس ریز نمونه های بافتی را به یک محیط کشت محتوی یک عامل متوقف کننده باکتری، که باکتری ها را حذف می کند، انتقال می دهند. پس از این مرحله، ریز نمونه ها به محیط کشتی که برای گزینش سلول های گیاهی تراریخت طراحی شده و از آنتی بیوتیک های مناسب برخوردار است، منتقل می شود. روش دیسکی از نظر تکنیکی ساده بوده و خیلی سریع، گیاهان تراریخت تولید می کند. بدین جهت در حال حاضر استفاده از این روش ترجیح داده می شود.

مزیت ها

ترانسفورماسیون یا میانجیگری آگروباکتریوم از مزیت های زیر برخوردار است:

۱- این روش یک ابزار طبیعی برای انتقال ژن ها است و در بین کسانی که روش های طبیعی را ترجیح می دهند از مقبولیت بیشتری برخوردار است.

۲- آگروباکتریوم از توانایی آلوده سازی سلول ها، بافت ها و اندام های گیاهی سالم بر خوردار است. بر این اساس مشکلات ناشی از محدودیت های کشت بافت، در این روش کمتر بوده و باززایی گیاهان تراریخت با سرعت بیشتری صورت می گیرد.

۳-آگروباکتریوم قادر است که قطعات بزرگ DNA را با کارایی زیاد و بدون بازترتیبی های قابل توجه به گیاه انتقال دهد.

٤-تلفیق T-DNA یک فرآیند نسبتاً دقیق است.

۵-پایداری ژن منتقل شده عالی است.

معایب

اگر چه امروزه انتقال صفات جدید به گیاهان از طریق سیستم آگروباکتریوم یک روش متداول است، اما این سیستم هنوز با

نارسائی هایی مواجه است.
۱- دارای محدویت در دامنه میزبانی است و تعدادی از گیاهان زراعی بسیار مهم با آگروباکتریوم آلوده نمی شود. اگر چه اخیراً با ایجاد نژاد های شدیدا بیماریزای آگروباکتریوم، پیشرفت های زیادی برای فایق آمدن بر این محدودیت صورت گرفته است.

۲- در بعضی از موارد، تراریخت نمودن سلول ها در بافت هایی که از توانایی باززایی برخوردارند، مشکل است. ممکن است سلول های جنین زا در مناطق درونی باشد و در دسترس آگروباکتریوم قرار نداشته و یا اینکه هدف انتقال T-DNA قرار نگیرد.

کولیموویروس ها(Caulimoviruses)

در بین انواع ویروس های گیاهی، از یک ویروس گروه کولیموویروس، یعنی ویروس موزائیک گل کلم (Cauliflower mosaic virus)(CaMV)به عنوان محتمل ترین ناقل بالقوه برای انتقال ژن های خارجی به گیاهان یاد می شود. دلیل عمده این نظر، این است که کولیموویروس ها به علت دارا بودن ژنومی با ساختار DNA دو رشته ای که به راحتی قابل دست ورزی است، در بین ویروس های گیاهی بی نظیرند. آنها اولین ویروس های گیاهی بودند که با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب مورد دستورزی قرار گرفتند. گروه کولیموویروس ها از ٦-١٩ویروس تشکیل شده است که هر یک از دامنه ی میزبانی محدودی برخوردار است. معروف ترین این ویروس ها عبارتند از: ویروس خراشی میخک(Carnations etehed virus)، ویروس موزائیک گل کلم، ویروس موزائیک کوکب (Dahlia mosaic virus)، ویروس موزائیک لاله عباسی، ویروس رگبرگ نواری توت فرنگی CaMV که مشهورترین عضو این گروه است، تعداد زیادی از گیاهان تیره شب بو و همچنینDatura stramonium را آلوده می نماید. این ویروس در طبیعت توسط شته ها منتقل می شود، اما به روش مکانیکی نیز به راحتی می توان آن را انتقال داد. مشخص شده است که هر گاه DNAی ویروسی یا DNA کلون شده CaMV به تنهایی بر سطح برگ های حساس مالیده شود از قابلیت بیماری زایی برخوردار است.

بمباران ذره ای (Particle bombardment) یا بیولیستیک (Biolistic)

تکنیک بمباران ذره ای که بیولیستیک، بمباران ریزپرتابه ای (bombardment Microprojectile) و شتاب ذره ای (Particle acceleration) نیز نامیده می شود، خود را به عنوان انعطاف پذیر ترین و مؤثر ترین راه برای ایجاد انواع مختلفی از موجودات تراریخت شامل میکروارگانیسم ها، سلول های حیوانی و گونه های گیاهی مطرح ساخته است. این روش که در آن ریزپرتابه های پر شتاب برای فرستادن اسید های نوکلئیک به درون سلول های زنده استفاده می شود، توسط کلین و همکاران و سانفورد و همکاران توصیف شد.

سیستم اصلی که توجه زیادی را به خود جلب کرده است از PDS-۱۰۰۰ وسیله تفنگی هدایت کننده ذرات یا PDS-۱۰۰۰/He) تفنگ هلیومی هدایت کننده ذرات) استفاده می کند. ذرات طلا یا تنگستن ناقل(DNA به قطر ۳-۱ میکرومتر) معروف به ریز پرتابه ها که توسط یک درشت پرتابه (Macro projectile) یا درشت ناقل (Macro carrier) حمل می شود، به سمت سلول های گیاهی زنده پرتاب می شود. ذرات حامل DNA(ریز پرتابه ها) بر سطح جلویی درشت حامل قرار داده می شود و پس از برخورد درشت حامل به یک صفحه یا غربال متوقف کننده، از آن رها می شود.

صفحه مانع، به نحوی طراحی شده است که حرکت پیش رونده درشت پرتابه را متوقف می نماید، اما به ریز پرتابه ها اجازه عبور می دهد. در این روش هنگامی که گاز هلیوم از تانک آزاد می شود، یک صفحه بازدارنده از ورود آن به اتاقک ممانعت می کند. این دیسک ها با قدرت های متفاوتی برای مقاومت در برابر فشار گاز که از psi ۵۰۰-۷۰۰ متفاوت است، موجود است.

پس از آنکه صفحه بازدارنده گاز هلیوم را متراکم کرد، این گاز به طور ناگهانی رها می شود و یک ورقه پلاستیکی نازک را که حامل ریزپرتابه ها است به سمت یک غربال فلزی شتاب می دهد.

پس از برخورد با یک صفحه یا غربال متوقف کننده، ریز پرتابه ها از منافذ غربال عبور می نماید. سپس این ریز پرتابه ها، یک مسیر با خلاء ناقص را طی می کند تا به بافت هدف برسند. خلاء ناقص برای کاهش کشش ایرودینامیک وارده بر ریز پرتابه ها و کاهش موج تلاطم ایجاد شده در زمان برخورد درشت پرتابه به صفحه متوقف کننده مورد استفاده قرار می گیرد.

درشت تزریقی

در این روش مقداری محلول DNA(۱۰-۵میکرولیتر) با استفاده از میکروپیپت به داخل ساقه های هوایی (پنجه ها) تزریق می شود.

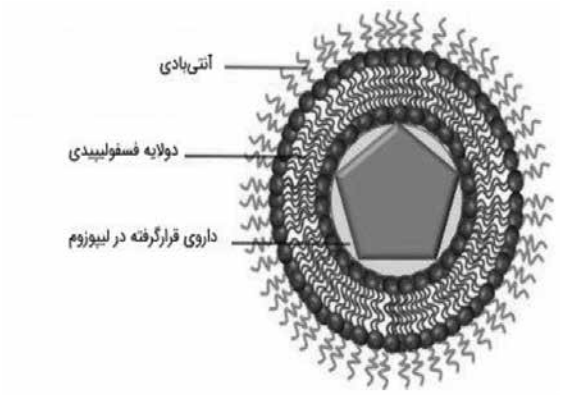
ریز تزریقی

در روش ریز تزریقی، DNA به طور مستقیم و به صورت مکانیکی و از طریق کنترل میکروسکوپی به درون یک هدف مشخص فرستاده می شود. هدف می تواند یک سلول معین در درون یک ساختار چند سلولی نظیر جنین، تخمک، مریستم، و یا در درون توده ای از پرتوپلاست ها یا سلول ها و یا یک جزء معین از یک سلول باشد. ریز تزریقی به عنوان یک روش فیزیکی مستقیم قادر به نفوذ از دیواره سلولی سالم است.

ترانسفورماسیون با استفاده از لیپوزوم

لیپوزوم ها، حباب های لیپیدی مصنوعی است که توسط غشا های مصنوعی فسفو لیپیدی احاطه شده و در کشت بافت های حیوانی برای فرستادن داروها، پروتئین ها و نظایر آن به درون سلول مورد استفاده قرار می گیرد. لیپوزوم ها را می توان با استفاده از PEG برای تلفیق در پرتوپلاست ها تحریک و از آنها برای انتقال ژن ها استفاده کرد. در این روش DNA در نتیجه آندوسیتوز شدن لیپوزوم ها به درون پرتوپلاست وارد می شود؛

مراحل کار عبارتند از :



۱-چسبیدن لیپوزوم ها به سطح پروتوپلاست

۲-تلفیق لیپوزوم ها در مکان اتصال

۳-رهاسازی پلاسمید ها در درون سلول

ترانسفورماسیون با استفاده از فیبر سیلیکون کرباید:

فیبر های سیلیکون کرباید (SCF) (Silicon carbide fiber- medi- ated transformation) از متوسط اندازه ای به قطر ۰/۶ میکرومتر و طول ۸۰-۱۰ میکرومتر برخوردارند. این فیبر ها قابلیت انتقال DNA به درون سلول های گیاهی برخوردارند. در این روش مخلوطی از DNAی پلاسمیدی کد کننده یک ژن نشانگر گزینشگر، فیبر های سیلیکون کرباید و بافت ریز نمونه دریک تیوپ اپندروف ورتکس می شود. فیبر های سیلیکون کرباید از ماهیت بسیار سخت با لبه های برنده تیز برخورداند.

انتقال DNA در این سیستم، احتمالاً به دلیل نفوذ فیبرهای سیلیکون کرباید آغشته به DNA از خلال دیواره سلولی است.

ترانسفورماسیون با استفاده از اولتراسوند

از اولتراسوند برای تحریک جذب DNA خارجی توسط پروتوپلاست گیاهی و قطعات برگی توتون استفاده می شود. این روش، شامل غوطه ور کردن اکسپلانت ها (قطعات برگی یا پرتوپلاست ها) در بافر صوتی (Sonication buffer) محتوی DNAی پلاسمیدی و ارسال امواج ماوراء صوت با یک مولد پالس های ماوراء صوتی با شدت صوتی ۵/۰ w/cm۲ به مدت ۳۰ دقیقه است.

انتقال ژن از طریق دانه گرده

محققان تعدادی دانه گرده را به عنوان یک حامل برای انتقال ژن پیشنهاد کرده اند. گزارش شده است که فرستادن DNA به درون گامت ها و پس از آن، لقاح و جنین زایی زایگوتی، منجر به انتقال ژن خواهد شد.

روش های انتقال شیمیایی ژن

در این روش برای تسهیل انتقال ژن از مواد شل کننده غشاء پلاسمایی و یا مواد رسوب دهنده استفاده می شود. بافت مورد استفاده اصولاً پرتوپلاست است. پرتوپلاست ها همراه با DNA در بافر های محتوی PE، پلی ال- اورنیتین (Poly L-ornithine)، پلی وینیل الکل یا یون های دو ظرفیتی انکوبه می شود. تکنیک های ترانسفورماسیون شیمیایی برای طیف وسیعی از گیاهان کارآیی دارند. بعلاوه تصادفی بودن این روش از نظر تلفیق DNA در ژنوم، بدین معنی است که برای انتقال ژن های غیر انتخابی، بررسی کامل خصوصیات افراد تراریخت با استفاده از تکنیک ساترن بلات برای تأیید ماهیت فرآیند تلفیق ضروری است.

رسوب با فسفات کلسیم

در این روش، DNA با محلول کلرید سدیم و بافر فسفات ایزو تونیک مخلوط شده و رسوب DNA-CaPO4 تشکیل می شود. به این رسوب اجازه داده می شود تا به سلول های فعال در حال رشدبه مدت چند ساعت به تعامل بپردازد و سپس عمل شستشو و اینکوباسیون سلول ها در محیط کشت تازه انجام می شود. وارد کردن یک شوک فیزیولوژیکی باDSMO، کارایی ترانسفورماسیون را تا حد معینی افزایش می دهد. میزان موفقیت به غلظت زیاد DNA و حفظ ظاهر آن در رسوب بستگی دارد.