بیوتکنولوژی

سارا کبیرنتاج
s.nataj@takato.ir
کارشناس تحقیقات بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات کاربردی و تولید بذر، شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی

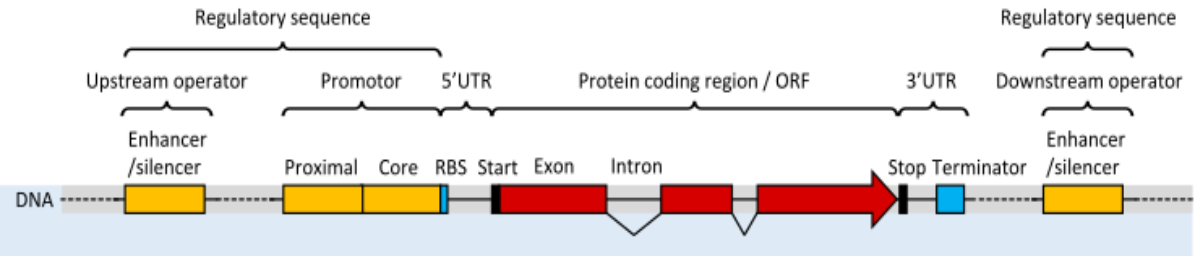
عناصر ژنتیکی و مولکولی موردنیاز جهت تولید محصول تراریخته (بخش دوم)

Genetic and molecular elements for transgenic crop development (Part 2)

در ادامه‌ی مباحث پیشین، در این شماره به سایر عناصر ژنتیکی و مولکولی مورد نیاز جهت تولید محصولات تراریخته به اختصار اشاره خواهد شد:

٤- تقویت بیان ژن بواسطه‌ی اینترون‌ها[3] و توالی‌های تقویت کننده[4]

اینترون‌ها توالی‌های غیرکدکننده‌ای هستند که در رونوشت‌های اولیه وجود دارند ولیکن قبل از ترجمه توالی کدکننده (اگزون‌ها)، ویرایش و حذف می‌شوند (شکل ۱). بااین‌حال، برخی از توالی‌های اینترون دارای عملکردهای اضافی مفید در مهندسی ژنتیک مانند تقویت رونویسی و بهبود کارایی ترجمه هستند. علاوه بر این، برخی از اینترون‌ها می‌توانند با بیان قوی و دائمی مختص به یک بافت و یا مرحله رشدی خاص یک ژن مرتبط باشند. این اینترون‌ها حاوی موتیف‌های خاصی هستند (به عنوان مثال TTNGATYTG) و باید در جهت صحیح، درون ناحیه 5'-UTR استفاده شوند. اینترون‌های *Adh1*، *Sh1*، *Bz1*، *Hsp82* و *GapA1* از گیاهان ذرت و برنج موجب بهبود رونویسی در گیاهان تک لپه و اینترون‌های *rbcS*، *ST-LS1*، *Ubq3*، *Ubq10* و *PAT1* از گیاهان سیب زمینی و آلوروپوس موجب بهبود رونویسی در گیاهان دولپه می‌شود. به عنوان مثال، اینترون *Ubi1* (با طول ۵۲۰ نوکلئوتید و جدا شده از ژن *Ubiquitin 1* ذرت) به طور گسترده‌ای برای افزایش رونویسی از پیشبرنده Ubi1 در گیاهان تک لپه تراریخته استفاده می‌شود. علاوه بر این، اینترون *Ubq10* (با طول ۶۴ نوکلئوتید، جدا شده از ژن *polyubiquitin 10* گیاه *Arabidopsis thaliana*) موجب افزایش رونویسی از پیشبرنده *Ubq10* در گیاهان تراریخته دولپه خواهد شد.



شکل ۱- ساختار ژن رمزگذار پروتئین

برخلاف اینترون‌ها، تقویت‌کننده‌ها، توالی DNA غیرکدکننده‌ای هستند که معمولاً درون توالی پیشبرنده و در بالادست خاتمه دهنده و یا در منطقه 5'-UTR و 3'-UTR یافت می‌شوند. آنها می‌توانند به چندین فاکتور رونویسی متصل شده و بیان ژن‌های واقع در بالا یا پایین‌دست را فعال کنند. علاوه بر این، تقویت کننده‌ها دارای موتیف‌های محافظت شده‌ای جهت اتصال فاکتورهای رونویسی بوده، بیان RNA را تقویت کرده و متیلاسیون DNA را کاهش می‌دهند. به‌طورکلی، توالی‌های اینترون و تقویت‌کننده پتانسیل بالایی برای استفاده در مهندسی ژنتیک دارند، ولیکن تعداد محدود مطالعات معتبر، استفاده از این توالی‌ها را در ترکیب با پروموترهای معمولی یا در محصولات خاص، محدود و نامطمئن کرده است.

[3] Intron
[4] Enhancer

۵- نشانگرهای انتخابی

چالش انتقال ژن، قرار دادن DNA موردنظر در ژنوم هسته‌ای سلول و سپس انتخاب سلول تراریخت و باززایی آن است. این انتخاب از طریق افزودن عوامل انتخابی به محیط کشت in vitro (به عنوان مثال، هیگرومایسین، کانامایسین، گلیفوسات، گلوفوسینات-آمونیوم و ایمازاپیر) و به دنبال آن چندین مرحله وا کشت و استفاده از هورمون‌ها اتفاق می‌افتد. این انتخاب معمولا پس از یک دوره هم‌کشتی در تاریکی یا نور کم آغاز می‌شود. اکثر گونه‌های گیاهی یا ژنوتیپ‌ها توصیه‌های از پیش تعیین شده‌ای برای بهترین عامل انتخابی جهت بهبود انتخاب و باززایی آنها و افزایش کارایی انتقال ژن دارند. به عنوان مثال، برای انتقال ژن به نیشکر، گلوفوسینات آمونیوم، برای پنبه و سویا ایمازاپیر و برای *Setaria viridis* و *S. Italica*، هیگرومایسین توصیه می‌شود. کارایی انتخاب را می‌توان با استفاده از پروموترهای اختصاصی هر گونه (به عنوان مثال، پروموتر CaMV 35S در دولپه‌ها، ubiquitin برنج یا ذرت و یا اکتین در تک لپه‌ها)، قرار دادن یک توالی کوزاک بهینه قبل از کدون آغاز و بهینه‌سازی کدون‌های ژن‌های نشانگر انتخابی، افزایش داد. انتخاب گیاهان تراریخته بر اساس مقاومت یک محصول ژنی (mRNA و پروتئین/آنزیم) در برابر عوامل انتخابی انجام می‌شود (به عنوان مثال ، ژن *bar* در برابر گلوفوسینات-آمونیوم، ژن *nptII* در برابر کانامایسین، ژن *hptII* در برابر هگرومایسین، *cpt-cp4 epsps* در برابر علف کش گلایفوزیت و ژن جهش‌یافته *als* یا *ahas* در برابر علف‌کش‌های ایمیدازولین و سولفونیل-اوره مقاومت ایجاد می‌کنند).

به‌صورت کلی انتخاب مثبت زمانی اتفاق می‌افتد که نشانگرهای انتخابی، بدون ایجاد آسیب یا مرگ سلول‌های غیرتراریخت، به سلول‌های تغییر یافته یک مزیت انتخابی اعطا می‌کنند، در حالی که انتخاب منفی از طریق مهار رشد و مرگ سلول‌های ترنسفرم نشده رخ می‌دهد. ژن‌های *uidA/gus* (b-glucuronidase)، *manA* (phosphomannose isomerase)، *xylA* (xylose isomerase)، ژن‌های جدا شده از میکروارگانیسم‌ها هستند که جهت انتخاب مثبت در کشت بافت گیاهی به کار می‌روند. در مقابل، ژن‌های *nptII*، *hptII* و *CmR* برخی از نمونه‌های مارکرهای انتخاب منفی هستند که در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها (به ترتیب کانامایسین، هیگرومایسین و کلرامفنیکل)، مقاومت ایجاد می‌کنند. محصول این ژن‌ها فعالیت ریبوزوم را مسدود کرده و سنتز پروتئین را مهار می‌کند. نگرانی اصلی استفاده از این مارکرهای انتخابی، وقوع انتقال افقی ژن به ارگانیسم‌های غیر هدف و سمیت بالقوه برای ارگانیسم‌هایی است که این گیاهان تراریخته را مصرف می‌کنند.

مارکرهای انتخابی مانند ژن‌های *bar* (یا *pat*) ، *ahas* (یا *als*) و *cpt-cp4 epsps* (یا *aroA*) که منجر به مقاومت به علف‌کش‌ها می‌شوند، به دلیل میزان فرار نسبتاً پایین آنها، به طور گسترده برای انتخاب گیاهان تراریخته مورد استفاده قرار می‌گیرند. در تراریخته-سازی ژنوم کلروپلاست، ژن *aadA* (استرپتومایسین ۳'- آدنیلیل ترانسفراز) که مقاومت در برابر اسپکتینومایسین و استرپتومایسین را ایجاد می‌کند، به طور گسترده‌ای برای انتخاب کلروپلاست تراریخته استفاده می‌شود. بااین‌حال، چندین استراتژی برای بازیابی گیاهان تراریخته عاری از مارکر ایجاد شده است، اگرچه اکثر آنها دارای محدودیت و بازده پایین هستند. به عنوان مثال در استراتژی انتقال همزمان[5] است که از دو وکتور (حامل) مختلف استفاده می‌کند (ژن هدف و نشانگر انتخابی روی دو وکتور جداگانه) و به دنبال آن مراحل تفکیک برای حذف گیاه تراریخت حاوی ژن نشانگر انتخابی انجام می‌شود، این روش بازده بسیار کمی دارد. علاوه بر این، از انتقال همزمان با یک وکتور حاوی دو T-DNA یا یک T-DNA با دو مرز[6] راست/چپ برای وارد شدن ژن‌های نشانگر هدف به‌صورت جداگانه در ژنوم نیز استفاده شده است.

[5] Cotransformation
[6] Border

۶- ژن‌های گزارشگر[7] برون زاد[8] و درون‌زاد[9]

پروتئین‌های گزارشگر در مهندسی ژنتیک جهت تسهیل مطالعات زیست‌شناسی مولکولی استفاده می‌شوند. در این استراتژی، ویژگی‌هایی مانند سهولت استفاده، سمیت کم برای سلول، قدرت و سیگنال زیاد، برای موفقیت مهم هستند. کاربردهای ژن‌های گزارشگر شامل غربالگری اولیه سلول‌ها یا گیاهان در حال باززایی جهت تشخیص تراریخته از غیرتراریخته، غربالگری بیان موقت، تعیین محل قرارگیری در سلول (به عنوان مثال فیوز شدن پروتئین موردنظر به پروتئین گزارشگر و تشخیص با استفاده از میکروسکوپ) و بررسی سطح بیان ژن (به عنوان مثال ارزیابی توالی پروموتر یا فیوز شدن با پروتئین موردنظر) می‌باشد. گزارشگرهای برون زادی که بیشترین کاربرد را دارند شامل GFP (یا eGFP)، بتاگلوکورونیداز (*uidA*/GUS)، لوسیفراز (LUC)، پروتئین فلورسنت زرد (YFP) و پروتئین فلورسنت قرمز (RFP، mCherry یا DsRed2) هستند در حالی که phytoene desaturase (*PDS*) ژن گزارشگر درون زادی است که بیشتر در گیاهان جهت ارزیابی روش RNAi استفاده می‌شود.

GFP تغییریافته[10] (eGFP) جداشده از چتر دریایی *Aequorea victoria* نسخه جهش‌یافته GFP است که در چند اسید آمینه متفاوت است و منجر به فلورسانس بالاتر می‌شود. به طور مشابه، ژن *uidA* آنزیم هیدرولیاز- گلوکورونیداز (GUS) را کد می‌کند که از X-Gluc به عنوان سوبسترا استفاده می‌کند. بیان ساختمانی یا موقت GUS منجر به تخریب X-Gluc ، تولید اسید گلوکورونیک بی رنگ و رسوب قابل مشاهده و به شدت آبی می‌شود.

۷- پپتیدهای سیگنال (SP) به‌منظور هدف قرار دادن پروتئین‌ها در اندامک‌های خاص

بعد از رونویسی DNA، ابتدا mRNA با استفاده از برش، پردازش می‌شود سپس به سیتوپلاسم منتقل شده و در نهایت توسط ریبوزوم‌های آزاد و یا متصل به شبکه آندوپلاسمی (ER) ترجمه می‌شود. پروتئین‌ها پس از سنتز در سیتوپلاسم، می‌توانند توسط SPها به مکان‌های مربوط به عملکردشان (برای مثال سیگنال‌های انتقال به هسته مانند NLS) منتقل شوند. در مقابل، پروتئین‌های بدون SP برای همیشه در سیتوپلاسم حفظ می‌شوند. SPها دارای توالی کوتاه (حدود ۳۶-۷ اسیدآمینه)، آبگریز و دارای باقیمانده‌های آمینواسیدی با بار مثبت در انتهای C هستند. SPها اغلب در انتهای N پروتئین قرار دارند و با توجه به اینکه پروتئین هدف به کدام اندامک فرستاده می‌شود ممکن است دو و یا تعداد بیشتری SP داشته باشد. این SP ها توسط دستگاه‌های درون سلولی شناسایی شده و پروتئین‌ها را به اندامک‌های هدف منتقل می‌کنند. اغلب پس از استقرار نهایی پروتئین هدف، SPها توسط آنزیم‌های پپتیداز، از بدنه پروتئین جدا می‌شوند، به عنوان مثال KDEL SP، در انتهای C پروتیئن قرار می‌گیرد و مانع از ترشح آن در شبکه آندوپلاسمی می‌شود، این راهکار برای هدف گذاری پروتئین‌های هترولوگ یا آنتی بادی‌ها در شبکه آندوپلاسمی گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر آن، استفاده از γ-zein با توالی غنی از پرولین $_8$(VHLPPP) در انتهای N پروتئین، موجب تجمع پروتئین در دانه می‌شود.

منبع

Basso, M. F., F. B. M. Arraes., M. Grossi-de-Sa., V. J. V. Moreira,, M. Alves-Ferreira., and M. F. Grossi-de-Sa. 2020. Insights in to genetic and molecular elements for transgenic crop development. Frontiers in Plant Science 11:1–24.

[7] Reporter
[8] Exogenous
[9] Endogenous
[10] Enhanced