مقالات و رویدادهای علمی

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

عناصر ژنتیکی و مولکولی مورد نیاز جهت تولید محصول تراریخته (بخش اول)

Genetic and molecular elements for transgenic crop development (Part 1)

روش‌های جدید و بسیار قدرتمند تعیین توالی DNA در سال های اخیر، انقلاب بزرگی در تحقیقات بیوتکنولوژی گیاهی ایجاد کرده است. تیم‌های تحقیقاتی قوی از طریق توالی‌یابی ژنوم (DNA هسته‌ای، کلروپلاستی و میتوکندریایی)، اکسون‌ها، رونوشت‌ها، miRNA ها و سایر RNA های کوچک، به کمک ابزارهای قدرتمند بیوانفورماتیک و روش‌های پیچیده زیست شناسی مولکولی، حجم بالایی از اطلاعات مفید را ایجاد کرده‌اند. اطلاعات بدست آمده به همراه عناصر متعدد مهندسی ژنتیک، امکان اکتشاف شبکه‌ها توسط ژنومیک عملکردی در گونه‌های گیاهی متعدد (گیاهان مدل و محصولات زراعی) را فراهم کرده است بطوریکه بیش بیان و خاموش‌کردن ژن‌های عملکردی با فنوتیپ یا صفات زراعی مطلوب، امکان تولید گیاهان با خصوصیات بهبود یافته را ایجاد نموده است. در حال حاضر، استراتژی‌های دیگری جهت رسیدن به صفت مطلوب مانند بیش بیان فاکتورهای رونویسی (TF[1]) (به عنوان مثال DREB و AREB برای بهبود تحمل استرس غیرطبیعی)، تنظیم دقیق miRNA، ویرایش ژنوم (با استفاده از CRISPR/Cas9 یا Cpf1) و فعال‌سازی رونویسی یا سرکوب (با استفاده از CRISPR/dCas9 یا dCpf1) نیز وجود دارد.

سازه ژنی

سازه ژنی، قطعه‌ای ساخته شده از اسید نوکلئیک است که قرار است به بافت یا سلول هدف وارد شود. سازه‌های ژنی اغلب از یک ناحیه به نام پیشبرنده[2] تشکیل شده که به دنبال آن، ژن مورد نظر واقع شده است و در انتها با یک خاتمه دهنده‌ی[3] رونویسی به پایان می‌رسد.

1- ژن هدف

ژن‌هایی که جهت انتقال استفاده می‌شوند می‌توانند از نظر منشا جداسازی به هر دو صورت سیس[4] (انتقال ژن بین گونه‌هایی که قابل تلاقی دادن هستند) و ترانس[5] (انتقال ژن بین گونه‌هایی که قابل تلاقی دادن نیستند) باشند. در مواقعی که ژن هدف در نسخه‌های متعدد[6] در ژنوم وجود دارد، با توجه به معیارهایی مانند سطح بیان، ساختار ژن و حضور دامنه‌های حفاظت شده، انتخاب صورت می‌گیرد. علاوه بر این، بهینه‌سازی کدون[7] جهت رسیدن به بیان مطلوب ژن نیز دارای اهمیت ویژه‌ایی است چرا که کدون انتخابی و درصد GC، بر میزان بیان ژن، پایداری mRNA و تجمع پروتئین تاثیر بسزایی دارد و در مقابل، مقدار بالای GC در ناحیه 5'-UTR

[1] Transcription factor
[2] Promoter
[3] Terminator
[4] Cisgene
[5] Transgene
[6] Paralogs
[7] Codon optimization

می‌تواند بارگذاری ریبوزوم را کاهش داده و ترجمه را مختل کند. در زمان انتقال ژن هدف، تنها منطقه کدکننده پروتئین (که معمولاً دنباله کدشونده یا CDS[8] نامیده می‌شود) از ژن هدف، در کاست[9] بیانی وارد می‌شود. از آنجا که معمولا ژن کدکننده پروتئین شامل چندین انترون و اگزون است، کلون کردن ژن کامل به دلیل اندازه زیاد قطعه، دشوار است. علاوه بر این ممکن است پردازش پس از رونویسی در میزبان متفاوت باشد و در نتیجه یک mRNA و یا پروتئین نامطلوب حاصل شود. از سوی دیگر احتمال هدف قرار گرفتن توالی های ژنی بزرگتر توسط دستگاه‌های خاموش‌کننده DNA و در نتیجه کاهش پایداری تراریخته‌ها حاصله بیشتر از توالی‌های کوتاه‌تر است. با این وجود در برخی موارد به دلیل ضرورت وجود عناصر تنظیم‌کننده یا توالی های تقویت‌کننده بیان، ترجمه و یا پایداری در کاست بیانی، ژن‌ها به صورت کامل به همراه عناصر ضمیمه منتقل می‌شوند.

2- پیشبرنده

پیشبرنده‌ها معمولاً توالی‌هایی از DNA به طول 1500-300 نوکلئوتید هستند که در بالادست منطقه 5'-UTR از ژن واقع شده‌اند و شامل چندین عنصر تنظیمی درگیر در تنظیمات زمانی-مکانی آغاز رونویسی هستند. جهت رونویسی موفقیت‌آمیز از هر ژن، کمپلکس آغاز رونویسی باید به پروتئین‌هایی مانند فعال‌کننده‌ها یا سرکوبگرها متصل شود تا رونویسی DNA توسط RNA پلیمراز انجام شود. فعال‌کننده‌ها و سرکوبگرها، پروتئین‌های مهمی برای تنظیم بیان ژن هستند. TFها متعلق به این دسته‌ی مهم از پروتئین‌ها بوده و دارای یک دمین متصل شونده به DNA هستند که امتداد کوتاهی از DNA به نام عناصر تنظیم کننده سیس را در ناحیه بالادست ژنی تشخیص می‌دهد. این عناصر، نواحی ضروری حفاظت شده‌ای برای اتصال TFها و سایر عوامل تنظیمی لازم برای شروع، تثبیت و حفظ رونویسی هستند. در واقع TF ها با تعامل با توالی‌های پیشبرنده به عنوان عوامل اصلی در تنظیم رونویسی عمل می‌کنند. ایجاد یک صفت زراعی جدید بواسطه‌ی بیش بیان ژن هدف، مستقیماً با سطح بیان ژن در یک مرحله معین به عنوان پاسخ به یک محرک و یا در یک بافت خاص در گیاه، مرتبط است. بنابراین، انتخاب پیشبرنده مناسب، به عنوان یک ابزار کارآمد برای امکان بروز صفات مدنظر و مطلوب کمک خواهد کرد. در حال حاضر، پیشبرنده‌های سنتتیک[10] ویروسی یا گیاهی با قابلیت بیان ساختمانی، بیان القایی (بیان ناشی از تنش های زنده و غیر زنده)، بیان در بافت خاص و یا مرحله‌ی رشدی مشخص، جهت بیش بیان ژن هدف در گیاهان تک لپه و دولپه در دسترس هستند. با این حال، هنگامیکه سطح بالایی از بیان ژن هدف برای دستیابی به یک فنوتیپ مطلوب مورد نیاز است، استفاده یا کشف پیشبرنده‌های مخصوص گونه‌های جدید که موجب تجمع مقادیر زیادی رونوشت می‌شوند، ضروری است. تاکنون پیشبرنده‌های سنتتیک، ویروسی و گیاهی متعددی مورد ارزیابی قرار گرفته است اما تعداد توالی‌های محدودی از آنها در دسترس است و اکثر آنها فقط در یک گونه گیاهی تأیید شده‌اند و ممکن است در گونه‌های دیگر عملکرد خوبی نداشته باشند. در کنار ابزارهای متعدد برای دستکاری ژن ها، امروزه از فناوری‌های ویرایش ژنوم نیز می‌توان برای ویرایش یا درج عناصر تنظیم کننده خاص در توالی پیشبرنده برای تعدیل سطح بیان ژن هدف استفاده کرد.

3- خاتمه دهنده

خاتمه دهنده‌ها توالی‌های محافظت شده متشکل از عناصر تنظیمی سیس در پایین دست منطقه کدکننده پروتئین (5' mRNA یا 3'-UTR) هستند که توسط ماشین رونویسی به عنوان سیگنال‌های توقف رونویسی شناخته می‌شوند و در نتیجه باعث جدا شدن این ماشین از DNA می‌شوند. خاتمه دهنده ها موجب بهبود میزان رونویسی، پلی آدنیلاسیون mRNA (دنباله پلیA) و خاتمه رونویسی

[8] Coding sequence

[9] Cassette

[10] Synthetic

RNA می‌شوند. سیگنال‌های Poly-A در 3'-UTR ژن‌های گیاهی از سه جز اصلی تشکیل شده‌اند:عناصر بالادست دور (FUE ، توالی غنی از یوراسیل) که تقریباً 100 نوکلئوتید در بالادست ناحیه poly-A قرار دارند، عناصر بالادست نزدیک (NUE، توالی غنی از آدنین) که حدود 25 نوکلئوتید بالادست ناحیه poly-A قرار داشته و CSs (مکان‌های برشی) که در یک منطقه غنی از یوراسیل و در پایین دست FUE و NUE واقع شده اند. پلی آدنیلاسیون mRNA جهت پردازش پس از رونویسی mRNA (پیرایش)، ثبات mRNA، انتقال آن از هسته به سیتوپلاسم و ترجمه، بسیار حیاتی است. موفق‌ترین خاتمه دهنده‌ها در گیاهان شامل:T-nos (طول 254 نوکلئوتید، منشا آن ژن Nopaline synthase از باکتری *Agrobacterium. tumefaciens*)، T-35S (طول 226 نوکلئوتید، منشا آن خاتمه دهنده ویروس موزاییک گل کلم)، rbcS1 یا rbcS-E9 (طول 291 نوکلئوتید، منشا آن ژن ریبولوز-1،5- بیس فسفات کربوکسیلاز، زیر واحد کوچک از گیاه *Pisum sativum*) و T-ocs (طول 196 نوکلئوتید، منشا آن ژن اکتوپین سنتاز از باکتری *A. tumefaciens*) می‌باشد. با این حال، از خاتمه دهنده‌های گیاهی و اصلی ژن نیز می‌توان در برخی موارد استفاده کرد، به عنوان مثال از ژن استوهیدروکسی اسید سنتاز (*ahas*) به عنوان یک ژن نشانگر انتخابی گیاهی استفاده می‌شود. گزارش‌ها نشان داده است وجود دو خاتمه دهنده درانتهای ژن (برای مثال T-nos + T-35S)، منجر به رونویسی کارآمدتر و کاهش خاموشی ژن پس از رونویسی و درنهایت ثبات بیان ژن می‌شود.

منبع:

1- Basso, M. F., Arraes, F. B. M., Grossi-de-Sa, M., Moreira, V. J. V., Alves-Ferreira, M., & Grossi-de-Sa, M. F. (2020). Insights into genetic and molecular elements for transgenic crop development. Frontiers in Plant Science, 11, 509.