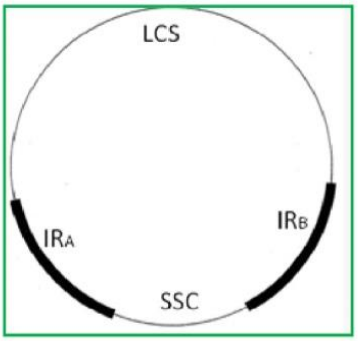
سارا کبیرنتاج
s.nataj@takato.ir
کارشناس تحقیقات بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات کاربردی و تولید بذر، شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی

انتقال ژن به کلروپلاست
Chloroplast transformation

کلروپلاست

دانشمندان معتقدند که کلروپلاست از یک رویداد اندوسیمبیوتیک بین یک سیانوباکتری فتوسنتز کننده و سلول یوکاریوتی اجدادی به وجود آمده است. بسیاری از ژن‌های رمز گذاری شده توسط کلروپلاست پس از اندوسیمبیوز از بین رفته یا به هسته منتقل شده‌اند. بنابراین ژنوم کلروپلاست گیاهان فقط ۵۰ ژن رمزگذار پروتئین دارد که در فتوسنتز، بیان ژن، متابولیسم لیپید و سایر فرایندها شرکت دارند. بیان ژن‌های کلروپلاست در مقایسه با سیستم ساده پروکاریوتی، توسط مکانیسم‌های پیچیده‌تری تنظیم می‌شود بنابراین ژن‌هایی که توسط کلروپلاست کد می‌شوند، برای تنظیم کردن بیان پیچیده ژن‌های کلروپلاست، کافی نیستند و در نتیجه سیستم بیان ژن کلروپلاست شامل اجزای تنظیمی متعددی است که توسط ژن های هسته‌ایی کد می‌شوند. ژنوم پلاستید (پلاستوم) قابلیت انعطاف پذیری ساختاری بالایی دارد زیرا می‌تواند به اشکال دایره‌ای یا خطی، به صورت مونومر یا مولتی‌مر (مشابه نوکلئوئیدهای باکتری) وجود داشته باشند. اندازه ژنوم کلروپلاست در میان گونه‌های مختلف، متفاوت و از ۱۰۷ کیلوباز تا ۲۱۸ کیلوباز متغیر است. این ژنوم، دارای ناحیه همانند سازی مستقل بوده که می‌توان چهار قسمت برای آن در نظر گرفت. این قسمت‌ها شامل دو نسخه یکسان از یک تکرار معکوس (IR) می‌باشد که نواحی تک نسخه‌ایی بزرگ (LSC) و تک نسخه‌ایی کوچک (SSC) را از هم جدا می‌کند (شکل ۱). یک سلول گیاهی می‌تواند ده‌ها پلاستید را در خود جای دهد، هر پلاستید دارای چندین نوکلئوئید است و علاوه برآن تعداد زیادی کپی از پلاستوم‌های مشابه می‌توانند در یک نوکلئوئید بسته بندی شوند. بنابراین، پلاستوم‌ها درجه بالایی از پلی پلوئیدی دارند و تعداد کپی‌های پلاستوم با رشد گیاه و نوع بافت متفاوت است، این تعداد به ۱۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ ژنوم در هر سلول می‌رسد. به نظر می‌رسد پلی پلوئیدی پلاستید می تواند به حفظ نرخ پایین جهش که مشخصه پلاستوم است، کمک کند. این موارد منجر به بیان بالای پروتئین در پلاستیدها می‌شود به طوریکه بازدهی آن تا ۷۵٪ کل پروتئین محلول نیز گزارش شده است.



شکل ۱- تصویر شماتیک از ژنوم کلروپلاست

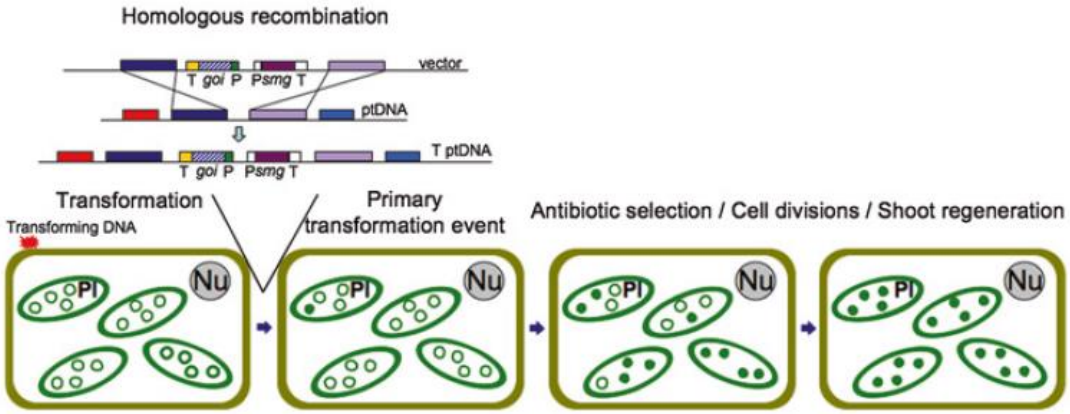
مزایای انتقال ژن به ژنوم کلروپلاست نسبت به ژنوم هسته ای

اغلب گیاهان تراریخت، از انتقال ژن هدف به ژنوم هسته‌ای گیاه به واسطه اگروباکتریوم و یا انتقال مستقیم شامل روش بیولیستیک و یا PEG-الکتروپوریشین حاصل شده‌اند. در این روش نگرانی‌های متعددی مانند بهینه‌سازی میزان بیان، پایداری ژن انتقال یافته و پروتئین نوترکیب حاصل، توسعه روش‌هایی جهت ادغام دقیق و تمیز[1] ترانس ژن انتقال یافته در ژنوم میزبان، شناسایی ژن‌های نشانگر جایگزین برای انتخاب سلول‌های تراریخت و امکان تغییرات پس از ترجمه صحیح[2] (PTMs) در پروتئین‌های نوترکیب، وجود دارد. روش جایگزین تغییر ژنوم

[1] Clean

[2] Post Translational Modifications

هسته‌ای، انتقال ژن هدف به پلاستوم می‌باشد. به دنبال انتقال ژن به پروتوپلاست‌های گیاهی بواسطه PEG و یا روش بیولیستیک، ژن هدف با رویدادهای نوترکیبی مضاعف بین توالی‌های کناری[3] در وکتور و توالی همولوگ در پلاستوم، ادغام می‌شود (شکل ۲). پس از ادغام ژن هدف در ژنوم پلاستید، برای رسیدن به هوموپلاسمی معمولاً به چرخه‌های مکرر تقسیم سلولی و باززایی شاخه‌ها نیاز است. در مقایسه با ترنسفورماسیون ژنوم هسته‌ای، مهندسی ژنتیک پلاستوم دارای مزایای قابل توجهی است و تا حدی به نگرانی‌های ذکر شده پاسخ می‌دهد. این مزایا شامل بیان پروتئین نوترکیب به میزان زیاد، وارد شدن ژن در مکان مشخص در ژنوم پلاستید و در نهایت ممانعت از خاموشی احتمالی ژن‌های هسته‌ای در اثر وارد شدن ژن هدف، امکان انتقال و بیان چندین ژن به صورت اپرون، امکان ایجاد باندهای دی سولفید و فولدینگ(یا تاشدگی) صحیح پروتئین نوترکیب، بیان مناسب ژن‌های پروکاریوتی به دلیل داشتن جد باکتریایی (سیانوباکتری)، حذف ژن مارکر و مهار تراریخته بودن گیاهان حاصل به دلیل وراثت مادری پلاستیدها در اکثر محصولات زراعی، می‌باشد. علاوه بر این از آنجاییکه پلاستیدها از مادر به ارث می‌رسند، امکان انتقال ژن تراریخت توسط دانه گرده در حین گرده افشانی و خطرات و نگرانی‌های گسترش ژن‌های تراریخت در طبیعت نیز وجود ندارد.



شکل ۲- تصویر شماتیک نحوه انتقال ژن به کلروپلاست گیاهی

نحوه انتقال ژن به کلروپلاست

دو روش متداول برای ورود DNA خارجی به کلروپلاست‌ها، روش بیولیستیک و انتقال به واسطه پلی اتیلن گلیکول (PEG) است. در روش بیولیستیک ذرات پوشش داده شده با DNA را با بمباران سرعت بالا از طریق یک تفنگ ژنی یا یک سیستم انتقال ذرات، به سلول‌های گیاهی منتقل می‌کند. این روش را می‌توان با تنظیم پارامترهای بمباران مانند فاصله تا بافت هدف، فشار محفظه خلا و نسبت اندازه ذرات و DNA برای گیاهان مختلف اعمال کرد تا قطعه هدف را در خود جای دهند. روش انتقال ژن به پلاستید به واسطه PEG، بر روی سلول‌های گیاهی که دیواره سلول از آنها برداشته شده است (پروتوپلاستها) انجام می‌شود. کشت مشترک پروتوپلاست‌ها در حضور وزیکول‌های PEG بارگذاری شده با DNA پلاسمید، منجر به جذب DNA توسط پروتوپلاست‌ها و در نهایت ادغام DNA خارجی در ژنوم پلاستید می‌شود. اگرچه روش PEG برای آزاد سازی پروتوپلاست‌ها به هضم آنزیمی بافت‌ها احتیاج دارد، اما روشی اقتصادی‌تر است زیرا به سیستم انتقال تخصصی و گران قیمت متکی نیست.

اخیراً استراتژی جدیدی برای انتقال پلاستید از طریق ذرات نانو ارائه شده‌است. این روش به DNA این امکان را می‌دهد بدون نیاز به ابزارهای اضافی، جداسازی پروتوپلاست یا حضور معرف‌های شیمیایی، به سادگی از طریق نانو لوله‌های کربنی تک جداره[4] (SWNTs) به کلروپلاست‌ها تحویل داده شود. نانو حامل‌های انتقال شامل نانو لوله‌های کربنی تک جداره پیچیده، از جنس کیتوزان (CS-SWNTs) هستند.

[3] flanking sequences

[4] single-walled carbon nanotubes

این نانو لوله‌ها دارای بار مثبت هستند و بنابراین می‌توانند DNA پلاسمید با بار منفی را از طریق فعل و انفعالات الکترواستاتیک حمل کنند. DNA-SWNT حاصل می‌تواند با استفاده از سرنگ به راحتی به منافذ روزنه سلول‌های مزوفیل برگ نفوذ کند. قدرت این استراتژی انتقال در این واقعیت نهفته است که DNA می‌تواند به دلیل تفاوت در pH درون سلول، به طور انتخابی در کلروپلاست آزاد شود. سیتوزول اسیدی (pH:5.5) DNA را به سختی به کیتوزان متصل می‌کند. در مقابل، حامل‌ها تمایل به تخلیه DNA در داخل کلروپلاست دارند زیرا محیط کلروپلاست کمی قلیایی است (pH: 8.0). این رها سازی ترجیحی، DNA را به طور انتخابی در محل مورد نظر خود رها می‌کند.

نوترکیبی همولوگ[5] (HR) یک مرحله مهم پس از تحویل DNA به کلروپلاست است که موفقیت بعدی ترنسفورماسیون را تعیین می‌کند. بیشترین فراوانی وقوع HR زمانی است که DNA خارجی، حامل توالی با حداقل ۱۲۱ جفت باز مشابه با ناحیه هدف در کلروپلاست باشد (شکل ۲). بنابراین برای به حداکثر رساندن قابلیت ترنسفورماسیون، باید به انتخاب پروموتر و نواحی تنظیمی و همچنین محل قرارگیری در ژن در پلاستید توجه ویژه‌ای شود (جدول ۱). برای مثال پروموتر *psbA*، متعلق به ژن کد کننده پروتئین D1 است. این پروتئین متعلق به دستگاه فتوسیستم II بوده و توسط ژنوم پلاستیدی کد می‌شود. پروموتر *psbA* اولین بار بیش از ۳۰ سال پیش در *Chlamydomonas* مورد استفاده قرار گرفت و به نظر می‌رسد هنوز هم بهترین موقعیت برای قرار دادن ژن هدف باشد زیرا محصول ژن *psbA* بیشترین بیان را در میان پروتئین-های پلاستید دارد.

جدول ۱- پروموترها، UTRها و نواحی وارد شدن ژن هدف که به طور معمول برای انتقال ژن به پلاستید مورد استفاده قرار می‌گیرد

Promoters	5'-UTRs	3'-UTRs	Insertion Sites
psbA	*ggagg*	*psbA*	*trnl/trnA*
rrn	*T7g10*	*rps16*	*rbcL/accD*
rbcL	*rbcL*	*rbcL*	*trnfM-trnG*
psaA	*psbA*	*petD*	*trnV/rps12*
atpl	*atpB*		*trnN-trnR*
	Cry2a		*ycf3-trnS*
			rbcL-accD

محدودیت‌های انتقال ژن به کلروپلاست

علی رغم موارد مثبت فراوان ذکر شده در روش انتقال ژن به کلروپلاست، این تکنیک با محدودیت‌هایی همچون کارایی پایین‌تر انتقال ژن به کلروپلاست نسبت به انتقال ژن به ژنوم، تجمع محصول نهایی تنها در اندامک‌ها و بافت‌های سبز گیاه (در مواردی که هدف بیان ژن در دانه و یا ریشه است، نکته‌ی مثبت تلقی می‌شود)، محدود بودن روش‌های انتقال ژن به کلروپلاست، هزینه بالا و یا نیاز به باززایی گیاه تراریخت از پروتوپلاست، طولانی‌تر بودن مراحل باززایی گیاهان تراریخت، عدم توانایی کلروپلاست‌ها در انجام گلیکوزیلاسیون پروتئین و بنابراین عدم امکان تولید پروتئین‌های گلیکوزیله شده در پلاستید، همراه است.

منابع

1. Mohsenpour, M., Tohidfar, M., Babaian-Jelodar, N. A. 2012. Designing and construction of specific plasmid constructs for targeted plastome transformation. Iranian Journal of Crop Sciences.14(3).
2. Scotti, N., Bellucci, M., Cardi, T. 2013. The chloroplasts as platform for recombinant proteins production. In Translation in mitochondria and other organelles. 225-262. Springer, Berlin, Heidelberg.
3. Yu, Y., Yu, P. C., Chang, W. J., Yu, K., Lin, C. S. 2020. Plastid Transformation: How Does it Work? Can it Be Applied to Crops? What Can it Offer?. International Journal of Molecular Sciences. 21(14):4854.

[5] Homologous recombination