به‌کارگیری توالی‌های تکراری پالیندرومیک کوتاه با فاصله تنظیم‌شده خوشه‌ای در محصولات باغی

مصطفی خوشحال سرمست
عضو هیئت‌علمی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، بخش علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی
*نویسنده مسئول: mkhsarmast@gau.ac.ir

چکیده

تغییر هدفمند ژنوم (TGM) به‌وسیله نوکلئازهای وابسته به یک توالی خاص ابزاری قدرتمند برای آشکارسازی کارکرد ژن و پیشبرد محصول‌های باغی خواهد بود. اخیراً توالی‌های تکراری پالیندرومیک کوتاه با فاصله تنظیم‌شده خوشه‌ای یا کریسپر وابسته به پروتئین Cas (یک اندونوکئاز هدایت شده به‌وسیله RNA) به جعبه‌ابزار نوکلئازهای ویرایشگر یک توالی خاص افزوده‌شده‌اند. تغییر هدفمند ژنوم به‌وسیله این سیستم به‌طورکلی وابسته به سنتز یک RNA راهنما بوده که عمل هدایت پروتئین Cas9 به یک DNA دارای سه نوکلئوتید از پیش مشخص‌شده برای برش را فراهم کند. برخلاف نوکلئازهای وابسته به یک توالی خاص درگذشته، CRISPR فناوری ارزان، ساده برای مهندسی ژنوم‌های پیچیده می‌باشد. این فناوری توانایی حذف چند نوکلئوتید تا یک قطعه بزرگ ژن، جایگزینی قطعه هدف با یک ژن جدید را دارا می‌باشد. این فناوری توانایی زیادی ازجمله تغییر در رنگیزه‌های گل، متابولیت‌های مربوط به عطر گل، تغییر مسیر تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی و بسیاری از فرایندهای مربوط به رشد و نمو محصول‌های باغی را دارا می‌باشد. این فناوری ابزاری دقیق برای شناخت بهتر ژن‌های با کارکرد غیر مشخص و شناسایی بهتر ژن‌های موجود خواهد بود. در این قسمت ما گام‌های لازم برای طراحی یک سیستم کریسپر را شرح داده و به کاربردهای این فناوری در مهندسی ژنوم گیاهان باغی می‌پردازیم.

کلمات کلیدی: **علوم باغبانی، مهندسی ژنتیک، کریسپر**

مقدمه

با تکمیل تولی یابی کل ژنوم، که در حال افزایش در برخی از محصولات است محققین گیاهی با تبدیل مقادیر زیادی از داده‌های توالی یابی شده به اطلاعات ژنتیکی دست‌وپنجه نرم می‌کنند. عرصه پسا ژنوم نیازمند توسعه روش‌های قابل انجام برای آشکار کردن کارکرد ژن و توسعه فناوری‌های اصلاحی نوین برای پیشبرد محصولات گیاهی است. تکنولوژی های برای تولید تغییرهای ژنتیکی وابسته به یک توالی خاص مدت‌زمان طولانی است که پس از روش‌های مهندسی ژنوم قدیمی در دسترس هستند. طی چند سال گذشته نوکلئازهای مهندسی شده شامل نوکلئازهای zinc-finger (ZFNs)) و نوکلئازهای مؤثر شبه فعال‌کننده رونویسی (TALENs) به‌صورت گسترده‌ای برای دست‌کاری هدفمند ژنوم مورداستفاده قرارگرفته‌اند. این نوکلئازهای مهندسی شده می‌توانند برای تغییر ژنوم در یک مکان ژنی ویژه به کار گرفته شوند و آن‌ها قادرند که با یک روش هدفمند پروتئین یک توالی ژنی ویژه را شناسایی کنند. به‌هرحال این سیستم نیازمند نوکلئازهای سنتز شده و طراحی شده جدید برای هر توالی DNA هدف جدید است. بنابراین سر هم کردن فناوری ZFN و TALEN علاوه بر هزینه نیازمند مهارت تجربی است. اخیراً یک فناوری نوکلئاز وابسته به توالی هدف، انقلابی بر اساس توالی‌های پالیندرومیک تکراری برای دست‌کاری دقیق ژنوم ایجاد کرده است. این سیستم از پروتئین نوکلئاز Cas9 و یک RNA رهنما (sgRNA) استفاده می‌کند که به‌طور ویژه‌ای به توالی هدف اتصال یافته و پروتئین Cas9 را برای برش مکان هدف فرامی‌خواند. تنها یک تک رشته RNA برای هدف قرار دادن توالی ویژه کافی است. و لزومی ندارد که Cas9 برای هر هدف جدید دوباره مهندسی شود. بنابراین سیستم کریسپر وعده جایگزینی با سیستم

ZFNs و TALENS را می‌دهد. اخیراً فناوری کیسپر به‌عنوان یکی از ۱۰ فناوری شگرف و تأثیرگذار سال ۲۰۱۳ به‌وسیله مجله Science انتخاب شده است. در عرض یک سال دست‌کاری ژنوم به‌واسطه کریسپر در بیش از ۵۰ مقاله با رنج وسیعی از دامنه میزبانی مانند سلول انسانُ، موش، zebrafish مگس سرکه نماتد، موش، مخمر و گیاه و بسیاری از دیگر از موجودات گزارش شده است. میزان جهش بدست آمده با استفاده از فناوری کریسپر قابل مقایسه با میزان جهشی است که در ZFNs و TALENS بدست آمده است. از سال ۲۰۱۳ کریسپر به یکی از ابزارهای بسیار سودمند برای مهندسی ژنوم تبدیل شده است. درست مشابه ZFNs و TALENS سیستم کریسپر منجر به برش دو رشته DNA در محل ژنومی مناسب شده و سپس سیستم ترمیم DNA یا از طریق error-prone یا اتصال انتهایی غیر همولوگ (NHEJ) یا به‌وسیله نوترکیبی همولوگ (HR) ناحیه بریده شده را ترمیم می‌کند.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ما ژن کد کننده مربوط به یک کانال یونی در میتوکندری گیاه آرابیدوپسیس را مورد هدف خود قرار داده‌ایم (AT5G67500.2). در اولین گام به دنبال توالی ngg بر روی اگزون‌های این ژن گشته و یک protospacer ۲۰ نوکلئوتیدی در سمت ۵ پرایم این توالی را برای ساخت RNA هدایتگر جدا می‌نماییم. نظر به نحوه طراحی خاص entry clone خود توالی ATTG را به رشته فوروارد اضافه و پرایمر معکوس خود را ریورس کامپلیمنت نمایید. پس از اتصال دو الیگو به همدیگر با استفاده از PCR حامل خود را با آنزیم PbsI بریده و RNA هدایتگر را به آن متصل کنید. قطعه را همانندسازی و تأیید نمایید. پس از تأیید قرارگیری درست الیگو در حامل با استفاده از آنزیم LR clonase RNA هدایتگر را به وکتور بیان دارای پروتئین Cas9 با فناوری Gateway منتقل کنید. دوباره حامل خود را با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تأیید و پس از واردسازی این حامل بیان به اگروباکتریوم می‌توان با استفاده از agro infiltration آن را به‌صورت موقت بیان نمود. برای تأیید کارکرد درست این فناوری ژن هدف خود را وارد وکتور بیان نموده و با ترانسفورماسیون همزمان آن به برگ‌های توتون میزان کارایی این فناوری برای برش ژن مربوط به کانال آنیونی با استفاده از توالی یابی DNA قابل ارزیابی خواهد بود.

نتایج و بحث

کریسپر یک سیستم ایمنی سازوارپذیر در آرکهآ و باکتری‌ها برعلیه حمل ویروس‌ها و پلاسمیدهاست. بر اساس عناصر اصلی و توالی سه نوع CRISPR/Cas9 شناسایی شده است. سیستم‌های نوع یک و سه نیازمند پروتئین‌های متعدد برای تشکیل یک کمپلکس بزرگ دارای چند پروتئین Cas فعال است درحالی‌که سیستم نوع دو به‌آسانی قابل استفاده عملی در دیگر موجودات می‌باشد. مکان ژنی کریسپر نوع دو باکتری Streptococcus pyogenes SF370 شامل گروهی از ژن‌های Cas و همچنین دارای دو عنصر RNA غیر کد شونده به نام trans activating CRISPR RNA یا (tracr RNA) و آرایه کریسپر است که به ترتیب شامل tracrRNA، اپرون ژن Cas، و توالی اصلی CRISPR می‌باشد.

بارزترین ویژگی این سیستم آرایه کریسپر است که دارای تکرارهای به‌تقریب مشابه DANاست که به‌وسیله توالی‌های تنظیمی فاصله‌دار از هم جدا شده است. CRISPR/Cas9 یک سیستم دفاعی برش DNA با واسطه‌گری یک RNA هدایت‌گر است. به‌محض تهاجم ویروس یا پلاسمید به سلول میزبان سلول میزبان با استفاده از واردکردن قطعات کوتاه DNA بیگانه به درون مکان ژنی کریسپر به‌عنوان یک توالی spacer جدید پاسخ می‌دهد. در ادامه RNAهای Tracr و توالی‌های pre-crRNA منشأ گرفته از آرایه تکرار و spacer رونویسی می‌گردند. سپس tracrRNA به هر یک از توالی‌های تکراری (هیبرید) درون pre-crRNA برای ایجاد یک RNA دو رشته‌ای متصل می‌شود. پس‌ازآن این RNA های دو رشته‌ای به‌وسیله یک اندونوکلئاز RNAase III و یک نوکلئاز مرتبط با CAS9 ناشناخته دیگر بریده شده و در

نهایت crRNAs بالغ رها می‌شود. crRNA بالغ حدود ۴۰ نوکلئوتید است که به‌طورکلی ۲۰ نوکلئوتید آن توالی هدایتگر ویژه مشتق شده از spacer و ۱۹-۲۲ نوکلئوتید سمت ′۳ از توالی تکراری مشتق شده است.

با مدل‌سازی از شکل طبیعی و افزودن توالی‌های مربوط به باکتریوفاژ لامبدا امروزه در بسیاری از آزمایشگاه‌ها این تکنیک به‌آسانی قابل کاربرد برای اهداف متفاوت است. هنوز کاربرد این فناوری بر روی محصولات باغی به‌طور کامل ارزیابی نشده است. ولی در رابطه با گیاهان زینتی این سیستم قابلیت زیادی در تغییر جهت مسیرهای متابولیتی به نفع تولید یک پیش ماده بیشتر یا کمتر برای تغییر در رنگ و عطر گل دارد. دست‌کاری ژن‌های مسیر بیوسنتز و سیگنالینگ اتیلن در گیاهانی که توالی ژن‌های آن‌ها به‌طور کامل فراهم نیست ابزاری بسیار قدرتمند برای افزایش عمر انباری آن‌ها خواهد بود. در رابطه با گیاهان دارویی این فناوری به کاهش متابولیت های مضر و افزایش متابولیت‌های دارویی و غیر دارویی می‌تواند کمک نماید.

منابع

Gilbert, LA. 2013. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. Cell. 154, 442–451

Mali, P., Yang, L. 2013. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. Science. DOI: 10.1126/science.1232033

O'Connel, MR., Oakes, BL. 2014. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. Nature. doi:10.1038/nature13769

Developing of CRISPR Technology in Horticultural Crops

Mostafa Khoshhal Sarmast
Department of Horticultural Science, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR), Golestan, Iran
**Corresponding Author:* mkhsarmast@gau.ac.ir

Abstract

Targeted genome modification (TGM) by sequence-specific nucleases is a influential tool for clarifying gene function and improving horticultural crops. Very recently, clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/ CRISPR-associated (Cas) system-based RNA-guided endonucleases have been added to the sequence-specific nucleases toolbox. TGMs generated by this system rely on a synthetic single guide RNA (sgRNA) to direct the Cas9 protein to cleave a predetermined DNA sequence. Unlike previous sequence-specific nucleases, CRISPR provides a simple, cost-effective and versatile approach to multiplex genome engineering. This technology is capable of production a loss of function mutant and insertion a gene to a very specific sequence on genome. With this technology manipulation of flower pigments, flower odor, redirecting secondary metabolite in medicinal plant and change in plant growth and development are doable. In this paper, we walk you through for a stepwise definition on making CRISPR construct and its possible application in Horticultural plants.

***Keywords*: Horticulture, genetic engineering, CRISPR, Gene editing**