انتقال ژن به روش نانوتکنولوژی

مرضیه اتحادپور(۱)، محمدرضا فتاحی مقدم (۲)، ذبیح اله زمانی (۳)

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ۲ و ۳- دانشیار گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

دستکاری ژنتیکی گیاهان توسط اصلاحگران گیاهی طی چندین سال با موفقیت انجام شده است. تکنولوژی DNA نوترکیب به مهندسان ژنتیک گیاهی این اجازه را داده است که ژن‌های خاص را شناسایی و کلون کنند. اهمیت تکنولوژی انتقال ژن به دلیل مقاومت علیه ویروس‌ها، حشرات و بیماری های باکتریایی، مقاومت در برابر خشکی، بهبود کیفیت غذایی، ایجاد رشد گیاه در فصول گوناگون است . در حال حاضر روش های موجود برای دستکاری ژنتیکی سلول های گیاهی شامل وارد کردن ژن جدید بوسیله ویروس،اگروباکتریوم، تیمارهای شیمیایی (پلی اتیلن گلیگول) پروتوپلاست جدا شده، روش های فیزیکی شامل الکتروپوریشن پروتوپلاست و بافت و ریز تزریق است .وکتورهای نانوذرات برای دلیوری پلی نوکلئوتیدها استفاده می شود که شامل نانوذرات پلی مری (پلی لاکتید کو گلیکولید (PLGA) و پلی لاکتیک اسید)، پلیمرهای کاتیونی(پلی اتیلن ایمین (PEI)، پلی متاکریلات ها، پلی L لیزین (PLL)، پلی بتاآمینو استرها)، چیتوزان ها، لیپوزوم های کاتیونی، نانوذرات طلا، نانوذرات مغناطیسیمی باشد. کاربردهای دیگر نانوذرات در کشاورزی شامل سامانه‌های انتقال و آزادسازی هوشمند (سموم یا مواد غذایی)، جداسازی زیستی، انتقال سلول‌های گیاهی محافظت شده توسط غشاها به مکان‌های دیگر، نمونه برداری سریع، حفظ سلامت دام‌ها است.

کلمات کلیدی: دستکاری ژنتیکی، نانوذرات، ژن

مقدمه: دستکاری ژنتیکی گیاهان توسط اصلاحگران گیاهی طی چندین سال با موفقیت انجام شده است. برای انتقال ژن های مطلوب بوسیله روش های کلاسیک نیاز به تلاقی دو ژنوتیپ می باشد و سپس نتاج با یکی از والدین دارای صفات مطلوب تلاقی برگشتی داده می شود. اصلاح گیاهان پروسه طولانی می باشد و ده تا پانزده سال طول می کشد تا رقم جدیدی معرفی شود. تکنولوژی DNA نوترکیب به مهندسان ژنتیک گیاهی این اجازه را داده است که ژن‌های خاص را شناسایی و کلون کنند.

نانوتکنولوژی در انتقال ژن و دارو در چند سال گذشته جلودار بوده است. چندین نوع از ابزار با مقیاس نانومتری مانند نانو ذرات، نانوگوی ها، نانولوله ها، نانوژل ها و اتصالات ملکولی بررسی شده اند. سایز خیلی کوچک این سیستم های انتقال مزیت‌های مشخصی در مقایسه با سیستم های با سایز بزرگ دارند. مانند نفوذپذیری بالاتر و عمیق تر در بافت، جذب سلولی بالاتر، توانایی بالاتردر مقابل موانع و توانایی بالاتر برای هدف قرار دادن سلول های خاص (Vogt et al, 2006; 2002 ,Kreuter et al). کاربرد جالب نانوذرات در حوزه علوم زیستی، استفاده از آنها بعنوان سیستم های انتقال هوشمند است. انتقال ژن بوسیله بمبارد ذرات طلا که DNA جذب کرده اند بطور موفقیت آمیزی برای گیاهان ترانس ژن بدون توجه به رفتار گونه استفاده شده است (Gonzalez et al. 2008). Torney و همکاران درسال ۲۰۰۷ کارایی فرستادن DNA و مواد شیمیایی از طریق نانو ذرات سیلیکا به درون سلول‌های گیاهی، بدون نیاز به تجهیزات مخصوص را گزارش کرد.

نانوذرات پلی مری: نانوذرات پلی مری یا نانو اسفرها بیشترین نوع مورد استفاده از سیستم های انتقال با مقیاس نانو هستند. آنها اغلب ذرات گوی مانند هستند و سایز آنها بین ۱ تا ۱۰۰۰ نانومتر است که مواد ژنتیکی مورد نظر را حمل می کنند. بیشتر پلی مرهای کاتیونی توانایی فشرده کردن پلاسمید DNA به ترکیبات با اندازه نانومتری (پلی پلکس) را دارند. DNA همچنین می تواند به درون ماتریکس پلیمریک وارد شد و یا می تواند جذب سطحی یا متصل به سطح نانوذرات شود.

چیتوزان ها: چیتوزان یک پلی کاتیون طبیعی است که بیشترین ارزیابی برای انتقال ژن در مورد آن صورت گرفته است. چیتوزان می تواند برای انتقال پلی نوکلئوتید هم به صورت کپسوله کردن آنها و هم در ترکیب با آنها بکار رود و ذرات بار مثبت ایجاد کنند (Koping-Hoggard et al 2004 ; 2004 Bozkir and Saka).

نانوذرات مغناطیسی: این روش آلودگی از مفهوم هدف یابی داروهای مغناطیسی الهام گرفته شده بود که قدمت آن به اواخر دهه ۱۹۷۰ برمی‌گردد که داروها بصورت کوالانتی یا غیر کوالانتی با ذرات مغناطیسی باند می‌شوند و یک شیب مغناطیسی نیاز است تا باعث تجمع این داروهای مغناطیسی در سایت هدف شود و یا آنها را در آنجا نگه دارد. قاعده کلی Magnetofection هدایت نانوذرات مغناطیسی از طریق استفاده از یک شیب مغناطیسی به بافت، ارگان‌ها و یا حتی به درون سلول‌های خاص می باشد و بطور قابل ملاحظه‌ای میزان DNA مورد استفاده و زمان لازم برای رسیدن به سلول‌های هدف کاهش می یابد و بطور معنی داری راندمان بیان ژن افزایش می یابد.

بیشترین کلاسترهای مورد استفاده نانوذرات اکسید آهن سوپرپارامغناطیسم هستند. این نانو ذرات می‌توانند به آسانی سنتز شوند و با لایه‌های پلیمری قابل تجزیه زیستی پوشانده شوند که از طریق کووالانتی یا غیر کووالانتی با بیوملکول‌ها متصل شوند.

شیوه های متعددی می تواند با وکتورهای گوناگون همراه ذرات مغناطیسی مورد استفاده قرار بگیرد که می تواند هم برای نوکلئیک اسیدهای بزرگ مانند پلاسمید یا ساختارهای کوچک (مانند الیگونوکلئوتیدهای آنتی سنس) و هم برای شکل برهنه DNA یا بسته های لیپوپلکس و پلی پلکس مورد استفاده قرار بگیرد و کارایی آلودگی را بالاتر می برد.

مکانیسم جذب وکتور به درون سلول در این سیستم احتمالا مانند روش های استاندارد آلودگی می باشد. نانوذرات آهن ربایی همراه وکتورها به درون سلول وارد می شود. وقتی وکتورها متصل به نانوذرات مغناطیسی هستند به سوسپانسیون سلولی اضافه می شوند. یک آهن ربای دائمی در زیر ظرف های کشت سلولی به منظور جذب وکتورها به سطح سلول قرار داده می شوند.

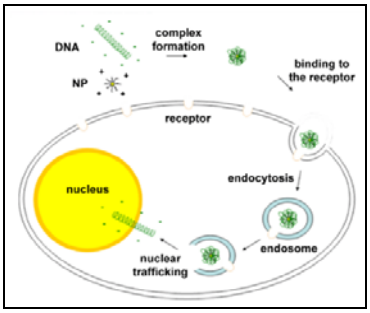
مسیر تحویل ژن

۱) تماس با DNA: اولین پیش نیاز برای یک حامل ژن موفق توانایی تماس با DNA است. اثرات استری و یا دفع الکترواستاتیکی بین مجموعه DNA و وکتور با اجزا پلاسما از تخریب ژن جلوگیری می‌کند و تا زمان رها شدن از آن محافظت می‌کند.

۲) انتقال از طریق غشای پلاسمایی سلول: وقتی که کمپلکس ایجاد شد باید وارد سلول هدف شود. مکانیسم‌های زیادی پروسه دلیوری را هدایت می‌کنند، به هرحال وقتی که کمپلکس به سطح سلول می‌چسبد، معمولا از طریق یک راه غیر تخصصی اندوسیتوز می‌شود. در غیر این صورت، باندهای خاصی روی سطح حامل‌ها وجود دارد که متمم گیرنده‌هایی روی سطح سلول‌های هدف هستند که به آنها اجازه ورود به سلول می‌دهند.

۳) فرار اندوزومی: وقتی که کمپلکس از غشای سلولی عبور می‌کند به درون کیسه اندوزمال درون سیتوپلاسم محبوس می-شود. در این زمان، مجموعه یا می‌تواند از اندوزوم فرار کند و یا تخریب شود.

٤) ورود به هسته: اگر DNA درون سیتوزول پخش نشود، سرانجام می‌تواند به هسته برسد. ویروس‌ها مکانیسم ویژه‌ای دارند که کارایی بالایی در تحویل ژن به هسته دارند. از آنجایی که وکتورهای غیر ویروسی فاقد این سیستم‌ها هستند کارایی تحویل DNA پایین‌تری در مقایسه با ویروس‌ها دارند (Ragusa et al, 2007).



(Ragusa et al, 2007)

مسیر شماتیک تحویل DNA به هسته توسط نانوذرات

نتیجه گیری

استفاده از نانوذرات بطور وسیعی در حوزه پزشکی کاربرد دارد که از جمله می توان به انتقال دارو و انتقال ژن اشاره داشت. ابزارهای نانوذرات هنوز در مورد انتقال ژنتیکی گیاهان بکار نرفته است که به دلیل مانع دیواره سلولی بوده است که با ارائه راهکارهایی برای غلبه بر این مانع می توان از نانوذرات در انتقال هدفمند ژن به درون گیاهان بهره گرفت.

منابع

Khan, K. H. 2009. Gene transfer technology in plants: roles in improving crops. Molecular Biology and Biotechnology. 1: 116–123.

Basarkar, A., Singh, J. 2007. Nanoparticulate systems for polynucleotide delivery. International Journal of Nanomedicine. 2: 353–360.

Monica, R.C. and Cremonini, R. 2009. Nanoparticles and higher plants. Caryologia. 62: 161-165.

Ragusa, A., García, I. and Penadés, S. 2007. Nanoparticles as Nonviral Gene Delivery Vectors. IEEE Transactions on nanobioscience. 6: 319-330.

Gene transfer using nanotechnology method

Genetic manipulation of plants has been done by plant breeders successfully over the years. Recombinant DNA technology has allowed to plant genetic engineering to identify and clone the specific genes.

Importance of gene transfer technology

Provide resistance against viruses, Acquire insecticidal resistance, to strengthen the plant to grow against bacterial diseases, develop the plants to grow in draught, engineering plants for nutritional quality, make the plants to grow in various seasons and etc.

Currently available methods for genetic manipulation of plant cells include: insert new genes by virus, *Agrobacterium*, chemical treatments (polyethylene glycol) of isolated protoplast, physical methods include Electroporation of protoplast and tissue, microinjection and etc.

Nanoparticle vectors for delivery of poly nucleotides

Polymeric nanoparticles (Poly lactide-co-glycolide (PLGA) and Poly lactic acid (PLA)), Cationic polymers (Polyethylenimine (PEI), Polymethacrylates, Poly-L-Lysine (PLL), Poly (β-amino ester)), Chitosans, Cationic liposomes, Gold nanoparticles, Magnetic nanoparticles.

Other applications of nanoparticles in Agriculture

transmission systems and intelligent release (toxins or nutrients), biological separation, transferring of protected plant cells by membranes to the other sites, quick sampling, and protection of animal health.

Key words: Genetic manipulation, Nanoparticles, Gene