

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



انتشارات
۷۵۲

ویرایش ژنوم در گیاهان

دکتر علیرضا سیفی

عضو هیئت علمی دانشگاه فردوسی مشهد

دانیال شکوهی

عاطفه قلیزادگان احسان آباد

رخشنده ابراهیم پور

عنوان و نام پدیدآور:	ویرایش ژنوم در گیاهان/ علیرضا سیفی... او دیگران!؛ ویراستار علمی نسرین مشتاقی؛ ویراستار ادبی مصطفی قندهاری.
مشخصات نشر:	مشهد: دانشگاه فردوسی مشهد، انتشارات، ۱۳۹۹.
مشخصات ظاهری:	۱۲۰ ص. مصور.
فروست:	انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد؛ ۷۵۲.
شابک:	ISBN: 978-964-386-444-6
یادداشت:	علیرضا سیفی، دانیال شکوهی، عاطفه قلیزادگان احسان آباد، رخسنده ابراهیم پور.
یادداشت:	کتابنامه: ص. ۱۱۹.
یادداشت:	نمایه.
وضعیت فهرست نویسی:	فیبیا.
موضوع:	ژنتیک گیاهی -- مهندسی
موضوع:	ویرایش ژنوم
موضوع:	گیاهان -- مقاومت در برابر بیماری‌ها و آفت‌ها -- ژنتیک
موضوع:	Plants -- Disease and pest resistance -- Genetic aspects
موضوع:	Plant genomes
شناسه افزوده:	ژنوم گیاهی
شناسه افزوده:	سیفی، علیرضا، ۱۳۵۶-
شناسه افزوده:	مشتاقی، نسرین، ۱۳۵۸-، ویراستار.
شناسه افزوده:	دانشگاه فردوسی مشهد، انتشارات.
رده‌بندی کنگره:	QK۹۸۱/۵
رده‌بندی دیویی:	۵۷۲/۸۷۷۲
شماره کتابشناسی ملی:	۶۱۷۸۳۷۱

ویرایش ژنوم در گیاهان

پدیدآورندگان: دکتر علیرضا سیفی؛ دانیال شکوهی؛ عاطفه قلیزادگان احسان آباد؛ رخسنده ابراهیم پور
ویراستار علمی: دکتر نسرین مشتاقی
ویراستار ادبی: مصطفی قندهاری
مشخصات: وزیری، ۲۰۰ نسخه، چاپ اول، تابستان ۱۳۹۹
چاپ و صحافی: چاپخانه دقت
بها: ۲۵۰/۰۰۰ ریال
حق چاپ برای انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد محفوظ است.

مراکز پخش:

فروشگاه و نمایشگاه کتاب پردیس: مشهد، میدان آزادی، دانشگاه فردوسی مشهد، جنب سلف یاس
تلفن: ۳۸۸۰۲۶۶۶-۳۸۸۳۳۷۲۷ (۰۵۱)
مؤسسه کتابیران: تهران، خیابان کارگر جنوبی، خیابان لبافی نژاد، بین خیابان فروردین و اردیبهشت،
شماره ۲۳۸، تلفن: ۶۶۴۹۴۴۰۹-۶۶۴۸۴۷۱۵ (۰۲۱)
مؤسسه دانشیران: تهران، خیابان انقلاب، خیابان منیری جاوید (اردیبهشت) نبش خیابان نظری، شماره ۱۴۲
تلفنکس: ۶۶۴۰۰۲۲۰-۶۶۴۰۰۱۴۴ (۰۲۱)

<http://press.um.ac.ir>

Email: press@um.ac.ir



انتشارات
۷۵۲

فهرست مطالب

۷	پیشگفتار.....
۹	فصل ۱: اهمیت فناوری‌های نوین مهندسی ژنتیک گیاهی.....
۱۰	گیاهان مهندسی ژنتیک شده.....
۱۲	روش‌های انتقال ژن به گیاهان.....
۱۲	روش‌های انتقال ژن پایدار.....
۱۳	مکانیسم مولکولی انتقال ژن به گیاه توسط آگروباکتریوم.....
۱۴	روش‌های بیان موقت ژن در گیاهان.....
۱۵	نگرانی‌های موجود در مورد گیاهان مهندسی ژنتیک شده.....
۱۷	فناوری‌های ویرایش ژنوم.....
۱۷	منابع.....
۱۹	فصل ۲: فناوری‌های ویرایش ژنوم.....
۲۰	سیر تکاملی روش‌های ویرایش ژنوم.....
۲۰	مگانوکلنازها.....
۲۲	نوکلنازهای متصل به فاکتورهای رونویسی انگشت روی (ZFN).....
۲۳	آنزیم FokI.....
۲۴	فاکتورهای رونویسی ZFP.....
۲۵	استفاده از فناوری ZFN در گیاهان.....
۲۷	نوکلنازهای متصل به پروتئین‌های افکتوری TAL (TALEN).....
۲۷	پروتئین‌های افکتوری TALE.....
۲۹	استفاده از فناوری TALEN برای ویرایش ژنوم در گیاهان.....
۳۰	منابع.....

فصل ۳: سیستم کریسپر به عنوان سیستم دفاعی باکتریایی ۳۳

تاریخچه ۳۳

ساختار جایگاه‌های کریسپری ۳۴

نقش سیستم کریسپر در پروکاریوت‌ها ۳۵

تنوع در سیستم‌های کریسپری ۳۸

مکانیسم مولکولی ایمنی اکتسابی به واسطه سیستم کریسپر ۳۹

فرایند اکتساب ۴۳

منابع ۴۴

فصل ۴: سیستم کریسپر به عنوان ابزار ویرایش ژنوم ۴۷

سیر تحولات و پیشرفت‌های سیستم ویرایش ژنوم ۴۷

ساختار و مکانیسم عمل پروتئین Cas9 ۴۹

انواع مختلف پروتئین‌های Cas مورد استفاده در ویرایش ژنوم ۵۱

ا. انواع تغییر یافته آنزیم Cas9 ۵۱

ب. Cas12a ۵۴

ج. Cas13 ۵۶

د. CasX ۵۷

انواع مختلف RNAهای هدایتگر ۵۸

ا. RNAهای راهنمای کوتاه (truRNA) ۵۸

ب. RNA راهنما همراه با رایبوزایم (RGR) ۵۹

ج. tRNA-gRNA پلی سیسترونیک (PTG-Cas9) ۵۹

د. استفاده از ریونوکلئاز Csy4 برای پردازش sgRNA ۵۹

ه. پیشبرهای دو طرفه ۶۰

منابع ۶۰

فصل ۵: ساخت سازه‌های کریسپر Cas9 بر اساس روش همسانه‌سازی گلدن گیت ۶۵

طراحی sgRNA ۶۵

سیستم همسانه‌سازی گلدن گیت ۶۶

استخراج پلاسمید سوپر کویل ۶۷

انتخاب sgRNA برای ژن EPSPS ۶۸

طراحی آغازگر برای ساخت sgRNA ۶۹

۶۹ ساخت sgRNA از طریق انجام PCR
۷۰ خالص سازی محصول PCR
۷۰ واکنش هضم اتصال اول برای سرهم کردن سازه AtU6::EPSPS_sgRNA
۷۳ واکنش هضم اتصال دوم برای سرهم کردن سازه S::Cas9-AtU6::EPSPS_sgRNA
۷۳ منابع

فصل ۶: روش های انتقال Cas9 و sgRNA به سلول گیاهی ۷۵

۷۸ روش های ارزیابی کارایی سازه/کمپلکس کریسپر
۷۸ ا. بیان در پروتوپلاست
۷۹ ب. تزریق آگروباکتریوم در برگ
۷۹ شناسایی جهش های حاصل از بیان سازه های کریسپر
۸۰ ا. الکتروفورز محصول PCR
۸۰ ب. تشخیص حذف سایت برشی یک آنزیم برشی
۸۰ ج. روش های مبتنی بر شناسایی هترو دوپلکس های ناشی از جفت شدگی های ناسازگار
۸۲ د. توالی یابی
۸۲ منابع

فصل ۷: ایجاد مقاومت به علف کش در گیاهان از طریق ویرایش ژنوم ۸۵

۸۵ علف کش گلايفوسیت و مقاومت به آن در موجودات زنده مختلف
۸۶ مسیر شیکیمات و اهمیت آن در گیاهان
۸۸ مکانیسم عمل علف کش گلايفوسیت بر مسیر شیکیمات
۸۸ مقاومت به علف کش گلايفوسیت در علف های هرز
۹۰ مهندسی ژنتیک برای ایجاد مقاومت به گلايفوسیت
۹۰ مقاومت به گلايفوسیت با موتاسیون های دو گانه
۹۱ مقاومت به گلايفوسیت از طریق ویرایش ژنوم
۹۲ ویرایش ژن کد کننده آنزیم ALS برای ایجاد مقاومت به علف کش
۹۳ منابع

فصل ۸: استفاده از فناوری ویرایش ژنوم برای ایجاد مقاومت به بیماری های گیاهی ۹۵

۹۵ سیستم ایمنی گیاهان
۹۸ مهندسی ژنتیک برای ایجاد مقاومت به بیماری های گیاهی

- گیاهان مهندسی ژنتیک شده مقاوم به بیماری های ویروسی ۹۸
- گیاهان مهندسی ژنتیک شده مقاوم به بیماری های باکتریایی ۹۹
- گیاهان مهندسی ژنتیک شده مقاوم به بیماری های قارچی ۱۰۰
- استفاده از ویرایش ژنوم برای ایجاد مقاومت به بیماری های گیاهی ۱۰۰
- ویرایش ژنوم برای ایجاد مقاومت به بیماری های ویروسی ۱۰۱
- ویرایش ژنوم برای ایجاد مقاومت به بیماری های باکتریایی ۱۰۲
- ویرایش ژنوم برای ایجاد مقاومت به بیماری های قارچی ۱۰۳
- منابع ۱۰۴

فصل ۹: ملاحظات زیست ایمنی گیاهان حاصل از ویرایش ژنوم ۱۰۹

- قوانین و مقررات مربوط به محصولات مهندسی ژنتیک شده ۱۱۰
- قوانین و مقررات اتحادیه اروپا در خصوص محصولات مهندسی ژنتیک شده ۱۱۰
- قوانین و مقررات ایالات متحده آمریکا در خصوص محصولات مهندسی ژنتیک شده ۱۱۱
- قوانین و مقررات مربوط به محصولات حاصل از ویرایش ژنوم ۱۱۲
- سطوح ارزیابی محصولات حاصل از ویرایش ژنوم ۱۱۳
- أ. سطح تکنیکی ۱۱۴
- ب. سطح مهار ۱۱۴
- ج. سطح مدیریت و نظارت ۱۱۴
- د. استاندارد بین المللی ۱۱۵
- قوانین اتحادیه اروپا در مورد گیاهان حاصل از ویرایش ژنوم ۱۱۵
- قوانین ایالات متحده آمریکا و کانادا در مورد گیاهان حاصل از ویرایش ژنوم ۱۱۷
- قوانین چین در مورد گیاهان حاصل از ویرایش ژنوم ۱۱۸
- منابع ۱۱۹
- نمایه ۱۲۰

پیشگفتار

در چند سال اخیر دستاوردهای شگرفی در دست‌ورزی ژنتیکی هدفمند حاصل شده است که تحت عنوان مهندسی ژنوم یا ویرایش ژنوم مطرح می‌شوند. ویرایش ژنوم این امکان را فراهم می‌کند تا بدون اینکه هیچ DNA ناخواسته‌ای وارد ژنوم هدف شود، به صورت کاملاً هدفمند بتوان حتی در سطح تک‌نوکلئوتید ژنوم هدف را به نحو دلخواه تغییر داد و یا یک ژن یا تعدادی ژن را در محل مشخصی از ژنوم اضافه کرد. چنین امکانی می‌تواند بسیاری از نگرانی‌های موجود در مورد گیاهان مهندسی ژنتیک شده را برطرف سازد. در حال حاضر طبق قوانین ایالات متحده آمریکا گیاهان حاصل از ویرایش ژنوم همانند گیاهان حاصل از به‌نژادی گیاهی در نظر گرفته می‌شوند و قوانین سخت‌گیرانه به گیاهان مهندسی ژنتیک شده شامل گیاهان تولیدشده از طریق ویرایش ژنوم مربوط نمی‌شود. بنابراین، امیدهای بسیاری وجود دارد که دست‌ورزی گیاهان از طریق ویرایش ژنوم راهکار مناسب‌تری برای استفاده از پیشرفت‌های نظری در ژنتیک و بهره‌برداری عملی از آن‌ها در به‌نژادی گیاهی فراهم سازد.

فناوری ویرایش ژنوم یکی از مباحث جذاب و رو به گسترش در ایران است که محققان زیادی در حوزه زیست‌شناسی مولکولی را به خود جلب کرده است و انتظار می‌رود در ۲-۳ سال آینده، فناوری مطرح در مهندسی ژنتیک گیاهی، جانوری و پزشکی باشد. یکی از اهداف سند چشم‌انداز بیست‌ساله جمهوری اسلامی ایران توسعه فناوری‌های نو از جمله زیست‌فناوری است. در سند ملی زیست‌فناوری مصوبه هیئت محترم دولت در تاریخ ۱۳۸۳/۲/۱۶، به‌صراحت بر نقش مهم این فناوری در ارتقای کیفیت و کمیت تولیدات کشاورزی به‌عنوان یکی از آرمان‌های ملی در حوزه زیست‌فناوری تأکید شده است. با این حال، توسعه کشت گیاهان مهندسی ژنتیک شده در ایران، با وجود نیاز مبرم به آن، با مشکلاتی مواجه است که بخشی از این مشکلات به‌دلیل وجود نگرانی‌های عمومی در مورد این نوع گیاهان است. بنابراین، امید است با استفاده از فناوری‌های ویرایش ژنوم بتوان بخش عمده‌ای از این نگرانی‌ها را برطرف کرد و در جهت رفع گوشه‌ای از مشکلات حوزه کشاورزی گام برداشت.

این کتاب که حاصل چهار سال پژوهش و مطالعه در زمینه ویرایش ژنوم در گیاهان می‌باشد، مجموعه‌ای است از مباحث نظری و عملی در مورد فناوری CRISPR-Cas (کریسپر)، یکی از روش‌های ویرایش

ژنوم، که امید است مورد استفاده پژوهشگران و دانشجویان تحصیلات تکمیلی در رشته‌های بیوتکنولوژی و زیست‌شناسی مولکولی گیاهی قرار گیرد. فصول کتاب به نحوی تنظیم شده است که از یک طرف قابلیت استفاده به‌عنوان یکی از منابع آموزشی در دروسی مانند مهندسی ژنتیک را داشته باشد و از طرف دیگر برای پژوهشگران علاقه‌مند استفاده از این فناوری اطلاعات کاربردی را نیز فراهم آورد. هرچند تلاش شده است تا به روزترین مطالب در زمینه فناوری کریسپر جمع‌آوری شود، لیکن با توجه به سرعت زیاد پیشرفت‌ها در این زمینه (تقریباً هر هفته ابداع و دستاوردی جدید در مورد ویرایش ژنوم در دنیا گزارش می‌شود)، تعقیب و پوشش تمام دستاوردها در این حوزه عملاً میسر نبود و تلاش خواهد شد در چاپ‌های بعدی کتاب مباحث کامل‌تر و جامع‌تری ارائه شود.

تلاش شده است که تا حد امکان مطالب با دقت کافی ارائه شود و اشکالات محتوایی و یا نگارشی در متن کتاب وجود نداشته باشد. با این حال، از خوانندگان محترم تقاضا دارم اشکالات احتمالی را به نحو مقتضی به این جانب منعکس کنند تا در ویرایش‌های بعدی، اشکالات و کاستی‌ها رفع شود.

علیرضا سیفی

دی‌ماه ۱۳۹۸