

مبانی و کاربردهای فناوری CRISPR/Cas در دستکاری ژنتیکی گیاهان

گردآوری و تدوین:

دکتر صبا علی خوشحال سرمست

(عضو هیات علمی دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان)

بی‌گمان گسترش مرزهای دانش از رسالت‌های مهم جامعه دانشگاهی است و نشر دستاوردهای ارزنده در پروراندن درخت تنومند دانش جایگاه ویژه‌ای دارد. شورای انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان بر این باور است که چاپ آثار استادان و پژوهشگران می‌تواند افزون بر گسترش یافته‌های علم، بستری فرهنگی برای شکوفایی اندیشه و خودباوری فراهم کند.

امید است این کتاب که یکمصد و هشتاد و نهمین اثر این مجموعه است بتواند همگام با سایر مراکز علمی کشور گامی موثر در اعتلای علمی فرهیختگان ایران زمین بردارد.

سرشناسه	:	خوشحال سرمست، مصطفی، ۱۳۶۳-
عنوان و نام پدیدآور	:	مبانی و کاربردهای فناوری <i>crispr/cas</i> در دستکاری ژنتیکی گیاهان / گردآوری و تدوین مصطفی خوشحال سرمست.
مشخصات نشر	:	گلستان: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۱۳۹۸.
مشخصات ظاهری	:	۱۲۴ ص.
شابک	:	978-622-621224-3
وضعیت فهرست نویسی	:	فیفا
موضوع	:	سیستم‌های کریسپر کس
موضوع	:	CRISPR-Cas systems
موضوع	:	ژنتیک گیاهی — مهندسی
موضوع	:	Plant genetic engineering
موضوع	:	ویرایش ژنوم
موضوع	:	Gene editing
شناسه افزوده	:	دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
رده بندی کنگره	:	۶۲۳QD
رده بندی دیویی	:	۵۷۲/۸ — ۷۸
شماره کتابشناسی ملی	:	۰۰۱۳۴۴

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

نام کتاب: مبانی و کاربردهای فناوری *CRISPR/Cas* در دستکاری ژنتیکی گیاهان

گردآوری و تدوین: مصطفی خوشحال سرمست

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

چاپ و صحافی: مکی

نوبت چاپ: اول

مشخصات ظاهری: ۱۲۴ صفحه

تاریخ نشر: ۱۳۹۸

شمارگان: ۲۰۰ جلد

قیمت: ۲۵۰۰۰۰ ریال

شابک: ۹۷۸-۶۲۲-۶۲۱۲-۲۴-۳

امور توزیع و فروش: گرگان، میدان بسیج، پردیس جدید، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تلفن و نمابر: ۰۱۷-۳۲۴۷۶۱۳

کدپستی: ۴۹۱۳۸-۱۵۷۳۹

پیشگفتار نویسنده

نزدیک به یک دهه از دستکاری ژنوم موجودات به کمک فناوری کریسپر Cas می‌گذرد. در اوایل سال ۲۰۰۵ دو گروه تحقیقاتی نا‌حدی سازوکار سیستم کریسپر را در گونه‌های آرکیا^۱ (آرکی باکتری‌ها یا باکتری‌های باستانی) و برخی باکتری‌ها مشخص نمودند ولی کاربرد این فناوری در ویرایش ژنوم پستانداران و بعد گیاه از سال ۲۰۱۲ و به مقدار بیشتر در سال ۲۰۱۳ آشکار شد. در رابطه با کاربردی نمودن و حق مالکیت سیستم کریسپر Cas بحث‌های زیادی بین دو دانشگاه پیشرو در این زمینه، یعنی انستیتو فناوری ماساچوست (MIT) (گروه تحقیقاتی فنگ ژنگ) در بوستون آمریکا و دانشگاه برکلی کالیفرنیا (گروه تحقیقاتی جنیفر دودنا) صورت گرفت که در نهایت دادگاه ایالت متحده، حق مالکیت معنوی استفاده از کرپ در یوکاریوت‌ها را به MIT داد. هر چند که افراد بسیاری این حق را برای دانشگاه برکلی متصور بودند ولی این دانشگاه فقط توانست که حق مالکیت سیستم کریسپر را در اروپا بدست آورد. طی کمتر از یک سال، سیار از گونه‌های گیاهی با استفاده از این روش مورد دستکاری ژنتیکی قرار گرفتند. این فناوری علاوه بر غیر مال نمیدن یک مکان ژنی با استفاده از شکست دو رشته DNA، قابلیت چشمگیری چون تنظیم بیان ژن، استفاده از آنزیم Cas9 جهش یافته، ورود هدفمند ژن به یک جایگاه ژنی خاص در موجود میزبان، بردن ژنات DNA با اندازه مختلف در ژنوم، نشاندار نمودن یک توالی خاص در ژنوم، غیر فعال نمودن همزمان چند مکان ژنی با استفاده از یک سازه ژنی، دقت بالا در خاموش نمودن ژن، غیر فعال نمودن بسیاری از ویرس‌ها، اتصال به تک رشته RNA و بسیاری از کاربردهای دیگر را در خود دارد. این فناوری به دلیل هدف قرار دادن رشته DNA، در مدت زمان کمتری به تولید گیاهان هموزیگوت منجر خواهد شد. برخی از ایرادات این فناوری مانند اتصال آنزیم Cas به نقاط غیر هدف در برخی از موارد، به تدریج با بهبود روش‌ها به کار رفته کمرنگ شده است. با توسعه روش همسانه سازی Gateway، کاربرد کریسپر به شدت آسان و سه‌نایار به طراحی یک RNA راهنما برای نقطه هدف وجود دارد که پس از جایگیری توالی RNA راهنما در سازه دارنده ژن Cas9، این سازه به سهولت به وسیله اگروباکتریوم یا تفنگ ژنی در سلول گیاهی هدف چه به صورت موقت یا دائمی قابلیت بیان خواهد داشت. این روش به وسیله ترانسفورماسیون همزمان^۲ دو سازه مجزا RNA راهنما و ژن

۱. (یک گروه غیر عادی از تک سلولی‌های بسیار مقاوم به شرایط سخت محیطی) Archaea

۲. انتقال همزمان و جداگانه دو سازه ژنی یا پلاسمید به درون یک تک سلول به وسیله اگروباکتریوم یا حتی روش - Co-transformation
های دیگر انتقال ژن را گویند)

Cas نیز قابل استفاده خواهد بود. بخشهایی از این کتاب حاصل تحقیقات و تجربیاتی است که نویسنده در سال ۲۰۱۴ و ۲۰۱۵ در رابطه با سیستم کریسپر Cas و همسانه سازی Gateway در دانشگاه کالیفرنیا بدست آورده است. مطالب تدوین شده در این کتاب تا حد ممکن ساده شده است و سعی گردیده تا آخرین پیشرفت های صورت گرفته با استفاده از این فناوری را در گیاهان بیان نماید. اگرچه که معادل یابی بسیاری از واژگان جدید مورد پذیرش همگان دشوار است ولی سعی شده از معانی نزدیک و در برخی موارد از اصل واژه برای جلوگیری از سردرگمی خواننده استفاده شود. از استادان و دانشجویان عزیز و سایر صاحب نظران که این کتاب را مورد استفاده قرار می دهند تقاضا دارم در صورت مشاهده اشکال در کتاب که به اصلاح نیاز دارد، با گوشزد نمودن، اینجانب را قرین امتنان فرمایند.

مصطفی خوشحال سرمست

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گرگان

دی ماه ۱۳۹۸

۱	فصل اول - مقدمه
۳	تاریخچه کریسپر
۳	شواهد اولیه
۵	نامگذاری
۷	شناسایی پروتئین ها مرتبط با کریسپر
۱۰	دو مطالعه تاثیر گذار در رابطه با فهم کارکرد کریسپر Cas
۱۵	تنوع در نقش و عملکرد سبب های کریسپر
۱۶	دعوت صاحب حق مالکیت کریسپر MIT و برکلی
۱۹	فصل دوم- اجزای کاربردی سیستم مبتنی بر CRISPR
۲۲	پروتئین های وابسته به کریسپر یا Cas
۲۴	آرایه های کریسپر
۲۵	پروموتور
۲۵	تکرارها
۲۷	فاصله انداز
۲۸	موتیف نزدیک پروتواسپیسر (PAM)
۲۸	کریسپر آر ان ای (CRISPR RNAs)
۲۹	سازه بیان RNA راهنما (sgRNA)
۲۹	سازه بیان Cas9
۳۰	روش های بررسی جهش ایجاد شده در اثر کریسپر Cas9
۳۰	استفاده از ژن های گزارشگر برای تایید جهش هدفمند ایجاد شده
۳۱	استفاده از اندونوکلاز ها برای تایید موتاسیون هدفمند
۳۱	استفاده از PAGE برای تایید جهش هدفمند

۳۱	 استفاده از ذوب با تفکیک پذیری بالا برای تایید موتاسیون هدفمند
۳۲	 استفاده از توالی یابی با راندمان بالا برای تایید جهش های هدفمند
۳۲	 استفاده از توالی یابی Sanger برای تایید جهش هدفمند

فصل سوم - چگونه فعالیت کریسپر Cas

۳۵	 مقایسه کریسپر، انگشت روی و TALEN
۳۹	 مزیت و کاربرد های کریسپر
۴۲	 بهبود دقت کریسپر
۴۴	 مقایسه کریسپر و RNAi (حله گر RNAi)
۴۴	 کاربرد فناوری کریسپر در گیاهان
۵۶	 مباحث اخلاقی پیرامون سیستم کریسپر Cas9
۵۸	 نتیجه گیری

فصل چهارم - نحوه عملی کار با سیستم کریسپر Cas9

۶۱	 طراحی آر آن ای راهنما
۶۹	 اتصال دو رشته RNA راهنما طراحی شده
۶۹	 برش حامل pEnChimera (هضم آنزیمی حامل)
۷۰	 مرحله اتصال RNA راهنما به حامل هضم شده با آنزیم
۷۱	 انتقال حامل به درون باکتری <i>E-Coli</i>
۷۲	 واکنش Gateway
۷۴	 نحوه تراریزش اگروباکتریوم با حامل بیان دارای Cas9
۷۶	 سیستم بیان موقت ژن در برگ های توتون با استفاده از agroinfiltration

فصل پنجم - فناوری Gateway

۸۱	 ناحیه att
۸۱	 پروتئین های عامل نو ترکیبی

۸۲	واکنش های نو ترکیبی Gateway
۸۲	واکنش BP
۸۲	واکنش LR
۸۵	ژن ccdB
۸۵	روش های ایجاد entry clones (کلون ابتدایی)
۸۷	طراحی آغازگرهای PCR دارای ناحیه attB
۸۷	طراحی آغازگر فوروارد
۸۸	طراحی آغازگر ریورس برای بیان ژن native
۸۸	طراحی آغازگر ف. برار د برای اتصال انتهای آمینی
۸۹	طراحی آغازگر رشته معکوس با reverse
۹۰	طراحی آغازگر ریورس برای اتصال یک فیوژن (پروتئین) به انتهای کربوکسیل
۹۱	تولید محصول PCR دارای ناحیه attB
۹۱	نمونه DNA
۹۲	وجود آوردن کلون ابتدایی با استفاده از واکنش نو ترکیبی
۹۲	همسانه سازی ژن به کمک کیت PENTACED-TOPO
۹۴	واکنش LR
۹۴	نحوه ساخت سازه ژنی با دو یا سه ژن مستقل به کمک Gateway
۹۶	اتصال دو ژن در یک سازه بیان
۹۹	اتصال سه ژن در یک سازه بیان
۱۰۳	منابع
۱۲۱	واژه نامه