

مهندسی ژنوم

تالیف

محمد سبزه‌اری

شکوفه مجتوی

زهره زمان زاده طالخونچه



- سرشناسه : سبزه‌زاری، محمد، ۱۳۶۸ -
عنوان و نام پدیدآور : مهندسی ژنوم / تألیف محمد سبزه‌زاری، شکوفه مجتوی، زهرا زمان‌زاده‌طالخنچه.
مشخصات نشر : دزفول: آهورا قلم، ۱۳۹۸.
مشخصات ظاهری : ۱۷۶ ص.: مصور (بخشی رنگی)، جدول (بخشی رنگی)، نمودار (بخشی رنگی).
شابک : 978-600-426-168-5
وضعیت فهرست نویسی : فیپا
یادداشت : ص.ع. به انگلیسی: Mohammad Sabzehzari, Shokoufeh Mojtavi, Zahra Zamanzadeh.
Genome engineering
یادداشت : کتابنامه.
موضوع : ژنتیک - مهندسی
موضوع : Genetic engineering
شناسه افزوده : مجتوی، سیده شکوفه، ۱۳۶۴ -
شناسه افزودن : Mojtavi, Seyede shekofeh
شناسه افزوده : زمان‌زاده‌طالخنچه، زهرا، ۱۳۵۹ -
رده بندی کنگره : ۱۳۹۸ م۲س / QH۴۴۲
رده بندی دیویی : ۶۶
شماره کتابشناسی ملی : ۵۱ ۶۵۴



■ عنوان: مهندسی ژنوم

■ ترجمه: محمد سبزه‌زاری - شکوفه مجتوی - زهرا زمان‌زاده‌طالخنچه

■ ناشر: آهورا قلم

■ شمارگان: ۱۰۰۰ نسخه

■ قطع: وزیری

■ نوبت چاپ: اول - بهار ۱۳۹۸

■ چاپ: گاندی

■ قیمت: ۴۰۰۰ تومان

■ شابک: ۵-۱۶۸-۴۲۶-۶۰۰-۹۷۸

انتشارات آهورا قلم

آدرس: دزفول، خیابان خیمه گاه بین خیابان قاضی و میرداماد، کوچه بنفشه پ ۱۹۴

تلفن: ۰۶۱۴۲۲۴۹۱۲۴ - ۰۹۱۶۶۴۱۵۸۹۴

پست الکترونیک: ahoora.ghalam@yahoo.com

آدرس اینترنتی: www.ahooraghalam.ir

حق چاپ و نشر محفوظ است

فهرست

۱	بخش ۱
۱	مبانی مهندسی ژنوم
۲	فصل ۱
۲	مقدمه‌ای بر مهندسی ژنوم
۲	مقدمه
۵	فصل ۲
۵	مهندسی ژنوم با ZFN
۵	مقدمه
۵	دمین انگشت روی
۷	دمین نوکلئازی FokI
۸	رابطاها
۹	روش‌های مهندسی انگشت روی‌ها
۹	گزینش متوالی ZF ها با اختصاصیت جدید توسط کتابخانه تصادفی و نمایش فازی
۱۰	کتابخانه دوبخشی و آرشیو دوانگشتی
۱۰	چینش مودیولار
۱۱	گزینش ZF ها از کتابخانه تصادفی مبتنی بر باکتری
۱۲	چینش وابسته به زمینه (CoDA)
۱۳	اختصاصیت ZFN ها
۱۵	فصل ۳
۱۵	مهندسی ژنوم با TALEN
۱۵	مقدمه
۱۵	TALEN ها

۱۷	روش‌های ساخت TALEN ها
۱۸	چینش مبتنی بر همسانه‌سازی گلدن‌گیت
۱۸	چینش مبتنی بر PCR گلدن‌گیت
۱۹	چینش REAL
۱۹	سامانه FLASH
۲۱	اختصاصیت TALEN ها
۲۳	فصل ۴
۲۳	مهندسی ژنوم CRISPR/Cas9
۲۳	مقدمه
۲۳	CRISPR/Cas
۲۴	CRISPR/Cas در مهندسی ژنوم
۲۶	اختصاصیت CRISPR/Cas9
۲۷	راهنماهای Double-Nicking و Prime Editing-Cas9 جهت مهندسی ژنوم
۲۹	نرم افزارهای طراحی اهداف gRNA و پیش‌بینی کاربردای آف‌تارگت
۲۹	ساخت حامل‌های CRISPR/Cas9
۳۰	روش‌های معرفی CRISPR/Cas9 به سلول و سازواره‌ها
۳۲	کاربردهای CRISPR/Cas9 در تحقیقات علوم حیات
۳۹	فصل ۵
۳۹	مهندسی ژنوم با CRISPR/Cpf1
۳۹	مقدمه
۴۱	فصل ۶
۴۱	مهندسی ژنوم با NgAgo
۴۱	مقدمه

بخش ۲.....	۴۳
کاربرد مهندسی ژنوم.....	۴۳
فصل ۷.....	۴۵
مهندسی ژنوم گیاهان.....	۴۵
مقدمه.....	۴۵
جهش‌زایی هدفمند از طریق ZFN ها.....	۴۷
جهش‌زایی هدفمند با TALEN.....	۴۷
جهش‌زایی هدفمند با CRISPR/Cas9.....	۴۸
هدف‌گیری ژن و دگر جهش‌زایی در گیاهان عالی از طریق مهندسی ژنوم.....	۴۹
فصل ۸.....	۵۱
مهندسی ژنوم کرم‌ها.....	۵۱
مقدمه.....	۵۱
ناک‌اوت هدفمند از طریق ترانسپوزون <i>Mos1</i>	۵۳
ناک‌اوت هدفمند از طریق ZFN ها.....	۵۳
ناک‌اوت هدفمند با TALEN.....	۵۴
ناک‌اوت هدفمند با CRISPR/Cas9.....	۵۴
مهندسی ژنوم از طریق ZFN، TALEN و CRISPR.....	۵۵
کاربرد فناوری مهندسی ژنوم.....	۵۷
فصل ۹.....	۵۹
مهندسی ژنوم حشرات.....	۵۹
مقدمه.....	۵۹
تعدیل هدفمند ژنی از طریق ZFN.....	۶۰
تعدیل هدفمند ژنی از طریق TALEN.....	۶۰

۶۱	تعدیل هدفمند ژن از طریق سامانه CRISPR/Cas9
۶۲	دستوالعمل هدف‌گیری ژن‌ها با ابزارهای مهندسی ژنوم
۶۲	انتخاب ابزار مهندسی ژنوم
۶۲	طراحی هدف
۶۳	ساخت حامل‌های TALEN یا gRNA
۶۴	طرح آمیزی
۶۴	مشکلات مهندسی ژنوم در کرم ابریشم
۶۴	کشندگی بالا
۶۴	چندشکلی نوکلئید درون و بین سوبه‌ای
۶۵	اثرات آفاتارگت
۶۵	کاربردهای TALEN و CRISPR/Cas9 در کرم ابریشم
۶۵	حذفیات بزرگ
۶۶	ناک‌این ژنی
۶۷	فصل ۱۰
۶۷	مهندسی ژنوم خارپوستان
۶۷	مقدمه
۶۸	دستورزی ژن‌های توتیای دریائی
۶۹	مهندسی ژنوم توتیای دریائی با ZFN
۷۰	مهندسی ژنوم توتیای دریائی با TALEN
۷۱	آشکارسازی بیان ژن‌ها با گزارشگرها
۷۳	فصل ۱۱
۷۳	مهندسی ژنوم ماهی‌ها
۷۳	مقدمه

۷۴	فنون مهندسی ژنوم در ماهی
۷۵	دستورزی‌های چندگانه در ژنوم گورخرماهی
۷۷	فصل ۱۲
۷۷	مهندسی ژنوم دوزیستان
۷۷	مقدمه
۷۹	مهندسی ژنوم در دوزیستان
۸۰	مهندسی ژنوم قورباغه با ZFN
۸۱	مهندسی ژنوم قورباغه با TALEN
۸۲	مهندسی ژنوم قورباغه با CRISPR/Cas9
۸۳	مهندسی ژنوم سمندر با ZFN
۸۳	مهندسی ژنوم سمندر با TALEN
۸۴	مهندسی ژنوم سمندر با CRISPR/Cas9
۸۵	فصل ۱۳
۸۵	مهندسی ژنوم موش
۸۵	مقدمه
۸۶	مهندسی ژنوم موش
۸۶	روش‌های طراحی و اعتبارسنجی فنون مهندسی ژنوم
۸۸	روش‌های تزریق CRISPR/Cas9 به اووسیت‌ها
۸۸	تزریق CRISPR/Cas9 به روش RNA
۸۹	تزریق CRISPR/Cas9 به روش پلاسمید
۸۹	مقایسه روش‌های تزریق پلاسمید و RNA
۹۰	دستورزی‌های ژنتیکی به واسطه الیگو
۹۰	جهش‌های نقطه‌ای

درج برچسب	۹۱
ناک‌این و ناک‌اوت ژن در موش	۹۱
ناک‌این و ناک‌اوت ژنی شرطی در موش	۹۲
مهندسی ژنوم خرموش	۹۳
مهندسی ژنوم خرموش با ZFN	۹۴
مهندسی ژنوم خرموش با TALEN	۹۵
مهندسی ژنوم خرموش با CRISPR/Cas9	۹۵
اختصاصیت CRISPR در هدف‌گیری جایگاه‌های ژنومی	۹۶
فصل ۱۴	۹۷
مهندسی ژنوم انسان	۹۷
مقدمه	۹۷
لاین‌های سلولی	۹۷
سلول‌های ES/iPS	۹۸
مهندسی ژنوم سلول‌های انسان با نوترکیبی همولوگ	۹۸
مهندسی ژنوم سلول‌های انسان با نوکلئازها	۹۹
مهندسی ژنوم سلول‌های انسان با مگانوکلئاز (هومینگ نوکلئاز)	۱۰۰
مهندسی ژنوم سلول‌های انسان با ZFN	۱۰۱
مهندسی ژنوم سلول‌های انسان با TALEN	۱۰۳
مهندسی ژنوم سلول‌های انسان با CRISPR/Cas9	۱۰۴
تحويل نوکلئازهای مهندسی‌شده به سلول	۱۰۶
تراآلودگی شیمیایی	۱۰۶
تراآلودگی فیزیکی	۱۰۷
تراآلودگی ویروسی	۱۰۷

۱۰۸.....	تراآلودگی باکتریائی
۱۰۸.....	تراآلودگی پروتئین
۱۰۸.....	رویکردهای دستورزی ژنومی
۱۰۸.....	ناکاوت ژن
۱۰۹.....	کتابخانه‌های ناکاوت جامع ژنومی
۱۱۰.....	لاین‌های سلولی گزارشگر
۱۱۰.....	مطالعات تاریخچه به کمک ناکاین
۱۱۱.....	ژن درمانی و طریق ناکاین
۱۱۲.....	حذف یا واژگونی کروموزوم
۱۱۲.....	سایر کاربردهای مدل‌های ساختاری اتصال به DNA
۱۱۳.....	کنترل وضعیت رونویسی
۱۱۴.....	تعدیل نشانه‌های اپی‌ژنتیکی
۱۱۴.....	کنترل نوری رونویسی
۱۱۵.....	اشکارسازی برای تصویربرداری از سلول زنده
۱۱۵.....	جداسازی یک توالی DNA خاص از طریق ChIP
۱۱۶.....	ژندرمانی
۱۱۷.....	فصل ۱۵
۱۱۷.....	اخلاقیات و ایمنی زیستی در مهندسی ژنوم
۱۱۷.....	مقدمه
۱۱۸.....	مهندسی ژنوم در برابر مهندسی ژنتیک
۱۱۹.....	بعد ایمنی زیستی
۱۱۹.....	راهبرد اتحادیه اروپا
۱۲۲.....	راهبرد آمریکا

- ۱۲۲.....راهبرد کانادا
- ۱۲۲.....رویکرد ایران
- ۱۲۳.....بعد مالکیت فکری
- ۱۲۵.....منابع

www.ketab.ir

پیشگفتار مولفان

با توجه به اینکه امروزه در علم ژنتیک صحبت زیادی از فناوری CRISPR/Cas⁹ می‌شود، لذا سؤالاتی ذکر می‌شود تا مشخص کنند که آیا فناوری CRISPR/Cas⁹ می‌تواند برای به‌هترآدی موجودات مفید واقع شود یا خیر؟

برای مثال، آیا تعداد کافی مکان ژنومی برای مهندسی ژنوم بر روی ژنوم گونه مورد نظر وجود دارد؟ از آنجایی که صفات کمی یا کیفی وراثت‌پذیری دارند لذا بدون شک توسط تعدادی ژن کنترل می‌شوند. بنابراین، واضح است که پتانسیل شناسایی جایگاه‌های موثر بر این صفات وجود دارد، اما جایگاه‌هایی که قرار است هدف مهندسی ژن قرار گیرند باید یکسری خصوصیات خاص داشته باشند؛ مثلاً باید بخش قابل توجهی از واریانس ژنتیکی صفت را توجیه کنند، اثرات آنها باید مستقل از خانواده و جمعیت باشد یعنی باید در جمعیت‌های قابل مشاهده باشد و ضمناً اثر این جایگاه باید به شرایط محیطی مرتبط نباشد. با این حال، بی‌شک مطالعاتی که تاکنون در موجودات مختلف انجام شده به این نتیجه رسیده‌اند که صفات مهم معماری بدن ژن دارند یعنی اینکه همه ژن‌ها، مسیرهای بیوشیمیایی و ساختارهای تنظیمی در داخل یک سلول انجام می‌دهند. فقط هستند که کنترل ژنتیکی توسط تمام ژنوم انجام می‌شود.

به عنوان سؤالی دیگر، آیا مهارت‌های ما توانایی این را دارند که این مکان‌های ژنومی را شناسایی کنند؟ شناسایی مکان‌های ژنی هدف برای کریسپر از چالش‌های اساسی مطالعات ژنومی در صفات پلی‌ژنی است زیرا که شناسایی جایگاه به تنهایی کافی نبوده و این باید مطمئن شویم آیا جایگاه شناسایی شده واقعاً یک واریانت سببی هست یا خیر؟ برای اینکه مشخص کنیم آیا یک جایگاه واقعاً اثر مورد نظر را دارد فرایند طولانی باید طی شود و برای ناک‌اوت ژن از طریق کریسپر تجربی‌هایی در ارتباط با سلامتی موجودات و اخلاق علمی پیش خواهد آمد. بنابراین، چالش اینجاست که این فرایند طولانی و هزینه‌بر باید در هر چرخه از انتخاب انجام شود تا منجر به پیشرفت ژنتیکی شود.

به عنوان سوال بعدی، آیا مهندسی مکان‌های ژنی شناسایی شده منجر به فنوتیپ یا عملکرد مورد نظر خواهد شد؟ سوال پایانی این است اگر برای یک صفت پلی‌ژنی یک تک ژن ویرایش شود چقدر می‌تواند موثر باشد و چه اتفاقی در فنوتیپ نهایی فرد دیده خواهد شد؟

در این اینجا، مثال جالبی از مقایسه معماری ژنتیکی یک موجود با ساختار یک خودرو آورده شده است. فرض کنید شما قصد دارید سرعت خودرو را افزایش دهید (صفت: سرعت) اما شما نمی‌دانید سرعت خودرو را چه قطعه‌ای از ماشین افزایش می‌دهد و برای اینکار شما بین قطعات خودرو و سرعت ماشین باید ارتباط آماری پیدا کنید. در ابتدا خصوصیات یک میلیون خودرو را جمع آوری می‌کنید که این خصوصیات شامل رنگ، عرض، طول، ارتفاع، جنس و مواد صندلی، قیمت و غیره هستند و نهایتاً یک مطالعه ارتباطی انجام می‌دهید و به این نتیجه می‌رسید که بسیاری از خصوصیات خودرو با سرعت آن ارتباط دارند. از بین همه این خصوصیات، قیمت خودرو ارتباط بسیار معنی‌داری با سرعت خودرو دارد. با این وجود معام می‌شود که قیمت سرعت را زیاد نمی‌کند زیرا که زیاد کردن قیمت یک ماشین منجر به افزایش سرعت نمی‌شود. عامل دیگر تعداد سیلندرهاى خودرو هست؛ کاملاً واضح است که یک خودرو دو سیلندری سرعت کمتری نسبت به یک خودرو ۱۲ سیلندری دارد. با بررسی بیشتر می‌بینیم که به تعداد سیلندر از نظر همبستگی نیز ارتباط معنی‌داری با قدرت ماشین دارد و باعث افزایش سرعت ماشین می‌شود. لذا برداشتن سیلندرها سرعت ماشین صفر و با غیر فعالسازی یکی یا دوتا از سیلندرها از قدرت ماشین کاسته شده و سرعت ماشین کم می‌شود. حال سوال این است اگر تعداد سیلندرهاى خودرو دو سیلندری دوبرابر سرعت آن هم دوبرابر می‌شود؟ لزوماً اینطور نیست؛ لذا موتور یک ماشین معماری پیچیده‌ای دارد و مزه مزایش تعداد سیلندر این است که تغییرات مهم دیگری در اجزای دیگر ماشین انجام شود، مثلاً ضربه‌بردار و غیره ارتقا داده شود. بنابراین، زیاد کردن تعداد سیلندر بدون توجه به سایر اجزاء ماشین ممکن است منجر به خرابی یا افت عملکرد ماشین شود. در ساده‌ترین حالت اگر هم سرعت ماشین بیشتر شد، حداقل لازم است قدرت ترمزهای ماشین بیشتر شود تا امنیت رانندگی تضمین شود.

با وجودی که مقایسه یک سیستم بیولوژیکی با یک سیستم مکانیکی، ساخت انسان چندان منطقی نیست، اما همین بس که بدانیم نباید انتظار داشت شناخت یک یا دو جابه‌جایی مهندسی آنها بدون توجه به سایر ژن‌ها و مکانیسم‌های درگیر بتواند تغییرات چشم‌گیری در عملکرد ایجاد کند یا دقیقاً آن فنوتیپی که ما انتظار داریم بروز کند. بدون شک مهندسی ژنوم پتانسیل این را دارد که برای صفات کیفی یا صفاتی که با تعداد محدودی ژن با اثر بزرگ موثر واقع شود اما برای بیشتر صفات اقتصادی و صفات پیچیده در به‌نژادی جای‌ما و اگرهای بسیاری باقی است.

محمد سبزه زاری

دانشگاه تهران