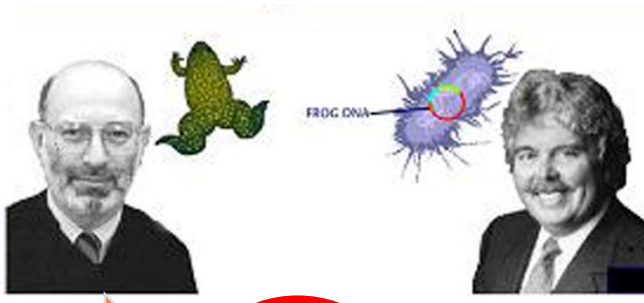
تکنولوژی زیستی (بیوتکنولوژی)

مهندسی ژنتیک: دست ورزی هدفمند ژن ها برای رسیدن به یک یا چند هدف خاص.



* E.COLI (اشریشیاکلای) اولین جاندارپست که تحت دست ورزی قرار گرفته است.

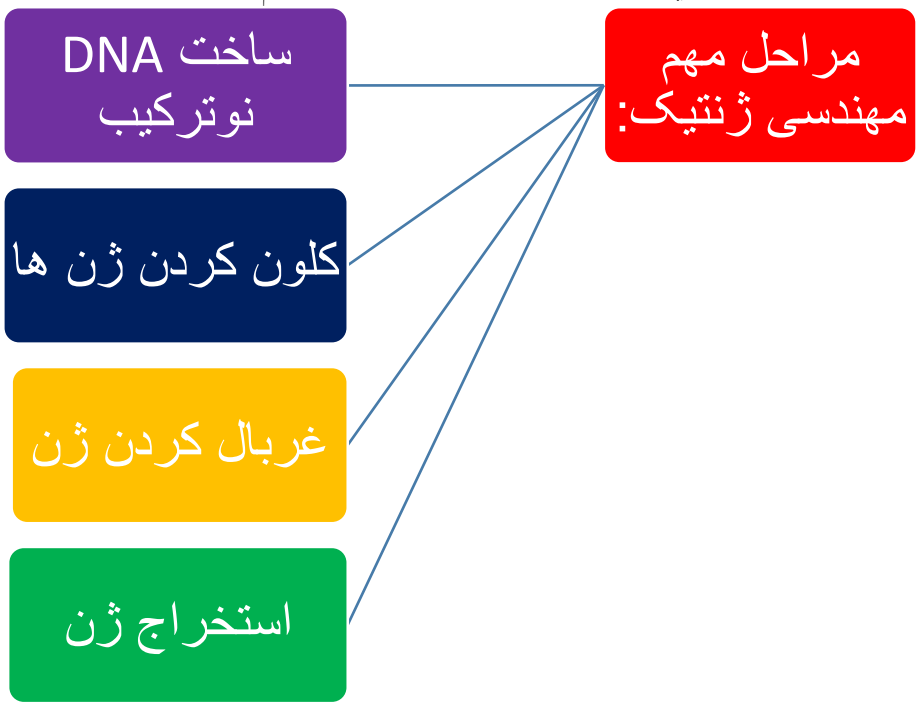
* rRNA با پروتئین ریبوزومی اشتباه نشود.

* ژن rRNA هنگامی که درون سلولهای قورباغه بوده توسط آنزیم RNA پلیمراز I سنتز می شده ولی هنگامی که به درون باکتری وارد می شود توسط RNA پلیمراز پروکاریوتی سنتز می گردد.

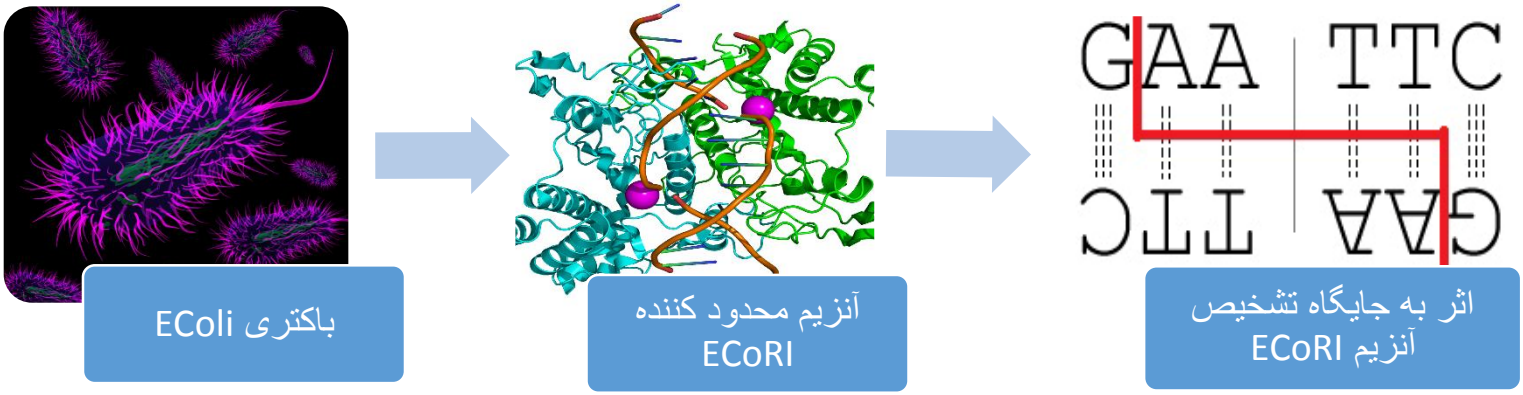
* یکی از مهمترین هدف ها در مهندسی ژنتیک، تولید ژن یا فرآورده های آن به مقدار انبوه است.

ابزارهای مهندسی ژنتیک:

- وکتورها: : وسیله ای که ژن مورد نظر را به درون سلول حمل کند، این وسیله را حامل یا وکتور می گویند.
  - پلازمیدها: DNAهای حلقوی که در بعضی از باکتریها وجود دارند و مستقل از کروموزوم اصلی همانند سازی می کنند و درون آن ژن هایی وجود دارد که در کروموزوم اصلی باکتری وجود ندارد. مثلاً ژن مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک (تترا سایکلین)
  - باکتریوفاژها: ویروس هایی هستند که میزبان آنها باکتری است. وقتی باکتریوفاژ باکتری را آلوده می کند DNA آن در سلول میزبان شروع به همانند سازی می کند. با قرار دادن ژن خارجی در DNA بااکتریوفاژ امکان تکثیر آن فراهم می شود (چه باکتریوفاژ وارد چرخه لتیک شود، چه وارد چرخه لیزوژنی)
- آنزیم های محدود کننده: آنزیم هایی باکتریایی هستند (فقط مختص باکتریها) که توالی کوتاه و خاصی از DNA را شناسایی کرده و آنرا برش می دهند
- آنزیم DNAلیگاز: برقراری پیوند فسفودی استرمیان دو قطعه DNA



*اولین محصولی که با مهندسی ژنتیک ساخته شد ، نفش آنزیمی داشت و ژن آن توسط DNAپلیمراز و RNA آن توسط RNA پلیمراز پروکاریوتی ساخته شد.



الف) ساخت DNA نوترکیب:

مثال: برای ساخت DNA نوترکیب از ژن انسولین انسانی:

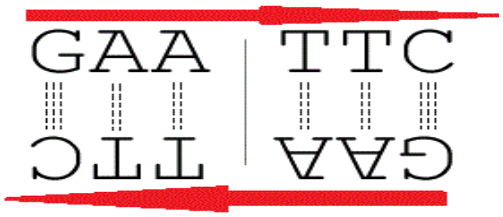
ژنی که ساخت ECoRI را رهبری می کند درون DNA حلقوی قرار دارد ولی محل بیان آن ، یعنی محل عمل آنزیم ؛ روی DNA خطی قرار دارد. ECoRI یک آنزیم باکتریایی است و از جنس پروتئین است و ژن آن توسط RNA پلیمراز پروپوکاریوتی رونویسی شده است.

*آنزیم محدود کننده نوعی نوکلئاز است.

* برای آنکه یک توالی بتواند جایگاه تشخیص آنزیم باشد، ۲شرط لازم است:

۱- ۴یا ۶ یا ۸ نوکلوئید داشته باشد

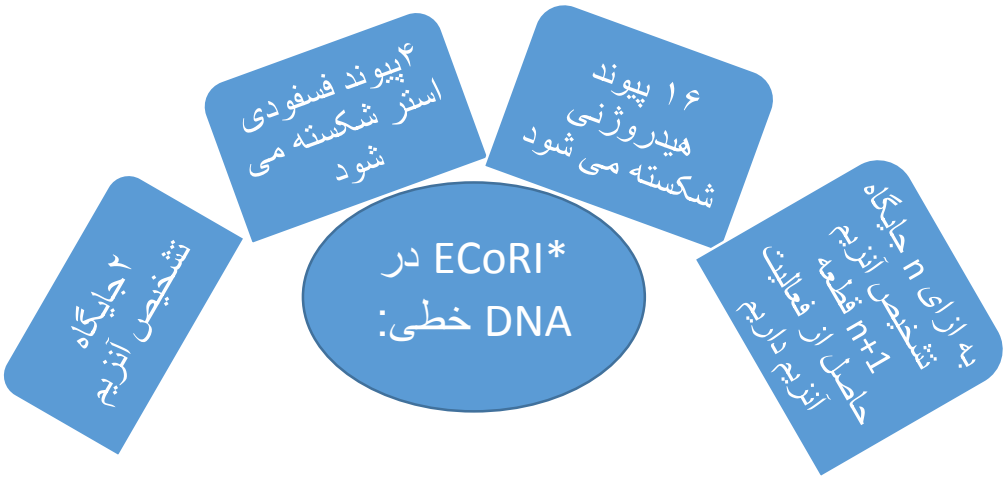
۲- از بالا یا پایین یکسان خوانده شود :

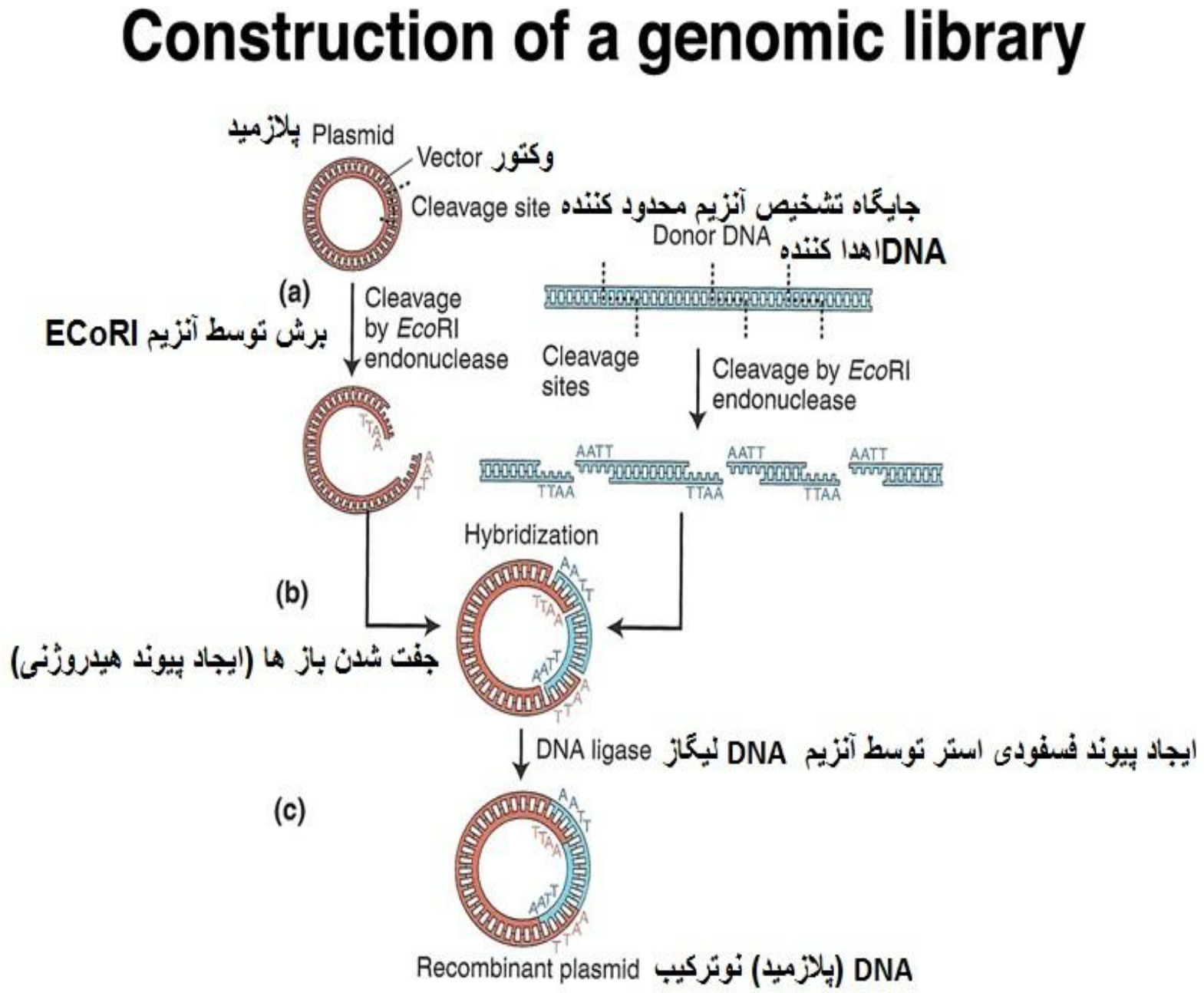


* به ازای n جایگاه تشخیص آنزیم 2n انتهای چسبنده ایجاد می شود

* به جانداری که دارای DNA نوترکیب باشد، جاندار ترانژنی گویند

* بیشتر (نه همه، نه اغلب و...) آنزیم های محدود کننده انتهای چسبنده ایجاد می کنند.





ب) کلون شدن ژن:

بعداز آنکه DNA نوترکیب ساخته شد آن را در مجاورت باکتریها قرار می دهند تا باکتریها آنرا جذب کنند. تعداد کمی از باکتریها DNA نوترکیب را جذب می کنند.

DNA نوترکیب بعد از ورود به باکتری، با استفاده از دستگاه همانند سازی باکتری، همانند سازی می کند.

***وقتی از یک ژن نسخه های متعدد یکسان ساخته می شود می گویند آن ژن کلون شده است.**

*** در مرحله کلون شدن آنزیم DNA پلیمراز و هلیکاز فعالیت زیادی دارند.**

ج) غربال کردن:

در این مرحله باکتریهایی را که DNA نوترکیب را جذب کرده اند از باکتری هایی که DNA نوترکیب را جذب نکرده اند جدا می کنند، این عمل را غربال کردن می گویند

مثلاً پلازمیر دارای ژن مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک است بنابراین آنهایی که DNA نوترکیب را جذب کرده اند نسبت به یک آنتی بیوتیک خاص مثلاً تترا سایکلین مقاوم شده اند بنابراین می توان با اضافه کردن تتراسایکلین به محیط کشت باکتریها آنها را غربال نمود.

د) استخراج ژن:

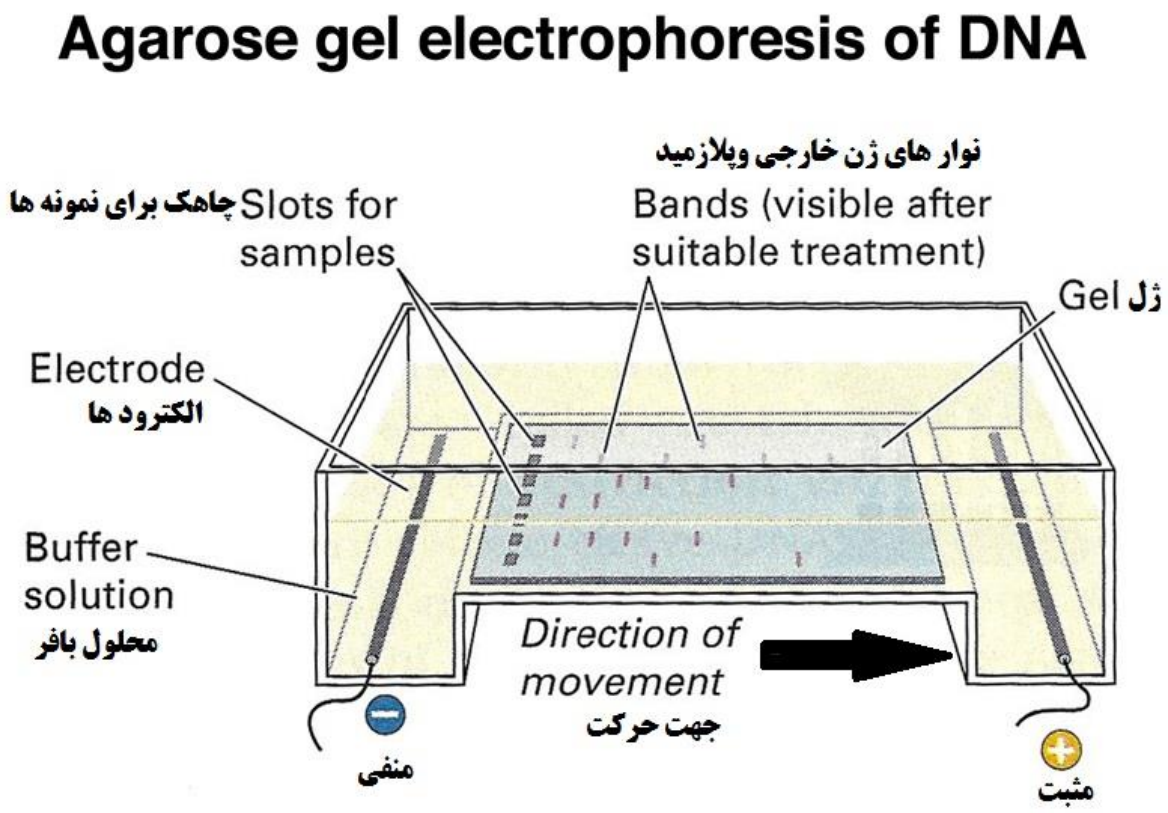
باید برای خارج نمودن ژن از **همان آنزیم محدود کننده** ای استفاده شود که برای ساخت DNA نوترکیب استفاده شده و تحت اثر این آنزیم دو نوع DNA بدست می آید یکی قطعات پلازمید و دیگری ژن خارجی.

***DNA به علت داشتن گروه فسفات بار منفی دارد(از ۶- تا ۱۲-) .**

*** برای جداسازی قطعات DNA و پروتئین براساس اندازه از روش الکتروفورز در ژل استفاده می شود.**

*** همه ی قطعات DNA به علت وجود گروه فسفات، بار منفی دارند پس در الکترو فورز آنها، اندازه مهم است.**

*** پروتئین ها می توانند بار+ و یا - داشته باشند پس در الکترو فورز آنها هم بار و هم اندازه مهم است.**



***تخمین اندازه و تعداد قطعات DNA براساس الکتروفورز:**

۱)هرچه توان بسمت قطب مخالف + نزدیک تر باشد اندازه ی قطعات کوچکتر است.

۲)هرچه ضخامت توان بیشتر باشد تعداد قطعات DNA بیشتر است.

***در DNA حلقوی به ازای n جایگاه تشخیص آنزیم ، n قطعه تولید می شود و در مولکولهای خطی به ازای n جایگاه تشخیص آنزیم n+1 قطعه تولید می شود.**

استفاده از مهندسی ژنتیک در پزشکی:

۱.داروها: علت بسیاری از بیماریهای ژنی نداشتن یک نسخه ی فعال از یک ژن خاص و در نتیجه عدم تولید یک پروتئین ویژه در بدن است حال اگر این پروتئین خاص را با استفاده از مهندسی ژنتیک در باکتریها تولید کنیم بسیار ایمن تر است. مهمترین این داروها:

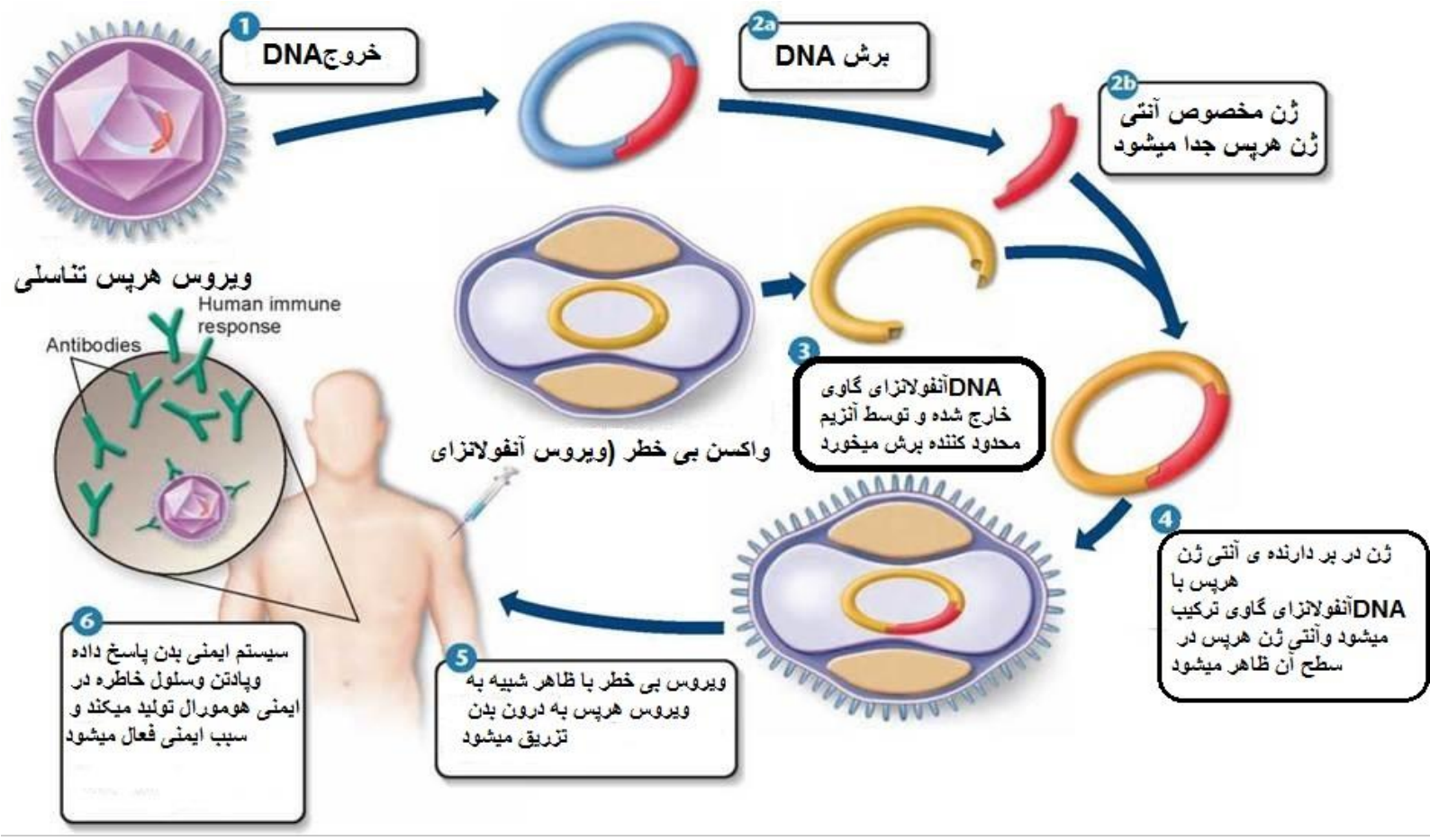
۱- انسولین(درمان دیابت نوع I) ۲- هپارین (داروی ضد انعقاد خون) ۳- فاکتور انعقادی شماره VIII(درمان هموفیلی) ۴- اریتروپویتین(درمان آنمی)

***داروهایی که در مهندسی ژنتیک تولید می شوند همگی پروتئینی هستند در نتیجه نمی توان لیپیدها، هورمونهای استروئیدی و... را با این روش تولید کرد.**

۲.واکسن ها: واکسن مخلوطی است حاوی میکروب ضعیف یا کشته شده یا سم میکروب خنثی شده است و هدف آن ایجاد ایمنی فعال در بدن است، با استفاده از مهندسی ژنتیک واکسن های تولید شده امنیت بیشتری برای مصرف دارند زیرا ممکن است در روش های قدیمی میکروب ها کشته نشده باشند و موجب بیماری شوند.

*در تولید واکسن با مهندسی ژنتیک ، ابتدا ژن تولید آنتی ژن سطحی را جدا کرده و آن ژن را با DNA یک میکروب غیر بیماریزا نوترکیب می کنیم ، سپس با بیان ژن اول در میکروب غیر بیماریزا یا در میزبان ویروس (اگر وکتور ژنوم ویروسی باشد) و ساخت مقدار کمی آنتی ژن سطحی ، آنتی ژن های میکروب بیماریزا در میکروب بی خطر ظاهر میشود سپس آنرا بعنوان واکسن تزریق میکنیم ، سیستم ایمنی بدن پاسخ داده و باعث ایجاد ایمنی فعال میشود.

مثالی از واکسن هایی که به روش مهندسی ژنتیک تولید شده است: هرپس تناسلی در این روش ژنی که در ویروس هرپس ساخت آنتی ژن های سطح آنرا رهبری می کند را جدا کرده و درون یک ویروس غیر بیماریزا قرار می دهند و آنرا کشت داده و به درون بدن منتقل می کند تا ایمنی فعال علیه آنتی ژن هرپس ایجاد شود. در این مثال ویروس بی آزار، ویروس آبله ی گاوی است.



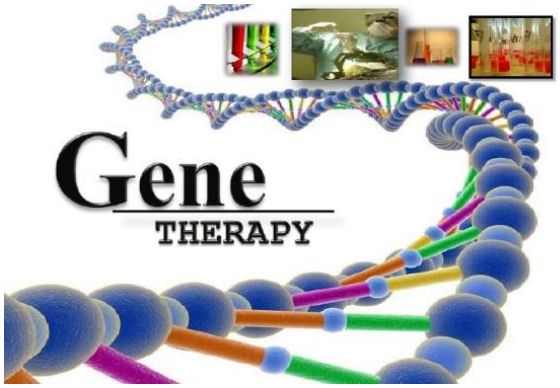
***روی ژن هرپس تناسلی ۲جایگاه تشخیص و روی ژن آبله ی گاوی فقط ۱جایگاه تشخیص آنزیم وجود دارد.**

*** وکتور استفاده شده در مثال فوق ویروس آبله ی گاوی (DNA آن) می باشد.**

***واکسن هرپس شامل آبله ی گاوی نزاژنی است.**

*** از بین مراحل مهندسی ژنتیک غربال کردن و استخراج ژن در مثال بالا استفاده نشده.**

***ژن خارجی در این مثال غیر بیماریزا است .**



ژن درمانی :

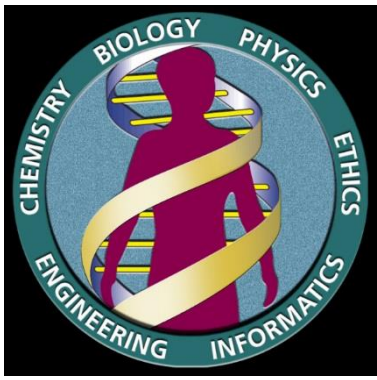
با استفاده از ژن های سلولهای بنیادی بیمارصورت میگیرد .

در این روش حتماً باید از سلولهایی استفاده شود که بطور طبیعی مسئول ساخت پروتئین خاص و مد نظرهستند.

برای اولین بار روی دختر ۶ساله سیاه پوستی که مبتلا به بیماری کشنده دستگاه ایمنی بود صورت گرفت در این بیماری به علت جهش در یک ژن خاص یک آنزیم مهم دستگاه ایمنی ساخته نمی شود (آنزیم مسئول کشتن میکروب های بلعیده شده)محققان این سلولهای بنیادی را از مغز استخوان کودک خارج کردند و در هر کدام از آنها یک نسخه ی فعال از ژن سازنده ی آنزیم های کشنده را قرار دادند.

*در ژن درمانی حتماً باید سلولها از بدن خارج شوند.

پروژه ژنوم انسان (HGP)



پروژه ژنوم انسان دو هدف دارد:

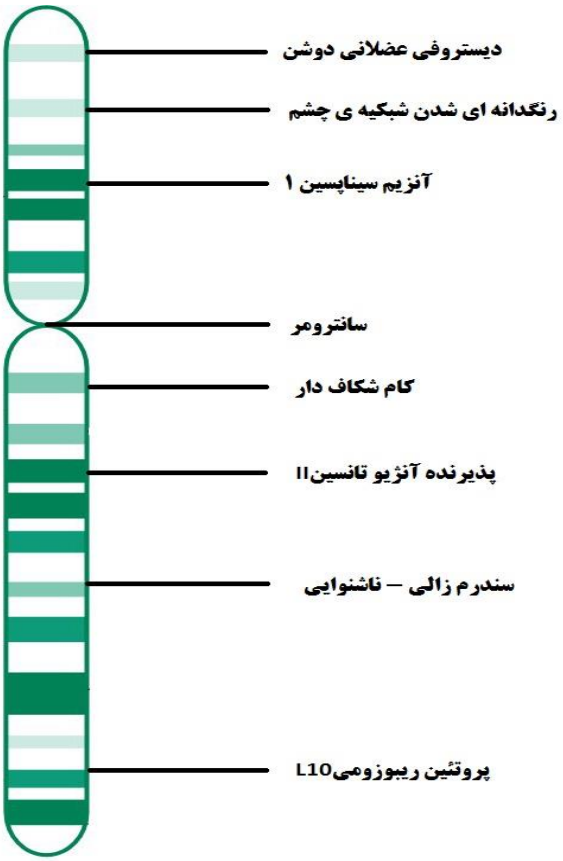
۱- تعیین توالی نوکلئوتیدی در کل ژنوم

۲- تهیه ی نقشه ی ژنی ؛ یعنی هر ژن روی کدام کروموزوم و در کجای آن قرار دارد

ژنوم: به کل محتوای DNA یک جاندار ژنوم آن گفته می شود. این DNA می تواند DNA هسته به همراه DNA متیوکندری و سیتوپلاسم در یوکاریوتها باشد.

***برای بررسی ژنوم هسته باید در یک هسته 2n تعداد n کروموزوم در جاندار XX و n+1 در جاندار XY را بررسی کرد . پس در یک گونه باید از جاندار XY (یعنی n+1) استفاده کرد .**

***حدود ۴۰۰۰بیماری ژنتیکی در انسان وجود دارد که امروزه جایگاه و توالی همه ی ژنهای مربوط به آنها شناسایی شده است.**



***روی کروموزوم x انسان بیش از ۴۵۰ ژن و حدود ۲۰۰ ناهنجاری ژنتیکی وجود دارد.**

***در شکل زیر ژنیب مهم است و حفظ شود و میزان فاصله از سانترومرنیز بسیار مهم می باشد:**

***بیماری های وابسته به x در مردان شایع تر است. (زیرا نمی توانند حالت نافل داشته باشند)**

*** بیماری های وابسته به X هیچگاه از پدر به پسر به ارث نمی رسد زیرا پسر کروموزوم X خود را از مادر و Y را از پدر دریافت کرده است.**

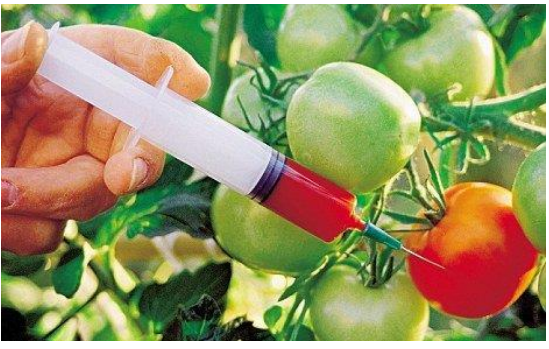
کاربردهای مهندسی ژنتیک در کشاورزی:

در گذشته هر محصول یا بذر مفید گیاهان ، توسط کشاورزان انتخاب می شد و با کاشت آن ها در نسل های بعد گیاهان را اصلاح می کردند.

در حال حاضر با مهندسی ژنتیک ، محصول ژن مفید ، یا خود ژن مفید را توسط باکتری تولید کرده و به داخل سلول های گیاهی وارد میکنند .

برای اولین بار برای مهندسی ژنتیک گیاهان از پلازمید باکتری ایجاد کننده ی گال استفاده شد ، در این روش ژن مضر Ti (القا کننده ی ایجاد تومور را از پلازمید این باکتری خارج نموده و ژن های مورد نظر را به جای آن اضافه کردند و سپس این پلازمید های نوترکیب را وارد سلول گیاهی کردند.

X
Human



امروزه از روش دیگری به نام تفنگ ژنی برای وارد کردن ژن های مثبت به گیاهان استفاده میشود ؛ در این روش ژن مورد نظر را بطور مستقیم (یعنی بدون پلازمید) توسط تفنگ ژنی به سلول گیاهی شلیک میکنند و گیاه صفات مورد نظر را بروز میدهد.

*پلازمید Ti وارد سلولهای گیاهانی مانند گوجه فرنگی، توتون، گندم و سویا می شود و آنها را آلوده می کند .

*در مهندسی ژنتیک پلازمید Ti را بعنوان وکتور برای گیاهان مورد استفاده قرار می دهند ولی ابتدا ژن القا کننده ی ایجاد تومور را از آن خارج کرده و ژن مورد نظر را جانشین آن می کنند.

* برای خارج کردن ژن Ti از پلازمید Ti ، ۴پیوند فسفودی استر شکسته می شود.

*چون پلازمید Ti نوترکیب است وارد هر گیاهی شود آنرا ترانژنی خوانند.

مثال های دیگر از کاربرد مهندسی ژنتیک در کشاورزی:

۱. تولید گیاهان پر محصول و مقاوم نسبت به شرایط سخت آب و هوایی ؛
۲. تولید گیاهان مقاوم در برابر حشرات و آفات و در نتیجه کاهش آلودگی محیط زیست ؛
۳. تولید گیاهان مقاوم نسبت به علف کش ها در نتیجه کاهش فرسایش خاک ؛
۴. تولید گیاهان غنی شده، مثل تولید برنج دارای آهن و بتا کاروتن به میزان زیاد .

* β کاروتن : پیش ساز ویتامین A

موارد استفاده از مهندسی ژنتیک در دامداری:

۱. تهیه ی هورمونهای رشد؛

در گذشته هورمون های رشد برای افزایش حجم شیردهی دام ها از مغز دام های کشته شده استخراج شده و به غذای دام ها افزوده می گردید ولی امروزه با روش ها ی مهندسی ژنتیک این هورمون ها به مقدار مورد نیاز تولید میشود و مورد استفاده قرار میگیرد.

۲. تهیه ی پروتئین های بزرگ و پیچیده ی انسانی ؛

مثال:

*دام هایی که در این روش از آنها استفاده می شود ترانژنی هستند زیرا DNA نوترکیب دارند .

* اغلب (نه همه ی) پروتئین های پیچیده در باکتری ها ساخته نمیشوند .

۳. کلون کردن: در گذشته (قبل از شوالیه یان ویلموت) فقط می توانستیم سلولهای جنینی (سلولهای تمایز نیافته) را به روش

کلون کردن تکثیر دهیم اما آزمایش و یلموت چیز دیگری را ثابت کرد:

گوسفند دالی: برای تولید آن سلول پستانی (نماینده یک سلول تمایز یافته) را با سیتوپلاسم بدون هسته ی تخمک گوسفند دیگری با شوک الکتریکی ترکیب کردند.

*** سلول پستانی پس از خارج شدن باید در محیطی قرار بگیرد که چرخه ی سلولی را متوقف کند.**

***زیگوت را در آزمایش ابتدا به روبان (پلاسنوسیت) تبدیل کردند و سپس جنین را درون رحم گوسفند دیگری (مادر جانشین) قرار دادند.**

***در تولید گوسفند دالی اسپرم و لقاح نقشی نداشتند.**

***مدت بارداری برای دالی ۵ماه بود.**

*** دالی یک جانور کلون شده است نه نژادی.**

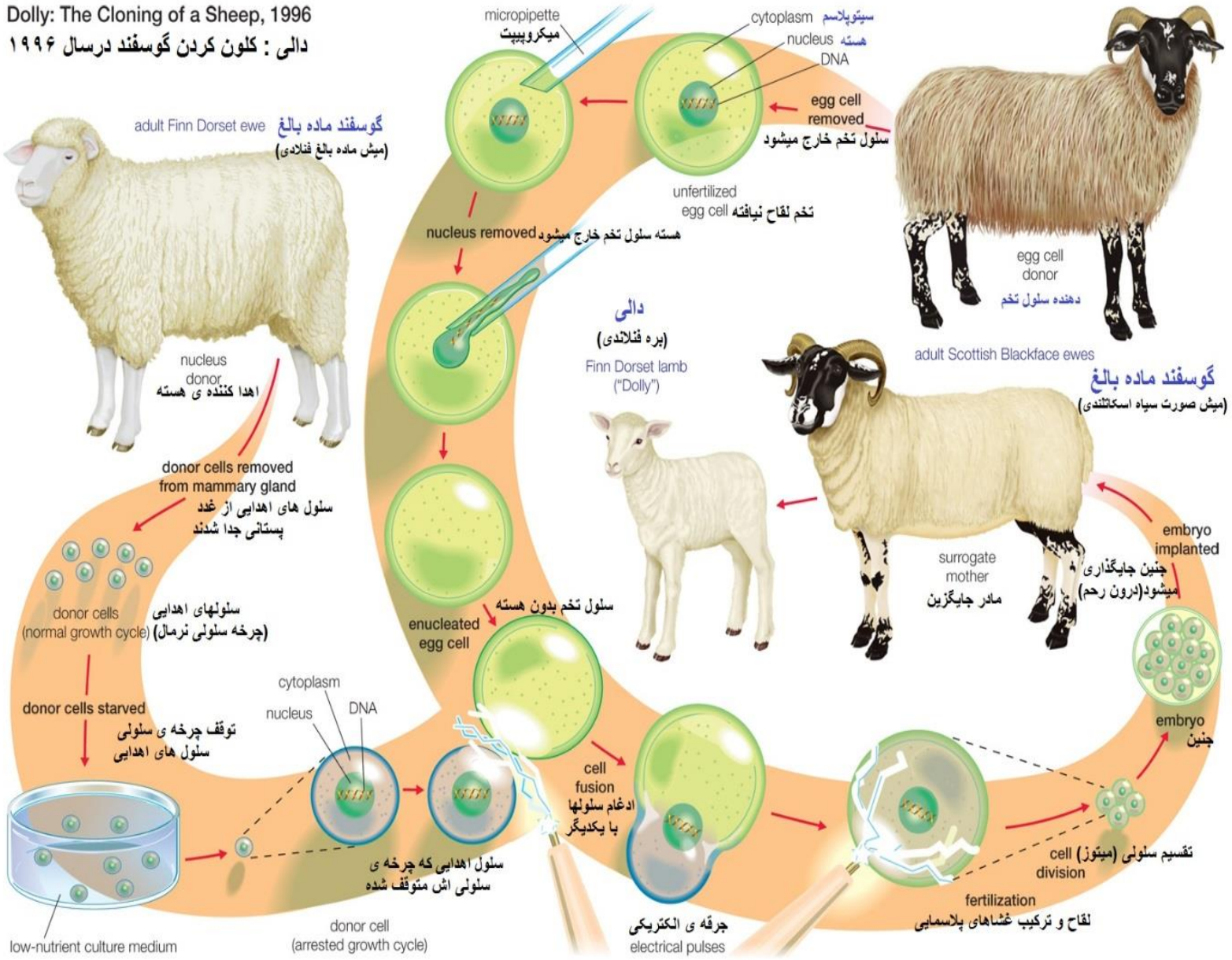
***دالی از نظر ژنوم هسته ای شبیه گوسفند دهنده ی سلول پستانی و از نظر ژنوم سیتوپلاسمی (میتوکندری) شبیه به گوسفند دهنده ی تخمک بود.**

*** در آزمایش ویلموت و بعداز آن همواره سیتوپلاسم از تخمک تأمین شد زیرا:**

۱- اندوخته غذایی سیتوپلاسم تخمک فراوان تر است.

۲- می تواند هسته ی سلول های بالغ را تمایز زدایی کند.

***روبانا اولین جانور شبیه سازی شده (کلون شده) در ایران بود که از هسته ی یک سلول لاله ی گوش گوسفند نر ایجاد شد (پس روبانا نر بود در حالی که دالی ماده بود).**


Dolly: The Cloning of a Sheep, 1996
دالی : کلون کردن گوسفند درسال ۱۹۹۶
micropipette
میکروپیپت
cytoplasm سیتوپلاسم
nucleus هسته
DNA
egg cell removed
سلول تخم خارج میشود
unfertilized egg cell تخم لقاح نیافته
nucleus removed هسته سلول تخم خارج میشود
adult Finn Dorset ewe گوسفند ماده بالغ
(میش ماده بالغ فنلاندی)
nucleus donor
اهدا کننده ی هسته
egg cell donor
دهنده سلول تخم
دالی
(بره فنلاندی)
Finn Dorset lamb ("Dolly")
adult Scottish Blackface ewes
گوسفند ماده بالغ
(میش صورت سیاه اسکاتلندی)
donor cells removed from mammary gland
سلول های اهدایی از غدد پستانی جدا شدند
surrogate mother
مادر جایگزین
embryo implanted
جنین جایگذاری میشود(درون رحم)
donor cells (normal growth cycle)
سلولهای اهدایی (چرخه سلولی نرمال)
enucleated egg cell
سلول تخم بدون هسته
cytoplasm
nucleus
DNA
donor cells starved
توقف چرخه ی سلولی سلول های اهدایی
cell fusion
ادغام سلولها با یکدیگر
embryo
جنین
سلول اهدایی که چرخه ی سلولی اش متوقف شده
cell division
تقسیم سلولی (میتوز)
fertilization
لقاح و ترکیب غشاهای پلاسمایی
low-nutrient culture medium
donor cell (arrested growth cycle)
جرقه ی الکتریکی
electrical pulses