-فصل ۷ دوازدهم:

«فناوری‌های نوین زیستی»

همه چی تو همین کتابه !

زیست ۳

دکتر زهرا همایونی

BIOLOGY BOOK

فصل ۷

فناوری‌های نوین زیستی

آیا تاکنون دربارهٔ تولید پلاستیک‌های قابل تجزیهٔ زیستی شنیده‌اید؟ با توجه به اهمّیت محیط زیست و حفظ آن، تولید و استفاده از چنین پلاستیک‌هایی راهکار مناسبی برای پیشگیری از مصرف بی‌رویهٔ پلاستیک‌های غیرقابل تجزیه است. امروزه به کمک روش‌های زیست فناوری، تولید پلاستیک‌های قابل‌تجزیه با صرف هزینهٔ کمتر ممکن شده است. این کار با وارد کردن ژن‌های تولیدکنندهٔ بسیاری از این نوع مواد از باکتری به گیاه امکان‌پذیر است.

چگونه می‌توان از فناوری‌های زیستی برای بهبود زندگی انسان و حفظ محیط زیست استفاده کرد؟

آیا می‌توان با استفاده از آنها همهٔ مشکلات بشر را حل کرد؟

انسان از نظر اخلاقی تا چه حد می‌تواند این فناوری‌ها را به خدمت بگیرد؟

در این فصل با این فناوری‌ها آشنا می‌شویم و می‌توانیم در آخر، به بخشی از پرسش‌های مطرح شده در مورد این فناوری‌ها پاسخ دهیم.

* دیدگاه مرجاندار ← دیدگاه سلولها ← pro های داخل سلول ← دگاروزن

* روش های زیست فناوری
  - مهندسی ژنتیک
  - " پروتئین
  - " بافت

دوره‌های زیست‌فناوری		
دوره	فرایند اصلی مورد استفاده	کاربردها
سنتی	تخمیر	تولید محصولات تخمیری مانند سرکه، نان و فراورده‌های لبنی
کلاسیک	روش‌های تخمیر و کشت ریزجانداران (میکروارگانیسم‌ها)	تولید پادزیست (آنتی‌بیوتیک)ها، آنزیم‌ها و مواد غذایی
نوین	مهندسی ژنتیک (انتقال ژن از یک جاندار به جاندار دیگر)	کاربرد در کشاورزی (مثل تولید گیاهان مقاوم به آفت‌ها)، تولید دارو (نظیر انسولین)، تولید واکسن (نظیر واکس نوترکیب ضد هپاتیت B)، ژن‌درمانی (مانند درمان دختر بچهٔ دارای نقص ژنی در سیستم ایمنی)، تولید جانوران تراژ

ویژگی‌های دوره‌های زیست‌فناوری			
دورهٔ زیست‌فناوری	سنتی	کلاسیک	نوین
تخمیر	✓ تولید محصولات تخمیری مانند سرکه، نان و فراورده‌های لبنی و خیارشور	✓ استفاده از روش‌های تخمیر	ـــــ
کشت ریزجانداران (میکروارگانیسم‌ها)	✗	✓	✓
انتقال ژن از یک ریزجاندار به ریزجاندار دیگر	✗	✗	✓
تغییر و اصلاح خصوصیات ریزجانداران	✗	✗	✓
تولید ترکیبات دارویی	✗	✓ پادزیست (آنتی‌بیوتیک)ها	✓ پادزیست، انسولین، عوامل انعقادی، واکسن و ...
تولید آنزیم‌ها	✗	✓	✓ آمیلاز، اینترفرون، پلاسمین و ...
تولید مواد غذایی	✓ محصولات تخمیری مانند سرکه، نان و فراورده‌های لبنی و خیارشور	✓	✓
تولید ترکیبات جدید با مقادیر بیشتر و کارایی بالاتر	✗	✗	✓ ناشی از تغییر و اصلاح خصوصیات ریزجانداران
فعالیت هوشمندانهٔ آدمی	✓	✓	✓
تولید و بهبود محصولات گوناگون با استفاده از موجود زنده	✓	✓	✓

گفتار ۱ زیست فناوری و مهندسی ژنتیک

همان‌طور که می‌دانیم جهش در یک ژن و درنتیجه، تغییر در محصول آن می‌تواند به بروز بیماری منجر شود. اختلال در عملکرد و مقدار عوامل مؤثر در انعقاد خون از این دسته هستند. با توجه به افزایش افراد نیازمند به این ترکیبات، تأمین نیاز دارویی آنها با مشکل مواجه می‌شود.

امروزه استفاده از روش‌های زیست فناوری[۳] و مهندسی ژنتیک[۴] تحولات مهمی در زمینهٔ تولید چنین فراورده‌هایی فراهم آورده است. تا چندی پیش، انتقال ژن‌های انسان به داخل یاخته‌های سایر موجودات زنده و یا استفاده از باکتری‌ها برای ساختن پروتئین‌های انسانی غیرقابل تصور بود اما اکنون روش‌های لازم برای تحقق آن توسعه یافته و کاربرد فراوانی پیدا کرده است. آیا می‌دانید چگونه می‌توان از باکتری برای ساختن یک پروتئین انسانی استفاده کرد؟ فرض کنید می‌خواهیم باکتری را برای ساختن هورمون رشد انسانی تغییر دهیم، پس ضرورت دارد تمام احتیاجات این فرایند را در یاختهٔ باکتری فراهم کنیم. در ادامه مطلب با مراحل این روش آشنا خواهیم شد.

زیست فناوری چیست؟

به‌طورکلی به هرگونه فعالیت هوشمندانه آدمی در تولید و بهبود محصولات گوناگون با استفاده از موجود زنده، **زیست فناوری** گویند.

زیست فناوری قلمروی بسیار گسترده دارد و روش‌هایی مانند مهندسی ژنتیک[۱]، مهندسی پروتئین[۲] و بافت را دربرمی‌گیرد[۳]. زیست فناوری از گرایش‌های علمی متعددی مانند علوم زیستی، فیزیک، ریاضیات و علوم مهندسی بهره می‌برد. کاربردهای فراوان زیست فناوری، آن را به‌عنوان نشانهٔ پیشرفت کشورها در قرن حاضر و به یکی از ابزارهای مهم برای تأمین نیازهای متنوع تبدیل کرده است.

برای زیست فناوری، که از سال‌های بسیار دور آغاز شده است، سه دوره درنظر می‌گیرند:

۱) **زیست فناوری سنتی:** تولید محصولات تخمیری مانند سرکه، نان و فراورده‌های لبنی با استفاده از فرایندهای زیستی مربوط به این دوره است.

۲) **زیست‌فناوری کلاسیک:** بااستفاده‌ازروش‌های‌تخمیروکشت‌ریزجانداران(میکروارگانیسم‌ها)تولید موادی مانند پادزیست‌ها، آنزیم‌ها و مواد غذایی در این دوره ممکن شد.

۳) **زیست فناوری نوین:** این دوره با انتقال ژن از یک ریزجاندار به ریز جاندار دیگر آغاز شد. دانشمندان توانستند با تغییر و اصلاح خصوصیات ریزجانداران، ترکیبات جدید را با مقادیر بیشتر و کارایی بالاتر تولید کنند.

برای زیست فناوری که از سال‌های دور آغاز شده است، سه دوره در نظر می‌گیریم:

	مثال‌ها	توضیحات
زیست‌فناوری سنتی	تولید محصولات تخمیری مثل سرکه، ماست، پنیر، نان و مشروبات الکلی	استفاده از فعالیت‌های زیستی مثل تخمیر که توسط باکتری‌ها و مخمرها انجام می‌شود.
زیست‌فناوری کلاسیک	استفراج آنتی‌بیوتیک از قارچ‌ها تولید آنزیم‌ها توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها و استفراج آنها تولید مواد غذایی مثل ویتامین‌ها توسط جانداران و استفراج آنها استفراج انسولین از لوزالمعدهٔ گاو استفراج هپیرلین از قارچ کپک هپیرلا	با استفاده از روش‌های تخمیر و کشت میکروارگانیسم‌ها، بدون تغییر ژنتیک، محصولات ساخته‌شده توسط سلول‌ها را از آنها جداسازی و خالص‌سازی می‌کنیم.
زیست‌فناوری نوین	تولید هورمون رشد توسط باکتری‌ها تولید انسولین انسانی توسط باکتری‌ها تولید هورمون رشد در شیر گاو و گوسفند تراژن تولید فاکتور انعقادی VIII توسط باکتری‌ها انتقال ژن مقاومت به سرما به گیاه و تولید گیاه مقاوم به سرما تولید و استفراج آمیلاز، اینترفرون و پلاسمین کشت بافت جهت تولید و پیوند اعضا تولید بافت و اندام با استفاده از بافته‌های بنیادی تولید بنیهٔ مقاوم به آفت تولید واکسن نوترکیب مثل واکسن ضد هپاتیت B انتقال ژن سالم به لنفوسیت‌هایی که نسخهٔ ناقص ژنی را دارند. پزشکی شفعی تشخیص ایدز	انتقال ژن از جانداری به جانداری از گونهٔ دیگر و تولید جاندار تراژن (مهندسی ژنتیک) مهندسی پروتئین مهندسی بافت شناسایی و توالی‌یابی DNA و پروتئین‌ها

تاریخچهٔ زیست فناوری

تعبیرنامهٔ دوره‌های فناوری زیستی

تعبیر	پاسخ
دوره‌ای از زیست‌فناوری که ترکیبات جدید با مقادیر و کارایی بیشتر تولید شد.	نوین
دوره‌ای از زیست‌فناوری که شروع تغییر و اصلاح خصوصیات ریزجانداران است.	نوین
دوره‌ای از زیست‌فناوری که شروع تولید محصولات تخمیری است.	سنتی
دوره‌ای از زیست‌فناوری که از میکروارگانیسم‌ها استفاده شد.	هر سه دوره
دوره‌ای از زیست‌فناوری که کشت میکروارگانیسم‌ها شروع شد.	کلاسیک
دوره‌ای از زیست‌فناوری که مواد غذایی تولید شد.	هر سه دوره
دوره‌ای از زیست‌فناوری که بین میکروارگانیسم‌ها انتقال ژن صورت گرفت.	نوین
دوره‌ای از زیست‌فناوری که به کمک میکروارگانیسم‌ها، تولید آنزیم صورت گرفت.	کلاسیک + نوین

مقایسهٔ دوره‌های فنا ی زیستی

	انتقال ژن	استفاده از ریزاندامگا	تولید			
			مواد غذایی	پادزیست	آنزیم	جاندار تراژن
سنتی	×	✓	✓	×	×	×
کلاسیک	×	-	✓	✓	✓	×
			-	✓	✓	✓

مراحل مهندسی ژنتیک

- **جداسازی قطعه‌ای از دنا**
  - جداسازی ژن‌ها به وسیلهٔ آنزیم‌های برش‌دهنده صورت می‌گیرد. این آنزیم‌ها توالی نوکلئوتیدی خاصی را در دنا تشخیص و برش می‌دهند.
- **تشکیل دنای نوترکیب**
  - به وسیلهٔ توالی‌های خاصی از دنا (مثلاً پلازمید) در خارج از کروموزوم، ژن جداسازی‌شده به دنای ناقل منتقل می‌شود. برای اتصال این دو قسمت از دنا به هم از آنزیم لیگاز استفاده می‌کنند.
- **واردکردن دنای نوترکیب به یاختهٔ میزبان**
  - در این مرحله دنای نوترکیب را به درون یاختهٔ میزبان منتقل می‌کنند. برای این کار در غشا و یا دیوارهٔ یاختهٔ میزبان به وسیلهٔ شوک الکتریکی یا استفاده از مواد شیمیایی منفذ ایجاد کرده و دنای نوترکیب را به یاخته اضافه می‌کنند.
- **جداسازی یاخته‌های تراژن**
  - طبق مطالعات انجام شده همهٔ یاخته‌ها دنای نوترکیب را دریافت نمی‌کنند و تنها بخشی از آن‌ها دارای ژن نوترکیب درون خود هستند. برای جداسازی این یاخته‌ها از روش‌های متفاوتی استفاده می شود. یکی از این روش ها استفاده از دیسکی است که دارای ژن مقاومت به پادزیست باشد که در ناقل و در نتیجه یاختهٔ دریافت کنندهٔ ژن نوترکیب وجود دارد. با اضافه کردن پادزیست به محیط، آن دسته از یاخته‌هایی که ژن نوترکیب را دریافت نکرده‌اند را از محیط کشت حذف می‌کنند.

در همهٔ دوره‌های زیست‌فناوری از میکروب‌ها استفاده شده است با این تفاوت که در دورهٔ سنتی این استفاده آگاهانه نبوده ولی در سایر دوره‌ها، آگاهانه استفاده شده است.

دقت کنید که در دورهٔ زیست فناوری سنتی، تولید محصولات لبنی با استفاده از تجربه انجام شده است و افراد علم تخمیر را نمی‌دانستند!

کشت ریزاندامگان در هر دو دورهٔ کلاسیک و نوین انجام شده است ولی انتقال ژن فقط در دورهٔ نوین است.

گریفیت با استفاده از زیست‌فناری کلاسیک سعی در تولید واکسن علیه بیماری آنفلوانزا داشت. (فصل ۱ دوازدهم)

تولید سرکه و فراورده‌های لبنی با استفاده از تخمیر لاکتیکی و تولید نان با استفاده از تخمیر الکلی انجام می‌گیرد (فصل۵ دوازدهم).

آنزیم‌های مؤثر در مهندسی ژنتیک

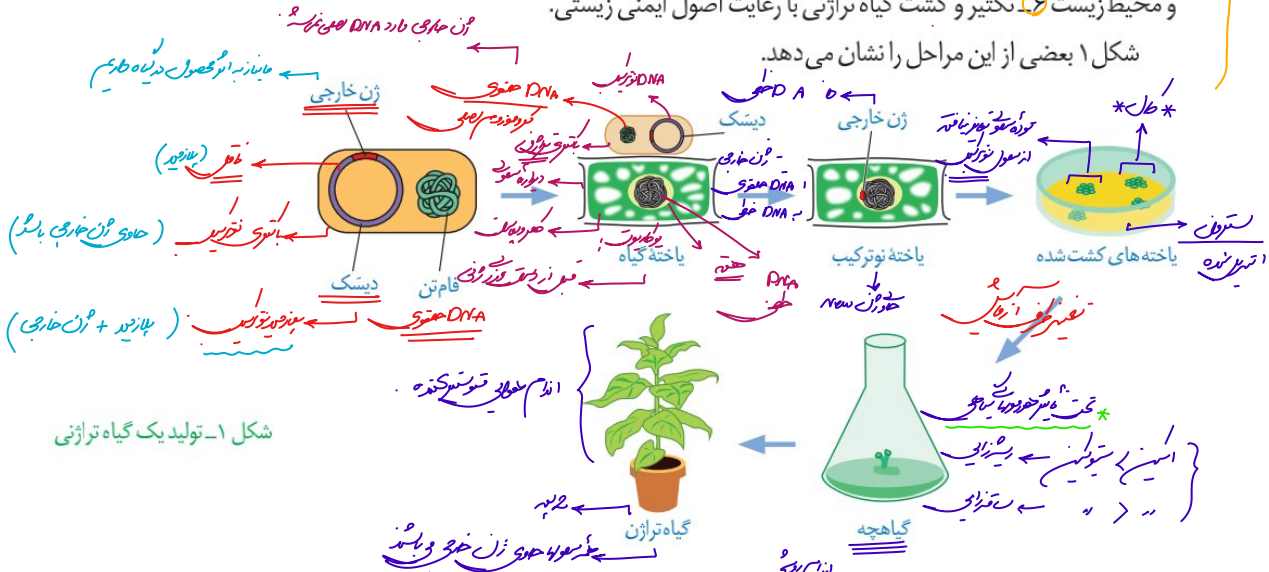
مرحله‌ای از مهندسی ژنتیک که آنزیم در آن فعالیت دارد		برش‌دهنده	لیگاز	دنابسپاراز	رنابسپاراز
		برش دنا (مرحلهٔ ۱ و ۲)	تشکیل دنای نوترکیب (مرحلهٔ ۲)	همسانه‌سازی دنا (مرحلهٔ ۴)	جداسازی یاختهٔ تراژنی (مرحلهٔ ۴)
پیوندهای مورد اثر و عملکرد آنزیم	فسفودی‌استر	شکستن	ایجاد	ایجاد / شکستن	ایجاد
	هیدروژنی	شکستن (غیرمستقیم)	-	-	شکستن
جنس آنزیم		پروتئینی	پروتئینی	پروتئینی	پروتئینی
پیوند بازی و ساختار آنزیم	اشتراکی	دارد (پپتیدی)	دارد (پپتیدی)	دارد (پپتیدی)	دارد (پپتیدی)
	غیراشتراکی	دارد (مثلن هیدروژنی)	دارد (مثلن هیدروژنی)	دارد (مثلن هیدروژنی)	دارد (مثلن هیدروژنی)
حساس به تغییرات شدید	دما	✓	✓	✓	✓
	pH	✓	✓	✓	✓
محل ..... آنزیم	تولید	درون سلول (فقط باکتری‌ها)	درون سلول	درون سلول	درون سلول
	فعالیت	درون و بیرون سلول	درون و بیرون سلول	درون سلول (هسته و سیتوپلاسم)	درون سلول (هسته و سیتوپلاسم)
ایجاد انتهای چسبنده در اثر فعالیت آنزیم		✓ (گروهی از آن‌ها)	✗	✗	✗
مؤثر در تولید خودش		✗	✗	✗	✓
تأثیر بر DNA		بریدن	اتصال دو قطعهٔ دنا	تشکیل	-
نقش دفاعی آنزیم		✓	✗	✗	✗
رونویسی از ژن رمزکنندهٔ آنزیم توسط		فقط رنابسپاراز پروکاریوتی	رنابسپاراز ۲ رنابسپاراز پروکاریوتی	رنابسپاراز ۲ رنابسپاراز پروکاریوتی	رنابسپاراز ۲ رنابسپاراز پروکاریوتی

مهندسی ژنتیک

یکی از روش‌های مؤثر در زیست فناوری نوین، مهندسی ژنتیک است. در مهندسی ژنتیک قطعه‌ای از دنای یک یاخته توسط ناقل به یاخته‌ای دیگر انتقال می‌یابد. در این حالت، یاختهٔ دریافت کننده قطعه دنا دچار دست‌ورزی ژنتیکی و دارای صفت جدید می‌شود. به جانداری که از طریق مهندسی ژنتیک دارای ترکیب جدیدی از مواد ژنتیکی شده است، جاندار **تغییریافته ژنتیکی**[1] یا **تراژنی**[2] می‌گویند. گرچه این روش ابتدا با باکتری‌ها شروع شد؛ اما پیشرفت‌های بعدی، امکان دست‌ورزی ژنتیکی برای سایر موجودات زنده مثل گیاهان و جانوران را نیز فراهم کرد. مثلاً مراحل ایجاد گیاهان زراعی تراژنی از طریق مهندسی ژنتیک را می‌توان به‌صورت زیر خلاصه کرد:

۱ـ تعیین صفت یا صفات مطلوب ۲ـ استخراج ژن یا ژن‌های صفت مورد نظر ۳ـ آماده‌سازی و انتقال ژن به گیاه ۴ـ تولید گیاه تراژنی ۵ـ بررسی دقیق ایمنی زیستی و اثبات بی‌خطر بودن برای سلامت انسان و محیط زیست ۶ـ تکثیر و کشت گیاه تراژنی با رعایت اصول ایمنی زیستی.

شکل ۱ بعضی از این مراحل را نشان می‌دهد.



شکل ۱ـ تولید یک گیاه تراژنی

مراحل مهندسی ژنتیک

یکی از اهداف مهندسی ژنتیک تولید انبوه ژن و فراورده‌های آن است. تولید انبوه ژن با همسانه‌سازی دنا[3] انجام می‌شود. جداسازی یک یا چند ژن و تکثیر آنها را **همسانه‌سازی دِنا** می‌گویند. در همسانه‌سازی دِنا مادهٔ وراثتی با ابزارهای مختلفی در خارج از یاخته تهیه و به وسیلهٔ یک **ناقل همسانه‌سازی**[4] به درون ژنوم میزبان منتقل می‌شود. هدف از این کار تولید مقادیر زیادی از دنای خالص است که می‌تواند برای دست‌ورزی، تولید یک مادهٔ بخصوص و یا مطالعه مورد استفاده قرار گیرد.

برای این منظور مراحل زیر انجام می‌شود:

۱ـ جداسازی قطعه‌ای از دِنا: این کار به‌وسیلهٔ **آنزیم‌های برش‌دهنده**[5] انجام می‌شود. این آنزیم‌ها در باکتری‌ها وجود دارند و قسمتی از سامانهٔ دفاعی آنها محسوب می‌شوند. اولین مرحله از همسانه‌سازی

۱ـ Genetically Modified Organism
۲- Transgenic Organism
۳- DNA Cloning
۴- Cloning Vector
۵- Restriction Enzyme

آنزیم‌های برش‌دهنده (محدودکننده) ← قطع فسفودی‌استر

سامانهٔ دفاعی باکتری‌ها در مقابل DNA ویروس‌ها!

مثال: آنزیم E co R I

اولین آنزیم استخراج‌شده از باکتری

اشرشیا (Escherchia)

کلای (coli)

مربوط به سویه باکتری است

جایگاه تشخیص:
- روی DNA: خطی / حلقوی
- دو رشته‌ای
- توالی یکسان که به‌صورت معکوس، خوانده می‌شود.
- حتما باید تعداد نوکلئوتیدها زوج باشد.

جایگاه تشخیص آنزیم EcoRI

G↓AATTC
CTTAA↑G

قطع دو فسفودی‌استر

بین قند و فسفات دو نوکلئوتید مجاور هم (نه دو باز آلی، نه دو نوکلئوتید مقابل هم!)

یکی از پرکاربردترین آنزیم‌های برش‌دهنده، آنزیم EcoRI (بخوانید ای کو آر وان) است. درمورد این آنزیم باید بدانیم که:

۱ ـ به‌طور طبیعی در باکتری اشرشیاکلای (E.coli) وجود دارد و چون نخستین آنزیم برش‌دهنده‌ای است که از این باکتری استخراج شده به نام EcoR I نام‌گذاری شده است.

۲ ـ آنزیم EcoRI جایگاه شش جفت نوکلئوتیدی $\frac{GAATTC}{CTTAAG}$ را شناسایی می‌کند که از هر دو طرف، GAATTC خوانده می‌شود.

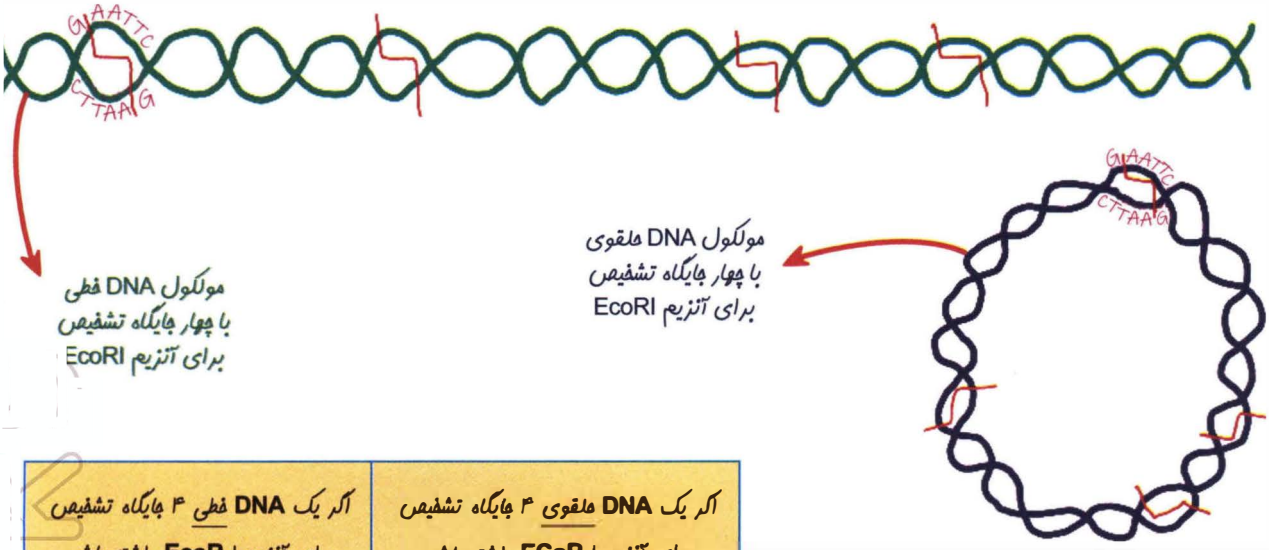
۳ ـ در هر جایگاه تشخیص آنزیم EcoRI ، شش نوکلئوتید پورین‌دار و شش نوکلئوتید پیریمیدین‌دار وجود دارد.

۴ ـ در هر جایگاه تشخیص آنزیم EcoRI، دو نوکلئوتید گوانین‌دار، دو نوکلئوتید سیتوزین‌دار، چهار نوکلئوتید آدنین‌دار و چهار نوکلئوتید تیمین‌دار وجود دارد.

۵ ـ این آنزیم در هر جایگاه تشخیص دو پیوند فسفودی‌استر را برش می‌دهد که پیوند بین گوانین و آدنین است. (فعالیت نوکلئازی).

۶ ـ به بیان دیگر می‌توان گفت این آنزیم در هر جایگاه تشخیص، دو پیوند کووالانسی بین بازهای پورینی را قطع می‌کند.

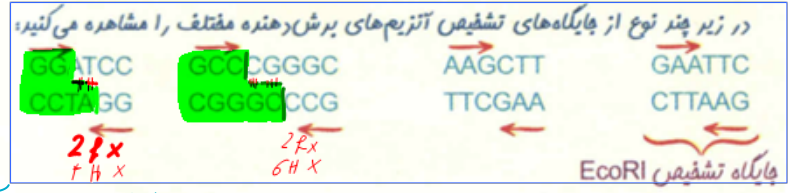
۷ ـ در هر جایگاه تشخیص این آنزیم، بر اثر قطع پیوند کووالانسی بین گوانین و آدنین، پیوندهای هیدروژنی بین چهار جفت باز آدنین ـ تیمین نیز شکسته شده و دو انتهای چسبنده ایجاد می‌شود.



	اگر یک DNA حلقوی ۴ جایگاه تشخیص برای آنزیم EcoR ۱ داشته باشد.	اگر یک DNA خطی ۴ جایگاه تشخیص برای آنزیم EcoR ۱ داشته باشد.
چند انتهای چسبنده ایجاد خواهد شد؟	۸	۸
چند قطعه DNA تشکیل خواهد شد؟	۴	۵
چند قطعه DNA با دو انتهای چسبنده ایجاد می‌شود؟	۴	۳
چند قطعه DNA با یک انتهای چسبنده ایجاد می‌شود؟	۰	۲
چند پیوند فسفودی‌استر قطع خواهد شد؟	۸	۸
پیوندهای فسفودی‌استر بین چند نوکلئوتید قطع می‌شوند؟	۱۶ نوکلئوتید	۱۶ نوکلئوتید
پیوندهای هیدروژنی بین چند جفت باز آلی قطع می‌شوند؟	۱۶ جفت باز آلی	۱۶ جفت باز آلی

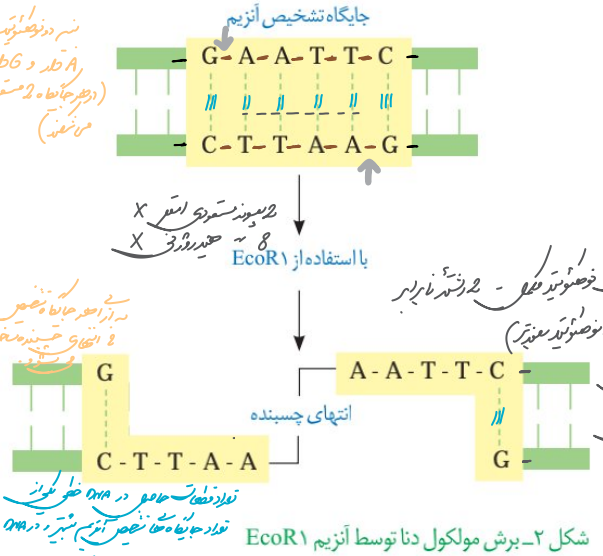
اگر از EcoRI به‌منظور ایجاد DNA نوترکیبی که فقط یک قطعهٔ DNA جدید وارد یک پلازمید شده باشد، استفاده کنیم در مجموع:

چند جایگاه تشخیص باید وجود داشته باشد؟	۳
چند پیوند فسفودی‌استر قطع می‌شود؟	۶
چند پیوند فسفودی‌استر تشکیل می‌شود؟	۴
پیوندهای فسفودی‌استر بین چند نوکلئوتید شکسته می‌شوند؟	۱۲
پیوندهای فسفودی‌استر بین چند نوکلئوتید تشکیل می‌شوند؟	۸
چند انتهای چسبنده تشکیل می‌شود؟	۶
چند انتهای چسبنده در کنار هم قرارمی‌گیرند؟	۴
پیوندهای هیدروژنی بین چند جفت باز شکسته می‌شوند؟	۱۲
پیوندهای هیدروژنی بین چند جفت باز تشکیل می‌شوند؟	۸



که جداسازی ژن‌ها است، به وسیلهٔ این آنزیم‌ها انجام می‌شود. این آنزیم‌ها توالی‌های نوکلئوتیدی خاصی را در دنا تشخیص و برش می‌دهند. مثلاً آنزیم EcoR۱ توالی شش جفت نوکلئوتیدی GAATTC / CTTAAG را شناسایی و برش می‌دهد. به این توالی **جایگاه تشخیص آنزیم** گفته می‌شود (شکل ۲).

همان‌طور که در شکل می‌بینید در جایگاه تشخیص آنزیم EcoR۱، توالی نوکلئوتیدهای هر دو رشته دنا از دو سمت مخالف یکسان خوانده می‌شود. این آنزیم پیوند فسفودی استر بین نوکلئوتید گوانین‌دار و آدنین‌دار هر دو رشته را برش می‌زند. در نتیجه، انتهایی از مولکول دنا ایجاد می‌شود که یک رشته آن بلندتر از رشته مقابل است و به آن **انتهای چسبنده** می‌گویند. برای تشکیل چنین انتهایی از مولکول دنا، علاوه بر پیوندهای فسفودی استر، پیوندهای هیدروژنی بین دو رشته دنا در منطقه تشخیص نیز شکسته می‌شوند. استفاده از آنزیم‌های برش‌دهنده، دنا را به قطعات کوتاه‌تری تبدیل می‌کند. این قطعات را با روش‌های خاصی جدا می‌کنند و تشخیص می‌دهند.



شکل ۲ـ برش مولکول دنا توسط آنزیم EcoR۱

۲ اتصال قطعه دِنا به ناقل و تشکیل دِنای نوترکیب[۱]: مرحله بعدی، اتصال قطعه دنای جداسازی شده به ناقل همسانه‌سازی است. این ناقلین، توالی‌های دنایی هستند که در خارج از فام‌تن اصلی قرار دارند و می‌توانند مستقل از آن تکثیر شوند. یکی از این مولکول‌ها دیسَک حلقوی باکتری است. این نوع دیسَک یک مولکول دنای دورشته‌ای و خارج فام‌تنی است که معمولاً درون باکتری‌ها و بعضی قارچ‌ها مثل مخمرها وجود دارد و می‌تواند مستقل از ژنوم میزبان همانندسازی کند. دیسَک‌ها را فام‌تَن‌های کمکی نیز می‌نامند چون حاوی ژن‌هایی هستند که در فام‌تن اصلی باکتری وجود ندارند. مثلاً ژن مقاومت به پادزیست در دیسَک قرار دارد. در صورت انتقال قطعه دنای موردنظر به دیسَک و ورود آن به یاخته میزبان، با هر بار همانندسازی دیسَک، دنای مورد نظر نیز همانندسازی می‌شود. بهتر است از دیسَکی استفاده شود که فقط یک جایگاه تشخیص برای آنزیم برش‌دهنده داشته باشد. به نظر شما چرا؟

شکل ۳ـ طرح ساده‌ای از دیسَک و یک ژن خارجی

شکل ۳ طرح ساده‌ای از دیسَک دارای یک جایگاه تشخیص آنزیم EcoR۱ را نشان می‌دهد. بسیاری از دیسَک‌ها دارای ژن‌های مقاومت به پادزیست‌ها هستند. چنین ژن‌هایی به باکتری این توانایی را می‌دهند که پادزیست‌ها را به موادی غیرکشنده و قابل استفاده برای

۱ـ Recombinant DNA

* ژن آنزیم برش دهنده در DNA همتوی باکتری ها وجود دارد.

* آنزیم برش دهنده ← ژن ← در DNA همتوی باکتری ها
← تولید ← درون باکتری ها
← فعالیت ← داخل باکتری ها (خط دفاعی)
بیرون سلول (مهندسی ژنتیک)

(آنزیم) Pro -
* سد دفاعی باکتری
* هیدرولیز کننده
پیوند فسفودی استری حاصل می شود!

* همه عوامل بیماری زا خطا نوکلئیک اسید دارن ← پاسخ دهی در مادهٔ ژنتیک
عامل بیماری زا، فاقد اثر آنزیمی

زنده - غیرزنده

* همه آنزیم برش دهنده ← توالی خاصی از DNA شناسایی میکنن و بین نوکلئوتید خاص دارون
جایگاه تشخیص آنزیم
توالی می شناسن ☺

محل برش.

* اولین آنزیم برش دهنده

EcoR1 ← جایگاه تشخیص

GAATTC
CTTAAG

اولین ← برش دهنده ← شناسایی این آنزیم با باکتری اشریشیا کلای.

* جایگاه تشخیص آنزیم ← 2 رشته ای (DNA) حالت آینه ای دارد.
← برابر
← از هر دو طرف یکسان خوانده می شود
لازمهٔ عملکرد آنزیم

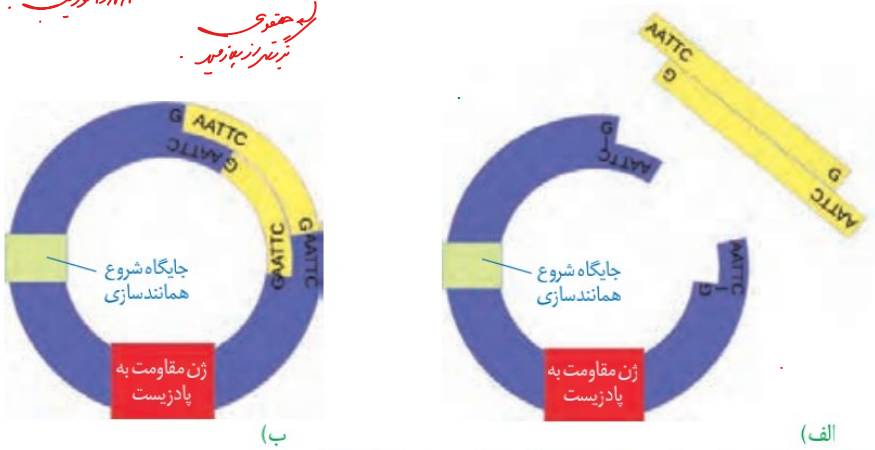
* انتهای چسبنده ← 2 رشته نابرابر ← خاصیت عملکرد آنزیم برش دهنده

* جایگاه تشخیص آنزیم ← آنزیم برش دهنده ← 2 انتهای چسبنده

خود تبدیل کنند. این ویژگی در مهندسی ژنتیک اهمیت زیادی دارد که در مباحث بعد به آن می‌پردازیم.

در ساخت یک دنای نوترکیب، قطعه دنای حاوی توالی موردنظر در دنای ناقل جاسازی می‌شود. دانستید که برای جداسازی قطعه دنای موردنظر از نوعی آنزیم برش‌دهنده استفاده می‌شود. توجه داشته باشید آنزیم مورد استفاده برای برش دادن دیسک، باید همان آنزیمی باشد که در جداسازی دنای موردنظر استفاده شده است. چرا؟

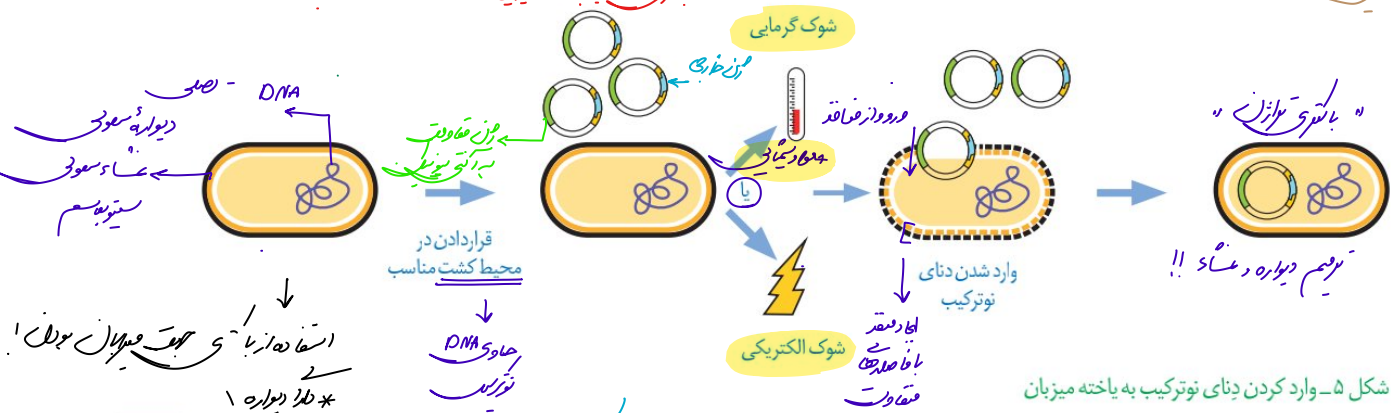
برش دیسک با آنزیم، آن را به یک قطعه دنای خطی تبدیل می‌کند که دارای دو انتهای چسبنده است. همچنین قطعه دنای خارجی نیز دو انتهای چسبنده دارد. برای اتصال دنای موردنظر به دیسک از آنزیم لیگاز (اتصال‌دهنده) استفاده می‌شود. این آنزیم پیوند فسفودی استر بین دو انتهای مکمل را ایجاد می‌کند. به مجموعه دنای ناقل و ژن جاگذاری شده در آن، **دنای نوترکیب** گفته می‌شود (شکل ۴).



شکل ۴ـ تشکیل دنای نوترکیب: الف) قبل از تأثیر لیگاز و ب) بعد از تأثیر لیگاز

۳ وارد کردن دِنای نوترکیب به یاخته میزبان: در این مرحله، دنای نوترکیب را به درون یاخته میزبان مثلاً باکتری منتقل می‌کنند (شکل ۵). به این منظور باید در دیواره باکتری منافذی ایجاد شود. این منافذ را می‌توان با کمک شوک الکتریکی و یا شوک حرارتی همراه با مواد شیمیایی ایجاد کرد.

بر طبق اطلاعات به دست آمده، مشخص شده همه باکتری‌ها دنای نوترکیب را دریافت نمی‌کنند. بنابراین لازم است باکتری دریافت‌کنندهٔ دیسک از باکتری فاقد آن تفکیک شود.



شکل ۵ـ وارد کردن دِنای نوترکیب به یاخته میزبان

① جداسازی DNA از سایر اجزای خارجی و آماده‌سازی برای تکثیر ← آنزیم برش دهنده . XF
(۴ انتهای چسبنده تولید می‌کند)

② تکثیر DNA توسط PCR ← آنزیم لیگاز VF

---

* جهت ایجاد انتهای چسبنده:
  - اول: ✗ پیوند فسفودی استر (آنزیم)
  - بعد: ✗ پیوند هیدروژنی (آنزیم)

* به اتصال ۲ انتهای چسبنده:
  - اول: ✓ پیوند هیدروژنی (توسط مولکول‌های بازها)
  - بعد: ✓ پیوند فسفودی استر (آنزیم)

در انتهای همانندسازی DNA:

۱ در صورت نیاز به محصول ژن:

درون باکتری با استفاده از آنزیم‌های داخل باکتری
رونویسی از آن ژن و ترجمه از mRNA حاصل از آن
محصول pro در باکتری تولید شده
و در نهایت استخراج می‌شود.

۲ در صورت نیاز به چند ژن: داستان مراحل پیچیده‌تر!!

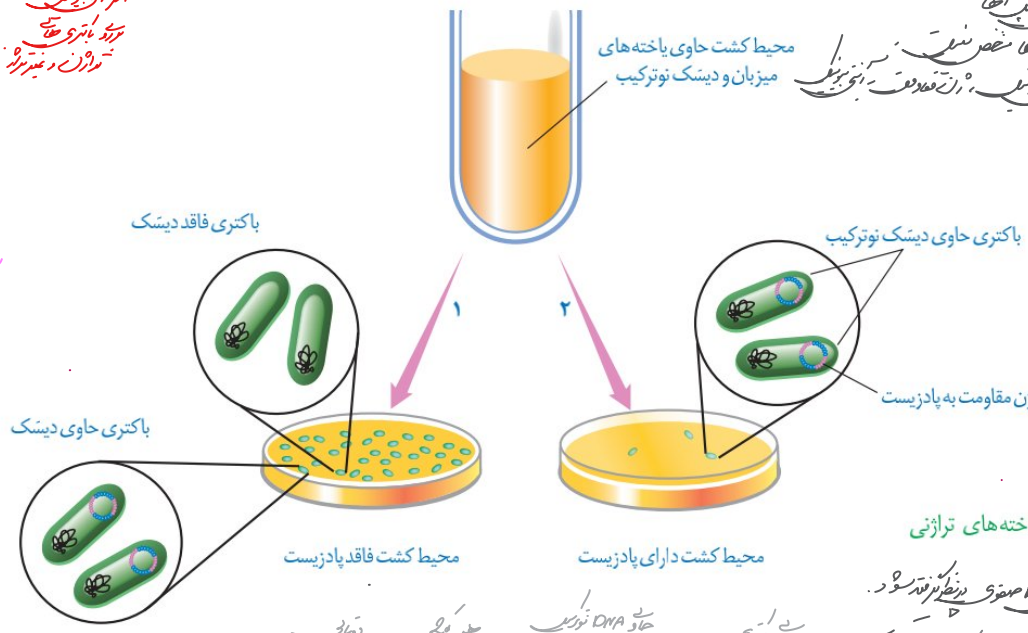
✓ ابتدا استخراج DNA نوترکیب از باکتری‌های حاوی ژن.

✓ اضافه کردن همان آنزیم برش دهنده‌ای که جهت تولید DNA نوترکیب استفاده کردیم؛
جهت جداسازی ژن خارجی و پلازمید
(۲ نوع DNA با طول متفاوت)

✓ استفاده از ستریفیوژ جهت جداسازی این دو نوع DNA.
براساس وزن در ارتفاع متفاوتی قرار می‌گیرند

جداسازی یاخته‌های تراژنی: برای انجام این مرحله، از روش‌های متفاوتی می‌توان استفاده کرد.

یکی از این روش‌ها استفاده از دیسک است که دارای ژن مقاومت به پادزیستی مثل آمپی‌سیلین است. اگر باکتری، دنای نوترکیب را دریافت کرده باشد، در محیط حاوی پادزیست رشد می‌کند. باکتری‌های فاقد دنای نوترکیب به‌دلیل حساسیت به پادزیست در چنین محیطی از بین می‌روند (شکل ۶).



شکل ۶ـ جداسازی یاخته‌های تراژنی دارای دنای نوترکیب

در شرایط مناسب، باکتری‌های تراژنی با سرعت بالایی تکثیر می‌شوند. همچنین از دناهای نوترکیب نیز به‌صورت مستقل از فام‌تن اصلی یاخته، نسخه‌های متعددی ساخته می‌شود که درنتیجهٔ آن دنای خارجی به سرعت تکثیر می‌شود. بنابراین، تعداد زیادی باکتری دارای دنای خارجی آماده خواهد شد که می‌توان از آنها برای تولید فراورده یا استخراج ژن استفاده کرد.

امروزه با پیشرفت روش‌های مهندسی ژنتیک می‌توان یاخته‌های دیگری مثل مخمرها، یاخته‌های گیاهی و حتی جانوری را با این فرایند تغییر داد. دناها و سایر مولکول‌های حاصل از دناهای تولید شده برای اهداف گوناگون علمی و کاربردی استفاده می‌شوند. در گفتارهای بعدی این فصل به برخی از این موارد اشاره شده است.

در هر مرحله از فرایند همسانه‌سازی دنا که .....

۱ از آنزیم برش‌دهنده استفاده می‌شود ← اول – دوم
۲ از آنزیم لیگاز استفاده می‌شود ← دوم
۳ پیوند فسفودی‌استر شکسته می‌شود ← اول – دوم - چهارم
۴ پیوند فسفودی‌استر تشکیل می‌شود ← دوم - چهارم
۵ انتهای چسبنده ایجاد می‌شود ← اول – دوم
۶ دنای نوترکیب تولید می‌شود ← دوم
۷ یاختهٔ نوترکیب ایجاد می‌گردد ← سوم
۸ از شوک الکتریکی یا حرارتی به همراه مواد شیمیایی استفاده می‌شود ← سوم
۹ در دیوارهٔ یاختهٔ میزبان، منافذی ایجاد می‌شود ← سوم
۱۰ ژن مقاومت به پادزیست از حالت خاموش به حالت روشن در می‌آید ← چهارم
۱۱ یاخته‌های نوترکیب در محیط کشت، رشد می‌کنند ← چهارم
۱۲ دنای حلقوی به دنای خطی تبدیل می‌شود ← دوم – اول(در صورتی که قطعه دنای مورد نیاز برای یک دنای حلقوی باشد.)

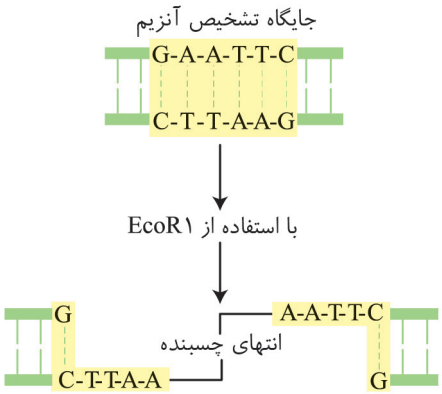
استفاده از آنزیم برش‌دهنده، دنا را به قطعات کوتاه‌تری تبدیل می‌کند. این قطعات را با روش‌های خاصی جدا می‌کنند و تشخیص می‌دهند.

شروط لازم برای این که یک توالی نوکلئوتیدی در دنا، جایگاه تشخیص آنزیم برش‌دهنده باشد:

تعداد نوکلئوتید آن در هر رشته و در کل آن قسمت زوج باشد.

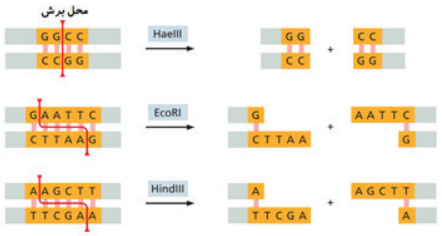
توالی نوکلئوتیدی دو رشته مشابه ولی برعکس یکدیگر باشد.

در هر رشتهٔ دنا از توالی داده شده بازهای آلی نوکلئوتیدی قرینه باید مکمل هم باشند.



شکل ۲- برش مولکول دنل توسط آنزیم $EcoR_1$

شکسته شدن یا نشدن پیوندهای هیدروژنی توسط آنزیم برش‌دهنده یکی از معضلات همیشگی این فصل است. در کتاب نظام جدید صراحتاً به این موضوع اشاره نشده است ولی از متن کتاب می‌توان برداشت کرد که آنزیم برش‌دهنده به طور مستقیم پیوندهای هیدروژنی را نمی‌شکند. در کتاب‌ها و کنکورهای نظام قدیم، اعتقاد بر این بود که آنزیم‌های برش‌دهنده هر دو پیوند فسفودی‌استر و هیدروژنی را می‌شکنند.



فعالیت هر آنزیم برش‌دهنده منجر به شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی نمی‌شود. همان‌طور که در شکل مقابل می‌بینید، در صورتی فعالیت آنزیم برش‌دهنده منجر به شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی در جایگاه تشخیص می‌شود که محل برش این توالی توسط آنزیم، مقابل یکدیگر نباشد. مثلاً در آنزیم برش‌دهندهٔ HaeIII نقاط برش دو رشتهٔ دنا در جایگاه تشخیص، مقابل یکدیگر هستند؛ در نتیجه پیوندهای هیدروژنی شکسته نمی‌شوند و انتهای چسبنده ایجاد نمی‌شود.

پیوند هیدروژنی نوعی پیوند غیراشتراکی کم انرژی است که در ساختار مولکول دنا، رنای ناقل و پروتئین‌ها بین واحدهای تکرارشوندهٔ آنها وجود دارد. تشکیل این پیوند به صورت خودبه‌خودی و بدون نیاز به آنزیم است ولی شکستن آن در مواردی با فعالیت آنزیم انجام می‌شود. آنزیم‌های هلیکاز و رنابسپاراز از جمله آنزیم‌های شکنندهٔ این پیوند هستند (فصل ۱ و ۲ دوازدهم).

هر آنزیم برش‌دهنده‌ای، پیوند فسفودی‌استر را می‌شکند ولی پیوند هیدروژنی را نه! در واقع آنزیم برش‌دهنده زمینهٔ شکستن پیوند هیدروژنی را فراهم می‌کند.

تعداد قطعات ایجاد شده از فعالیت یک آنزیم برش‌دهنده در:

دنای خطی برابر است با = تعداد جایگاه‌های تشخیص + ۱

دنای حلقوی برابر است با = تعداد جایگاه‌های تشخیص

در جایگاه تشخیص آنزیم EcoR۱، ۴ نوع نوکلئوتید، ۶ باز آلی پورین و ۶ باز آلی پیریمیدین، ۱۸ حلقهٔ باز آلی و ۱۲ عدد نوکلئوتید وجود دارد.

آنزیم برش‌دهندهٔ EcoR۱ پیوند بین باز آلی آدنین و گوانین را نمی‌شکند؛ چون بین این دو باز آلی اصلاً پیوند وجود ندارد!

انتهای چسبنده:

انتهایی از مولکول دنا است که به دنبال فعالیت آنزیم برش‌دهنده ایجاد می‌شود.

یک رشتهٔ آن بلندتر از رشتهٔ دیگر است.

نوکلئوتیدهایی قرار دارند که پس از شکسته شدن پیوندها، دیگر با پیوند هیدروژنی به نوکلئوتیدی دیگر متصل نباشند و کاملن آزاد باشند.

توالی نوکلئوتیدی جایگاه تشخیص جز توالی ژن نیست!

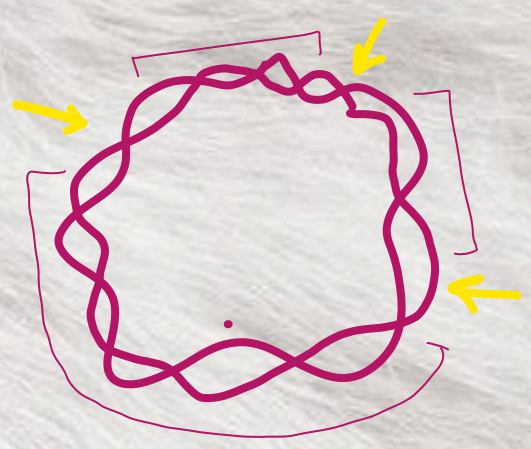
ژن سازندهٔ آنزیم برش‌دهنده در دنای حلقوی باکتری‌ها به طور طبیعی وجود دارد و توسط رنابسپاراز پروکاریوتی رونویسی می‌شود (فصل ۲ دوازدهم).

عوامل دفاعی باکتری‌ها: آنزیم برش‌دهنده، پوشینه و ژن مقاومت به پادزیست.

دقت کنید که در جملهٔ بالا منظور از ضمیر «آن» فام‌تن اصلی است نه خودِ یاخته! در واقع هیچ ناقل همسانه‌سازی‌ای نمی‌تواند خارج از یاخته میزبان همانندسازی کند. این ناقلین با استفاده از آنزیم‌های میزبان، همانندسازی می‌کنند حالا مستقل از فام‌تن اصلی یاخته و یا همراه با آن!

اثر آنزیم بر روی دهنده

در DNA حلقوی

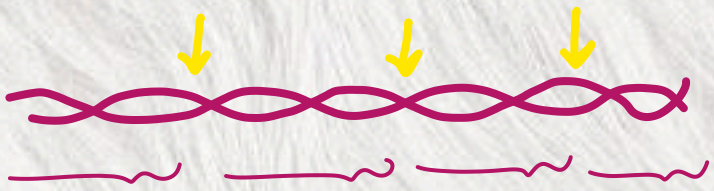


تعداد جایگاه تشخیص آنزیم ← n

تعداد قطعات حاصل ← n

تعداد خطی ← ۱

در DNA خطی



تعداد جایگاه تشخیص آنزیم ← n

تعداد قطعات حاصل ← n + ۱

تعداد خطی ← ۱

تعداد جایگاه تشخیص آنزیم ← n

انتهای چسبنده ← 2n

پیوند هیدروژنی مستعد به شکستن ← 2n

نکات دیسک

نام دیگر	جنس	اندازه	شکل	قطبیت	تعداد جایگاه		زمان همانندسازی	در کدام نوع سلول وجود دارد؟	تعداد رشته	تعداد در سلول	وجود ژن ..... در پلازمید			
					همانندسازی	رونویسی					tRNA	rRNA	پروتئین	مقاوم به پادزیست
پلازمید	DNA	کوچک	حلقوی	ندارد	یک	زیاد	○ هم‌زمان با سلول میزبان ○ مستقل از سلول میزبان	پروکاریوت یوکاریوت (قارچ مثل مخمر)	۲	یک یا بیشتر از یک	✗	✗	✓	✓ (بسیاری از آن‌ها)

قیدبازی در دیسک‌ها

همه

- ○ توانایی همانندسازی و رونویسی مستقل از کروموزوم اصلی میزبان را دارند.
- ○ توانایی استفاده از انواع پلی‌مرهای میزبان برای رونویسی و همانندسازی
- ○ دارای ۴ نوع مونومر و ۲ نوع پیوند اشتراکی و غیراشتراکی
- ○ دنای خارج کروموزومی هستند.
- ○ فاقد قند ریبوز، باز آلی یوراسیل و نوکلئوزوم هستند.

بیشتر

- ○ ژن مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک را دارند.

برخی

- ○ فاقد ژن مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک هستند.
- ○ دارای یک جایگاه تشخیص برای یک نوع آنزیم برش‌دهنده
- ○ دارای بیش از یک جایگاه تشخیص برای آنزیم برش‌دهنده

افزایش پایداری پروتئین‌ها با مهندسی پروتئین			
نام پروتئین	آمیلاز	اینترفرون	پلاسمین
عملکرد	تجزیهٔ مولکول‌های نشاسته به قطعات کوچک‌تر	دارای فعالیت ضدویروسی / ایجاد مقاومت در برابر ویروس‌ها	تجزیهٔ لخته‌ها
کاربرد	از جمله آنزیم‌های پرکاربرد صنعتی / کاربرد در بخش‌های صنایع غذایی، نساجی و تولید شوینده‌ها	تولید داروهای ضدویروسی	دارای کاربرد درمانی / تجزیهٔ لخته‌های اضافی در سرخرگ‌ها
روش تولید پروتئین اولیه	مهندسی ژنتیک	مهندسی ژنتیک	مهندسی ژنتیک
نقش مهندسی پروتئین	تولید آمیلازهای پایدار در برابر گرما	افزایش عملکرد و پایداری پروتئین	افزایش مدت زمان فعالیت پلاسمایی، افزایش اثرات درمانی
روش تغییر پروتئین	ـــــ	جهش جانشینی دگرمعنا: جایگزین کردن فقط یک آمینواسید	جهش جانشینی دگرمعنا: جایگزین کردن فقط یک آمینواسید
نتیجه	کاهش زمان واکنش، صرفه‌جویی اقتصادی و در نتیجه، افزایش بهره‌وری صنعتی	۱ـ افزایش فعالیت ضدویروسی تا حد پروتئین طبیعی ۲ـ پایدارتر شدن پروتئین ← افزایش مدت نگهداری دارو	۱ـ اثر طولانی‌مدت در پلاسما ۲ـ اثرات درمانی بهتر ۳ـ پایدارتر شدن پروتئین ← افزایش مدت نگهداری دارو

در تغییر جزئی مهندسی پروتئین برای تولید یک پروتئین جهش جانشینی از نوع دگرمعنا انجام می‌شود؛ چون یک یا چند نوع آمینواسید در توالی زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی تغییر می‌کند.

در تغییر گسترده می‌توان پروتئینی تولید کرد که ویژگی چند پروتئیم مختلف را به صورت یک‌جا داشته باشد.

نوع، تعداد، ترتیب و تکرار آمینواسیدها، ساختار اول پروتئین‌ها را تعیین می‌کند؛ بنابراین، تغییر در توالی آمینواسیدها سبب تغییر در ساختار اول پروتئین می‌شود (فصل ۱ دوازدهم).

گفتار ۲ فناوری مهندسی پروتئین و بافت

روش‌های جدید امکان ایجاد تغییرات دلخواه در توالی آمینواسیدهای یک پروتئین را فراهم کرده است که می‌توان از آن‌ها به منظور تغییر در ویژگی‌های یک پروتئین و بهبود عملکرد آن بهره‌مند شد. انجام چنین تغییراتی که به آن **مهندسی پروتئین** گفته می‌شود، نیازمند شناخت کامل ساختار و عملکرد آن پروتئین است. این تغییرات می‌تواند جزئی یا کلی باشد.

تغییر جزئی شامل تغییر در رمز یک یا چند آمینواسید در مقایسه با پروتئین طبیعی است. تغییرات عمده، گسترده‌تر است و می‌تواند شامل برداشتن قسمتی از ژن یک پروتئین تا ترکیب بخش‌هایی از ژن‌های مربوط به پروتئین‌های متفاوت باشد.

می‌دانیم تغییر در توالی آمینواسیدها ممکن است باعث تغییر در شکل فضایی مولکول پروتئین و در نتیجه تغییر در عمل آن شود. چنین پروتئین‌های تغییر یافته‌ای با اهداف مختلف، مثلاً درمانی و تحقیقاتی ساخته می‌شوند.

از تغییرات و اصلاحات مفید در فرایند مهندسی پروتئین‌ها می‌توان به افزایش پایداری پروتئین در مقابل گرما و تغییر pH، افزایش حداکثری سرعت واکنش و تمایل آنزیم برای اتصال به پیش‌ماده اشاره کرد.

افزایش پایداری پروتئین‌ها

امروزه با دستیابی به روش‌های مهندسی پروتئین می‌توان پایداری آن‌ها را در مقابل گرما افزایش داد. این موضوع اهمیت زیادی دارد زیرا در دمای بالاتر سرعت واکنش بیشتر و خطر آلودگی میکروبی در محیط واکنش کمتر می‌شود. همچنین، نیازی به خنک کردن محیط واکنش به‌خصوص در مورد واکنش‌های گرمازا نیست. در ادامه مثال‌هایی از افزایش پایداری پروتئین‌ها، ارائه می‌دهیم.

آمیلازها: این آنزیم‌ها که از آنزیم‌های پرکاربرد در صنعت هستند مولکول‌های نشاسته را به قطعات کوچک‌تری تجزیه می‌کنند. آمیلازها در بخش‌های مختلف صنعتی مانند صنایع غذایی، نساجی و تولید شوینده‌ها کاربرد دارند. بسیاری از مراحل تولید صنعتی در دماهای بالا انجام می‌شود. بنابراین، استفاده از آمیلاز پایدار در برابر گرما ضرورت دارد. امروزه به کمک روش‌های زیست فناوری، طراحی و تولید آمیلازهای مقاوم به گرما ممکن شده است. استفاده از این مولکول‌ها باعث کاهش زمان واکنش، صرفه‌جویی اقتصادی و در نتیجه افزایش بهره‌وری صنعتی می‌شود. مشاهده شده است که در طبیعت نیز آمیلاز مقاوم به گرما وجود دارد. مثلاً باکتری‌های گرمادوست در چشمه‌های آب گرم دارای آمیلازهایی هستند که پایداری بیشتری در مقابل گرما دارند.

اینترفرون: به یاد دارید که اینترفرون از پروتئین‌های دستگاه ایمنی است. وقتی این پروتئین با روش مهندسی ژنتیک ساخته می‌شود، فعالیتی بسیار کمتر از اینترفرون طبیعی دارد. علت این کاهش فعالیت، تشکیل پیوندهای نادرست در هنگام ساخته شدن آن در باکتری است. پیوندهای نادرست باعث تغییر در شکل مولکول و درنتیجه کاهش فعالیت آن می‌شوند. به کمک فرایند مهندسی پروتئین، تغییر جزئی در رمز آمینواسید، توالی آمینواسیدهای اینترفرون طوری تغییر می‌یابد که به جای یکی از آمینواسیدهای آن آمینواسید دیگری قرار می‌گیرد. این تغییر، فعالیت ضد ویروسی اینترفرون ساخته شده

مقایسهٔ اینترفرون‌های تولیدشده به روش مهندسی ژنتیک و مهندسی پروتئین		
موارد مقایسه	اینترفرون تولیدشده در مهندسی ژنتیک	اینترفرون تولیدشده در مهندسی پروتئین
داشتن ساختار متفاوت با اینترفرون طبیعی	بله	بله
محل تشکیل	درون باکتری	-
تشکیل پیوندهای نادرست هنگام ساخته‌شدن	بله	خیر
ایجاد تغییر در توالی آمینواسیدی	خیر	بله
نوع تغییر در توالی آمینواسیدی	-	تغییر جزئی (تغییر رمز یک آمینواسید)
عداد آمینواسید متفاوت با اینترفرون طبیعی	صفر	یک
میزان فعالیت ضدویروسی	کمتر	بیشتر
میزان فعالیت ضدویروسی در مقایسه با اینترفرون طبیعی	بسیار کم‌تر از آن	به یک اندازه با آن
میزان پایداری	کمتر	بیشتر
یزان پایداری در مقایسه با اینترفرون طبیعی	-	بیشتر
امکان نگهداری طولانی‌مدت	ندارد	دارد
کاربرد به عنوان دارو	ندارد	دارد

پلاسمین و اینترفرون مهندسی‌شده، استفاده‌های دارویی دارند اما آمیلاز مهندسی‌شده در صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرد.

پلاسمین یک آنزیم پروتئینی است.

را به اندازهٔ پروتئین طبیعی افزایش می‌دهد و همچنین آن را پایدارتر می‌کند. افزایش پایداری در نگهداری طولانی‌مدت پروتئین‌هایی که به‌عنوان دارو استفاده می‌شوند، اهمیت زیادی دارد.

پلاسمین: می‌دانیم تشکیل لخته، یک فرایند زیستی مهم است که از ادامه خونریزی جلوگیری می‌کند، اما تشکیل لخته در سرخرگ‌های شش، مغز و ماهیچه قلب به‌ترتیب منجر به بسته شدن رگ‌های شش، سکته مغزی و قلبی می‌شود که بسیار خطرناک است و می‌تواند باعث مرگ شود. لخته‌ها به‌طور طبیعی در بدن توسط آنزیم پلاسمین تجزیه می‌شوند. پلاسمین کاربرد درمانی دارد، اما مدت اثر آن در پلاسما خیلی کوتاه است. جانشینی یک آمینواسید پلاسمین با آمینواسید دیگری در توالی، باعث می‌شود که مدت زمان فعالیت پلاسمایی و اثرات درمانی آن بیشتر شود.

مهندسی بافت

از دست رفتن بافت به‌دلیل آسیب یا بیماری، زندگی را دشوار و هزینهٔ بالای اقتصادی و اجتماعی را بر فرد بیمار و خانواده او تحمیل می‌کند. فرض می‌کنیم که به علت سوختگی وسیع نیاز به پیوند پوست وجود داشته باشد. چنانچه اهداکننده پوست مناسب وجود نداشته باشد و یا به‌علت وسعت سوختگی، برداشت پوست از بدن بیمار ممکن نباشد، بهترین راه، کشت بافت و پیوند پوست است. ثابت شده است که در پوست یاخته‌هایی وجود دارد که توانایی تکثیر زیاد و تمایز به انواع یاخته‌های پوست را دارند. امروزه در **مهندسی بافت** از این یاخته‌ها، به‌طور موفقیت‌آمیزی استفاده می‌شود.

متخصصان مهندسی بافت، در زمینه تولید و پیوند اعضا نیز فعالیت می‌کنند. برای نمونه، جراحان بازسازی کنندهٔ چهره می‌توانند به کمک روش‌های مهندسی از بافت غضروف برای بازسازی لاله گوش و بینی استفاده کنند. در این روش، یاخته‌های غضروفی را در محیط کشت روی داربست مناسب تکثیر و غضروف جدید را برای بازسازی اندام آسیب دیده تولید می‌کنند (شکل ۷).

شکل ۷ـ مهندسی بافت غضروف گوش انسان: عکس گوش طبیعی (چپ) تصویر رقمی (دیجیتالی) (وسط) و غضروف گوش ساخته شده با روش مهندسی بافت بعد از دو هفته (راست)

یاخته‌های بنیادی و مهندسی بافت: یاخته‌های تمایز یافته‌ای مانند یاخته‌های ماهیچه‌ای در محیط کشت به مقدار کم تکثیر می‌شوند و یا اصلاً تکثیر نمی‌شوند. به‌همین دلیل، در چنین مواردی از منابع یاخته‌ای که سریع تکثیر می‌شوند مثل یاخته‌های بنیادی جنینی یا یاخته‌های بنیادی بالغ استفاده می‌کنند. یاخته‌های بنیادی جنینی، همان توده یاخته‌ای درونی هستند. یاخته‌های بنیادی بالغ در

- اینترفرون
  - نوع ۱
    - از یاختهٔ آلوده به ویروس ترشح می‌شود.
    - مقاوم‌سازی یاختهٔ آلوده به ویروس و یاخته‌های سالم مجاور
  - نوع ۲
    - از یاخته‌های کشندهٔ طبیعی و لنفوسیت‌های T ترشح می‌شود.
    - درشت‌خوارها را فعال می‌کند و در مبارزه علیه یاخته‌های سرطانی نقش مهمی دارد.

ژن سازندهٔ اینترفرون می تواند توسط رنابسپاراز ۲ (در یاختهٔ یوکاریوتی) و یا رنابسپاراز پروکاریوتی (در باکتری) رونویسی شود (فصل ۲ دوازدهم).

اینترفرون در یاخته‌های آلوده به ویروس توسط رناتن‌های روی شبکهٔ آندوپلاسمی زبر تولید می‌شود. این پروتئین بعد از تولید از انتهای آمین خود وارد شبکهٔ آندوپلاسمی زبر می‌شود و بعد از تغییراتی به دستگاه گلژی وارد می‌شود و در نهایت با اگزوسیتوز از یاخته‌های سازنده خارج می‌شود (فصل ۲ دوازدهم).

در بدن انسان ژن سازندهٔ اینترفرون نوع۱، در همهٔ یاخته‌های هسته‌دار وجود دارد و تنها زمانی بیان می‌شود که یاخته آلوده به ویروس شود.

تفاوت توالی اینترفرون طبیعی با اینترفرون مهندسی ژنتیک در یک آمینواسید است نه یک جفت!

در زیست‌فناوری با استفاده از مهندسی ژنتیک و مهندسی پروتئین، اینترفرون تولید می‌شود.

	اینترفرون نوع۱	پلاسمین
عملکرد	دارای فعالیت ضدویروسی	تجزیهٔ لخته‌های خونی
کاربرد	تولید داروهای ضدویروسی	دارای کاربرد درمانی / تجزیهٔ لخته‌های اضافی در سرخرگ‌ها
نقش مهندسی پروتئین	افزایش عملکرد و پایداری پروتئین	افزایش مدت زمان فعالیت پلاسمایی، افزایش اثرات درمانی
روش تغییر پروتئین	جایگزین کردن فقط یک آمینواسید	جایگزین کردن فقط یک آمینواسید
نتیجهٔ تغییر مهندسی پروتئین	افزایش فعالیت ضدویروسی تا حد پروتئین طبیعی پایدارتر شدن پروتئین ← افزایش مدت نگهداری دارو	اثر طولانی‌مدت در پلاسما پایدارتر شدن پروتئین ← افزایش مدت نگهداری دارو

نکات یادآوری لخته و انعقاد:

۱ ـ آزاد شدن یکی از ترکیبات فعال (آنزیم پروترومبیناز) درون پلاکت‌های آسیب‌دیده، سبب آغاز فرایندی می‌شود که منجر به تشکیل لخته در محل خون‌ریزی‌های شدید خواهد شد. (دهم، فصل ۴)

۲ ـ در شرایط عادی، فیبرینوژن و پروترومبین در پلاسما وجود دارند؛ ولی پروترومبیناز، ترومبین و فیبرین فقط در شرایط خون‌ریزی در پلاسما دیده می‌شوند. (دهم، فصل ۴)

۳ ـ اختلال در ترشح صفرا و کارکرد آن، موجب کم شدن جذب ویتامین‌های محلول در چربی از جمله ویتامین K شده و در نهایت در روند لخته‌شدن خون اشکال ایجاد می‌شود. (دهم، فصل ۲)

۴ ـ ویتامین‌های محلول در چربی به رگ‌های لنفی جذب می‌شوند؛ پس مسدود شدن رگ‌های لنفی نیز موجب کمبود ویتامین K خواهد شد. (دهم، فصل ۲)

۵ ـ باکتری‌های همزیست روده بزرگ نیز ویتامین K تولید می‌کنند؛ پس خوردن بیش از حد آنتی‌بیوتیک نیز موجب از بین رفتن این باکتری‌های مفید روده‌ای و کمبود ویتامین K در بدن خواهد شد. (دهم، فصل ۲)

۶ ـ اختلال در جذب کلسیم در روده باریک نیز سبب بروز اشکال در روند لخته‌شدن خون می‌شود. (دهم، فصل ۲ و ۴)

۷ ـ ویتامین D به جذب کلسیم کمک می‌کند. در نتیجه کاهش ویتامین D، موجب کاهش جذب کلسیم شده و در روند لخته‌شدن خون اشکال ایجاد می‌شود. (یازدهم، فصل ۴)

۸ ـ در لختهٔ حاصل از پروتئین‌های فیبرین، علاوه بر گویچه‌های قرمز، گویچه‌های سفید و پلاکت نیز به دام می‌افتند. (دهم، فصل ۴)

۹ ـ در خون‌ریزی‌های شدید برخلاف خون‌ریزی‌های محدود، درپوش ایجاد نمی‌شود. (دهم، فصل ۴)

۱۰ ـ پلاسمین به طور طبیعی درخون انسان وجود دارد و موجب تجزیهٔ لختهٔ خون می‌شود. (دوازدهم، فصل ۷)

۱۱ ـ هپارین که از بازوفیل ترشح می‌شود، ماده‌ای ضد انعقاد خون است. (یازدهم، فصل ۵)

۱۲ ـ کم‌کاری غدد پاراتیروئید می‌تواند کمبود کلسیم در پلاسما را در پی داشته باشد و موجب بروز اختلال در روند لخته شدن خون شود

۱۳ ـ پرکاری تیروئید می‌تواند موجب افزایش ترشح هورمون کلسی‌تونین و افزایش ممانعت برداشت کلسیم از بافت‌های استخوانی شود؛ و درنتیجهٔ کمبود کلسیم در پلاسما، در روند لخته شدن خون اختلال ایجاد شود. (یازدهم، فصل ۴)

۱۴ ـ در افراد مبتلا به هموفیلی، انعقاد خون با مشکل مواجه می‌شود که اغلب به علت فقدان عامل انعقادی VIII می‌باشد. (

پلاسمین می‌تواند در مقادیر اندک، بر مقدار زیادی فیبرین تاثیر بگذارد.

مثال سلول بنیادی بالغ ← سلول‌های بنیادی کبد

سلول‌های بنیادی مغز استخوان

3 نوع

مثال سلول‌های بنیادی جنینی ← مورولا ← تخم تقسیم نایافته حاصل از لقاح

بلاستولا ← سلول‌های تودهٔ درونی جنینی حاصل از

نوع یاختهٔ بنیادی			یاخته‌های حاصل از تقسیم و تمایز
یاختهٔ بنیادی بالغ	پوست		انواع یاخته‌های پوست
	کبد		یاخته‌های کبدی و مجاری صفراوی
	مغز استخوان	میلوئیدی	گویچهٔ قرمز نابالغ + مگاکاریوسیت + گویچه‌های سفید دانه‌دار + مونوسیت
		لنفوئیدی	لنفوسیت‌ها
		سایر	رگ‌های خونی، ماهیچهٔ اسکلتی و قلبی، یاختهٔ عصبی، یاختهٔ استخوانی
جنینی	مورولا	تودهٔ یاخته‌ای حاصل تقسیمات متوالی میتوزی یاختهٔ تخم	همهٔ یاخته‌های جنینی و خارج جنینی (جفت و پرده‌های جنینی)
	بلاستولا	یاخته‌های درونی بلاستوسیست	همهٔ یاخته‌های جنینی

۱ـ همهٔ انواع یاخته‌های بنیادی، سریع تکثیر می‌شوند و چرخهٔ یاخته‌ای کوتاهی دارند.
۲ـ یاخته‌های بنیادی، می‌توانند تکثیر و به انواع متفاوت یاخته تبدیل شوند.
۳ـ یاخته‌های بنیادی، توانایی به وجود آوردن یاخته‌های مشابه خود را نیز دارند.

سلولهای بنیادی

مایع (فعال)

پوست ← تولید پوست

عضروف ← بازسازی غضروف لاله گوش و بینی

لثه ← سلولهای لثه
" مجرای صفراوی

مغز قرمز استخوان

بنیادی

RBC نابالغ ← RBC بالغ

مگاکاریوسیت ← PLT

بازوفیل

نوتروفیل

ائوزینوفیل

مونوسیت

لنفوئیدی

سلول B

سلول T ← T کشنده، کشنده اصلی، آگاه کننده

جنینی

توده سلولی مورولا

فرانشیمی

کلاژن خونی

هاپلوئید اسطقسی

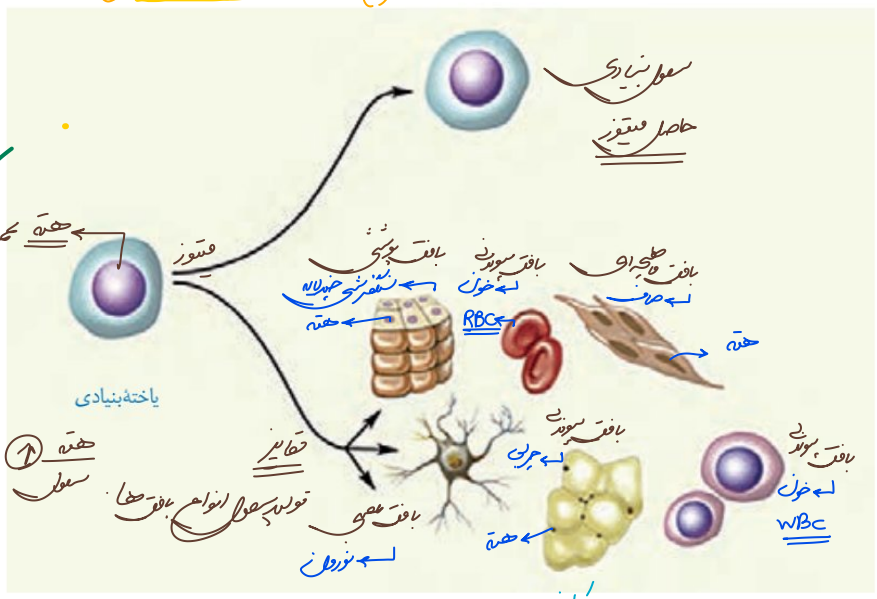
هاپلوئید فلسی

سلولهای عصبی

سلولهای استخوانی

توده سلولی داخلی
در دوران بلاستولا

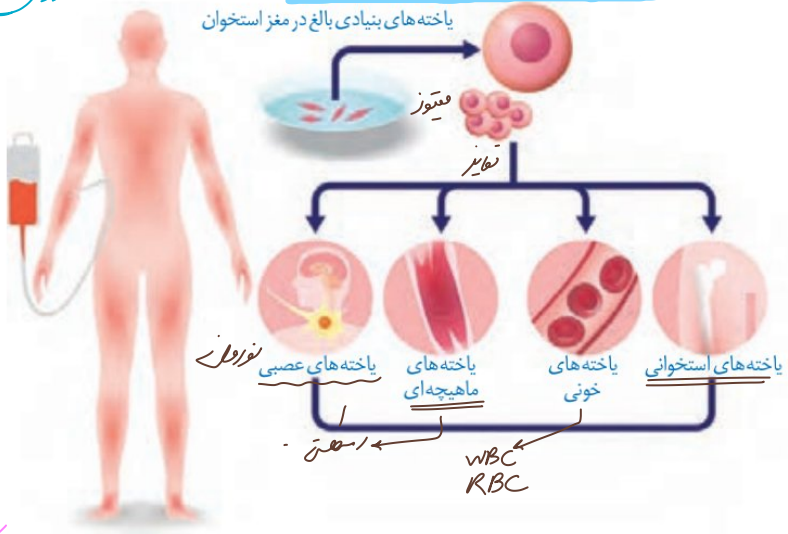
بافت‌ها یافت می‌شوند. یاخته‌های بنیادی می‌توانند تکثیر و به انواع متفاوت یاخته تبدیل شوند (شکل ۸).



شکل ۸ـ یاخته‌های بنیادی توانایی ۱ تکثیر و به‌وجود آوردن یاخته‌های مشابه خود؛ و نیز توانایی ۲ تبدیل شدن به سایر یاخته‌ها را دارند.

یاخته‌های بنیادی بالغ: در بافت‌های مختلف بدن یاخته‌های بنیادی وجود دارند که در محیط کشت تکثیر می‌شوند. به‌عنوان مثال یاخته‌های بنیادی کبد می‌توانند تکثیر شوند و به یاخته کبدی یا یاخته مجرای صفراوی تمایز پیدا کنند.

با دو نوع از یاخته‌های بنیادی مغز استخوان قبلاً آشنا شده‌اید. آیا آنها را به یاد دارید؟ انواع دیگری از یاخته‌های بنیادی در مغز استخوان وجود دارند که می‌توانند به رگ‌های خونی، ماهیچه اسکلتی و قلبی تمایز پیدا کنند. این یاخته‌ها از فرد بالغ برداشته و کشت داده می‌شوند (شکل ۹).



شکل ۹ـ یاخته‌های بنیادی مغز استخوان به انواع مختلف یاخته‌ها و بافت‌ها تمایز پیدا می‌کنند.

یاخته‌های بنیادی جنینی: جنین یاخته‌هایی نه‌تنها قادر به تشکیل همه بافت‌های بدن جنین هستند، بلکه اگر در مراحل اولیهٔ جنینی جداسازی شوند، می‌توانند یک جنین کامل را تشکیل دهند. این یاخته‌ها بعد از جداسازی کشت داده و برای تشکیل بسیاری از انواع یاخته‌ها تحریک می‌شوند (شکل ۱۰).

اما تمایز چنین یاخته‌هایی هنوز نمی‌تواند به گونه‌ای تنظیم شود که بتوانند همه انواع یاخته‌هایی را که در بدن جنین تولید می‌کنند در شرایط آزمایشگاهی نیز به‌وجود بیاورند.

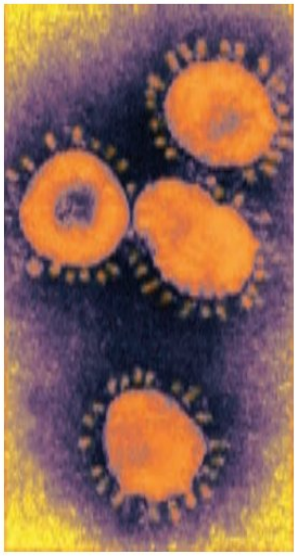
شکل ۱۰ـ الف) یاخته‌های بنیادی مورولا به همه انواع یاخته‌های جنینی و خارج جنینی (جفت و پرده‌ها) متمایز می‌شوند.

ب) یاخته‌های بنیادی توده یاخته‌ای درونی به انواع یاخته‌های بدن جنین متمایز می‌شوند.

بیوانفورماتیک

مهندسی پروتئین و بافت از علمی به نام بیوانفورماتیک بهره می‌برند. این علم با استفاده از مفاهیم زیست‌شناختی، ریاضی، آمار و علوم رایانه‌ای، مبنایی برای درک، طبقه‌بندی، مدل‌سازی و تجزیه و تحلیل داده‌های زیستی فراهم می‌کند. بیوانفورماتیک نقش مهمی در بررسی پروتئین‌ها در مواردی مانند تعیین توالی، ساختار سه‌بعدی، پایداری، پیش‌بینی ساختار و عملکرد پروتئین‌ها و نیز عوامل مؤثر بر آنها دارد.

این علم در بسیاری از پژوهش‌های زیستی که با حجم عظیمی از داده و عوامل متفاوت سروکار دارند، استفاده می‌شود. یک مثال، ساختن واکسن علیه بیماری کرونا است. عامل این بیماری، ویروسی از خانواده ویروس‌های تاجی[1] است (شکل ۱۱). محققان در سراسر جهان با دنیاگیری[2] کرونا به مطالعه و بررسی آن پرداختند؛ به‌طوری که در زمانی کوتاه حجم عظیمی از داده‌ها تولید و به اشتراک گذاشته شد. اما این داده‌ها چگونه به ساختن واکسن کرونا کمک کرد؟ پژوهشگران با بهره‌مندی از بیوانفورماتیک توانستند با استفاده از این داده‌ها به فرضیه‌هایی قابل آزمون در ارتباط با نحوه عملکرد ویروس برسند و به‌جای بررسی همه فرضیه‌ها، تشخیص دهند که کدام یک از آنها را مورد آزمایش قرار دهند. بنابراین بیوانفورماتیک علاوه بر کوتاه کردن مسیر تحلیل داده‌ها، به صرفه‌جویی در زمان و کاهش هزینه‌های اقتصادی برای انجام آزمایش‌ها نیز کمک کرد؛ به‌طوری که بدون استفاده از این علم، ساختن واکسنی در مدتی به اندازه چند ماه امکان نداشت، رویدادی که انجام آن در گذشته چندین سال زمان می‌برد. بیوانفورماتیک همچنین مسیر شناسایی ژنوم جانداران، درک شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنی و نیز تشخیص ارتباط بین دنا و پروتئین را ساده کرده است؛ چیزی که شاید در نبود این علم به سختی ممکن بود.



شکل ۱۱ـ ویروس کرونا در مشاهده با میکروسکوپ الکترونی (۶۰۰۰۰ برابر)

۱ـ Corona Viruses
۲ـ Pandemic

گفتار ۳ کاربردهای زیست فناوری

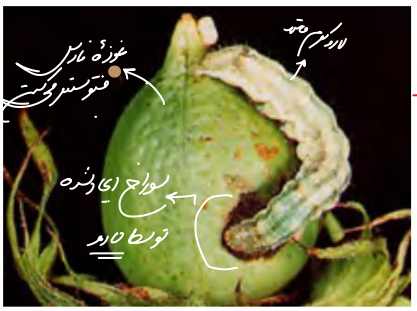
همان‌طور که در گفتار قبلی دیدید زیست فناوری در زمینه‌های متفاوتی کاربرد دارد. اکنون می‌خواهیم بدانیم چگونه می‌توان از این شاخهٔ علمی برای بهبود کیفیت زندگی انسان و حفظ محیط‌زیست بهره برد.

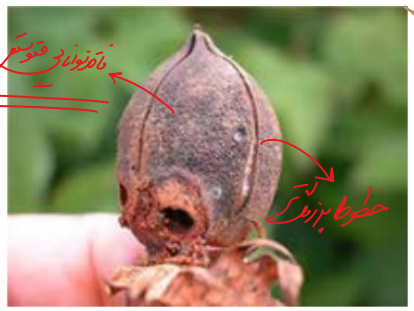
کاربرد زیست فناوری در کشاورزی

تحول در کشاورزی نوین توانست افزایش چشمگیری در محصولات کشاورزی مانند گندم، برنج و ذرت ایجاد کند. استفاده از کودها و سموم شیمیایی، کشت انواع محصول، استفاده از ماشین‌ها در کشاورزی و افزایش سطح زیر کشت از نتایج این تحول بود. اما در کنار آن شاهد عواقب زیانباری همچون آلودگی محیط‌زیست، کاهش تنوع ژنی و تخریب جنگل‌ها و مراتع نیز بوده‌ایم. امروزه نمی‌توان برای افزایش محصولات به هر روشی متوسل شد. بنابراین، شاید فناوری‌های جدید زیستی بتوانند تا حدودی مشکلات بشر را در این زمینه حل کنند.

یکی از کاربردهای زیست فناوری، تولید گیاهان مقاوم در برابر بعضی آفت‌ها هستند. این روش توانسته است مصرف آفت‌کش‌ها را کاهش دهد. به‌عنوان مثال برخی از باکتری‌های خاکزی، پروتئین‌هایی تولید می‌کنند که حشرات مضر برای گیاهان زراعی را می‌کُشند. این باکتری‌ها در مرحله‌ای از رشد خود نوعی پروتئین سمی می‌سازند که ابتدا به صورت مولکولی غیرفعال است. این مولکول در بدن حشره فعال شده، حشره را از بین می‌برد. چرا این سم نمی‌تواند خود باکتری را از بین ببرد؟ (پیش‌سم غیرفعال، تحت‌تأثیر آنزیم‌های گوارشی موجود در لوله گوارش حشره شکسته و فعال می‌شود. سم فعال شده باعث تخریب یاخته‌های لوله گوارش و سرانجام مرگ حشره می‌شود.)

برای تولید گیاه مقاوم به آفت، ابتدا ژن مربوط به این سم از ژنوم باکتری جداسازی و پس از همسانه‌سازی به گیاه مورد نظر انتقال داده می‌شود. تاکنون با این روش چند نوع گیاه مقاوم مثل ذرت، پنبه و سویا تولید شده‌اند. همان‌طور که در شکل ۱۲ می‌بینید نوزاد کرمی شکل (لارو) به درون غوزه نارس پنبه نفوذ می‌کند، بنابراین برای از بین بردن این آفت سم پاشی‌های متعدد لازم است، زیرا آفت در معرض سم قرار نمی‌گیرد. از سوی دیگر، استفاده زیاد سم برای محیط‌زیست مضر است. امروزه با کمک فناوری زیستی و تولید پنبه‌های مقاوم، نیاز به سم‌پاشی مزارع پنبه تا حدود زیادی کاهش پیدا کرده است. حشره در اثر خوردن گیاه مقاوم شده از بین می‌رود و فرصت ورود به درون غوزه را از دست می‌دهد. بنابراین، نیاز به سم پاشی مزرعه کاهش می‌یابد.





شکل ۱۲ــ آلوده شدن غوزه گیاه پنبه به آفت را نشان می‌دهد. گیاه سالم (سمت چپ)، ورود آفت به درون غوزه (وسط) و گیاه آلوده (سمت راست)

* مش سم غیرفعال

Pro

تولید ✓ در باکتری خاک زندگی میکنه و در ریشه گیاه تراوش میکنه

تولید ✓ در باکتری خاک زندگی میکنه و در ریشه گیاه تراوش میکنه و در لوله گوارش حشرات آفت میکشه

تولید ✓ در باکتری خاک زندگی میکنه و در ریشه گیاه تراوش میکنه و در لوله گوارش حشرات آفت میکشه

تشدید ؟! صحیح جا !!

* سم فعال

Pro

تولید ✓ فقط در لوله گوارش حشرات آفت میکشه

تشدید ✓ صحیح جا خواهد داشته باشه !!

ابزار زیست فناوری در پزشکی

تولید داروی ژن درمانی

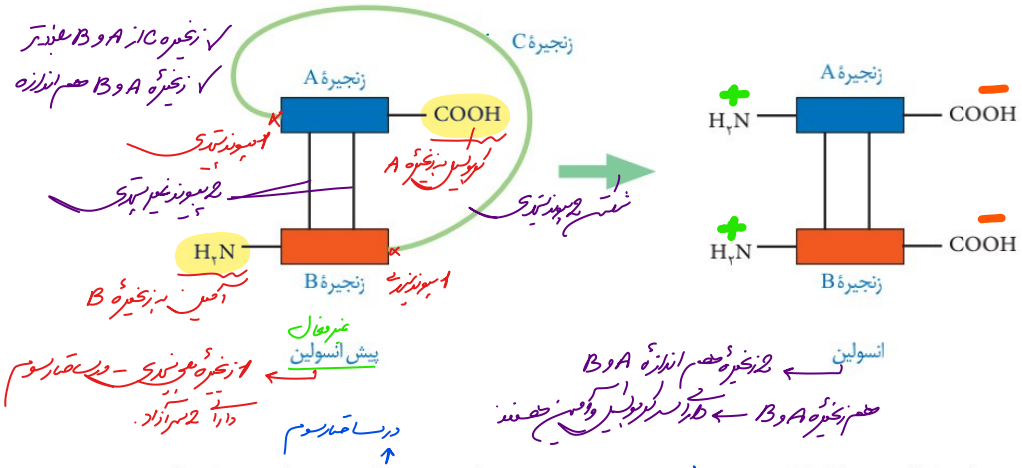
تولید واکسن

تشخیص بیماری

زیست فناوری علاوه بر تولید گیاهان مقاوم در برابر آفت‌ها، کاربردهای زیادی در زمینهٔ کشاورزی دارد. اصلاح بذر برای تولید گیاهان مطلوب، تولید گیاهان مقاوم به خشکی و شوری، تنظیم سرعت رسیدن میوه‌ها و افزایش ارزش غذایی محصولات نیز با انجام روش‌های مهندسی ژنتیک ممکن شده است. تولید گیاهان زراعی مقاوم به علف‌کش‌ها نیز از دیگر دستاوردهای این فناوری است.

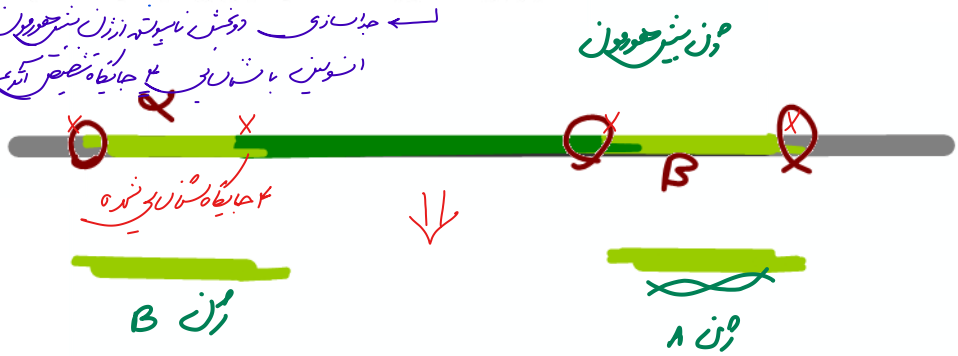
کاربرد زیست فناوری در پزشکی

۱ـ تولید دارو فناوری دنای نوترکیب به‌علت تولید داروهای مطمئن و مؤثر، جایگاه ویژه‌ای در صنعت داروسازی دارد. این داروها، برخلاف فراورده‌های مشابهی که از منابع غیرانسانی تهیه می‌شوند، پاسخ‌های ایمنی ایجاد نمی‌کنند. انسولین یکی از داروهایی است که توسط این فناوری تولید می‌شود. دیابت نوع یک را می‌توان به‌وسیلهٔ دریافت انسولین کنترل کرد. به نظر شما چگونه می‌توان نیاز افراد نیازمند به این ماده را تأمین کرد؟ یکی از روش‌های تهیهٔ انسولین جداسازی و خالص کردن آن از لوزالمعده جانورانی مثل گاو است. روش دیگر، استفاده از مهندسی ژنتیک است. می‌دانیم که باکتری در صورت داشتن ژن انسولین انسانی می‌تواند آن را بسازد. مولکول انسولین فعال، از دو زنجیرهٔ کوتاه پلی‌پپتیدی به نام‌های A و B تشکیل شده است که به یکدیگر متصل هستند. در پستانداران از جمله انسان انسولین به‌صورت یک مولکول پیش‌هورمون ساخته می‌شود.



شکل ۱۳ـ جدا شدن زنجیرهٔ C و تبدیل پیش‌انسولین به انسولین

همان‌طور که در شکل ۱۳ می‌بینید، پیش‌هورمون به‌صورت یک زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی است و با جدا شدن بخشی از توالی به‌نام زنجیرهٔ C به هورمونِ فعال تبدیل می‌شود. مهم‌ترین مرحله در ساخت انسولین به روش مهندسی ژنتیک، تبدیل انسولین غیرفعال به انسولین فعال است، زیرا تبدیل پیش‌هورمون به هورمون در باکتری انجام نمی‌شود. در سال ۱۹۸۳ برای اولین بار دو توالی دنا به‌صورت جداگانه برای رمز کردن زنجیره‌های A و B انسولین تولید و توسط دیسک به نوعی



ژن زنجیره A

ژن زنجیره C

ژن زنجیره B

ژن پیش هورمون انسولین

رونویسی توسط RNA پلیمراز II

ژن پیش هورمون

* رشته الگو هر ژن یک رشته دارد و دارای یک توالی نوکلئوتیدی است.

رونوشت ژن A

رونوشت ژن C

رونوشت ژن B

mRNA

ترجمه

زنجیره A

زنجیره C

زنجیره B

3'

تعدیل نهایی

Pro

۴۵

C

A

B

پیش هورمون

حذف اینترون‌ها و متصل شدن بخش‌های A و C و B

هورمون فعال

۱ هر زنجیره‌ای از پیش انسولین که انتهای آمینی آزاد دارد ← B

۲ هر زنجیره‌ای از پیش انسولین که انتهای کربوکسیلی آزاد دارد ← A

۳ هر زنجیره‌ای از انسولین فعال که انتهای آمینی آزاد دارد ← A و B

۴ هر زنجیره‌ای از انسولین فعال که انتهای کربوکسیلی آزاد دارد ← A و B

۵ هر زنجیره‌ای از انسولین فعال که طی فعال شدن انتهای آمینی در آن تشکیل می‌شود ← A

۶ هر زنجیره‌ای از انسولین فعال که طی فعال شدن، انتهای کربوکسیلی در آن تشکیل می‌شود ← B

۷ زنجیرهٔ C در پیش انسولین طول بیشتری نسبت به زنجیرهٔ A و B دارد.

پیش انسولین	انسولین
به صورت یک زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی بزرگ است که خود از ۳ زنجیرهٔ A، B و C تشکیل شده است.	از دو زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی A و B تشکیل شده است.
زنجیره‌های A و B توسط دو پیوند (این پیوندها، غیرپپتیدی هستند!) به هم متصل هستند.	
انتهای آمینی زنجیرهٔ A به انتهای کربوکسیلی زنجیرهٔ C متصل است.	انتهای آمینی زنجیرهٔ A آزاد است.
انتهای کربوکسیل زنجیرهٔ B به انتهای آمین زنجیرهٔ C متصل است.	انتهای کربوکسیل زنجیرهٔ B آزاد است.
انتهای کربوکسیل زنجیرهٔ A و انتهای آمین زنجیرهٔ B آزاد است.	
زنجیره‌های A و B هم از طریق زنجیرهٔ C و هم از طریق پیوندهای غیرپپتیدی به هم اتصال دارند.	زنجیره‌های A و B فقط از طریق پیوندهای غیرپپتیدی به‌هم متصل‌اند.
زنجیره‌های A و B به‌صورت مستقیم از طریق پیوند بین ۴ آمینواسید به هم متصل‌اند؛ هر یک از پیوندهای غیرپپتیدی بین دو آمینواسید است.	

نوع پلی‌پپتید	وجود در پیش‌انسولین	وجود در انسولین فعال	رونویسی و ترجمه در روند مهندسی ژنتیک	انتهای کربوکسیلی	انتهای آمینی	ترتیب ترجمه در پیش‌انسولین	طول پلی‌پپتید
زنجیرهٔ A	+	+	+	آزاد	پیوند پپتیدی با زنجیرهٔ C	۳	کوتاه
زنجیرهٔ B	+	+	+	پیوند پپتیدی با زنجیرهٔ C	آزاد	۱	کوتاه
زنجیرهٔ C	+	-	-	پیوند پپتیدی با زنجیرهٔ A	پیوند پپتیدی با زنجیرهٔ B	۲	بلند

- در زمان رونویسی از ژن سازندهٔ پیش انسولین، بخش‌هایی از ژن که منجر به تولید زنجیرهٔ B می‌شوند در مجاورت راه‌انداز و بخش‌هایی از ژن که منجر به تولید زنجیرهٔ A می‌شوند، در مجاورت جایگاه پایان رونویسی قرار دارند.
- در زمان تبدیل پیش انسولین به انسولین، دو پیوند پپتیدی توسط پروتئاز شکسته می‌شود؛ یکی پیوند پپتیدی میان انتهای آمین زنجیرهٔ A و انتهای کربوکسیل زنجیرهٔ C و پیوند دیگر بین انتهای کربوکسیل زنجیرهٔ B و انتهای آمین زنجیرهٔ C.
- زنجیره‌های پلی‌پپتیدی انسولین فعال همانند زنجیره‌های هموگلوبین به صورت نامتقارن قرار می‌گیرند.
- اولین متیونین مولکول انسولین در انتهای آمین زنجیرهٔ B قرار دارد.
- مولکول پیش‌انسولین پس از تولید شدن وارد شبکهٔ آندوپلاسمی می‌شود.

- در یوکاریوت‌ها تنظیم بیان ژن در مراحل مختلفی انجام می‌گیرد. یکی از این مراحل، تنظیم بیان ژن پس از ترجمه است. تبدیل شدن پیش‌انسولین به انسولین مثالی برای این نوع تنظیم است (فصل ۲ دوازدهم).
- بیماری دیابت شیرین نوع ۱ با تزریق روزانه انسولین، کنترل می‌شود. (فصل ۴ یازدهم)

۱- پیش‌انسولین از سه زنجیره تشکیل شده است. در زمان ترجمه رنای پیک مربوط به این پروتئین در ابتدا زنجیرهٔ B، سپس زنجیرهٔ C و سپس زنجیرهٔ A تولید می‌شود.

۲- پیش‌انسولین یک انتهای آمین و یک انتهای کربوکسیل دارد ولی انسولین، دو انتهای آمین و دو انتهای کربوکسیل دارد.

۳- در پیش‌انسولین زنجیرهٔ B به انتهای آمین نزدیک‌تر است و زنجیرهٔ A به انتهای کربوکسیل.

۴- هم در پیش‌انسولین و هم در انسولین، زنجیره‌های A و B توسط دو پیوند اشتراکی به یکدیگر اتصال دارند.

۵- زنجیره‌های A و B اندازهٔ یکسانی دارند.

۶- در پیش‌انسولین انتهای آمین زنجیره C به انتهای کربوکسیل زنجیرهٔ B اتصال دارد و انتهای آمین زنجیرهٔ A به انتهای کربوکسیل زنجیرهٔ C.

۷- هم در پیش‌انسولین و هم در انسولین، انتهای آمین و کربوکسیل زنجیره‌های A و B با یکدیگر پیوندی ندارد.

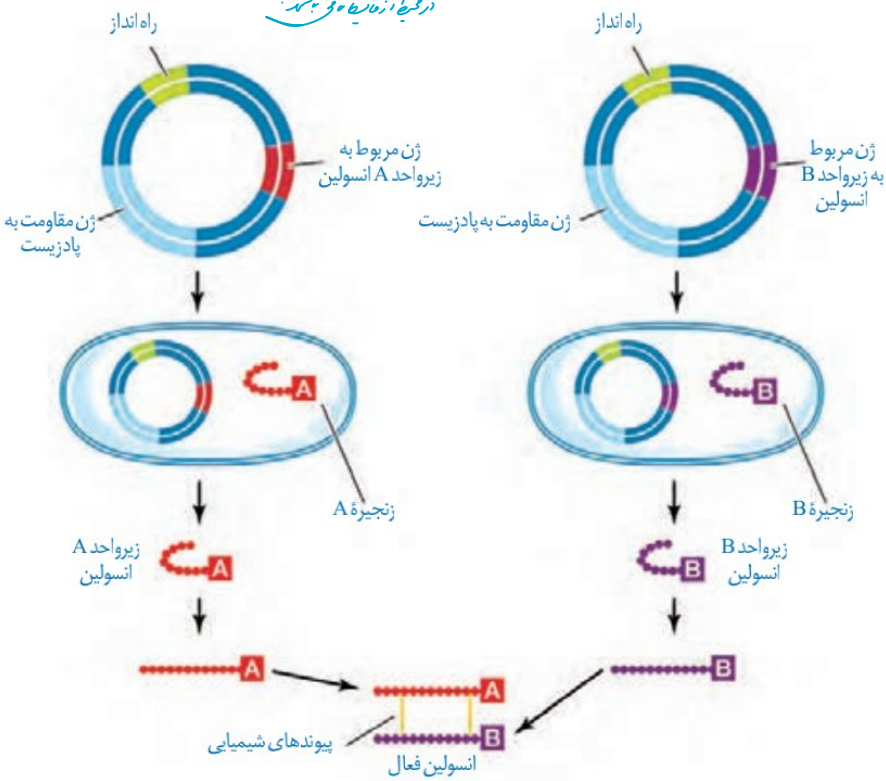
۸- در پیش‌انسولین هر یک از زنجیره‌های A و B یک انتهای آزاد دارند ولی در انسولین هر یک از آنها دو انتهای آزاد دارند.

* تولید زنجیرهٔ A و B در سلول‌های باکتری ترانس‌ژن تولید شد
* تولید محصول انسولین فعال ← در محیط آزمایشگاه!

تولید دو نوع DNA نوترکیب و ایجاد دو نوع باکتری ترانس‌ژن که در یکی زنجیرهٔ B و در دیگری زنجیرهٔ A تولید می‌شود.

باکتری منتقل شدند. سپس، زنجیره‌های پلی‌پپتیدی ساخته شده جمع‌آوری و در آزمایشگاه به‌وسیله پیوندهایی به یکدیگر متصل شدند (شکل ۱۴).

تولید زنجیرهٔ A و B در باکتری‌های ترانس‌ژن و تولید انسولین فعال در محیط آزمایشگاه



الف) انتقال ژن زنجیره‌های A و B انسولین به‌طور جداگانه به دیسک

ب) انتقال دیسک‌های نوترکیب به باکتری و انتخاب یاخته‌های دریافت‌کننده به کمک پادزیست

پ) خالص کردن زنجیره‌ها

ت) ترکیب زنجیره‌های A و B برای تولید انسولین فعال

شکل ۱۴ـ مراحل ساخت انسولین در مهندسی ژنتیک

۲ـ تولید واکسن: روش‌های قبلی تولید واکسن شامل ضعیف کردن میکروب‌ها، کشتن آن‌ها و یا غیرفعال کردن سموم خالص شده آن‌ها با روش‌هایی خاص بود. واکسن تولید شده باید بتواند دستگاه ایمنی را برای مقابله با عامل بیماری‌زا تحریک کند، اما منجر به ایجاد بیماری نشود. چنانچه در مراحل تولید واکسن خطایی رخ دهد، احتمال بروز بیماری در اثر مصرف آن وجود دارد. واکسن‌های تولید شده با روش مهندسی ژنتیک چنین خطری ندارند. در این روش، ژن مربوط به پادگن (آنتی‌ژن) سطحی عامل بیماری‌زا به یک باکتری یا ویروس غیربیماری‌زا منتقل می‌شود. واکسن نوترکیب ضد هپاتیت B با این روش تولید شده است.

تولید سموم خاصه و ایجاد ایمنی فعال

روش قدیمی تولید واکسن

روش تولید واکسن در مهندسی ژنتیک

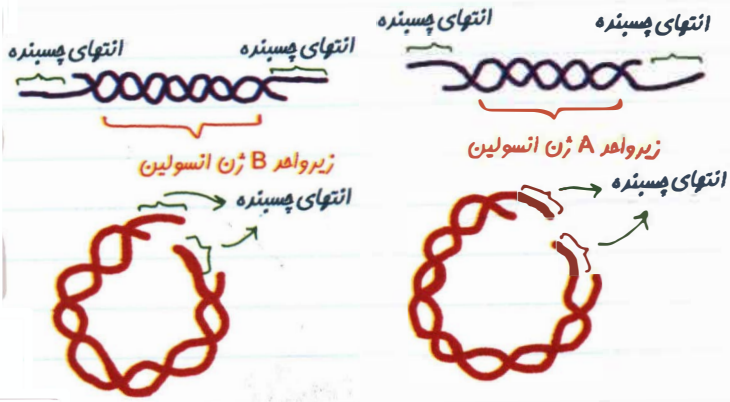
باکتری با ویروس ترانس‌ژنیک به دلیل داشتن Ag عامل بیماری‌زا توسط دستگاه ایمنی شناسایی می‌شود.

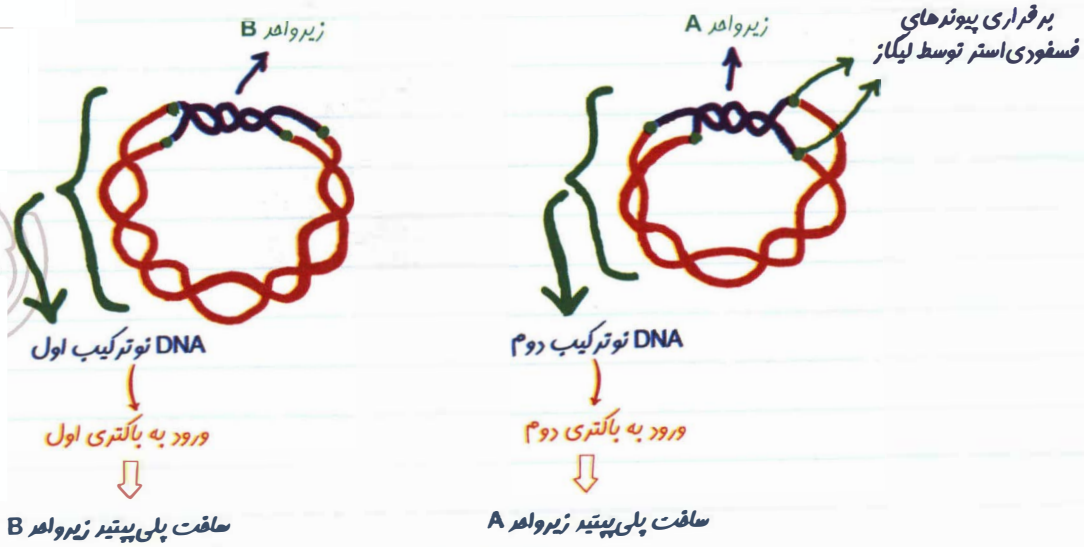
اینطوری بهتر درک می‌کنی!
جمع‌بندی تولید انسولین به روش مهندسی ژنتیک:
(مربوط به شکل ۱۳)

قطع ۸ پیوند فسفودی‌استر توسط آنزیم برش‌دهندهٔ مخصوص و ایجاد ۸ انتهای چسبنده

که چهار تای آن‌ها مهم‌اند:
- ۲ انتهای چسبنده متصل به دو طرف B
- ۲ انتهای چسبنده متصل به دو طرف A

با همان نوع آنزیم برش‌دهنده، دو پلازمید را نیز برش می‌زنیم؛
در هر پلازمید فقط یک جایگاه تشخیص وجود دارد و برش دارای دو انتهای چسبنده خواهد بود.





(رونویسی + ترجمه)
داخل یاختهٔ پروکاریوت

خارج از یاخته:
- برقراری پیوندها بین دو پلی‌پپتید A و B
- برای ساخت انسولین فعال (در محیط آزمایشگاهی)

درمورد دختربچهٔ چهارساله و روش ژن‌درمانی او باید بدانید که:

۱ـ ژن جهش‌یافته در بدن این فرد نمی‌توانست یک آنزیم مهم دستگاه ایمنی را بسازد.

۲ـ برای درمان آن ابتدا لنفوسیت‌ها را از خون بیمار جدا کردند و در خارج از بدن کشت دادند.

۳ـ سپس نسخه‌ای از ژن سالم و کارآمد را توسط ناقل به لنفوسیت‌ها منتقل کردند.

۴ـ لنفوسیت‌های تغییریافته را دوباره به بدن فرد بیمار منتقل کردند.

۵ـ لنفوسیت‌ها توانستند آنزیم مورد نیاز دستگاه ایمنی فرد بیمار را بسازند.

۶ـ ولی چون لنفوسیت‌ها بقای زیادی ندارند، لازم بود بیمار به طور متناوب لنفوسیت‌های مهندسی شده را دریافت کند.

۷ـ دقت کنید که با نخستین سلول‌هایی که ژن‌درمانی با آنها انجام شد، نمی‌توان ژنوم کامل انسان را بررسی کرد، چون سلول‌های دختران، کروموزوم Y ندارند.

نکات مهم ژن‌درمانی:

۱ـ ژن‌درمانی فقط برای افرادی که نقص ژنی مادرزادی دارند، کاربرد دارد.

۲ـ دقت کنید که ژن‌درمانی فقط یکی از روش‌های درمان برای بیماری‌های ژنتیکی است.

۳ـ ژن‌درمانی خودش شامل مجموعه‌ای از روش‌هاست.

۴ـ دقت کنید که ژن ناقص را از سلول‌های فرد بیمار خارج نمی‌کنیم؛ بلکه نسخهٔ سالم ژن را در برخی سلول‌های او وارد می‌کنیم.

۵ـ حتماً باید سلول‌های مورد نظر از بدن بیمار خارج شوند تا تحت مهندسی ژن قرار گیرند.

۶ـ برای وارد کردن ژن سالم به سلول‌های خارج شده از بدن فرد بیمار، حتماً نیاز به ناقل داریم.

۷ـ ناقل ژن‌درمانی معمولاً ویروسی است که از قبل غیرفعال شده است.

۸ـ به سلول نوترکیب که اکنون دارای نسخهٔ سالم یک ژن شده است، تراژن نمی‌گوییم؛ بلکه سلول دست‌ورزی‌شده نام دارد.

۹ـ بیان شدن ژن و تولید محصول آن فقط در بدن فرد مورد نظر ممکن است.

۱۰ـ در این روش همیشه مقداری از سلول‌های دست‌ورزی‌شدهٔ فرد را در آزمایشگاه نگه‌داری کرده و کشت می‌دهند، تا به تناوب به بدن فرد وارد کنند.

۱۱ـ ژن‌درمانی فقط در مورد سلول‌هایی که قدرت تقسیم بالایی دارند، نتیجه‌بخش است.

۱۲ـ دقت کنید که در مورد بیماری‌های اکتسابی مثل هپاتیت و مالاریا، ژن‌درمانی کارساز نیست!

۱۳ـ به بیان ساده می‌توان گفت ژن‌درمانی برای نقص ایمنی اکتسابی مثل ایدز کارساز نیست؛ ولی برای نقص ایمنی ارثی ممکن است کارساز باشد.

تبدیل مولکول یا مادهٔ غیرفعال به فعال:

۱- تبدیل پپسینوژن به پپسین در معده ← توسط اسید معده و در یک محیط اسیدی انجام می‌شود (فصل۲ دهم).

۲- پروتئازهای لوزالمعده در محیط قلیایی دوازدهه، فعال می‌شوند. برای ایجاد محیط قلیایی در دوازدهه کبد با تولید صفرا، رودهٔ باریک با تولید شیره و لوزالمعده با تولید شیرهٔ بیکربنات دار، موثر هستند (فصل۲ دهم).

۳- فعال شدن پروتئین مکمل ← این فرایند می‌تواند درون خون و یا خارج از آن صورت بگیرد. یک پروتئین مکمل غیرفعال می‌تواند به ۳ روش فعال شود: (۱) برخورد با میکروب. (۲) برخورد با یک پروتئین مکمل فعال دیگر. (۳) برخورد با پادتن (فصل۵ یازدهم).

۴- فعال شدن آنزیم های موثر در مرگ برنامه ریزی شده ← ورود آنزیم القاکنندهٔ مرگ برنامه ریزی شده به یاختهٔ سرطانی و آلوده به ویروس + اثر نقطهٔ وارسی G_1 به دلیل آسیب دیدن و عدم ترمیم دنای یاخته

۵- تبدیل پیش انسولین به انسولین با جدا شدن زنجیرهٔ C

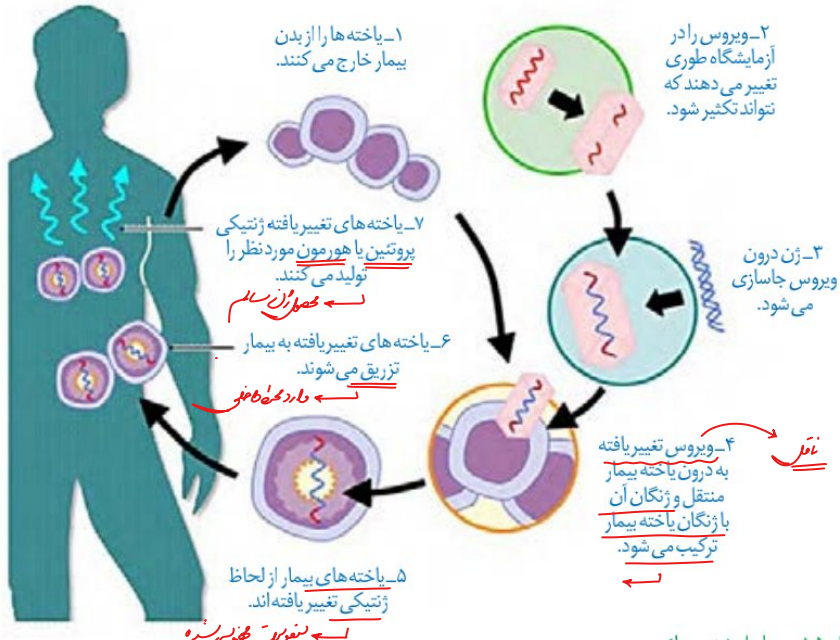
✓ همه ژن درمانی ها کاری به شخصه ناقص ژن ندارند
✓ " " " سلول تراریخت ندارند

۳ـ ژن درمانی: آیا می‌توان افرادی را که با بیماری ارثی متولد می‌شوند درمان کرد؟ ژن درمانی!

پاسخ به این سؤال مشکل است ولی یکی از روش‌های جدید درمان بیماری‌های ژنتیکی، ژن درمانی است که خود مجموعه‌ای از روش‌هاست. ژن درمانی یعنی قرار دادن نسخه سالم یک ژن در یاخته‌های فردی که دارای نسخه‌ای ناقص از همان ژن است. در این روش یاخته‌هایی را از بدن بیمار خارج و ژن سالم را با کمک ناقل وارد آنها می‌کنند. سپس یاخته تغییریافته را به بدن بیمار باز می‌گردانند.

اولین ژن درمانی موفقیت‌آمیز در سال ۱۹۹۰ برای یک دختر بچه ۴ ساله، دارای نوعی نقص ژنی، انجام شد. این ژن جهش یافته نمی‌توانست یک آنزیم مهم دستگاه ایمنی را بسازد. برای درمان آن ابتدا لنفوسیت‌ها را از خون بیمار جدا کردند و در خارج از بدن کشت دادند. سپس نسخه‌ای از ژن کارآمد را به لنفوسیت‌ها منتقل و آنها را وارد بدن بیمار کردند. اگرچه این یاخته‌ها توانستند آنزیم مورد نیاز بدن را بسازند ولی چون قدرت بقای زیادی ندارند، لازم بود بیمار به‌طور متناوب لنفوسیت‌های مهندسی شده را دریافت کند (شکل ۱۵).

برای درمان این افراد می‌توان از روش‌هایی مثل پیوند مغز استخوان و یا تزریق آنزیم هم استفاده کرد.



شکل ۱۵ـ مراحل ژن درمانی

۴ـ تشخیص بیماری: برای درمان موفقیت‌آمیز یک بیماری، تشخیص اولیه و شناخت دقیق آن بسیار مهم است. علاوه بر روش‌های تشخیصی مثل آزمایش خون و ادرار، روش‌های دیگری مثل فناوری‌های مبتنی بر دنا در تشخیص بیماری نقش مهمی دارند. تشخیص بیماری وقتی که علائم آن در بدن ظاهر شده باشد ساده است، اما وقتی که هنوز علائم ظاهر نشده‌اند و میزان عامل بیماری‌زا در بدن پایین است مشکل است. امروزه با کمک روش‌های زیست فناوری و شناسایی نوکلئیک اسید عامل بیماری‌زا می‌توان به‌وجود آن در بدن پی برد.

در ژن درمانی نسخهٔ معیوب را از بدن بیمار خارج نمی کنند!

از ژن‌درمانی فقط برای درمان بیماری‌های ژنتیکی نهفته می‌توان استفاده کرد. توجه دارید که اگر بیماری بارز باشد، قرار دادن نسخهٔ سالم ژن (یعنی ژن نهفته) تأثیری در فنوتیپ فرد ندارد و همچنان فرد بیمار است!

در ژن درمانی از ویروس به عنوان ناقل همسانه‌سازی استفاده می شود. در آزمایشگاه با خارج کردن قطعاتی از ژنوم ویروس (که یک دنای تک رشته‌ای است!)، آن را طوری تغییر می‌دهند که نتواند تکثیر شود.

گرچه نمی‌توان بیماری های ژنتیک را در حال حاضر درمان کرد (مگر در موارد معدود) اما گاهی می‌توان با تغییر عوامل محیطی، بروز اثر ژن‌ها را مهار کرد. مثال این موضوع، بیماری فنیل کتونوری (PKU) است(فصل۳ دوازدهم).

لنفوسیت‌ها یاخته‌هایی تک‌هسته‌ای هستند که بیشتر حجم یاخته را هسته اشغال می‌کند. لنفوسیت‌ها یک هستهٔ تکی گرد یا بیضی‌شکل با سیتوپلاسم بدون دانه دارند (فصل ۴ دهم). لنفوسیت‌ها یاخته‌های اصلی دستگاه ایمنی هستند. این یاخته‌ها از یاختهٔ بنیادی لنفوئیدی موجود در مغز قرمز استخوان منشاء می‌گیرند. لنفوسیت‌ها هم در دفاع غیراختصاصی (یاختهٔ کشندهٔ طبیعی) و هم در دفاع اختصاصی (لنفوسیت‌های B و T) نقش دارند (فصل۵ یازدهم).

هپاتیت B نوعی بیماری ویروسی است.

تولید واکسن به روش قدیمی در حوزهٔ زیست‌فناوری کلاسیک و تولید واکسن به روش مهندسی ژنتیک در حوزهٔ زیست فناوری نوین است.

در روش تولید واکسن به کمک مهندسی ژنتیک کاری به خودِ عامل بیماری‌زا نداریم!

همان‌طور که می‌دانید ایدز بیماری خطرناکی است و هنوز درمان قطعی برای آن وجود ندارد. فرد مبتلا به ایدز توانایی دفاع در مقابل عوامل بیماری‌زا را از دست می‌دهد. برای تشخیص ایدز در مراحل اولیه، دنای موجود در خون فرد مشکوک را استخراج می‌کنند. دنای استخراج شده شامل دنای یاخته‌های بدن خود فرد و احتمالاً دنای ساخته شده از رنای ویروس است. سپس با استفاده از روش‌های زیست فناوری دنای ویروس تشخیص داده می‌شود. تشخیص زودهنگام آلودگی با ویروس ایدز اهمیت زیادی دارد زیرا باعث می‌شود که بدون اتلاف وقت اقدامات درمانی و پیشگیری لازم برای جلوگیری از انتقال ویروس به سایر افراد صورت گیرد.

زیست فناوری در تشخیص ژن‌های جهش یافته در بیماران مستعد به سرطان، در مسائل پزشکی قانونی و تحقیقاتی همچون مطالعه در مورد دنای فسیل‌ها نیز کاربرد دارد.

اهمیت تولید جانوران تراژنی در زیست فناوری

دلایل متعددی برای طراحی و تولید این جانوران وجود دارد که می‌توان به چند مورد اشاره کرد:

۱ ـ مطالعه عملکرد ژن‌های خاص در بدن مثل ژن‌های عوامل رشد و نقش آنها در رشد بهتر دام‌ها

۲ ـ کاربرد آنها به‌عنوان مدلی برای مطالعه بیماری‌های انسانی از قبیل انواع سرطان، آلزایمر و بیماری ام.اس

۳ ـ تولید پروتئین‌های انسانی یا داروهای خاص در بدن آنها، به‌عنوان مثال دام‌های تراژنی می‌توانند، شیر غنی از نوعی پروتئین انسانی تولید کنند که برای انسان نسبت به شیر طبیعی دام‌ها مناسب‌تر است (شکل ۱۶).

شکل ۱۶ـ تولید پروتئین‌های انسانی با استفاده از دام‌های تراژنی

زیست‌فناوری و اقتصاد

گرچه زیست فناوری امروزه عمدتاً با مهندسی ژنتیک شناخته می‌شود، اما بهره‌برداری اقتصادی از این فناوری الزاماً وابسته به دستکاری جانداران نیست. انسان در طول تاریخ از باکتری‌ها و قارچ‌ها در تولید محصولاتی مانند ماست و پنیر استفاده کرده است. امروزه نیز صنایع لبنی همچنان با بهره‌مندی از آنزیم‌ها و ریزجانداران محصولات متنوعی روانه بازار می‌کنند و همچنان سهم قابل توجهی در اقتصاد کشورها دارند.

تولید انواعی از ترکیبات بر مبنای فرایندهای زیستی، استفاده از گیاهان و جلبک‌ها در تولید سوخت و ترکیبات دیگر، شناسایی ریزجانداران و گیاهانی که می‌توانند به‌عنوان منابع تجدیدپذیر در تولید ترکیبات گوناگون به‌کار روند، اساس شکل‌گیری صنایع متفاوتی در دنیای امروز شده‌اند.

فتوبیوراکتور[1] نمونه‌ای از فناوری زیستی با کاربرد صنعتی است (شکل ۱۷). فتوبیوراکتورها محیط‌های کشت وسیع جانداران فتوسنتزکننده‌ای مانند جلبک‌ها هستند. این جانداران با انجام فتوسنتز انواعی از مواد را می‌سازند که می‌توان از آنها در تولید سوخت زیستی، دارو، مکمل‌های غذایی و ترکیبات دیگر استفاده کرد.

شکل ۱۷ـ دو نوع فتوبیوراکتور که در آن جلبک تک یاخته‌ای کشت شده است.

زیست‌فناوری و اخلاق

مانند همهٔ دستاوردهای بشر، استفاده از این دستاورد علمی نیز باید با ملاحظاتی همراه باشد. این ملاحظات جنبه‌های مختلف اخلاقی، اجتماعی و ایمنی زیستی را دربر می‌گیرند. ایمنی زیستی شامل مجموعه‌ای از تدابیر، مقررات و روش‌هایی برای تضمین بهره‌برداری از این فناوری است. قانون ایمنی زیستی به‌منظور استفاده مناسب از مزایای زیست فناوری و پیشگیری از خطرات احتمالی آن، در همه کشورها از جمله ایران تدوین و به تصویب رسیده است.

همواره سؤال‌های متعددی در مورد نتایج انواع کاربردهای زیست فناوری مطرح بوده و هست. برای پاسخ به این سؤالات، پژوهش‌های زیادی در حال انجام است. نتایج به‌دست آمده از چنین پژوهش‌هایی از طرف مجموعه‌ای از دانشمندان با تخصص‌های مختلف داوری و صدور مجوز نهایی توسط دستگاه‌های نظارتی انجام می‌شود. تاکنون از نتایج تحقیقات انجام شده هیچ‌گونه گزارشی مبتنی بر شواهد و داده‌های علمی در مورد آثار جانبی کاربرد این فناوری، محصولات به‌دست آمده و خطرناک بودن آنها ارائه نشده است. لذا با توجه به حساسیت موضوع، این تحقیقات باید ادامه یابند و نتایج با دقت فراوان مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرند.

---

۱. Photobioreactor

مورد مقایسه	سیستم استخری	سیستم لوله‌ای
نوعی سامانهٔ ..... می‌باشد.	باز	بسته
می‌تواند دارای ساختار زاویه‌دار باشد؟	-	بله
در افزایش میزان تولیدکنندگی و خدمات بوم سازگان مؤثر است؟	بله	بله
مساحت	بیشتر	کمتر
ممکن است دارای میزان خلوص و شدت متفاوتی از یک نوع رنگ باشد؟	-	بله، طبق شکل ممکن است دارای محتویات سبز تیره یا روشن باشد!
احتمال آلودگی به میکروارگانیسم‌ها	بیشتر	کمتر
میزان محبوس شدن اکسیژن در آن	کمتر	بیشتر
میزان هدررفت انرژی حاصل از فتوسنتز در آن	بیشتر	کمتر
میزان راندمان انرژی حاصل از فتوسنتز	کمتر	بیشتر

قیدها

۱- امروزه وارد کردن ژن‌های تولید کنندهٔ **بسیاری** از پلاستیک‌های قابل تجزیه **از باکتری به گیاه** امکان پذیر است.

۲- در زیست فناوری نوین دانشمندان توانستند با تغییر و اصلاح خصوصیات ریزاندامگان‌ها ترکیبات جدید را با مقادیر بیشتر و کارایی **بالاتر** تولید کنند.

۳- **یکی** از اهداف مهندسی ژنتیک تولید انبوه ژن و فراورده‌های آن است.

۴- دیسَک یک مولکول دنای دو رشته‌ای و حلقوی خارج فام‌تنی است که **معمولاً** درون باکتری‌ها و **بعضی** قارچ‌ها مثل مخمرها وجود دارد

۵- در مهندسی ژنتیک بهتر است از دیسَکی استفاده شود که **فقط** یک جایگاه تشخیص برای آنزیم برش دهنده داشته باشد.

۶- **بسیاری** از دیسَک‌ها دارای ژن‌های مقاومت به پادزیست‌ها هستند.

۷- در مرحلهٔ وارد کردن دنای نوترکیب به میزبان، **همهٔ** باکتری‌ها دنای نوترکیب را دریافت نمی‌کنند.

۸- **بسیاری** از مراحل تولید صنعتی در دماهای بالا انجام می‌شود.

۹- باکتری‌های گرمادوست در چشمه‌های آب گرم دارای آمیلازهایی هستند که پایداری **بیشتری** در مقابل گرما دارند.

۱۰- وقتی اینترفرون نوع۱ با روش مهندسی ژنتیک ساخته می‌شود، فعالیتی **بسیار کمتر** از اینترفرون طبیعی دارد.

۱۱- جانشینی یک آمینواسید پلاسمین با آمینواسید دیگری در توالی، باعث می‌شود که مدت زمان فعالیت پلاسمایی و اثرات درمانی آن **بیشتر** شود.

۱۲- یاخته‌های تمایز یافته‌ای مانند یاخته‌های ماهیچه‌ای در محیط کشت به مقدار **کم** تکثیر می‌شوند و یا اصلاً تکثیر نمی‌شوند.

۱۳- یاخته‌های بنیادی جنینی بعد از جداسازی کشت داده و برای تشکیل **بسیاری** از انواع یاخته‌ها تحریک می‌شوند.

۱۴- یکی از کاربردهای زیست فناوری، تولید گیاهان مقاوم در برابر **بعضی** آفت‌ها هستند.

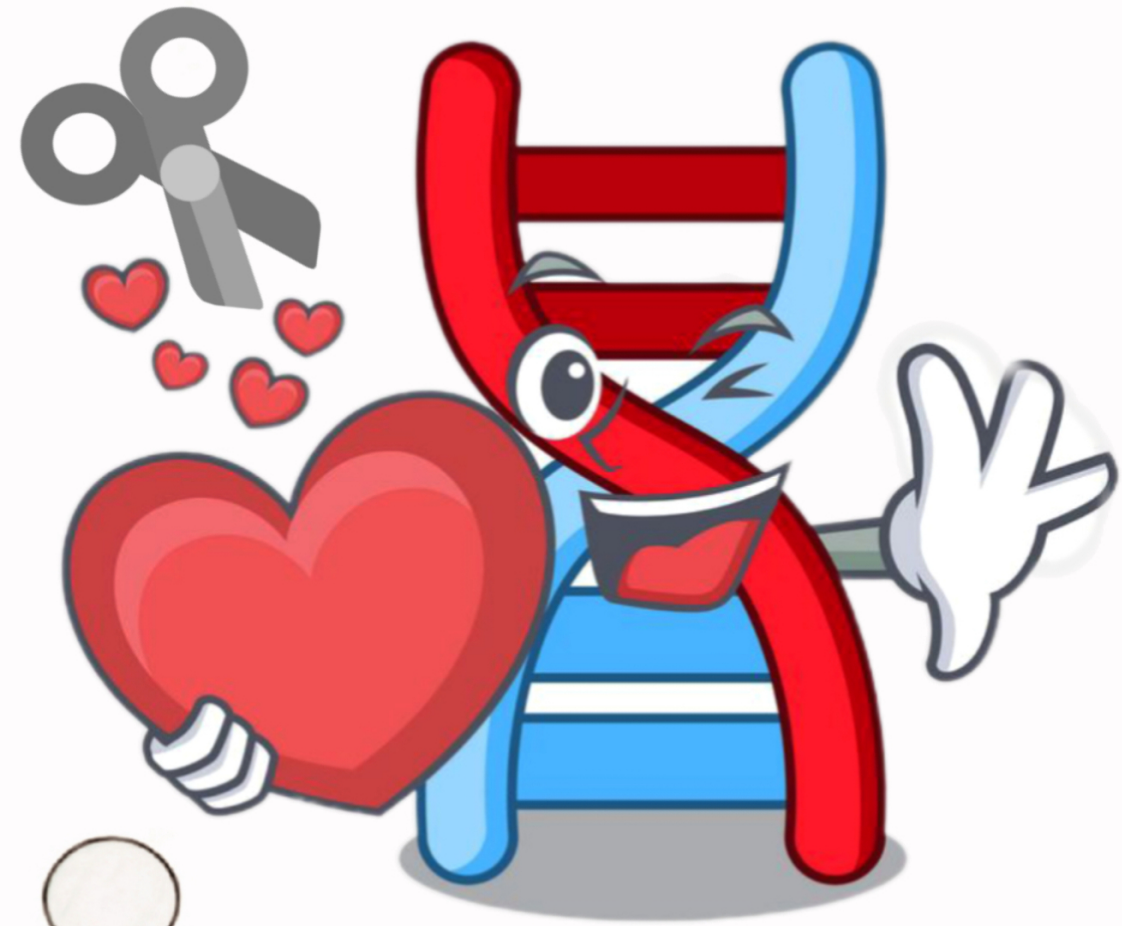
۱۵- **برخی** از باکتری‌های خاکزی، پروتئین‌هایی تولید می‌کنند که حشرات مضر برای گیاهان زراعی را می‌کشند.

۱۶- امروزه با کمک فناوری زیستی و تولید پنبه‌های مقاوم، نیاز به سم پاشی مزارع پنبه تا حدود زیادی **کاهش** پیدا کرده است.

۱۷- **اولین** ژن درمانی موفقیت آمیز در سال ۱۹۹۰ برای یک دختر بچه ۴ ساله، دارای نوعی نقص ژنی، انجام شد.

زیست ۳

«فناوری های نوین زیستی»

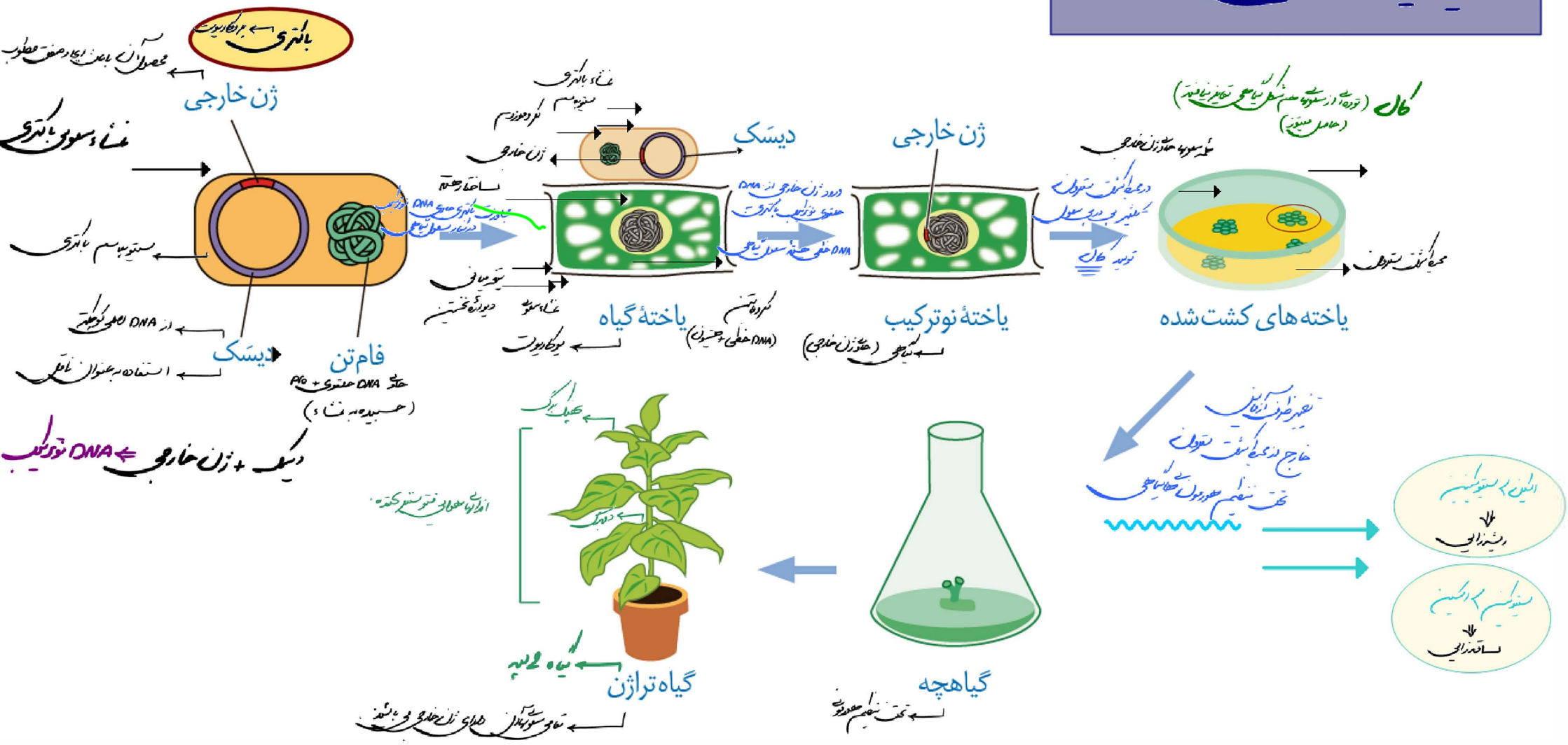


فصل ۷

دکتر زهرا هماپونی

BIO GALLERY

تولید گیاه تراژنی



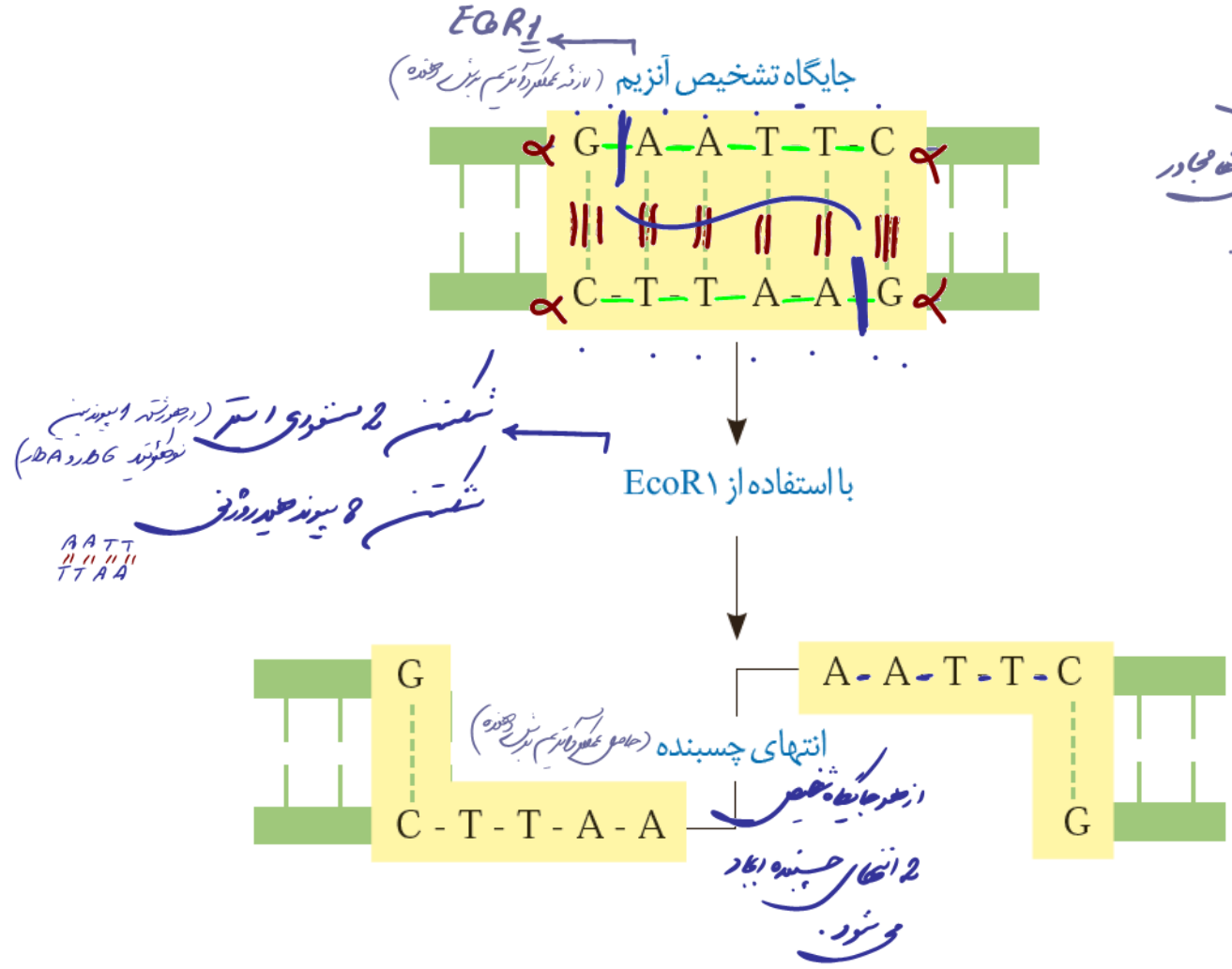
۱- پس از وارد شدن دیسک حاوی ژن مورد نظر به یاخته گیاهی، ژن خارجی به ژنوم هسته‌ای این یاخته می‌پیوندد.

۲- در روش نشان داده شده برای انتقال ژن خارجی به گیاه، نیازی به حذف کامل دیوارهٔ یاخته‌ای گیاه نیست.

برش مولکول DNA توسط EcoR1

جایگاه تشخیص آنزیم EcoR1 :

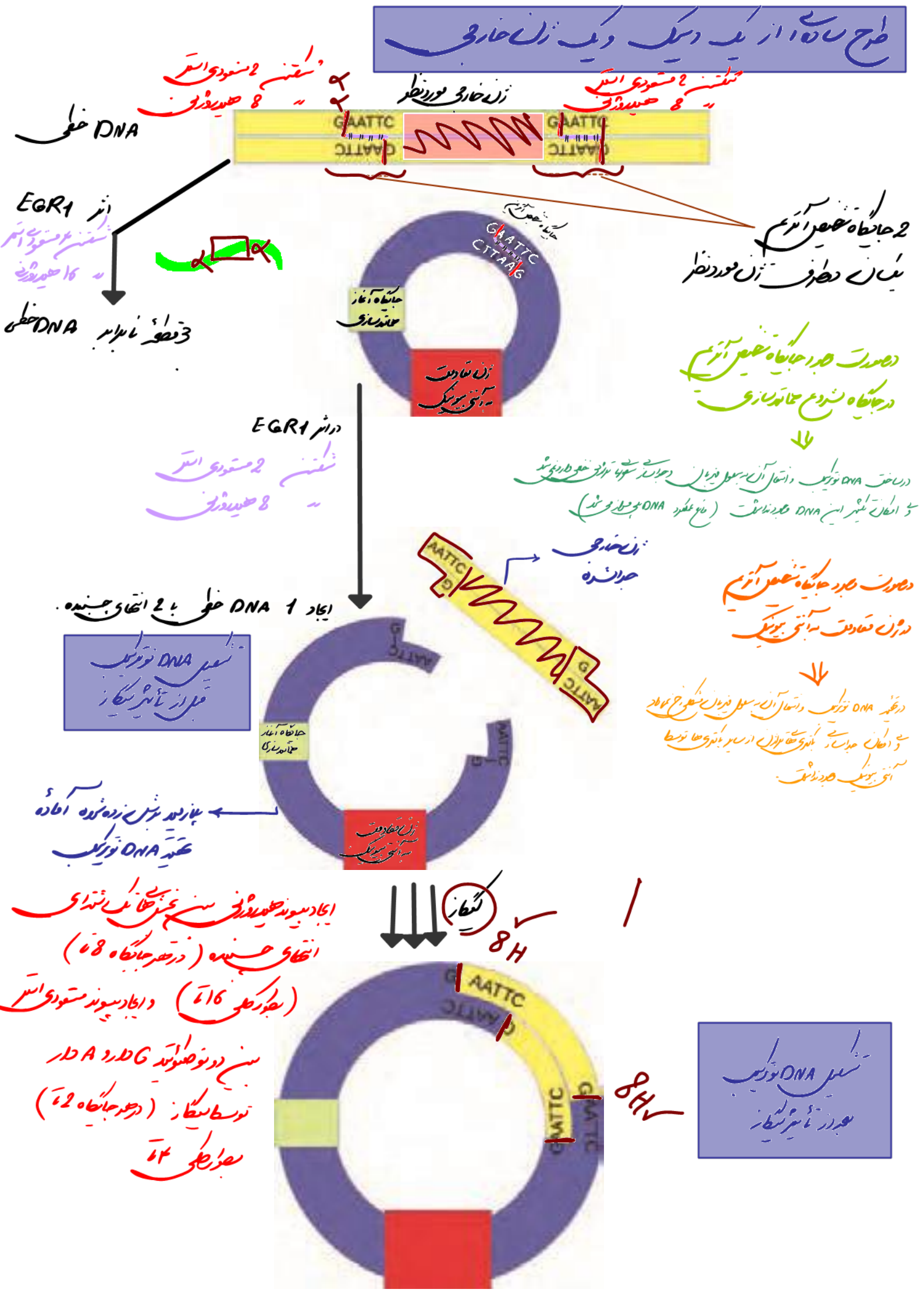
- ۶ جفت نوکلئوتید - ۱۲ تا نوکلئوتید
- ۱۰ پیوند هیدروژنی است
- ۱۴ پیوند هیدروژنی
- ۴ هیدروژنی است با توالی‌های مجاور
- DNA - ۲ رشته برابر



هر انتهای چسبنده :

- DNA
- ۲ رشته نابرابر ← در بخش تک رشته‌ای ۴ نوکلئوتید، ۳ مستقری است وجود دارد. (A.A.T.T)
- ۳ جفت نوکلئوتید (۶ تا)
- ۱ جفت نوکلئوتید مکمل (C / G)
- دارای ۴ پیوند مستقری است در رشته بلندتر (رشته‌ای که فاقد مستقری است)
- دارای ۳ پیوند هیدروژنی بین دو رشته
- " ۲ پیوند مستقری است با توالی‌های مجاور

طرح ساده از یک دستگاه و یک ژن خارجی



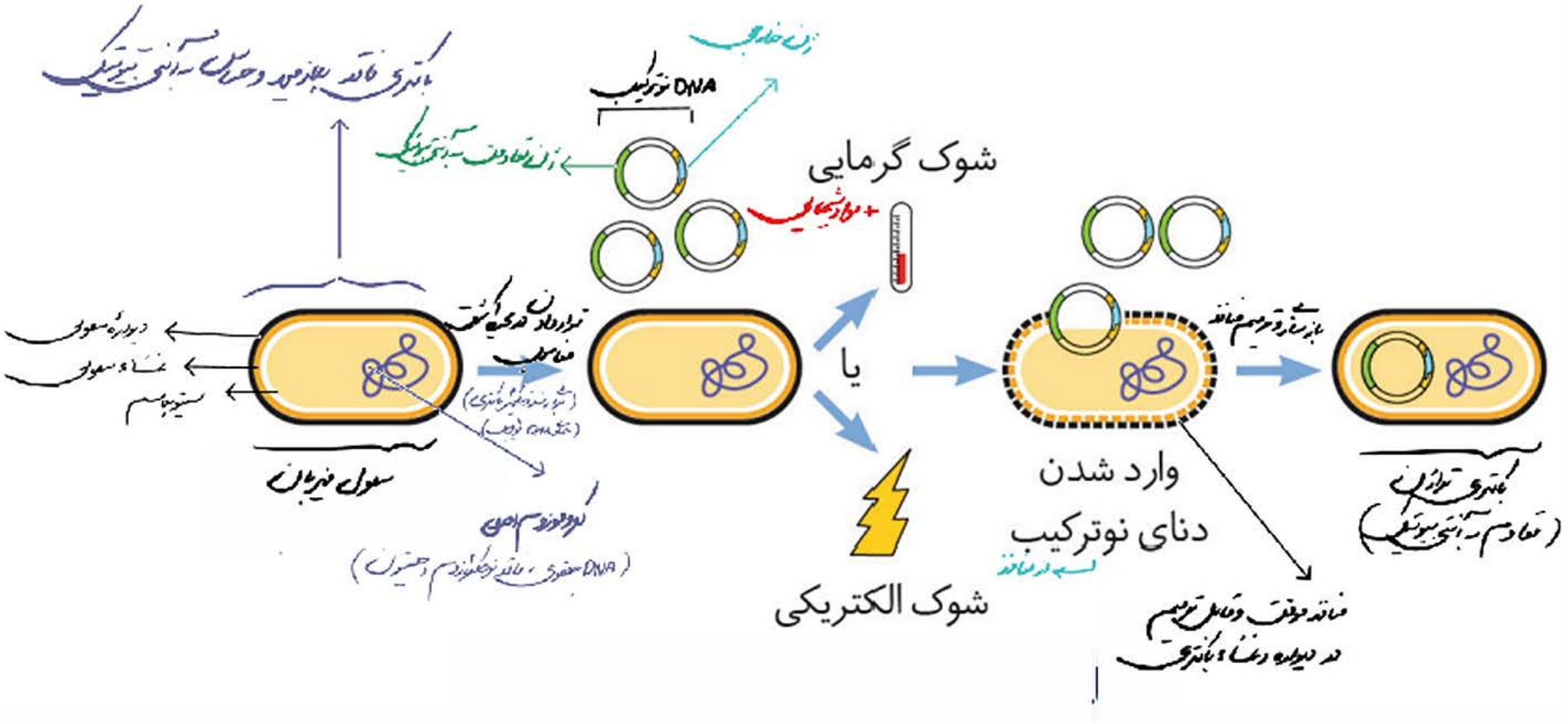
۱- توالی نوکلئوتیدی ژن مقاومت به پادزیست نسبت به جایگاه آغاز همانندسازی بیشتر است.

۲- در همانندسازی دوجهتی از دیسک نوترکیب، فقط یکی از هلیکازهای متصل به جایگاه آغاز همانندسازی دو رشتهٔ دنا در ژن مقاومت به پادزیست را از یکدیگر جدا می‌کند.

۳- آنزیم لیگاز برای اتصال ژن خارجی به دیسک، چهار پیوند فسفودی‌استر ایجاد می‌کند.

۴- در نیمی از پیوندهای فسفودی‌استر ایجاد شده توسط لیگاز نوکلئوتید آدنین‌دار مربوط به دیسک و نوکلئوتید گوانین‌دار مربوط به ژن مورد نظر است و در نیمی دیگر از پیوندها، این قضیه برعکس است.

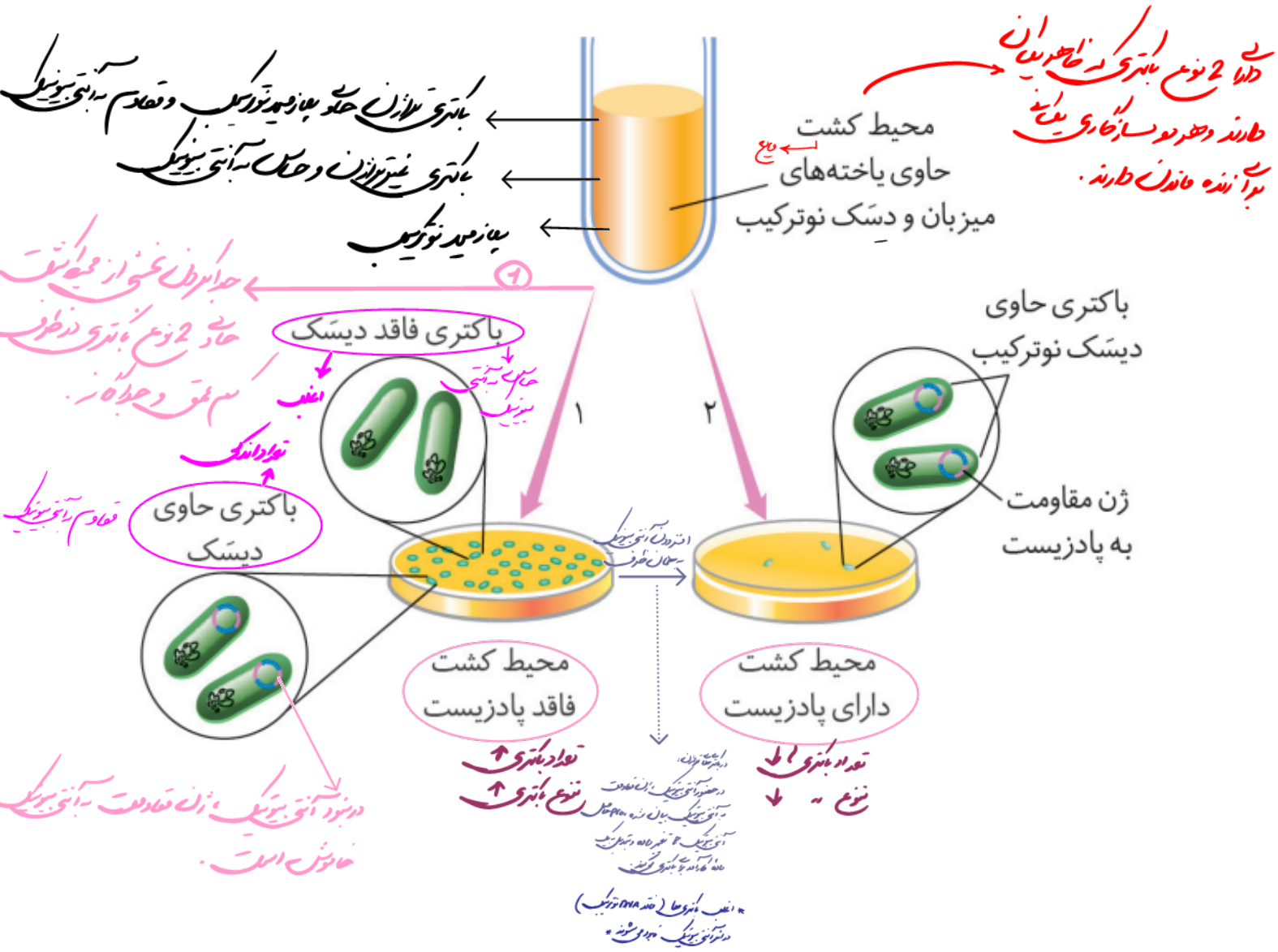
۵- دیسک نوترکیب نسبت به دیسک عادی، تعداد نوکلئوتید بیشتری دارد.



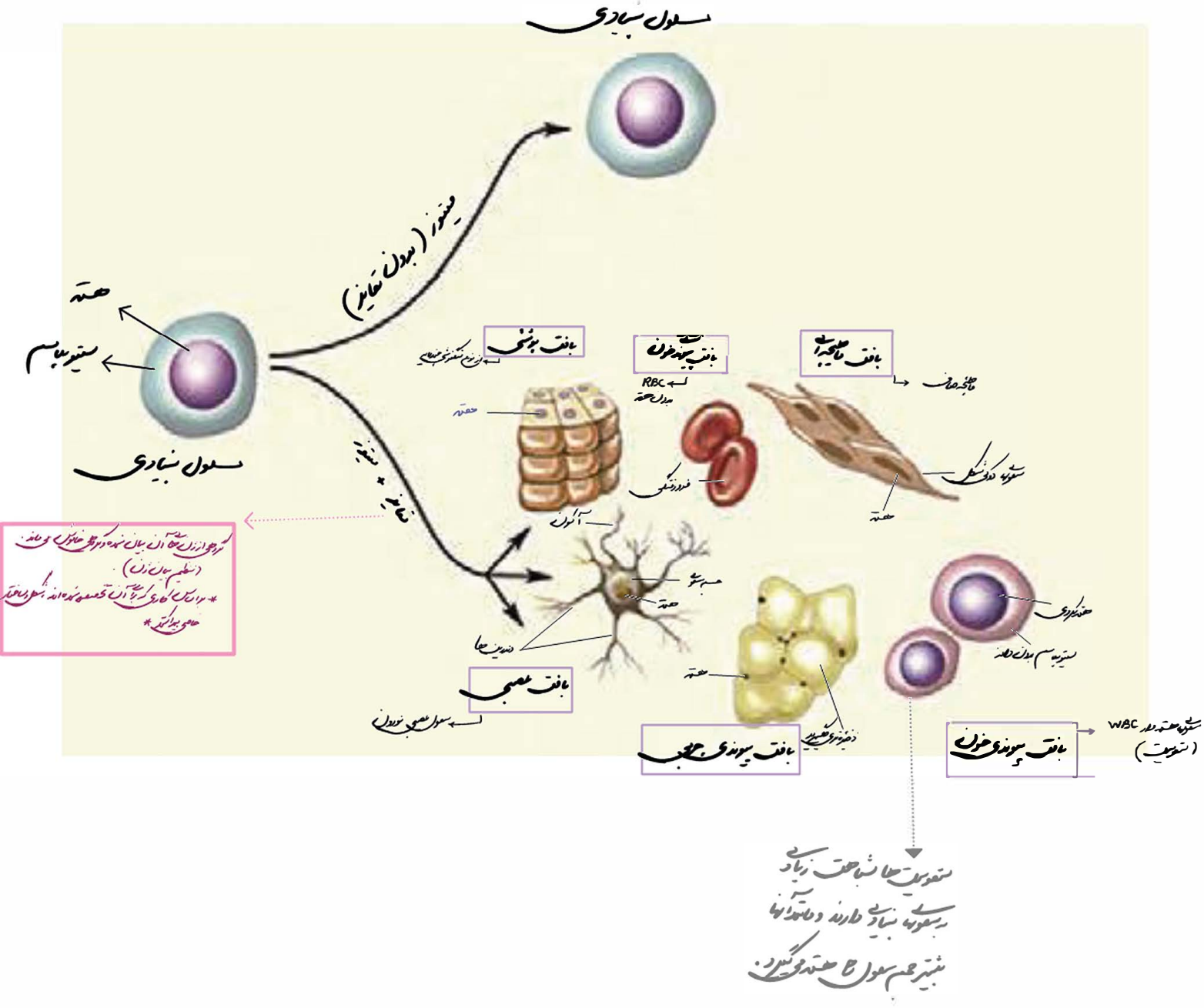
۱- باکتری مورد استفاده دارای دیواره است.

۲- در اثر ایجاد شوک، منافذی در سراسر غشا و دیوارهٔ باکتری ایجاد می‌شود.

۳- منافذ ایجاد شده در غشا و دیوارهٔ باکتری بعد از انتقال دنای نوترکیب، ترمیم می‌شوند و دوباره غشا و دیواره به صورت یکپارچه در می‌آیند.

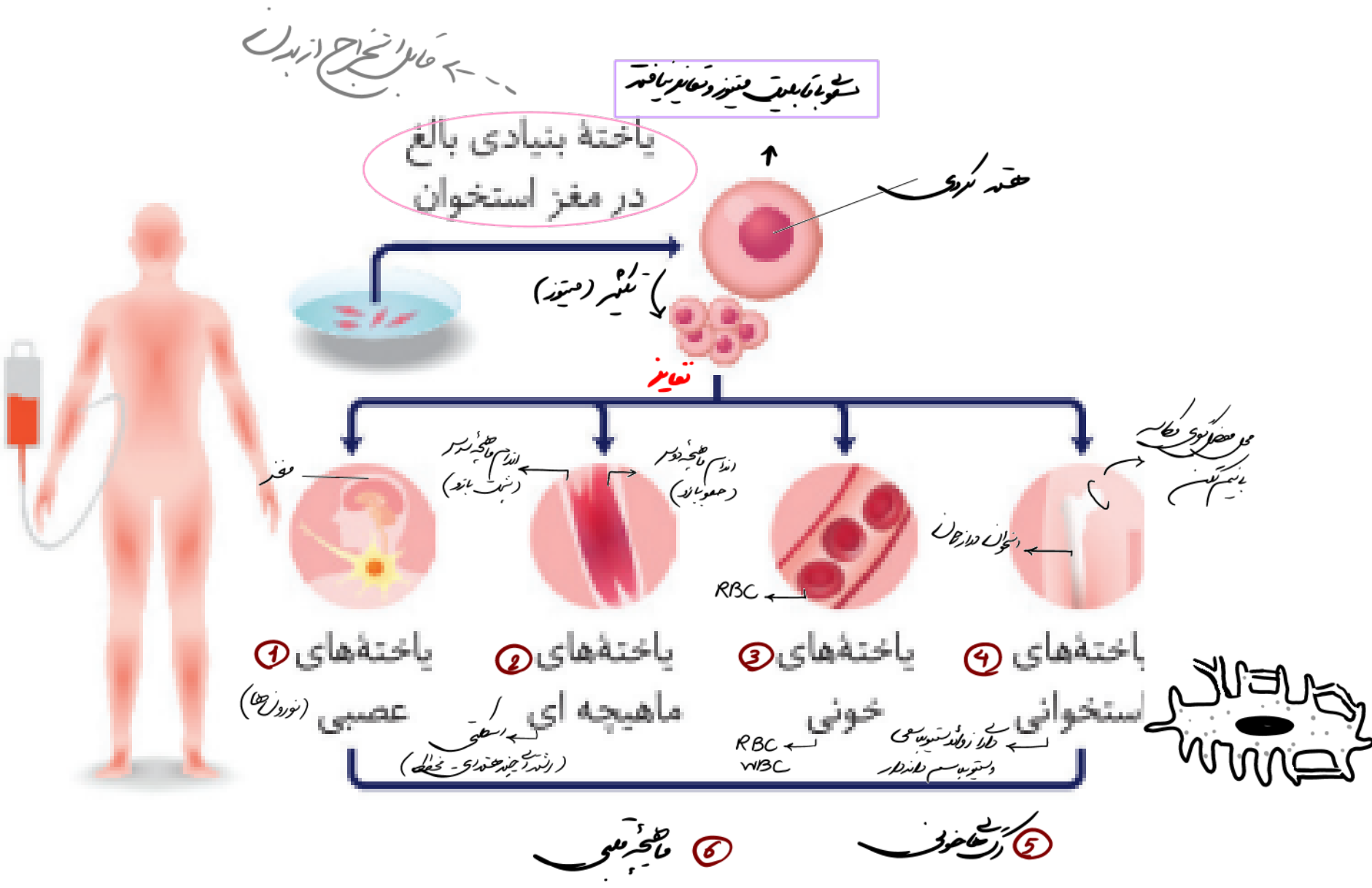

محیط کشت
حاوی یاخته‌های
میزبان و دسَک نوترکیب
باکتری فاقد دیسَک
باکتری حاوی
دیسَک نوترکیب
ژن مقاومت
به پادزیست
۱
۲
محیط کشت
فاقد پادزیست
محیط کشت
دارای پادزیست

شکل ۷- مهندسی بافت غضروف گوش انسان: عکس گوش طبیعی(چپ) تصویر رقمی(دیجیتالی)(وسط) و غضروف گوش ساخته شده با روش مهندسی بافت بعد از دو هفته(راست)

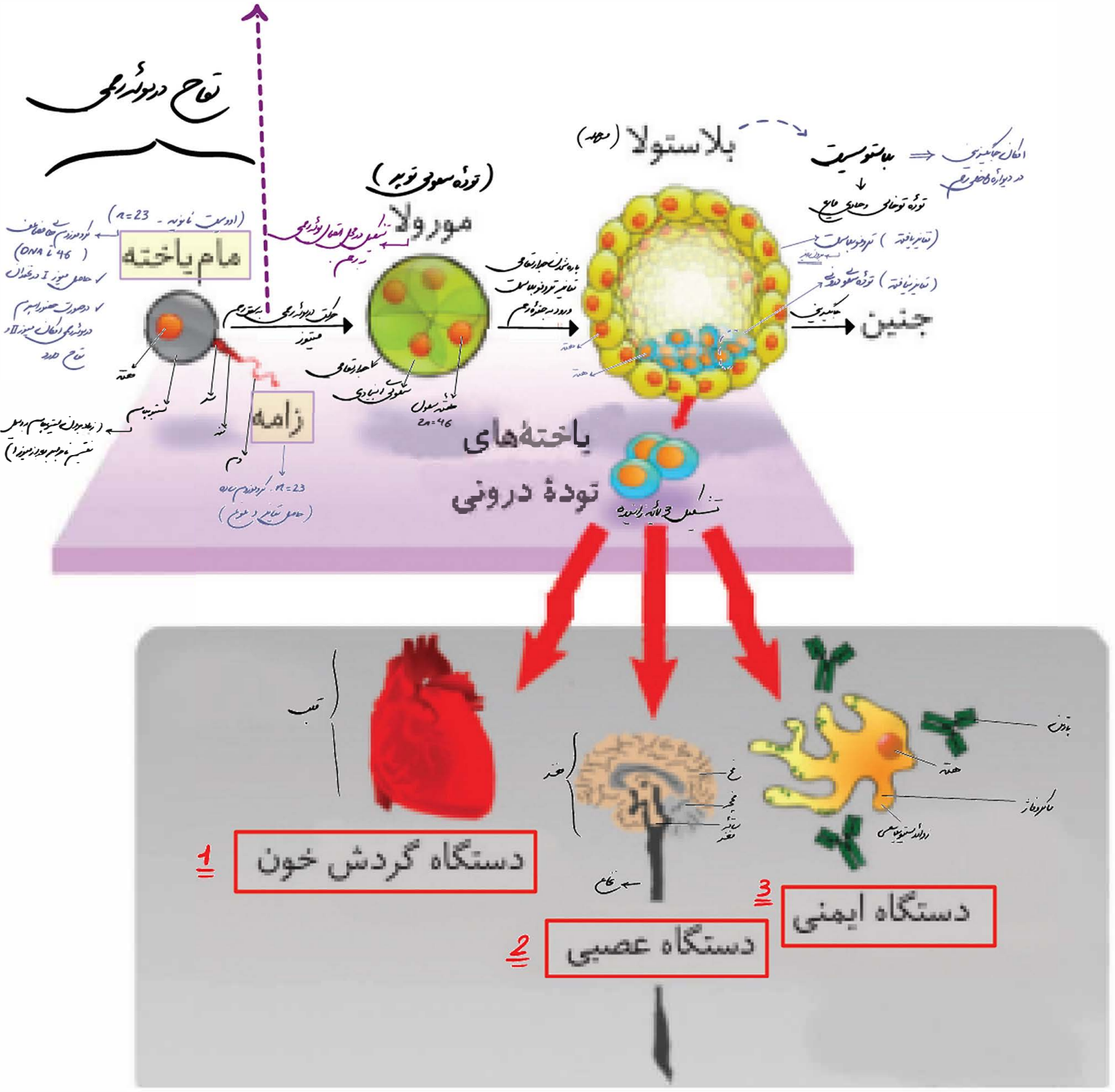


یاخته‌های بنیادی، یک هستهٔ درشت مرکزی دارند ولی می‌توانند یاخته‌ای ایجاد کنند که فاقد هسته باشد (مثل گویچهٔ قرمز بالغ) و یا هستهٔ غیرمرکزی داشته باشد (مثل یاخته‌های چربی).

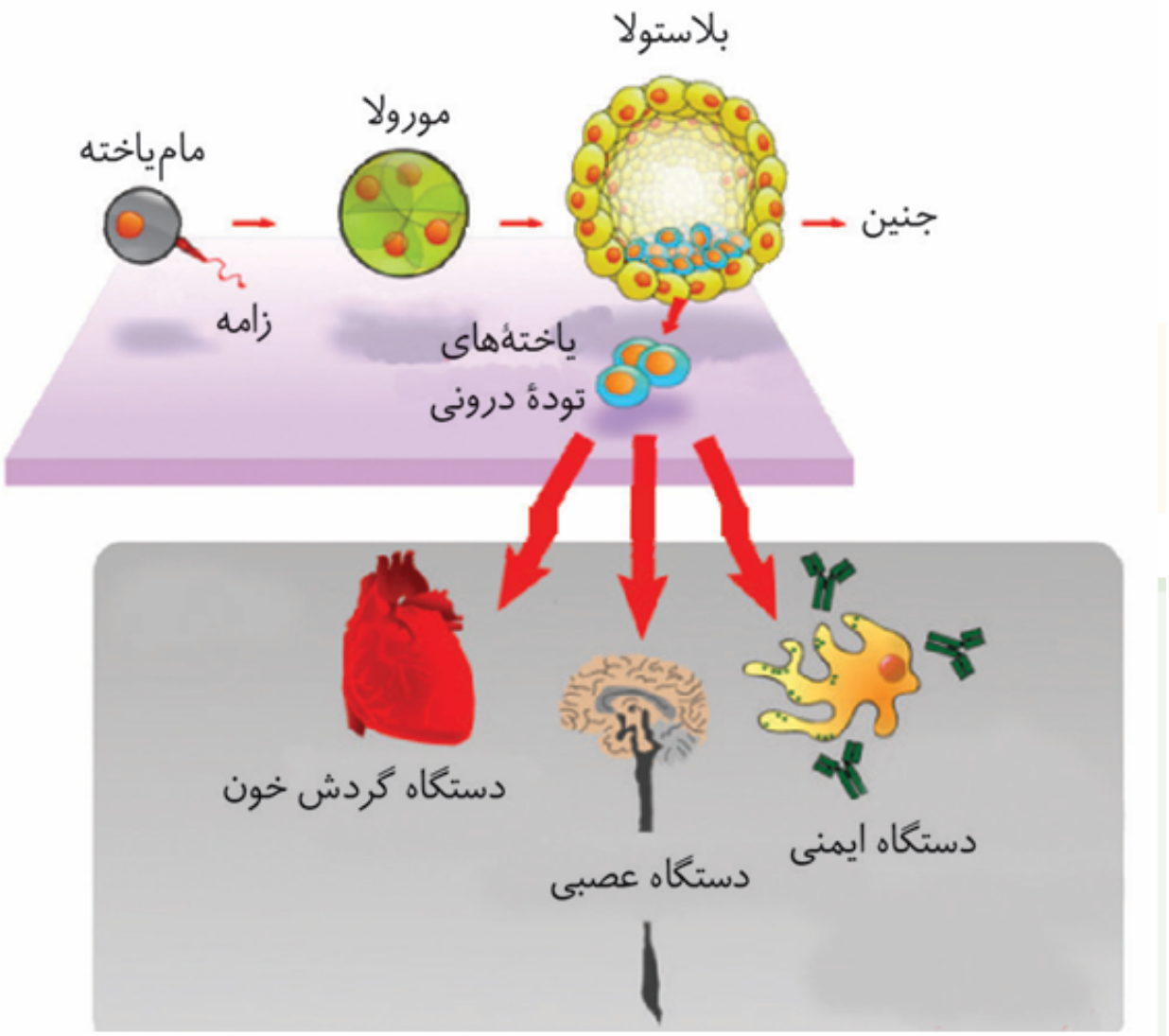
سلول‌های بنیادی مغز استخوان



Stop 36h



شکل ۱۰- الف) یاخته‌های بنیادی مورولا به همه انواع یاخته‌های جنینی و خارج جنینی(جفت و پرده‌ها) متمایز می‌شوند. ب) یاخته‌های بنیادی توده یاخته‌ای درونی به انواع یاخته‌های بدن جنین متمایز می‌شوند.



یاخته‌های بنیادی مورولا در لولهٔ فالوپ و یاخته‌های بنیادی تودهٔ درونی بلاستولا در رحم مشاهده می‌شوند.

۱- پادتن بیشتر از یک زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی دارد؛ در نتیجه دارای ساختار چهارم پروتئین‌ها است.

۲- تودهٔ یاخته‌ای بلاستولا دو بخش دارد؛ یکی یاخته‌های تودهٔ درونی که همان یاخته‌های بنیادی جنینی هستند و دیگری که به رنگ زرد نشان داده شده است، تروفوبلاست نام دارد.

۳- یاخته‌های تودهٔ درونی نسبت به یاخته‌های مورولا تمایزیافته‌تر هستند.

۴- تودهٔ بلاستولا نسبت به مورولا بزرگ‌تر است.

۵- تکثیر و تمایز یاخته‌های تودهٔ درونی به ایجاد دستگاه ایمنی، دستگاه عصبی و دستگاه گردش خون می‌شود

ویروس کرونا - با میکروسکوپ الکترونی (60 000 برابر)

نشل تروی

برجستگی‌های
سطحی
(Ag)

گیاه پنبه سالم

- ✓ 5 برابر بیشتر بودن تعداد گیاه پنبه کاملا مشخص است
- ✓ گیاه دو پنبه ای است .

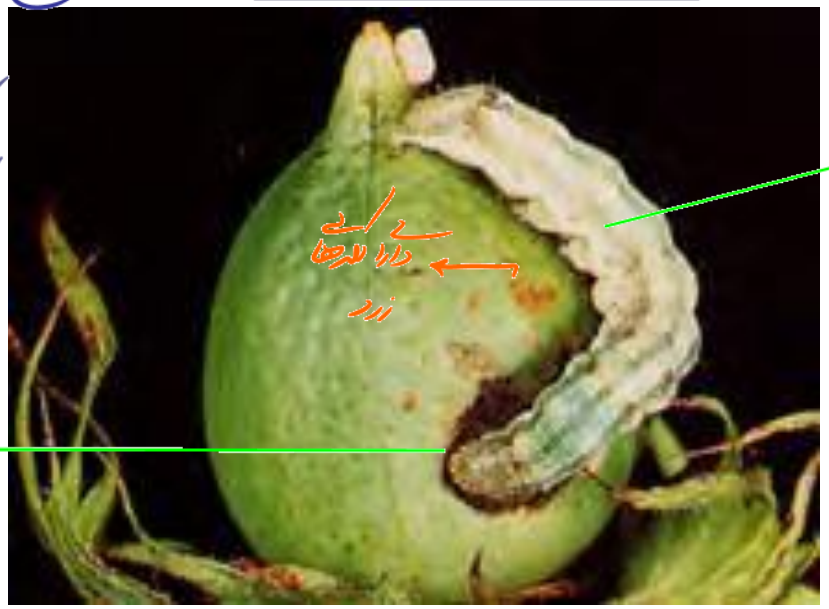
این ساختار گل نیست بلکه
میوه رسیده و باز شده پنبه است .
(میوه حقیقی)

گیاه آلوده

کپک میوه خشک و نابود شده در اثر
نفوذ لارو حشره .

فاقد توانایی فتوسنتز - خطوط سطح خارجی آن تیره تر شده
سوراخ هایی ایجاد شده در سطح آن جهت نفوذ لارو حالت متورم پیدا کرده .

آسیب وارد شده به درون غوزه پنبه



- ✓ غوزه نارس امکان فتوسنتز دارد
- ✓ خطوط سطح آن برجستگی دارد .

- ✓ لارو آفت سن غوزه نارس استقرار دارد
- ✓ کمی شکل است ولی کرم نیست
(جزء حشرات است)

لارو آفت (کرم شکل) گیاهخوار است
با خوردن بخش غوزه نارس سوراخی جهت
ورود آن ایجاد می کند .

ایجاد انسولین فعال از پیش انسولین با جدا سازی زنجیرهٔ C

✓ پیش هورمون نسبت به هورمون فعال پیوند بیشتری و آمینواسید بیشتری دارد.

✓ هورمون فعال حاصل شکسته شدن دو پیوند پپتیدی می باشد. (در استوبیاسم)

(هیدرولیز - مصرف آب)

✓ پیش هورمون حاصل ترجمه و پیرایش آن می باشد. (توسط ریبوزوم ها و فعل سنتز ساخته شده و جهت ترشح، نیاز به بسته بندی دارد.)

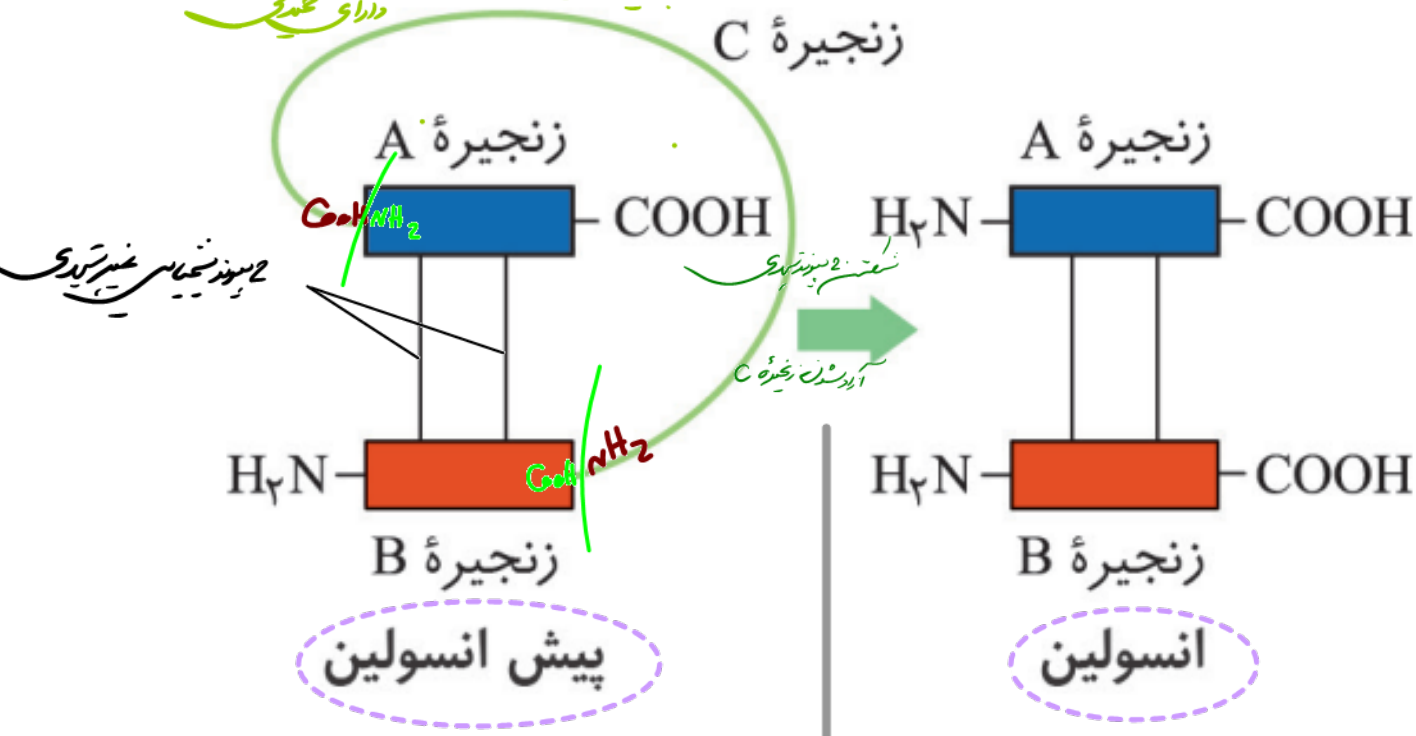
✓ پیوندهای پپتیدی در زنجیرهٔ A، B و C حین ترجمه توسط ریبوزوم ایجاد شده ولی پیوندهای شیمیایی بین B و A جهت ایجاد ساختار نهایی سوم پیش هورمون ایجاد می‌شود.

* هورمون فعال دارای 4 سر آزاد می باشد و هر زنجیره حداقل
دارای NH_2 و $COOH$ آزاد می باشد
(آمین و کربوکسیل زنجیره ها در یک سمت است)

* پیش هورمون ← دارای 2 سر آزاد : کربوکسیل آزاد A - آمین آزاد B

(از A ~ COOH و از B ~ NH_2 متصل) ← پیچیده ترین زنجیره - فاقد سر آزاد می باشد

دارای حلقه ای



- در زمان رونویسی از ژن سازندهٔ پیش انسولین، بخش‌هایی از ژن که منجر به تولید زنجیرهٔ B می‌شوند در مجاورت راه‌انداز و بخش‌هایی از ژن که منجر به تولید زنجیرهٔ A می‌شوند، در مجاورت جایگاه پایان رونویسی قرار دارند.
- در زمان تبدیل پیش انسولین به انسولین، دو پیوند پپتیدی توسط پروتئاز شکسته می‌شود؛ یکی پیوند پپتیدی میان انتهای آمین زنجیرهٔ A و انتهای کربوکسیل زنجیرهٔ C و پیوند دیگر بین انتهای کربوکسیل زنجیرهٔ B و انتهای آمین زنجیرهٔ C.
- زنجیره‌های پلی‌پپتیدی انسولین فعال همانند زنجیره‌های هموگلوبین به صورت نامتقارن قرار می‌گیرند.
- اولین متیونین مولکول انسولین در انتهای آمین زنجیرهٔ B قرار دارد.
- مولکول پیش‌انسولین پس از تولید شدن وارد شبکهٔ آندوپلاسمی می‌شود.

* زنجیرهٔ A در پیش هورمون انسولین چون دارای کربوکسیل آزاد است ⇐ آخرین بخش تولید شده است و دارای زنجیر آن در نزدیک‌ترین بخش به راه انداز است

* زنجیرهٔ B ″ ″ چون دارای آمین است ⇐ اولین بخش تولید شده است و ″ ″ نزدیک‌ترین بخش به راه انداز است

دارای سر آن سر دارای NH_2 آزاد است متیونین می باشد

۱- پیش‌انسولین از سه زنجیره تشکیل شده است. در زمان ترجمه رنای پیک مربوط به این پروتئین در ابتدا زنجیرهٔ B، سپس زنجیرهٔ C و سپس زنجیرهٔ A تولید می‌شود.

۲- پیش‌انسولین یک انتهای آمین و یک انتهای کربوکسیل دارد ولی انسولین، دو انتهای آمین و دو انتهای کربوکسیل دارد.

۳- در پیش‌انسولین زنجیرهٔ B به انتهای آمین نزدیک‌تر است و زنجیرهٔ A به انتهای کربوکسیل.

۴- هم در پیش‌انسولین و هم در انسولین، زنجیره‌های A و B توسط دو پیوند اشتراکی به یکدیگر اتصال دارند.

۵- زنجیره‌های A و B اندازهٔ یکسانی دارند.

۶- در پیش‌انسولین انتهای آمین زنجیره C به انتهای کربوکسیل زنجیرهٔ B اتصال دارد و انتهای آمین زنجیرهٔ A به انتهای کربوکسیل زنجیرهٔ C.

۷- هم در پیش‌انسولین و هم در انسولین، انتهای آمین و کربوکسیل زنجیره‌های A و B با یکدیگر پیوندی ندارد.

۸- در پیش‌انسولین هر یک از زنجیره‌های A و B یک انتهای آزاد دارند ولی در انسولین هر یک از آنها دو انتهای آزاد دارند.

مراحل ساخت انسولین با مهندسی ژنتیک

طی ۴ مرحله

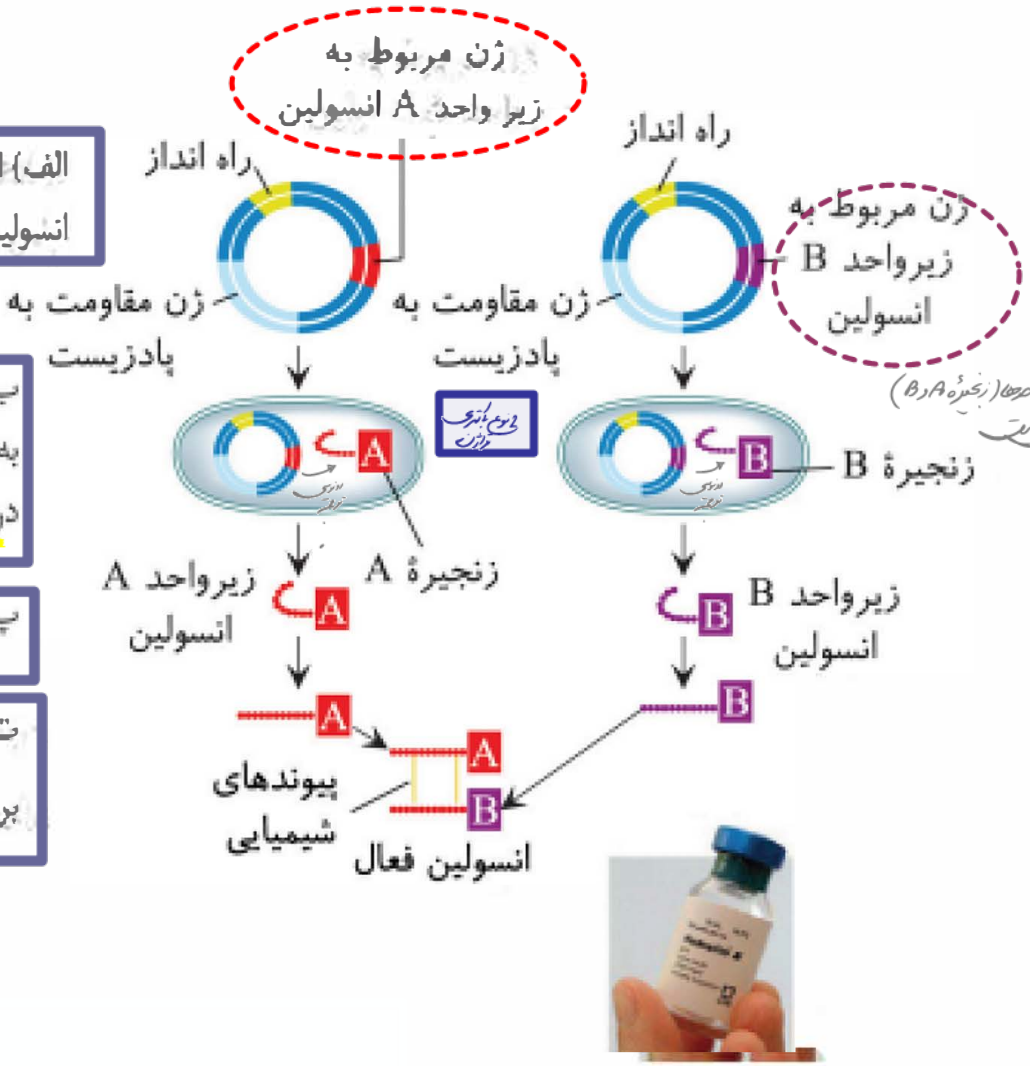
✓ در این فرآیند از پلازمید حلقوی ژن مقاومت به آنتی بیوتیک به‌عنوان ناقل استفاده می‌شود.

الف) انتقال ژن زنجیره‌های A و B انسولین به طور جداگانه به دیسک

ب) انتقال دیسک‌های نوترکیب به باکتری و انتخاب یاخته‌های دریافت‌کننده به کمک پادزیست

پ) خالص کردن زنجیره‌ها

ت) ترکیب زنجیره‌های A و B برای تولید انسولین فعال



✓ در این روش تولید پیش هورمون، تبدیل پیش هورمون به هورمون و تولید زنجیرهٔ C نداریم.

۱- در تولید انسولین در باکتری، ژن سازندهٔ زنجیرهٔ C به باکتری منتقل نمی‌شود.

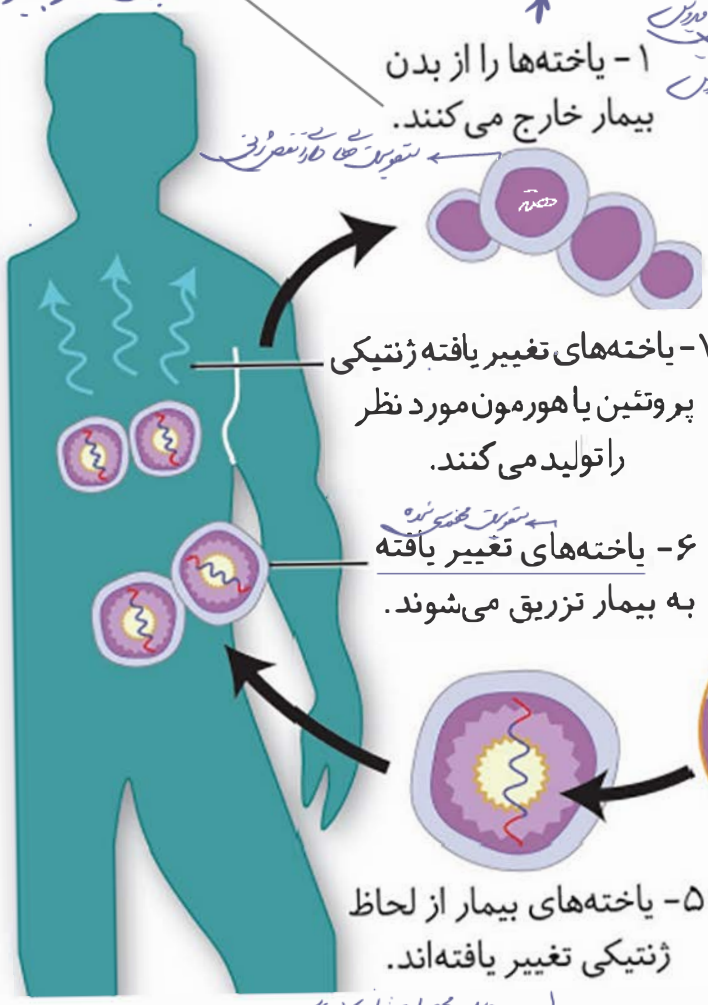
۲- طول و شکل زنجیره‌های A و B در حالت خالص و ناخالص متفاوت است.

۳- تولید انسولین با مهندسی ژنتیک در ۴ مرحله انجام می‌شود.

۴- اتصال دو زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی A و B خارج از باکتری‌ها و در محیط آزمایشگاه صورت می‌گیرد.

۵- ژن مربوط به زنجیره‌های A و B به دیسک‌های جداگانه منتقل می‌شود. در هر دیسک بین ژن‌های مورد نظر و توالی راه‌انداز فاصله وجود دارد.

مراحل ژن درمانی



۱- یاخته‌ها را از بدن بیمار خارج می‌کنند.

۲- ویروس را در آزمایشگاه طوری تغییر می‌دهند که نتواند تکثیر شود.

۳- ژن درون ویروس جاسازی می‌شود.

۴- ویروس تغییر یافته به درون یاخته بیمار منتقل و ژنگان آن با ژنگان یاخته بیمار ترکیب می‌شود.

۵- یاخته‌های بیمار از لحاظ ژنتیکی تغییر یافته‌اند.

۶- یاخته‌های تغییر یافته به بیمار تزریق می‌شوند.

۷- یاخته‌های تغییر یافته ژنتیکی پروتئین یا هورمون مورد نظر را تولید می‌کنند.

۱- یاخته‌های خارج شده از بدن بیمار، اندازهٔ برابری با یکدیگر ندارند ولی در همهٔ آنها بخش زیادی از سیتوپلاسم توسط هسته اشغال شده است.

۲- در مرحلهٔ سوم یکی از رشته‌های ژن مورد نظر درون ویروس جاسازی می‌شود.

۳- در مرحلهٔ دوم محتوای ژنتیکی ویروس کاهش و در مرحله سوم افزایش پیدا می‌کند.

۴- ویروسی که به عنوان ناقل همسانه‌سازی استفاده شده است، یک مولکول دنای تک‌رشته‌ای دارد!

۵- یاخته‌های جدا شده از بدن که ویروس تغییریافته به آنها وارد می‌شود، دوباره به بدن برگشت داده می‌شوند.

تولید پروتئین انسانی با استفاده از دام تراریخت

یک DNA حلقوی کوتاه دارای 2 انتهای چسبنده که توسط آنزیم برش داده شده از ژنوم انسان جدا شده.

ژن پروتئین انسانی

انتهای چسبنده

۱ هضم DNA نوترکیب در دمای سلول

جایگاه شروع همانندسازی

دیسک ناقل

۲ اتصال DNA نوترکیب به هسته سلول تخم

تخم لقاح یافته گوسفند که دیسک نوترکیب را دریافت کرده است.

۳ گوسفند تراژن حاصل از تخم لقاح یافته دارای ژن مورد نظر

۴ شیر حاوی پروتئین انسانی

۵ پروتئین انسانی گرفته شده از شیر (خالص سازی شده)

۲ نوع فتوبیوراکتور با جنبش سیالی

← فتوسنتز کننده

سیستم بولدای

قرارگیری تیغه‌ها و فتوسنتز جلبک‌ها در ساختمان‌های بولدای شیشه‌ای

- نوع رنگی بیشتری دارد.
- احتمال آلودگی کمتری دارد
- الکترون محبوس شده
- راندمان بالاتری دارد.

استخری

- مساحت اشغال شده بیشتر
- احتمال آلودگی بیشتر
- الکترون محبوس شده کمتر