بعد از این که دانشمندان دریافتند که کدون‌ها عمومی هستند (مثلاً کدون UUU در همه‌ی جانداران می‌تواند آمینواسید فنیل‌آلانین را رمز کند)، به این فکر افتادند که می‌توانند محصولات مورد نیازشان را از طریق جانداران دیگر تهیه کنند؛ به عنوان مثال، می‌توانند ژن انسولین را از سلول‌های هسته‌دار بدن انسان جدا کرده و به باکتری منتقل کنند و باکتری نیز می‌تواند آن ژن را به طور انبوه تولید کند (زیرا زمان تقسیم و تکثیر در باکتری‌ها کوتاه است و می‌توانند در مدت زمان کوتاهی، تعداد زیادی از آن را تولید کنند)؛ بنابراین، وقتی ژن را از یک جاندار، به جاندار دیگری منتقل می‌کنیم، چون کدون‌ها عمومی‌اند، پس محصول نیز یکسان خواهد بود.

آزمایش کوهن و بایر

هدف: تولید فراورده‌های ژنی یوکاریوتی، توسط سیستم‌های پروکاریوتی با سرعت بیش‌تر و به میزان انبوه.

✓ آنان ژن رمزکننده‌ی rRNA (نه خود rRNA !) را از DNAی نوعی قورباغه‌ی افریقایی استخراج و به DNAی باکتری اشریشیا کلای وارد کردند و مشاهده نمودند که باکتری هنگام رونویسی از ژن‌های خود، rRNA قورباغه را نیز می‌سازد.

شرح آزمایش

۱. ژن رمز کننده‌ی rRNA (RNA ریبوزومی) را به کمک آنزیم‌های محدودکننده، در DNA قورباغه برش دادند.

۲. پلازمید (یا کروموزوم کمکی) باکتری اِ.کلای را برش دادند.

۳. ژن رمزکننده‌ی rRNA را درون پلازمید جای دادند (تولید DNA نوترکیب).

۴. باکتری اِ.کلای در محیط کشت، DNA حلقوی نوترکیب را طی فرایند ترانسفورماسیون جذب کرد.

۵. DNA نوترکیب در درون باکتری، به طور پیاپی همانندسازی کرد.

۶. راه‌اندازِ ژن رمزکننده‌ی rRNA در باکتری، توسط RNA پلی‌مراز پروکاریوتی شناسایی و در نتیجه ژن، رونویسی و بیان شد.

نتیجه: تولید انبوه rRNA قورباغه در درون باکتری اِ.کلای (باکتری توسط RNA پلی‌مراز پروکاریوتیِ خود، rRNA قورباغه را ساخت).

✓ توجه فرمایید در آزمایش کوهن و بایر، **ژن** رمزکننده‌ی rRNA (بخشی از DNA قورباغه) به باکتری اِ.کلای منتقل شد، نه خود rRNA.

✓ در این آزمایش، ژن به پروتئین ترجمه نشد (چون فقط mRNA می‌تواند ترجمه شود)؛ به بیان دیگر در این آزمایش، فقط از روی ژن rRNA رونویسی انجام شد (rRNA، محصول مستقیم رونویسی است).

✓ ژن رمزکننده‌ی rRNA، به کمک آنزیم DNA پلی‌مراز و هلیکاز همانندسازی می‌شود و به کمک آنزیم RNA پلی‌مراز I و عوامل رونویسی در قورباغه رونویسی می‌گردد، ولی رونویسی از روی آن در **درون باکتری** اِ.کلای، توسط آنزیم RNA پلی‌مراز پروکاریوتی صورت گرفت؛ به عبارت دیگر، **آنزیم RNA پلی‌مراز پروکاریوتی، از روی یک ژن یوکاریوتی رونویسی کرد.**

✓ آنزیم RNA پلی‌مراز پروکاریوتی، برای شناسایی راه‌انداز ژنِ رمزکننده‌ی rRNA یوکاریوتی، نیاز به عوامل رونویسی ندارد، ولی برای شناسایی راه‌اندازِ همین ژن در قورباغه، RNA پلی‌مراز I نیاز به عوامل رونویسی دارد.

✓ rRNA اولین آنزیمی بود که در مهندسی ژنتیک تولید شد.

✓ باکتری اشریشیاکلای **اولین** جانداری است که با روش‌های مهندسی ژنتیک تغییر پیدا کرد و تحت دستورزی قرارگرفت؛ بنابراین می‌توان گفت:

۱. **اولین** ژن دستکاری شده، ژن رمزکننده‌ی rRNA قورباغه بود.

۲. **اولین** ژن دستورزی شده، مربوط به DNA باکتری اِ.کلای بود.

۳. **اولین** جاندار تراژنی (جانداری که یک ژن خارجی را دریافت کرده)، باکتری اِ.کلای بود.

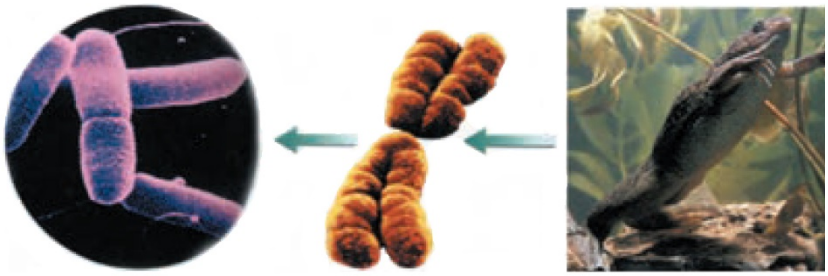
استاد علی درخشان فر

نکات ترکیبی

✓ در پدیده‌ی ترانسفورماسیون، باکتری با دریافت مواد ژنتیک از محیط خارج، در خصوصیات ظاهری خود، تغییراتی پدید می‌آورد. باکتری‌ها DNA نوترکیب را طی فرایند ترانسفورماسیون جذب می‌کنند. (فصل پنجم سال سوم)

✓ با توجه به شکل زیر، درمی‌یابیم که کوهن و بایر، از ژنی استفاده کردند که کروموزوم آن دو کروماتیدی است؛ یعنی در مرحله‌ی انتهای پروفاز یا متافاز قرار داشته است. (فصل ششم سال سوم)

✓ ژن رمزکننده‌ی rRNA، در این آزمایش مورد استفاده قرارگرفت؛ بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت کوهن و بایر، این ژن را از درون هسته جدا کردند. (ژن رمزکننده‌ی rRNA، درون هسته قراردارد). (فصل اول پیش دانشگاهی)



۱ــ این قورباغه به‌عنوان جاندار آزمایشگاهی انتخاب شد.

۲ــ ژن رمز کنندهٔ یک rRNA از یکی از کروموزوم‌های آن جدا شد.

۳ــ این ژن را به باکتری‌ها وارد کردند. باکتری‌ها rRNA قورباغه را ساختند.

نکته

۱. فرایند دست‌ورزی در ژن‌ها و تشکیل DNA نوترکیب، مهندسی ژنتیک نامیده می‌شود.

۲. با توجه به شکل ابتدای فصل می‌توان گفت: برای انگشت‌نگاری DNA، از ژل و روش الکتروفورز استفاده می‌شود.

۳. برای تعیین نقشه‌ی ژنی یک فرد، یک قطره خون کافی است. توجه فرمایید برای تهیه‌ی نقشه‌ی ژنی، سلول باید هسته‌دار باشد، به همین دلیل، از گلبول‌های سفید استفاده می‌شود (چون گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها، هسته ندارند).

۴. کدون‌ها عمومی‌اند، اما از آزمایش کوهن و بایر چنین نتیجه‌ای استنباط نمی‌شود؛ چون آن‌ها ژنی را منتقل کردند که کدون ندارد (rRNA). کدون مختص mRNA است.

اهداف مهندسی ژنتیک

۱. تولید یک ژن (بخشی از DNA) یا فراورده‌ی آن (انواع RNA یا پروتئین) به مقدار انبوه (که مهم‌ترین هدف مهندسی ژنتیک است).

۲. تولید دارو

۳. تولید واکسن

۴. ژن درمانی

۵. توالی‌یابی و تعیین جایگاه ژن‌های انسان (پروژه‌ی ژنوم انسان)

۶. اصلاح نژاد گیاهان

۷. اصلاح نژاد جانوران

موارد فوق، در صفحات آتی به تفصیل مورد بررسی قرارگرفته‌اند.

علی دارخشان فر

چگونگی تولید انبوه یک ژن

۱. ژن مورد نظر را از ژنوم جاندار جدا می‌کنند (توسط آنزیم‌های محدودکننده).

۲. ژن را به جاندار ساده‌ای مثل باکتری ـ که تولیدمثل سریعی دارد ـ وارد می‌کنند (از طریق وکتورها).

۳. ژن مورد نظر، در باکتری همانندسازی کرده و مقدار آن زیاد می‌شود.

آنزیم‌های محدودکننده

✓ آنزیم‌های محدودکننده، پروتئینی‌اند؛ بنابراین ۲۰ نوع مونومر (۲۰ نوع آمینواسید) دارند؛ یعنی پیش‌ساز آن‌ها آمینواسید است که با پیوند پپتیدی به هم وصل شده‌اند.

✓ پیش‌ماده‌ی آنزیم‌های محدودکننده (یعنی بخشی که روی آن اثر می‌گذارند)، DNA است.

✓ آنزیم‌های محدودکننده، مختص باکتری‌ها هستند و توسط سیستم اپرانی ساخته می‌شوند؛ یعنی ژن رمزکننده‌ی آن‌ها، درون اپران (روی DNA حلقوی باکتری‌ها) قرار دارد. (سلول‌های یوکاریوتی، آنزیم محدودکننده ندارند).

✓ آنزیم‌های محدودکننده را می‌توان به طور طبیعی و به مقدار زیاد، از باکتری‌ها استخراج کرد و نیازی به تولید آن‌ها از روش‌های مهندسی ژنتیک نیست.

✓ این آنزیم‌ها، **توالی کوتاه و خاصی** از DNA (هم حلقوی و هم خطی) را می‌شناسند و می‌توانند این توالی را از بخش معینی برش دهند؛ یعنی پیوند فسفودی‌استر آن بخش را می‌شکنند. این توالی خاص دو رشته‌ای، «جایگاه تشخیص آنزیم» نام دارد.

✓ هر آنزیم محدودکننده، جایگاه تشخیص خاص خود را روی DNA دارد که یک توالی ثابت و مشخص است (سایر آنزیم‌های محدودکننده، قادر به شناسایی این جایگاه تشخیص نیستند)؛ به بیان دیگر، آنزیم‌های محدودکننده، بسیار اختصاصی عمل می‌کنند و پس از شناسایی توالی‌های کوچک مشخصی ـ که خاص همان آنزیم محدودکننده است ـ آن‌ها را در محل‌های خاصی در درون این توالی‌ها، برش می‌دهند.

✓ توجه فرمایید آنزیم‌های محدودکننده، می‌توانند DNA را برش دهند (نه RNA یا پروتئین را!)؛ بنابراین نمی‌توانند بر ویروس‌های RNA دار؛ نظیر آنفلوآنزا، هاری، HIV (عامل ایدز) و TMV (ویرس موزائیک تنباکو)، یا عامل جنون گاوی (پریون‌ها) و یا ویروئید (از جنس RNA)، تأثیری داشته باشند، چون RNA و پروتئین، برای آنزیم‌های محدودکننده، جایگاه تشخیص آنزیم ندارند. (پریون‌ها از جنس پروتئین‌اند.)

✓ جایگاه تشخیص آنزیم محدودکننده‌ی EcoRI به صورت $\rightarrow$ GAATTC / CTTAAG $\leftarrow$ است. در این توالی، دو رشته‌ی جایگاه تشخیص، عکس یک دیگر (قرینه) هستند؛ یعنی به صورت آینه‌ای می‌باشند؛ به عنوان مثال، همان‌طور که ملاحظه می‌فرمایید، رشته‌ی پایین، قرینه‌ی رشته‌ی بالایی است (یعنی ترتیب نوکلئوتیدی رشته‌ی بالایی از چپ به راست، دقیقاً مشابه ترتیب نوکلئوتیدی رشته‌ی پایینی از راست به چپ می‌باشد).

✓ با برش جایگاه تشخیص (شکستن پیوندهای فسفودی‌استر)، پیوندهای هیدروژنی بین نوکلئوتیدهای جایگاه تشخیص نیز (در بسیاری از جایگاه‌های تشخیص) شکسته می‌شود و دو رشته‌ی DNA از هم جدا می‌شوند.

پیش‌تر بدانید (خارج از کتاب درسی):

توالی دو رشته‌ی جایگاه تشخیص، ممکن است عکس یک‌دیگر (قرینه) نباشند؛ به عنوان مثال، آنزیم محدودکننده‌ی EcoRII توالی GCCTGGC / CGGACCG **را شناسایی می‌کند. همان‌طور که ملاحظه می‌کنید، دو رشته‌ی جایگاه تشخیص عکس و قرینه‌ی هم نیستند.**

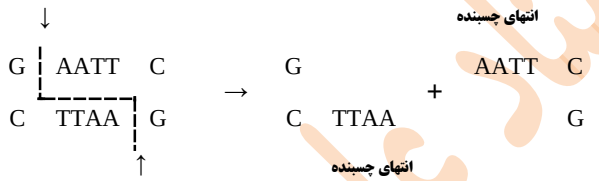
استاد علی درخشان فر

نحوه‌ی برش DNA توسط آنزیم‌های محدودکننده‌ی مختلف

۱. در **بعضی** از جایگاه‌های تشخیص، به دلیل این‌که محل‌های برش در DNA، دقیقاً روبه‌روی هم است، آنزیم محدودکننده، DNA را به صورت عمودی برش می‌دهد؛ در این حالت، دو انتهای صاف تشکیل می‌شود که در مهندسی ژنتیک کاربردی ندارد، زیرا قطعات تشکیل‌شده، قادر به اتصال مجدد به یک‌دیگر نیستند:

```
CTT | AAG      CTT     AAG
GAA | TTC  →   GAA  +  TTC
```

۲. در **بیش‌تر** جایگاه‌های تشخیص، به دلیل این‌که محل‌های برش روبه‌روی هم نیست، پس از شکستن پیوند فسفودی‌استر توسط آنزیم محدودکننده، پیوند هیدروژنی بین نوکلئوتیدها نیز (به دلیل وزن قطعات) شکسته می‌شود؛ در این حالت، هر قطعه‌ی حاصل از برش، که خود دو رشته‌ای است، در انتهای خود قطعاتی کوتاه و تک‌رشته‌ای از DNA دارد که با یک‌دیگر مکمل هستند. این دو انتهای حاصل از برش، «انتهای چسبنده» نامیده می‌شوند؛ بنابراین می‌توان گفت آنزیم‌های محدودکننده با شکستن پیوندهای فسفودی‌استر در بیش‌تر جایگاه‌های تشخیص، سبب می‌شوند که پیوندهای هیدروژنی نیز شکسته شوند.



- ✓ ویژگی دو انتهای چسبنده این است که بازهای آلی آن‌ها، مکمل هم بوده و می‌توانند توسط پیوند هیدروژنی به یک‌دیگر متصل شوند.
- ✓ هر انتهای چسبنده‌ای که توسط **یک نوع** آنزیم محدودکننده ایجاد شود، **قطعاً** می‌تواند با انتهای چسبنده‌ی دیگری که از **همان نوع** آنزیم محدودکننده به وجود آمده، **پیوند هیدروژنی** برقرار کند (یعنی قطعاً این دو انتهای چسبنده، مکمل هم می‌باشند.)
- ✓ تعداد نوکلئوتیدها در هر انتهای چسبنده‌ای، زوج است.

آنزیم محدودکننده‌ی EcoRI

- ✓ EcoRI اولین آنزیم محدودکننده‌ای است که شناخته شد. این آنزیم، توسط باکتری اشریشیاکلای سنتز می‌شود:

Eco= Ecoli , R=Restrict (محدود کردن) و I = one (اولین)

- ✓ ژن رمزکننده‌ی آنزیم محدودکننده‌ی EcoRI، به صورت اپران است و روی DNA حلقوی باکتری (کروموزوم اصلی باکتری) قرار گرفته است.
- ✓ جایگاه تشخیص این آنزیم، توالی GAATTC است؛ یعنی می‌تواند این توالی را شناسایی کرده و روی آن اثر بگذارد.

ویژگی‌های جایگاه تشخیص آنزیم محدودکننده‌ی EcoRI

۱. دو رشته‌ای است (بخشی از DNA حلقوی باکتری) است.

۲. به صورت قرینه و آینه‌ای است : GAATTC / CTTAAG

۳. ۶ جفت (۱۲ عدد) نوکلئوتید دارد (در ساختار آن، ۴ نوع نوکلئوتید به کار رفته است).

۴. مجموعاً ۱۰ پیوند فسفودی‌استر و ۱۴ پیوند هیدروژنی دارد.

۵. دارای ۳۰ حلقه است (مطمئنم !!!!!!! از فصل پنجم سال سوم به یاد دارید که هر جفت نوکلئوتید (هر پله در DNA)، دارای سه حلقه باز آلی و دو حلقه قند دئوکسی ریبوز و در مجموع، پنج حلقه است)، بنابراین به ازای ۶ جفت نوکلئوتید، ۳۰ حلقه نتیجه می‌شود (۱۸ حلقه مربوط به بازهای آلی و ۱۲ حلقه نیز مربوط به قند دئوکسی ریبوز).

استاد علی درخشان فر

۶. نیمی از بازها، پورینی (A و G) و نیمی دیگر، پیریمیدینی (T و C) هستند (تعداد بازهای پورینی و پیریمیدینی، هم در دو رشته و هم در هر رشته، با هم برابر است).

۷. در هر جایگاه تشخیص، آنزیم EcoRI، پیوند فسفودی‌استر بین نوکلئوتیدهای پورینیِ گوانین‌دار و آدنین‌دار را می‌شکند؛ بنابراین، همواره در هر جایگاه تشخیص، دو پیوند فسفودی‌استر و ۸ پیوند هیدروژنی شکسته می‌شود (در مجموع دو جایگاه تشخیص در دو طرف ژن خارجی، ۴ پیوند فسفودی‌استر و ۱۶ پیوند هیدروژنی شکسته می‌شود). به این نکته دقت فرمایید که نوکلئوتیدهای پورینی گوانین‌دار و آدنین‌دار را با بازهای G و A اشتباه نگیرید، زیرا بین بازهای آلی گوانین و آدنین، هیچ پیوندی نمی‌تواند تشکیل شود!

۸. بر اثر هیدرولیزِ دو پیوند فسفودی‌استر در هر جایگاه تشخیص، دو مولکول آب مصرف می‌شود.

۹. توالی‌های AATT و TTAA را دو انتهای چسبنده‌ی تک‌رشته‌ای می‌نامند، چون این قابلیت را دارند که با مکمل خودشان در رشته‌ی دیگر، پیوند هیدروژنی برقرار کنند (۸ پیوند هیدروژنی) .

۱۰. هر انتهای چسبنده، ۴ نوکلئوتید، سه پیوند فسفودی‌استر و ۷ پیوند قند ـ فسفات دارد و به نوکلئوتید آدنین‌دار ختم می‌شود. (۷ پیوند قند فسفات: ۴ پیوند در درون ۴ نوکلئوتید، و ۳ پیوند نیز بین قند یک نوکلئوتید با فسفات نوکلئوتید دیگر، که پیوندهای فسفودی‌استر را می‌سازند).

۱۱. در هر انتهای چسبنده، نیمی از بازها دو حلقه‌ای (بازهای آدنین) و نیم دیگر، تک‌حلقه‌ای (بازهای تیمین) می‌باشند.

۱۲. توجه فرمایید C و G، مربوط به انتهای چسبنده نیستند، چون پیوند هیدروژنی بین آن‌ها شکسته نمی‌شود و دو رشته‌ای باقی می‌مانند.

۱۳. بخش بیرونیِ هر انتهای چسبنده‌ی آن، به نوکلئوتید آدنین‌دار ختم می‌شود.

نکته

برای تعیین این که آیا یک توالی می‌تواند مربوط به جایگاه تشخیص یک آنزیم محدودکننده باشد یا خیر، باید بدانیم که: در هر رشته از جایگاه تشخیص، نوکلئوتیدهای اول و آخرِ توالی، دوم و ماقبل آخرِ توالی، و ... ، با هم مکمل هستند و همین‌طور که نوکلئوتیدها به هم نزدیک می‌شوند، دو به دو با هم مکمل‌اند؛ بنابراین می‌توان گفت هر انتهای چسبنده، باید حداقل شامل دو نوکلئوتید از دو نوع مختلف باشد (چون باید با هم مکمل باشند).

مثال: در توالی‌های زیر، توالی «الف» می‌تواند جایگاه تشخیص برای یک آنزیم محدودکننده باشد، چون ۱ با ۱′ و ۲ با ۲′ و ۳ با ۳′ مکمل است، ولی توالی «ب» نمی‌تواند جایگاه تشخیص باشد، چون نوکلئوتیدهای ۱ و ۱′ با هم مکمل نیستند.

A	T	T	A	A	G
۱	۲	۳	۳′	۲′	۱′

ب

A	T	T	A	A	T
۱	۲	۳	۳′	۲′	۱′

الف

مثال: اگر جایگاه تشخیص آنزیمی، T A A ۱ ۲ ۳ باشد، نوکلئوتیدهای ۱ و ۲ و ۳ کدام‌اند؟

نوکلئوتید ۱: T و نوکلئوتید ۲: T و نوکلئوتید ۳: A

تعداد قطعات حاصل از اثر آنزیم محدودکننده

۱. اگر یک DNA خطی، از n محل بشکند (یعنی به ازای n جایگاه تشخیص)، n + ۱ قطعه حاصل می‌شود که n - ۱ قطعه‌ی آن، دارای دو انتهای چسبنده خواهد بود.

۲. اگر یک DNA حلقوی، از n محل بشکند (یعنی به ازای n جایگاه تشخیص)، n قطعه حاصل می شود که همه‌ی n قطعه‌ی آن، دارای دو انتهای چسبنده خواهد بود.

۳. اگر M عدد DNA خطی و N عدد DNA حلقوی، از n محل بشکند (مشروط براین که همه‌ی DNAها شکسته شوند)، در مجموع همواره M + n قطعه DNA حاصل می‌شود.

نکته

در یک DNA ی خطی، به ازای n جایگاه تشخیص:

الف. ۲n انتهای چسبنده خواهیم داشت.

ب. n − ۱ قطعه DNA حاصل می‌شود، که دارای ۲n − ۲ انتهای چسبنده خواهند بود.

ج. n + ۱ قطعه حاصل می‌شود (دو قطعه‌ی ابتدا و انتهای DNA، هر کدام دارای یک انتهای چسبنده هستند).

پیش‌تر بدانید (خارج از کتاب درسی):

۱. نقش آنزیم‌های محدودکننده در حالت طبیعی در باکتری‌ها، برش DNA باکتریوفاژها و از بین بردن آن‌هاست. باکتریوفاژها، ویروس‌های DNA داری هستند که به باکتری‌ها حمله کرده و آن‌ها را تخریب می‌کنند.

۲. آنزیم‌های محدودکننده نمی‌توانند DNAی مربوط به سلول خودشان را برش دهند، چون باکتری‌ها برای محافظت از خودشان، به نوکلئوتیدهای جایگاه تشخیص آنزیم محدودکننده‌ی خود، برخی مولکول‌ها (گروه متیل) اضافه می‌کنند.

وکتور

- ✓ ابزاری است برای انتقال ژن خارجی به درون باکتری.
- ✓ ژن‌ها را نمی‌توان بدون واسطه وارد باکتری‌ها کرد، به همین دلیل، برای انتقال ژن مورد نظر به درون سلول میزبان، از DNAای کمک می‌گیریم که بتواند به طور طبیعی به درون سلول میزبان انتقال یابد. به این نوع DNAها، «وکتور» یا «حامل» گویند.
- ✓ برای انتقال ژن مورد نظر، آن را به وکتور متصل می‌کنند تا توسط آن، وارد سلول میزبان شود.
- ✓ از معمول‌ترین وکتورها، پلازمیدها و ویروس‌های DNAدار (مانند باکتریوفاژها) را می‌توان نام برد.

ویژگی‌های وکتور

۱. وکتور باید با اثر آنزیم محدودکننده، دو انتهای چسبنده ایجاد کند.

۲. وکتور مطلوب، باید تنها دارای یک جایگاه تشخیص برای آنزیم محدودکننده‌ی مورد نظر باشد؛ در غیراین‌صورت، قطعه قطعه می‌شود (البته به جز پلازمید Ti و وکتورهای ویروسی مثل باکتریوفاژ که در بخش مربوطه در مورد آن‌ها توضیحات کامل ارائه شده است).

اگر وکتور فقط یک جایگاه تشخیص برای آنزیم محدودکننده داشته باشد، پس از اثر آنزیم، به یک قطعه مولکول DNA با دو انتهای تک‌رشته‌ای تبدیل می‌شود (دو انتهای چسبنده)، ولی اگر وکتور بیش از یک جایگاه تشخیص برای آنزیم محدودکننده داشته باشد، چندین قطعه DNA با دو انتهای تک‌رشته‌ای (دو انتهای چسبنده) ایجاد می‌شود.

۳. باید توانایی انتقال به سلول میزبان را داشته باشد.

۴. باید غیربیماری‌زا باشد تا سبب ایجاد بیماری در سلول میزبان نشود.

۵. باید حتماً دارای **جایگاه آغاز همانندسازی** باشد تا بتواند در مرحله‌ی کلون ژن، هم هماهنگ با DNA اصلی و هم مستقل از DNA اصلی سلول میزبان همانندسازی کند؛ البته با استفاده از امکانات سلول میزبان (آنزیم‌های هلیکاز و DNA پلی‌مراز).

۶. باید حتماً ژن مقاوم نسبت به یک آنتی‌بیوتیک را داشته باشد تا در مرحله‌ی غربال‌گری بتوان از آن استفاده کرد. **(در این مورد، در صفحات بعدی، توضیحات کامل ارائه شده است).**

پلازمیدها

✓ مولکول‌های DNA حلقویِ دو رشته‌ای کوچکی هستند که در **بعضی از** (نه همه‌ی!) باکتری‌ها وجود دارند. (در یوکاریوت‌ها دیده نمی‌شوند).

✓ باکتری‌ها می‌توانند پلازمید نداشته باشند، و یا این که یک و یا بیش از یک پلازمید داشته باشند.

✓ پلازمیدها را کروموزوم‌های کمکی نیز می‌نامند، چون حاوی ژن‌هایی هستند که در کروموزوم اصلی باکتری وجود ندارد، ولی به باکتری، توانمندی‌های ویژه‌ای می‌دهد؛ مثلاً ژن مقاومت نسبت به یک آنتی‌بیوتیک خاص (نه همه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها) در بعضی از پلازمیدها وجود دارد، ولی این ژن را نمی‌توان در کروموزوم اصلی باکتری دید.

✓ ژن مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک، در برخی از پلازمیدها وجود دارد و در برخی دیگر، نمی‌توان این ژن را یافت.

✓ پلازمیدها نیز مانند کروموزوم‌های اصلی (DNA حلقوی اصلی باکتری‌ها)، از واحدهای دئوکسی ریبونوکلئوتید تشکیل شده‌اند، ولی برخلاف کروموزوم‌های اصلی، فقط در بعضی از باکتری‌ها وجود دارند.

✓ کروموزوم اصلی در باکتری‌ها، در ناحیه‌ی نوکلئوئیدی قرارگرفته و از سطح داخلی، به بخشی از غشای سلولی متصل است، ولی پلازمید یا پلازمیدها در سیتوپلاسم پراکنده‌اند.

✓ پلازمیدهایی که در مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند، مانند کروموزوم اصلی باکتری، دارای جایگاه آغاز همانندسازی هستند. این جمله بدین معناست که این پلازمیدها برای همانندسازی، به کروموزوم اصلی باکتری‌ها وابسته نیستند و می‌توانند هم مستقل از کروموزوم اصلی و هم هماهنگ و همراه با کروموزوم اصلی، همانندسازی کنند؛ به بیان دیگر می‌توان گفت تکثیر پلازمیدها در مهندسی ژنتیک، برخلاف تکثیر کروموزوم اصلی، به تقسیم دوتایی باکتری وابسته نیست.

✓ توجه فرمایید پلازمیدها می‌توانند مستقل از کروموزوم اصلی باکتری، همانندسازی کنند، ولی مستقل از سلول باکتری (یعنی خارج از سلول باکتری) نمی‌توانند همانندسازی نمایند، چون پلازمیدها برای تکثیر، به آنزیم‌های DNA پلی‌مراز و هلیکاز باکتری نیاز دارند؛ به بیان دیگر، پلازمیدها می‌توانند در زمانی که باکتری تقسیم دوتایی (تولیدمثل) انجام نمی‌دهد نیز، با استفاده از امکانات باکتری (استفاده از آنزیم‌های هلیکاز و DNA پلی‌مراز باکتری)، همانندسازی کرده و تکثیر شوند.

✓ پلازمیدها، قدرت تکثیر زیادی دارند؛ از طرفی، پلازمیدها به دلیل کوچک‌بودن، می‌توانند با سرعت بیش‌تری نسبت به کروموزوم اصلی باکتری همانندسازی کنند.

✓ پلازمیدها اگر بیرون از سلول (در محیط کشت) قرار بگیرند، می‌توانند طی فرایند ترانسفورماسیون به **تعداد اندک**، وارد **بعضی از** (نه همه‌ی!) باکتری‌ها شوند؛ به بیان دیگر، برخی از باکتری‌ها می‌توانند پلازمیدهایی را که به طور آزاد در محیط کشت قرار دارند، جذب کنند. این پلازمیدها می‌توانند ژن‌های خود را در درون باکتری، بیان کنند.

✓ در مهندسی ژنتیک، ژن مورد نظر (**ژن خارجی**) را درون پلازمید قرار می‌دهند؛ در این حالت، به پلازمید، DNA نوترکیب، یا پلازمید نوترکیب می‌گویند و سپس آن را به درون باکتری هدایت می‌کنند؛ حال هرگاه پلازمید نوترکیب، همانندسازی کند، ژن مورد نظر نیز همانندسازی کرده و مرتباً به تعداد نسخه‌های آن افزوده می‌شود.

✓ پلازمیدی به عنوان وکتور مورد استفاده قرار می‌گیرد که دارای **یک** جایگاه تشخیص آنزیم محدودکننده باشد. البته به جز پلازمید Ti، که دارای **دو** جایگاه تشخیص برای آنزیم محدودکننده می‌باشد.

✓ پلازمید Ti، در سلول‌های میزبان گیاهی می‌تواند به عنوان وکتور مورد استفاده قرارگیرد. **(در مورد پلازمید Ti، در صفحات بعدی توضیح داده شده است).**

نکته‌ی ترکیبی

✓ بعضی از باکتری‌ها، برآمدگی‌هایی به نام پیلی دارند که نسبت به تاژک، کوتاه‌تر و ضخیم‌تر هستند. پیلی، علاوه بر این که باکتری را به سطوح مختلف می‌چسباند، آن را قادر می‌سازد تا پلازمید خود را طی فرایندی به نام «هم‌یوغی» مبادله کند؛ در این حالت، پیلیِ یک باکتری، به باکتری بدون پیلی می‌چسبد و ماده‌ی ژنتیک، از باکتری دارای پیلی، به باکتری بدون پیلی منتقل می‌شود. هم یوغی، به باکتری

امکان می‌دهد تا پلازمید و ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک را، از سرده‌ای به سرده‌ی دیگر، منتشر کنند و از این طریق، موجب انتقال صفات جدید در باکتری دوم گردند. (فصل نهم پیش‌دانشگاهی)

باکتریوفاژها

✓ باکتریوفاژ، ویروس DNAدار است که دارای **DNA** طویل، کپسید چند وجهی و دم مارپیچی است. (فصل نهم پیش‌دانشگاهی)

✓ DNA باکتریوفاژها، برخلاف DNA پلازمیدها، خطی است.

✓ این ویروس، به سلول باکتری متصل شده و DNA خود را به درون باکتری تزریق می‌کند (کپسید وارد باکتری نمی‌شود)؛ بنابراین، با قراردادن ژن خارجی در DNA باکتریوفاژ، امکان تکثیر ژن فراهم می‌شود.

✓ در مهندسی ژنتیک، ابتدا توسط یک یا چند آنزیم محدودکننده، ژن یا ژن‌های بیماری‌زای ویروس را از باکتریوفاژ جدا می‌کنند و بعد، توسط یک آنزیم محدودکننده‌ی دیگر، ژن مورد نظر را درون DNAی ویروس قرار می‌دهند؛ به بیان دیگر، در مهندسی ژنتیک، وکتور باید غیربیماری‌زا باشد؛ بنابراین می‌توان گفت برای این‌که یک باکتریوفاژ بتواند به عنوان وکتور مورد استفاده قرار گیرد، باید بیش از یک آنزیم محدودکننده روی آن اثر بگذارد.

✓ دقت داشته باشید باکتریوفاژها، فاقد ژن مقاوم نسبت به آنتی‌بیوتیک هستند.

✓ ژن باکتریوفاژی که به عنوان وکتور مورد استفاده قرار می‌گیرد، باید پس از ورود به باکتری، چرخه‌ی لیزوژنی را طی کند، تا باکتری تخریب نشود.

فرق باکتریوفاژ و پلازمید

۱. میزبان پلازمید، می‌تواند سلول گیاهی باشد (پلازمید Ti)، ولی باکتریوفاژ نمی‌تواند به سلول گیاهی حمله کند.

۲. پلازمید مطلوب، فقط یک جایگاه تشخیص برای آنزیم محدودکننده‌ی مورد نظر دارد، ولی بر روی باکتریوفاژ، باید بیش از یک آنزیم محدودکننده اثر بگذارد.

۳. DNA در پلازمیدها، حلقوی و در باکتریوفاژها، خطی است.

۴. در صورتی که وکتور پلازمید باشد، دارای ژن مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک است، ولی اگر باکتریوفاژ باشد، ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک را ندارد.

نکات ترکیبی فصل نهم پیش‌دانشگاهی

۱. **چرخه لیتیک:** گاهی ویروس، بلافاصله بعد از آن که سلول را آلوده کرد، به تولید ژن‌های ویروسی و همچنین پروتئین‌های ویروسی (مثل کپسید) می‌پردازد و ویروس کاملی را پدید می‌آورد. این روند که در نهایت، با تخریب سلول همراه است، چرخه‌ی لیتیک نام دارد. **در چرخه‌ی لیتیک، باکتریوفاژها، مستقل از کروموزم اصلی میزبان، همانندسازی می‌کنند.**

۲. **چرخه‌ی لیزوژنی:** در چرخه‌ی لیزوژنی، ژن‌های ویروسی، خود را در درون کروموزوم میزبان جای می‌دهند و همراه با تقسیم سلولی، تقسیم می‌شوند؛ در این حالت، چون پروتئین‌های ویروسی ساخته نمی‌شوند، ویروس جدیدی نیز تولید نخواهد شد؛ لذا در چرخه‌ی لیزوژنی، بدون آن که سلول میزبان تخریب شود، ژنوم ویروس، همانندسازی می‌کند. **در چرخه‌ی لیزوژنی، باکتریوفاژها، هماهنگ و همراه با کروموزوم اصلی میزبان همانندسازی می‌کنند.**

مهندسی ژنتیک

✓ هدف مهندسی ژنتیک یا فناوری تولید DNA نوترکیب، تولید ژن و یا محصول آن به مقدار انبوه می‌باشد.

✓ در بسیاری از آزمایش‌های مهندسی ژنتیک، یکی یا همه‌ی مراحل زیر انجام می‌شود (۴ مرحله‌ی اول، را می‌توان مراحل اساسی در آزمایش‌های مهندسی ژنتیک دانست).

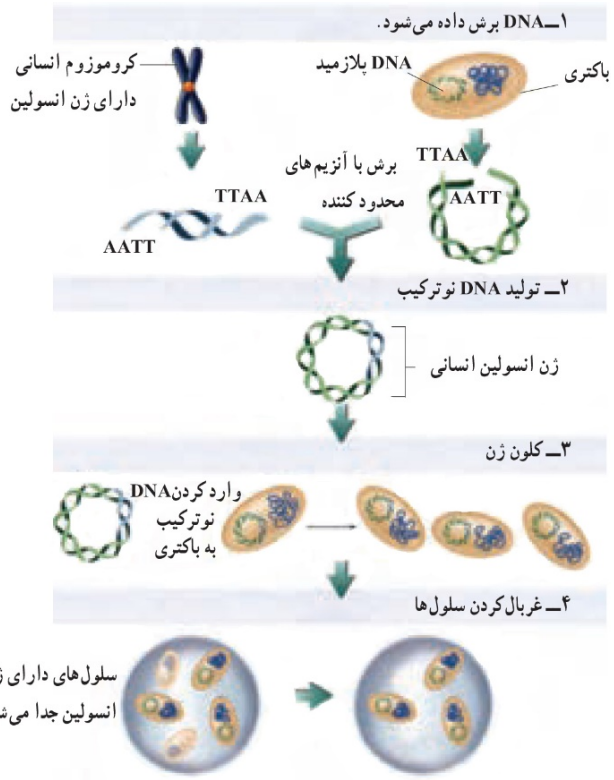
مراحل مهندسی ژنتیک

۱. برش DNA و پلازمید
۲. تولید DNA نوترکیب
۳. کلون‌کردن ژن
۴. غربال‌کردن
۵. استخراج ژن

برش DNA

✓ فرض کنید می‌خواهیم ژن رمزکننده‌ی انسولین را به تولید انبوه برسانیم. برای این‌کار، توسط آنزیم محدودکننده‌ی EcoRI، دو طرف ژن رمزکننده‌ی انسولین در کروموزوم انسانی برش داده می‌شود (دو برش).

✓ توسط همان آنزیم، در جایگاه تشخیص وکتور، یک برش ایجاد می‌شود.



شرح

۱. ابتدا باید دو طرف ژن رمزکننده‌ی انسولین را برش دهیم. برای این کار، باید از آنزیم محدودکننده‌ای استفاده کنیم که در دو طرف ژن رمزکننده‌ی انسولین، دارای جایگاه تشخیص باشد. این آنزیم محدودکننده، EcoRI است؛ به عبارت دیگر، دو طرف ژن رمزکننده‌ی انسولین انسانی، توالی GAATTC قراردارد. به این نکته‌ی مهم توجه فرمایید که **آنزیم محدودکننده، ژن انسولین را نمی‌شکند، بلکه دو طرف آن را می‌شکند**؛ به بیان دیگر، در ژن انسولین، توالی GAATTC وجود ندارد و سالم باقی می‌ماند.

۲. توجه فرمایید در کروموزوم حاوی ژن انسولین، فقط دو جایگاه تشخیص برای آنزیم محدودکننده‌ی EcoRI وجود ندارد، بلکه تعداد زیادی جایگاه تشخیص به طور تصادفی در این کروموزوم یافت می‌شود؛ بنابراین، ممکن است قطعات زیادی از DNA (با طول‌های مختلف) ایجاد شود که همگی دارای دو انتهای چسبنده هستند، اما قطعاً یکی از این قطعات، حاوی ژن رمزکننده‌ی انسولین می‌باشد.

۳. پس از برش دو طرف ژن رمزکننده‌ی انسولین، توسط **همان** آنزیم محدودکننده (EcoRI)، وکتور **در بیرون از سلول باکتری**، از محل جایگاه تشخیص آنزیم، برش داده می‌شود (فقط یک برش در جایگاه تشخیص وکتور ایجاد می‌شود).

۴. دلیل این که فقط از یک نوع آنزیم محدودکننده برای برش DNA (نه برش ژن!) و همچنین برش پلازمید استفاده می‌شود، این است که انتهای چسبنده‌ی آن‌ها، دو به دو با هم مکمل باشند.

نکته

۱. ژن رمزکننده‌ی انسولین، در همه‌ی سلول‌های هسته‌دار بدن انسان وجوددارد، ولی فقط در بعضی از سلول‌های پانکراس بیان می‌شود.

۲. طی جداکردن ژن انسولین، در دو طرف آن، دو جایگاه تشخیص EcoRI برش داده می‌شود؛ لذا در این فرایند (فقط برش‌های دو طرف ژن رمزکننده‌ی انسولین)، ۴ پیوند فسفودی‌استر و ۱۶ پیوند هیدروژنی شکسته می‌شود. در ضمن توجه فرمایید که به ازای شکستن ۴ پیوند فسفودی‌استر، ۴ مولکول آب نیز مصرف می‌گردد.

۳. طی برش جایگاه تشخیص آنزیم در وکتور، دو پیوند فسفودی‌استر و ۸ پیوند هیدروژنی شکسته می‌شود. همچنین ۲ مولکول آب نیز مصرف می‌شود.

۴. توجه فرمایید منظور از برش DNA، یعنی قطع پیوند فسفودی‌استر و منظور از اتصال دو DNA، یعنی برقراری پیوند فسفودی‌استر بین دو DNA است. به این نکته‌ی مهم توجه داشته باشید که آنزیم محدودکننده، پیوند هیدروژنی را نمی‌شکند. پیوندهای هیدروژنی پس از برش DNA (قطع پیوند فسفودی‌استر)، به دلیل وزن نوکلئوتیدها، خودبه‌خود شکسته می‌شوند؛ بنابراین می‌توان گفت آنزیم‌های محدودکننده با شکستن پیوندهای فسفودی‌استر در بیش‌تر جایگاه‌های تشخیص، سبب می‌شوند که پیوندهای هیدروژنی نیز شکسته شوند.

استاد علی درخشان فر