کتاب درسی زیر ذره‌بین

اولین تجربه

۱- ..... اولین جاندار دست‌ورزی شده است که طی فرآیند مهندسی ژنتیک ..... وارد آن شد.

۱) DNA ، Ecoli ۲) rRNA ، Ecoli ۳) قورباغه آفریقایی، DNA ۴) قورباغه آفریقایی، rRNA

۲- کدام‌یک در مورد اولین تجربه‌ی مهندسی ژنتیک درست است؟

۱) در این فرآیند یک جاندار یوکاریوت دست‌ورزی شد.
۲) DNAی نوترکیب ساخته شده در این فرآیند خطی بود.
۳) rRNAی قورباغه وارد باکتری Ecoli شد.
۴) ترجمه صورت نگرفت.

برش + آنزیم‌های محدودکننده + DNAی نوترکیب

۳- یکی از اولین مراحل اقدام برای تولید پپتید انسولین انسانی، به روش ابتدایی‌تر تکنولوژی ژن، کدام است؟ *(سنجش ۸۴)*

۱) استخراج سلول‌های تمایزیافته از دام
۲) هدایت وکتور حامل ژن انسولین به سلول دام
۳) هدایت ژن انسولین به درون باکتری
۴) افزودن ژن انسولین به ژنوم سلول پستانی

۴- کدام نادرست است؟

۱) جایگاه تشخیص EcoRI، ۱۲ نوکلئوتید دارد.
۲) بین نوکلئوتیدهای جایگاه تشخیص EcoRI ، ۱۰ پیوند فسفودی‌استر وجود دارد.
۳) EcoRI با اثر بر جایگاه تشخیصش ۴ پیوند فسفودی‌استر را می‌شکند.
۴) ۱۴ پیوند هیدروژنی بین نوکلئوتیدهای جایگاه تشخیص EcoRI قرار دارد.

۵- کدام‌یک انتهای چسبنده‌ی ایجاد شده توسط EcoRI را نشان می‌دهد؟

۱) GAATTC ۲) GAATT ۳) AATT ۴) ATAT

۶- در فعالیت یک آنزیم محدودکننده، پیوندهای ..... بین نوکلئوتیدهای مجاور ..... DNA قطع می‌شوند. *(سنجش ۸۴)*

۱) فسفودی‌استر ـ در هر یک از رشته‌های
۲) فسفودی‌استر ـ در یک رشته از
۳) هیدروژنی ـ در هر یک از رشته‌های
۴) هیدروژنی ـ در یک رشته از

۷- باکتریوفاژ یک ..... است که ..... دارد.

۱) باکتری ـ DNA ۲) باکتری ـ RNA ۳) ویروس ـ DNA ۴) ویروس ـ RNA

۸- کدام‌یک در پلازمید وجود ندارد؟

۱) پیوند فسفودی‌استر ۲) پیوند هیدروژنی ۳) دئوکسی ریبوز ۴) یوراسیل

۹- کروموزوم اشریشیاکلای با پلازمید آن در کدام مورد اختلاف ندارند؟

۱) شکل مولکول ۲) ژن مقاومت به آنتی بیوتیک ۳) تعداد نوکلئوتیدها ۴) سرعت تکثیر

۱۰- برای ایجاد یک DNA نوترکیب، چند انتهای چسبنده مورد نیاز است؟

۱) ۴ ۲) ۳ ۳) ۲ ۴) ۱

۱۱- اگر آنزیم محدودکننده‌ی مربوطه، بر پلازمید نوترکیب با ژن انسولین اثر کند، چند انتهای چسبنده ایجاد خواهد کرد؟

۱) ۱ ۲) ۲ ۳) ۴ ۴) ۶

۱۲- EcoRI برای جداکردن ژن انسولین و استفاده از پلازمید، به ترتیب چند پیوند فسفودی‌استر را می‌شکند؟

۱) ۲ و ۱ ۲) ۱ و ۲ ۳) ۴ و ۲ ۴) ۲ و ۴

۱۳- در دو قطعه DNA که توسط EcoRI برش داده شده‌اند، آنزیم لیگاز پیوند فسفودی‌استر بین کدام دو نوکلئوتید را برقرار می‌سازد؟

۱) A و T ۲) G و C ۳) A و G ۴) T و C

۱۴- DNAهای انسان و وکتور با یک آنزیم محدودکننده برش داده می‌شوند تا ..... *(سنجش ۸۲)*

۱) وکتور بتواند بیش‌تر تکثیرشود.
۲) به‌راحتی وارد سلول میزبان شوند.
۳) انتهای چسبنده‌ی مکمل داشته باشند.
۴) وکتور در مقابل آنتی‌بیوتیک مقاوم شود.

۱۵- دو انتهای چسبنده ..... کمک آنزیم لیگاز و به وسیله‌ی پیوند ..... به‌هم وصل می‌شوند.

۱) با ـ هیدروژنی
۲) با ـ فسفودی‌استر
۳) بدون ـ هیدروژنی
۴) بدون ـ فسفودی‌استر

۱۶- جایگاه تشخیص EcoRI ، چند پیوند هیدروژنی و چند پیوند فسفودی‌استر دارد؟

۱) ۱۰ و ۱۰
۲) ۱۴ و ۱۲
۳) ۱۴ و ۱۰
۴) ۱۲ و ۱۲

۱۷- پس از برش و ایجاد قطعات ژن انسولین و پلازمید توسط آنزیم محدودکننده‌ی EcoRI، برای تشکیل DNA نوترکیب ابتدا کدام پیوند تشکیل می‌شود؟ *(سنجش ۸۵)*

۱) هیدروژنی بین C و G
۲) فسفودی‌استر بین G و A
۳) هیدروژنی بین A و T
۴) فسفودی‌استر بین A و T

کلون کردن

۱۸- اگر یک پلازمید نوترکیب با ژن انسولین را وارد یک اشریشیاکلای کنیم و هر باکتری اشریشیاکلای پس از ۲۰ دقیقه تقسیم شود، بعد از یک ساعت چند نسخه ژن انسولین در محیط کشت وجود دارد؟

۱) ۱
۲) ۳
۳) ۸
۴) بیش از ۸ نسخه

۱۹- علت اصلی استفاده از باکتری در کلون کردن ژن‌ها چیست؟

۱) تکثیر سریع
۲) قابلیت جذب DNA نوترکیب
۳) تک‌سلولی بودن
۴) مقاومت در برابر تتراسایکلین

۲۰- رونویسی ژن انسولین در برخی سلول‌های پانکراس و در مهندسی ژنتیک در کجا انجام می‌شود؟

۱) هسته ـ هسته
۲) هسته ـ سیتوپلاسم
۳) سیتوپلاسم ـ هسته
۴) سیتوپلاسم ـ سیتوپلاسم

غربال کردن

۲۱- هدف از غربال کردن سلول‌های کلون شده چیست؟ *(سنجش ۸۲)*

۱) تکثیر سلول میزبان
۲) تکثیر وکتور در سلول میزبان
۳) مقاوم کردن سلول به آنتی‌بیوتیک
۴) جدا کردن سلول‌های حاوی وکتور نوترکیب از بقیه‌ی سلول‌ها

۲۲- در غربال کردن، کدام‌یک نقش مهم‌تری دارد؟

۱) DNAی خارجی
۲) کروموزوم باکتری
۳) DNAی پلازمید
۴) DNA پلی‌مراز

۲۳- علت غربال کردن در روند مهندسی ژنتیک چیست؟

۱) از بین بردن باکتری‌های فاقد کروموزوم
۲) از بین بردن باکتری‌های دارای پلازمید
۳) از بین بردن باکتری‌های دارای کروموزوم
۴) از بین بردن باکتری‌های فاقد پلازمید

الکتروفورز و استخراج ژن

۲۴- در مرحله استخراج ژن به کدام‌یک نیازی نداریم؟

۱) پلازمید نوترکیب
۲) ژل الکتروفورز
۳) آنزیم محدودکننده
۴) آنزیم لیگاز

۲۵- اولین مرحله در استخراج ژن، کدام است؟

۱) الکتروفورز
۲) برش DNA
۳) رونویسی از ژن خارجی
۴) استفاده از آنزیم لیگاز

۲۶- در ژل الکتروفورز مولکول‌های ..... DNA ، سریعتر به سمت قطب ..... حرکت می‌کنند.

۱) بزرگتر ـ منفی
۲) کوچکتر ـ منفی
۳) بزرگتر ـ مثبت
۴) کوچکتر ـ مثبت

۱- گزینه «۱»

اولین دستکاری ژنی

▲ یک کابوی جوان به همراه مرکبش که سرعت بالایی هم دارد؛ یک شتر خروس با مهندسی ژنتیک!

۱ شنیدی که به یک آدم خیلی فضول می‌گن: مگه مهندسی؟! حالا قضیه‌ی مهندسی ژنتیک هم همینه. مهندسی ژنتیک یعنی فضولی و دخالت در ژن‌ها و ژنوم‌ها به نفع انسان. مثلاً آدم‌های زیادی در جهان دیابت دارند. می‌دونید که درمان دیابت نوع I تزریق انسولینه. قبلاًها که مهندسی ژنتیک نیومده بود، فکر می‌کنید که داروسازان محترم از کجا انسولین تهیه می‌کردند؟ از اون‌هایی که به دیار باقی می‌شتافتند؟ نه. یک آقا یا خانم! گاو پیدا می‌کردند و پانکراسش را در می‌آوردند و انسولین پانکراس گاو را می‌کردند توی شیشه به‌عنوان داروی انسولین. مهم‌ترین اشکال این کار این بود که با این‌که انسولین گاو و انسان با هم فرق زیادی ندارند، اما به‌علت همان تفاوت‌های جزئی، بدن انسان در برابر انسولین گاو واکنش نشان می‌داد؛ ضمن این‌که مگه ما کلاً چند تا گاو داریم؟! تازه، این چه راه تهیه‌ی دارو اِ؟

۲ در مهندسی ژنتیک، میان و ژن انسولین انسان رو پیدا و جدا می‌کنن و بعد می‌ذارنش درون DNAی یک باکتری. در این حالت می‌گن باکتری دست‌ورزی یا همون دست‌کاری شده. تازه به DNAی جدید که ترکیب جدیدی از اتصالDNAی انسان (ژن انسولین) و DNAی باکتری هست، می‌گن DNAی **نوترکیب**. کلاً یادتون باشه هدف از مهندسی ژنتیک، تولید انبوه ژن خارجی (مثل ژن انسولین) یا تولید انبوه یکی از محصولات ژن خارجیه (RNA یا پروتئین ـ مثل خود انسولین).

۳ حالا DNAی نوترکیب رو می‌ذاریم توی باکتری. بعد از باکتری خواهش می‌کنیم که اون رو شدیداً برامون تکثیر (همانندسازی) کنه. از این به بعد دو جوره، یا می‌خوایم ژن رو به صورت انبوه تولید کنیم (ژن انسولین) یا محصول ژن رو (خود انسولین). در حالت اول بایدDNAهای نوترکیب تکثیر شده رو استخراج و ژن خارجی رو جدا کنیم (با روشی به اسم الکتروفورز). در حالت دوم باید بذاریم باکتری از روی ژن انسولین رونویسی و بعدmRNAی حاصل رو ترجمه کنه و نهایتاً انسولین بسازه و بعد ما با کلک مرغابی (یعنی همون الکتروفورز)، انسولین رو از محیط کشت باکتری استخراج کنیم.

▲ کوهن و بایر. فکر می‌کنین کدوم کدومشونن؟!

۴ سال ۱۹۷۳ بود! آقای کوهن (Stanley Cohen) و بایر (Herbert Boyer) یک قورباغه آفریقایی بسیار زشت رو پیدا کردند و از هسته‌ی یکی از سلول‌هاش ژن rRNA اون رو جدا کردند. دقت کنید ژن از جنس DNA است، پس ژن rRNA از جنس DNA است نه RNA. این دوستان در همان سال! این ژن رو بردند و بردند و بردند و قرار دادند درون DNAی یک باکتری زیبا به نام اشریشیاکلای یا همون Ecoli خودمون! Ecoli یک دفعه به خودش اومد و دید ای دل غافل دست‌ورزی شده! در درون Ecoli یک DNAی نوترکیب تشکیل شده بود و Ecoli از طرف انسان مأمور و مجبور بود که از روی ژن rRNAی قورباغه رونویسی کنه و rRNAی قورباغه آفریقایی زشت توسط آنزیم‌های Ecoli (RNA پلی‌مراز پروکاریوتی) رونویسی و درون Ecoli ساخته شد.

۵ در مورد آزمایش کوهن ـ بایر که اولین تجربه‌ی مهندسی ژنتیک بوده است به موارد زیر توجه کنید:

a قورباغه آفریقایی، یوکاریوت و Ecoli، باکتری و پروکاریوت است.

b در این آزمایش، Ecoli دست‌ورزی شد نه قورباغه‌ی آفریقایی.

c در این آزمایش، ژن (DNA) rRNA منتقل شد نه خود rRNA.

d کروموزوم‌های یوکاریوت‌ها (قورباغه‌ی آفریقایی) خطی و کروموزوم باکتری (Ecoli) حلقوی است.

e DNAی نوترکیب در این آزمایش در Ecoli تشکیل شد و حلقوی بود.

f در این آزمایش، RNA پلی‌مراز Ecoli (RNA پلی‌مراز پروکاریوتی) از روی یک ژن یوکاریوتی (ژن rRNA) رونویسی کرد.

g نتیجه‌ی این آزمایش تولید rRNAی قورباغه در Ecoli است.

h در این آزمایش فقط رونویسی انجام شد و ترجمه رخ نداد.

۲- گزینه «۴» در اولین تجربه‌ی مهندسی ژنتیک، ژن rRNAی قورباغه در Ecoli رونویسی شد. می‌دانید که rRNA آخر خط است و دیگر ترجمه نمی‌شود.

گزینه (۱): در این فرآیند Ecoli دست‌ورزی شد. Ecoli پروکاریوت است.

گزینه (۲): Ecoli یک باکتری است و DNA حلقوی دارد. پس DNAی نوترکیب تشکیل شده حلقوی است.

گزینه (۳): ژن rRNA (DNA) وارد Ecoli شد نه خود rRNA.

۳- گزینه «۳»

مهندسی ژنتیک در یک نگاه

گفتیم که هدف، به‌دست آوردن یک ژن یا محصولاتش (RNA یا پروتئین) به مقدار مورد نیاز است. حالا باید چه‌کار کنیم؟ هیچی باید از ژن مورد نظر یک نسخه پیدا کنیم و بعد با یک سری کلک اون رو تکثیر کنیم.

۱ برش

اولین مرحله، جداکردن ژن موردنظر است که ما از این به بعد اسمش رو می‌ذاریم **ژن خارجی**. برای برش، از **آنزیم‌های محدودکننده** استفاده می‌کنیم. این آنزیم‌ها ژن خارجی رو برامون جدا می‌کنن.

۲ تشکیل DNAی نوترکیب

ژن خارجی رو باید درون یک ساختاری از DNA قرار بدیم تا جزئی از اون بشه و با همانندسازی اون DNA، ژن خارجی هم تکثیر بشه (اون کلکه، اینه!). پس ژن خارجی رو میان و وصل می‌کنن به یک DNAی دیگه که بهش می‌گن **وکتور** یا **حامل**. پس حالا ما یه ترکیب جدید داریم: ژن خارجی + یه DNAی دیگه (وکتور). به این ترکیب جدید می‌گن **DNAی نوترکیب**.

۳ کلون کردن

اشتباه نکنید. ما هنوز موفق نشدیم ژن یا محصولش رو تکثیر کنیم! باید به راهمون ادامه بدیم! نکته‌ی ظریف بعدی اینه که یک DNA، چه خارجی، چه داخلی، چه تکراری و چه نوترکیب، خودبه‌خود توانایی تکثیر شدن، همانندسازی و کلون شدن رو نداره! پس باید DNA نوترکیب رو ببریم درون یک سلول (در این‌جا باکتری) که با استفاده از امکانات و آنزیم‌های باکتری بتونه به سرعت تکثیر بشه. به همانندسازی DNAی نوترکیب در باکتری می‌گن **کلون کردن**. پس در این لحظه ما موفق به تکثیر ژن خارجی شدیم!

۴ غربال کردن

اما شما هنوز اشتباه نکنید! البته بهتره آدم هیچ‌وقت اشتباه نکنه! وقتی ما می‌خواستیم چند تا DNAی نوترکیب رو وارد یکسری باکتری کنیم تا اونا ژن خارجی رو برامون تکثیر کنن یه اتفاقی افتاد! اونم اینه که DNA نوترکیب وارد بعضی از باکتری‌ها شد و وارد بعضی دیگه نشد! باکتری‌هایی که DNA نوترکیب ندارن چون ژن خارجی ندارن به درد ما نمی‌خورن و محکوم به مرگن! به کشتن بی‌رحمانه‌ی باکتری‌های بدون DNA نوترکیب می‌گن **غربال کردن**.

۵ استخراج ژن

تا قبل از این مرحله، کلی ژن خارجی رو تکثیر کردیم. تازه باکتری‌هایی رو هم که ژن خارجی و DNA نوترکیب ندارن از بین بردیم. حالا دو راه جلوی رویمون داریم؛ یکی این‌که مجدداً از باکتری سوء استفاده کنیم و بگیم با استفاده از آنزیم‌ها و ساختارهاش از روی ژن خارجی رونویسی و ترجمه کنه و برامون محصول ژن (RNA یا پروتئین) تولید کنه (مثل تولید انسولین با استفاده از مهندسی ژنتیک)؛ راه دوم اینه که اگر به محصول ژن نیازی نداشته باشیم و به خود ژن نیاز داشته باشیم بعد از غربال کردن دیگه اجازه‌ی پروتئین سازی رو به ژن نمی‌دیم و یک راست می‌ریم سر اصل مطلب یعنی **استخراج ژن**. در این مرحله به وسیله‌ی همون نوع آنزیم محدودکننده‌ی مرحله‌ی برش، DNA نوترکیب رو از همون جایی که قبلاً وصل کرده بودیم پاره می‌کنیم. با توجه به بسیار کوچک بودن مولکول‌های DNA ، نمی‌توانیم با دست ژن‌های خارجی را از وکتورها جدا کنیم!! برای جدا کردن ژن خارجی و وکتور (DNAی حامل ژن خارجی) از اختلاف اندازه‌ی آن‌ها استفاده می‌کنیم که به این روش می‌گن الکتروفورز.

با الکتروفورز، ما به هدفمون رسیدیم و از ژنی که فقط چند تای اون رو به زور به‌دست آورده بودیم، کلی تکثیر کردیم و می‌تونیم بریم کلی باهاشون حال کنیم! در کادرهای بعدی جزئیات و نکات هر یک از این ۵ مرحله را با ما باشید!

۴- گزینه «۳»

آنزیم‌های محدود کننده

۱ آنزیم‌های محدودکننده آنزیم‌هایی هستند پروتئینی که توسط باکتری‌ها ساخته می‌شوند و رمز آن‌ها فقط در DNAی پروکاریوت‌ها (باکتری‌ها) دیده می‌شود. این آنزیم‌ها کارشان بریدن و تخریب DNA است و نوعی آنزیم نوکلئاز هستند.

حاشیه شاید اولین سؤالی که برایتان مطرح می‌شود این است که این آنزیم که برای مهندسی ژنتیک خلق نشده است! پس چه کاربردی در خود باکتری‌ها دارد؟ داستان از این قرار است که باکتری‌ها دشمنان قسم خورده و بسیار خطرناکی دارند به نام باکتریوفاژها. باکتریوفاژها ویروس‌هایی هستند DNAدار که به باکتری‌ها حمله می‌کنند و آن‌ها را منفجر می‌کنند! باکتری‌ها برای مقابله و از بین بردن باکتریوفاژها، از آنزیم‌های محدودکننده استفاده می‌کنند و DNAی باکتریوفاژها را با آنزیم‌های محدودکننده می‌بُرند تا دیگه همچین غلط‌هایی نکنند! پس نقش آنزیم‌های محدودکننده در حالت طبیعی در باکتری‌ها از بین بردن باکتریوفاژهاست و استفاده از این آنزیم‌ها در مهندسی ژنتیک نوعی سوء استفاده‌ی انسان از آن‌ها است!

حاشیه اگه IQتون بالای ۱۲۰ باشه الان باید یک سؤال دیگه ازم بپرسید! چی؟ اگه آنزیم‌های محدودکننده نوکلئاز هستند و DNA را می‌برند چرا DNA خود باکتری‌ها را از بین نمی‌برند؟ جوابش خارج از کتاب میشه!! اما همین قدر بدونید که عوامل محافظت کننده‌ای به DNAی باکتری متصل می‌شن که جلوی اثر آنزیم‌های محدودکننده روی اون رو می‌گیرند. چه‌قدر رفتیم تو حاشیه!

۲ آنزیم‌های محدودکننده روی توالی‌های خاصی از DNAی دو رشته‌ای تأثیر می‌گذارند نه هر جای DNA. به این توالی‌های خاص DNA می‌گویند **جایگاه تشخیص** آنزیم محدودکننده. جایگاه تشخیص آنزیم محدودکننده یک جور خاصی است! معمولاً تعداد نوکلئوتیدهای کمی داره و این‌که توالی رشته‌ی بالایی عکس توالی رشته‌ی پایینی است. ضمناً یادتون باشه که رشته‌ی بالایی و پایینی با هم مکمل هستند. یعنی چی حالا؟

به جایگاه تشخیص روبه‌رو توجه کنید.

(۱) →
—GAATTC—
—CTTAAG—
← (۲)

از سمت (۱) توالی را بخوانید. از سمت (۲) هم بخوانید. مکمل بودن رشته‌ها رو هم چک کنید! هر ۲ رشته با هم مکمل هستند و توالی از جهت (۱) عین توالی از جهت (۲) است! چه جوری این‌جوری شد؟!

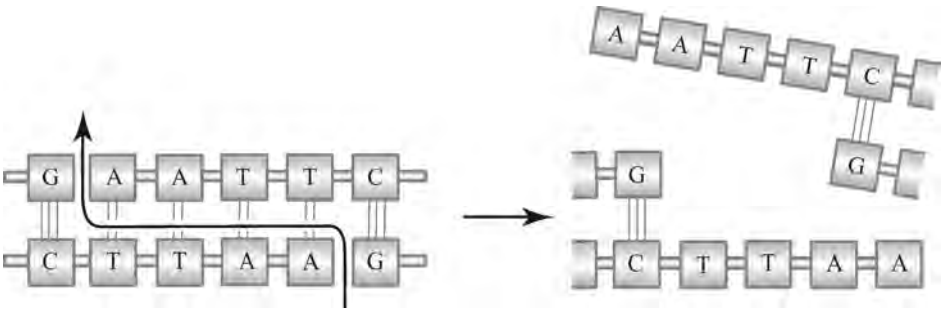
۳ علت این اتفاق جالب این است که در جایگاه تشخیص در یک رشته، نوکلئوتید اول و آخر جایگاه تشخیص با هم مکمل هستند.

①②③④⑤⑥
GAATTC

یعنی در این توالی نوکلئوتید (۱) و (۶) (G و C) با هم مکمل هستند. همین طور نوکلئوتیدهای (۲) و (۵) (A و T). نوکلئوتید (۳) و (۴) نیز با هم مکمل هستند (A و T).

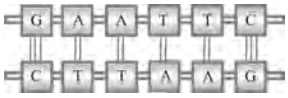
۴ دقت کنید که در باکتری‌ها، هرگونه برای خودش یک یا چند نوع آنزیم محدودکننده دارد و تازه هر آنزیم که مخصوص یک گونه است برای خودش جایگاه تشخیص با توالی متفاوت و اختصاصی نسبت به بقیه‌ی آنزیم‌های محدودکننده دارد. آنزیم‌های محدودکننده در جایگاه تشخیص‌شان با خاصیت نوکلئازی دو پیوند فسفودی‌استر (که نوعی پیوند کووالان است) را می‌برند (در هر رشته یک پیوند). با این کار دو رشته‌ی DNA بریده می‌شود.

نکته آنزیم‌های محدودکننده به‌صورت **مستقیم** پیوندهای فسفودی‌استر (نه پیوند هیدروژنی) را می‌برند. با بریده شدن پیوند فسفودی‌استر پیوندهای هیدروژنی به صورت غیرمستقیم در محل پاره‌شدن DNA از بین می‌روند.

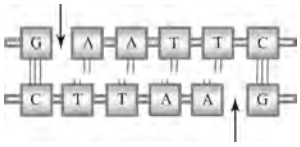


۵ برای نمونه EcoRI یک آنزیم محدودکننده است. این آنزیم، اولین آنزیم محدودکننده‌ای است که از باکتری Ecoli استخراج شده است. Eco یعنی Ecoli، R یعنی restrict (محدود کردن) و I یعنی اولین!

۶ جایگاه تشخیص اختصاصی آنزیم EcoRI توالی روبه‌روست:



این جایگاه دو رشته‌ای، ۱۲ نوکلئوتید و ۱۴ پیوند هیدروژنی دارد و تعداد بازهای پورین و پیریمیدین، هم در دو رشته و هم در هر رشته با هم برابر است.

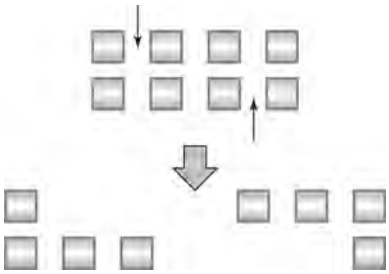


۷ گفتیم که با اثر هر آنزیم محدودکننده بر جایگاه تشخیصش، ۲ پیوند فسفودی‌استر شکسته می‌شود. EcoRI در جایگاه تشخیصش، پیوند فسفودی‌استر بین دو نوکلئوتید (نه باز آلی) G و A را می‌شکند (یکی در رشته‌ی بالایی و دیگری در رشته‌ی پایینی).

طی این فرآیند، به جز ۲ پیوند فسفودی‌استر شکسته شده، ۸ پیوند هیدروژنی (از ۱۴ پیوند هیدروژنی کل جایگاه) که بین A و T برقرار شده است نیز شکسته می‌شود. یعنی در اثر عملکرد EcoRI در یک جایگاه تشخیصش، ۱۰ پیوند (۲ تا فسفودی‌استر و ۸ تا هیدروژنی) شکسته می‌شود.

نکته در زیست A، T، C، G دو جور معنی می‌دهد. گاهی A یعنی باز آلی آدنین و گاهی هم A نماد نوکلئوتیدی است که باز آلی آن آدنین است. در مورد جایگاه تشخیص و اصلاً در مورد همه‌ی توالی‌هایی که پشت هم نوشته می‌شوند، منظور از حروف، نوکلئوتیدها هستند نه فقط بازها.

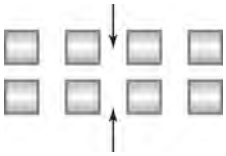
۸ در بیش‌تر جایگاه‌های تشخیص، محل شکستن پیوند فسفودی‌استر در رشته‌ی پایینی و بالایی روبه‌روی هم نیست.



این حالت باعث شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی و ایجاد قطعات کوتاه تک رشته‌ای از DNA بعد از برش در انتهای دو سر بریده شده می‌شود که به آن‌ها **انتهای چسبنده** می‌گویند. دقت کنید که فقط به همان نوکلئوتیدهای تک رشته‌ای انتهای چسبنده اطلاق می‌شود،

مثلاً با اثر EcoRI انتهای چسبنده‌ی AATT ایجاد می‌شود. خصلت جالب انتهاهای چسبنده این است که هم عین هم هستند (البته اون طرفی) و هم مکمل! مکمل بودن انتهاهای چسبنده باعث اتصال آن‌ها به هم و تشکیل پیوند هیدروژنی می‌شود. اتصال دو انتهای چسبنده‌ی مربوط به یک آنـزیم و تـشکیل پیونـدهای هیدروژنی بین آن‌ها نیاز به آنزیم ندارد.

واضح است که از اثر آنزیم محدودکننده بر یک جایگاه تشخیص حداکثر ۲ انتهای چسبنده به‌وجود می‌آید.

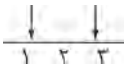


حاشیه در بعضی از آنزیم‌های محدودکننده دو نقطه‌ی برش پیوند فسفودی‌استر در جایگاه تشخیص، دقیقاً روبه‌روی هم هستند و برش DNA باعث شکـسته شـدن پیونـد هیـدروژنی و ایجـاد انتهـای چـسبنده نمی‌شود. موضوع بحث آن‌ها خارج از کتاب و حوصله‌ی ماست!

۹ یک سری مسأله از آنزیم محدودکننده و EcoRI می‌دهند که باید بتوانید آن‌ها را حل کنید. مثلاً اگر یـک DNAی حلقـوی یـک جایگـاه تشخیص داشت بعد از برش چند قطعه ایجاد می‌کند؟ بله؛ یکی! خب حالا اگر یک DNAی **حلقوی** n جایگاه تـشخیص بـرای EcoRI داشـت، بعد از برش آن:

- n قطعه ایجاد می‌شود.
- ۲n پیوند فسفودی‌استر شکسته می‌شود.
- ۸n پیوند هیدروژنی شکسته می‌شود.
- ۲n انتهای چسبنده به‌وجود می‌آید.
- همه‌ی قطعه‌ها ابتدا و انتهایشان انتهای چسبنده دارد.

۱۰ اگر یک DNAی خطی ۲ جایگاه تشخیص برای EcoRI داشته باشد، بعد از برش چند قطعه ایجاد می‌شود؟ ۳ قطعه.



چند انتهای چسبنده به‌وجود می‌آید؟

برای هر جایگاه، ۲ انتهای چسبنده؛ یعنی کلاً ۴ انتهای چسبنده. دقت کنید از این ۳ قطعه، ۲ قطعه هستند که یکی از انتهاهایـشان! چـسبنده نیست! (قطعه‌ی ۱ و ۳) و یک قطعه‌ی دیگر هست که دو انتهای چسبنده دارد (قطعه‌ی ۲). پس اگر یـک قطعـه DNA **خطـی** کـه n جایگـاه تشخیص برای EcoRI دارد، به وسیله‌ی این آنزیم برش شود:

- n+۱ قطعه DNA به‌وجود می‌آید.
- ۲n پیوند فسفودی‌استر شکسته می‌شود.
- ۸n پیوند هیدروژنی شکسته می‌شود.
- ۲n انتهای چسبنده به‌وجود می‌آید.
- ۲ قطعه هستند که فقط یکی از انتهاهایشان چسبنده است.
- (n+۱)−۲ یعنی n−۱ قطعه هستند که هر دو انتهایشان چسبنده است.

توجه نکته‌های شماره‌های ۹ و ۱۰ در مورد آنزیم محدودکننده‌ی EcoRI صادق است و استفاده از آنزیم محدودکننده‌ی دیگر شرایط دیگری را ایجاد می‌کند.

سؤال **اگر یک کروموزوم انسانی در مرحله‌ی G_2، ۴ جایگاه تشخیص برای EcoRI داشته باشد خودتان موارد بالا را برایش بنویسید!**

۱۱ و آخرین مطلب در مورد آنزیم‌های محدودکننده این است که تعداد و فاصله‌ی جایگاه‌های تـشخیص آنـزیم‌هـای محـدودکننـده پدیـده‌ای مربوط به انتخاب طبیعی است. یعنی این توالی‌ها لزوماً در همه‌ی DNAها وجود ندارند و فواصل معین و تعریف شده‌ای بین این جایگـاه‌هـا در یک DNA (که چند جایگاه دارد) وجود ندارد.

۱۲ یه چیز دیگه هم که الان یادم اومد، اینه: هر چه تعداد نوکلئوتیدهای یک جایگاه (نه تعداد جایگاه‌های یک DNA) کم‌تر باشـد احتمـال بـه‌وجـود آمدن آن جایگاه و فراوانیش در یک قطعه DNA بیش‌تر می‌شود. فراوان‌تر بودن تعداد جایگاه‌های تشخیص یک آنزیم محدودکننده باعث می‌شـود کـه DNA در نقاط بیش‌تری بریده شود؛ پس تعداد قطعات حاصل از برش بیش‌تر و طول DNAهای حاصل از برش کم‌تر می‌شود.

۱۳ به خدا آخریشه! در مقابل موضوع بالا این‌طور می‌شود گفت که: هر چه‌قدر تعداد جایگاه‌های تشخیص (نه تعـداد نوکلئوتیـدهای جایگـاه) در یـک قطعه DNA کم‌تر باشد، DNA در نقاط کم‌تری بریده می‌شود و طول رشته‌های حاصل از برش، افزایش می‌یابد؛ اما تعداد آن‌ها کم می‌شود.

GAATTC
CTTAAG جایگاه تشخیص EcoRI است و ۱۲ نوکلئوتید دارد، در هر رشته ۶ تا که بین آن‌ها ۵ پیوند فسفودی‌استر وجود دارد. به ازای هر G و C ۳ تا و به ازای هر A و T ۲ تا پیوند هیدروژنی و کلاً ۱۴ پیوند هیدروژنی داریم. اما با اثر آنزیم تنها دو پیوند فسفودی‌استر شکسته می‌شود، در هر رشته بین A و G.

۵- گزینه «۳» بدون شرح!

۶- گزینه «۱» مجاور یعنی فسفودی‌استر، مقابل یعنی هیدروژنی. ضمناً در هر دو رشته این کار را می‌کند.

۷- گزینه «۳»

وکتور یا حامل

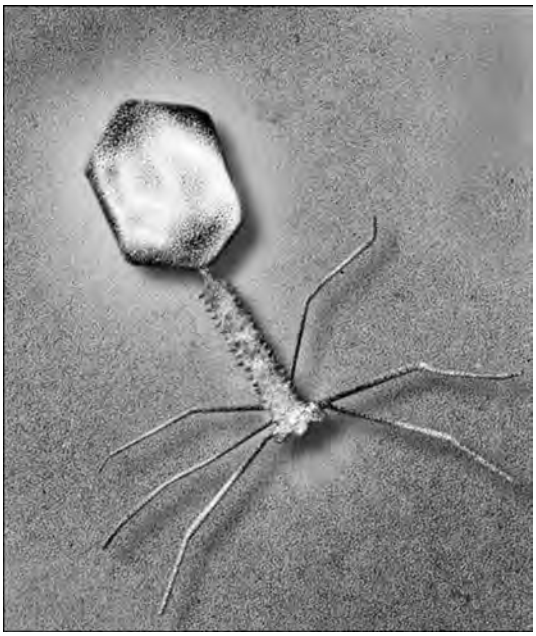
۱ گفتیم که یک DNAی خارجی را نمی‌توان به‌صورت مستقل هل داد درون یک باکتری و با خواهش و التماس از آن باکتری خواست که بیا و جان عمه‌ات این DNAی خارجی را زیادش کن، ما باهاش کار داریم! گوش نمی‌ده! پس باید گولش زد! یعنی باید این DNAی خارجی را درون یک DNA ای قرار دهیم که باکتری از آن DNA بدون التماس همانندسازی و رونویسی می‌کند. در این حالت باکتری با همانندسازی و رونویسی کردن از آن DNA، از ژن خارجی ما هم همانندسازی و یا رونویسی کرده است. به DNA ای که برای گول زدن باکتری استفاده می‌شود و ژن خارجی را به آن وصل کرده‌ایم و در حالت معمول باکتری از روی آن همانندسازی و رونویسی می‌کند، **وکتور یا حاملِ ژن خارجی** می‌گویند.

۲ باکتریوفاژها، پلازمیدها و ویروس‌های DNAدار از معروف‌ترین و مهم‌ترین وکتورها هستند. باکتریوفاژها، نوعی ویروس‌های DNAدار هستند که در حالت معمول به باکتری‌ها حمله می‌کنند و از آن‌ها سوء استفاده می‌کنند. باکتریوفاژها به دیواره‌ی باکتری می‌چسبند و DNAشان را درون DNAی باکتری قرار می‌دهند. کپسید باکتریوفاژ وارد باکتری نمی‌شود. در این حالت باکتری اصلاً حواسش نیست! و با استفاده از آنزیم‌هایش از روی ژنوم باکتریوفاژ همانندسازی و رونویسی می‌کند و نهایتاً پروتئین‌های باکتریوفاژ را می‌سازد که باعث مرگ خود باکتری می‌شود.

نکته پلازمید Ti ، نوعی پلازمید است که به عنوان وکتور در سلول‌های میزبان گیاهی استفاده می‌شود.

نکته ویروس‌ها انگل درون سلولی هستند.

ترکیب به مرحله‌ی قرار گرفتن ژنوم باکتریوفاژ در ژنوم باکتری، چرخه‌ی **لیزوژنی** (حالت نهفته) می‌گویند. در این مرحله، ژنوم باکتریوفاژ مثل یک ژن خارجی در درون DNAی باکتری قرار می‌گیرد. این حالت، حالتی شبیه DNAی نوترکیب است. در این حالت به ژنوم ویروس، **پروویروس** می‌گویند. در مرحله‌ی فعال شدن ویروس (**چرخه‌ی لیتیک**)، DNAی ویروس از DNAی باکتری خارج شده و همانندسازی، رونویسی و ترجمه از روی ژنوم آن با استفاده از امکانات باکتری صورت می‌گیرد. چرخه‌ی لیتیک باعث ایجاد شدن باکتریوفاژهای زیادی درون باکتری می‌شود. خروج این باکتریوفاژها باعث ترکیدن و مرگ باکتری می‌شود.



▲ این یه باکتریوفاژ خونگیه که ما تو خونمون نگهش می‌داریم. می‌خوام بفروشمش. زنگ بزنین انتشارات. به بالاترین قیمت پیشنهادی میفروشیمش

۳ دانشمندان ژن خارجی را وارد ژنوم باکتریوفاژ می‌کنند (تشکیل DNA نوترکیب). بعد این باکتریوفاژ نوترکیب را می‌اندازند به جان باکتری‌های بیچاره! آن‌ها هم که از نقشه‌ی شوم انسان بی‌خبر هستند، به وسیله‌ی ویروس‌ها مورد سوء استفاده قرار می‌گیرند و ژنوم باکتریوفاژ که حامل ژن خارجی است به وسیله‌ی باکتری در مقادیر متنابهی تکثیر می‌شود.

۴ بسته به نوع ژن خارجی، اهمیت و کاربرد آن می‌توانیم از ویروس‌های دیگر هم به عنوان وکتور (حامل) ژن خارجی به درون میزبان آن ویروس استفاده کنیم. دقت کنید ویروس‌هایی را که به‌عنوان وکتور انتخاب می‌کنیم باید سه مشخصه‌ی زیر را داشته باشند:

a توانایی آلوده کردن و تکثیر در سلول میزبانی را که ما می‌خواهیم ژن موردنظر را وارد آن کنیم، داشته باشند (مثلاً باکتریوفاژها نمی‌توانند سلول‌های انسان را آلوده کنند پس وکتور مناسبی برای انتقال ژن به انسان نیستند).

b در سلول میزبان ایجاد بیماری نکنند و یا اگر می‌کنند ژن بیماری‌زای آن‌ها را خارج کنیم.

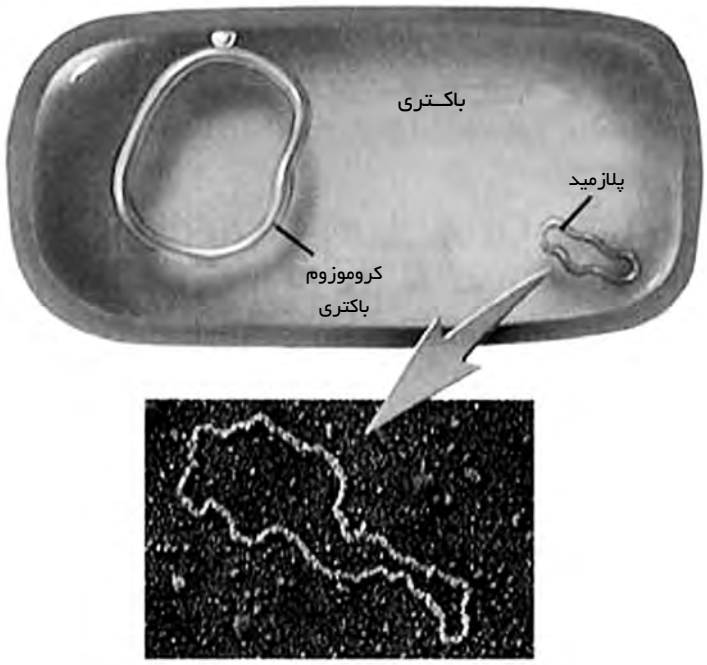
c اگر می‌خواهیم یک ژن خارجی از جنس DNA را حمل کنیم، وکتور ویروسی باید ژنومش از جنس DNA باشد.

ترکیب در فصل نهم کتاب پیش‌دانشگاهی می‌خوانید که هم ویروس RNAدار داریم و هم ویروس DNAدار.

ویروس	RNA دار	HIV ـ آنفلوآنزا ـ هاری ـ TMV
	DNA دار	زگیل ـ آبله مرغان، هرپس تناسلی، آبله‌ی گاوی و هپاتیت B

۵ پلازمیدها:

a همه‌ی باکتری‌ها یک کروموزوم اصلی دارند که از یک DNA حلقوی و مقداری پروتئین تشکیل شده و در ناحیه‌ی نوکلئوئیدی (شبه هسته‌ای) باکتری قرار گرفته است. **بعضی** از باکتری‌ها علاوه بر کروموزوم اصلی، DNAهای دو رشته‌ای و حلقوی کوچک‌تری دارند که به آن‌ها می‌گویند **پلازمید**.



b نام دیگر پلازمید، کروموزوم کمکی است زیرا ژن‌هایی دارد که در کروموزوم اصلی باکتری نیست؛ مثل ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک. ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک ژنی است که با روشن شدنش پروتئینی می‌سازد که آن پروتئین باعث بی‌تأثیر شدن آنتی‌بیوتیکی خاص بر باکتری دارای آن پلازمید می‌شود.

c پلازمیدها مستقل از کروموزوم اصلی و تقسیم دوتایی باکتری تقسیم می‌شوند. می‌دانید که در تقسیم دوتایی که در آن یک باکتری می‌شود دو تا، کروموزوم اصلی همانندسازی می‌کند. اما پلازمیدها تندتند تقسیم می‌شوند نه لزوماً در هنگام تقسیم دوتایی. مثلاً امکان دارد یک باکتری الان یک پلازمید داشته باشد و چند دقیقه بعد همان باکتری ۴ تا پلازمید داشته باشد از همان نوع و با همان توالی بدون این‌که تقسیم دوتایی انجام داده باشد و کروموزوم اصلی‌اش تقسیم شده باشد.

d DNA پلی‌مراز و هلیکازی که در همانندسازی از کروموزم اصلی نقش دارند، در همانندسازی پلازمیدها هم شرکت می‌کنند. پلازمیدها دارای یک نقطه‌ی آغاز و یک نقطه‌ی پایان همانندسازی هستند که روبه‌روی هم قرار دارند.

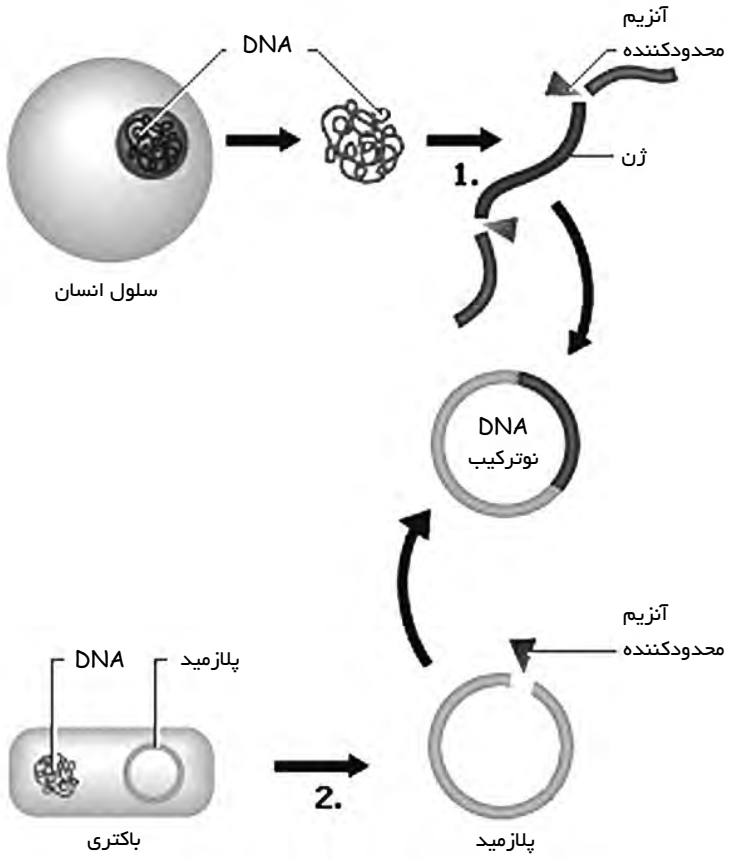
ترکیب در کتاب پیش‌دانشگاهی(۲) در فصل باکتری‌ها، چیزی می‌خوانید به نام **هم‌یوغی** که در آن ژن‌هایی از یک باکتری دارای پیلی از طریق پیلی به یک باکتری بدون پیلی منتقل می‌شود. در فرآیند هم‌یوغی آن چه بین باکتری‌ها رد و بدل می‌شود پلازمیدها و ژن‌های روی آن‌ها هستند. به همین دلیل باکتری‌ها می‌توانند ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک را از طریق هم‌یوغی به سرعت به‌هم منتقل کنند.

۸- گزینه «۴» پلازمید مولکول DNAی دو رشته‌ای است. در DNA یوراسیل نداریم. این باز آلی تک‌حلقه‌ای در RNA وجود دارد.

۹- گزینه «۱» هر دو حلقوی‌اند و دو رشته‌ای. ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک در پلازمید وجود دارد نه در کروموزوم اصلی باکتری. تعداد نوکلئوتیدهای کروموزوم اصلی بیش‌تر است. سرعت تکثیر پلازمید (کروموزوم کمکی) زیادتر است؛ کروموزوم اصلی فقط موقع تقسیم دوتایی (تقسیم سلول) همانندسازی می‌کند امّا پلازمید تکثیرش مستقل از کروموزوم اصلی باکتری است.

۱۰- گزینه «۱»

برش و تشکیل DNAی نوترکیب



۱ فرض کنید ژن موردنظر ما که می‌خواهیم تکثیرش کنیم، ژن انسولین باشد. باید کروموزومی را که حاوی ژن انسولین است، جدا کنیم و آنزیم محدودکننده‌ای که در دو طرف ژن انسولین جایگاه تشخیص دارد را به جان آن کروموزوم بیندازیم. EcoRI در دو طرف ژن انسولین جایگاه تشخیص دارد. نکته‌ی بسیار بسیار مهم این است که ژن انسولین برای EcoRI جایگاه تشخیص ندارد! چرا؟ خب، اگر (درون) ژن انسولین برای EcoRI جایگاه تشخیص داشته باشد، ژن پاره شده و قابل استفاده نخواهد بود. آنزیم محدودکننده باید در خارج از ژن و دو طرف آن جایگاه تشخیص داشته باشد.

۲ یک نکته‌ی دیگر این است که این طور نیست که EcoRI با اثر بر کروموزوم حاوی ژن انسولین فقط دو طرف ژن انسولین را بِبُرَد، بلکه تعداد قطعات بیش‌تری تولید خواهد شد که یکی از آن‌ها (یا دوتای آن‌ها؛ جلوتر توضیح می‌دهیم) حاوی ژن انسولین خواهد بود. علت متعدد بودن تعداد قطعات وجود تعداد زیادی جایگاه تشخیص در یک کروموزوم است.

ترکیب اول این‌که چون انسان ۲n است، در هر سلولش در ۲ کروموزوم که همتا هستند، ژن انسولین دارد. پس هر سلول ۲n یک فرد، حداقل ۲ نسخه ژن انسولین روی یک جفت کروموزوم همتا دارد. دوم این‌که چرا حداقل؟! چون هر یک از آن کروموزوم‌ها می‌توانند تک کروماتیدی باشند یا دو کروماتیدی. پس یک کروموزوم که دارای ژن انسولین است اگر تک کروماتیدی باشد یک نسخه و اگر دو کروماتیدی باشد دو نسخه ژن انسولین دارد. دقت کنید که همه‌ی سلول‌های هسته‌دار انسان ژن انسولین دارند، نه فقط سلول‌های پانکراس.

نکته در فرآیند جدا کردن ژن انسولین توسط EcoRI در دو طرف ژن انسولین دو جایگاه تشخیص EcoRI بریده شده و طی این فرآیند ۴ پیوند فسفودی‌استر و ۱۶ پیوند هیدروژنی و کلاً ۲۰ پیوند شکسته می‌شود (در این کروموزوم تعداد برش‌ها خیلی بیش از این است، اشتباه نکنید). در این حالت در دو طرف ژن انسولین دو انتهای چسبنده به‌وجود می‌آید.

۳ بعد از جدا کردن ژن انسولین باید وکتورمان را هم ببریم و ژن انسولین را در درون وکتور بگذاریم. در کتاب می‌خوانیم که پلازمیدهای به کاربرده شده فقط یک جایگاه تشخیص برای آنزیم محدودکننده دارند. در واقع این جمله را باید این‌طور اصلاح کنیم که ما پلازمیدی را به‌عنوان وکتور در مهندسی ژنتیک انتخاب می‌کنیم که برای آنزیم محدودکننده‌ی آن آزمایش (این‌جا EcoRI) فقط و فقط یک جایگاه تشخیص داشته باشد و الّا هستند وکتورهایی که برای یک آنزیم خاص جایگاه‌های بیش از یکی دارند اما برای ما کاربردی در مهندسی ژنتیک ندارند. علت این امر کاهش تعداد قطعات ایجاد شده و آسان‌تر بودن تشکیل DNA نوترکیب است.

نکته چون باید انتهاهای چسبنده‌ی ایجاد شده در دو سر پلازمید بریده شده و دو طرف ژن انسولین با هم مکمل باشند در تمام مراحل مهندسی ژنتیک فقط و فقط از یک نوع آنزیم محدودکننده استفاده می‌کنند.

نکته در بریدن وکتور فقط یک جایگاه تشخیص بریده می‌شود و دو پیوند کووالانسی و ۸ پیوند هیدروژنی می‌شکنند و دو انتهای چسبنده به‌وجود می‌آید.

۴ خب، حالا باید DNA نوترکیب را تشکیل دهیم. دو انتهای چسبنده‌ی ژن خارجی و دو انتهای چسبنده‌ی پلازمید با هم مکمل هستند و پیوندهای هیدروژنی بین بازهای مکمل **بدون دخالت آنزیم** به‌هم وصل می‌شود. تشکیل پیوندهای فسفودی‌استر به وسیله‌ی آنزیم پروتئینی DNA **لیگاز** انجام می‌شود. طی این فرآیند یک قطعه DNAی حلقوی نوترکیب به‌وجود می‌آید که در دو سر ژن خارجی آن دو جایگاه تشخیص وجود دارد.

در واقع در تشکیل این قطعه DNA نوترکیب ۴ انتهای چسبنده به‌هم می‌چسبند و دو جایگاه تشخیص EcoRI تشکیل می‌دهند که طی این فرآیند ۴ پیوند فسفودی‌استر (۲×۲) و ۱۶ پیوند هیدروژنی (۲×۸) تشکیل می‌شود (کلاً ۲۰ پیوند).

نکته در هر پیوند فسفودی‌استری که به وسیله‌ی DNA لیگاز ایجاد می‌شود یک مولکول آب تولید و در هر پیوند فسفودی‌استری که به وسیله‌ی EcoRI شکسته می‌شود یک مولکول آب مصرف می‌شود. پس به هنگام تشکیل DNA نوترکیب ۴ مولکول آب آزاد می‌شود.

۵ فعالیت ۴ آنزیم زیر را با هم مقایسه کردیم:

نام آنزیم	شکستن پیوند هیدروژنی	شکستن پیوند فسفودی‌استر	تشکیل پیوند فسفودی‌استر
EcoRI	به صورت مستقیم نه	آره	نه
DNA لیگاز	نه	نه	آره
RNA پلی‌مراز	آره، در ابتدای رونویسی	نه	آره، طی رونویسی
DNA پلی‌مراز	نه	آره، طی ویرایش	آره، طی همانندسازی

۶ دقت کنید که دو قطعه‌ی DNA نوترکیب را با دست به‌هم وصل نمی‌کنند! بلکه تعدادی ژن خارجی بریده شده و تعدادی پلازمید بریده شده را در یک محلول در کنار هم قرار می‌دهند. طی این فرآیند چون انتهاهای چسبنده با هم مکمل هستند چندین جور اتصال دیده می‌شود که همه‌ی آن‌ها هم به نفع ما و مطابق خواسته‌ی ما نیست:

a اتصال ژن خارجی با ژن خارجی ⟵ به درد ما نمی‌خورد.

b اتصال پلازمید با پلازمید ⟵ به درد ما نمی‌خورد.

c اتصال پلازمید با ژن خارجی ⟵ به درد ما می‌خورد.

به همین دلیل گفتیم که پلازمید باید یک جایگاه تشخیص داشته باشد تا انواع اتصالات، بیش‌تر از این نشود.

وقتی یک ژن خارجی را می‌خواهیم وارد یک DNA (وکتور) بکنیم، قطعاً این ژن دو تا سر (انتهای چسبنده) دارد، پس وکتور هم دو تا سر نیاز دارد تا دو سر ژن خارجی به دو سر وکتور بچسبد! پس برای تشکیل یک DNAی نوترکیب، ۴ تا انتهای چسبنده می‌خواهیم.

۱۱- گزینه «۳» این کار ژن انسولین را از پلازمید جدا خواهد کرد. پس ۴ تا انتهای چسبنده ایجاد می‌شود. دو تا در دو سر ژن، دو تا هم دو سر پلازمید.

۱۲- گزینه «۳» برای جدا کردن ژن انسولین باید در دو سر این ژن برش ایجاد شود؛ یعنی در هر سمت یک جایگاه تشخیص. در هر جایگاه تشخیص هم که می‌دانید ۲ پیوند فسفودی‌استر می‌شکنند. پس برای جدا کردن ژن انسولین ۴ پیوند فسفودی‌استر می‌شکنند. برای ایجاد برش در پلازمید هم که یک جایگاه تشخیص دارد، ۲ پیوند فسفودی‌استر می‌شکنند.

۱۳- گزینه «۳» محل برش EcoRI در جایگاه تشخیص اختصاصی‌اش در هر رشته، بین نوکلئوتیدهای A و G است. حالا برای اتصال دادن دو قطعه‌ی DNA، آنزیم DNA لیگاز نیز باید پیوند فسفودی‌استر را بین همین دو نوکلئوتید برقرار کند.

۱۴- گزینه «۳» اگر وکتور و ژن خارجی را به وسیله‌ی دو نوع آنزیم محدودکننده‌ی متفاوت برش بزنیم، نمی‌توانیم ژن خارجی و وکتور را از طریق انتهاهای چسبنده‌شان به‌هم وصل کنیم. چون آنزیم‌های محدودکننده‌ی متفاوت، انتهاهای چسبنده‌ی متفاوتی به‌وجود می‌آورند. یک انتهای چسبنده‌ی به‌وجود آمده به‌وسیله‌ی آنزیم x فقط با انتهای چسبنده‌ی دیگری که توسط خودش به‌وجود آمده مکمل است نه با انتهای چسبنده‌ی ایجاد شده توسط آنزیم محدودکننده‌ی دیگر.

۱۵- گزینه «۳» دو انتهای چسبنده خودشان چسبنده‌اند! زیرا با هم مکمل‌اند و بدون نیاز به آنزیم با ایجاد **پیوند هیدروژنی** به‌هم وصل می‌شوند. اما با این اتصال هنوز کار تمام نشده است. بعداً DNA لیگاز می‌آید و پیوند فسفودی‌استر را بین دو نوکلئوتید بدون پیوند فسفودی‌استر برقرار می‌کند.

۱۶- گزینه «۳» جایگاه تشخیص EcoRI، ۱۲ نوکلئوتید، ۱۴ پیوند هیدروژنی و ۱۰ پیوند فسفودی‌استر دارد.

۱۷- گزینه «۳» انتهای چسبنده‌ی ایجاد شده توسط EcoRI، TTAA است. انتهاهای چسبنده به صورت خودبه‌خود و بدون نیاز به آنزیم به‌هم می‌چسبند (پس اول تشکیل پیوند هیدروژنی بین A و T) و بعد DNA لیگاز پیوند فسفودی‌استر بین A و G را برقرار می‌کند.

۱۸- گزینه «۴»

کلون کردن و غربال کردن

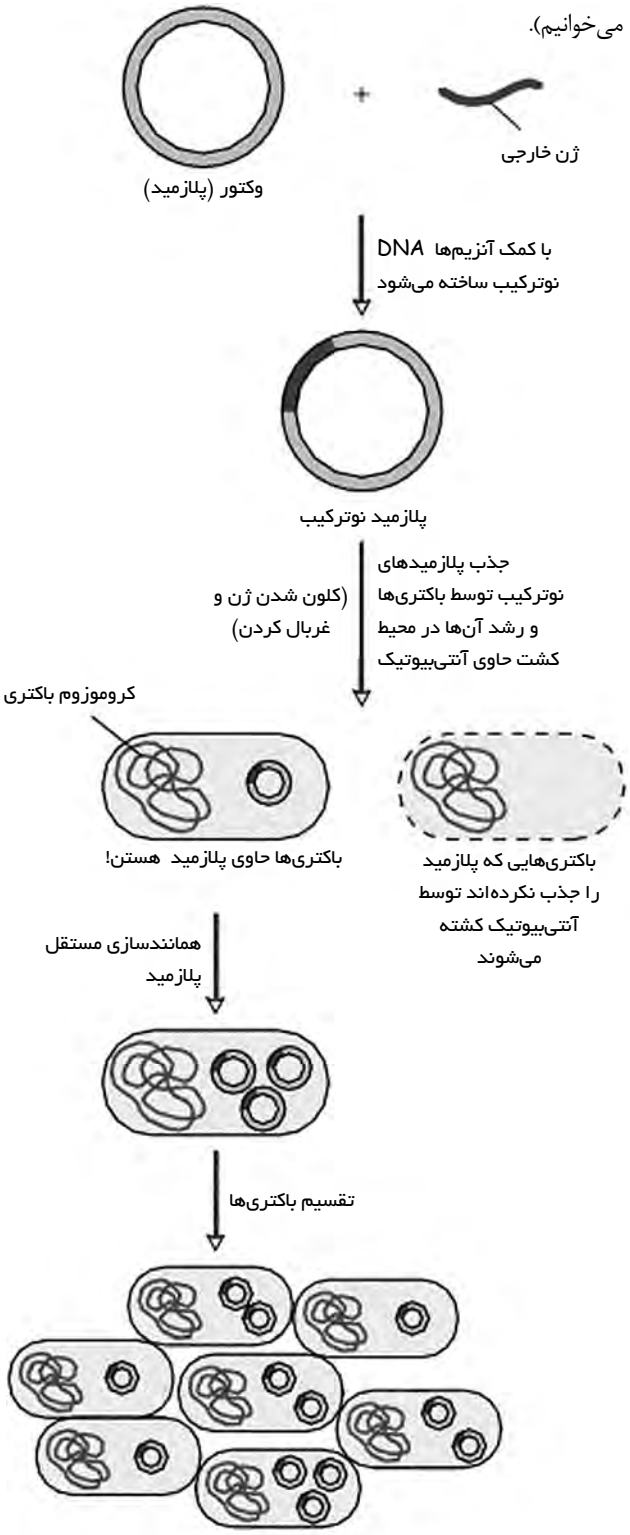
۱ کلون کردن یک ژن یا یک قطعه DNA، یعنی ایجاد نسخه‌های متعدد و یکسان از آن با استفاده از همانندسازی. بعد از تشکیل DNA نوترکیب باید آن را تکثیر و کلون کرد. برای این کار باید پلازمید نوترکیب را وارد باکتری کنیم تا با سوء استفاده از آن، باکتری ژن خارجی و پلازمید نوترکیب را برای ما همانندسازی کند. برای این کار DNAهای نوترکیب را در مجاورت باکتری‌ها قرار می‌دهیم و با کَلَک‌هایی (که خارج از کتاب است) تعداد کمی از باکتری‌ها می‌توانند DNA نوترکیب را جذب کنند. آن‌هایی که DNA نوترکیب را جذب نکرده‌اند چون ژن خارجی ندارند به درد ما نمی‌خورند. به حذف باکتری‌های بدون DNA نوترکیب می‌گویند **غربال کردن** (در ادامه می‌خوانیم).

۲ باکتری‌هایی که پلازمید نوترکیب را جذب کرده‌اند با استفاده از DNA پلی‌مرازشان شروع می‌کنند به همانندسازی پلازمیدهای نوترکیب، به این کار می‌گویند **کلون کردن** پلازمید نوترکیب. پلازمیدها مستقل از کروموزوم باکتری و تقسیم دوتایی باکتری تقسیم می‌شوند. یعنی امکان دارد که در یک باکتری یک پلازمید داشته باشیم که بعد از ۳ نسل همانندسازی بشود ۸ تا (۲^n) بدون این‌که در این فاصله باکتری همانندسازی کند.

ترکیب پلازمیدها هم مثل کروموزوم اصلی، یک نقطه‌ی آغاز همانندسازی دارند که از آن نقطه حباب همانندسازی ایجاد شده و به دنبال آن دو دوراهی همانندسازی تشکیل می‌شود. در همانندسازی پلازمید، نقطه‌ی آغاز و پایان همانندسازی روبه‌روی هم هستند.

۳ تا این‌جای کار، ما DNA نوترکیب و ژن خارجی‌مان را کلون کردیم. در این مرحله می‌خواهیم باکتری‌هایی را که در محیط کشت DNA نوترکیب را جذب نکرده بودند و به درد ما نمی‌خورند، بکشیم (غربال کردن). اگر یادتان باشد گفتیم که در پلازمیدها ژن‌هایی هست که در کروموزوم اصلی باکتری نیست (مثل ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک). وجود ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک در پلازمیدها به ما کمک می‌کند تا بتوانیم باکتری‌های بدون پلازمید را بکشیم. اما چه جوری؟ فرض کنید که پلازمیدهای نوترکیب ما ژن مقاومت به تتراسایکلین دارند. اگر به محیط کشت باکتری‌ها (باکتری‌های دارای پلازمید و بدون پلازمید با هم در محیط کشت هستند) تتراسایکلین اضافه کنیم، باکتری‌های پلازمید نوترکیب‌دار! زنده می‌مانند (چون ژن مقاومت دارند) و بقیه که ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک ندارند می‌میرند.

نکته طی این فرآیند باکتری‌های دارای پلازمید با کمک RNA پلی‌مراز پروکاریوتی از روی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک رونویسی می‌کنند و mRNA آن را ترجمه می‌کنند (رونویسی و ترجمه در سیتوپلاسم) و پروتئینی می‌سازند که وظیفه‌اش ایجاد مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک است.



ایجاد یک کلونی از باکتری‌های حاوی پلازمید نوترکیب

باکتری‌ها در این مرحله ژن انسولین را دارند و آن را برای ما کلون کرده‌اند. از این مرحله به بعد ۲ تا کار می‌توانیم با این ژن کلون شده بکنیم:

a آن را استخراج کنیم.

b به باکتری‌ها بگوییم آن را روشن کنند و برای ما خود انسولین را بسازند و بعد ما انسولین را استخراج کنیم و به عنوان دارو از آن استفاده کنیم.

حاشیه سؤال مهمی که مطرح می‌شود این است که آقا، مگه ژن‌های یوکاریوتی اینترون ندارند و mRNAی آن‌ها نباید بالغ بشه؟ مگه برای رونویسی از روی ژن‌های یوکاریوتی عوامل رونویسی لازم نداشتیم؟ این کمبودها و مشکلات چه جوری در باکتری برطرف می‌شه؟ و باکتری می‌تونه از روی ژن انسولین، انسولین بسازه؟ جوابش اینه که دانشمندان گرانقدر قبل از وارد کردن ژن به پلازمید، اینترون‌های ژن رو خودشون حذف می‌کنن که دیگه mRNAی حاصل از رونویسی، نیازی به بلوغ نداشته باشه. در مورد عوامل رونویسی و چیزهای دیگر در رونویسی، دانشمندان پلازمیدهایی می‌سازند که درست قبل از محلِ قرارگیری ژن خارجی، توالی راه‌انداز پروکاریوتی دارند تا RNA پلی‌مراز پروکاریوتی راحت بتواند از روی آن ژن یوکاریوتی بدون نیاز به عوامل رونویسی، رونویسی کند و خلاص!

نکته کمی جلوتر می‌خوانید که به جاندارانی که ژن گونه‌ای دیگر در آن‌ها قرار داده می‌شود می‌گویند **تراژنی (Transgenic)**. در این مثال باکتری که در آن پلازمید نوترکیب قرار دارد نوعی جاندار تراژن است چون ژن انسولین انسانی در آن قرار دارد.

پس از ۶۰ دقیقه، یک باکتری می‌شود ۸ باکتری (2^3). اما در کتاب خواندیم که پلازمیدها مستقل از کروموزوم باکتری‌ها همانندسازی می‌کنند و تکثیر می‌شوند. یعنی در مواقعی که باکتری‌ها در حال تقسیم نیستند نیز این مولکول‌ها می‌توانند همانندسازی کنند. بنابراین بعد از ۶۰ دقیقه که تعداد باکتری‌ها و کروموزوم‌های اصلی‌شان ۸ تاست، پلازمیدها قطعاً بیش از این تعدادند.

۱۹- گزینه «۱» کتاب گفته، راستم گفته.

۲۰- گزینه «۲» ژن‌های یوکاریوت‌ها روی کروموزوم‌هایشان، درون هسته قرار دارند. پس آنزیم‌های مسئول رونویسی (RNA پلی‌مراز) و همانندسازی (DNA پلی‌مراز) باید در هسته کارشان را بکنند. رونویسی از روی DNA نوترکیب در مهندسی ژنتیک در باکتری‌ها انجام می‌شود. باکتری‌ها هسته ندارند و همه‌ی امورشان در سیتوپلاسم می‌گذرد.

۲۱- گزینه «۴» معلومه دیگه!

۲۲- گزینه «۳» در غربال کردن از ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک استفاده می‌کنیم که قسمتی از DNAی پلازمید است.

۲۳- گزینه «۴» *این سؤال رو کی طرح کرده؟!*

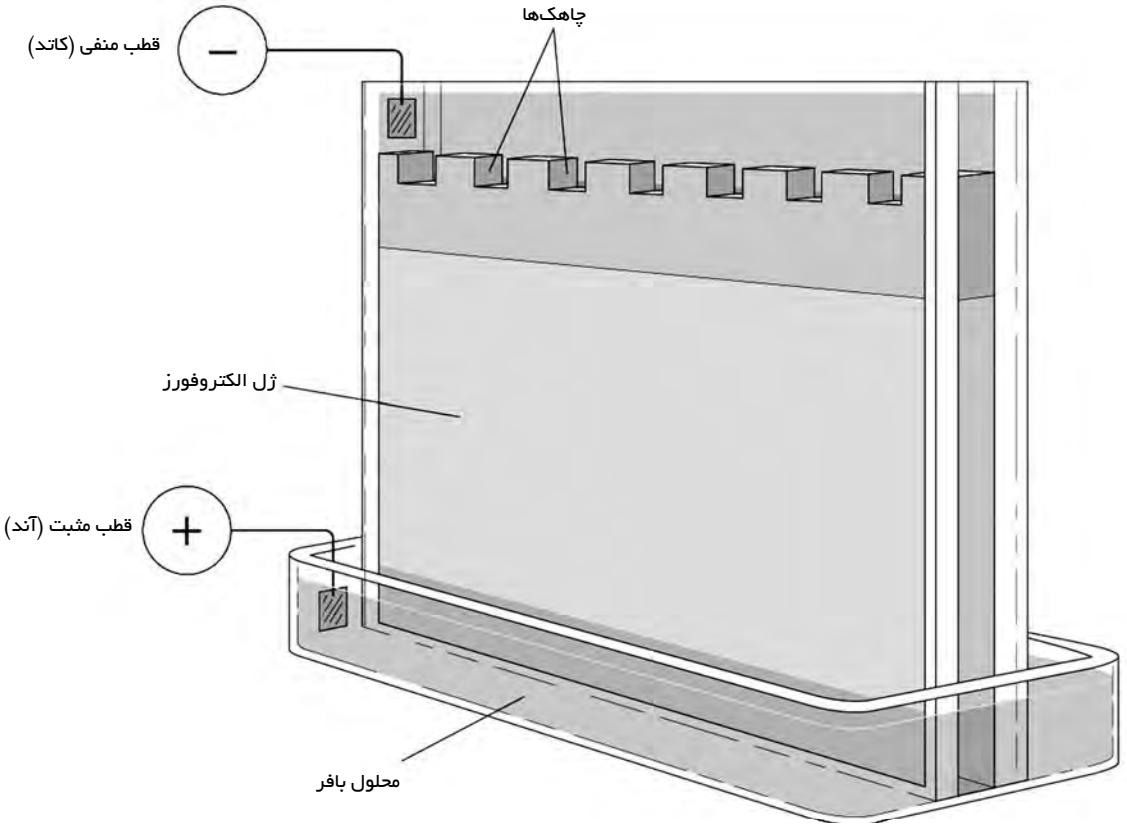
۲۴- گزینه «۴»

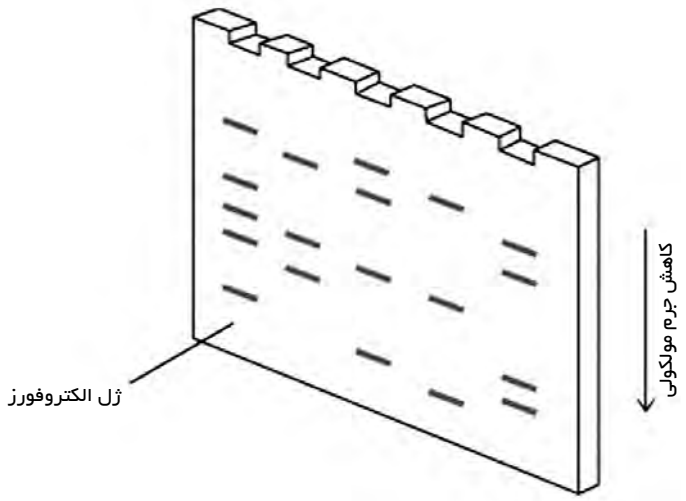
استخراج ژن و الکتروفورز

۱ بعد از مرحله‌ی غربال کردن، تعداد زیادی DNA نوترکیب با ژن خارجی داریم که باید ژن خارجی را از آن‌ها استخراج کنیم. برای این کار ابتدا DNAهای نوترکیب را به وسیله‌ی همان آنزیم محدودکننده‌ی اول (که در مرحله‌ی برش استفاده کردیم) می‌بریم. با این کار ژن خارجی و پلازمید از هم جدا می‌شوند. حالا این قطعات در یک ظرف با هم مخلوط هستند و باید بر اساس اختلاف اندازه (معمولاً ژن خارجی کوچک‌تر از پلازمید است) آن‌ها را از هم جدا کنیم.

۲ الکتروفورز یعنی تفکیک کردن با کمک الکتریسته (الکترو: الکتریسیته/ فورز: حمل‌کردن). ژل الکتروفورز، مستطیلی ژلاتینی و دارای منافذ بسیار ریز است. در بالای ژل، فرورفتگی‌ها و چاله‌هایی (چاهک‌ها) هست که نمونه‌ها (DNA و پروتئین‌ها) را در آن قرار می‌دهند. در بالای ژل، الکترود منفی و در پایین آن الکترود مثبت را قرار می‌دهند. یک باتری به این دو الکترود وصل می‌شود و بین الکترود مثبت و منفی یک میدان الکتریکی به‌وجود می‌آید. نمونه‌های DNA یا پروتئین را در چاهک‌ها می‌ریزند و این مولکول‌ها بر اساس بار الکتریکی یا اندازه یا هر دو تا شروع می‌کنند به حرکت کردن و عبور کردن از منافذ ریز.

نکته چاهک‌ها نزدیک قطب منفی هستند.





۳ خب، قطعات DNA را در چاهک‌ها در قطب منفی قرار می‌دهیم. DNA به‌علت وجود فسفات‌ها بار منفی دارد و تمایل دارد به سمت قطب مثبت حرکت کند. قطعات بزرگ‌تر DNA سنگین‌تر هستند و کندتر از منافذ عبور می‌کنند و سرعت کم‌تری خواهند داشت و به قطب منفی نزدیک‌تر می‌مانند. قطعات کوچک‌تر، سبک‌تر هستند و تندتر حرکت می‌کنند و به قطب مثبت نزدیک‌تر می‌شوند. قطعات هم‌اندازه (چه ۲ تا چه ۱۰۰ تا) به‌علت هم‌اندازه بودن یک سرعت دارند و در کنار هم در ژل می‌ایستند و یک نوار را در ژل تشکیل می‌دهند.

نکته هر چه تعداد نوکلئوتیدهای یک قطعه DNA بیش‌تر باشد و هر چه تعداد پیوندهای فسفودی‌استر آن بیش‌تر باشد، آن قطعه DNA سنگین‌تر خواهد بود و در ژل کندتر حرکت می‌کند در نتیجه به قطب منفی نزدیک‌تر خواهد بود.

۴ ۱۰ تا DNA نوترکیب داریم، بعد از برش با آنزیم محدودکننده‌ی اولیه، آن‌ها را الکتروفورز می‌کنیم چند نوار در ژل دیده می‌شود؟ ۱۰ تا DNA نوترکیب، بعد از برش ۲۰ قطعه ایجاد می‌کند، ۱۰ تا ژن خارجی و ۱۰ تا پلازمید. ۱۰ تا پلازمید کاملاً هم‌اندازه و ۱۰ تا ژن خارجی هم کاملاً هم‌اندازه هستند. پس پلازمیدها با هم در یک نوار و ژن خارجی‌ها هم با هم در یک نوار قرار می‌گیرند. پس کلاً ۲ نوار به وجود می‌آید. ژن خارجی کوچک‌تر از پلازمید است پس نوار ژن خارجی‌ها تندتر حرکت می‌کند و به قطب مثبت نزدیک‌تر خواهد بود. خب حالا اگر ۱۰۰ تا از همان DNA نوترکیب داشته باشیم چه خواهد شد؟ باز هم همان ۲ نوار روی ژل تشکیل خواهد شد، اما با یک تفاوت خیلی مهم! اگه گفتی! **قطر نوارها** در این‌جا خیلی بیش‌تر خواهد شد چون در مثال قبل هر نوار شامل ۱۰ قطعه DNA بود اما در این‌جا هر نوار شامل ۱۰۰ قطعه DNA هست.

۵ خب، حالا یک سؤال مهم! اساس الکتروفورز DNA و جدا شدن قطعات چیست؟ اندازه‌ی قطعات؟ بار الکتریکی قطعات؟هم‌اندازه و هم بار الکتریکی قطعات؟ دقت کنید این موضوع خارج از کتاب نیست و یک بحث مفهومی‌ست. در الکتروفورز DNA، قطعات فقط بر اساس اندازه جدا می‌شوند نه بر اساس بار الکتریکی. فهمیدنش یه کم سخته! بار الکتریکی هست و خیلی هم مفید است و عامل به‌حرکت درآمدن قطعات DNA از قطب منفی به قطب مثبت است. اما بار الکتریکی عامل جداکردن و تفکیک کردن بین قطعات نیست. چرا؟ چون اگر ۱۰ قطعه DNA **هم‌اندازه** داشته باشیم همه‌ی آن‌ها تشکیل یک نوار می‌دهند و بار الکتریکی نمی‌تواند آن‌ها را از هم جدا کند (این یعنی عامل جداکردن، اندازه است نه بار). درست است که قطعات بزرگ‌تر بار منفی بیش‌تری دارند و کندتر حرکت می‌کنند اما مقدار بار در واحد سطح (چگالی بار) برای همه‌ی قطعات DNA یکسان است و تنها عامل در جداسازی بین قطعات DNA (نه در حرکت کردن قطعه) اختلاف اندازه‌ی قطعات است.

نکته در کتاب می‌خوانیم که در الکتروفورز پروتئین‌ها، قطعات بر اساس اندازه جدا می‌شوند.

نقد کتاب درسی

در کتاب درسی در مورد الکتروفورز پروتئین‌ها چیزی نمی‌خوانیم فقط نوشته شده که در الکتروفورز، پروتئین‌ها بر اساس اندازه جدا می‌شوند. آن وقت در مورد DNA که کلی چیز نوشته است، ننوشته که بر اساس بار جدا نمی‌شوند و فقط بر اساس اندازه جدا می‌شوند (یعنی خودمون باید بعد از کلی فکرکردن بفهمیم!). دقت کنید که بر خلاف الکتروفورز DNA که قطعات فقط بر اساس اندازه جدا می‌شوند، در الکتروفورز پروتئین‌ها، قطعات بر اساس اندازه و بارالکتریکی جدا می‌شوند (که کتاب درسی فقط اندازه‌ی آن را نوشته است). چون چگالی بار در اسیدهای آمینه به‌علت وجود گروه‌های R متفاوت، متفاوت است. یعنی دو پروتئین هم‌اندازه لزوماً روی یک نوار قرار نمی‌گیرند چون به‌علت گروه‌های R متفاوت می‌توانند بار الکتریکی متفاوتی داشته باشند در حالی‌که قطعات DNA هم‌اندازه همیشه بارهای یکسان دارند و حتماً در یک نوار قرار می‌گیرند.

۶ این‌جا آخر خط است! نواری روی ژل الکتروفورز هست که از تعداد زیادی ژن خارجی که ما می‌خواستیم تشکیل شده است. اگر یادتان باشد گفتیم یکی از اهداف اصلی مهندسی ژنتیک تولید ژن‌های مورد نظر در مقادیر انبوه است.

پلازمیدهای نوترکیب را در این مرحله به کمک محدودکننده می‌بریم و قطعات حاصل را الکتروفورز می‌کنیم. به لیگاز نیازی نیست.

۲۵- گزینه «۲»

۲۶- گزینه «۴» در الکتروفورز DNA، مولکول‌ها کلاً به سمت قطب مثبت حرکت می‌کنند. چون بارشان منفی است. مولکول‌های کوچک‌تر سریع‌تر از منافذ رد می‌شوند پس زودتر به قطب مثبت می‌توانند برسند.