

فناوری های نوین زیستی



مقدمه

پلاستیک قابل تجزیه زیستی

اهمیت: حفظ محیط زیست و استفاده از آن راهکاری برای پیشگیری از مصرف بی رویه پلاستیک غیر قابل تجزیه

با استفاده از زیست فناوری: تولید پلاستیک های قابل تجزیه با صرف هزینه کمتر

روش تولید پلاستیک قابل تجزیه: وارد کردن ژن های تولیدکننده بسیاری از این نوع مواد از باکتری به گیاه (در این روش جاندار تغییر یافته گیاه است)

زیست فناوری و مهندسی ژنتیک

جهش در یک ژن و تغییر در محصول آن (رنا یا پروتئین) منجر به بروز بیماری می شود. مثال: بیماری کم خونی داسی شکل، بیماری هموفیلی

(اختلال در عملکرد و مقدار عوامل موثر در انعقاد خون مثل فاکتور انعقادی شماره ۸)

افزایش نیاز به این ترکیبات ← مشکل در تامین نیاز دارویی

استفاده از روش های زیست فناوری و مهندسی ژنتیک ایجاد تحولات مهمی در زمینه تولید این محصولات داشته است

تا چندی پیش انتقال ژن انسان به داخل یاخته های سایر موجودات زنده و یا استفاده از باکتری برای ساختن پروتئین های انسانی غیرقابل تصور بود. اکنون روش های لازم برای رسیدن به این هدف **توسعه** زیادی پیدا کرده و **کاربرد** فراوانی دارد.

در ادامه می خواهیم ببینیم برای رسیدن به این هدف چه مراحل را باید دنبال کرد(روش کار) و به چه ابزار هایی نیاز داریم (ابزارها و مواد لازم)

زیست فناوری (Biotechnology) چیست؟

تعریف: به طور کلی به هرگونه فعالیت هوشمندانه آدمی در **تولید** و **بهبود** محصولات گوناگون **با استفاده از موجود زنده** زیست فناوری گویند.

زیست فناوری قلمرو بسیار گسترده دارد و شامل روشهای زیر است:

(۱) مهندسی ژنتیک (۲) مهندسی پروتئین (۳) مهندسی بافت

زیست فناوری از گرایش های علمی متعددی مانند موارد زیر استفاده می کند:

(۱) علوم زیستی (۲) فیزیک (۳) ریاضیات (۴) علوم مهندسی

کاربردهای فراوان زیست فناوری باعث شده تا آن را به نشانه پیشرفت کشورها در قرن حاضر و به یکی از ابزارهای مهم برای تامین نیازهای متنوع تبدیل کرده است.

تاریخچه زیست فناوری

۱- دوره زیست فناوری سنتی: تولید محصولات تخمیری مثل نان و سرکه و فراورده های لبنی با استفاده از فناوری زیستی.

۲- دوره زیست فناوری کلاسیک: تولید موادی چون پادزیست ها، آنزیم ها و مواد غذایی با استفاده از روش های تخمیر و کشت میکروارگانیسم ها

۳- دوره زیست فناوری نوین: این دوره با انتقال ژن از یک ریزاندامگان به ریزاندامگان دیگر آغاز شد.

دانشمندان توانستند با تغییر و اصلاح خصوصیات ریزاندامگان ها ترکیبات جدید را با مقادیر بیشتر و کارایی بیشتر تولید کنند.

مهندسی ژنتیک

یکی از روشهای موثر در زیست فناوری است.

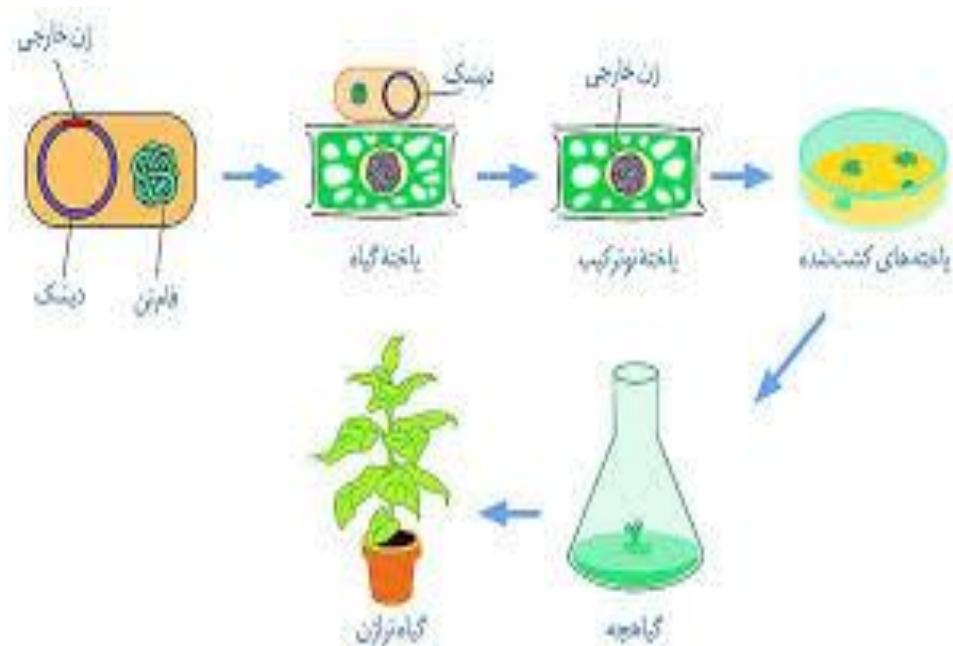
روش مهندسی ژنتیک: در این روش قطعه ای از دنا ی یک یاخته توسط ناقل (وکتور) به یاخته دیگر (همان گونه یا گونه دیگر) منتقل می شود.

سلول دریافت کننده دنا دچار **دست ورزی ژنتیکی** شده و دارای صفات **جدید** است.

جاندار تراژن یا تغییر یافته ژنتیکی: جاندار ی که از طریق مهندسی ژنتیک دارای ترکیب جدیدی از مواد ژنتیکی شده است.

این روش با **باکتری اشرشیا کلی** شروع شد اما بعدا گیاهان و جانوران نیز تحت دست ورزی ژنتیکی قرار گرفتند.(مثلا گیاهان زراعی)

مراحل ایجاد گیاهان تراژنی از طریق مهندسی ژنتیک



۱- تعیین صفت یا صفات مطلوب

۲- استخراج ژن یا ژنهای صفت مورد نظر

۳- آماده سازی و انتقال ژن به گیاه

۴- تولید گیاه تراژنی

۵- بررسی دقیق ایمنی زیستی و اثبات بی خطر بودن برای سلامت انسان

۶- تکثیر و کشت گیاه تراژنی با رعایت اصول ایمنی زیستی

مراحل مهندسی ژنتیک

یکی از اهداف مهندسی ژنتیک: تولید انبوه ژن و فراورده های آن (رنا یا پروتئین)

همسانه سازی دنا (DNA Cloning) : جداسازی یک یا چند ژن و تکثیر آنها

روش: در همسانه سازی دنا ماده وراثتی با ابزارهای مختلف در خارج از یاخته تهیه و به وسیله ناقل همسانه سازی به درون ژنوم میزبان منتقل می شود.

هدف: تولید مقدار زیادی از دناي خالص است که می تواند برای (۱) **دست ورزی**،

(۲) **تولید یک ماده بخصوص و (۳) یا مطالعه** مورد استفاده قرار گیرد

جداسازی قطعه ای از دنا

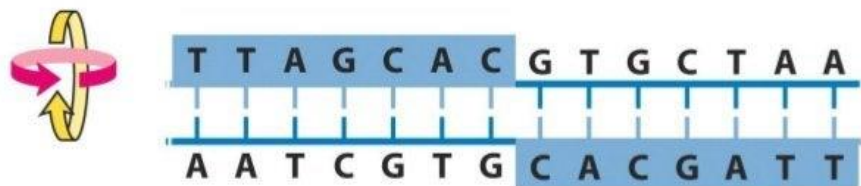
Restrictive enzymes آنزیم های برش دهنده

منشاء: این آنزیم ها در باکتری ها وجود دارند و جزء سامانه دفاعی آنها است به این صورت که اسید نوکلئیک ویروس مهاجم (باکتریوفاژ) را قطعه قطعه می کند.

نام گذاری براساس گونه باکتری که از آن گرفته شده انجام می شود (مثلا آنزیم $EcoR$ از باکتری اشرشیاکلی گرفته شده است).

این آنزیمها مولکول دنا را از محل های خاصی برش می زند که در این محلها یک توالی معکوس در دنا دیده می شود.

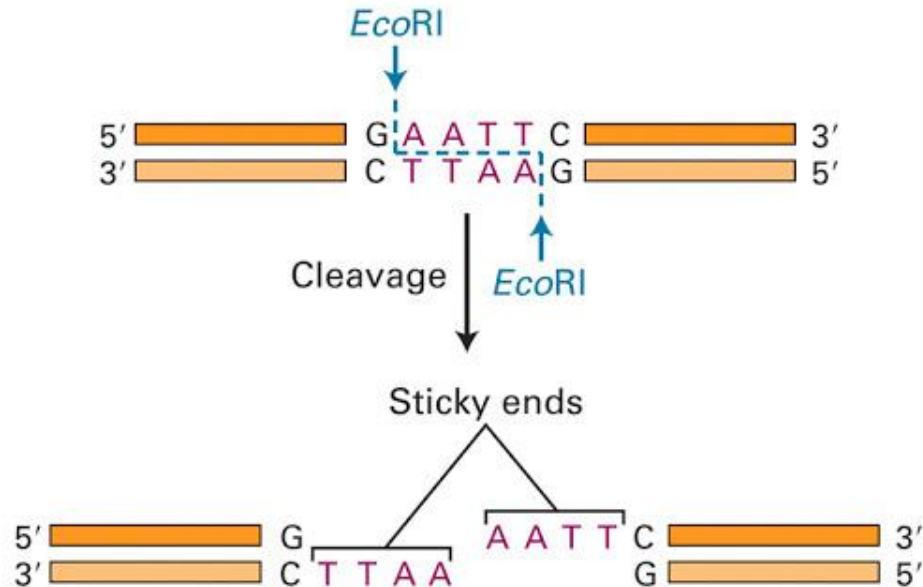
Palindrome



آنزیم **EcoR¹** توالی نوکلئوتیدی را در محل خاصی برش می زند که شش جفت نوکلئوتید در این محل وجود دارد به این توالی جایگاه تخیص آنزیم **EcoR¹** می گویند. در این توالی نوکلئوتیدهای هر دو رشته از دو سمت مخالف یکسان خوانده می شود.

جایگاه شکست بین **G** و **A** است.

نتیجه: ایجاد انتهای چسبنده است.



انتهای چسبنده چیست؟

در نتیجه برش زدن آنزیم محدود کننده پیوندهای فسفودی استر بی دو جفت نوکلئوتید و پیوند هیدروژنی بین چهار جفت نوکلئوتید می شکند و یک رشته دنا بلندتر و یکی کوتاهتر است که به آن انتهای چسبنده می گویند.

چرا انتهای چسبنده می گویند؟

چون می تواند به یک دناى تک رشته مکمل خود با پیوند هیدروژنى بچسبد.

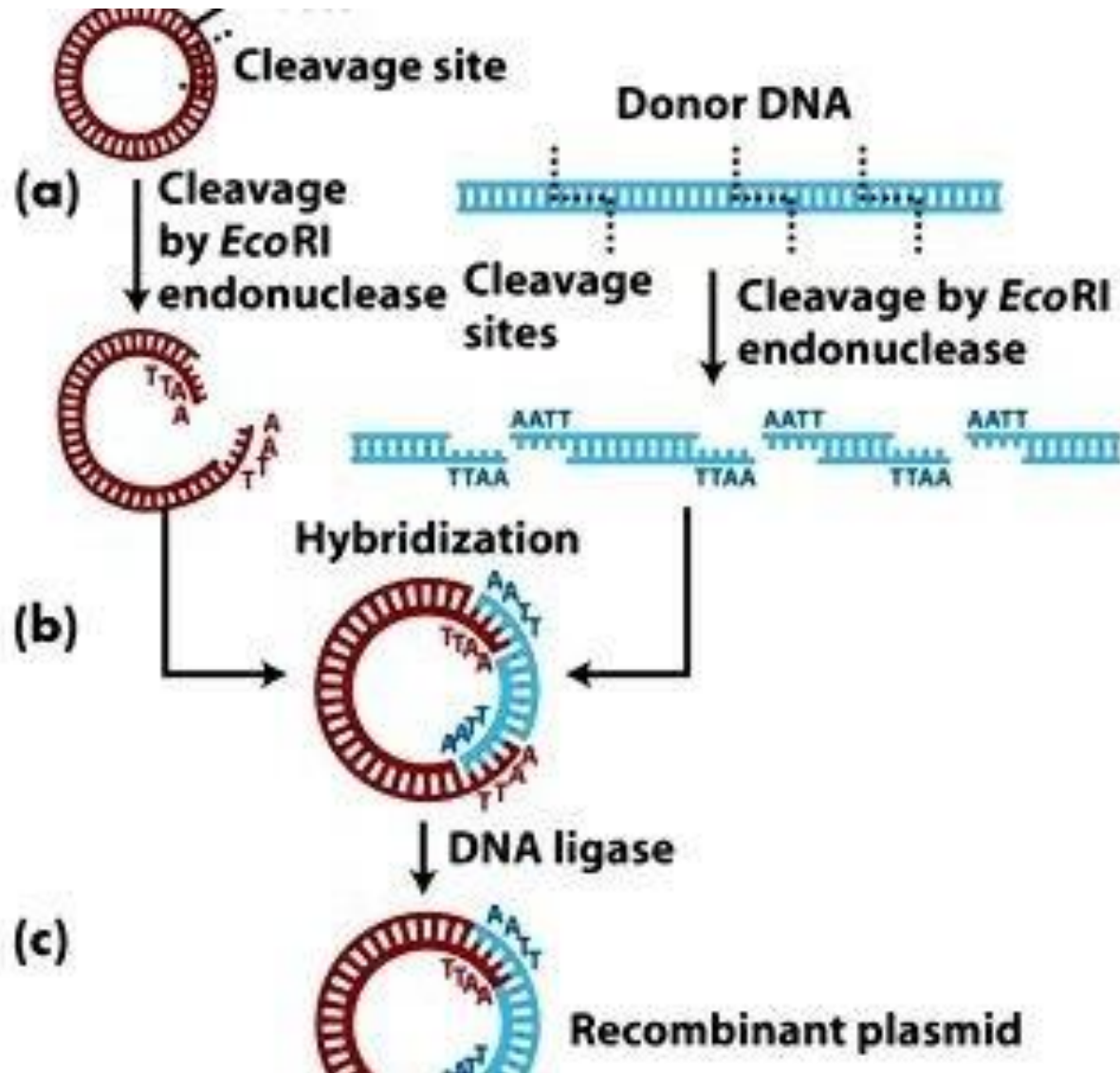
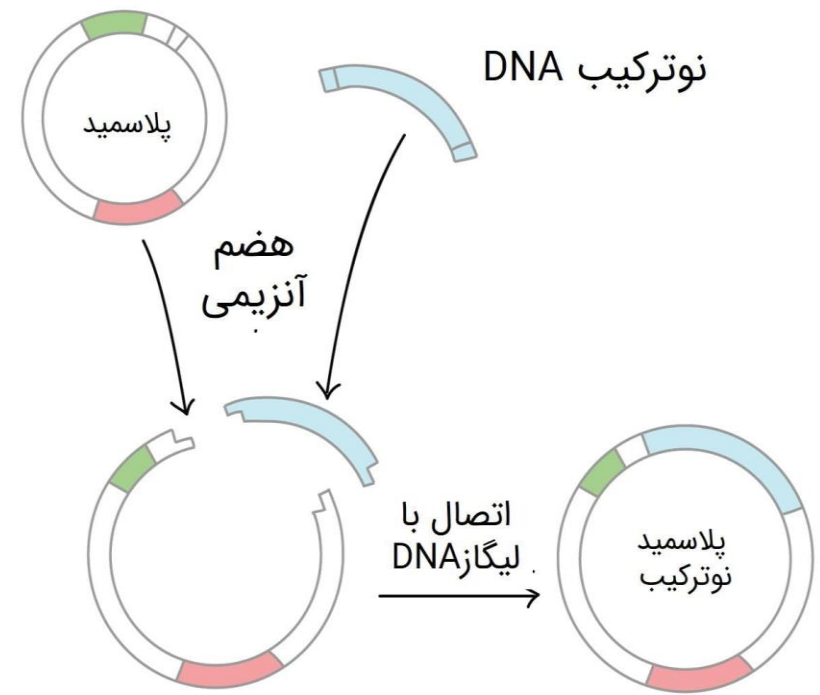
اتصال قطعه دنا به ناقل و تشکیل دناى نو ترکیب (Recombinant DNA)

ناقل همسانه سازی (وکتور) چیست؟ یک مولکول دنا است که می تواند مولکول دناى مورد نظر ما را به داخل سلول مورد نظر (میزبان) حمل کند.

از چه ابزارهایی به عنوان وکتور استفاده می شود؟

- (۱) پلازمید (دیسک): یک دناى حلقوى کوچک است که در باکتری ها و بعضی قارچ ها مثل مخمرها وجود دارد و مستقل از دناى اصلی همانند سازی کرده و صفاتی ایجاد می کند که در کروموزوم اصلی وجود ندارد مثلاً مقاومت به آنتی بیوتیک.
- (۲) باکتریوفاز: ویروس های آلوده کننده باکتری ها که ماده وراثتی خود را داخل باکتری تکثیر می کنند. می تواند

مراحل ایجاد دناي نو ترکیب



برای وارد کردن دنای خارجی به پلازمید لازم است که پلازمید را نیز برش بزنیم.
برای این کار از همان آنزیم محدود کننده ای استفاده می کنیم که برای جدا کردن
ژن خارجی استفاده کرده ایم.

علت: برای این که انتهای چسبنده ایجاد شده مشابه باشد و بین آنها پیوند هیدروژنی
برقرار شود.

بهتر است دیسک **یک** جایگاه تشخیص برای آنزیم داشته باشد در این صورت با اثر
آنزیم **EcoR^۱** تبدیل به یک **دنا** **خطی** می شود که دو انتهای چسبنده دارد. (چرا؟)
حالا لازم است از یک آنزیم **لیگاز** استفاده کنیم تا بین دنای خارجی و دیسک پیوند
فسفودی استر برقرار شود.

در تولید دنای نو ترکیب ابتدا پیوند هیدروژنی بدون کمک آنزیم تشکیل شده و سپس پیوند فسفودی استر با کمک **لیگاز** ایجاد می شود.

از شش جفت نوکلئوتید موجود در جایگاه تشخیص آنزیم **EcoR** فقط ۴ جفت در تشکیل انتهای چسبنده شرکت می کنند.

به تعداد جایگاه های تشخیص آنزیم محدود کننده در دنای حلقوی قطعه ایجاد می شود ولی در دنای خطی تعداد قطعات ایجاد شده **یکی بیشتر** است.

در هر جایگاه تشخیص آنزیم **EcoR** تعداد پیوندهای شکسته شده عبارتست

EcoR I



از ۲ پیوند فسفودی استر و ۸ پیوند هیدروژنی

وارد کردن دنای نوترکیب به یاخته میزبان

در این مرحله باید دنای نوترکیب را به سلول میزبان (مثلا باکتری) وارد کنیم.

چگونه در دیواره سلولی باکتری منافذ ایجاد کنیم؟

(۱) شوک حرارتی همراه با مواد شیمیایی

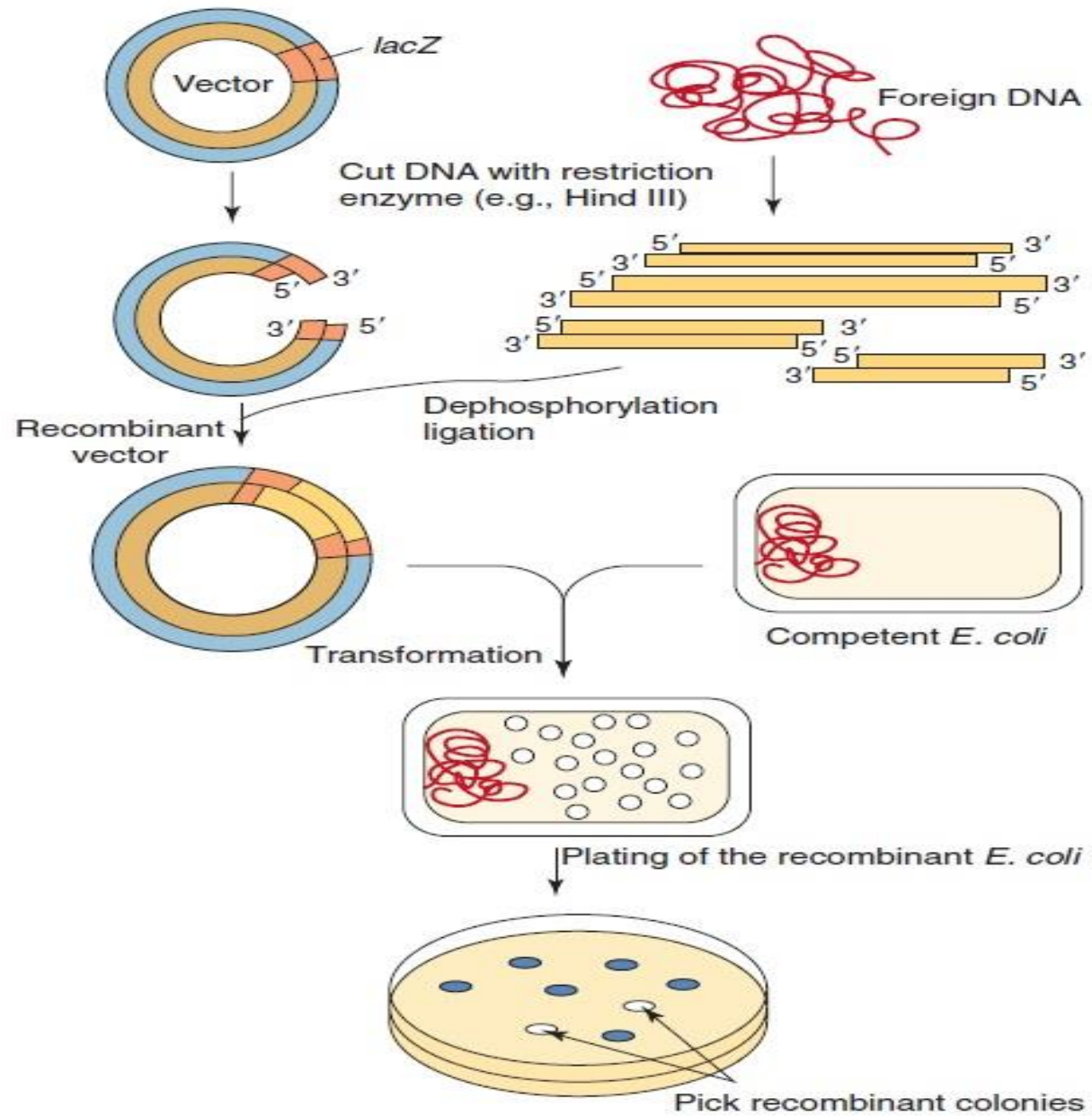
(۲) شوک الکتریکی

همه باکتری ها دنای نوترکیب را دریافت نمی کنند.

جداسازی یاخته های تراژنی (غربالگری)

در این مرحله **غربالگری** داریم یعنی جدا کردن باکتری هایی که دنای نوترکیب را جذب کرده اند از آنهایی که جذب نکرده اند. برای این کار از آنتی بیوتیک (پادزیست) استفاده می کنیم. اگر پلازمید مورد نظر ژن مقاومت به آمپی سیلین را داشته است هر باکتری که پلازمید را دریافت کرده نسبت به آمپی سیلین مقاوم است.

باکتری هایی که دنای نوترکیب را ندارند نسبت به پادزیست **حساس** هستند.



مرحله تکثیر دنای نو ترکیب

در شرایط مناسب، باکتری های تراژنی به سرعت تکثیر می شوند.

از دناهای نو ترکیب به طور مستقل از کروموزوم اصلی باکتری نسخه های زیادی تولید می شود که در نتیجه آن دناهای خارجی هم (که داخل دناهای نو ترکیب است) به سرعت تکثیر می شود.

بنابراین تعداد زیادی دناهای خارجی فراهم می شود که برای تولید فراورده یا استخراج ژن می توان از آن استفاده کرد.

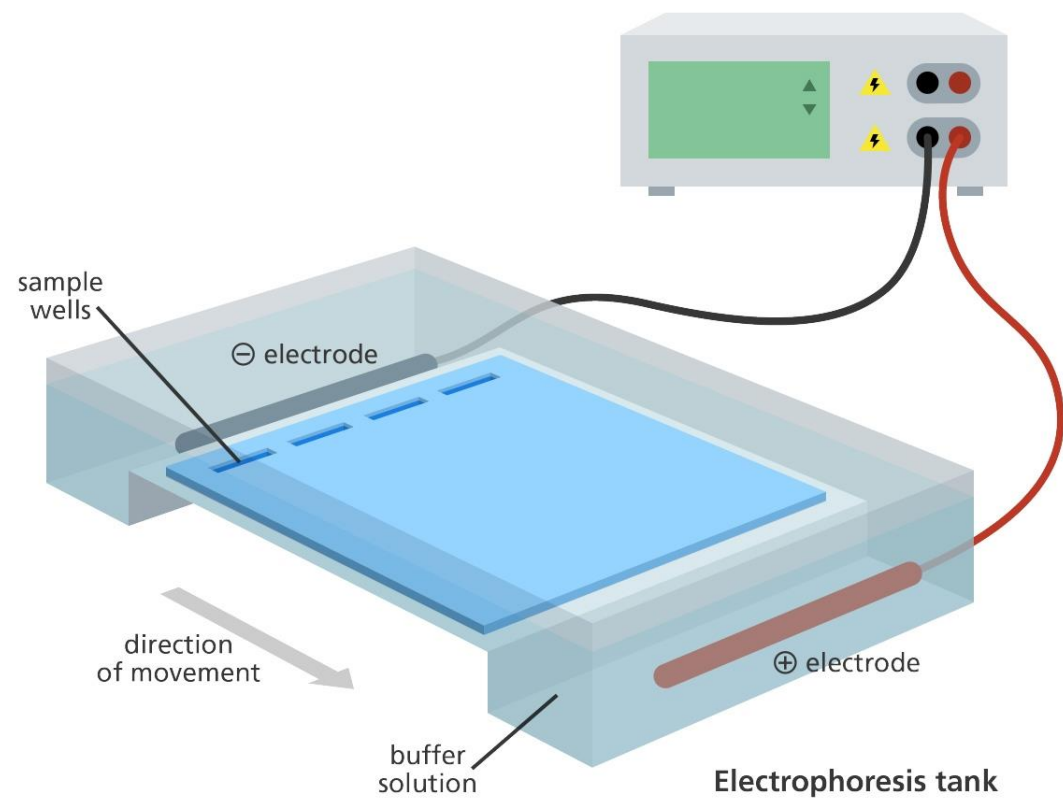
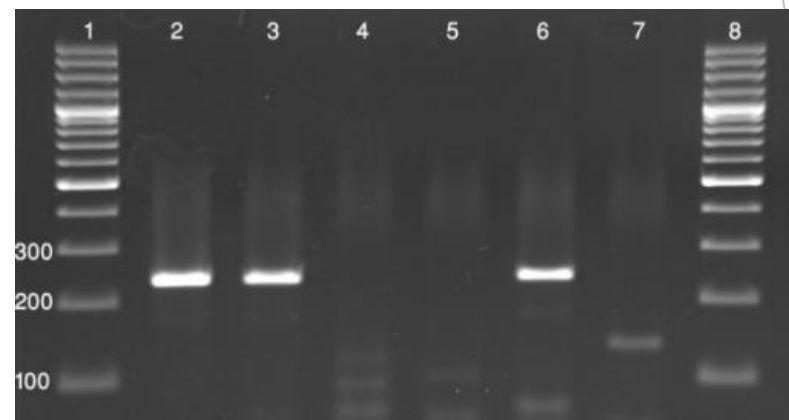
جداسازی دمای خارجی از پلازمید

برای جدا کردن دمای خارجی از پلازمید دوباره باید از همان آنزیم محدود کننده ای استفاده کرد که در ابتدا استفاده کردیم. (برای جدا شدن درست دمای خارجی از پلازمید)

در این مرحله می توانیم از روشهایی چون الکتروفورز بر روی ژل دمای خارجی را از پلازمید جدا کنیم چون وزن این دو قطعه باهم متفاوت است.

در روش ژل الکتروفورز قطعات دنا با وزنهای مختلف در یک میدان الکتریکی از هم جدا می شوند.

Power supply



امروزه با پیشرفت روشهای مهندسی ژنتیک می توان سلول هایی چون
مخمر، سلولهای جانوری و گیاهی را تغییر داد
مولکولهای دنا یا فراورده های آنها که رنا و یا پروتئین است برای اهداف
گوناگون علمی و کاربردی استفاده می شود.