فناوری های نوین زیستی

گفتار ۱ : زیست فناوری و مهندسی ژنتیک

زیست فناوری (بیوتکنولوژی)

هر گونه فعالیت هوشمندانه انسان در تولید و بهبود محصولات گوناگون با استفاده از موجود زنده.

انواع روشهای زیست فناوری :

۱- مهندسی ژنتیک

۲- مهندسی پروتئین

۳- مهندسی بافت

در زیست فناوری از انواع علوم مانند علوم زیستی، فیزیک، ریاضیات و علوم مهندسی استفاده می شود.

تاریخچه زیست فناوری :

۱- زیست فناوری سنتی : تولید محصولات تخمیری (سرکه ، نان ، فرآورده های لبنی) با استفاده از فرآیند های زیستی

۲- زیست فناوری کلاسیک : استفاده از روشهای تخمیری و کشت میکروارگانیسم ها (ریزاندامگان) برای تولید مواد گوناگون (پادزیست ها ، آنزیم ها و مواد غذایی)

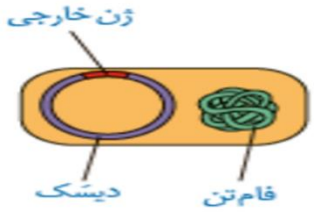
۳- زیست فناوری نوین : انتقال ژن از یک ریزاندامگان به ریزاندامگان دیگر و تغییر و اصلاح خصوصیات آنها برای تولید ترکیبات جدید با مقادیر بیشتر و کارایی بالاتر

مهندسی ژنتیک :

انتقال قطعه ای از DNA یک یاخته توسط ناقل به یاخته ای دیگر

نکته : انتقال قطعات DNA بوسیله ناقل انجام می شود و ماده وراثتی خودش منقل نمی شود.

نکته : یاخته دریافت کننده قطعه DNA ، دچار دست ورزی ژنتیکی شده و در آن صفت جدیدی بوجود می آید.



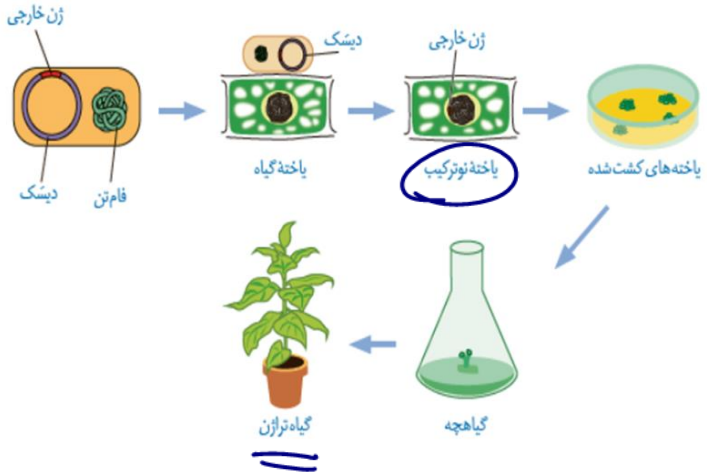
جاندار تراژنی(تغییر یافته ژنتیکی) :

جانداری که از طریق مهندسی ژنتیک دارای ترکیب جدیدی از مواد ژنتیکی شده.

نکته : در بدن جانداران تراژن حداقل دو نوع DNA وجود دارد.(DNA جاندار اولیه + DNA جاندار دیگر)

نکته : اولین جاندارانی که دست ورزی شدند ، باکتری ها بودند و بعد از آنها سایر جانداران (مانند گیاهان و جانوران) دست ورزی شدند.

مراحل ایجاد گیاهان زراعی تراژنی :



۱- تعیین صفت یا صفات مطلوب

۲- استخراج ژن یا ژن های صفت مورد نظر

۳- آماده سازی و انتقال ژن به گیاه

٤- تولید گیاه تراژنی

٥- بررسی دقیق ایمنی زیستی

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

اهداف مهندسی ژنتیک

۱- تولید انبوه ژن

۲- تولید فرآورده های آن ژن

نکته : در بعضی موارد ممکن است هر دو هدف مهندسی ژنتیک مدنظر باشد.

همسانه سازی(کلون کردن) DNA : جداسازی یک یا چند ژن و تکثیر آنها

نکته : برای تولید انبوه ژن از روش همسانه سازی استفاده می شود.

هدف همسانه سازی : تولید مقادیر زیادی از DNAخالص که می توان برای دست ورزی ، تولید یک ماده خالص و یا مطالعه ، مورد استفاده قرار داد.

نکته : برای همسانه سازی ، DNA تولید شده به روش های مختلف ، بوسیله یک ناقل همسانه سازی به سلول میزبان وارد و به ژنوم آن وارد می شود.

مواد مورد نیاز برای انجام مهندسی ژنتیک

۱- آنزیم های برش دهنده :

انواعی از آنزیم ها که توالی های نوکلئوتیدی خاصی را در DNAشناسایی و درون آن را برش می زنند. (جایگاه تشخیص آنزیم)

نکته : آنزیم های برش دهنده در باکتری ها وجود دارند و قسمتی از سامانهٔ دفاعی آنها محسوب می شوند.

جایگاه تشخیص آنزیم :

توالی های نوکلئوتیدی خاصی در DNA، که بوسیله آنزیم های برش دهنده شناسایی و درون آنها برش می‌خورد.(یعنی پیوند فسفودی‌استر شکسته می‌شود)

نکته : ویژگی توالی نوکلئوتیدها در جایگاه تشخیص این است که توالی هر دو رشته DNA، از دوسمت مخالف ، یکسان خوانده شود.

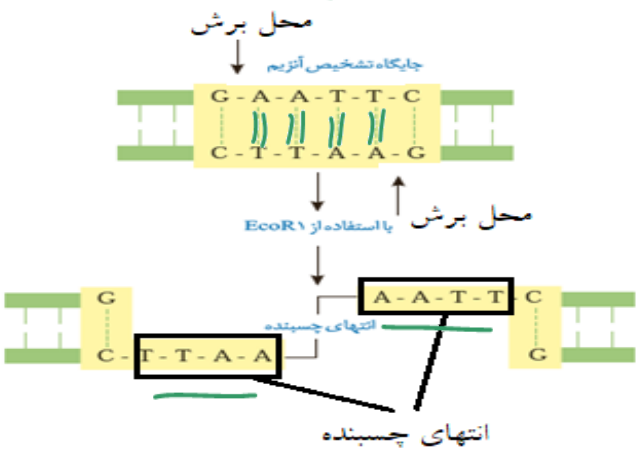
مثال : جایگاه تشخیص در آنزیم ECOR1 به شکل مقابل است.

GAATTC
CTTAAG

نکته : منظور از برش ، شکستن پیوند فسفودی استر است.

انتهای چسبنده : انتهای مولکول DNA که بر اثر برش آنزیم ، یک رشته آن بلندتر از رشته مقابل است.(در واقع انتهای چسبنده ، بخش تک رشته ای DNA است)

نکته : در محل برش آنزیم در جایگاه تشخیص ، علاوه بر پیوند فسفودی استر ، پیوند هیدروژنی بین دو رشته DNA شکسته شود.



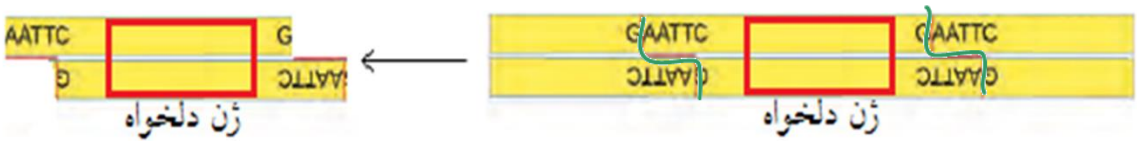
نکته : بر اثر عمل آنزیم ECOR1 دو پیوندفسفودی‌استر و هشت پیوند هیدروژنی شکسته می‌شود.

نکته : در هر محل برش یک آنزیم ، ۲ انتهای چسبنده تولید می شود.

آنزیم Eco R1 توالی شش جفت نوکلئوتیدی GAATTC / CTTAAG را شناسایی و بین A و G در هر رشته را برش می زند.

نکته : انتهای چسبنده تولید شده بوسیله آنزیم Eco R1 دارای ٤ عدد (دقت : نه جفت) نوکلئوتید می‌باشد.

نکته : آنزیم برش دهنده مناسب برای مهندسی ژنتیک نباید درون ژن مورد نظر دارای جایگاه تشخیص نباشد تا ژن موردنظر به قطعات کوچک خرد نشود.



۲- ناقلین DNA

توالی هایی از DNA که در خارج ازکروموزوم (فام تن) اصلی بوده و دارای تکثیر مستقل از آن می باشند.

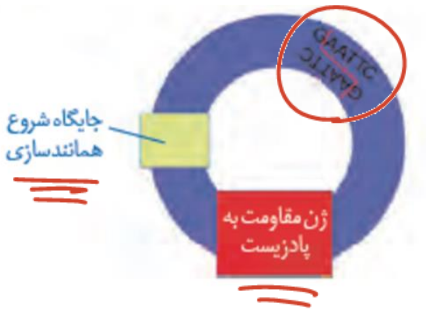
دیسک ها و باکتریوفاژها از انواع ناقلین هستند.

دیسک (پلازمید) حلقوی باکتری ها : یک مولکول DNA دو رشته ای و خارج کروموزومی است که معمولاً درون باکتریها و بعضی قارچها (مخمرها) وجود دارد.

نکته : دیسک ها از مهم ترین انواع ناقلین و پرکاربرد ترین آنها می باشند.

دیسک ها کروموزوم های کمکی می باشند ، زیرا دارای ژنهایی هستند که در کروموزوم اصلی باکتری وجود ندارد.

ویژگی های دیسک مناسب برای مهندسی ژنتیک :



۱- باید فقط یک جایگاه تشخیص برای آنزیم برش دهنده باشد.

۲- دارای ژن مقاومت به یک نوع آنتی بیوتیک (پادزیست) باشد.

۳- بهتر است که فقط یک جایگاه شروع همانندسازی داشته باشد.

نکته : دیسک ها دارای توانایی همانندسازی مستقل از کروموزوم اصلی باکتری هستند.

نکته : ژن مقاومت به آنتی بیوتیک (پادزیست) به باکتری توانایی می دهد تا پادزیست ها را به مواد غیرکشنده و قابل استفاده تبدیل کند.(از توانایی این ژن در مرحله جاسازی استفاده می شود.)

نکته : ویروسها نیز یکی از انواع ناقلین DNA می‌باشند که برای انتقال ژن به درون یاخته ها مورد استفاده قرار می‌گیرند.

گروه باکتریوفاژها

۳- آنزیم های اتصال دهنده

انواعی از آنزیم ها که با ایجاد پیوند فسفودی‌استر باعث اتصال قطعات DNA به هم می‌شوند.

آنزیم لیگاز: نوعی آنزیم است که بین دو انتهای مکمل ایجاد پیوند فسفودی استر می کند.

دقت : آنزیم لیگاز از مهم‌ترین آنزیم های اتصال دهنده است که کاربرد زیادی در مهندسی ژنتیک دارد.

نکته : در مهندسی ژنتیک از مواد و دستگاه‌های زیادی استفاده می‌شود که موارد بالا از جمله مهم‌ترین آنها هستند.

مراحل مهندسی ژنتیک

۱- جداسازی قطعه ای از DNA (ژن مطلوب)

۲- اتصال قطعه DNA به ناقل و تولید DNA نوترکیب

۳- وارد کردن DNA نوترکیب به یاخته میزبان

٤- جداسازی یاخته های تراژن

۱- جداسازی قطعه DNA مطلوب

الف) بررسی و انتخاب ژن دلخواه جهت انتقال

ب) انتخاب آنزیم برش دهنده مناسب که درون ژن دلخواه جایگاه تشخیص نداشته باشد و دارای جایگاه‌های تشخیص قبل و بعد از ژن دلخواه در ساختار DNA باشد.

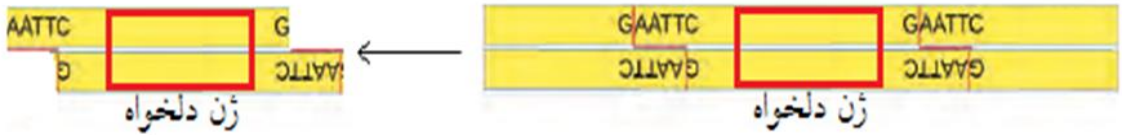
نکته : باید در انتخاب آنزیم مناسب دقت شود چون در تمامی مراحل دیگر نیز از همین آنزیم باید استفاده شود.

ج) قرار دادن DNA در معرض آنزیم برش دهنده تا آنزیم جایگاه های قبل و بعد ژن را برش دهد و ژن دلخواه را از درون DNA جدا کند.

نکته : در اثر عمل آنزیم در این مرحله ، در مجموع ٤ پیوند فسفودی‌استر برای جداسازی ژن دلخواه شکسته می‌شود.

دقت : در هر محل برش آنزیم در جایگاه تشخیص ، علاوه بر پیوند فسفودی استر ، پیوندهای هیدروژنی بین دو رشته DNA نیز شکسته می‌شود.

نکته : در هر محل برش یک آنزیم ، ۲ انتهای چسبنده تولید می شود.



د) پس از استفاده از آنزیم های برش دهنده، ژن دلخواه که قطعه DNA کوچکی است را با روش های خاصی جدا می کنند و تشخیص می دهند.

۲- اتصال DNA به ناقل و تولید DNA نوترکیب

الف) انتخاب یک ناقل(دیسک یا ویروس) مناسب بر اساس نوع ژن و آنزیم برش دهنده مصرف شده در مرحله قبل

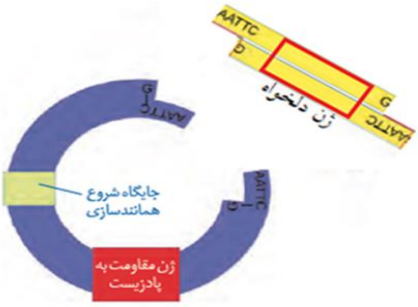
ب) قراردادن ناقل(دیسک) در معرض آنزیم برش دهنده جهت ایجاد برش و تولید انتهای چسبنده

نکته : آنزیم Eco R1 هنگام شکستن درون جایگاه تشخیص باعث شکسته شدن هشت پیوند هیدروژنی میشود.

نکته : چون دیسک دارای یک جایگاه تشخیص آنزیم است ، پس فقط از ۲ محل پیوند فسفودی‌استر می‌خورد و تکه تکه نمی شود و به حالت خطی در می‌آید.

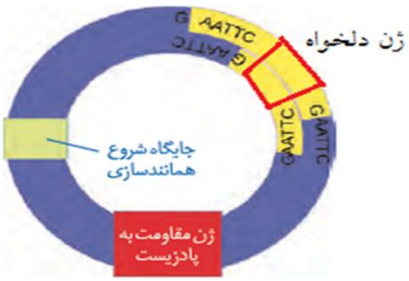
ج) قرار دادن قطعه DNA مورد نظر(ژن دلخواه) کنار DNA ناقل(دیسک برش خورده) ، باعث می شود تا انتهاهای چسبیده این دو DNA ، بوسیله پیوند هیدروژنی در مجاورت هم قرار می گیرند.

نکته : اگر آنزیم ECOR1 استفاده شده باشد در این مرحله ۱۶ پیوند هیدروژنی ایجاد می شود.

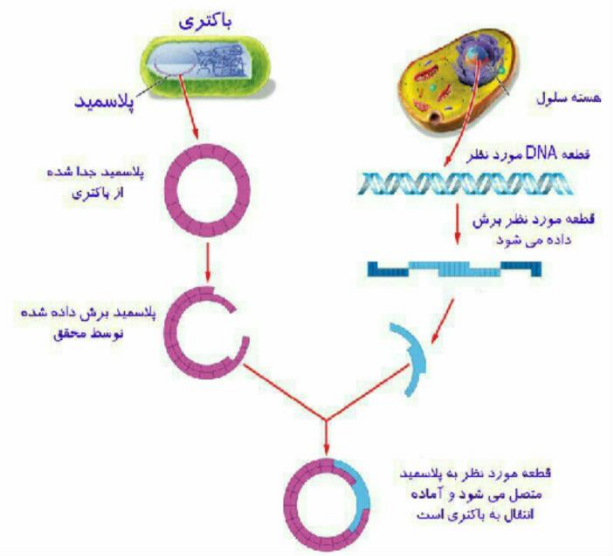


د) پس از قرارگیری DNA مورد نظر و DNA ناقل بوسیله پیوند هیدروژنی در کنار هم ، با وارد کردن آنزیم لیگاز و ایجاد پیوند فسفودی استر ، این دو قطعه DNA را به هم متصل می کند

دقت: مجموعه DNA جاگذاری شده در DNA ناقل را DNA نوترکیب می گویند.



نکته : آنزیم لیگاز با ایجاد ٤ پیوند فسفودی استر ، DNA نوترکیب را می سازد.



۳- وارد کردن DNA نوترکیب به سلول میزبان

با ایجاد منافذی در دیواره باکتری ، می توان DNA نوترکیب را وارد یاخته باکتری (میزبان) کرد.

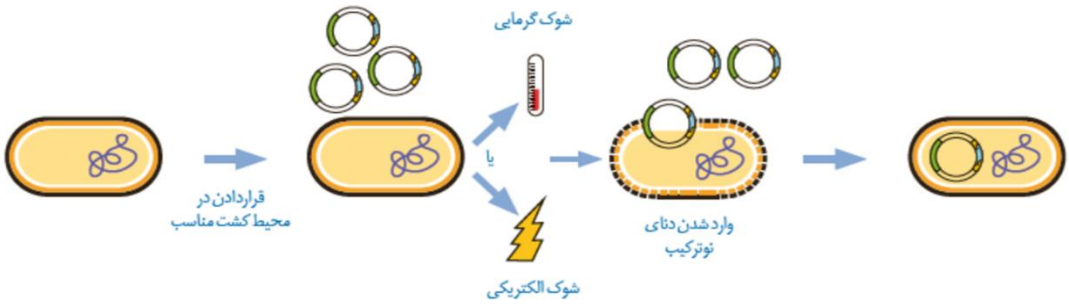
روشهای ایجاد منفذ در دیواره باکتریها :

الف) شوک الکتریکی

ب) شوک حرارتی همراه با مواد شیمیایی

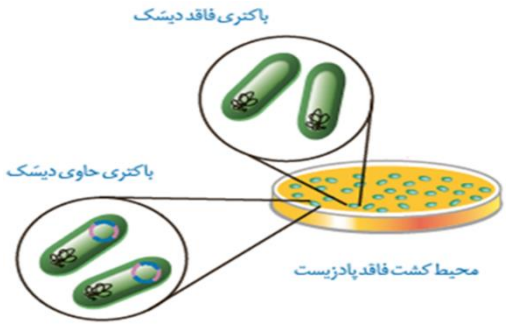
نکته : در هر دو حالت ایجاد منفذ از مواد شیمیایی باید استفاده کرد.

دقت : در مرحله وارد کردن DNA به نوترکیب به یاخته میزبان ، همه باکتری ها ، DNA نوترکیب را دریافت نمی‌کنند بلکه عده‌ای از آنها دریافت می کنند که لازم است از باکتریهایی که DNA نوترکیب را دریافت نکرده اند ، جدا شوند.

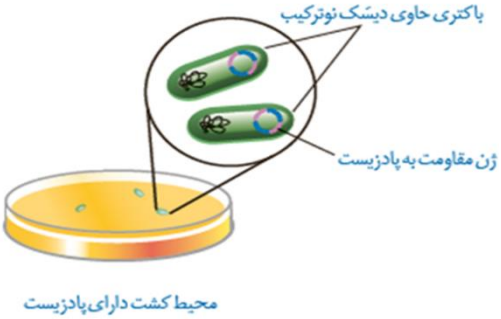


٤- جداسازی یاخته های تراژن(غربالگری)

یکی از روشهای مورد استفاده برای جداسازی سلولهای تراژن از سلولهای غیر تراژن ، قرار دادن تمام باکتریها در محیط کشت حاوی(آنتی بیوتیک) پادزیست است.



باکتریها دارای DNA نوترکیب با توجه به داشتن ژن مقاومت به پادزیست می توانند در محیط کشت حاوی پادزیست زنده بمانند و تکثیر شود و سایر باکتریها که فاقد DNA نوترکیب هستند ، می میرند.



نکته : در تولید مقدار زیادی از DNA خارجی ، علاوه بر تکثیر سریع باکتری های تراژن ، تکثیر DNA نوترکیب به طور مستقل از کروموزوم اصلی هم بسیار موثر است.

از باکتریهای تراژن تکثیر شده می توان برای تولید فرآورده یا استخراج ژن استفاده کرد.

نکته : در مهندسی ژنتیک می توان یاخته هایی مانند مخمرها ، یاخته های گیاهی و حتی جانوری را هم تغییر داد.

گفتار۲ : فناوری مهندسی پروتئین و بافت

مهندسی پروتئین : انجام تغییرات دلخواه در توالی آمینواسیدهای یک پروتئین به منظور تغییر در ویژگی‌های یک پروتئین و بهبود عملکرد آن

نکته : برای مهندسی پروتئین نیاز به شناخت کامل ساختار و عملکرد پروتئین است.

تغییرات انجام شده در مهندسی پروتئین ممکن است جزئی یا کلی باشد.

تغییر جزئی : رمز یک یا چند آمینواسید در مقایسه با پروتئین طبیعی عوض می شود.

تغییرات عمده : برداشتن قسمتی از ژن یک پروتئین تا ترکیب کردن بخشهایی از ژنهای مربوط به پروتئین متفاوت با هم

پروتئین های تغییر شکل یافته به دلیل تغییر شکل فضایی مولکول پروتئین ، در عملکردشان هم تغییر ایجاد میشود.

تغییرات و اصلاحات مفید در مهندسی پروتئین :

۱- افزایش پایداری پروتئین در برابر گرما و تغییر PH

۲- افزایش حداکثری سرعت واکنش

۳- افزایش تمایل آنزیم برای اتصال به پیش ماده

فواید افزایش پایداری پروتئین در برابر گرما :

۱- افزایش سرعت واکنشها ، زیرا در دمای بالاتر سرعت واکنشها افزایش می‌یابد.

۲- کاهش خطر آلودگی میکروبی در محیط واکنش

۳- عدم نیاز به خنک کردن محیط واکنش بویژه برای واکنشهای گرمازا

آمیلازها

آنزیم های گروه آمیلازها در صنایع غذایی ، نساجی و تولید شوینده ها کاربرد دارند.

تولید آمیلازهای مقاوم به گرما ، باعث کاهش زمان واکنش ، صرفه جویی اقتصادی و افزایش بهره صنعتی می‌شود.

نکته : آمیلازهای مقاوم به گرما در باکتری های گرمادوستِ موجود در چشمه های آب گرم یافت می شود.

اینترفرون ها

یادآوری : اینترفرون ها از پروتئین های دومین خط دفاعی در دستگاه ایمنی هستند.

اینترفرون های تولید شده در مهندسی ژنتیک ، به دلیل تشکیل پیوندهای نادرست هنگام ساخته شدن در باکتری ، دارای فعالیت کمتری از نوع طبیعی هستند.

پیوندهای نادرست باعث تغییر شکل مولکول و کاهش فعالیت اینترفرون های تولید شده با مهندسی ژنتیک میشود.

درمهندسی پروتئین با تغییر توالی آمینواسیدهای اینترفرون ، به جای یکی از آمینواسیدها ، آمینواسید دیگری قرار داده شده و این عمل باعث افزایش کارایی پروتئین در حد نوع طبیعی و همچنین افزایش پایداری آن گردید.

دقت : این عمل در واقع با ایجاد یک جهش دگرمعنا در ژن تولیدکننده اینترفرون انجام می‌شود.

پلاسمین

نکته : افزایش پایداری پروتئین در نگهداری طولانی مدت آن به عنوان دارو مهم است.

تشکیل لخته در سرخرگ های شش، مغز و ماهیچه قلب به ترتیب منجر به بسته شدن رگ های شش، سکته مغزی و قلبی می شود که بسیار خطرناک است و می تواند باعث مرگ شود.

آنزیم پلاسمین باعث تجزیه ی لخته های خون و در نتیجه مانع بسته شدن رگهای شش ، سکته مغزی و قلبی می شود.

از پلاسمین به عنوان دارو استفاده می‌شود ولی مدت اثر آن در پلاسما (خوناب) خیلی کوتاه است.

در مهندسی پروتئین با جانشین کردن یک آمینواسید پلاسمین با آمینواسید دیگر ، مدت زمان فعالیت پلاسمایی و اثرات درمانی آن بیشتر می شود.

دقت : این عمل نیز در واقع ایجاد نوعی جهش دگرمعنا در ژن تولیدکننده پلاسمین است.

مهندسی بافت

هدف از مهندسی بافت ، تولید و پیوند اعضا است.

از یاخته های با توانایی تکثیر بالا و تمایز به انواع یاخته های پوستی که در پوست وجود دارد، در مهندسی بافت برای کشت بافت و تولید پوست برای پیوند استفاده می شود.

در روش مهندسی بافت ، با استفاده از تکثیر یاخته های غضروفی در محیط کشت و روی داربست مناسب ، می توان بافت غضروفی برای بازسازی لاله گوش و بینی تولید کرد.

گوش طبیعی — تصویر دیجیتالی گوش — گوش ساخته شده با مهندسی بافت

یاخته های بنیادی و مهندسی بافت

در مهندسی بافت از یاخته های بنیادی جنینی یا یاخته های بنیادی بالغ استفاده می شود.

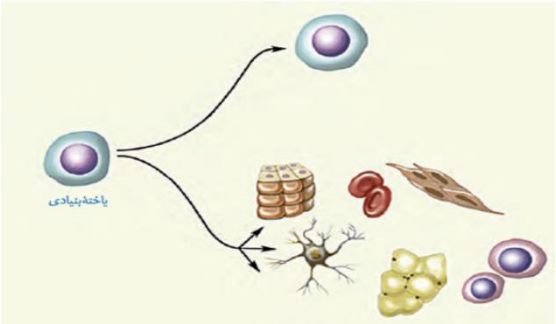
دقت : یاخته های بنیادی توانایی تکثیر و به وجود آوردن یاخته های مشابه خود؛ و نیز توانایی تبدیل شدن به سایر یاخته ها را دارند.

نکته : یاخته های بنیادی جنینی در واقع همان یاخته های توده درونی در مرحله بلاستولا هستند.

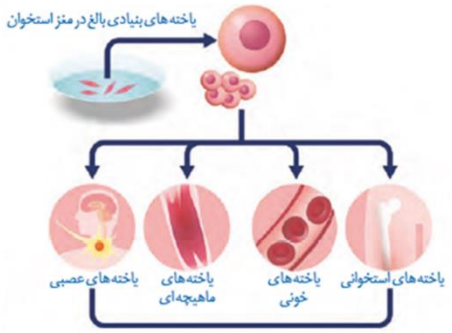
نکته : یاخته های بنیادی دارای توانایی تکثیر و تمایز به انواع یاخته ها هستند.

نکته : سلول های بنیادی بالغ در بافت های مختلف بدن مانند مغز استخوان وجود دارند.

یاخته های بنیادی کبدی می توانند پس از تکثیر و تمایز به سلولهای کبدی و مجاری صفراوی تبدیل شوند.



یاخته های بنیادی مغز استخوان می توانند به رگهای خونی، ماهیچه اسکلتی و قلبی تمایز پیدا کنند.



نکته : یاخته های بنیادی مغز استخوان می توانند به سلولهای استخوانی و نورون هم تمایز یابند.

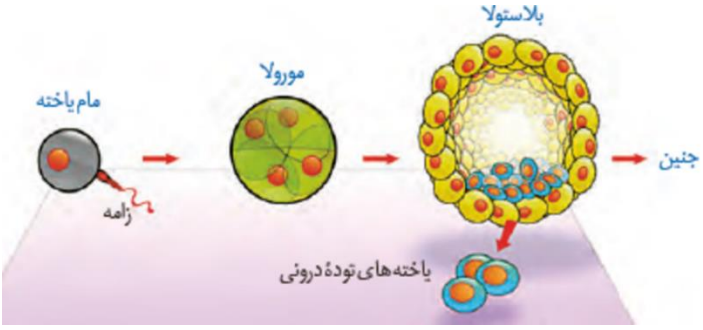
یاخته های بنیادی جنینی در صورت جداسازی در مراحل اولیه جنینی، می توانند یک جنین کامل را تشکیل دهند.

یاخته بنیادی جنینی ، بعد جداسازی و کشت برای تشکیل بسیاری از انواع یاخته می توان استفاده کرد.

نکته : هنوز امکان تبدیل یاخته بنیادی جنینی به همه انواع سلولها وجود ندارد.

نکته : یاخته بنیادی مورولا به انواع یاخته ای جنینی و خارج جنینی (جفت و پرده ها) تمایز می یابند.

نکته : یاخته بنیادی درونی به انواع سلولهای جنینی (نه خارج جنینی) تبدیل می شوند.



بیوانفورماتیک

علمی که در آن با استفاده از مفاهیم زیست شناختی، ریاضی، آمار و علوم رایانه ای، مبنایی برای درک، طبقه‌بندی، مدل سازی و تجزیه و تحلیل داده های زیستی فراهم می‌شود.

کاربردهای مهم

۱- از بیوانفورماتیک در بررسی پروتئین ها در مواردی مانند تعیین توالی، ساختار سه بعدی، پایداری، پیش بینی ساختار و عملکرد پروتئین ها و نیز عوامل مؤثر بر آنها استفاده می‌شود.

۲- از بیوانفورماتیک در بسیاری از پژوهش های زیستی که با حجم زیادی از داده و عوامل متفاوت سروکار دارند، استفاده می شود.

۳- بیوانفورماتیک مسیر شناسایی ژنوم جانداران، درک شباهت ها و تفاوت های ژنی و نیز تشخیص ارتباط بین دنا و پروتئین را ساده می کند.

مثال: ساختن واکسن علیه بیماری کرونا

بیماری کرونا توسط ویروسی از خانواده ویروس های تاجی(کرونا ویروسها) ایجاد می‌شود.

با استفاده بیوانفورماتیک توانستند با استفاده از داده ها ، به فرضیه هایی قابل آزمون در ارتباط با نحوه عملکرد ویروس برسند و به جای بررسی همه فرضیه ها، بتوانند تشخیص دهند که کدام یک از آنها را مورد آزمایش قرار دهند.

دقت : در واقع بیوانفورماتیک علاوه بر کوتاه کردن مسیر تحلیل داده ها، در صرفه جویی در زمان و کاهش هزینه های اقتصادی برای انجام آزمایش ها نیز کمک می‌کند.