دانشگاه تربیت مدرس

ژنتیک ملکولی

Molecular genetic

مجموعه مقالات تحقیقی و سمینارهای پایان ترم ـ درس ژنتیک ملکولی

کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی ـ دانشگاه تربیت مدرس

شامل:

- ✓ تاریخچه ژنتیک HISTORY OF GENETICS
- ✓ اهمیت ژنتیک مولکولی در مهندسی ژنتیک
- ✓ شناسایی و جداسازی کلون حاوی ژن موردنظر
- ✓ انتقال مستقیم ژن به گیاهان
- ✓ مطالعهٔ روش‌های تنظیم بیان ژن
- ✓ خاموشی ژن GENE SILENCING
- ✓ مهندسی کلروپلاست
- ✓ کنترل و نظارت دقیق بر تولید و توزیع ومصرف مواد تراریخته
- ✓ تکنولوژی بازدارنده
- ✓ تصوری از ژنتیک مولکولی در سال ۲۰۵۰
- ✓ تعمیر و اصلاح DNA

Agrisoft.ir
http: //agrisoft. ir

agrisoft.ir

به نام خدا

فهرست مقالات

تاریخچه ژنتیک HISTORY OF GENETICS ۳

اهمیت ژنتیک مولکولی در مهندسی ژنتیک ۴۱

شناسایی و جداسازی کلون حاوی ژن موردنظر ۶۱

انتقال مستقیم ژن به گیاهان ۸۴

مطالعهٔ روش‌های تنظیم بیان ژن ۱۰۱

خاموشی ژن GENE SILENCING ۱۱۳

مهندسی کلروپلاست ۱۱۸

کنترل و نظارت دقیق بر تولید و توزیع ومصرف مواد تراریخته ۱۳۴

تکنولوژی بازدارنده ۱۶۲

تصوری از ژنتیک مولکولی در سال ۲۰۵۰ ..... ۱۶۸

تعمیر و اصلاح DNA ۲۱۹

agrisoft.ir

• **تذکر:** مطالب این جزوه، مربوط به منتخب سمینار پایان ترم دانشجویان کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی می‌باشد تا به عنوان یک منبع فارسی مورد استفاده دانشجویان دانشگاههای دیگر و همچنین ورودی‌های سالهای بعد قرار گیرد. لذا صحت و درستی آنها به عهده گروه اگریسافت نمی‌باشد.

تاریخچه ژنتیک

history of genetics

ن. ویشلقی

مقدمه:

ازنظر تاریخی تنوع بیش از موجودات زنده مانع از کشف اصول واحد در زیست شناسی و به طور اخص در ژنتیک شده است. به طوری که مشخصه قانون‌های اصلی ژنتیک در قرن نوزدهم کشف شده اند و به طور اساسی از اوایل قرن بیستم روابط فیزیکی ارگانیسم‌های زنده و رابطه آنها با نسل بعدی مشخص شدند. البته حائز اهمیت است که اطلاعات کنونی ما بر گرفته از اطلاعات اولیه ایست که سال‌ها پیش به دست آمدند. بسیاری از وقایع تاریخی نشان می‌دهند که در حدود۸۰۰۰-۱۰۰۰سال قبل انسانها به اهلی کردن حیواناتی نظیر اسب و شتر و نوعی سگ از خانواده ولف می‌پرداختند همچنین از حدود ۵۰۰۰ سال پیش کشت گیاهانی چون ذرت وگندم و برنج را شروع کردند. در این زمان انسانها هیچ گونه اطلاعاتی درباره وراثت و نحوه انتقال ژنها نداشتند و بدون آگاهی این کار را انجام می‌دادند به همین خاطر از این دوره به عنوان دوره قبل از تاریخ ژنتیک نام می‌برند. در همین رابطه نیز می‌توان به کتیبه‌ای مربوط به حدود ۴۰۰۰ سال پیش که در آسیا کشف شده اشاره کرد که در آن انسان‌های آن زمان همانند اصلاح گران کنونی به اصلاح نژاد اسب پرداختند ونحوه به ارث رسیدن صفات مطلوب را در این کتیبه حک کردند.

برای سالهای طولانی این تفکر بر اذهان عمومی حاکم بود که انتقال مواد زیستی بین نسل‌ها ضروری نیست و حداقل تا اوایل قرن هجدهم زیست شناسان معتقد بودند که موجود کوچکی به نام " فرد اولیه " می‌تواند به طور خود به خودی از مواد در حال پوسیدن به وجود بیاید، به وجود آمدن خود به خود مگس از فضولات و یا پیدایش موجودات ریز در آبهای ظاهراً تمیز از مثال‌هایی است که باعث تقویت چنین اعتقاداتی می‌شد. دو زیست شناس ایتالیایی به نام‌های ردی (۱۶۲۱-۱۶۹۷) و اسپلانزای (۱۷۲۹-۱۷۹۹) آزمایش‌هایی را برای بررسی این موضوع انجام دادند ردی نشان داد که بدون تخم گذاری مگس روی گوشت، لاروهای مگس به وجود نمی‌آیند واسپلانزای دریافت که اگر مواد آلی در ظروف در بسته به مدت کافی جوشانده شوند، هیچ گونه موجود ریزی در آنها دیده نخواهد شد. قرن هفدهم و هجدهم آغاز مطالعات سیستماتیک یا طبقه بندی موجودات به گونه‌های مختلف بود برطبق گفته لینه (۱۷۷۸-۱۷۰۷) اساس طبقه بندی روی ثبات گونه‌ها بود به

مشخص کرد وآن را نقشه پیوستگی یا نقشه ژنتیکی نامید و درصد نوترکیبی را به عنوان شاخص فاصله بین ژن‌ها مورد استفاده قرار داد.

- در سال ۱۹۱۳ اولین کشت سلولی توسط کارل انجام شد.

در این سال دانشمندی به نام داونپورت کنترل رنگ پوست را به دو ژن نسبت داد ولی امروزه معلوم شده که چهار ژن مسئول کنترل رنگ پوست در انسان است.

- در سال ۱۹۱۵ بریجز برای اولین بار آنیوپلوئیدی را کشف کرد انیوپلوئیدی به معنای تغییر در تعداد کروموزوم‌های همتا که کاهش یا افزایش یک یا چند کروموزوم و نه تمام ژنوم را در بر می‌گیرد. گرچه نقش مهمی در روند تکاملی گیاهان نداشته است ولی کاربرد آن در علومی چون ژنتیک، سیتوژنتیک واصلاح نبات اهمیت ویژه‌ای دارد همان طور که گفته شد بریجز اولین بار در کروموزوم‌های جنسی مگس سرکه انیوپلوئیدی را گزارش کرد او با مقایسه افراد آنیوپلوئید با افراد طبیعی ثابت کرد که ژن‌ها روی کروموزوم‌ها قرار دارند همان طور که گفتیم مورگان و استورت وانت و مولر هم نتایج مشابهی به دست آورده بودند که در این سال به عنوان تائیدی برفرضیه کروزومی ارائه شد.

- رابرتسون در سال ۱۹۱۶جابه جایی رابرتسونی را شناسایی کرد. هم جوشی تمام بازوی یک کروموزوم را در کروموزوم دیگر ترانسلوکاسیون رابرتسونی یا یوسانتریک می‌نامند که عبارت از جابه جایی متقابل دو کروموزوم آکروسانتریک است که در آن گسستگی یک کروموزوم در جلو و نزدیک سانترومروگسستگی کروموزوم دیگر بلافاصله پشت سانترومر آن است کروموزوم کوچکتری که از این راه حاصل می‌شود عمدتا از ماده هتروکروماتیک بی‌اثر اطراف سانترومر تشکیل شده که معمولابدون ژن‌های اساسی است و غالبا گرایش به گم شدن دارد بنابراین یک جابجایی رابرتسونی به کاهش تعداد کروموزوم‌ها می‌انجامد.

- در دهه ۱۹۲۰ اولترا سانتریفوژ تحلیلی به وسیله تئودور سودبرگ ابداع شد. آهنگ رسوب هر ماده در جریان اولتراسانتریفوژکردن، در درجه اول تابع اندازه ودر درجه دوم وابسته به شکل فضایی آن ماده است واحدسرعت رسوب که آنرا برای بزرگداشت سودبرگ باS نشان می‌دهند نمودی از این دو پارامتر است.

- در سال ۱۹۲۳ آلفرد استورت وانت دو فنوتیپ مختلف از حلزون آبی لیمنا را که پیچش صدف در یکی از آنها راست گرد و در دیگری چپ گرد بود را مورد بررسی قرار داد پس از آمیزش این دو نوع فنوتیپ خالص مشاهده کرد که پیچش صدف در نسل F_1تابعی از پیچش صدف در والد مادری است و به نظر می‌رسد که این صفت دارای وراثت مادری است با توجه به این که این جانور دارای وضیعت دو جنسی است و خودگشنی در آن امکان پذیر است استوارت وانت با انجام خود

موتانت E. coli شناسایی شده اند، احتمالاً، بدست آوردن آن آسان است. برای مثال ازمرکز ذخیره یا Stock ژنتیکی E. coli دردانشگاه Yale. این موتانت نمی تواند هیستیدین را بسازد وبنابراین درمحیط کشتی که فاقد آن آمینواسید است نمی تواند زنده بماند. حال ما به کتابخانه خودمان رجوع می‌کنیم. پلاسمیدها دراین کتابخانه حاوی قطعات DNA وارد شده از کروموزم‌های تمام باکتری‌های نرمال می‌باشد. ما یک توده از این موتانت راTransform می‌کنیم: E. coli که نیاز به هیستیدین دارد را با مخلوطی از این پلاسمیدها. وقتی تغییر شکل یافتن یاTransformation در فراوانی کمی رخ می‌دهد، هر سلول E. coli حداکثر یک پلاسمید را دریافت خواهدکردحال ما یک E. coliتغییریافته را بدست آورده‌ایم که توانایی ساخت هیستیدین را داردو ما به راحتی می‌توانیم آن را پیدا کنیم. چون توانایی رشد روی محیط کشت فاقد هیستیدین را دارد. فرض براین است که هر باکتری که حال توانایی ساخت هیستیدن را دارد، باید ژن از دست رفته روی آن پلاسمید جدید را دریافت کرده باشد.

Genetics

Mutant phenotype
↓
Mutant allele
↓
DNA sequence
↓
Protein sequence

به این ترتیب با استفاده از کتابخانهٔ ژنومی و فرآیندTransformation ژنی که مورد نظر مهندسین ژنتیک است، یافت میشود.

با کاربرد محصول: روش ژنتیکی که دربالا شرح داده شد، روش ساده وکارآمدی است. اما تنها تحت شرایط محدودی قابل اجراست. به طور واضح، اگر شما یک ژن حیوانی را جستجو کنید شما نمی توانید توده‌ای از حیوان‌های جهش یافته را جمع کنید وآنها رابا پلاسمیدها Transformکنید واستقرار مجدد فنوتیپ‌های نرمال را جستجو کنید. به جای آن، ما باید، بعضی تکنیکهای متفاوت را از ابزارهای بیوتکنولوژی مانند نمونهٔ زیر بکار بگیریم. فرض کنید، شما دوست دارید ژنی را برای هموگلوبین خرس قطبی پیدا کنیم، یک محصول ژنی شناخته شده، اگر شما نتوانید، دانشمندان دیگری را پیدا کنید که قبلاً یک کتابخانه ازDNA خرس قطبی را ساخته‌اند. شما اول باید یکی از این کتابخانه‌ها را بسازید. حال شما اطلاعات خاصی از پروتئین را نیاز دارید، بنابراین شما یک نمونه از خون خرس قطبی را بگیرید وهموگلوبین را از سلولهای قرمز آن جدا کنید.

این قطعات بعداًاز الکتروفورز با ژل ازهم جدا می‌شوند[1]. کاربرد آنزیم‌های دیگر درمراحل بعدی نیز شرح داده خواهد شد.

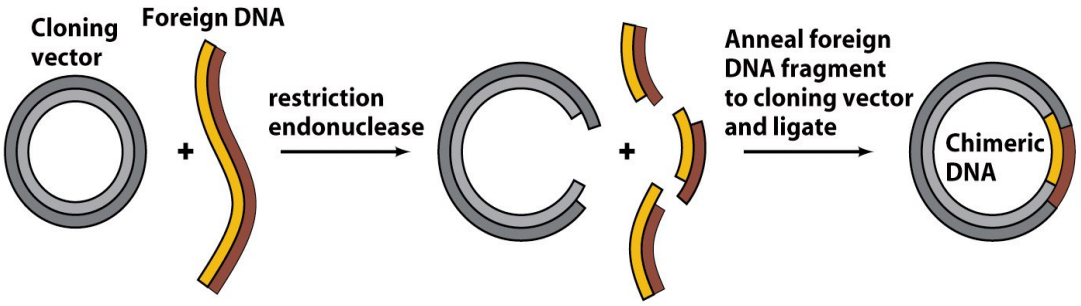


Figure 3-27 Fundamentals of Biochemistry, 2/e
© 2006 John Wiley & Sons

دستکاری DNA: تولیدDNA نوترکیب

بعداز جداسازی وخالص سازی DNA، آخرین مرحله درساختن یک مولکول نوترکیب DNA، ملحق شدن مولکول ناقل به DNAای که می‌خواهد کلون شود، می‌باشد[2]. فرآیند اتصال دو مولکول DNA برای تولید DNA نوترکیب به وسیلهٔ خانواده‌ای از آنزیم‌ها به نام لیگازها کاتالیز می‌شودوواکنش آن ligation نامیده می‌شود. لیگازها آنزیم هایی هستند که درهمهٔ سلولها یافت می‌شوندوآنها نقش مهمی رادر همانندسازی ونگهداری نوکلئیک اسیدها دارند. آنها تشکیل پیوندهای فسفودی استری را بین نوکلئوتیدهای پهلوی هم ردیف شدهٔ مجاور یا نزدیک هم را کاتالیز می‌کنند. [3]درواقع عمل لیگاز DNA درسلول، ترمیم شکستگی‌های تک رشته‌ای یعنی عدم تداوم است که در مولکولهای دورشته‌ای DNA مثلاً درحین همانندسازیDNA ایجاد می‌شوند. لیگازهای DNAدراغلب موجودات، همچنین دوقطعهٔ منفرد ازDNA را بهم متصل می‌نمایند. [4]

باوجود پیوندهای هیدروژنی بین بازهای مکمل، مولکول‌های DNA دورشته‌ای می‌توانند تمامیت شان را حفظ کنند، خواه بعضی از پیوندها ازدست رفته باشند، حداکثر تاوقتی که آنزیم لیگاز برای درزگیری شکستگی آن برسد. دقیقاً این عملی است که به لیگازها اجازه می‌دهد برای اتصال دو مولکول DNA درمهندسی ژنتیک بکاربرده شوند. ابزار اصلی برای همهٔ لیگازها، حضور حداقل یک باقی ماندهٔ فسفاته درانتهای مولکول‌های DNAای است که برای ligation آورده شده‌اند. [5]چون یک وقفه به طورساده مکانی است که در آنجا یک اتصال فسفودی استری بین نوکلئوتیدهای مجاور وجودنداشته باشد.

1. براون.تی.ای ،مقدمه ای بر همسانه سازی ژن ها، احمدیان تهرانی . پ،۷۶،۱۳۷۷
2. براون.تی.ای ،مقدمه ای بر همسانه سازی ژن ها، احمدیان تهرانی . پ،۹۱،۱۳۷۷
3. Dawson .M.T , Powell. A ,Gannon .F ,Gene Technology ,1996,17
4. براون.تی.ای ،مقدمه ای بر همسانه سازی ژن ها، احمدیان تهرانی . پ،۱۳۷۷، ۶۵
5. Dawson .M.T , Powell. A ,Gannon .F ,Gene Technology , 1996,17

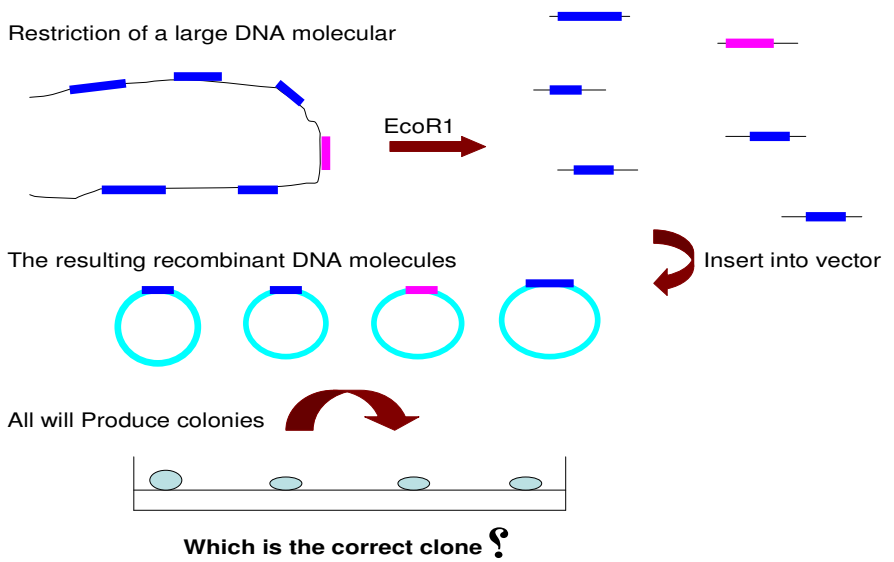
agrisoft.ir

شناسایی و جداسازی کلون حاوی ژن موردنظر

ا. راستگو

بدست آوردن کلون نوترکیب دلخواه

در اثر هضم DNA ی مولکولی با آنزیمهای برشی ؛ قطعات زیادی تولید می‌شود که قطعه حاوی ژن مورد نظر هم در بین آنهاست و این مشکلی است که زیست شناسان مولکولی در هنگام بدست آوردن یک کلون خاص با آن روبرو می‌شوند. در طی واکنش اتصال نیز هیچگونه انتخابی برای قطعه‌ای خاص وجود ندارد؛ بنابراین تعداد زیادی DNA نوترکیب متفاوت بدست می‌آید که هر کدام قطعات متفاوتی از DNA سلولی را حمل می‌کنند در نتیجه بعد از ترانسفورماسیون و کشت دادن، کلونهای نوترکیب متنوع حاصل می‌شود؛ بنابراین کلون نوترکیب مورد نظر به طریقی باید شناسایی شود.



دو روش اساسی برای بدست آوردن کلون نوترکیب مورد نظر:

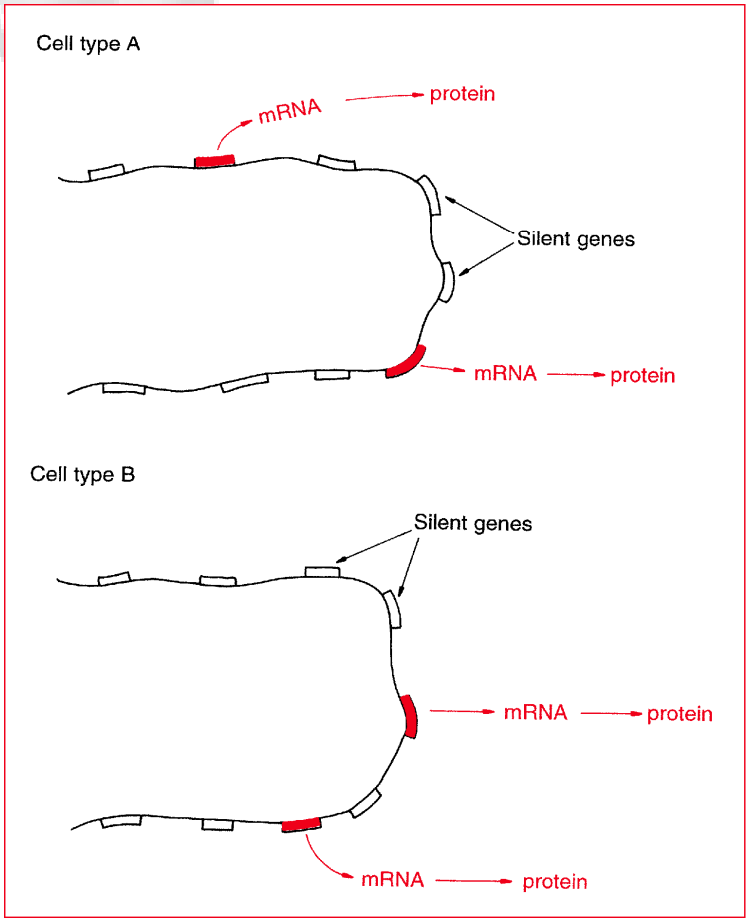
۱- انتخاب مستقیم ژن مورد نظر: عمل کلون کردن به گونه‌ای انجام می‌شود که فقط کلون هایی از ژن مورد نظر بدست آید. تقریباً همیشه انتخاب در مرحله کشت صورت می‌گیرد.

۲- شناسایی کلون مشخص از کتابخانه ژنی: ابتدا با کلون کردن تصادفی ؛ کتابخانه‌ای از کلون‌ها بدست می‌آید که دارای تمام یا اکثر ژنهای موجود در سلول باشند. سپس با بررسی تک کلونها کلون صحیح را شناسایی می‌نمائیم.

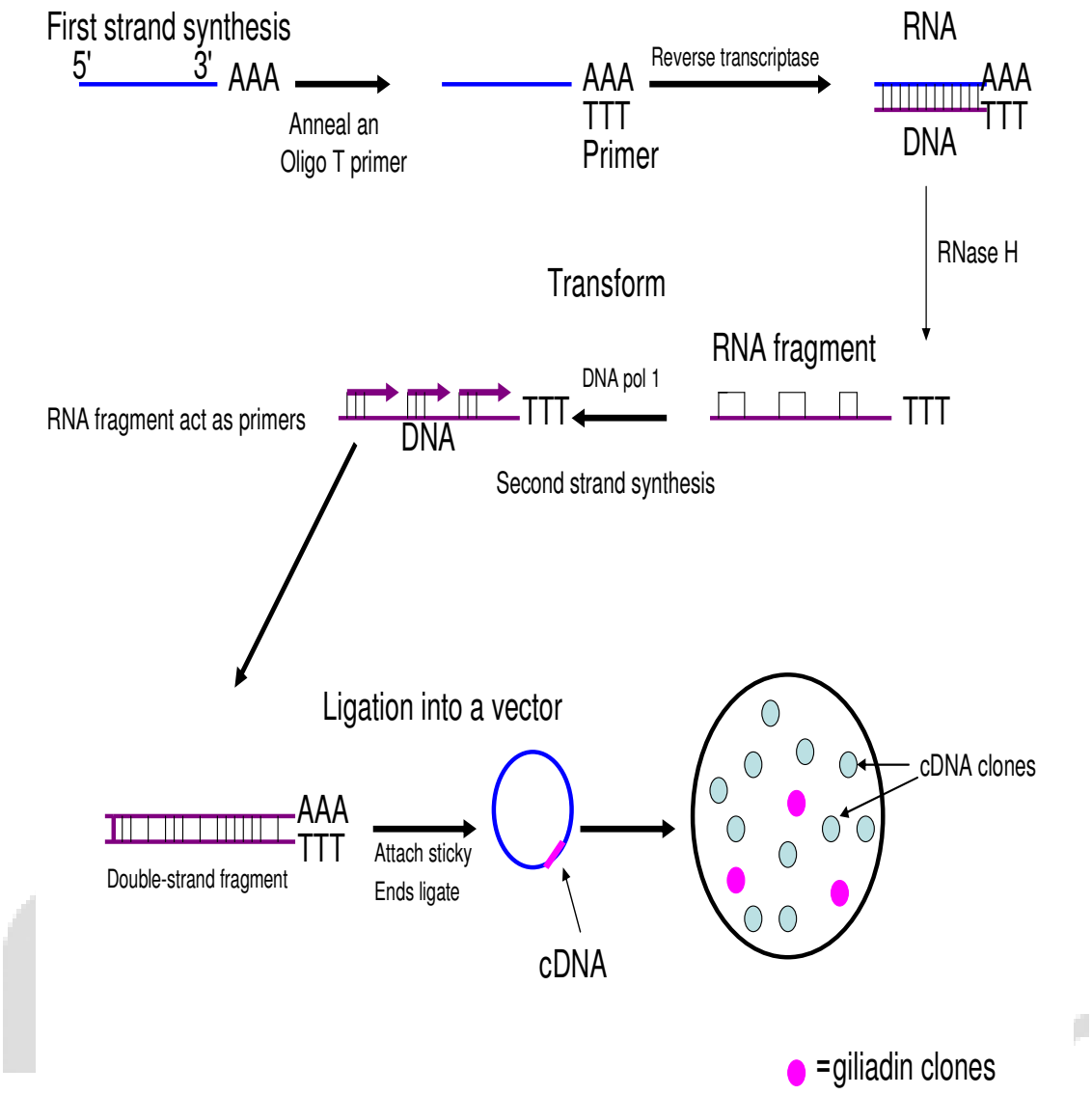
بطور کلی روش انتخاب مستقیم به علت سرعت و عدم وجود ابهام ارجح است، اما برای تمام ژنها کاربرد ندارد. بنابراین

مشخصه اکثر موجودات پرسلولی، اختصاصی شدن سلولها می‌باشد. به عنوان مثال انسان از تعداد بسیار زیادی سلول متفاوت، سلولهای مغزی، سلولهای خونی، سلولهای کبدی و... تشکیل شده است. مطمئناً همه سلولها ژنوم کاملاً شبیه هم دارند، اما در انواع متفاوت سلولها، مجموعه متفاوتی از ژنها روشن هستند و بقیه خاموش می‌باشند این واقعیت که تنها ژنهای نسبتاً اندکی در هر نوع سلول بیان می‌شوند، می‌تواند برای تهیه کتابخانه ژنی مورد استفاده قرار گیرد، به شرطی که ماده‌ای که کلون می‌شود mRNA باشد نه DNA. تنها ژنهایی بیان می‌شوند که mRNA از روی آنها نسخه برداری شده باشد. بنابراین اگر mRNA به عنوان ماده آغازکننده استفاده شود. کلونهای حاصل، تنها شامل بخشی از کل ژنهای موجود در سلول می‌باشد.

روش کلون کردن با کمک mRNA بخصوص هنگامی مفید خواهد بود که ژن مورد نظر به مقدار زیاد در یک نوع سلول خاص بیان شود برای مثال ژن گلیادین که یکی از پروتئین‌های مهم تغذیه‌ای گندم است، در سلولها بیش از ۳۰٪ کل mRNA سلول مخصوصی گلیادین است. واضح است که اگر بتوانیم mRNA را از دانه‌های گندم کلون کنیم، تعداد زیادی کلون مخصوص گلیادین بدست خواهیم آورد.

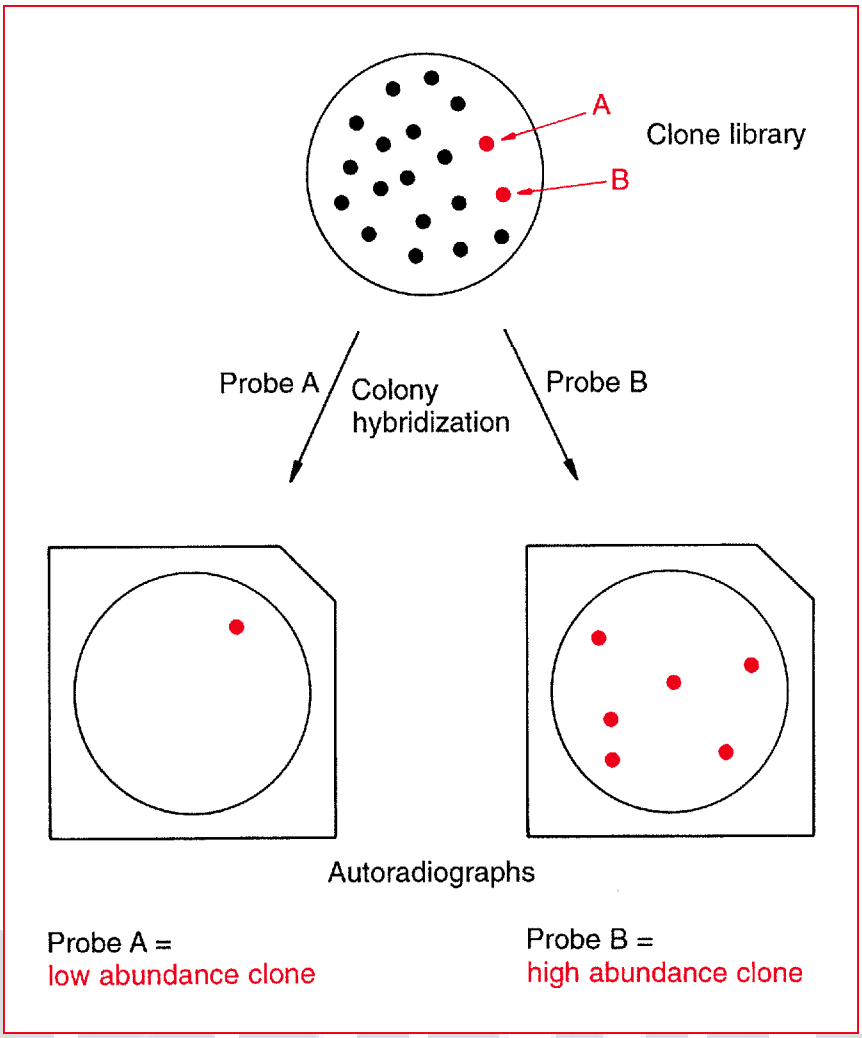


ژنهای مختلف در انواع متفاوتی از سلولها بیان می‌شوند.



mRNA می‌تواند به عنوان cDNA کلون شود:

خود mRNA را نمی توان به یک حامل کلون سازنده متصل کرد، اما mRNA مـی‌توانـد بـا سـاختن DNA مکمـل بـه DNA تبدیل شود. در این روش نقش کلیدی بر عهده آنزیم نسخه بردار معکوس است که قادر به سنتز DNA مکمل از روی RNA موجود می‌باشد. اکنون که رشته cDNA ساخته شده است، mRNA در مولکول هیبریدی می‌تواند بطور نسبی توسط آنزیم ریبونوکلئاز H شکسته شود. قطعات باقی مانده mRNA می‌تواند به عنوان پرایمر برای آنـزیم DNA پلـی مـراز I، کـه دومین رشته cDNA را سنتز می‌کند، استفاده شود نتیجه یک مولکول دو رشته‌ای DNA است که می‌تواند به حامل متـصل شده کلون گردد کلونهای cDNA حاصل، نماینده mRNA موجود در مراحل اولیه خواهند بود. در نمونـه‌ای کـه mRNA از دانه‌های گندم تهیه شده است، کتابخانه cDNA دارای نسبت زیادی از کلونهای نماینده mRNA گلیادین خواهد بـود سـایر



جستجوکردن در کتابخانه برای شناسایی یک کلون غالب

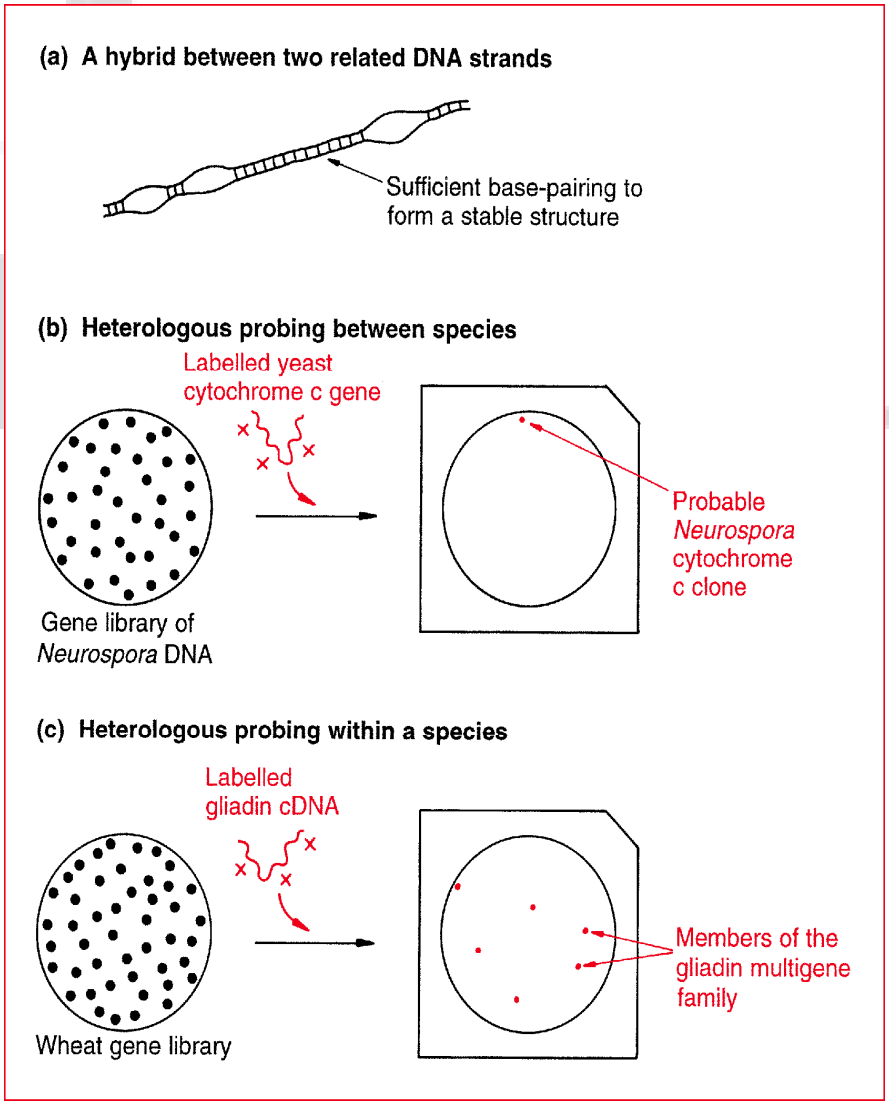
15
GLY-SER-ALA-LYS-LYS-GLY-ALA-THR-LEU-PHE-LYS-THR-ARG-CYS-GLU-
30
LEU-CYS-HIS-THR-VAL-GLU-LYS-GLY-GLY-PRO-HIS-LYS-VAL-GLY-PRO-
45
ASN-LEU-HIS-GLY-ILE-PHE-GLY-ARG-HIS-SER-GLY-GLN-ALA-GLN-GLY-
60
TYR-SER-TYR-THR-ASP-ALA-ASN-ILE-LYS-LYS-ASN-VAL-LEU-TRP-ASP-
75
GLU-ASN-ASN-MET-SER-GLU-TYR-LEU-THR-ASN-PRO-LYS-LYS-TYR-ILE-
90
PRO-GLY-THR-LYS-MET-ALA-PHE-GLY-GLY-LEU-LYS-LYS-GLU-LYS-ASP-
103
ARG-ASN-ASP-LEU-ILE-THR-TYR-LEU-LYS-LYS-ALA-CYS-GLU

توالی آمینواسیدهای سیتوکروم c.

بازهای کافی باید ایجاد و بوسیله اتورادیوگرافی ثبت گردد.

در حقیقت شرایط آزمایشگاهی نیز باید تغییر یابد، به طریقی که ساختمان ناهمگون قبل از اتورادیوگرافی، ناپایدار و از هم پاشیده نگردد.

پروب کردن ناهمگون برای شناسایی ژنهای مرتبط در یک ارگانیسم نیز استفاده می‌شود. اگر cDNA متعلق به گلیادین گندم برای پروب کردن کتابخانه ژنی گندم استفاده شود، آنگاه نه تنها با ژن خودش، بلکه با ژنهای متنوع دیگر نیز هیبرید تشکیل می‌دهد. تمام این ژنها به cDNA گلیادین مربوط می‌شوند اما توالی نوکلئوتیدهایشان بطور جزیی متفاوت است. علت این امر این است که گلیادین‌های گندم یک مجموعه پروتئینهای مرتبط را تشکیل می‌دهند، که هر یک از آنها بوسیله یکی از اعضای یک خانواده چند ژنی رمزدهی می‌شود. بعد از اینکه یک ژن در این خانواده کلون شد سایر اعضا را می‌توان با روش پروب کردن ناهمگون جدا کرد.



جستجو کردن ناهمگون

kingdoms. *Genes Dev* **10**: 638-643.
4. Guru T.(2000). A silence that speaks volumes. *Nature* **404** ،804-808.
5. Hammond SM ،Caudy AA ،Hannon GJ.(2001) Post-transcriptional Gene Silencing by Double-stranded RNA. *Nature Rev Gen* **2**: 110-119.
6. Napoli C ،Lemieux C ،and Jorgensen R.(1990) Introduction of a chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* **2**: 279-289.
7. Jorgensen RA ،Cluster PD ،English J ،Que Q ،and Napoli CA.(1996) Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol Biol* **31**: 957-973.
8. Ingelbrecht I ،Van Houdt H ،Van Montagu M ،and Depicker A.(1994) Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10502-10506.
9. Cogoni C ،Irelan JT ،Schumache ،M ،Schmidhauser T ،Selker EU ،and Macino G.(1996) Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J* **15**: 3153-3163.
10. Palauqui JC ،Elmayan T ،Pollien JM ،and Vaucheret H.(1998) Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J* **16**: 4738-4745.
11. Guo S ،and Kempheus KJ.(1995). *Par-1* ،a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos ،encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**: 611-620.
12. Fire A ،Xu S ،Montgomery MK ،Kostas SA ،Driver SE ،and Mello CC.(1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
13. Timmons ،L. ،and Fire ،A.(1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**: 854.
14. Timmons L ،Court D ،and Fire A.(2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **263**: 103-112.
15. Hunter CP.(2000) Shrinking the Black Box of RNAi. *Current Biology* **10**: R137-R140.
16. Tabara H ،Grishok A ،and Mello CC.(1998) RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* 282: 430-431.
17. Kamath RS ،Martinez-Campos M ،Zipperlen P ،Fraser AG ،and Ahringer J.(2000) Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biology* 2: 2. 1-2. 10.
18. Hutvagner G ،and Zamore PD.(2002) RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genetics & Development* 12: 225-232.
19. Bernstein E ،Caudy AA ،Hammond SA ،and Hannon GJ.(2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366.

agrisoft.ir

به کونفروهای مارپیچی، ستاره‌ای و لوله‌ای تقسیم کرد. در جلبکها کلروپلاستها ساختمان ساده‌تری دارند و اغلب آنها را کروماتوفور می‌نامند. در گیاهان پیشرفته و عده‌ای از جلبکهای سرخ و قهوه‌ای کلروپلاستها کروی، بیضوی و یا اغلب عدسی شکل هستند.

اندازه کلروپلاست:

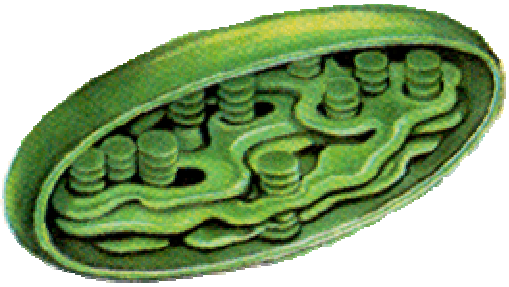
کلروپلاستها اندازه بسیار متفاوتی دارند. طول آنها از حدود ۲ تا بیش از ۳۰ میکرون می‌رسد. در گیاهان پیشرفته طول کلروپلاستها ۳ تا ۱۰ میکرومتر، عرض آنها ۱ تا ۳ و ضخامتشان ۱ تا ۲ میکرومتر است. اندازه کلروپلاست به **ویژگیهای وراثتی**، سن یاخته و دیگر ویژگیهای فیزیولوژیکی یاخته وابسته است. یاخته‌های پلی پلوئید کلروپلاستهای درشت‌تری از یاخته‌های دیپلوئید دارند.

رنگ کلروپلاست:

کلروپلاستها به دلیل داشتن کلروفیل اغلب سبز رنگ هستند اما در برخی شرایط فیزیولوژیکی یا برحسب نوع یاخته و میزان نسبی رنگیزه‌های غیر کلروفیلی ممکن است به رنگهای دیگری دیده شوند. در جلبکهای قهوه‌ای و قرمز، رنگ سبز کلروفیل بوسیله سایررنگیزه‌ها پوشیده شده است.

تعداد و محل کلروپلاست:

تعداد کلروپلاست بر حسب نوع یاخته، گونه گیاهی و سن یاخته تغییرمی‌کند. تعداد کلروپلاستها در هر میلی متر مربع برگ کرچک به حدود ۴۰۰ هزار می‌رسد و یک درخت ممکن است تا 10^{12} عدد کلروپلاست داشته باشد. کلروپلاستها در یاخته‌های جلبکها و گیاهان مختلف در بخشهای مختلف یاخته قرار می‌گیرند. بطور معمول در بخشهای کناری **یاخته** که امکان دریافت نور بیشتر است فراوانی بیشتری دارند.



در ساختمان کلروپلاستها سه بخش اصلی شامل پوشش پلاستی، ماده زمینه‌ای یا استروما و ساختمانهای غشایی درونی قابل تشخیص است.

سلول دیگر از گونه دیگر با دستیابی عملی به فن آوری DNA نوترکیب توسعه یافته است.(۱)

نمونه‌های متعددی از مواد در ناقل‌های مختلف میزبان نظیر باکتری‌ها، سلول‌های پستانداران مخمرها یا ویروس‌ها تولید شده‌اند. گیاهان و حیوانات تغییر ژن یافته نیز برای تولید پروتئن‌های نوترکیب مشخص مورد استفاده قرار گرفته‌اند. پروتئین‌های ویروسی وپارازیت‌ها هم برای تولید واکسن‌ها با کمک فن آوری نوترکیب تولید شده‌اند.(۱)

مهمترین کار مهندسی ژنتیک تولید انواع جدید گیاهان نوترکیب برای استفاده در کشاورزی بوده است. قرنها نباتات مختلف با برنامه‌های اصلاح نژاد سنتی اصلاح میشده‌اند. اما اکنون با روش‌های مهندسی ژنتیک با تغییر دادن مستقیم ژن گیاهان این کار انجام می‌گیرد.(۱)

تا کنون حداقل ۶۴ گونه مهم گیاهان نوترکیب که از نظر اقتصادی اهمیت خاصی دارند با این نوع روش‌ها تولید شده‌اند. مهمترین آنها ذرت، سویا، کلزا، کتان، گوجه فرنگی، سیب زمینی، یونجه، اطلسی، دانه روغن، کلم، برنج، گندم، چغندر، جو، تنباکو... می‌باشند. صفاتی که در گیاهان نوترکیب ایجاد شده اند و از نظر اقتصادی اهمیت زیادی دارند را می‌توان در شش گروه طبقه بندی نمود.(۱)

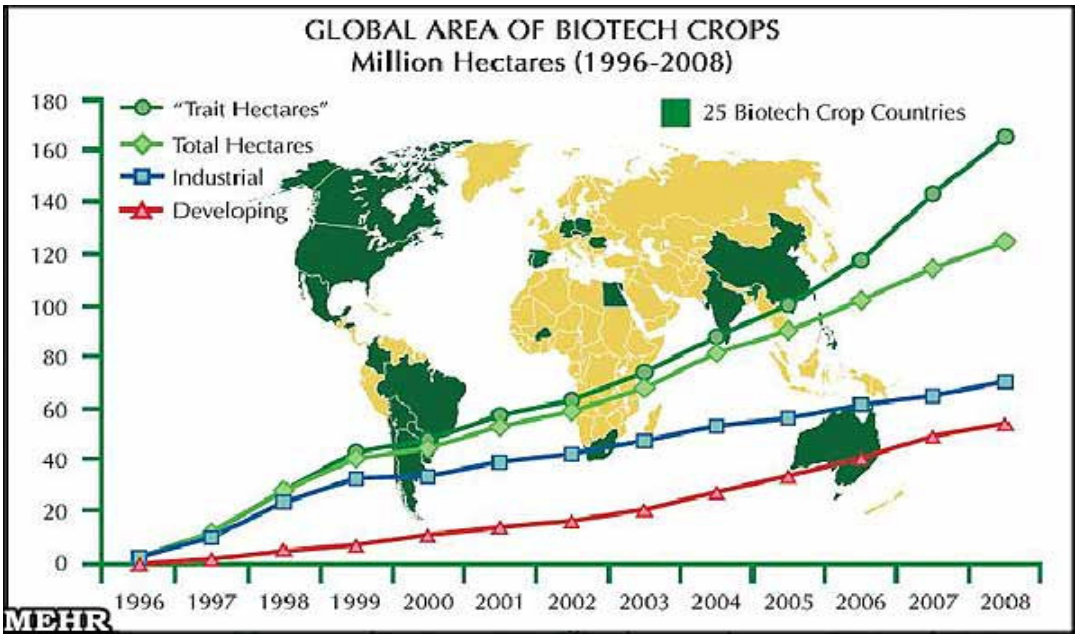
جدول۲: انتقال ژنتیکی خصوصیات در گیاهان تغییر ژن داده شده با روش‌های DNA نوترکیب

تحمل علف کش
مقاومت در برابر حشره
مقاومت در برابر بیماری‌های ویروسی
مقاومت در برابر بیماری‌های قارچی
اصلاح کمیت محصول
سایر خصوصیات (تولید شیمیایی/ متابولیت‌های ویژه، پیوند ژن‌های نشاندار شده، مقاومت در برابر تنش، بیان ایمونولوژیکال‌ها در گیاهان برای واکسن‌های خوراکی وغیره)

در حال حاضرکشورهای متعدی برای استفاده از گیاهان تغیر ژن داده شده در تجارت کشاورزی مجوز کسب نموده‌اند. چین اولین کشوری بود که دراوایل دهه ۱۹۹۰ تنباکوی مقاوم به ویروس را تولید کرد. و کمی بعد از آن گوجه فرنگی مقاوم به ویروس برای تجارت زیر کشت رفت. بعد از آن در ماه May 1994 شرکتCalgene Inc . آمریکا گوجه فرنگی مقاوم به ویروس را به طور تجاری عرضه نمود.(۱)

کاربر بیوتکنولوژی در سایر علوم

بارها این حقیقت انکارناپذیر بیان شده که فن آوری زیستی می‌تواند نقش کلیدی در توسعه و تأمین نیازهای بشر در



روند کشت محصولات تراریخته در فاصله سالهای ۱۹۹٦ تا ۲۰۰۸

بر اساس گزارش منتشر شده ایران در سال ۲۰۰۸ نیز همانند سال قبل از آن، نقش خود در زمینه تولید محصولات تراریخته از دست داده است.(۲)

جدول ۳: سطح زیر کشت محصولات تراریخته (۲۰۰۸)

	Country	Area (million hectares)	Biotech Crops
۱	USA	۵ .۶۲	Soybean, maize, cotton, canola, squash, papaya, alfalfa, sugarbeet
۲	Argentina	۰ .۲۱	Soybean, maize, cotton
۳	Brazil	۸ .۱۵	Soybean, maize, cotton
۴	India*	۶ .۷	Cotton
۵	Canada	۶ .۷	Canola, maize, soybean, sugarbeet
۶	China	۸ .۳	Cotton, tomato, poplar, petunia, papaya, sweet pepper
۷	Paraguay	۷ .۲	Soybean
۸	South Africa	۸ .۱	Maize, soybean, cotton
۹	Uruguay	۷ .۰	Soybean, maize
۱۰	Bolivia	۶ .۰	Soybean
۱۱	Philippines	۴ .۰	Maize
۱۲	Australia	۲ .۰	Cotton, canola, carnation
۱۳	Mexico	۱ .۰	Cotton, soybean
۱۴	Spain	۱ .۰	Maize
۱۵	Chile	<0. 1	Maize, soybean, canola

این محصولات، برچسب گذاری به صورت غیر اجباری ادامه یابد و بعد از پنج سال امکان اجباری کردن برچسب گذاری مجددا بررسی شود.(۴)

این گزینه بسیار محافظه کارانه است. عده زیادی از تولیدکنندگان مواد غذایی تغییر یافته ژنتیکی حاضر به برچسب گذاری محصولات خود نیستند. در این صورت دولت باید از تولیدکنندگان محصولات غذایی عاری از مواد تغییر یافته ژنتیکی که مایل به برچسب گذاری محصولات خود هستند حمایت کند و فروشگاههایی را که از پذیرفتن این محصولات خودداری می کنند و نیز تولیدکنندگانی که به دروغ محصولات خود را عاری از مواد تغییر یافته ژنتیکی معرفی می کنند مشمول جریمه کند.(۴)

در تصویر سمت راست مزرعه‌ای در مکزیک، در تصویر سمت چپ مزرعه‌ای است در فرانسه که زیر کشت محصولات تراریخته بودند وبصورت نمادین بوسیله (Green peace) علامت گذاری شده است.

رعایت ایمنی در فن آوری زیستی در سطح بین المللی

کشورها نیازمند به ایجاد مراکز تماس ایمنی زیستی ملی برای تبادل اطلاعات در سطح بین المللی می‌باشند. این مرکز می‌تواند همان واحد یا سازمان ملی ایمنی زیستی که مسئولیت کنترل و نظارت کاربری صحیح فن آوری زیستی را بعهده دارد باشد.(۱)

بسته به خصوصیات ارگانیسم تراریخته و کاربرد آن، استفاده کننده‌ای که مایل به انتقال اینگونه ارگانیسم‌ها از یک کشور به کشور دیگر می‌باشند می‌بایست اطلاعات مربوط به کاربرد و ناحیه‌ای از کشور که این ارگانیسم در آن رها می‌شود را مشخص نماید. این درخواست انتقال اطلاعات باید انجام پذیرد حتی اگر ارگانیسم مورد نظر مستثنی از کنترل و مراقبت ویژه باشد. اطلاعات می‌باید در بیشتر موارد به همراه ارگانیسم‌های تراریخته انتقال یابد و در پاره‌ای موارد حتی قبل از انتقال ارگانیسم باستی در دسترس قرار گیرد.(۱)

تعمیر و اصلاح DNA

رضا فریدی

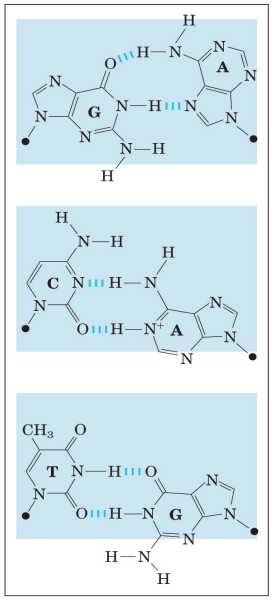
مقدمه

صحت عمل همانندسازی DNA در دو مرحله کنترل می‌شود:

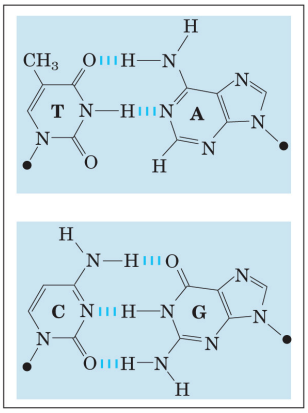
۱) عمل پلیمریزاسیون

شامل دقت عمل پلیمریزاسیون آنزیم DNAپلیمراز (مانند جایگاه هندسی جفت بازهای AT و GC) و دیگر آنزیم‌های شرکت کننده در همانندسازی می‌باشد، ولی با این وجود اندازه گیری‌های دقیق در شرایط آزمایشگاهی نشان داده است که DNAپلیمرازها به ازاء هر $۱۰^{۴}$ تا $۱۰^{۵}$ نوکلئوتید صحیح، یک نوکلئوتید غلط را در محل قرار می‌دهند. یکی از علل آن می‌تواند وجود حالت توتومری نادر یک باز باشد که به آن امکان ایجاد پیوند هیدروژنی با باز غلط را می‌دهد.

توتومرها[1] ایزومرهای ساختمانی هستند که با یکدیگر در تعادل دینامیک هستند. به عنوان مثال تیمیدین دو شکل توتومری دارد: کتو که فرم غالب و طبیعی است و انول فرم نادر بوده و در هنگام همانندسازی به جای A با G جفت می‌شود. بعد از همانندسازی به فرم طبیعی کتو تغییر می‌یابد و سبب ایجاد «جفت باز ناهمخوان» می‌شود. که بعدها توسط سیستم‌های آنزیمی تعمیر می‌شود.



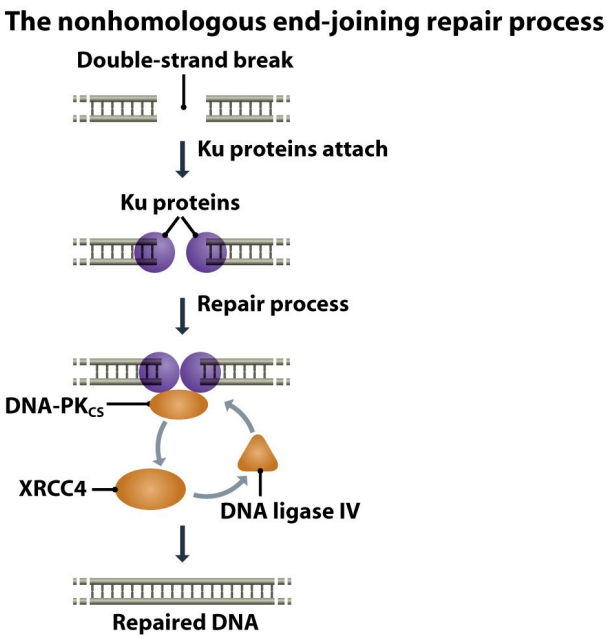
(b)

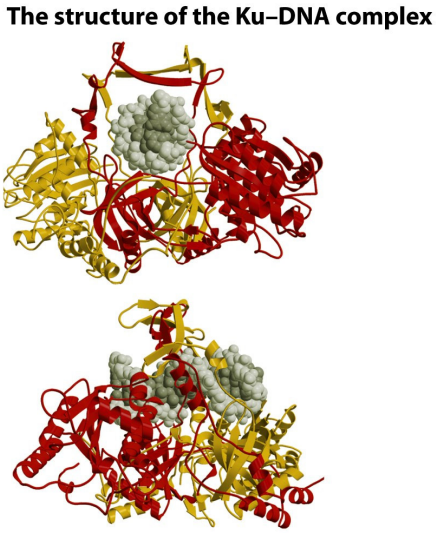


(a)

FIGURE 25-6 Contribution of base-pair geometry to the fidelity of DNA replication. (a) The standard A═T and G≡C base pairs have very similar geometries, and an active site sized to fit one (blue shading) will generally accommodate the other. **(b)** The geometry of incorrectly paired bases can exclude them from the active site, as occurs on DNA polymerase I.

1. Toutomers





سنتز DNA مستعد خطا با عبور از آسیب (TLS)

Error-Prone translesion DNA synthesis (TLS)

اگر یک ناحیه از ژنوم دچار آسیب گسترده‌تری (نسبت به آنچه در قبل گفته شود) بشود، روندهای تعمیری با شکست مواجه می‌شود. سلول باید از مردن و کوشش برای همانندسازی ناحیه آسیب دیده یکی را انتخاب کند، سلول مسیر دوم، یعنی همانندسازی را انتخاب می‌کند گرچه با اشتباه و جهش سلولهای دختری همراه است.

در باکتریها TLS بخشی از پاسخ استرس سلولی به آسیب وسیع DNA است که پاسخ SOS می‌نامند. پاسخ SOS یعنی نادیده گرفتن مواردی که سبب توقف کمپلکس همانندسازی و یا تأخیر در آن می‌شود نظیر:

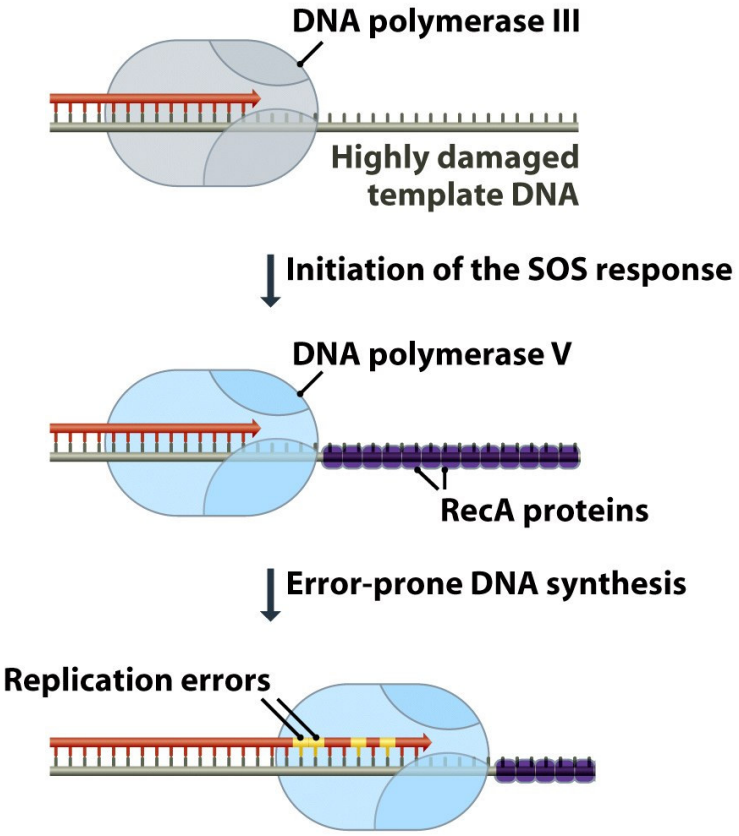
- جایگاه AP
- دایمرهای سیکلوبوتیل
- محصولات نوری ناشی از UV

پاسخ SOS مستلزم سنتز موتازوم[1] است که از دو قسمت تشکیل شده است:

- کمپلکس $UMUD'_2C$ ← (= DNA پلی‌مرازV) تریمری است از دو پرتئین UmuD' و یک پرتئین UmuC
- چندین نسخه از پرتئین RecA

1 . Motasome

در این سیستم پرتئین RecA رشته‌های آسیب دیده را می‌پوشاند و کمپلکس $UmuD'_2C$ را قادر می‌سازد تا آنزیم DNAپلیمرازIII را خارج نموده و خود به جای آن قرار گیرد و سنتز مستعد اشتباه DNA را تا انتهای ناحیه آسیب دیده ادامه دهد، یعنی جایی که دوباره آنزیم DNAپلیمرازIII جای آن را می‌گیرد.



اغلب پاسخ SOS به عنوان آخرین و بهترین شانس باکتری جهت همانندسازی و در نتیجه بقای آن در شرایط دشوار می‌باشد. در حقیقت موتازوم آسیب را تعمیر نمی‌کند، بلکه فقط به طرز ساده‌ای به قسمت آسیب دیده اجازهٔ همانندسازی می‌دهد. وقتی موتازوم در DNAی الگو به یک جایگاه آسیب دیده می‌رسد، آنزیم پلیمراز نوکلئوتیدها را تقریباً به طور اتفاقی انتخاب می‌کند، در نهایت تعداد اشتباهات روند همانندسازی افزایش می‌یابد.

بیماریهای ناشی از نقص در تعمیر DNA

تعدادی از بیماریهای شدید ارثی انسان ناشی از نقص در یکی از روندهای تعمیری می‌باشد.

اگزرودرما پیگمانتازوم[1]

به دلیل جهش در یکی از چندین ژن پرتئین‌های درگیر در تعمیر «با برداشت نوکلئوتید» ایجاد می‌شود. در سلول‌های

1 . Xeroderma pigmentosum