@Gene_Expression

چکیده مهندسی ژنتیک

۱ ـ کلیات و مراحل مهندسی ژنتیک

۱ ـ ۱ ـ درآمد

در دسامبر ۱۹۹۷ (آذرماه ۱۳۷۶ شمسی)، گروهی از دانشمندان ژاپنی در دانشگاه اوزاکا، نخستین پستان‌دار تولیدکننده‌ی نور را به‌وجود آوردند! این محققان با وارد کردن ژن تولید نور از یک عروس دریایی درخشان به سلول‌های تخم (زیگوت) موش، بچه‌موش‌هایی را تولید کردند که زیر اشعه‌ی فرابنفش (UV)، نور سبز فلوئورسانس درخشانی از خود تولید می‌کردند!

این کار تنها با دست‌کاری DNAی موش‌ها امکان‌پذیر شد. به DNAی موش‌های سبزِ دست‌کاری‌شده، «DNA ی نوترکیب» می‌گوییم. چرا که در آن‌ها، DNAی دو گونه جانور بسیار جدا از هم (موش و عروس دریایی)، در هم ادغام شده‌اند (شکل «۱»).

احتمالاً حداقل یک قسمت از سری فیلم‌های معروف «مرد عنکبوتی» را دیده‌اید! این فیلم‌ها براساس کتب مصوّری به همین نام ساخته شده است. داستان مصور مرد عنکبوتی، اولین بار در آگوست ۱۹۶۲ (مرداد ۱۳۴۱شمسی)، در یک نشریه‌ی نوجوانان به چاپ رسید (شکل «۲»).

نکته‌ی جالبی که سیر تکاملی این داستان از آن زمان تا به امروز طی کرده، این است که در آن موقع که هنوز بحث مهندسی ژنتیک مطرح نبود، علّت تبدیل شدن «پیتر پارکر» (قهرمان داستان) به مرد عنکبوتی، گزیده شدن وی توسط یک عنکبوت آلوده به تشعشعات رادیواکتیو بود! در آن زمان که بحث اثرات پرتوها در جهش‌زایی (خصوصاً بعد از دسته گلِ به آب داده شده در هیروشیما و ناکازاکی توسط آمریکایی‌ها) بسیار داغ بود، رادیواکتیویته‌ی موجود در عنکبوت، باعث تغییر یافتن پیتر و تبدیل شدن آن به مرد عنکبوتی بود! ولی در سری جدید فیلم‌های مرد عنکبوتی، در نحوه‌ی تبدیل پیتر به مرد عنکبوتی، پیش‌رفت چشم‌گیری رخ داده است!!!

در این سریِ جدید، که معاصر با اوجِ شکوفایی مهندسی ژنتیک و شبیه‌سازی و ژن‌درمانی و این‌گونه مسایل است، دلیلِ تبدیل شدن قهرمان فیلم به مردِ عنکبوتی، انتقال یک سری از ژن‌های عنکبوت از طریق محل گزش عنکبوت و ورود آن‌ها به گردش خون پیتر است! در حقیقت مرد عنکبوتی نیز پس از این گزش، دارای «**DNAی نوترکیب**» شده است؛ مخلوطی از DNA های انسان و عنکبوت!

اما از عالم داستان‌های علمی ـ تخیلی که بگذریم، در عالم واقعیت چگونه و با چه محدودیتی می‌توان صفات یک جاندار را به جانداری دیگر منتقل کرد؟ آیا واقعاً می‌توان مرد عنکبوتی، پسر کوسه‌ای و دختر گدازه‌ای و یا چیزی در این مایه‌ها ساخت!!؟ جواب این است: بله، ولی نه تا این حد!! با کمی تخفیف در انتظارات تخیلی‌مان، می‌توان گفت تا همین حالا هم کلی جاندار عجیب و غریب که در دنیای طبیعی وجود ندارند، ساخته شده‌اند، تازه حدود ۴ دهه است که محققان توانسته‌اند برخی صفات را از جانداری به جاندار دیگر منتقل کنند، ولی در همین ۴ دهه نیز پیش‌رفت آن‌ها فوق‌العاده بوده است. وقتی فقط طی ۴ دهه به‌جایی می‌رسند که موش یا گیاه تنباکوی نورانی می‌سازند، یا

شکل «۱»

موش‌های سبز فلوئورسانت! دارای DNAی نوترکیب حاوی ژن‌های نورافشان عروس دریایی.

شکل «۲»

بخشی از اولین سری کتاب‌های مصور مرد عنکبوتی در سال ۱۹۶۲ (۱۳۴۱ شمسی).

سیب‌زمینی‌ای تولید می‌کنند که وقتی چیپس حاصل از آن را می‌خورید، در واقع، در همان حال، مشغول وارد کردن چند نوع واکسن به بدن خود هستید و تولید بسیاری دیگر از جان‌دارانِ به‌قول معروف شتر ـ گاو ـ پلنگ (!)، پس افق این کار در آینده‌ی نه‌چندان دور، معلوم نیست.

شاید در چند سال آینده، شاهد تولد قاطری صورتی‌رنگ یا آبی‌رنگ با خال‌های سبز و یک جفت بال زیبا و پرشکوه همچون عقاب و دُمی شبیه پری دریایی باشیم! خال‌های سبز این موجودِ عجیب، برای نورافشانی در شب است. با بال‌های قوی خود به‌جای سم‌زدن در مسیرهای صعب‌العبور پرواز می‌کند، هنگامی که به آب می‌رسد، با دمِ شبیهِ پریِ دریاییِ خود با شنا کردن، کلی بار و مسافر را به آن طرف آب می‌برد و از همه مهم‌تر، رنگ صورتی و آبی آن است که در دو مدل زنانه و مردانه به بازار عرضه می‌شود!!! کسی چه می‌داند؟ شاید هم یک روزی همین ایده‌ی ما را بدزدند و بسازند!

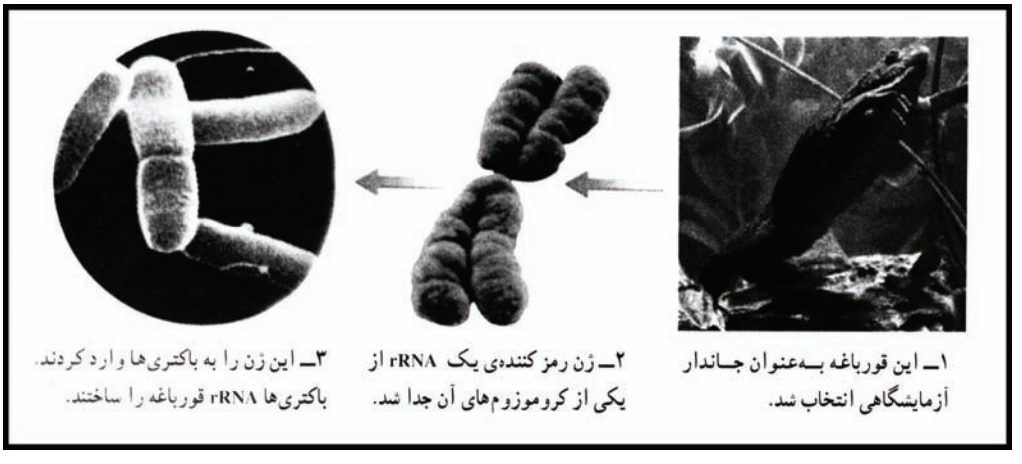
«**تکنولوژی DNAی نوترکیب**» یا همان «**مهندسی ژنتیک**»، تازه، کم‌کم دارد پا می‌گیرد! حال سؤال این است که اصولاً این کار از کی شروع شد؟ اولین جان‌دار ساخته شده توسط مهندسی ژنتیک در چه زمانی و با در اختیار داشتن چه امکاناتی ساخته شد؟ هدف از دست‌کاری ژن‌های جان‌داران چه بود و هست؟ آیا هدف، صرفاً ساختن موجودات عجیب و غریب است!؟ روندِ کاری، برای تغییر ژنتیکی جان‌داران چیست؟ چه ابزارهایی برای این کار درون جعبه‌ی ابزار یک مهندس ژنتیک وجود دارد؟ محدودیت‌ها و دشواری‌های این کار کجاست؟

همه‌ی این‌ها، سؤال‌هایی هستند که پس از مطالعه‌ی بخش‌های بعدی با نام‌های «روند کاری در مهندسی ژنتیک» و «روش‌ها و ابزارهای مهندسی ژنتیک» به پاسخ آن‌ها می‌رسید؛ اما پیش از این که درون جعبه‌ی ابزار مهندسان ژنتیک را بگردیم (!)، سعی کنید کاملاً با روند کاری مهندسی ژنتیک، آشنا شوید. **روند کاری** در این‌جا که معادل فارسی «**Workflow**» است، در حقیقت نوعی **نقشه‌ی راه** یا در اصطلاح کامپیوتری‌ها، **الگوریتم کاری مهندسی ژنتیک** است.

۱ ـ ۲ ـ روندِ کاری در مهندسی ژنتیک

در سال ۱۹۷۳، دو دانشمند آلمانی به‌نام‌های «استانلی کوهن» و «هربرت بایر»، آزمایشی را طراحی و اجرا کردند که اولین نمونه‌ی دست‌کاری ژنتیکی یا همان مهندسی ژنتیک بود. آنان **ژن رمزکننده‌ی RNAی ریبوزومی** (rRNA) را از **DNAی نوعی قورباغه‌ی آفریقایی** (قورباغه‌ی پنجه‌دار آفریقایی *Xenopus leavis*)، استخراج و آن را به DNAی **پلازمید** یا **کروموزوم کمکی** باکتری **اشریشیا کُلای** (E.coli) وارد کردند.

باکتری هنگام **رونویسی** از ژن‌های خود، rRNAی قورباغه را نیز می‌سازد. به این ترتیب **باکتری اشریشیا کلای** (E.coli)، اولین جان‌داری است که با روش‌های مهندسی ژنتیک تغییر پیدا کرد و به‌اصطلاح، تحت **دست‌ورزی** (Manipulation) قرار گرفت (شکل «۳»). **این فرایند دست‌ورزی در ژن‌ها، مهندسی ژنتیک نامیده می‌شود.**



شکل «۳»

آزمایش معروف کوهن و بایر؛ ساخت اولین جان‌دار دست‌کاری‌شده با مهندسی ژنتیک: باکتری اشریشیا کُلایی که می‌توانست RNAی ریبوزومی (rRNA) نوعی قورباغه‌ی آفریقایی را بسازد.

۱ ـ ژنی که در نخستین دست‌ورزی ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت، به‌طور طبیعی توسط کدام نوع RNA پلی‌مراز، رونویسی می‌شود؟

۱) I ۲) III ۳) پروکاریوتی ۴) II

۲ ـ اولین جان‌داری که به روش مهندسی ژنتیک دچار دست‌ورزی ژنتیکی شد، کدام را نداشت؟

۱) اپراتور ۲) دیواره‌ی سلولی ۳) فعال کننده ۴) ناحیه‌ی نوکلئوئیدی

۳ ـ نخستین جان‌دار تغییر یافته در مهندسی ژنتیک، کدام ویژگی را ندارد؟

۱) تقسیم دوتایی ۲) داشتن مهارکننده‌ی لک ۳) تولید ریبوزوم در هستک ۴) دارا بودن اپراتور

۴ ـ در اولین جان‌داری که با روش مهندسی ژنتیک به‌دست آمد، کدام ژن قورباغه‌ی پنجه‌دار استفاده شده است؟ *(سنجش ـ ۸۲)*

۱) rRNA ۲) mRNAی اولیه ۳) mRNAی بالغ ۴) tRNA

آزمایش کوهن و بایر به نوبه‌ی خود، نقطه‌ی عطفی در تاریخ ژنتیک مولکولی و بیوتکنولوژی بود. در حقیقت این آزمایش، سرآغاز مسیر بالنده‌ای بود، به‌نام «**مهندسی ژنتیک**»؛ اما ایده‌ی این آزمایش، هدف آن، پیش‌فرض‌ها و مسیر اجرای آن، در ذهن کوهن و بایر به چه صورت بود؟

مراحل کاری (روش علمی) که کوهن و بایر در طول آزمایش خود در نظر گرفته بودند و تا امروز نیز چهارچوب کلی مهندسی ژنتیک را تشکیل می‌دهد، در زیر شرح داده شده است (جزییات فنّی و روش‌های تکنیکی خاص را در بخش «روش‌ها و ابزارها» بررسی می‌کنیم).

آزمایش کوهن و بایر از جنبه‌های متعددی حایز اهمیت است. برای آشنایی با دلایل اهمیت این آزمایش تاریخی، به کد «۲ ـ ۱» در کتابچه‌ی پیوست مراجعه کنید.

۱ ـ ۳ ـ نگاهی دقیق به آزمایش کوهن و بایر

الف) ایده‌ی اولیه‌ی آزمایش:

آیا می‌توان یک ژن یوکاریوتی (ژن قورباغه) را در یک سیستم پروکاریوتی (باکتری اشریشیا کلای ـ E.coli) بیان کرد؟

ب) هدف از انجام این آزمایش:

۱) تولید فراورده‌های ژنی یوکاریوتی در سیستم‌های پروکاریوتی با سرعت و راندمان بالاتر.

۲) ایجاد نخستین جان‌دار دست‌ورزی‌شده با تکنیک‌های مهندسی ژنتیک.

ج) پیش‌فرض‌ها:

۱) محل یک ژن خاص (مثلاً ژن rRNA) یوکاریوتی، در جان‌داری مانند قورباغه‌ی آفریقایی مشخص است؛ یعنی معلوم است که بر روی کدام کروموزوم قرار دارد.

۲) در باکتری اشریشیاکلای (E.coli)، علاوه بر کروموزوم اصلی (یک DNAی حلقوی طویل)، تعدادی **کروموزوم‌های کمکی** به‌نام **پلازمید** وجود دارد. یک باکتری می‌تواند پلازمیدهایی را که به‌طور آزاد در محیط کشت قرار دارند، جذب کند و اگر ژن‌های خاصی روی آن‌ها باشد، درون خود بیان کند. به عبارتی می‌توان گفت، از آن‌جا که برای انتقال یک ژن خارجی به یک جان‌دار دیگر، نیاز به «**حامل**» یا «**وکتور**» داریم، در باکتری‌ها از پلازمیدها که می‌توانند نسبتاً راحت جذب سلول شوند، به‌عنوان وکتور یا حامل استفاده می‌کنیم. (در بخش‌های بعدی، وکتورها به تفصیل توضیح داده شده‌اند). در حقیقت یکی از روش‌های ترانسفورماسیون، آن‌گونه که گریفیت در سال ۱۹۲۸ شرح داده بود، از همین طریق است. در این‌جا نیز واژه‌ی ترانسفورماسیون به‌کار می‌رود. به‌علاوه ثابت شده بود که باکتری‌ها می‌توانند مستقیماً با هم به تبادل پلازمید بپردازند.

پلازمیدها، کروموزوم‌های کمکی موجود در **بعضی** باکتری‌ها هستند که به‌صورت **DNAهای حلقوی کوچک**، حامل تعدادی ژن می‌باشند. ژن‌های پلازمیدی در کروموزوم اصلی باکتری وجود **ندارند**. توضیح کامل پلازمید در بخش‌های بعدی آمده است.

۳) برخی ژن‌های خاص موجود بر روی پلازمید، مثلاً **ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها**، ابزار مناسبی جهت **جداسازی** و **تشخیص** آن‌ها است.

در کتاب سال سوم دبیرستان با «ترانسفورماسیون» یا «تغییر شکل» آشنا شدید. **پدیده‌ای که طی آن، استرپتوکوکوس نومونیای بدون کپسول، تبدیل به نوع کپسول‌دار آن شد!** نوع بدون کپسول این باکتری که عامل مولد ذات‌الریه است، در واقع با دریافت ژن(های) مسیر بیوشیمیایی تولید کپسول، قدرت ساخت کپسول پلی‌ساکاریدی را پیدا کرده بود.

د) فرضیه‌ی آزمایش:

اگر به طریقی بتوان ژن یوکاریوتی مورد نظر را از قورباغه جدا کرد و به پلازمید چسباند و اگر باکتری، پلازمید نوترکیب را که حاوی ژن خارجی قورباغه است، جذب کند، ممکن است در هنگام رونویسی از ژن‌های پلازمید، rRNAی یوکاریوتی نیز، رونویسی شود.

@Gene_Expression

ه) ابزار و مواد لازم:

۱) مجموعه‌ی **ابزارهای** لازم برای **شناسایی ژن مورد نظر** در هسته‌ی سلول‌های قورباغه (شامل الکتروفورز، وسایل لکه‌گذاری سادرن، دستواره‌ی مناسب نشان دار و ...).

۲) **قیچی ژن‌ها؛** یعنی آنزیمی که بتواند **دو طرف ژن یوکاریوتی** را در محل توالی خاصی **ببرد** و در عین حال **پلازمید** را هم به همان‌صورت و در همان توالی، ولی **در یک نقطه، برش دهد** (آنزیم اندونوکلئاز محدودکننده‌ی EcoR1 که در بخش‌های بعدی کاملاً آن را خواهید شناخت).

۳) **چسب ژن‌ها؛** یعنی آنزیمی که بتواند ژن بریده‌شده‌ی یوکاریوتی را در محل برش، روی پلازمید بچسباند (آنزیم لیگاز).

۴) **محیط کشت** مناسب جهت **تکثیر باکتری** و فرصت دادن به باکتری برای **جذب پلازمید نوترکیب**.

۵) **محیط کشت انتخابی (دارای آنتی‌بیوتیک)** که فقط باکتری‌های دارای پلازمیدهای نوترکیب را زنده نگاه دارد؛ چون **پلازمید نوترکیب**، علاوه بر **ژن خارجی** (ژن قورباغه)، دارای **ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک** نیز هست.

و) مراحل کار:

۱) تشخیص محل ژن مورد نظر در قورباغه ← بریدن دو طرف ژن با آنزیم محدودکننده‌ی EcoR1 ← بریدن پلازمیدی که تنها یک نقطه‌ی شناسایی برش دارد با همان آنزیم (EcoR1).

۲) چسباندن ژن مورد نظر به پلازمید، به‌کمک آنزیم لیگاز.

۳) قرار دادن پلازمیدهای نوترکیب و باکتری‌های فاقد پلازمید در یک محیط کشت به‌منظور جذب پلازمید توسط باکتری.

۴) کلون کردن (تکثیر) باکتری به‌همراه ژنِ درون آن.

۵) غربال کردن باکتری‌ها (از بین بردن باکتری‌های فاقد پلازمید نوترکیب) در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک.

۶) بررسی نحوه‌ی بیان **ژن**، خالص‌سازی و استفاده از فرآورده‌های ژن خارجی بیان‌شده در باکتری و یا تکثیر ژن خارجی توسط باکتری برای استفاده در آزمایش های بعدی.

در اولین دست‌ورزی ژنتیکی، **ژن رمزکننده‌ی نوعی rRNA قورباغه‌ی پنجه‌دار** به‌کار رفت. این ژن به‌طور طبیعی توسط RNA پلی‌مراز I قورباغه‌ی پنجه‌دار، رونویسی می‌شود؛ ولی هنگام وارد شدن به E.coli، **RNA پلی‌مرازِ پروکاریوتی**، آن را **رونویسی** می‌کند.

در تمامی روش‌های عمومی مهندسی ژنتیک، روند کار کمابیش به همین صورت است. معمولاً اختلاف روش‌ها از مرحله‌ی ۶ به بعد است که خود برمی‌گردد به این که، به چه هدفی، ژن را وارد باکتری کرده‌اند:

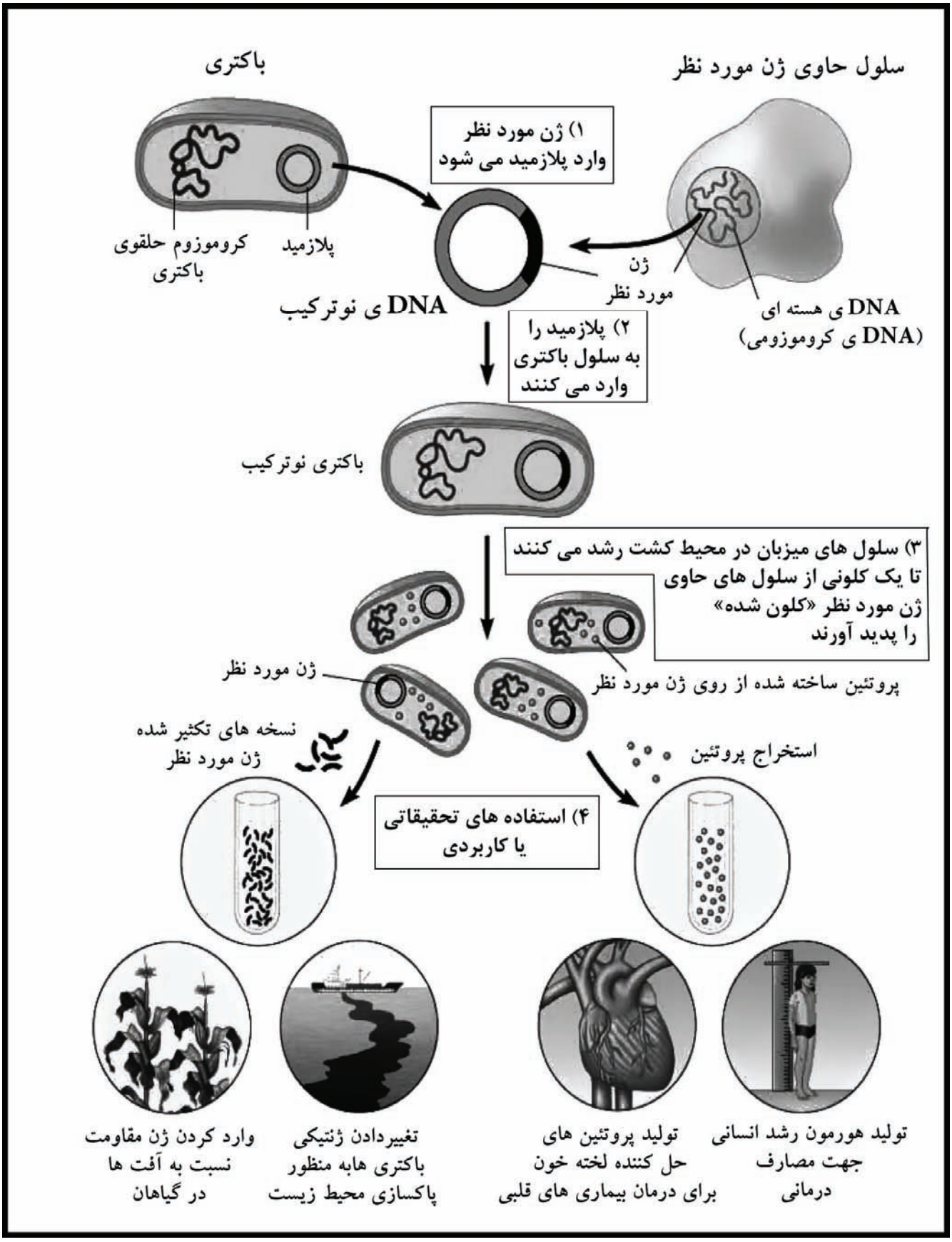
– اگر هدف، تنها این باشد که ژن در باکتری **بیان شود**، در مرحله‌ی ۶، تنها به خالص‌سازی **محصول ژن** (RNA یا پروتئین) از محیط کشت باکتری‌ها، اقدام می‌شود.

– اما اگر هدف، **تکثیر یک ژن خاص** و سپس استفاده از آن در آزمایش‌های دیگر باشد (مثلاً تعیین توالی، انگشت‌نگاری ژنتیکی، RFLP و ...)، در ادامه‌ی مرحله‌ی ۶، باید مراحل برش (با همان آنزیم EcoR1)، استخراج، الکتروفورز و تشخیص ژن کلون‌شده‌ی مورد نظر را به‌کمک لکه‌گذاری سادرن انجام داد(شکل «۴»).

باز هم تاکید می‌کنیم که فراموش نکنید، هدف از وارد کردن ژن خارجی به یک حامل که آن را به درون باکتری می‌رساند (در این‌جا پلازمید)، دو چیز بیش‌تر نیست:

I) بیان آن ژن و استفاده از محصول آن

II) تکثیر آن ژن و استفاده از خود ژن در آزمایش‌های بعدی.



شکل «۴»

خلاصه‌ای از روند کاری در مهندسی ژنتیک یا همان فن‌آوری DNAی نوترکیب با استفاده از پلازمید باکتری به‌عنوان حامل یا وکتور.

به کادر زیر که در آن چند خط از کتاب درسی پیش‌دانشگاهی عیناً ذکر شده است، با دقت توجه کنید:

برگی از کتاب درسی پیش‌دانشگاهی

«... در مهندسی ژنتیک، **هدف‌های مختلفی** دنبال می‌شود؛ اما یکی از مهم‌ترین آن‌ها، تولید ژن **یا** [تولید] فرآورده‌ی آن به‌مقدار انبوه است.

برای تولید ژن به‌مقدار انبوه، مهندسان ژنتیک، ژن مورد نظر را از میان انبوه ژن‌های جان‌دار جدا و بعد آن را به جان‌دار ساده‌ای مثل **باکتری** ـ که **تولید مثل سریعی** دارد ـ وارد می‌کنند. به این ترتیب، ژن مورد نظر **در باکتری، همانند سازی** می‌کند و در نتیجه‌ی همانندسازی‌های پی در پی، مقدار آن زیاد می‌شود. .....»

همان‌طور که مشاهده می‌کنید، در کتاب درسی نیز اهداف مهندسی ژنتیک، همان اهداف دوگانه‌ی ذکر شده در نکته‌ی حاشیه‌ی همین صفحه است؛ **ولی در ادامه، فقط به بررسی مراحل کاری در «تکثیر ژن» پرداخته است**. بسیاری از دوستان عزیز که این چند خط را با دقت مطالعه نکرده‌اند، پس از رسیدن به صفحه‌های بعدی کتاب و مشاهده‌ی عنوان «استخراج ژن» می‌پرسند:

«اگر قرار است که ژن خارجی دوباره از پلازمید جدا شود، پس دلیل این همه زحمت برای وارد کردن ژن به باکتری چه بوده است؟»؛ جواب آن عزیزان این است که در این حالت، نسخه‌های متعدد ژنِ تکثیریافته (کلون شده) را از باکتری‌ها جدا می‌کنیم، نه همان ژن خارجی اولیه که آن را به پلازمید متصل کردیم.

۵ ـ کدام جمله درست است؟

«در اولین دست‌ورزی ژنتیکی ...»

۱) کوهن و بایر موفق به ایجاد تغییر در قورباغه شدند.

۲) rRNAی قورباغه وارد سیتوپلاسم E.coli شد.

۳) محصول ژن وارد شده به سلول میزبان، مورد ترجمه قرار گرفت.

۴) سلول دریافت‌کننده‌ی ژن خارجی، DNAی خطی نداشت.

۶ ـ در آزمایش‌هایی که برای اولین بار منجر به ایجاد تغییر ژنتیکی در E.coli شد، ژن رمزکننده‌ی .....

۱) rRNA، مورد رونویسی قرار گرفت.

۲) mRNA، همانندسازی شد.

۳) rRNA، همانندسازی شد.

۴) mRNA، مورد رونویسی قرار گرفت.

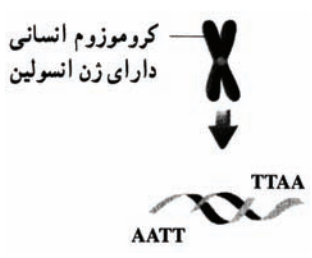
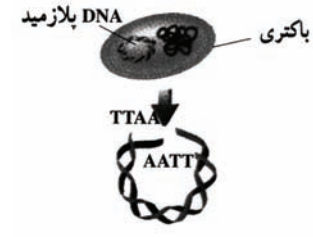
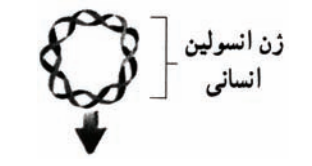
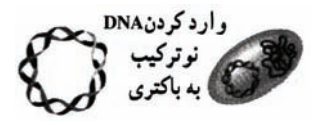
۲ ـ روش‌ها و ابزارها در مهندسی ژنتیک

۲ ـ ۱ ـ درآمد

حال که با کلیات مهندسی ژنتیک از طریق بررسی نخستین مورد آن (آزمایش کوهن و بایر) آشنا شدید، نوبت به بررسی روش‌ها (تکنیک‌ها) و ابزارهای مورد استفاده در مهندسی ژنتیک می‌رسد. در جدول «۱»، مراحل مختلف روند کاری مهندسی ژنتیک و تکنیک‌ها و ابزارهای لازم برای انجام هر مرحله را مشاهده می‌کنید. در ستون سوم این جدول، به مطابقت این مراحل جزیی، با مراحل کلّی شرح داده شده در شکل «۲ ـ ۲»ی صفحه‌ی ۳۲ی کتاب درسی، دقت کنید. از مرحله‌ی ۹ به بعد، روند کاری، بستگی به هدف ما از ایجاد DNAی نوترکیب دارد (تولید محصول ژن یا تکثیر ژن).

پس از بررسی جدول، تک‌تک این روش‌ها و ابزارها و کاربرد آن‌ها در مراحل مختلف مهندسی ژنتیک (فن‌آوری DNAی نوترکیب)، به تفصیل شرح داده شده است، در هر مرحله (به‌جز مطالب مربوط به آنزیم‌های محدودکننده)، مطالب مربوط به کتاب درسی، در کادرهای «برگی از کتاب درسی»، عیناً ذکر شده، سپس توضیحات تکمیلی به‌دنبال آن آمده است.

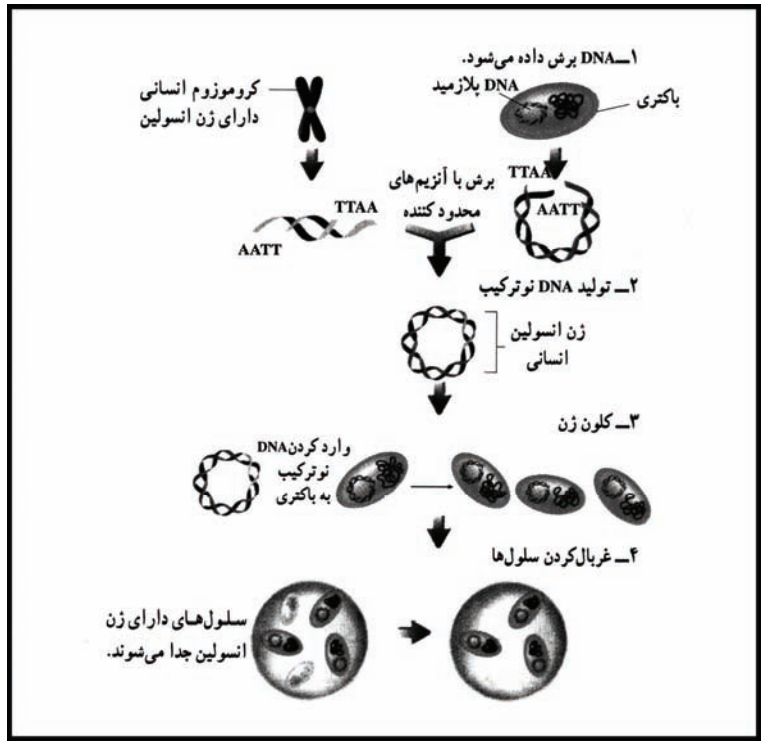
همان‌طور که در جدول «۱» نیز مشاهده می‌کنید، زیرِ برخی از تکنیک‌های مورد استفاده در روند کاریِ مهندسی ژنتیک خط کشیده‌ایم. از آن‌جا که پرداختن به جزییات این روش‌ها از حوصله‌ی این کتاب خارج است ـ ولی دانستن آن‌ها بسیار پرفایده!ـ شما می‌توانید با آن‌ها در کد «۲ ـ ۲» در کتابچه‌ی پیوست به‌طور مفصل آشنا شوید.

مراحل جزیی روند کاری مهندسی ژنتیک	روش‌ها و ابزارهای مربوط	مطابقت با مراحل کتاب درسی	شکل
۱ ـ تشخیص ژن مورد نظر در جان‌دار اولیه	الکتروفورز ـ لکه‌گذاری سادرن ـ استفاده از کاوشگر (دستواره)	مرحله‌ی ۱ کتاب درسی، (DNA، برش داده می‌شود.)	
۲ ـ بریدن دو طرف ژن با آنزیم محدودکننده	آنزیم‌های محدودکننده (مثلاً آنزیم EcoRI)	مرحله‌ی ۱ کتاب درسی، (DNA، برش داده می‌شود.)	
۳ ـ جداسازی ژن بریده شده	الکتروفورز ـ کروماتوگرافی	مرحله‌ی ۱ کتاب درسی، (DNA، برش داده می‌شود.)	
۴ ـ انتخاب حامل یا وکتور مناسب	انواع وکتورها یا حامل‌ها مانند پلازمید یا ویروس	مرحله‌ی ۱ کتاب درسی، (DNA، برش داده می‌شود)	
۵ ـ بریدن یک نقطه از وکتور با همان آنزیم محدودکننده	آنزیم‌های محدودکننده (مثلاً همان آنزیم EcoRI)	مرحله‌ی ۱ کتاب درسی، (DNA، برش داده می‌شود.)	
۶ ـ چسباندن ژن خارجی به وکتور	آنزیم لیگاز	مرحله‌ی ۲ی کتاب درسی، (تولید DNAی نوترکیب)	
۷ ـ وارد کردن DNAی نوترکیب به جان‌دار میزبان	محیط کشت و روش‌های فیزیکی و شیمیایی دیگر	مرحله‌ی ۳ی کتاب درسی، (ژن کلون)	
۸ ـ کلون کردن (تکثیر) ژن	محیط کشت مناسب	مرحله‌ی ۳ی کتاب درسی، (ژن کلون)	
۹ ـ غربال کردن (جدا کردن) میزبان‌های حاوی ژن خارجی (DNAی نوترکیب)	محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک (محیط انتخابی)	مرحله‌ی ۴ کتاب درسی، (غربال کردن سلول‌ها)	
۱۰ ـ I) استخراج محصول بیان‌شده‌ی ژن II) استخراج ژن مورد نظر که تکثیر شده است.	I) خارج از بحث کتاب است. II) آنزیم محدودکننده، الکتروفورز، لکه‌گذاری، دستواره‌ی نشان‌دار	استخراج ژن؛ این مرحله در صفحات مربوط در کتاب درسی پیش‌دانشگاهی، توضیح داده شده است.	

جدول «۱»

مراحل مختلف روند کاری مهندسی ژنتیک و روش‌ها و ابزارهای مربوط به آن

@Gene_Expression



شکل «۵»

مراحل مختلف روندکاری مهندسی ژنتیک

۲ ـ ۲ ـ آنزیم‌های محدودکننده

در رابطه با اهمیت آزمایش کوهن و بایر از لحاظ تاریخی باید اشاره کنیم که: «آن‌ها زمانی موفق به طراحی و اجرای آزمایش خود شدند که اولین **آنزیم اِندونوکلئاز محدودکننده** به‌نام **EcoRI**، در اختیارشان بود». از این‌رو می‌توان گفت، مهم‌ترین کشفی که مهندسی ژنتیک را امکان‌پذیر ساخت، کشف چنین آنزیم‌هایی بود که می‌توانستند مولکول DNA را از یک محل درونی در ساختمان آن، در چند نقطه‌ی مشخص برش دهند. به‌همین خاطر به‌آن‌ها، آنزیم «**اِندونوکلئاز**» می‌گویند. این آنزیم‌ها یعنی **آنزیم‌های محدودکننده** یا Restriction Enzymes، در اواخر دهه‌ی ۱۹۶۰ میلادی، **در باکتری‌ها کشف شدند**.

آنزیم‌های محدودکننده، **بسیار اختصاصی** عمل می‌کنند و تنها **توالی‌های کوچک** (۴ تا ۸ جفت نوکلئوتیدی) خاصی را در **مولکول DNA شناسایی** کرده، آن‌ها را از محل خاصی درون این توالی‌ها **برش** می‌دهند. توالی خاصی که آنزیم، آن را می‌شناسد، **جایگاه تشخیص** یا **جایگاه برش آنزیم** نام دارد. نحوه‌ی شناسایی و عمل آنزیم‌های محدودکننده را با مثال معروف آنزیم EcoRI بررسی می‌کنیم.

آنزیم EcoRI (ایکو R یک، بخوانید!)، از باکتری اشریشیاکلای، اولین آنزیم محدودکننده بود که تخلیص شد. این آنزیم، توالی $\overset{\downarrow}{\text{...GAATTC...}}$ / $\text{...CTTAA}\overset{\uparrow}{\text{G...}}$ را در **DNAی دو رشته‌ای** شناسایی می‌کند، سپس در جایگاه‌های مشخص‌شده با فلش، هر یک از دو رشته‌ی DNA را می‌شکند. بر اثر این شکست، دو انتهای جدید به‌وجود می‌آید، یکی $\text{...AATTC}_{\text{G}}$ و دیگری $_{\text{G}}\text{CTTAA...}$. دقت کنید که **جایگاه تشخیص آنزیم EcoRI**، یک **توالی، ۶ جفت نوکلئوتیدی** است.

این جمله غلط است: EcoRI، پیوند بین A و Gی متعلق به یک رشته‌ی DNA را برش می‌دهد؛ چون اساساً هرگز بین A و G، پیوندی وجود ندارد!

این جمله درست است: EcoRI، پیوند بین **نوکلئوتیدهای** A و Gی متعلق به یک رشته‌ی DNA را برش می‌دهد.

اما چرا «اِندونوکلئاز»؟

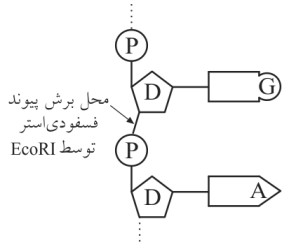
آنزیمی که خاصیت تجزیه و برش‌دادن اسیدنوکلئیک را دارد (نوکلئاز است) و این کار را از قسمتی در **درون رشته** انجام می‌دهد (اِندو = درونی).

نقش آنزیم‌های محدودکننده در باکتری‌ها چیست؟

نقش این آنزیم‌ها در طبیعت، محافظت باکتری‌ها در مقابل ورود DNAی جان‌داران دیگر، مانند گونه‌های دیگر باکتری‌ها و یا DNAی ویروسی است. چنان‌چه DNAی بیگانه‌ای (مثلاً از یک ویروس) وارد باکتری شود، این آنزیم‌ها آن را به قطعه‌های کوچک بریده و از بین می‌برند. این فرایند را «محدودسازی» می‌نامند و از این رو این آنزیم‌ها، محدودکننده نام گرفتند.

در جایگاه تشخیص EcoRI، تعداد ۱۴ پیوند هیدروژنی وجود دارد (...GAATTC... / ...CTTAAG...) که هنگام برش، ۸ عدد آن‌ها گیسخته می‌شوند (بین A و T، **دو** و بین C و G، **سه** پیوند هیدروژنی وجود دارد).

برای تهیه‌ی DNAی خارجی توسط EcoRI، **۴ پیوند فسفودی‌استر** و **۱۶ پیوند هیدروژنی** باید بریده شوند. فعلاً به چراییِ آن فکر کنید تا در پاسخ یکی از تست‌ها جواب را ببینید.



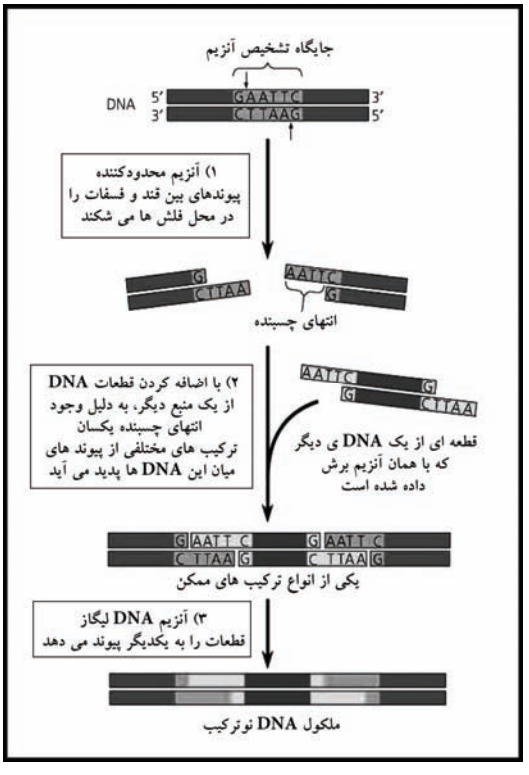
پیش‌ماده‌ی مناسب برای آنزیم‌های محدودکننده، مولکول **DNA** است.

همیشه بعد از عمل‌کرد EcoRI، خارجی‌ترین نوکلئوتید در انتهای چسبنده، نوکلئوتید Aدار است.

....G
....CTTA Ⓐ ⟵ انتهایی‌ترین نوکلئوتید

اما جایگاه تشخیص آنزیم محدودکننده، چه ویژگی‌ای دارد که آنزیم، آن را می‌شناسد؟

به کلماتی مانند «گرگ»، «داماد»، «کپک» و «شپش»(!)، دقت کنید! این کلمات را از هر طرف که بخوانیم، یک‌سان هستند؛ به‌عبارتی، این کلمات دارای نوعی تقارن‌اند. جایگاه شناسایی یا همان **جایگاه تشخیص** آنزیم‌های محدودکننده نیز به همین صورت دارای **نوعی تقارن** است؛ یعنی اگر توالی نوکلئوتیدهای دو رشته‌ی DNAی مربوط به جایگاه تشخیص را از ′۵ به ′۳ (یا برعکس) بخوانیم، متوجه می‌شویم که این توالی‌ها در دو رشته، عین هم هستند. از این‌رو در کتاب درسی نوشته شده که: «توالی دو رشته‌ی جایگاه تشخیص، **عکس یک‌دیگر** هستند.» این ویژگی، یعنی تقارن دو رشته، در مورد جایگاه تشخیص تمامی انواع آنزیم‌های محدودکننده، صادق است. به همین خاطر، تمامی قطعه‌های بریده‌شده با یک آنزیم مشخص، دارای دو انتهای مکمل هستند که می‌توانند با هم جفت شوند. از این‌رو به آن‌ها، «**انتهای چسبنده**» می‌گویند (شکل «۶»).



شکل «۶»

نحوه‌ی عمل‌کرد آنزیم‌های محدودکننده

۷ ـ در انتهای چسبنده‌ی حاصل از عمل‌کرد EcoRI، کدام قطعاً وجود ندارد؟

۱) دئوکسی‌ریبوز ۲) پیوند هیدروژنی ۳) پورین ۴) پیوند فسفودی‌استر

۸ ـ جایگاه تشخیص آنزیم محدودکننده‌ی فرضی، در کدام توالی وجود دارد؟

۱) ...AGTAGT... ۲) ...CTGCTGAT... ۳) ...AGCGCT... ۴) ...TAAGTATA...

چرا آنزیم‌های محدودکننده، DNAی خود باکتریِ دارای آن را برش نمی‌دهند؟

باکتری‌ها، DNAی خود را از طریق افزودن گروه‌های متیل ($-CH_3$) به آدنین‌ها و سیتوزین‌های توالی تشخیص، از بریده شدن محافظت می‌کنند.

چند نکته‌ی مهم در رابطه با آنزیم‌های محدودکننده:

الف) کلیات:

۱) تمامی باکتری‌ها دارای آنزیم‌های محدودکننده هستند.

۲) از آن‌جایی که این آنزیم‌ها، پروتئین‌های پروکاریوتی هستند، لذا به‌طور طبیعی در سیتوپلاسم تولید شده و در همان‌جا هم فعال هستند.

۳) ژن رمزکننده‌ی آنزیم محدودکننده، فقط در باکتری‌ها وجود دارد. یوکاریوت‌ها در ژنوم خود، ژن رمزکننده‌ی این نوع آنزیم را ندارند.

۴) آنزیم‌های محدودکننده، توانایی شکستن هر دو نوع پیوند فسفودی‌استر (بین نوکلئوتیدها) و هیدروژنی (بین بازهای مکمل) را دارند و از این نظر شبیه آنزیم DNA پلی‌مراز (به‌هنگام ویرایش) هستند.

۵ ـ آنزیم‌های محدودکننده می‌توانند هم DNAی پروکاریوتی و هم DNAی یوکاریوتی را برش دهند. به‌شرط آن که جایگاه شناسایی خود را در آن DNA داشته باشند.

ب) کار با آنزیم محدودکننده:

۱) در هنگام بریدن یک ژن به‌کمک آنزیم محدودکننده، باید دقت کرد که درون توالی آن ژن، جایگاه تشخیص وجود نداشته باشد و تنها دو جایگاه تشخیص در دو طرف ژن باشد.

۲) پلازمیدی (یا هر وکتور یا حامل دیگری) که قرار است با همان آنزیمِ محدودکننده‌ی برش‌دهنده‌ی ژنِ مورد نظر بریده شود، باید تنها یک جایگاه تشخیص داشته باشد، زیرا در غیر این صورت قطعه‌قطعه می‌شود.

ج) انتهای چسبنده:

۱) انتهای چسبنده، به‌صورت یک قطعه **DNAی تک‌رشته‌ای** و **فاقد پیوند هیدروژنی** در انتهای مولکول DNAی برش‌یافته، وجود دارد.

۲) انتهای چسبنده‌ای که توسط یک آنزیم خاص به‌وجود آمده، اگر با هر انتهای چسبنده‌ی دیگری که با **همان** آنزیم، برش‌خورده، مواجه شود، با آن پیوند برقرار می‌کند.

۳ ـ انتهای چسبنده، **محصول** عمل‌کرد **آنزیم محدودکننده** است.

۴ ـ در DNAی خطی، به‌ازای وجود n جایگاه تشخیص برای آنزیم محدودکننده، $n+1$ **قطعه** و $2n$ **انتهای چسبنده** به‌وجود می‌آید (به نمونه‌ی حاشیه‌ی مقابل توجه کنید).

۵ ـ در DNAی حلقوی، به‌ازای وجود n جایگاه تشخیص برای آنزیم محدودکننده، n **قطعه** و $2n$ **انتهای چسبنده**، به‌وجود می‌آید (به نمونه‌ی حاشیه‌ی مقابل توجه کنید).

آنزیم‌های محدودکننده، قادر به بریدن هر نوع DNA (**پروکاریوتی** و **یوکاریوتی**) هستند.

آنزیم‌هایی که قادرند پیوندهای هیدروژنی را برش دهند:
۱ ـ RNA پلی‌مراز
۲ ـ هلیکاز
۳ ـ محدودکننده نظیر EcoRI
۴ ـ DNA پلی‌مراز (هنگام فعالیت ویرایشی خود)

آنزیم‌هایی که قادرند پیوند فسفودی استر را برش دهند:
۱ ـ محدودکننده
۲ ـ DNA پلی‌مراز (هنگام فعالیت ویرایشی خود)
DNA پلی‌مراز، هم در واکنش سنتز آب‌دهی (هنگام همانندسازی DNA) و هم در واکنش هیدرولیز (هنگام ویرایش) شرکت می‌کند.

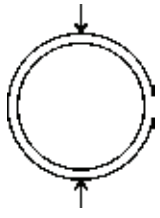
آنزیم‌هایی که پیوند فسفودی‌استر را برقرار می‌کنند:
۱ ـ DNA پلی‌مراز
۲ ـ RNA پلی‌مراز
۳ ـ DNA لیگاز

DNAی خطی زیر را با **۲ جایگاه تشخیص**، برای نوعی آنزیم محدودکننده در نظر بگیرید.

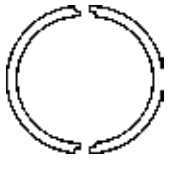
پس از انجام برش، **۳ قطعه** تولید می‌شود.

مشاهده می‌کنید که **۴ انتهای چسبنده** به‌وجود آمد.

حال اگر DNA، حلقوی باشد:



پس از انجام برش، دو قطعه حاصل می‌شود که ۴ انتهای چسبنده در قطعات مشاهده می‌کنید.



۹ ـ کدام جمله نادرست است؟

۱) EcoRI، برای گسیختن DNA در یک جایگاه تشخیص، دو پیوند فسفودی‌استر را می‌شکند.

۲) در برش DNA، توسط EcoRI در جایگاه تشخیص، پیوند هیدروژنی شکسته می‌شود.

۳) در انتهای چسبنده‌ی حاصل از برش DNA توسط EcoRI، همیشه نوکلئوتید Aدار وجود دارد.

۴) در جایگاه تشخیص EcoRI، هشت پیوند هیدروژنی وجود دارد.

۱۰ ـ اگر توالی AGCG?T، جایگاه تشخیص مناسبی برای آنزیم محدودکننده‌ی فرضی باشد، علامت سؤال کدام است؟

۱) A　　۲) C

۳) G　　۴) T

۲ ـ ۳ ـ وِکتورها یا حامل‌ها

برگی از کتاب درسی پیش‌دانشگاهی

بعد از آن که ژن مورد نظر را از ژنوم جدا کردیم، به‌وسیله‌ای نیاز داریم که آن را به درون سلول باکتری هدایت کند؛ این وسیله را **حامل** یا **وکتور** می‌نامند. از معمول‌ترین وکتورها، می‌توان **پلازمیدها** و **ویروس‌ها** را نام برد.

پلازمیدها، مولکول‌های **DNAی حلقوی کوچکی** هستند که در **بعضی** از باکتری‌ها وجود دارند. پلازمیدها را «**کروموزوم‌های کمکی**» نیز می‌نامند، چون حاوی ژن‌هایی هستند که در کروموزوم اصلی باکتری وجود **ندارند**؛ مثلاً **ژنِ مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک** در پلازمیدها قرار دارد.

پلازمیدها می‌توانند **مستقل** از کروموزوم اصلی، **همانندسازی** کنند. معنی این جمله این است که پلازمیدها می‌توانند حتی در مواقعی که باکتری در حال تولیدمثل **نیست**، **همانندسازی کنند**. مهندسان ژنتیک، ژن مورد نظر را درون پلازمید قرار می‌دهند. به این ترتیب، هرگاه که پلازمید، همانندسازی می‌کند، ژن مورد نظر نیز همانندسازی می‌کند و به این ترتیب بر تعداد نسخه‌های آن، دائماً افزوده می‌شود.

پلازمیدها به‌دلیل کوچکی، با سرعت **بیش‌تری** نسبت به کروموزوم اصلی باکتری (یک DNAی حلقوی دو رشته‌ای بزرگ) می‌توانند همانندسازی کنند. پلازمیدهایی که در مهندسی ژنتیک کاربرد دارند، باید چند ویژگی مهم داشته باشند:

۱) باید فقط دارای **یک جایگاه** تشخیص برای **همان** آنزیم محدودکننده‌ای باشند که با آن، مولکول DNAی خارجی را برش داده‌اند؛ چرا که در صورت بیش از یکی بودن جایگاه تشخیص، پلازمید قطعه‌قطعه می‌شود (تعداد قطعه‌ها به‌ازای n جایگاه تشخیص، n قطعه است) و اگر با همان آنزیم برش داده **نشود**، انتهای چسبنده‌ی آن، **مکمل** انتهای چسبنده‌ی ژن خارجی نخواهد بود.

۲) باید **ژنِ مقاومت به آنتی‌بیوتیک** خاصی را داشته باشد تا در مرحله‌ی **غربال‌گری** از آن استفاده شود.

۳) باید **جایگاه آغاز همانندسازی** داشته باشد تا آنزیم‌های **هلیکاز** (بازکننده‌ی دو رشته‌ی DNA) و نیز آنزیم **DNA پلی‌مراز**، بتوانند کار همانندسازی را از آن نقطه شروع کنند.

@Gene_Expression

برگی از کتاب درسی پیش‌دانشگاهی

از دیگر **وکتورها** می‌توان به **باکتریوفاژها** اشاره کرد. باکتریوفاژها، **ویروس‌هایی‌اند** که **میزبان** آن‌ها **باکتری‌ها** هستند. وقتی باکتریوفاژ، باکتری را آلوده می‌کند، DNAی آن در سلول میزبان، شروع به همانندسازی می‌کند. با قرار دادن ژن خارجی در DNAی باکتریوفاژ، امکان تکثیرژن [در سلول باکتری] فراهم می‌شود.

در ویروس‌ها، DNA یا RNA وجود دارد. **باکتریوفاژها** از جمله **ویروس‌های DNAدار** هستند؛ در غیر این صورت نمی‌توانند به‌عنوان وکتور استفاده شوند. وکتور، قرار است **DNAی خارجی** را به درون سلول میزبان حمل کند.

همان‌طور که جلوتر خواهید دید، کاربرد ویروس‌ها به‌عنوان وکتور، تنها به باکتریوفاژها محدود نمی‌شود؛ مثلاً برای انتقال بسیاری از ژن‌ها در فرایند ژن‌درمانی، امروزه از ویروس‌های دست‌کاری‌شده و غیربیماری‌زا استفاده می‌شود. **مهم‌ترین مزیت استفاده از ویروس، اختصاصی بودن سلول میزبان آن است.** به این ترتیب می‌توان ژن خاصی را که درون یک ویروس خاص وارد کرده‌ایم، به درون یک سلول خاص وارد کنیم.

۱۱ ـ در خصوص پلازمیدها، کدام نادرست است؟

۱) می‌توانند با سرعت بیش‌تری نسبت به کروموزوم اصلی باکتری، همانندسازی کنند.
۲) ممکن نیست در مواقعی که باکتری در حال تولیدمثل نیست، همانندسازی کنند.
۳) ممکن نیست حاوی ژن‌هایی باشند که در کروموزوم اصلی باکتری وجود دارند.
۴) ممکن است در بعضی باکتری‌ها به‌صورت کروموزوم کمکی وجود داشته باشند.

۱۲ ـ کدام نمی‌تواند جزء معمول‌ترین وکتورها باشد؟

۱) باکتریوفاژ ۲) ویروس ۳) باکتری ۴) پلازمید

۱۳ ـ اگر در یک پلازمید، n جایگاه تشخیص برای نوعی آنزیم محدودکننده وجود داشته باشد، پس از اثر آن آنزیم، چند قطعه DNA ایجاد می‌شود و چند انتهای چسبنده شکل می‌گیرد؟ (به‌ترتیب از راست به چپ)

۱) $2n$ ، $n+1$ ۲) $2n$ ، n ۳) n ، $n+1$ ۴) n ، n

۱۴ ـ کدام یک در مورد پلازمید نادرست است؟ *(سنجش ـ ۸۱)*

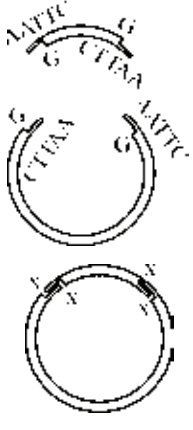
۱) DNAی دو رشته‌ای حلقوی است.
۲) قابل استفاده برای کلون کردن است.
۳) در خارج سلول فعال است.
۴) گاهی دارای ژنِ مقاومت است.

۲ ـ ۴ ـ ایجاد مولکول DNAی نوترکیب

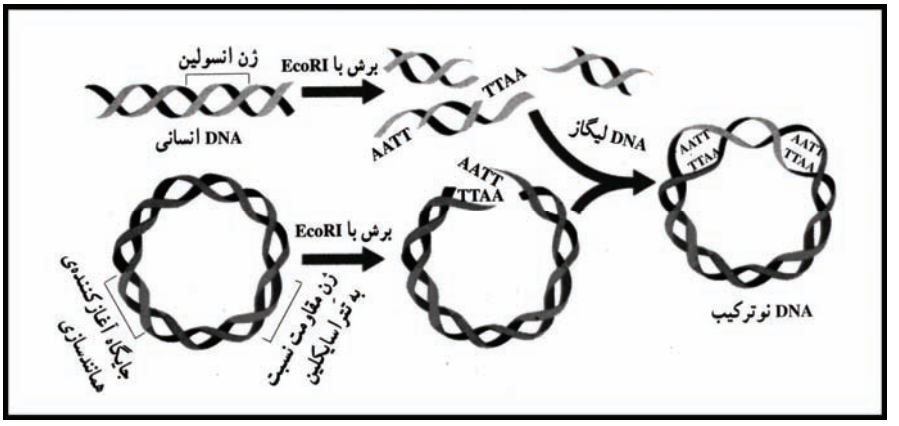
برگی از کتاب درسی پیش‌دانشگاهی

وقتی ژن مورد نظر که از این پس آن را **ژن خارجی** می‌نامیم، درون پلازمید قرار می‌گیرد، در واقع DNAی جدیدی ساخته می‌شود که از ترکیب دو DNAی متفاوت ـ یکی ژن خارجی و دیگری پلازمید ـ حاصل شده است. این DNA را **DNAی نوترکیب** می‌نامند. **ساختن DNAی نوترکیب**، یکی از **اصلی‌ترین** مراحل مهندسی ژنتیک است. از این‌رو مهندسی ژنتیک را «**فن‌آوری DNAی نوترکیب**» نیز می‌نامند.

برای ساختن مولکول DNAی نوترکیب، به دو نوع آنزیم نیاز داریم. یکی برای بریدن پلازمید و قرار دادن ژن خارجی در آن (قیچی مولکولی) و دیگری برای اتصال دو سر ژن خارجی به پلازمید (چسب مولکولی). توجه داشته باشید که منظور از **بریدن DNA**، **قطع پیوند فسفودی‌استر** و منظور از **اتصال دو DNA**، **برقراری پیوند فسفودی** استر میان دو DNA است.



آنزیم محدودکننده‌ای که برای بریدن پلازمید استفاده می‌شود، باید **همان** آنزیمی باشد که دو سر ژن خارجی با آن بریده شده است، در این صورت، انتهای چسبنده‌ی یکی به انتهای چسبنده‌ی دیگری متصل می‌شود. این **اتصال** توسط **پیوندهای هیدروژنی** صورت می‌گیرد، نه پیوند فسفودی‌استر [از این‌رو نیازی به آنزیم ندارد]. برای **برقراری پیوند فسفودی‌استر** میان دو DNA، مهندسان ژنتیک، از آنزیمی به‌نام **لیگاز** استفاده می‌کنند (شکل «۷»).



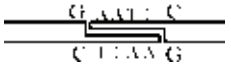
شکل «۷»
ساخته شدن DNAی نوترکیب

با توجه به توضیحات مبسوطی که در رابطه با آنزیم‌های محدودکننده ارایه شد و نیز توضیحات کتاب درسی در مورد چگونگی ساخته‌شدن مولکول DNAی نوترکیب، توضیح دیگری باقی نمانده است که بخواهیم به آن اشاره کنیم! به مطالعه‌ی بخش‌های بعدی ادامه دهید!

اگر آنزیم محدودکننده، EcoRI باشد برای تولید DNAی نوترکیب باید **۴ پیوند فسفودی‌استر** و **۱۶ پیوند هیدروژنی** برقرار شود. به‌شکل حاشیه‌ی روبه‌رو توجه کنید.

xها محل‌های برقراری پیوند فسفودی‌استر توسط لیگاز هستند. در انتهای چسبنده هنگام برقراری رابطه‌ی مکملی بین بازها، ۸ پیوند هیدروژنی شکل می‌گیرد، یعنی در دو طرف، ۱۶ پیوند هیدروژنی تشکیل می‌شود.

[بین A و T، دو پیوند هیدروژنی]



۱۵ ـ کدام آنزیم، هم در واکنش سنتز آب‌دهی و هم در واکنش هیدرولیز شرکت می‌کند؟
۱) DNA پلی‌مراز ۲) EcoRI ۳) RNA پلی‌مراز I ۴) DNA لیگاز

۱۶ ـ چند مورد از آنزیم‌های زیر، توانایی شکستن پیوند هیدروژنی را دارند؟
☐ EcoRI ☐ DNA پلی‌مراز ☐ DNA لیگاز ☐ هلیکاز ☐ RNA پلی‌مراز
۱) ۲ ۲) ۳ ۳) ۴ ۴) ۵

۱۷ ـ عمل کدام آنزیم در تولید DNAی نوترکیب مقدم بر سایرین است؟
۱) DNA لیگاز ۲) محدودکننده ۳) DNA پلی‌مراز ۴) هلیکاز

۲ ـ ۵ ـ وارد کردن DNAی نوترکیب به باکتری (آلوده‌سازی)

بعد از آن که DNAی نوترکیب ساخته شد، آن را در یک محیط کشت معمولی کامل، در مجاورت باکتری‌ها قرار می‌دهند تا باکتری، آن‌ها را جذب کند. باکتری‌ها به‌طور طبیعی قادر به جذب تعدادی از پلازمیدها هستند؛ البته **همه‌ی باکتری‌ها موفق به جذب DNAی نوترکیب** نمی‌شوند، اما **تعداد کمی** از آن‌ها، DNAی نوترکیب را جذب می‌کنند. این پدیده، دقیقاً همان اتفاقی است که در آزمایش گریفیت رخ داده بود: «جذب DNAی باکتری‌های استرپتوکوکوس نومونیای کپسول‌دارِ کشته شده با حرارت، توسط باکتری‌های زنده‌ی فاقد کپسول و رخ دادن ترانسفورماسیون».

امروزه در آزمایشگاه، با استفاده از تیمارهای شیمیایی (استفاده از مواد شیمیایی خاص و غلظت زیاد Ca^{2+}) و یا فیزیکی (استفاده از امواج فراصوت، حرارت و ...)، باعث می‌شوند، میزان جذب پلازمیدها توسط باکتری‌ها، زیادتر شود.

۲ ـ ۶ ـ کلون کردن (تکثیر) ژن

DNAی نوترکیب بعد از ورود به باکتری، با استفاده از دستگاه همانندسازی باکتری (آنزیم‌های هلیکاز و DNA پلی‌مراز باکتریایی)، همانندسازی می‌کند و در نتیجه‌ی همانندسازی‌های پی‌درپی DNAی نوترکیب، نسخه‌های متعددی از آن و در نتیجه، ژن خارجی ساخته می‌شود. **وقتی از یک ژن، نسخه‌های یک‌سان متعدد ساخته می‌شوند، می‌گویند آن ژن، کلون شده است.**

واژه‌ی «کلون» از علم میکروبیولوژی دریافت شده است. در پی تقسیم‌های دوتاییِ متوالیِ یک باکتری، کلونی باکتری‌ها تولید می‌شود.

۲ ـ ۷ ـ غربال کردن

در این مرحله، مهندسان ژنتیک باید باکتری‌هایی را که DNAی نوترکیب جذب کرده‌اند، از باکتری‌هایی که DNAی نوترکیب را جذب نکرده‌اند، جدا کنند؛ این کار را «**غربال کردن**» می‌نامند. به‌یاد دارید که گفتیم یکی از ویژگی‌های پلازمیدی که برای ساخت DNAی نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرد، این است که «باید ژنِ مقاومت به آنتی‌بیوتیک خاصی را دارا باشد»؛ بنابراین، آن باکتری‌هایی که DNAی نوترکیب را جذب کرده‌اند، نسبت به آن آنتی‌بیوتیک خاص (مثلاً تتراسایکلین)، مقاوم شده‌اند. به این ترتیب، می‌توان **با اضافه‌کردن تتراسایکلین** به محیط کشت باکتری‌ها، غربال‌گری را انجام داد. باکتری‌هایی که DNAی نوترکیب را جذب **نکرده‌اند**، بعد از اضافه کردن تتراسایکلین **می‌میرند** و فقط آن‌هایی زنده می‌مانند که DNAی نوترکیب را **جذب** کرده‌اند (شکل «۸»).

شکل «۸»
غربال‌گری، باکتری‌هایی که پلازمید حاوی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک را جذب کرده‌اند، زنده می‌مانند.

۱ ـ آنتی‌بیوتیک‌ها با تداخل در فرایندهای سلولی نظیر همانندسازی DNA، رونویسی و ترجمه، موجب مرگ **باکتری‌ها (سلول‌های پروکاریوتی)** می‌شوند. پس برای غربال کردن سلول‌های **یوکاریوتی** که DNAی نوترکیب را دریافت کرده‌اند باید به روش‌های دیگری متوسل شد!
۲ ـ **اریترومایسین** نوعی داروی آنتی‌بیوتیکی است که با ایجاد اختلال در فرایند **ترجمه (پروتئین‌سازی)**، موجب مرگ باکتری می‌شود.

در مرحله‌ی غربال کردن، ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک خاص توسط **RNA پلی‌مراز پروکاریوتی** رونویسی می‌شود. mRNAی حاصل، مورد ترجمه قرار می‌گیرد، پروتئینِ مقاوم به آنتی‌بیوتیک تولید می‌شود و باکتری میزبان را نسبت به آنتی‌بیوتیک خاص، مقاوم می‌کند.

در خیلی از موارد، مراحل کلون شدن و غربال‌گری، هم‌زمان و در یک محیط کشت انتخابی صورت می‌گیرد. علاوه بر این، می‌توان به محیط کشت، موادی افزود که باکتری‌های حاوی DNAی نوترکیب، بتوانند پس از جذب و ایجاد تغییر شیمیایی بر روی آن‌ها، با تغییر رنگ در کلونی‌ها، متمایز شوند.

۱۸ ـ در کروموزوم اصلی نوعی باکتری که نسبت به تتراسایکلین مقاوم است، کدام ژن یا توالی ژنی قطعاً وجود ندارد؟
۱) RNA پلی‌مراز
۲) مقاومت به تتراسایکلین
۳) آنزیم محدودکننده
۴) اپراتور

۱۹ ـ در مرحله‌ی آلوده‌سازی، تعداد ..... از باکتری‌ها، DNAی نوترکیب را دریافت می‌کنند که در مرحله‌ی غربال کردن، این باکتری‌ها .....
۱) کمی ـ زنده می‌مانند.
۲) زیادی ـ می‌میرند.
۳) کمی ـ می‌میرند.
۴) زیادی ـ زنده می‌مانند.

۲۰ ـ در مهندسی ژنتیک، کدام در مرحله‌ی غربال کردن باکتری‌های میزبان مورد استفاده قرار نمی‌گیرد؟
۱) اریترومایسین
۲) تتراسایکلین
۳) پنی‌سیلین
۴) اریتروپویتین

۲۱ ـ هدف از غربال کردن سلول‌های کلون شده چیست؟ *(سنجش ـ ۸۲)*
۱) تکثیر سلول میزبان
۲) جدا کردن سلول‌های حاوی وکتور از بقیه‌ی سلول‌ها
۳) تکثیر وکتور در سلول میزبان
۴) مقاوم کردن سلول به آنتی‌بیوتیک

@Gene_Expression

۲ ـ ۸ ـ استخراج ژن تکثیرشده

حال ژن مورد نظر ما که به پلازمید متصل شده، درون باکتری تکثیر شده است و باید آن را از سلول‌های باکتری استخراج کنیم. این کار در دو مرحله انجام می‌شود:

اول) شکافتن باکتری‌ها و جدا کردن پلازمیدها از عصاره‌ی سلول باکتری.

دوم) استخراج ژن خارجی از پلازمید.

برای مرحله‌ی اول می‌توان ابتدا به‌راحتی توسط امواج فراصوتی، سلول باکتری را شکافت و عصاره‌ی آن را گرفت و در درجه‌ی بعدی، عصاره‌ی سلولی را سانتریفیوژ کرد تا پلازمیدها، از بقیه‌ی سیتوپلاسم جدا شوند.

یکی دیگر از روش‌های انهدام سلول‌های باکتری، استفاده از آنزیم لیزوزیم است که قادر به تخریب دیواره‌ی سلولی باکتری می‌باشد. لیزوزیم، یک آنزیم یوکاریوتی است ولی بر پروکاریوت اثر دارد.

در مرحله‌ی دوم یعنی برای جدا کردن ژن از DNAی نوترکیب، باز هم به **آنزیم محدودکننده** نیاز داریم. باید **از همان** آنزیمی استفاده کنیم که قبلاً برای ساختن DNAی نوترکیب استفاده کردیم. بر اثر این آنزیم، پلازمید و ژن خارجی را از یک‌دیگر جدا می‌کنیم. حال در لوله‌ی آزمایش، مخلوطی داریم از دو نوع DNA: یکی پلازمید و دیگری ژن خارجی.

۲ ـ ۹ ـ تفکیک ژن خارجی و پلازمید از هم، به‌کمک الکتروفورز در ژل

در مرحله‌ی قبل تا آن‌جا پیش رفتیم که در لوله‌ی آزمایش، مخلوطی از DNAی خارجی و پلازمید در اختیار داشتیم و می‌خواستیم ژن خارجی را از پلازمید جدا کنیم. این دو را به‌کمک روش‌هایی مانند سانتریفیوژ، استفاده از صافی و دیگر روش‌های متداول، نمی‌توان از یک‌دیگر جدا کرد؛ بنابراین باید به سراغ تکنیک خاصی برویم که بر مبنای خواص ذاتی این درشت‌مولکول‌ها، بتوانیم آن‌ها را از هم جدا نماییم. تفکیک ژن خارجی و پلازمید، به‌کمک تکنیکی به‌نام «**الکتروفورز در ژل**» انجام می‌شود.

الکتروفورز، در حقیقت نوعی کروماتوگرافی پیش‌رفته است که در دهه‌ی ۱۹۶۰ میلادی ابداع شد و جهش بزرگی در توانایی جداسازی پروتئین‌ها (در ابتدای ابداع این روش) و سپس جداسازی اسیدهای نوکلئیک و امروزه حتی کروموزوم‌های کوچک برخی جان‌داران، به‌وجود آورد.

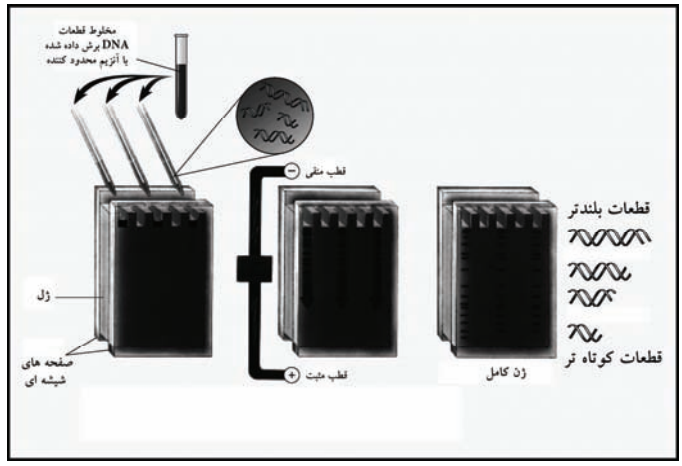
الکتروفورز در ژل، تکنیکی خاص برای جداسازی درشت‌مولکول‌ها، براساس میزان حرکت آن‌ها از خلال منافذ یک ماده‌ی ژلاتینی ویژه و تحت اثر یک میدان الکتریکی است. همان‌طور که در «بیش‌تر بدانید» کتاب درسی نیز خوانده‌اید، معنی کلمه‌ی الکتروفورز، حمل شدن به‌کمک الکتریسیته است.

در این روش، پروتئین‌ها یا قطعات اسیدنوکلئیکی که وزن مولکولی یا بار الکتریکی شبیه به هم دارند و جداسازی آن‌ها با روش‌های معمولی امکان‌پذیر نیست، از یک‌دیگر جدا می‌شوند. از آن‌جا که مقدار درشت‌مولکول‌هایی که برای انجام الکتروفورز به‌کار گرفته می‌شود، کم است، جداسازی (خالص‌سازی)، معمولاً با روش‌های دیگر شروع می‌شود تا بیش‌تر ناخالصی‌ها حذف شوند و الکتروفورز در مرحله‌ی آخر جداسازی انجام گیرد. پس از الکتروفورز، درشت‌مولکول‌ها یا رنگ‌آمیزی شده و یا آن‌هایی که خود، خاصیت فلوئورسانس دارند، تحت اشعه‌ی فرابنفش، بررسی می‌شوند. در این حالت، درشت‌مولکول‌های تفکیک‌شده، به‌صورت نوارهای جداگانه، مشاهده می‌شوند؛ بنابراین می‌توان گفت علاوه بر جداسازی، الکتروفورز، روش مناسبی برای **تشخیص میزان خلوص نمونه** نیز هست. در نمونه‌ی **کاملاً خالص**، فقط **یک نوار** باید مشاهده شود.

الکتروفورز برای جداسازی اسیدهای نوکلئیک کوچک، روی ژل‌های خاصی به‌نام «پلی‌آکریل‌آمید» انجام می‌شود. مولکول‌های پلی‌آکریل‌آمید، نوعی کربوهیدرات هستند که در شرایط مناسب به یک‌دیگر متصل شده و شبکه‌ای سه‌بعدی از پلی‌آکریل‌آمید، با منافذی به اندازه‌های متفاوت تشکیل می‌دهند که حالت ژل دارد.

ژل به‌شکل یک ورقه‌ی مستطیلی‌شکل است. نمونه‌ای که مخلوطی از چند اسیدنوکلئیک می‌باشد، روی چاهک‌هایی که در یک سمت ژل وجود دارد، قرار می‌گیرد و پس از ایجاد میدان الکتریکی، اسیدهای نوکلئیک به‌حرکت درمی‌آیند و طول ژل را طی می‌کنند (شکل «۹»). میدان الکتریکیِ ایجاد

شده به‌کمک یک منبع تغذیه، به‌گونه‌ای است که همواره قطب منفی در بالا و قطب مثبت در پایین قرار دارد.



شکل «۹»

الکتروفورز درشت‌مولکول‌ها بر روی ژل [پلی‌آکریل آمید]

اسیدهای نوکلئیک به‌علت داشتن بار منفی ناشی از وجود گروه‌های فسفات (PO_4^{3-})، در میدان الکتریکی به‌حرکت درمی‌آیند، از میان حفره‌ها در شبکه‌ی سه‌بعدی ژل [پلی‌آکریل آمید] عبور کرده، طول ژل را طی می‌کنند و به‌سمت قطب مثبت به پایین می‌روند. مولکول‌های کوچک‌تر، سریع‌تر از مولکول‌های بزرگ‌تر حرکت می‌کنند، زیرا درصد بیش‌تری از منافذ، مولکول‌های کوچک را از خود عبور می‌دهند.

در نتیجه‌ی الکتروفورز، مولکول‌هایی که به یک اندازه هستند در یک ردیف (یک نوار) قرار می‌گیرند و به این ترتیب، موقعیت آن‌ها در ژل، به‌صورت نوارهایی مشاهده می‌شود؛ بنابراین بعد از اتمام الکتروفورزِ مخلوط دو نوع DNAی پلازمیدی و خارجی، دو نوار در ژل خواهیم دید. نواری که به **قطب مثبت نزدیک‌تر** است، حاوی مولکول‌های کوچک‌تر، یعنی **DNAی خارجی** است و نوار دیگر، حاوی **مولکول‌های بزرگ‌تر**، یعنی **پلازمید** است.

نکته‌های مهم

تعداد نوارها روی ژل الکتروفورز، **تعداد** انواع مولکول‌های موجود در مخلوط یا نمونه را **معرفی** می‌کند، ولی **پهنای** هر نوار متناسب با **مقدار** آن مولکول در نمونه است.

فاصله‌ی مولکول‌ها از بالای ژل (چاهک ژل)

$$\propto \frac{1}{\text{وزن مولکولی و یا تعداد پیوند بین مونومرهای مولکول}}$$

در الکتروفورز، هم اسیدهای نوکلئیک و هم پروتئین‌ها براساس **اختلاف در اندازه**، جداسازی می‌شوند.

خلاصه‌ای از مراحل اساسی ازدیاد ژن در مهندسی ژنتیک، عبارتند از:

۱ ـ تهیه‌ی DNAی خارجی و خطی کردن پلازمید توسط آنزیم محدودکننده.

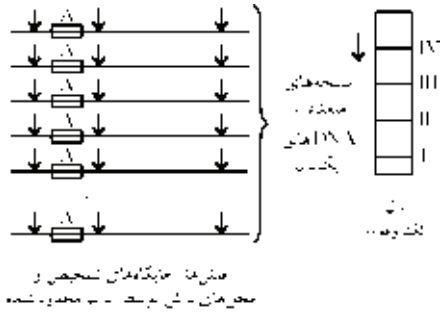
۲ ـ **تولید DNAی نوترکیب** (توسط DNAی لیگاز) که یکی از **اصلی‌ترین** مراحل مهندسی ژنتیک است.

۳ ـ کلون کردن، که هلیکاز و DNA پلی‌مراز در این مرحله عمل می‌کنند.

۴ ـ غربال کردن، که در این مرحله، ژنِ مقاومت به آنتی‌بیوتیک توسط **RNA پلی‌مراز، باکتری**، رونویسی می‌شود.

در عمل، مشاهده می‌شود که بین میزان حرکت درشت‌مولکول‌ها و وزن مولکولی آن‌ها، رابطه‌ای خطی با شیب منفی برقرار است. از این رو، الکتروفورز نه‌تنها جداسازی بهینه‌ی درشت‌مولکول‌ها را ممکن می‌سازد، بلکه روش خوبی برای تعیین وزن مولکولی آن‌ها نیز هست. در مورد DNA، قطعه‌های کوچک DNA با کم‌تر از ۲۰۰۰ ـ ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید روی ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید تفکیک می‌شوند. برای جداسازی قطعه‌های بزرگ‌تر تا حدود ۱۵۰۰۰ جفت نوکلئوتید، از ژل‌های آگاروز که دارای منفذهای بزرگ‌تری هستند، استفاده می‌شود.

۲۲ ـ با توجه به شکل مقابل، توالی‌های بخش A، در کدام نوار، روی ژل الکتروفورز قرار می‌گیرند؟

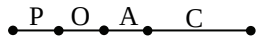


۱) I
۲) II
۳) III
۴) IV

۲۳ ـ هر چه ..... نوارهای روی ژل الکتروفورز بیش‌تر باشد، مقدار آن مولکول در نمونه (مخلوط مولکول‌ها) ..... است.

۱) ضخامت ـ کم‌تر
۲) ضخامت ـ بیش‌تر
۳) تعداد ـ بیش‌تر
۴) تعداد ـ کم‌تر

۲۴ ـ اگر قطعات ایران زیر، الکتروفورز شوند، بالاترین قطعه روی ژل کدام خواهد بود؟ *(سنجش ـ ۸۲)*



۱) A
۲) C
۳) O
۴) P

۲۵ ـ عبارت صحیح کدام است؟ *(سراسری ـ ۹۰ ـ خارج از کشور)*

۱) تعداد کمی از باکتری‌ها می‌توانند DNAی نوترکیب را جذب و به کلون کردن ژن بپردازند.
۲) اکثر آنزیم‌های محدودکننده، توالی‌های بلند و خاصی از DNA را شناسایی می‌کنند و برش می‌دهند.
۳) برخی آنزیم‌های محدودکننده، قطعاتی از DNAی کوتاه تک‌رشته‌ای با انتهای چسبنده تولید می‌کنند.
۴) کروموزوم‌های کمکی در بسیاری از باکتری‌ها وجود دارند و مستقل از کروموزوم‌های اصلی همانندسازی می‌کنند.

۲ ـ ۱۰ ـ پس از الکتروفورز

در خیلی از موارد پس از اتمام الکتروفورز و تشکیل نوارها، اگر چندین نوار داشته باشیم که به هم خیلی نزدیک باشند، باید به طریقی ژن مورد نظر خود را شناسایی کنیم. این کار توسط تکنیکی به‌نام لکه‌گذاری سادرن یا انتقال ژن مورد نظر از ژل الکتروفورز به کاغذ صافی مخصوص، انجام می‌شود. با جزییات این تکنیک، می‌توانید در «بیش‌تر بدانید» صفحه‌های مربوط، در کتاب درسی و یا در کد «۲ ـ ۲» در کتابچه‌ی پیوست، آشنا شوید.

@Gene_Expression

پاسخ تست ها

۱ ـ گزینه‌ی ۱ در نخستین دست‌ورزی ژنتیکی، ژن رمزکننده‌ی نوعی rRNA از کروموزوم قورباغه خارج و به DNAی E.coli منتقل شد. rRNA در یوکاریوت، توسط **RNA پلی‌مراز I** ساخته می‌شود.

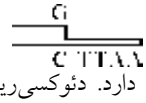
۲ ـ گزینه‌ی ۳ اولین جان‌دار دست‌ورزی‌شده، E.coli بود که فعال‌کننده ندارد. **فعال‌کننده** نوعی عامل رونویسی است که فقط در **یوکاریوت‌ها** وجود دارد.

۳ ـ گزینه‌ی ۳ نخستین جان‌دارِ تغییریافته‌ی ژنتیکی، E.coli بود. باکتری‌ها هسته و هستک **ندارند**.

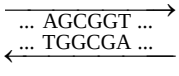
۴ ـ گزینه‌ی ۱ اولین جان‌دار دست‌ورزی‌شده‌ی ژنتیکی، E.coli بود که ژن rRNAی قورباغه را وارد DNA ی آن کردند.

۵ ـ گزینه‌ی ۴ کوهن و بایر، **ژن** رمزکننده‌ی نوعی rRNAی قورباغه را وارد E.coli کردند نه خودِ rRNA را! این ژن توسط **RNA پلی‌مراز باکتری** رونویسی شد و **rRNAی قورباغه** تولید شد که **قابل ترجمه نیست**.

۶ ـ گزینه‌ی ۱

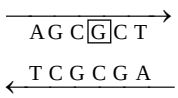
۷ ـ گزینه‌ی ۲ انتهای چسبنده، **تک‌رشته‌ی** DNA است و رابطه‌ی **مکملی** در این بخش **برقرار نیست**، پس پیوند هیدروژنی **ندارد**. در این انتها توالی به‌صورت  می‌باشد یعنی هم پورین (A) و هم پیریمیدین (T) وجود دارد. دئوکسی‌ریبونوکلئوتیدها، که قند دئوکسی‌ریبوز دارند به‌واسطه‌ی پیوند فسفودی‌استر به هم متصل‌اند.

۸ ـ گزینه‌ی ۳ توالی دو رشته‌ی جایگاه تشخیص آنزیم محدودکننده، عکس یک‌دیگر هستند. این شرط فقط در گزینه‌ی ۳ دیده می‌شود.



۹ ـ گزینه‌ی ۴ جایگاه تشخیص EcoRI دارای توالی GAATTC / CTTAAG است که در آن **۱۴ پیوند هیدروژنی** وجود دارد (چون بین C و G، سه پیوند هیدروژنی و بین A و T، دو پیوند هیدروژنی وجود دارد). **بیرونی‌ترین** نوکلئوتید در انتهای چسبنده‌ی حاصل از این برش، نوکلئوتید **Aدار** است.

۱۰ ـ گزینه‌ی ۲ توالی دو رشته‌ی جایگاه تشخیص آنزیم محدودکننده، **عکس** یک‌دیگر هستند.



۱۱ ـ گزینه‌ی ۲ **همانندسازی پلازمید**، ممکن است هنگامی که باکتری تولیدمثل نمی‌کند، انجام شود، یعنی **مستقل** از همانندسازی کروموزوم اصلی باکتری می‌تواند، انجام شود.

۱۲ ـ گزینه‌ی ۳ معمول‌ترین **وکتورها**، **پلازمیدها** و **ویروس‌ها** (مثل باکتریوفاژ) هستند. باکتری‌ها هرگز به‌عنوان وکتور استفاده نمی‌شوند.

۱۳ ـ گزینه‌ی ۲ در DNAی خطی در صورت وجود n جایگاه تشخیص، n+۱ قطعه و ۲n انتهای چسبنده ایجاد می‌شود، ولی در DNAی حلقوی در صورت وجود n جایگاه تشخیص، n قطعه و ۲n انتهای چسبنده ایجاد می‌شود.

۱۴ ـ گزینه‌ی ۳ پلازمیدها، کروموزوم‌های کمکی هستند که به‌طور طبیعی درون سلول فعال‌اند.

۱۵ ـ گزینه‌ی ۱ DNA پلی‌مراز، هنگام **همانندسازی**، واکنش **سنتز آب‌دهی** و هنگام **ویرایش**، **هیدرولیز** پیوند فسفودی‌استر را کاتالیز می‌کند. **DNA لیگاز** و **RNA پلی‌مراز** در **سنتز آب‌دهی** و **EcoRI** تنها در **هیدرولیز** شرکت دارند. گسیخته شدن پیوندهای هیدروژنی، هیدرولیز نیست.

۱۶ ـ گزینه‌ی ۳ به‌جز DNA لیگاز، سایر آنزیم‌های ذکر شده در متن سؤال قادرند پیوند هیدروژنی را برش دهند.

۱۷ ـ گزینه‌ی ۲ برای برش DNAی خارجی و خطی کردن پلازمید، نیاز به آنزیم محدودکننده است و بعد از آن، DNA لیگاز برای اتصال این دو، وارد عمل می‌شود.

۱۸ ـ گزینه‌ی ۲ ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در پلازمیدها وجود دارند و در کروموزوم اصلی وجود **ندارند**.

۱۹ ـ گزینه‌ی ۱ تعداد **کمی** از سلول‌های میزبان، DNAی نوترکیب را دریافت می‌کنند. برای تولید DNAی نوترکیب، از پلازمیدی استفاده می‌شود که ژنِ مقاومت به آنتی‌بیوتیک را داشته باشد؛ بنابراین سلول باکتریِ میزبانِ که DNAی نوترکیب را دریافت کرده، ژنِ مقاومت به آنتی‌بیوتیک را نیز خواهد داشت و در مرحله‌ی غربال کردن در برابر آنتی‌بیوتیک، مقاومت می‌کند و زنده می‌ماند.

۲۰ ـ گزینه‌ی ۴ در مرحله‌ی غربال کردن، علیه باکتری‌های میزبان، آنتی‌بیوتیک استفاده می‌شود. اریتروپویتین، نوعی هورمون است. سایر گزینه‌ها آنتی‌بیوتیک هستند.

۲۱ ـ گزینه‌ی ۲

۲۲ ـ گزینه‌ی ۳ پس از اثر آنزیم محدودکننده، ۴ نوع قطعه حاصل می‌شود که براساس اندازه، قطعه‌های کوچک‌تر، فاصله‌ی بیش‌تری از بالای ژل خواهند داشت. بخش A که خود توالی‌یی در قطعه‌ی نشان داده شده است در نوار III قرار خواهد گرفت.

۲۳ ـ گزینه‌ی ۲ تعداد نوارهای روی ژل الکتروفورز با تعداد انواع مولکول‌های موجود در نمونه (مخلوط مولکول‌ها) برابر است و ضخامت هر یک از نوارها، متناسب با مقدار آن مولکول در نمونه است.

۲۴ ـ گزینه‌ی ۲ بالاترین قطعه یعنی قطعه‌ای که به قطب منفی نزدیک‌تر است و آن، قطعه‌ای است که اندازه‌ای بزرگ‌تر از سایر قطعات دارد.

۲۵ ـ گزینه‌ی ۱

۲ توالی‌های کوتاه ...

۳ بیش‌تر آنزیم‌های محدودکننده ...

٤ در بعضی از باکتری‌ها ...

@Gene_Expression

آزمون

آزمون یکم

۱۵ دقیقه

۱ ـ کدام، جزء مراحل اساسی آزمایش‌های مهندسی ژنتیک نیست؟

۱) غربال کردن ۲) کلون کردن ۳) تولید DNAی نوترکیب ۴) الکتروفورز

۲ ـ پلازمیدها ...

۱) در همه‌ی باکتری‌ها وجود دارند.

۲) حاوی ژن‌هایی هستند که در کروموزوم اصلی باکتری، وجود ندارند.

۳) نمی‌توانند مستقل از کروموزوم اصلی، همانندسازی کنند.

۴) دئوکسی‌ریبوز در ساختمان شیمیایی خود ندارند.

۳ ـ برای اتصال انتهای چسبنده‌ی DNAی خارجی و انتهای چسبنده‌ی پلازمید برش‌یافته، برقراری کدام پیوند (ها) ضروری است؟

۱) فقط هیدروژنی ۲) هیدروژنی و فسفودی‌استر

۳) فقط فسفودی‌استر ۴) پپتیدی

۴ ـ در صورتی که در یک مولکول DNA، تعداد n جایگاه تشخیص برای EcoRI وجود داشته باشد، پس از برش DNA چند انتهای چسبنده در قطعات حاصل از برش به‌وجود می‌آید؟

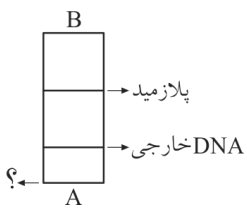
۱) n ۲) $2n$ ۳) $\frac{n}{2}$ ۴) $2n+1$

۵ ـ آنزیم‌های محدودکننده به‌طور طبیعی در کدام سلول‌ها ساخته می‌شوند و در مهندسی ژنتیک چه نوع DNAهایی را می‌توانند برش دهند؟

۱) پروکاریوتی ـ یوکاریوتی و پروکاریوتی ۲) پروکاریوتی ـ فقط یوکاریوتی

۳) یوکاریوتی ـ پروکاریوتی و یوکاریوتی ۴) یوکاریوتی ـ فقط پروکاریوتی

۶ ـ با توجه به ژل الکتروفورز مقابل، قطب نشان داده شده با علامت سؤال، کدام است و چاهک‌های استقرار مولکول‌های نمونه در کدام انتهاست؟



۱) منفی ـ A ۲) مثبت ـ A

۳) منفی ـ B ۴) مثبت ـ B

۷ ـ عمل‌کرد کدام آنزیم با فرایند ذکر شده در مهندسی ژنتیک متناسب نیست؟

۱) DNA لیگاز ـ ساخت DNAی نوترکیب ۲) RNA پلی‌مراز ـ غربال کردن

۳) هلیکاز ـ کلون کردن ۴) پروتئاز ـ استخراج ژن

۸ ـ در نخستین دست‌ورزی ژنتیک، ژن rRNA را وارد ..... کردند.

۱) سیتوپلاسم باکتری ۲) DNA باکتری ۳) سیتوپلاسم قورباغه ۴) DNA قورباغه

۹ ـ کدام نمی‌تواند پیش‌ماده‌ی مناسبی برای آنزیم محدودکننده باشد؟

۱) توالی افزاینده‌ی موش ۲) ژنوم باکتریوفاژ ۳) کروموزوم انسان ۴) ریبوزوم کلروپلاست

۱۰ ـ در ژنوم E.coli، ژن رمزکننده‌ی کدام، وجود ندارد؟

۱) ایکو.ار. یک ۲) مهارکننده‌ی لک ۳) لیزوزیم ۴) آنزیم تولید آلولاکتوز

۱۱ ـ در جایگاه تشخیص EcoRI .....

۱) توالی دو رشته، در جهت عکس، شبیه نیستند. ۲) پورین‌ها و پیریمیدین‌ها نابرابرند.
۳) پورین و پیریمیدین‌های یک رشته برابرند. ۴) ۱۲ پیوند هیدروژنی وجود دارد.

۱۲ ـ وقتی از یک ژن، نسخه‌های یک‌سان متعدد ساخته می‌شود، می‌گویند آن ژن چه شده است؟ *(آزاد ـ پزشکی ـ ۸۶)*

۱) کلون ۲) نوترکیب ۳) تراژنی ۴) همانندسازی

۱۳ ـ کدام گزینه از اصلی‌ترین مراحل مهندسی ژنتیک است؟ *(آزاد ـ غیرپزشکی ـ ۸۶)*

۱) ساختن DNAی نوترکیب ۲) کلون شدن ژن ۳) استخراج ژن ۴) غربال کردن

۱۴ ـ روش الکتروفورز که برای جدا کردن نوکلئیک‌اسیدها کاربرد دارد، برای کدام مواد دیگر نیز کاربرد دارد و این مواد براساس کدام گزینه از یک‌دیگر جدا می‌شوند؟ *(آزاد ـ پزشکی ـ ۸۷)*

۱) فسفولیپیدها ـ محتوای ژنتیک ۲) استروئیدها ـ شکل
۳) پروتئین‌ها ـ اندازه ۴) پلی‌ساکاریدها ـ محتوای ژنتیک

۱۵ ـ از معمول‌ترین حامل‌ها یا وکتورها که ژن موردنظر را به درون باکتری هدایت می‌کنند، کدام گزینه را می‌توان نام برد؟

۱) ریزوئیدها و میسلیوم‌ها ۲) پلازمیدها و ویروس‌ها *(آزاد ـ غیرپزشکی ـ ۸۷)*
۳) استولون‌ها و ریزوئیدها ۴) میسلیوم‌ها و استولون‌ها

۱۶ ـ برای ساختن مولکول DNAی نوترکیب به دو نوع آنزیم نیاز است. این دو آنزیم کدام‌اند؟ *(آزاد ـ غیرپزشکی ـ ۸۸)*

۱) محدودکننده و لیگاز ۲) هلیکاز و لیپاز ۳) کاتالاز و هلیکاز ۴) لیپاز و کاتالاز

۱۷ ـ این عبارت بیان‌گر کدام است؟ «قطعه‌ای تک‌رشته‌ای که در انتهای یک قطعه DNAی دو رشته‌ای قرار دارد و مکمل قطعه‌ی تک‌رشته‌ای دیگر است.» *(سنجش ـ ۸۴)*

۱) انتهای چسبنده ۲) جایگاه تشخیص آنزیم ۳) mRNAی اولیه ۴) DNAی نوترکیب

۱۸ ـ توده‌ای از DNAی باکتریایی به‌طور کامل تحت‌تأثیر آنزیم EcoRI قرار گرفته است. کدام آنزیم روی این توده‌ی DNA (بعد از اثر آنزیم) هیچ فعالیتی نمی‌تواند داشته باشد؟ *(آموزش و پرورش)*

۱) آنزیم EcoRI ۲) DNA لیگاز ۳) DNA پلی‌مراز ۴) RNA پلی‌مراز

آزمون دوم

۲۰ دقیقه

۱ ـ در جایگاه تشخیص آنزیم محدودکننده، کدام قطعاً وجود ندارد؟

۱) پیریمیدین ۲) ریبوز ۳) تیمین ۴) پیوند فسفودی‌استر

۲ ـ اگر زمان لازم برای تقسیم دوتایی یک باکتری دارای پلازمید، ۲۰ دقیقه فرض شود، پس از یک ساعت چند پلازمید تولید می‌شود؟

۱) ۲ ۲) ۸ ۳) بیش از ۸ ۴) ۴

۳ ـ در انتهای چسبنده‌ی حاصل از فعالیت EcoRI، کدام توالی وجود دارد؟

۱) G / C TTAA ۲) C / G AATT ۳) A / TTAAG ۴) G / C AATT

۴ ـ در الکتروفورز مخلوطی از چند مولکول DNA ....

۱) مولکول‌های بزرگ‌تر، سریع‌تر از منفذهای ژل عبور می‌کنند.
۲) مولکول‌های کوچک‌تر، عقب‌تر از بقیه حرکت می‌کنند.
۳) مولکول‌های دارای وزن کم‌تر، به قطب منفی نزدیک‌تر هستند.
۴) فاصله‌ی مولکول دارای وزن بیش‌تر، از چاهک ژل، کم‌تر است.

۵ ـ تشابه باکتریوفاژ و میزبان آن، داشتن کدام است؟

۱) ریبوزوم ۲) ریبوز ۳) یوراسیل ۴) پیریمیدین

۶ ـ فرض کنید پلازمید و DNAی خارجی، هر دو توسط EcoRI برش داده شده‌اند. برای تولید DNAی نوترکیب، چند پیوند هیدروژنی برقرار می‌شود و لیگاز، پیوند فسفودی‌استر را بین کدام نوکلئوتیدها برقرار می‌کند؟

۱) ۱۶ ـ G ،T ۲) ۸ ـ C ،T ۳) ۱۶ ـ G ،A ۴) ۸ ـ G ،A

۷ ـ در کدام، دئوکسی‌ریبوز وجود دارد؟

۱) باکتریوفاژ ۲) ریبوزوم ۳) EcoRI ۴) DNA لیگاز

۸ ـ هنگام آزمایش‌های مهندسی ژنتیک، کدام آنزیم در مقاوم‌کردن سلول دریافت کننده‌ی DNAی نوترکیب، نسبت به آنتی‌بیوتیک، نقش مهم‌تری دارد؟

۱) DNA لیگاز ۲) RNA پلی‌مراز ۳) EcoRI ۴) DNA پلی‌مراز

۹ ـ کدام آنزیم، توانایی شکستن پیوندهای هیدروژنی سه‌گانه را ضمن عمل خود ندارد؟

۱) هلیکاز ۲) RNA پلی‌مراز III ۳) EcoRI ۴) DNA پلی‌مراز

۱۰ ـ با توجه به شکل مقابل، می‌توان گفت:

ژل الکتروفورز

۱) مقدار A از B بیش‌تر است.
۲) تعداد نوکلئوتیدهای B از A کم‌تر است.
۳) اندازه‌ی B از A بیش‌تر است.
۴) وزن مولکولی A از B کم‌تر است.

۱۱ ـ تعداد نوارهای روی ژل الکتروفورز به ..... و پهنای هر نوار روی ژل به ..... بستگی دارد.

۱) اندازه‌ی قطعات ـ توالی آمینواسیدها ۲) تعداد جایگاه‌های تشخیص در DNA ـ تعداد قطعاتِ آن نوار
۳) توالی نوکلئوتیدی DNA ـ اندازه‌ی قطعات ۴) تعداد آمینواسیدها در قطعات ـ اندازه‌ی پلی‌پپتیدها

۱۲ ـ آنزیم‌های محدودکننده برای برش DNA، حتماً ..... .

۱) به‌طور طبیعی در سیتوپلاسم سلول تولید می‌شوند ۲) پیوندهای فسفودی‌استر دو رشته را، روبه‌روی هم برش می‌دهند
۳) پیوندهای هیدروژنی را برش می‌دهند ۴) انتهای چسبیده ایجاد می‌کنند

۱۳ ـ کدام آنزیم، قدرت شکستن پیوند فسفودی‌استر را دارد؟ *(سراسری ـ ۸۴ ـ خارج از کشور)*

۱) هلیکاز ۲) DNA لیگاز ۳) DNA پلی‌مراز ۴) RNA پلی‌مراز

۱۴ ـ برای انتقال ژن خارجی به ژنوم انسان، از کدام می‌توان به‌عنوان وکتور استفاده کرد؟ *(آموزش و پرورش)*

۱) پلازمید ۲) باکتریوفاژ ۳) ویروس ۴) مخمر

۱۵ ـ برای استخراج ژن انسولین از DNAی نوترکیب، آنزیم محدودکننده‌ی EcoRI چند جایگاه تشخیص دارد؟ *(سنجش ـ ۸۴)*

۱) ۱ ۲) ۲ ۳) ۳ ۴) ۴

آزمون سوم

۱۱ دقیقه

۱ ـ هر چه تعداد جایگاه‌های تشخیص یک آنزیم محدودکننده در DNA ..... باشد، قطعات حاصل از برش ..... خواهند بود. (فاصله‌ی جایگاه‌های تشخیص برابر فرض شود.)

۱) کم‌تر ـ کوتاه‌تر و فراوان‌تر ۲) بیش‌تر ـ بلندتر و کم‌تر
۳) کم‌تر ـ بلندتر و کم‌تر ۴) بیش‌تر ـ کوتاه‌تر و کم‌تر

۲ ـ در آزمایش کوهن و بایر، ژنی که در نخستین دست‌ورزی ژنتیکی استفاده شد، در جان‌دار میزبان توسط کدام آنزیم رونویسی شد؟

۱) RNA پلی‌مراز I ۲) RNA پلی‌مراز II
۳) RNA پلی‌مراز III ۴) RNA پلی‌مراز پروکاریوتی

۳ ـ در ژن رمزکننده‌ی EcoRI، کدام وجود دارد؟

۱) اینترون ۲) توالی افزاینده ۳) جایگاه پایان رونویسی ۴) اگزون

۴ ـ سطح فعالیت ..... در مرحله‌ی .....، بسیار بالاست.

۱) RNA پلی‌مراز ـ غربال کردن ۲) هلیکاز ـ تولید DNAی نوترکیب

۳) آنزیم محدودکننده ـ کلون کردن ۴) DNA لیگاز ـ الکتروفورز

۵ ـ مخلوطی از EcoRI، پروتئاز و پلازمید دارای یک توالی $\frac{GAATTC}{CTTAAG}$ در ظرفی وجود دارد. کدام حکم در مورد پلازمید درست است؟

۱) در یک نقطه بریده می‌شود. ۲) دو پیوند فسفودی‌استر و ۸ پیوند هیدروژنی شکسته می‌شود.

۳) بدون تغییر باقی‌می‌ماند. ۴) تعدادی نوکلئوتید از هیدرولیز آن به‌وجود می‌آید.

۶ ـ در همه‌ی باکتری‌ها ....

۱) پلازمید وجود دارد. ۲) DNA خطی است.

۳) آنزیم محدودکننده وجود دارد. ۴) ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک وجود دارد.

۷ ـ در یک DNA، هر چه تعداد جایگاه‌های تشخیص برای یک نوع آنزیم محدودکننده ..... باشد، تعداد قطعات حاصل از برش ..... و ..... خواهد بود. (فاصله‌ی جایگاه‌های تشخیص برابر فرض شود.)

۱) کم‌تر ـ کم‌تر ـ طویل‌تر ۲) بیش‌تر ـ کم‌تر ـ کوتاه‌تر

۳) کم‌تر ـ بیش‌تر ـ کوتاه‌تر ۴) بیش‌تر ـ بیش‌تر ـ طویل‌تر

۸ ـ در مرحله‌ی غربال کردن باکتری‌های آلوده‌شده به ژن انسولین، ..... استفاده نمی‌شود.

۱) RNA پلی‌مراز باکتری ۲) عامل پایان ترجمه ۳) آنتی‌کدون ۴) آنزیم محدودکننده

۹ ـ ژن مقاومت به اریترومایسین در DNAی نوترکیب حاوی ژن هورمون رشد گاوی وجود دارد، باکتری‌های میزبان به‌علت بیان ژن مقاومت، دچار اختلال در ..... نمی‌شوند و در غربال‌گری زنده می‌مانند.

۱) همانندسازی ۲) رونویسی ۳) ترجمه ۴) ویرایش

۱۰ ـ مخلوطی از یک نوع پلازمید با یک جایگاه تشخیص مناسب برای EcoRI، DNA لیگاز و EcoRI را در یک ظرف، در نظر بگیرید. در این صورت ممکن نیست پلازمیدهای ..... در ظرف یافت شود.

۱) دست‌نخورده ۲) بزرگ‌تر ۳) خطی‌شده ۴) قطعه‌قطعه‌شده

۱۱ ـ کروموزوم‌های کمکی: *(سراسری ـ ۸۷ ـ داخل کشور)*

۱) همانندسازی وابسته به تکثیر سلول دارند. ۲) همگی توسط آنزیم EcoRI بریده می‌شوند.

۳) حامل برخی ژن‌های کروموزوم‌های اصلی می‌باشند. ۴) ساختار حلقوی دارند و در برخی باکتری‌ها یافت می‌شوند.

۱۲ ـ برای تهیه‌ی DNAی نوترکیب از پلازمید اشریشیا کلای، حضور کدام آنزیم ضروری نیست؟ *(سراسری ـ ۸۴ ـ خارج از کشور)*

۱) لیگاز ۲) EcoRI ۳) DNA پلی‌مراز ۴) محدودکننده

۱۳ ـ قند موجود در کدام، متفاوت از سایرین است؟ *(سراسری ـ ۸۶ ـ خارج از کشور)*

۱) پلازمید ۲) ویروئید ۳) پیش‌ماده‌ی EcoRI ۴) افزاینده در یوکاریوت‌ها

۱۴ ـ در آزمایش‌های مهندسی ژنتیک، ابتدا از کدام استفاده می‌شود؟ *(سنجش ـ ۸۲)*

۱) آنتی‌بیوتیک ۲) آنزیم محدودکننده ۳) DNA پلی‌مراز ۴) DNA لیگاز

۱۵ ـ اگر یک مولکول DNA، ۳ جایگاه تشخیص برای یک آنزیم محدودکننده با فاصله‌های برابر داشته باشد، در اثر برش کامل و الکتروفورز توده‌ای از این مولکول، چند عدد نوار در ژل ایجاد می‌شود؟ *(آموزش و پرورش)*

۱) ۱ ۲) ۲ ۳) ۳ ۴) ۴

@Gene_Expression

پاسخ های آزمون

پاسخ تست‌های آزمون یکم

۱ ـ گزینه‌ی ۴ طبق شکل ۲ ـ ۲ کتاب پیش‌دانشگاهی، مراحل **اساسی** در آزمایش‌های مهندسی ژنتیک عبارتند از:
۱ ـ برش DNA (تهیه‌ی DNAی خارجی و برش پلازمید یا DNAی ویروسی که به‌عنوان وکتور استفاده می‌شود).
۲ ـ تولید DNAی نوترکیب
۳ ـ کلون ژن
۴ ـ غربال کردن سلول‌ها
ملاحظه می‌کنید که **الکتروفورز**، جزء این مراحل نیست.

۲ ـ گزینه‌ی ۲ پلازمیدها، DNAهای حلقوی هستند، پس پیوند فسفودی‌استر، دئوکسی‌ریبوز و بازهای A، T، C و G و پیوند هیدروژنی دارند. این مولکول‌ها به‌عنوان کروموزوم‌های کمکی در **بعضی** باکتری‌ها موجودند و ژن‌هایی را حمل می‌کنند که در کروموزوم اصلی آن باکتری وجود ندارند. پلازمیدها می‌توانند **مستقل** از کروموزوم اصلی ولی با **سرعتی بیش‌تر**، همانندسازی شوند.

۳ ـ گزینه‌ی ۱ در کتاب درسی آمده است: اتصال انتهای چسبنده‌ی DNAی خارجی به انتهای چسبنده‌ی پلازمید خطی شده، توسط **پیوند هیدروژنی** صورت می‌گیرد نه فسفودی‌استر!

۴ ـ گزینه‌ی ۲ اگر در یک DNA (فرقی نمی‌کند که خطی باشد یا حلقوی)، n جایگاه تشخیص برای آنزیم محدودکننده‌ی خاص وجود داشته باشد، ۲n انتهای چسبنده در قطعه‌های حاصل از برش، وجود خواهد داشت.
به شکل موجود در متن درسی پلکان آموزش رجوع کنید.

۵ ـ گزینه‌ی ۱ آنزیم‌های محدودکننده، خاص باکتری‌ها هستند ولی قادرند هم **DNAی پروکاریوتی** (نظیر پلازمید)، هم **DNAی یوکاریوتی** (نظیر ژن انسولین) و هم **DNAی ویروس** (نظیر باکتریوفاژ) را برش دهند.

۶ ـ گزینه‌ی ۴ اندازه‌ی DNAی خارجی، کوچک‌تر است، پس به قطب (+) ژل نزدیک‌تر می‌باشد. **مبدأ حرکت مولکول‌ها، چاهک موجود در قطب (–) ژل است** تا DNA با بار منفی از این قطب دفع شود و به سمت قطب (+) هدایت شود.

۷ ـ گزینه‌ی ۴ در استخراج ژن، پس از انهدام باکتری توسط **لیزوزیم** (البته اگر سلول میزبان باکتری باشد)، برای برش ژن خارجی، از **آنزیم محدودکننده** استفاده می‌شود. پروتئاز در این خصوص نقشی ندارد.

۸ ـ گزینه‌ی ۲ به متن کتاب مراجعه کنید.

۹ ـ گزینه‌ی ۴ پیش‌ماده‌ی مناسب برای آنزیم‌های محدودکننده، DNA است. همه‌ی گزینه‌ها DNA هستند جز گزینه‌ی ۴ که از rRNA و پروتئین تشکیل شده است.

۱۰ ـ گزینه‌ی ۳ لیزوزیم، آنزیم **یوکاریوتی** است که مثلاً در **بزاق، اشک، عرق** و **مایعات مخاطی انسان** وجود دارد و قادر است **دیواره‌ی اسکلتی** (دیواره‌ی سلولی) **باکتری‌ها** را **تخریب** کند. این مولکول، در **خط اول دفاع غیراختصاصی** آدمی، فعال است. در ژنومِ E.coli، ژنِ EcoRI، مهارکننده‌ی لک (پروتئین تنظیم‌کننده) و آنزیم تبدیل لاکتوز به آلولاکتوز وجود دارد. آلولاکتوز، عامل تنظیمی در بیان اپران لک این باکتری است.

۱۱ ـ گزینه‌ی ۳ جایگاه تشخیص EcoRI به‌صورت $\begin{matrix}GAATTC\\CTTAAG\end{matrix}$ است.
ـ در یک رشته ۳ پورین، ۳ پیریمیدین
ـ در دو رشته نسبت پورین به پیریمیدین برابر یک، یعنی ۶ پورین، ۶ پیریمیدین
ـ جمعاً ۱۴ پیوند هیدروژنی (بین A و T، دو و بین C و G، سه پیوند هیدروژنی)
ـ در دو رشته به‌طور ناهم‌سو، توالی‌ها یک‌سان‌اند.

۱۲ ـ گزینه‌ی ۱

۱۳ ـ گزینه‌ی ۱ یکی از **اصلی‌ترین** مراحل مهندسی ژنتیک، **ساختن DNAی نوترکیب است.**

۱۴ ـ گزینه‌ی ۳ **پروتئین‌ها** و **اسیدهای نوکلئیک**، براساس **اندازه** در روش جداسازی الکترو فورز با دقت بسیار بالا، تفکیک می‌شوند.

۱۵ ـ گزینه‌ی ۲

۱۶ ـ گزینه‌ی ۱

۱۷ ـ گزینه‌ی ۱

۱۸ ـ گزینه‌ی ۱ وقتی DNAی باکتریایی به‌طور کامل تحت‌تأثیر آنزیم EcoRI قرار گیرد، همه‌ی جایگاه‌های شناسایی برش خورده‌اند و دیگر جایگاهی برای برش باقی نمانده است. لیگاز می‌تواند قطعات حاصل را متصل کند، **DNA پلی‌مراز**، آن‌ها را **همانندسازی** و **RNA پلی‌مراز**، آن‌ها را **رونویسی** می‌کند.

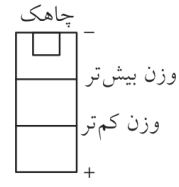
پاسخ تست‌های آزمون دوم

۱ ـ گزینه‌ی ۲ جایگاه تشخیص آنزیم محدودکننده بخشی از DNA است و در آن ریبوز وجود ندارد.

۲ ـ گزینه‌ی ۳ همانندسازی و تکثیر پلازمیدها مستقل از همانندسازی کروموزوم اصلی باکتری و با سرعتی بیش‌تر از آن صورت می‌پذیرد.

۳ ـ گزینه‌ی ۱ همیشه انتهایی‌ترین نوکلئوتید در انتهای چسبنده‌ی حاصل از عمل‌کردِ EcoRI، نوکلئوتید Aداراست.

۴ ـ گزینه‌ی ۴ هر چه وزن و اندازه‌ی مولکول **کم‌تر** باشد، به **قطب مثبت نزدیک‌تر** است و از **مبدأ** حرکت (بالای ژل که **چاهک** در آن‌جاست)، **بیش‌تر** فاصله می‌گیرد، یعنی در جریانِ عملِ الکتروفورز با سرعت بیش‌تری حرکت کرده است.



۵ ـ گزینه‌ی ۴ باکتریوفاژ، ویروس DNAداراست و میزبان آن، باکتری است که هم DNA دارد و هم RNA؛ پس این دو، در داشتن باز تک‌حلقه‌ای سیتوزین و تیمین اشتراک دارند. **باکتریوفاژ**، **ریبوز**، **یوراسیل** و **ریبوزوم ندارد**.

۶ ـ گزینه‌ی ۳ برای قرار گرفتن DNAی خارجی در پلازمید خطی شده، همواره ۴ پیوند فسفودی‌استر توسط **لیگاز** برقرار می‌شود. حال اگر از EcoRI برای بریدن DNA استفاده کرده باشیم، در هر طرف ۸ پیوند هیدروژنی باید برقرار شود تا اتصال صورت گیرد. همان‌گونه که EcoRI، پیوند فسفودی‌استر بین نوکلئوتید A و G را می‌شکند، هنگام تشکیل DNAی نوترکیب نیز، DNA لیگاز باید بین همین دو نوکلئوتید، پیوند را برقرار کند.

۷ ـ گزینه‌ی ۱ باکتریوفاژ، ویروس DNAداراست و در نوکلئوتیدهای خود، قند دئوکسی‌ریبوز دارد. EcoRI و DNA لیگاز، پروتئین هستند. ریبوزوم دارای RNA و قند ریبوز است.

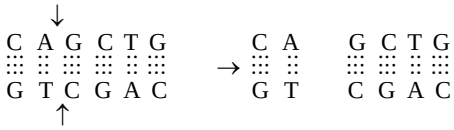
۸ ـ گزینه‌ی ۲ RNA پلی‌مراز از ژنِ مقاومت به آنتی‌بیوتیک رونویسی می‌کند و mRNAی حاصل، ترجمه شده و پروتئین مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری میزبان تولید می‌شود.

۹ ـ گزینه‌ی ۳ EcoRI در جایگاه تشخیص خود، پیوندهای هیدروژنی بین A و T را که دوگانه هستند،می‌شکند. سایر آنزیم‌های ذکر شده، پیوندهای هیدروژنی بین C و G را که سه‌گانه هستند؛ می‌شکنند.

۱۰ ـ گزینه‌ی ۲ مولکول A چون به قطب منفی نزدیک‌تر است، اندازه‌ای بزرگ‌تر و چون پهنای نوارش، کم‌تر است، تعداد نوکلئوتیدهای کم‌تری دارد. مقدار مولکول‌های B در نمونه بیش‌تر بوده است چون پهنای این نوار، بیش‌تر است ولی مولکول B، کوچک‌تر است چون فاصله‌ی بیش‌تری از قطب منفی دارد.

۱۱ ـ گزینه‌ی ۲ تعداد نوارها روی ژل الکتروفورز برابر **تعداد انواع** مولکول‌های موجود در نمونه است (که در مورد DNA، مثلاً بستگی به تعداد جایگاه‌های تشخیص آنزیم محدودکننده در DNA دارد. هر چه این جایگاه‌ها بیش‌تر باشند، تعداد و تنوع قطعات بیش‌تر خواهند بود). **پهنای نوارها** هم بستگی به **مقدار** آن مولکول خاص در نمونه دارد.

۱۲ ـ گزینه‌ی ۱ آنزیم‌های محدودکننده، به‌طور طبیعی فقط در سیتوپلاسم باکتری‌ها تولید می‌شوند. **بیش‌تر آن‌ها** (نه همه‌ی آن‌ها!) قطعاتی از DNAی کوتاه تک‌رشته‌ای در هر دو انتها تولید می‌کنند که با یک‌دیگر مکمل‌اند.
از این جمله برمی‌آید که بعضی از محدودکننده‌ها بدون بریدن پیوند هیدروژنی، فقط پیوندهای فسفودی‌استرِ دقیقاً مقابل هم را برش می‌دهند و انتهای چسبنده ایجاد نمی‌کنند؛ مثل:

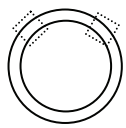


به‌یاد بیاورید که EcoRI پیوندهای فسفودی‌استر دو رشته‌ی مکمل را به‌صورت غیرمقابل برش می‌دهد و فقط پیوندهای هیدروژنی دوگانه بین A و T را برش می‌دهد و انتهای چسبنده تولید می‌کند.

۱۳ ـ گزینه‌ی ۳ DNA پلی‌مراز هنگام ویرایش با شکستن پیوند فسفودی‌استر، نوکلئوتید اشتباه را حذف می‌کند. DNA لیگاز و RNA پلی‌مراز، این پیوند را برقرار می‌کنند و هلیکاز، پیوند هیدروژنی را می‌شکند.

۱۴ ـ گزینه‌ی ۳ **وکتور** رایج در مهندسی ژنتیک، **پلازمید و ویروس** است. **پلازمیدها و باکتریوفاژها** معمولاً برای آلوده کردن سلول‌های باکتری و گیاه، مورد استفاده قرار می‌گیرند. **ویروس‌های انسانی یا جانوری** می‌توانند وکتور مناسبی برای انتقال ژن خارجی به **ژنوم انسان** باشند.

۱۵ ـ گزینه‌ی ۲ این آنزیم **دو جایگاه تشخیص** دارد تا ژن انسولین را برش دهد.



پاسخ تست‌های آزمون سوم

۱ ـ گزینه‌ی ۳ تعداد قطعه‌های حاصل از برش DNA توسط آنزیم محدودکننده با **تعداد جایگاه‌های تشخیص**، رابطه‌ی **مستقیم**، ولی با **طول** قطعات برش‌یافته، رابطه‌ی **عکس** دارد. دو DNAی فرضی را در نظر بگیرید که جایگاه‌های تشخیص در آن‌ها با علامت × مشخص شده باشد.

تعداد جایگاه تشخیص کم‌تر، قطعات کم‌تر ولی بلندتر

تعداد جایگاه تشخیص بیش‌تر، قطعات بیش‌تر ولی کوتاه‌تر

۲ ـ گزینه‌ی ۴ این ژن درون E.coli توسط RNA پلی‌مراز پروکاریوتی رونویسی شد.

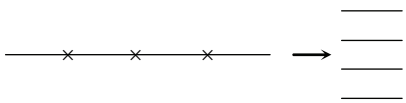
۳ ـ گزینه‌ی ۳ در هر ژنی (خواه پروکاریوت، خواه یوکاریوت) جایگاه پایان رونویسی وجود دارد. در E.coli، ژن‌ها گسسته نیستند و اگزون و اینترون ندارند. **توالی افزاینده**، خاص **یوکاریوت‌هاست**.

۴ ـ گزینه‌ی ۱ ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک در مرحله‌ی **غربال‌گری** توسط **RNA پلی‌مراز رونویسی** می‌شود و سپس mRNAی حاصل، **ترجمه** می‌گردد تا **پروتئینِ** مقاومت به آنتی‌بیوتیک تولید شود.

۵ ـ گزینه‌ی ۳ پروتئاز، آنزیم EcoRI را تجزیه می‌کند و وقتی آنزیم محدودکننده وجود نداشته باشد، پلازمید هیچ تغییری نمی‌کند.

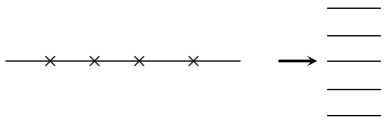
۶ ـ گزینه‌ی ۳ پلازمید و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک در **بعضی** باکتری‌ها وجود دارد. DNAی همه‌ی باکتری‌ها، حلقوی است و همه‌ی باکتری‌ها، آنزیم محدودکننده را برای دفاع در برابر DNAهای خارجی نظیر DNA باکتریوفاژ، دارند.

۷ ـ گزینه‌ی ۱ فرض کنید در DNAی زیر سه جایگاه تشخیص وجود دارد، چهار قطعه با طول مشخص شده، در شکل، پدید می‌آید.



حال همان DNA را با ۴ جایگاه تشخیص فرض کنید، پنج قطعه‌ی کوتاه‌تر حاصل می‌شود.

نتیجه: هر چه تعداد جایگاه‌های تشخیص (با فاصله‌ی برابر) بیش‌تر باشد، تعداد قطعات بیش‌تر و اندازه‌ی آن‌ها کوچک‌تر خواهد بود.



۸ ـ گزینه‌ی ۴ در مرحله‌ی غربال کردن، ژنِ مقاومت به آنتی‌بیوتیک توسط RNA پلی‌مراز باکتری رونویسی می‌شود و mRNAی حاصل، مورد ترجمه قرار می‌گیرد. در ترجمه‌ی ریبوزوم، tRNA (دارای آنتی‌کدون)، آنزیم، ATP، عامل پایان ترجمه و ... مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این مرحله، آنزیم محدودکننده کاربردی ندارد.

۹ ـ گزینه‌ی ۳ **اریترومایسین**، آنتی‌بیوتیکی است که با اختلال در **ترجمه** (پروتئین‌سازی)، موجب مرگ باکتری می‌شود (به فعالیت پایان فصل ۲ی کتاب سال دوم مراجعه کنید). ژن مقاومت به این آنتی‌بیوتیک، این اثر را خنثی می‌کند.

۱۰ ـ گزینه‌ی ۴ اگر پلازمیدهای مشابه، فقط یک جایگاه تشخیص برای EcoRI داشته باشند، **هرگز قطعه‌قطعه نمی‌شوند**. ممکن است پس از برش در یک نقطه مجدداً انتهای چسبنده هیبرید شده و با لیگاز به هم بپیوندند که گویی پلازمید، دست‌نخورده باقی مانده است. ممکن است پلازمید مذکور خطی شود و مجدداً به‌صورت حلقه در نیاید، یعنی قبل از تشکیل حلقه‌ی مجدد همواره تعدادی از مولکول‌های خطی شده را ببینیم و ممکن است انتهای چسبنده‌ی پلازمیدهای خطی شده‌ی مختلف، به هم بپیوندند، اتصالشان با لیگاز محکم شود و DNAی حلقوی بزرگ‌تری شکل بگیرد.

۱۱ ـ گزینه‌ی ۴ پلازمیدها یا کروموزوم‌های کمکی، مستقل از تکثیر DNAی باکتری، همانندسازی می‌شوند. در همه‌ی آن‌ها جایگاه تشخیص EcoRI وجود ندارد و ممکن نیست حاوی ژن‌هایی باشند که در کروموزوم اصلی وجود دارند. آن‌ها در **بعضی** باکتری‌ها وجود دارند و **حلقوی** هستند.

۱۲ ـ گزینه‌ی ۳ برای تهیه‌ی DNAی نوترکیب، نیاز به آنزیم‌های برش‌دهنده‌ی DNAی خارجی و پلازمید (یا هر وکتور دیگر) داریم که همان آنزیم‌های محدودکننده هستند (نظیر EcoRI و ...)؛ سپس باید DNAی خارجی و پلازمید را با DNA لیگاز به هم متصل کنیم تا DNAی نوترکیب شکل بگیرد. DNA پلی‌مراز در مرحله‌ی **همانندسازی** DNA یا **کلون کردن**، مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۱۳ ـ گزینه‌ی ۲ ویروئید، ت**ک‌رشته‌ی RNA و دارای قند ریبوز** است (به فصل ۹ کتاب پیش‌دانشگاهی رجوع کنید). سایر گزینه‌ها DNA و دارای قند دئوکسی‌ریبوز هستند.

۱۴ ـ گزینه‌ی ۲ اولین گام، بریدن ژن خارجی و برش پلازمید است که با استفاده از آنزیم محدودکننده انجام می‌پذیرد.

۱۵ ـ گزینه‌ی ۱ از آن‌جا که فاصله‌ی این جایگاه‌های تشخیص برابر است، DNAهای حاصل، **هم‌اندازه** خواهند بود و روی ژل، **یک نوار** تشکیل خواهند داد.

@Gene_Expression