زیست پیش‌دانشگاهی

فصل دوم

« جلسه ۵ »

رهپویان دانش
و اندیشه

WWW.RAHPOOYAN.IR

آزمایش کوهن و بایر:

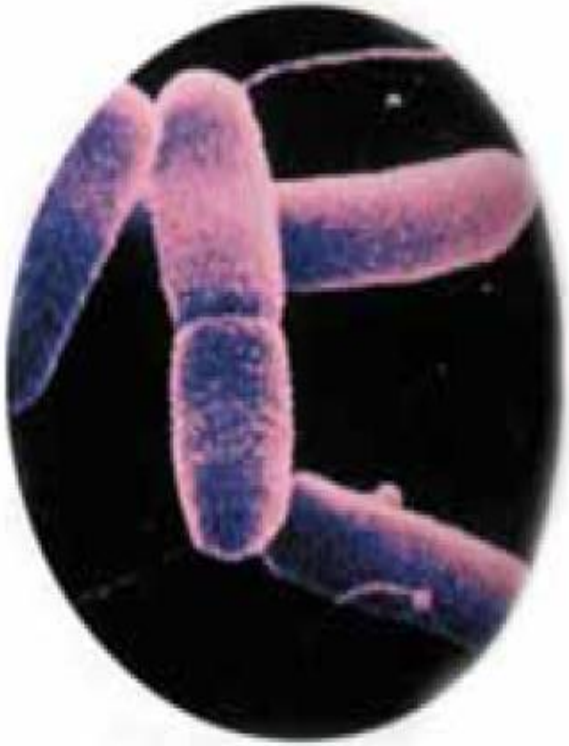
۱- نوع ژنی که دست ورزی شد.

- ژن رمزکننده rRNA قورباغه‌ی آفریقایی
- این ژن به کمک RNA پلی مراز I و عوامل رونویسی در قورباغه رونویسی می‌شود.
- این ژن به پروتئین ترجمه نمی‌شود بلکه در ساختار ریبوزوم نقش آنزیمی دارد.

۲- جاندار دریافت کننده: باکتری EcoRI (اولین جاندار تراژنی یا دارای ژن بیگانه)

۱ــ این قورباغه بــه‌عنوان جــاندار آزمایشگاهی انتخاب شد.

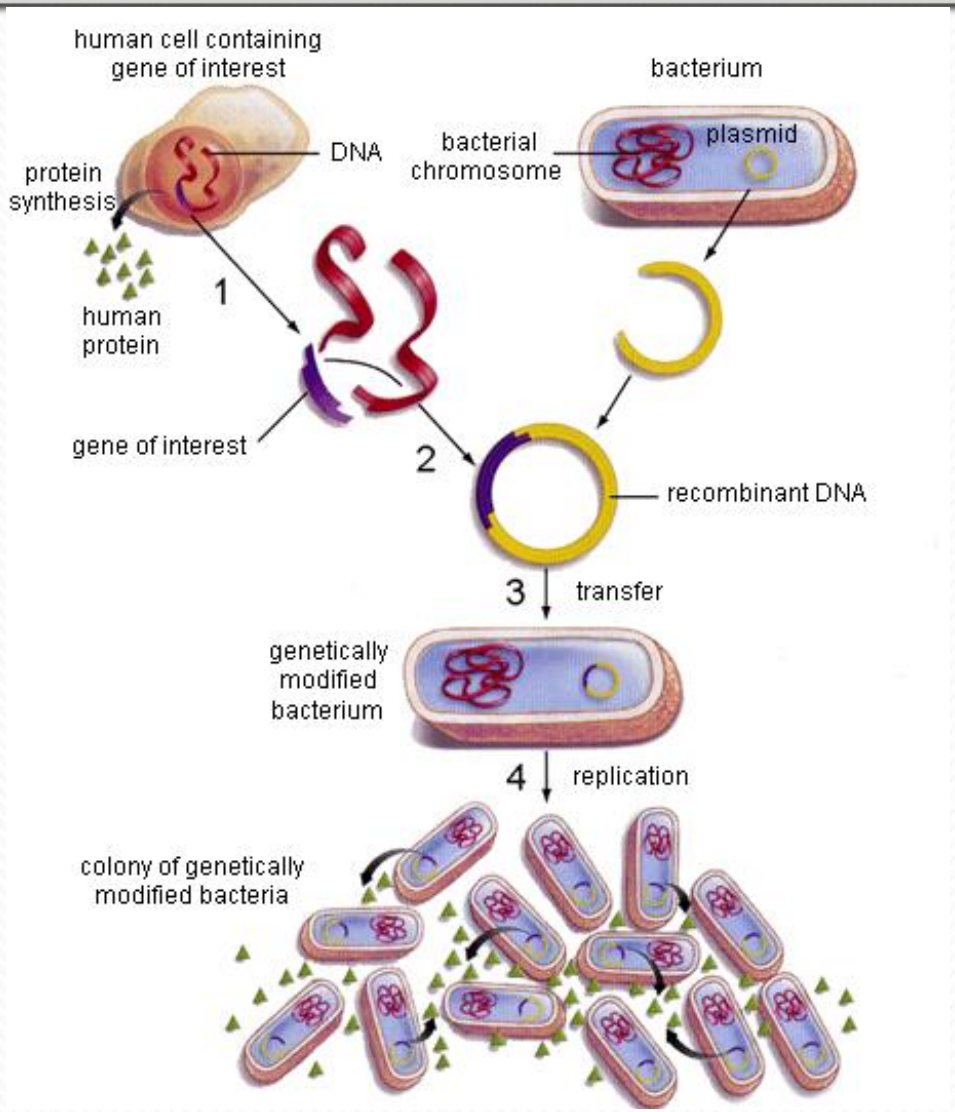
۲ــ ژن رمز کننده‌ی یک rRNA از یکی از کروموزوم‌های آن جدا شد.



۳ــ این ژن را به باکتری‌ها وارد کردند. باکتری‌ها rRNA قورباغه را ساختند.

تست: در آزمایش کوهن و بـایر، ژن وارد شـده در اولـین جاندار دست ورزی شـده، محصـولی ایجـاد کـرد کـه ..... داشت. (سراسری ۸۹)

۱) پیوند پپتیدی
۲) کدون ترجمه
۳) جایگاه اتصال آمینواسید
۴) پیوند فسفودی استر


human cell containing
gene of interest
bacterium
DNA
bacterial
chromosome
plasmid
protein
synthesis
1
human
protein
gene of interest
2
recombinant DNA
3
transfer
genetically
modified
bacterium
4
replication
colony of genetically
modified bacteria

ابزارهای مهندسی ژنتیک

- وکتور
- آنزیم‌ها

۱) آنزیم‌ها:

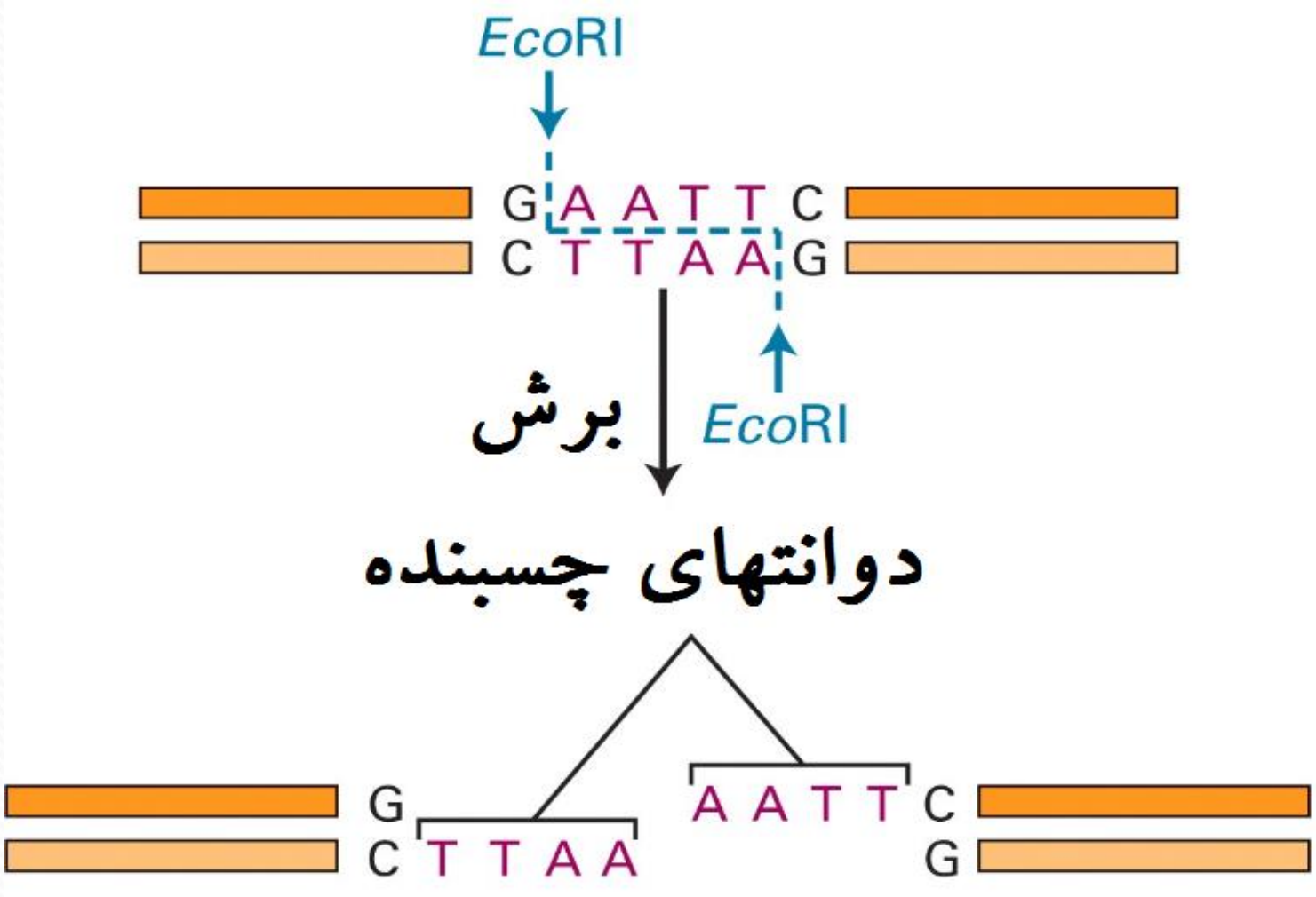
- برای ساخت DNA نوترکیب
  - الف) محدود کننده
  - ب) لیگاز
- برای کلون کردن ژن: DNA پلی‌مراز و هلیکاز
- برای استخراج ژن: مجدداً آنزیم محدودکننده‌ی که بار اول استفاده شد.
- برای غربال کردن: RNA پلی‌مراز برای بیان ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک
- برای بیان ژن و تولید محصول: RNA پلی‌مراز

الف) محدود کننده:

- مختص باکتری‌ها هستند (توسط سیستم اپرانی ساخته می‌شوند)
- جایگاه تشخیص آن‌ها توالی‌های کوتاه قرینه دو طرفه است.
- انواع برش DNA:

۱- بعضی بدون تولید انتهای چسبنده (فقط شکستن پیوند فسفودی استر)

۲- بیش‌تر تولید انتهای چسبنده (شکستن پیوندهای فسفودی‌استر و هیدروژنی)


EcoRI
G A A T T C
C T T A A G
برش
EcoRI
دوانتهای چسبنده
G
C T T A A
A A T T C
G

ب) لیگاز

- دو انتهای چسبنده از طریق پیوندهای هیدروژنی و بدون لیگاز به هم می‌چسبند.
- بعد از چسبیدن دو انتهای چسبنده به هم وارد عمل می‌شود و دو DNA را به هم متصل می‌کند.

معمول ترین وکتورها

- پلازمید
- باکتریوفاژ

۱) پلازمید:

- DNAهای حلقوی کوچک در بعضی باکتری‌ها
- به دلیل داشتن ژن‌های متفاوت با کروموزوم اصلی (مثل ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک) کروموزوم کمک‌اند.
- به دلیل داشتن نقطه‌ی شروع همانندسازی هم هماهنگ اصلی و هم مستقل از کروموزوم اصلی می‌توانند همانندسازی کنند.

۱) باکتریوفاژ:

- ساختار

DNA طویل

کسپید چند وجهی

دم مارپیچی

- هم هماهنگ با کروموزوم‌های اصلی (چرخه لیزوژنی) و هم مستقل از کروموزوم اصلی (چرخه‌ی لیتیک) تکثیر می‌شوند.

سؤال: صحیح یا غلط بودن هر یک از جملات زیر را مشخص کنید.

۱) به‌طور معمول در باکتری‌ها به تعداد مولکول DNA، دو برابر دو راهی همانندسازی ایجاد می‌شود.

۲) به دنبال هر بار همانندسازی DNA در باکتری، تقسیم دوتایی رخ می‌دهد.

۳) دو انتهای چسبنده حاصل از برش یک آنزیم محدودکننده از نظر تعداد و نوع باز آلی یکسان‌اند.

۴) در مهندسی ژنتیک برای انتقال هر ژن خارجی به سلول دریافت کننده، نیاز به یک وکتور است.

۵) هر DNAای که در باکتری‌ها دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک باشد، یک DNA کمکی است.

۶) با اثر آنزیم E.coRI در جایگاه تشخیص خود ۸ پیوند هیدروژنی و ۲ پیوند فسفودی‌استر شکسته می‌شود.

تست : باکتریوفاژها ..... پلازمیدها ..... . (سراسری ۹۱ خارج)

۱) همانند- فاقد ژن مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها هستند.

۲) همانند- می‌توانند مستقل از کروموزوم اصلی میزبان همانندسازی نمایند.

۳) برخلاف- برای کلون کردن DNA در باکتری‌ها استفاده می‌شوند.

۴) برخلاف- توسط آنزیم‌های محدود کننده برش داده می‌شوند.

تست: اگر به کروموزوم‌های کمکی یک باکتری، دو ژن بیگانه در دو محل جداگانه متصل کنند، برای تشکیل این DNAی نوترکیب، جمعاً چند پیوند فسفودی‌استر در این کروموزوم تخریب و تشکیل شده است؟ (سراسری ۸۹ خارج)

۱) ۶ ۲) ۸

۳) ۱۲ ۴) ۱۶

تست: در ..... ، نوکلئوتید یافت نمی‌شود. (سراسری ۹۲)

۱) EcoRI و هلیکاز

۲) عامل ترانسفورماسیون و کاتالاز

۳) جایگاه تشخیص آنزیم محدود کننده و پتیالین

۴) پپسینوژن و پیک دومین گلوکاگون

مراحل کلون کردن ژن انسولین:

۱- جدا کردن ژن از کروموزوم انسان به کمک آنزیم ECORI (۸+۸ پیوند هیدروژنی و ۲+۲ پیوند فسفودی‌استر می‌شکند.)

۲- برش پلازمید به کمک آنزیم ECORI (۸ پیوند هیدروژنی و ۲ پیوند فسفودی‌استر می‌شکند.)

۳- دوانتهای چسبنده‌ی پلازمید (TTAA) با دو انتهای چسبنده‌ی دو سر ژن انسولین (TTAA) از طریق پیوند هیدروژنی می‌چسبند. (۸+۸ هیدروژنی تشکیل)

۴- آنزیم لیگاز موجب تشکیل پیوند فسفو دی‌استر بین دو DNA (نه انتهای چسبنده) با برقراری پیوند بین A و G می‌شود. (۲+۲ فسفو دی استر تشکیل)

۵- DNA نوترکیب را در مجاورت باکتری‌ها قرار می‌دهند، تعداد کمی از باکتری‌ها موفق به جذب آن می‌شوند.

۶- DNA نوترکیب به دلیل داشتن نقطه‌ی شروع همانندسازی مستقل به کمک DNA پلی‌مراز و هلیکاز باکتری کلون می‌شود.

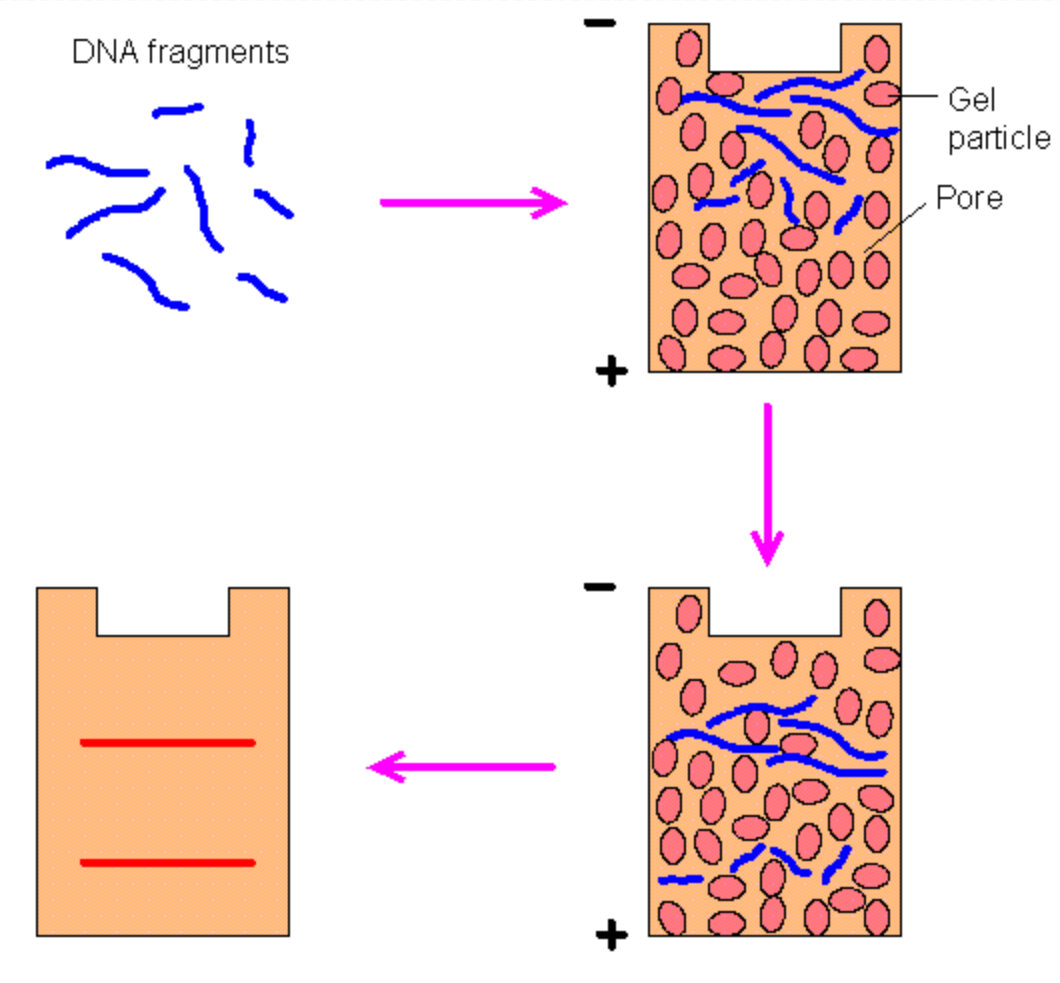
۷- ژن مقاومت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین به کمک RNA پلی مراز باکتری روشن می‌شود که می‌توان با این آنتی‌بیوتیک باکتری‌ها را غربال کرد.

۸- اگر هدف تولید انسولین باشد، باید RNA پلی‌مراز ژن انسولین را رونویسی و بعد ریبوزوم باکتری آن را بسازد.

۹- اگر هدف استخراج ژن انسولین باشد به کمک آنزیم EcoRI ، ژن انسولین استخراج می‌شود.

۱۰- ژل الکتروفورز:

- قطعات برش داده شده در چاهک‌های ژل قرار می‌گیرند.
- قطب منفی در کنار چاهک و قطب مثبت مخالف آن قرار می‌گیرد.
- ژل منافذ ریز بسیار دارد، قطعات کوچک‌تر (انسولین) سریع‌تر از قطعات بزرگ‌تر (پلازمیدی) از آن‌ها عبور می‌کنند.
- بعد از اتمام الکتروفورز دونوار روی ژل وجود دارد. نوار نزدیکتر به قطب مثبت دارای قطعات کوچکتر (انسولین) است .
- این روش برای پروتئین ها هم کاربرد دارد.


DNA fragments
Gel particle
Pore
−
+
−
+