



اصول ومبانی مهندسی ژنتیک

مولفان:

دکتر محمدعلی ابراهیمی دکتر مسعود توحیدفر

مهندس ائلیاز احمدی نیک

امروزه کتاب‌خوانی و علم‌آموزی، نه تنها یک وظیفه‌ی ملی، که یک واجب دینی است.

مقام معظم رهبری

در عصر حاضر یکی از شاخصه‌های ارزیابی رشد، توسعه و پیشرفت فرهنگی هر کشوری میزان تولید کتاب، مطالعه و کتاب‌خوانی مردم آن مرز و بوم است. ایران اسلامی نیز از دیرباز تاکنون با داشتن تمدنی چندهزارساله و مراکز متعدد علمی، فرهنگی، کتابخانه‌های معتبر، علما و دانشمندان بزرگ با آثار ارزشمند تاریخی، سرآمد دولت‌ها و ملت‌های دیگر بوده و در عرصه‌ی فرهنگ و تمدن جهانی به‌سان خورشیدی تابناک همچنان می‌درخشد و با فرزندان نیک‌نهاد خویش هنرنمایی می‌کند. چه کسی است که در دنیا با دانشمندان فرزانه و نام‌آور ایرانی همچون ابوعلی سینا، ابوریحان بیرونی، فارابی، خوارزمی و ... همچنین شاعران برجسته‌ای نظیر فردوسی، سعدی، مولوی، حافظ و ... آشنا نباشد و در مقابل عظمت آنها سر تعظیم فرود نیاورد. تمامی این افتخارات ارزشمند، برگرفته از میزان عشق و علاقه فراوان ملت ما به فراگیری علم و دانش از طریق خواندن و مطالعه منابع و کتاب‌های گوناگون است. به شکرانه‌ی الهی، تاریخ و گذشته ما، همیشه درخشان و پربار است. ولی اکنون در این زمینه در چه جایگاهی قرار داریم؟ آمار و ارقام ارائه‌شده از سوی مجامع و سازمان‌های فرهنگی در مورد سرانه‌ی مطالعه‌ی هر ایرانی، برایمان چندان امیدوارکننده نمی‌باشد و رهبر معظم انقلاب اسلامی نیز از این وضعیت بارها اظهار گله و ناخشنودی نموده‌اند.

کتاب، دروازه‌ای به سوی گستره‌ی دانش و معرفت است و کتاب خوب، یکی از بهترین ابزارهای کمال بشری است. همه‌ی دستاوردهای بشر در سراسر عمر جهان، تا آنجا که قابل کتابت بوده است، در میان دست‌نوشته‌هایی است که انسان‌ها پدید آورده و می‌آورند. در این مجموعه‌ی بی‌نظیر، تعالیم الهی، درس‌های پیامبران به بشر، و همچنین علوم مختلفی است که سعادت بشر بدون آگاهی از آنها امکان‌پذیر نیست. کسی که با دنیای زیبا و زندگی‌بخش کتاب ارتباط ندارد بی‌شک از مهم‌ترین دستاورد انسانی و نیز از بیشترین معارف الهی و بشری محروم است. با این دیدگاه، به‌روشنی می‌توان ارزش و مفهوم رمزی عمیق در این حقیقت تاریخی را دریافت که اولین خطاب خداوند متعال به پیامبر گرامی اسلام(ص) این است که «بخوان!» و در اولین

سوره‌ای که بر آن فرستاده‌ی عظیم‌الشان خداوند، فرود آمده، نام «قلم» به تجلیل یاد شده‌است: «إِقْرَأْ وَ رَبُّكَ الْأَكْرَمُ. الَّذِي عَلَّمَ بِالْقَلَمِ» در اهمیت عنصر کتاب برای تکامل جامعه‌ی انسانی، همین بس که تمامی ادیان آسمانی و رجال بزرگ تاریخ بشری، از طریق کتاب جاودانه مانده‌اند.

دانشگاه پیام‌نور با گستره‌ی جغرافیایی ایران‌شمول خود با هدف آموزش برای همه، همه‌جا و همه‌وقت، به‌عنوان دانشگاهی کتاب‌محور در نظام آموزش عالی کشورمان، افتخار دارد جایگاه اندیشه‌سازی و خردورزی بخش عظیمی از جوانان جویای علم این مرز و بوم باشد. تلاش فراوانی در ایام طولانی فعالیت این دانشگاه انجام پذیرفته تا با بهره‌گیری از تجربه‌های گرانقدر استادان و صاحب‌نظران برجسته کشورمان، کتاب‌ها و منابع آموزشی درسی شاخص و خودآموز تولید شود. در آینده هم، این مهم با هدف ارتقای سطح علمی، روزآمدی و توجه بیشتر به نیازهای مخاطبان دانشگاه پیام‌نور با جدیت ادامه خواهد داشت. به‌طور قطع استفاده از نظرات استادان، صاحب‌نظران و دانشجویان محترم، ما را در انجام این وظیفه‌ی مهم و خطیر یاری‌رسان خواهد بود. پیشاپیش از تمامی عزیزانی که با نقد، تصحیح و پیشنهادهای خود ما را در انجام این وظیفه‌ی خطیر یاری می‌رسانند، سپاسگزاری می‌نماییم. لازم است از تمامی اندیشمندانی که تاکنون دانشگاه پیام‌نور را منزلگاه اندیشه‌سازی خود دانسته و ما را در تولید کتاب و محتوای آموزشی درسی یاری نموده‌اند، صمیمانه قدردانی گردد. موفقیت و بهروزی تمامی دانشجویان و دانش‌پژوهان عزیز آرزوی همیشگی ما است.

ابوالفضل فراهانی

رئیس دانشگاه پیام‌نور

فهرست

پیش‌گفتار..... سیزده

فصل اول. مقدمه، تاریخچه و کاربردهای مهندسی ژنتیک.....	۱
اهداف کلی	۱
اهداف یادگیری.....	۱
مقدمه.....	۲
۱-۱ کاربردهای مهندسی ژنتیک و موجودات تراریخته.....	۸
۱-۱-۱ ارتقای کیفیت محصولات	۸
۱-۱-۲ افزایش مستقیم عملکرد گیاهان.....	۹
۱-۱-۳ مهندسی پروتئین.....	۹
۱-۱-۴ تولید گیاهان تراریخته مقاوم به تنش‌های محیطی.....	۱۱
۱-۱-۵ گیاهان تراریخته مقاوم به تنش‌های زنده.....	۱۱
۱-۱-۶ گیاهان تراریخته مقاوم به تنش‌های غیرزنده.....	۱۳
۱-۱-۷ ایجاد مقاومت به علف‌کش‌ها.....	۱۴
۱-۱-۸ بهبود کیفیت انباری، افزایش دوام و رنگ گل‌ها.....	۱۴
۱-۱-۹ تولید واکسن‌های خوراکی، مواد شیمیایی، دارویی و غیره.....	۱۵
۱-۱-۱۰ تولید گیاهان تراریخته نرعیق.....	۱۶
۱-۱-۱۱ حیوانات تراریخته.....	۱۷
۱-۱-۱۲ میکروب‌های تراریخته.....	۱۷
۱-۱-۱۳ ژن درمانی.....	۱۸
۲-۱ ملاحظات احتمالی مهندسی ژنتیک.....	۱۸
خودآزمایی.....	۲۰

فصل دوم. ابزارهای دست‌ورزی ژن و ساخت DNA نو ترکیب.....	۲۱
اهداف کلی	۲۱
اهداف یادگیری.....	۲۱
مقدمه.....	۲۱
۱-۲ پلیمرازها.....	۲۲
۲-۲ نوکلئازها.....	۲۵
۳-۲ تیپ I آنزیم.....	۲۶
۴-۲ روش نام‌گذاری آنزیم‌های تیپ II.....	۲۸
۵-۲ تعریف واحد آنزیمی.....	۲۸
۶-۲ نگهداری آنزیم‌های محدودکننده.....	۲۸
۷-۲ نکات لازم برای کار با آنزیم‌های محدودکننده داخلی نوع دوم.....	۲۹
۸-۲ Star Activity.....	۳۰
۹-۲ ایزوشیمرازها.....	۳۰
۱۰-۲ نوکلئاز S1.....	۳۱
۱۱-۲ آنزیم DNase I.....	۳۲
۱۲-۲ آنزیم RNase A.....	۳۲
۱۳-۲ آنزیم RNase H.....	۳۲
۱۴-۲ آنزیم کلتو.....	۳۳
۱۵-۲ آنزیم لیگاز.....	۳۳
۱۶-۲ آنزیم‌های تغییردهنده DNA.....	۳۴
۱۷-۲ تبدیل انتهای صاف به انتهای چسبنده.....	۳۶
۱۸-۲ همسانه‌سازی.....	۳۸
۱۹-۲ غربالگری.....	۴۳
۱-۱۹-۱ غیرفعال‌سازی یک ژن عملکردی.....	۴۴
۲-۱۹-۲ روش غیرفعال‌سازی یک ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک.....	۴۶
۳-۱۹-۲ روش PCR مستقیم.....	۴۶
خودآزمایی.....	۴۷
فصل سوم. تهیه DNA خالص و الکتروفورز.....	۴۹
اهداف کلی	۴۹
اهداف یادگیری.....	۴۹
مقدمه.....	۴۹
۱-۳ جداسازی DNA.....	۵۰
۱-۱-۳ روش‌های جداسازی DNA.....	۵۱
۲-۳ جداکردن DNA ژنومی با وزن مولکولی بالا.....	۵۳
۱-۲-۳ جداکردن اسید نوکلئیک از سلول‌های باکتریایی.....	۵۳

۵۳	۳-۳ آزمایش‌های مقدماتی پلاسمید و روش‌های جذب
۵۴	۴-۳ جداسازی پلاسمید
۵۴	۵-۳ جداسازی اسید نوکلئیک از فاژ
۵۵	۶-۳ الکتروفورز بر روی ژل
۵۶	۳-۶-۱ انواع ژل
۵۶	۳-۶-۲ SDS-PAGE
۵۷	۳-۷ حرکت قطعات DNA در آگاروز
۵۸	۳-۸ غلظت آگاروز
۵۸	۳-۹ شکل مولکولی
۵۸	۳-۱۰ ولتاژ
۵۹	۳-۱۱ بافر الکتروفورز
۵۹	۳-۱۲ جداسازی DNA از ژل
۶۰	۳-۱۳ ژل آگاروز
۶۰	۳-۱۴ جداسازی قطعات بزرگ DNA
۶۱	خودآزمایی

۶۳	فصل چهارم. انواع ناقل‌های همسانه‌سازی
۶۳	اهداف کلی
۶۳	اهداف یادگیری
۶۴	مقدمه
۶۴	۴-۱ پلاسمید
۶۶	۴-۱-۱ همانندسازی
۶۶	۴-۱-۲ گروه‌های ناسازگار
۶۶	۴-۱-۳ کنترل تعداد نسخه
۶۶	۴-۱-۴ قسمت‌بندی (تفکیک)
۶۷	۴-۲ انواع پلاسمیدها
۶۷	۴-۲-۱ پلاسمیدهای هم‌یوغ و غیرهم‌یوغ (پیوسته و غیرپیوسته)
۶۷	۴-۳ طبقه‌بندی پلاسمیدها بر اساس عملکرد
۶۹	۴-۴ ساختمان پلاسمیدها
۶۹	۴-۵ مبدأ همانندسازی (Ori)
۶۹	۴-۶ نشانگرهای انتخابی
۷۰	۴-۷ جایگاه همسانه‌سازی
۷۰	۴-۸ همانندسازی پلاسمیدها
۷۰	۴-۹ پلاسمیدها به عنوان ناقل
۷۰	۴-۹-۱ انواع پلاسمیدها بر اساس نوع همانندسازی
۷۳	۴-۱۰ برخی پلاسمیدهای ناقل مهم

۷۳	pUC18 و pBR322 ۱-۱۰-۴
۷۴	 pUC19 ۲-۱۰-۴
۷۵	پلاسمیدهای مخمری ۳-۱۰-۴
۷۵	Ti ۱۱-۴
۷۹	۱۲-۴ باکتریوفاژها به عنوان ناقل ها
۷۹	۱۳-۴ ساختار باکتریوفاژها
۸۰	۱۴-۴ مکانیسم آلودگی میزبان
۸۲	۱۵-۴ چرخه تکثیر فاژ
۸۲	۱-۱۵-۴ حلقوی شدن کروموزوم فاژ
۸۳	۲-۱۵-۴ فاژهای لیزکننده (تجزیه کننده دیواره سلولی) و لیزوژنیک
۸۳	۳-۱۵-۴ فاژهای مخرب یا لیزکننده
۸۳	۴-۱۵-۴ فاژ انباشته در سلول
۸۳	۵-۱۵-۴ لیزشدن و رهایی فاژ
۸۴	۶-۱۵-۴ فاژ معتدل یا لیزوژنی
۸۴	۱۶-۴ جایگاه اختصاصی نوترکیبی
۸۵	۱۷-۴ خاتمه لیزوژنی
۸۵	۱۸-۴ اهمیت لیزوژنی
۸۶	۱۹-۴ طبقه بندی فاژ
۸۷	۲۰-۴ باکتریوفاژ لامبدأ به عنوان ناقل
۹۰	۲۱-۴ فاژ M13
۹۱	۲۲-۴ چرخه زندگی M13
۹۱	۲۳-۴ M13 به عنوان یک ناقل
۹۲	۲۴-۴ فاژمیدها
۹۲	۲۵-۴ کاسمیدها
۹۳	۲۶-۴ کاربرد کاسمید به عنوان ناقل
۹۵	۲۷-۴ ناقلین گیاهی
۹۵	۲۸-۴ CaMV
۹۶	۲۹-۴ چرخه زندگی CaMV
۹۷	۳۰-۴ پلاسمید Ti
۹۸	۳۱-۴ ویروس های جانوری
۹۸	۳۲-۴ SV40 (ویروس بوزینه)
۱۰۰	۳۳-۴ آدنوویروس ها
۱۰۰	۳۴-۴ دیگر فاژهای مهم
۱۰۰	۳۵-۴ ناقلین یوکاریوتی
۱۰۱	۳۶-۴ ناقل های مخمر
۱۰۲	۳۷-۴ ناقل های پلاسمید الحاقی مخمری

۳۸-۴	ناقل‌های پلاسمیدی اپی‌زومی مخمر.....	۱۰۲
۳۹-۴	کروموزوم‌های مصنوعی مخمر.....	۱۰۲
	خودآزمایی.....	۱۰۴
فصل پنجم. تهیه کتابخانه ژنومی، cDNA و روش‌های شناسایی ژن از کتابخانه.....		
	اهداف کلی.....	۱۰۷
	اهداف یادگیری.....	۱۰۷
	مقدمه.....	۱۰۸
	۱-۵ کتابخانه ژنومی.....	۱۰۸
	۲-۵ کتابخانه‌های cDNA.....	۱۱۳
	۳-۵ ساخت کتابخانه cDNA.....	۱۱۹
	۴-۵ روش‌های شناسایی ژن از کتابخانه ژنومی.....	۱۲۰
	۵-۵ غربالگری براساس دورگ‌گیری اسیدهای نوکلئیک.....	۱۲۰
	۶-۵ روش هیبریداسیون نوردن بلات.....	۱۲۳
	۷-۵ غربالگری ایمونولوژیکی.....	۱۲۳
	۸-۵ غربالگری براساس عملکرد پروتئین.....	۱۲۵
	۹-۵ نمایش فاژی.....	۱۲۶
	۱۰-۵ روش نشان‌دارکردن اسید نوکلئیک.....	۱۲۶
	۱-۱۰-۵ پرکردن شکاف.....	۱۲۶
	۲-۱۰-۵ نشان‌دارکردن به‌روش پرایمرهای تصادفی.....	۱۲۷
	۱۱-۵ روش‌های غیررادیواکتیو.....	۱۲۷
	خودآزمایی.....	۱۲۸
فصل ششم. روش‌های بررسی بیان ژن.....		
	اهداف کلی.....	۱۳۱
	اهداف یادگیری.....	۱۳۱
	مقدمه.....	۱۳۱
	۱-۶ اصول و مبانی Real Time PCR.....	۱۳۲
	۲-۶ استفاده از Real Time PCR در کمی‌سازی نسبی.....	۱۳۹
	خودآزمایی.....	۱۴۱
فصل هفتم. تکنیک‌های توالی‌یابی DNA.....		
	اهداف کلی.....	۱۴۳
	اهداف یادگیری.....	۱۴۳
	مقدمه.....	۱۴۳
	۱-۷ توالی‌یابی با استفاده از روش شیمیایی (روش ماکسام - گیلبرت).....	۱۴۴

۱۴۵.....	۲-۷ توالی‌یابی به وسیله خاتمه‌دهنده زنجیره (روش سانگر-کولسون)
۱۵۱.....	۳-۷ توالی‌یابی خودکار.....
۱۵۳.....	۴-۷ روش گام‌زنی به کمک آغازگر.....
۱۵۴.....	۵-۷ تعیین توالی Shotgun (توالی‌یابی شلیک تصادفی).....
۱۵۵.....	۶-۷ روش پایروسکونسینگ.....
۱۵۵.....	۷-۷ تکنیک‌های نسل جدید توالی‌یابی (NGS).....
۱۵۷.....	۱-۷-۷ کاربردهای NGS.....
۱۵۹.....	خودآزمایی.....

۱۶۱.....	فصل هشتم. انتقال ژن به گیاهان و آنالیز مولکولی گیاهان تراریخته.....
۱۶۱.....	اهداف کلی.....
۱۶۱.....	اهداف یادگیری.....
۱۶۲.....	مقدمه.....
۱۶۲.....	۱-۸ کشت بافت.....
۱۶۳.....	۲-۸ فرایند انتقال ژن.....
۱۶۳.....	۱-۲-۸ الکتروپوریشن.....
۱۶۴.....	۲-۲-۸ روش انتقال ژن با واسطه آگروباکتریوم.....
۱۷۰.....	۳-۲-۸ تفنگ ژنی.....
۱۷۱.....	۴-۲-۸ روش ریز تزریقی.....
۱۷۲.....	۵-۲-۸ روش لیپوزومی.....
۱۷۲.....	۳-۸ آنالیز مولکولی گیاهان تراریخته.....
۱۷۳.....	۱-۳-۸ آنالیز در سطح DNA.....
۱۷۸.....	۴-۸ بررسی گیاه تراریخته در سطح RNA.....
۱۷۹.....	۵-۸ آنالیز در سطح پروتئین.....
۱۸۱.....	۶-۸ ارزیابی فنوتیپی.....
۱۸۲.....	خودآزمایی.....

۱۸۳.....	فصل نهم. کشاورزی مولکولی.....
۱۸۳.....	اهداف کلی.....
۱۸۳.....	اهداف یادگیری.....
۱۸۳.....	مقدمه.....
۱۸۴.....	۱-۹ کشاورزی مولکولی.....
۱۸۹.....	۲-۹ آنالیز مولکولی.....
۱۹۱.....	خودآزمایی.....

فصل دهم. ایمنی زیستی گیاهان تراریخته.....	۱۹۳
اهداف کلی	۱۹۳
اهداف یادگیری.....	۱۹۳
مقدمه.....	۱۹۳
۱-۱۰ چند اصطلاح مهم در ایمنی زیستی.....	۱۹۴
۲-۱۰ ارزیابی احتمال خطر گیاهان تراریخته.....	۱۹۵
خودآزمایی.....	۱۹۷

فصل یازدهم. روش های آزمایشگاهی درخصوص اسیدنوکلئیک.....	۱۹۹
اهداف کلی.....	۱۹۹
اهداف یادگیری.....	۱۹۹
مقدمه.....	۱۹۹
۱-۱۱ کشت فاز لاند (λ).....	۲۰۰
۲-۱۱ استخراج DNA لاند (λ).....	۲۰۴
۳-۱۱ جداسازی اسید دزوکسی ریبونوکلئیک (DNA).....	۲۰۶
۴-۱۱ استخراج DNA گیاهی.....	۲۰۹
۵-۱۱ استخراج DNA کل گیاهی (روش سریع).....	۲۱۱
۶-۱۱ جداسازی اسید ریبونوکلئیک.....	۲۱۴
۷-۱۱ اندازه گیری DNA.....	۲۱۷
۸-۱۱ اندازه گیری RNA.....	۲۱۹
۹-۱۱ جداسازی mRNA با استفاده از کروماتوگرافی جاذب.....	۲۲۱
۱۰-۱۱ جداسازی پلاسمیدها.....	۲۲۳
۱۱-۱۱ روش جداسازی سریع DNA پلاسمید (Mini screen).....	۲۳۰
۱۲-۱۱ برش DNA.....	۲۳۲
۱۳-۱۱ الکتروفورز DNA در ژل آگارز.....	۲۳۵
۱۴-۱۱ بازیابی قطعات DNA از روی ژل آگارز.....	۲۳۹
۱۵-۱۱ لکه گذاری سادرن.....	۲۴۰

منابع.....	۲۴۵
------------	-----

واژه نامه.....	۲۵۵
----------------	-----

پیش‌گفتار

مهندسی ژنتیک به عنوان یکی از ابزارهای بیوتکنولوژی در قرن حاضر، تلاش دارد تا قلمرو حیات را محدود به مرزهای فعلی ننماید و بتواند این مرزها را با روش‌های نوین به منظور حل مشکلات بشریت گسترش دهد. اکنون با توسل به روش‌های مهندسی ژنتیک امکان ساخت DNAی نو ترکیب، ادغام و انتقال ژن‌ها در سلول هدف امکان‌پذیر شده است. از طرف دیگر برطرف شدن بسیاری از چالش‌های بشر از جمله امنیت غذایی، درمان برخی بیماری‌ها و رفع مشکلات زیست محیطی و غیره با بهره‌گیری از این علم امکان‌پذیر شده است. برای نیل به این هدف باید به این علم و تکنیک‌های آن مسلط شد. لذا تلاش گردیده تا کتاب حاضر به عنوان یک منبع درسی با ویژگی خودآموز تدوین شده تا دانشجویان و دانش‌پژوهان را در آشنایی با این مهم یاری‌رسان باشد. خداوند بزرگ را سپاسگزاریم که این توفیق را به ما عطا فرمود.

لازم است از جناب آقای دکتر کسری اصفهانی و دکتر علیرضا صفاهانی لنگرودی که ما را در ارتقای علمی این کتاب یاری کرده‌اند، سپاسگزاری نمائیم. فصل یازدهم این کتاب حاصل همکاری سرکار خانم مهندس مهسا کریمی است، این فرصت را غنیمت شمرده و مراتب سپاسگزاری خود را از همکاری موثر ایشان اعلام می‌داریم.

صفحه‌آرایی و تنظیم ساختار کتاب، با همکاری کارشناسان محترم مدیریت تدوین و تولید کتب آموزشی دانشگاه پیام‌نور سرکار خانم حاجی‌انزهایی، سرکار خانم علی‌نژاد رنجکش و سرکار خانم حیدری عراقی انجام شده است که از زحمات این همکاران محترم قدردانی می‌گردد.

لازم است از خانواده محترممان که در نهایت شکیبایی ما را در ارائه این اثر یاری کرده و به ادامه این کار علمی تشویق نمودند، صمیمانه سپاسگزاری نمائیم. امید است با نظرات دانشجویان، استادان و محققان محترم در آینده شاهد ارتقای علمی این اثر باشیم.

محمدعلی ابراهیمی

مسعود توحیدفر

اثرلیاز احمدی‌نیک

تابستان ۱۳۹۳

فصل اول

مقدمه، تاریخچه و کاربردهای مهندسی ژنتیک

اهداف کلی

هدف کلی این فصل عبارت است از: آشنا ساختن شما با مفهوم مهندسی ژنتیک و دستکاری ژن‌ها، بیان پیشینه‌ای از تاریخچه این علم در جهان و ایران و جنبه‌های کاربردی مهندسی ژنتیک

اهداف یادگیری

برای رسیدن به هدف کلی فوق، باید به هدف‌های یادگیری جزئی زیر دست یابید. یعنی بتوانید:

۱. مهندسی ژنتیک را تعریف کنید.
۲. به اختصار مراحل مهندسی ژنتیک را توضیح دهید.
۳. تاریخچه مختصری از مهندسی ژنتیک را بنویسید.
۴. کاربردهای مهندسی ژنتیک برای افزایش مستقیم عملکرد گیاهان را توضیح دهید.
۵. مهندسی پروتئین و کاربردهای آن را بیان نمایید.
۶. مثال‌هایی از تولید گیاهان تراریخته مقاوم به تنش‌های محیطی زنده را بیان کنید.
۷. چند ژن مؤثر در ایجاد مقاومت به تنش خشکی را نام ببرید.
۸. ایجاد مقاومت به علف‌کش به‌وسیله مهندسی ژنتیک را به اختصار شرح دهید.
۹. مکانیسم عمل برخی ژن‌های مؤثر در افزایش عمر ماندگاری میوه در انبار را بیان کنید.

۱۰. مثالی از تولید گل‌هایی با رنگ‌های جدید را ارائه نمایید.
۱۱. واکسن‌های خوراکی را شرح دهید.
۱۲. کشاورزی مولکولی را تعریف کنید.
۱۳. برخی از قابلیت‌های مهندسی ژنتیک و مهندسی پروتئین را در صنعت و محیط زیست را شرح دهید.
۱۴. کاربرد مهندسی ژنتیک در تولید تجاری هورمون‌ها و آنزیم‌ها را در قالب چند مثال بیان کنید.
۱۵. تولید گیاهان نر عقیم به وسیله دست‌کاری ژنتیکی را شرح دهید.
۱۶. کاربرد حیوانات تراریخته را ارائه نمایید.
۱۷. ژن درمانی را تعریف کنید.
۱۸. نگرانی‌های بشر نسبت به مهندسی ژنتیک را توضیح دهید.
۱۹. چالش‌های موجود در روند انجام مهندسی ژنتیک را بیان نمایید.

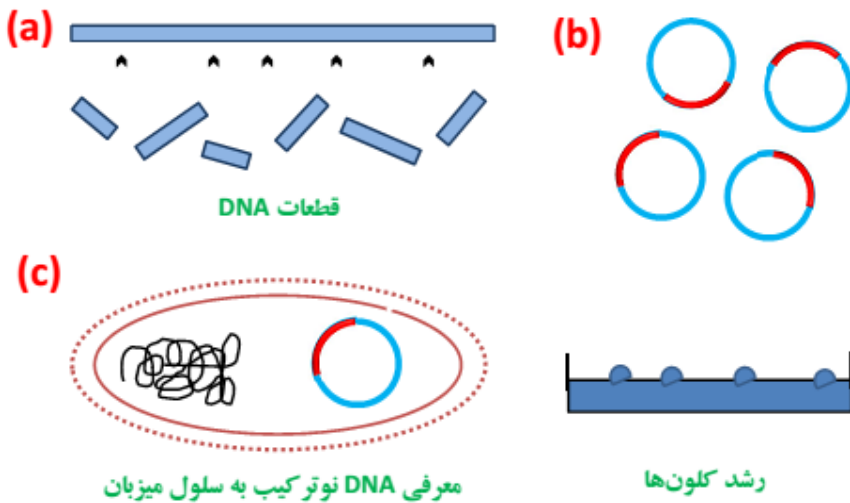
مقدمه

امروزه دانش و فن مهندسی ژنتیک در عرصه‌های بسیار متنوع مانند کشاورزی، تغذیه و مواد غذایی، دامپروری، شاخه‌های مختلف کشاورزی، علوم پزشکی و صنایع دارویی، صنایع تخمیری، صنایع نظامی، انرژی، محیط‌زیست و بهداشت کاربردهای بسیار ارزشمندی پیدا کرده است. اهمیت بعضی از اصول علمی، در زمان کشف آنها مشخص نمی‌شود، بلکه پس از مدت زمانی که می‌گذرد ارزش آنها معلوم می‌شود. یکی از مثال‌های روشن این مسئله، کشف ساختمان سه بعدی DNA به وسیله جیمز واتسون و فرانسیس کریک در سال ۱۹۵۳ بود. این ساختمان نسبتاً ساده باعث شد تا دانشمندان سیستم‌های مختلف ژنتیکی را بررسی کنند. پس از آن دانشمندان مختلف سعی کردند که از این اطلاعات استفاده نمایند. هدف آنها نیز بیان ساده‌ای داشت. آنها خواستند تا DNA را از یک موجود بگیرند و در ژنوم موجود دیگر ادغام نمایند تا اثرات آن ژن، در موجود ثانویه بروز کند. مهندسی ژنتیک شاخه جدید و قابل توسعه‌ای از بیوتکنولوژی می‌باشد که به‌طور خلاصه دست‌ورزی ژن‌های^۱ یک موجود تحت شرایط کنترل‌شده‌ی

آزمایشگاهی، به منظور رسیدن به یک بیان تغییر یافته از ژن مورد انتخاب است.

مهندسی ژنتیک به طور خلاصه شامل مراحل زیر است:

- **جداسازی ژن^۱ مورد نظر:** در این مرحله ژن مورد نظر شناسایی، استخراج و تخلیص می شود. این ساختار ژنتیکی همچنین DNA دهنده^۲ یا DNA هدف^۳ نامیده می شود.
- **انتخاب ناقل^۴:** ژن مورد نظر توسط ناقل وارد سلول میزبان می شود. ناقل عبارت است از یک مولکول DNA خود تکثیر^۵ که ژن مورد نظر به آن متصل می شود. معمولاً مولکول های DNA ویروسی، پلاسمیدها و کروموزوم های مصنوعی به عنوان ناقل به کار می روند. اما روش های انتقال فیزیکی DNA هم معرفی شده و وجود دارد.
- **همسانه سازی (همسانه کردن) ژن مورد نظر در ناقل:** هدف از همسانه سازی ژن، به دست آوردن مقادیر زیادی از ژن های خاص به صورت خالص می باشد. هدف اصلی همسانه سازی ژن، انتقال ژن مورد نظر از داخل یک ژنوم بزرگ و پیچیده به داخل یک ناقل ساده و کوچک و تکثیر آن است. در مرحله بعد تعداد زیادی نسخه یکسان از ژن مورد نظر به منظور انتقال های بعدی این ژن به سلول های هدف تولید می شوند. امروزه همسانه سازی ژن، فرایندی سریع و ماشینی است که با استفاده از دستگاه PCR^۶ که واکنش رنجیره ای پلیمراز را انجام می دهد به سهولت انجام می گیرد.
- **انتقال اختصاصی ژن به سلول های میزبان:** ژن مورد نظر به یکی از روش های انتقال ژن به سلول های میزبان و هدف منتقل می شود. سلول هایی که ژن را دریافت کرده اند در مرحله بعد باید غربالگری، انتخاب و تکثیر شوند.
- **بیان ژن و ایجاد صفت مورد نظر:** ژن مورد نظر که به میزبان انتقال یافته، باید بتواند محصولات کاربردی خود و در نتیجه صفات مرتبط ما را در میزبان جدید بیان کند. محصول ژن ها عمدتاً پروتئین ها هستند و از محصولات غیر پروتئینی می توان به tRNA، rRNA، snRNA اشاره کرد.



شکل ۱-۱. همسانه‌سازی قطعه DNA: (a) منبع DNA جداسازی شده و قطعه قطعه شده در اندازه مناسب (b) قطعات ملحق شده به ناقل برای تولید مولکول‌های DNA نو ترکیب در این مورد ناقل پلاسمید نشان داده شده است (c) معرفی مولکول DNA نو ترکیب به سلول میزبان برای تکثیر کلون‌ها (در این شکل سلول میزبان یک باکتری است).

سال ۱۹۷۰ که آن را می‌توان نقطه آغاز مهندسی ژنتیک دانست، زمانی بود که اولین آنزیم برشی (محدودکننده) توسط اسمیت در باکتری *Haemophilus influenzae* کشف شد. بعداً این آنزیم به *HindII* معروف گردید. در سال بعد ناتانر اولین نقشه برشی DNA حلقوی ویروس SV40 را با استفاده از این آنزیم تهیه و ارائه کرد. در سال ۱۹۷۲ لوبان و کیسر از DNA لیگاز برای اتصال دو قطعه DNA و ساخت مولکول DNA نو ترکیب استفاده نمودند. یک سال بعد کوهن و بویر موفق به ادغام DNA ویروسی و باکتریایی در یک پلاسمید شدند و به این ترتیب نخستین موجود حامل DNA نو ترکیب ساخته شد. تحقیقات ادامه داشت تا اینکه در سال ۱۹۹۷ نخستین پروتئین انسانی (هورمون سوماتواسیاتین) همسانه‌سازی شد و مهندسی ژنتیک توانست برای اولین بار در سطح انبوه، محصولی را تولید کند. در همین سال روش «خاتمه زنجیره به کمک دی‌داکسی نوکلئوتیدها»^۱ (dNTPs) و روش دیگری مبتنی بر تجزیه شیمیایی زنجیره DNA، برای توالی‌یابی DNA به جامعه علمی معرفی شد. در سال

1. High quality deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)

۱۹۷۸ نخستین داروی تغییر یافته ژنتیکی برای مصارف انسانی که حاوی ژن انسولین انسانی بود، به بازار ارائه شد. در سال ۱۹۷۸ نخستین واکسن علیه ویروس هپاتیت B توسط تکنولوژی DNA نو ترکیب ساخته شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دهه ۱۹۸۰ معرفی و امکان تکثیر و سنتز DNA کافی برای مهندسی ژنتیک را فراهم کرد. به دنبال این توسعه علمی، تحقیقات زیر به سرعت باعث تحول در علم مهندسی ژنتیک شد.

۱۹۹۰: تولید مایه پنیر مصنوعی کیموزین با استفاده از باکتری‌ها که هم اکنون نیمی از پنیر آمریکا به کمک آن تولید می‌شود.

۱۹۹۳: هورمون رشد گاوی^۱ (BGH) در باکتری تولید شد، که به عنوان دارو به گاوها خورانده می‌شود و موجب افزایش تولید شیر آنها می‌گردد.

۱۹۷۳: معرفی موش تراریخته با انتقال DNA به داخل جنین آن به عنوان اول حیوان تراریخته توسط Rudolf Jaenisch

۱۹۹۶: تولد بز تراریخته به نام گریس که توانایی تولید شیر دارای پروتئین ضد سرطان را داشت.

۱۹۹۷: در اسکاتلند گوسفند تراریخته دالی به دنیا آمد. در همان سال دو گوسفند تراریخته دیگر به نام‌های مولی و پولی به دنیا آمدند که حامل یک ژن انسانی برای تولید فاکتور انعقاد خون بودند.

۱۹۹۸: دو گوساله تراریخته به نام‌های چارلی و گئورگ در آمریکا متولد شدند که داروی سرم آلبومین انسانی (HSA)^۲ را در شیر خود تولید می‌کردند.



میمون تراریخته اندی (۲۰۰۱)



یادبود گوسفند دالی در موزه‌ی سلطنتی اسکاتلند

۲۰۰۱: میمون تراریخته به نام اندی^۱ تولید شد که حامل ژن‌هایی برای تولید پروتئین‌هایی برای درمان بیماری آلزایمر و همچنین بیماری Cystic Fibrosis بود. در همان سال در کانادا یک بز تراریخته به نام بیلی متولد شد که حامل ژن‌هایی برای تولید پروتئین تار عنکبوت در شیر خود بود که این ماده در جراحی مصرف دارد.

در خلال این سال‌ها و سال‌های بعد از آن نیز این روند ادامه داشت. امروزه متخصصین مهندسی ژنتیک می‌توانند ژن‌های خارجی را از هر موجود زنده‌ای، در ژنوم یک موجود زنده دیگر وارد نمایند و انواع موجودات تراریخت را تولید کنند. دانشمندان این علم مدعی هستند که در آینده قادرند بسیاری از مشکلات بشر را در زمینه‌های کشاورزی، علوم پزشکی و صنایع دارویی، صنایع تخمیری، صنایع نظامی، انرژی، محیط‌زیست و بهداشت را حتی در زمانی کوتاه‌تر، برطرف نمایند.

در ایران نیز مؤسسه سرم‌سازی رازی و انیستیتو پاستور از مؤسسات قدیمی هستند که در زمینه تولید سرم و واکسن از طریق بیوتکنولوژی آغاز به فعالیت کردند. پیشینه علم بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک در ایران به اختصار به شرح زیر است.

۱۲۹۹: تأسیس انیستیتو پاستور ایران

۱۳۰۳: آغاز به کار مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی زیر نظر وزارت کشاورزی



تصویر بدو فعالیت انیستیتو پاستور ایران

- ۱۳۴۵: تأسیس انجمن ژنتیک ایران
- ۱۳۶۱: تأسیس پژوهشکده زیست فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
- ۱۳۶۶: تأسیس پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری زیر نظر وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
- ۱۳۷۰: شکل‌گیری پژوهشگاه رویان
- ۱۳۷۳: تصویب سرفصل مصوب رشته بیوتکنولوژی کشاورزی در مقطع کارشناسی‌ارشد توسط شورایعالی برنامه ریزی وزارت علوم تحقیقات و فناوری
- ۱۳۷۴: ساماندهی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انیستیتو پاستور ایران
- ۱۳۷۶: تأسیس انجمن بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
- ۱۳۷۸: احیای مجدد انجمن ژنتیک ایران
- ۱۳۷۹: آغاز به کار کمیته ملی زیست فناوری به صورت کمیته‌ای فرابخشی با عضویت دستگاه‌ها و نهادهای ذیربط
- ۱۳۷۹: تأسیس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران وابسته به وزارت جهاد کشاورزی
- ۱۳۸۲: تصویب سرفصل مصوب رشته بیوتکنولوژی کشاورزی گرایش گیاهی در مقطع دکتری تخصصی توسط شورایعالی برنامه ریزی وزارت علوم تحقیقات و فناوری
- ۱۳۸۳: تصویب سند توسعه زیست فناوری توسط هیات دولت
- ۱۳۸۵: تولد نخستین حیوان شبیه‌سازی شده خاورمیانه (رویانا) در پژوهشگاه رویان (۸ مهر ۱۳۸۵)
- ۱۳۸۷: ایجاد ستاد توسعه زیست فناوری به عنوان یکی از ستادهای فناوری‌های راهبردی زیر نظر معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری
- ۱۳۸۸: تولد دو گوساله و سه بزغاله همسانه‌سازی شده در پژوهشگاه رویان
- ۱۳۸۸: تولد اولین بزغاله تراریخته به نام حنا حاوی ژن تولیدکننده فاکتور ۹ انعقادی خون انسان در پژوهشگاه رویان

۱۳۸۹: تولد اولین بزغاله تراریخته حاوی ژن (Tpa)^۱ انسانی در پژوهشگاه رویان
 ۱۳۸۹: آغاز به کار دبیرخانه دائمی شبکه شرق مدیترانه‌ای ژنتیک و بیوتکنولوژی
 سلامت (EMGEN) در تهران



حنا اولین بزغاله شبیه‌سازی شده در ایران
 (فروردین ۱۳۸۸)



رویانا نخستین گوسفند شبیه‌سازی شده ایران و
 خاورمیانه (۱۳۸۵)

۱-۱ کاربردهای مهندسی ژنتیک و موجودات تراریخته

به هر موجود زنده‌ای که به وسیله یکی از روش‌های گوناگون دست‌کاری ژنتیکی^۲، یک ژن خارجی یا یک ژن تغییر یافته را دریافت کرده باشد و بتواند آن را به گونه‌ای پایدار بیان کند یک موجود تراریخته^۳ یا جاندار دست‌کاری شده ژنتیکی^۴ (GMO) اطلاق می‌گردد. دانش مهندسی ژنتیک امروزه توسعه زیادی یافته و جنبه‌های کاربردی فراوانی پیدا نموده است و پیش‌بینی می‌شود که در سال‌های آینده کاربردهای جدیدی هم پیدا کند. اما هدف کلی مهندسی ژنتیک را می‌توان افزایش کیفیت و میزان محصولات بیان کرد. در ادامه برخی از جنبه‌های کاربردی مهندسی ژنتیک در زمینه‌های مختلف به اختصار معرفی می‌گردد.

۱-۱-۱ ارتقای کیفیت محصولات

افزایش میزان یا ترکیب پروتئین‌های ذخیره‌ای در گیاهان زراعی و باغی با استفاده از

1. Tissue Plasminogen Activator
 2. Genetic Manipulation
 3. Transgenic
 4. Genetically Modified Organism

روش‌های اصلاح نباتات کلاسیک بسیار مشکل است. زیرا ژن‌های کنترل‌کننده این خصوصیات مهم به‌خصوص ترکیب اسیدهای آمینه اغلب با هم پیوستگی داشته و به همراه ژن‌هایی که عامل خصوصیات نامطلوب هستند به ارث می‌رسند. در این موارد استفاده از مهندسی ژنتیک در اصلاح کیفیت محصولات بسیار امیدبخش است.



برنج غیرتراریخته

برنج تراریخته حاوی ویتامین A

۱-۲ افزایش مستقیم عملکرد گیاهان

با رشد جمعیت و چالش‌های زیست محیطی، امنیت غذایی یکی از الویت‌های بشر محسوب می‌شود. امروزه توجه به به‌زراعی و به‌نژادی سنتی که عموماً زمان‌بر می‌باشد، نمی‌تواند امنیت غذایی را به‌تنهایی در آینده تضمین کند. مهندسی ژنتیک تلاش دارد با افزایش مستقیم عملکرد گیاهان زراعی در این خصوص امیدبخش باشد. از جمله این تلاش‌ها می‌توان به دست‌کاری ژنتیکی به‌منظور افزایش فعالیت فتوسنتزی به‌خصوص تغییر مسیر فتوسنتزی از C3 به C4، افزایش تعداد کلروپلاست‌ها، افزایش میزان کلروفیل در هر کلروپلاست، افزایش سنتز مواد کمیاب، بررسی امکان تغییر متابولیسم در گیاهان تراریخته و موارد متعدد دیگر اشاره کرد.

۱-۳ مهندسی پروتئین

مولکول‌های پروتئین، شامل یک توالی پلیمری از اسیدهای آمینه مختلف هستند. پروتئین‌های مصنوعی را نیز می‌توان ساخت، زیرا شیمیدان‌ها و زیست‌شناسان روش‌هایی را برای ترکیب ۲۰ آمینواسید طبیعی و برخی آمینواسیدهای غیرطبیعی

اضافی در قالب رشته‌های طولانی مورد نظر، ابداع کرده‌اند. مهندسی پروتئین و مهندسی آنزیم به طراحی و ساخت پروتئین‌ها یا آنزیم‌هایی با عملکرد جدید بواسطه تغییر توالی آمینواسیدی اطلاق می‌شود. اندازه و آرایش فضایی مولکول‌های پروتئینی را نیز می‌توان با روش‌های مهندسی پروتئین تغییر داد. بیوانفورماتیک و روش‌های محاسباتی^۱ ابزارهایی بسیار قدرتمند در فرایند مهندسی پروتئین هستند. انجام مهندسی پروتئین به‌منظور افزایش پایداری، از نظر فرایند آزمایشگاهی کار چندان پیچیده‌ای نیست و امروزه با ابداع روش‌های جدید، انجام آن آسان‌تر و سریع‌تر شده است. بخش نسبتاً پیچیده این کار مربوط به طراحی و عملیات فکری قبل از شروع مراحل آزمایشگاهی است. اندازه و آرایش فضایی مولکول‌های پروتئینی را نیز می‌توان با روش‌های مهندسی پروتئین تغییر داد. چنین تغییراتی عمدتاً برای بررسی ارتباط ساختار و عملکرد به کار می‌رود. برای رسیدن به این هدف می‌توان از چند روش زیر استفاده کرد.

• **جهش‌های نقطه‌ای:** با جابه‌جایی یک آمینواسید با آمینواسید دیگر در جایگاهی خاص از توالی آمینواسیدی، می‌توان تغییراتی را در ساختمان پروتئین اعمال کرد که این تغییرات عملکرد آن پروتئین را تحت تأثیر خود قرار می‌دهد. در روش مهندسی پروتئین هدف‌دار، آمینواسیدی که در عملکرد بیولوژیکی ویژه‌ای درگیر است به‌طور اختصاصی مورد هدف واقع می‌شود.

• **جهش‌های حذفی:** در این روش علاوه بر جایگزینی آمینواسیدها می‌توان با حذف آمینواسیدها به‌صورت تکی یا گروهی از توالی پروتئینی، پروتئین‌های جدید ایجاد کرد. این روش، روشی مؤثر برای ایجاد پروتئین‌هایی کوچک‌تر است که تنها حاوی یک یا چند بخش از پروتئین اصلی می‌باشد.

• **پروتئین‌های هیبریدی:** می‌توان توالی آمینواسیدی یک پروتئین را به پروتئین دیگر متصل کرد که به این ساختمان پروتئینی جدید، پروتئین هیبرید گفته می‌شود که به‌طور کلی ویژگی‌های هر دو ساختمان را دارا است. پروتئین‌های هیبریدی به‌طور گسترده‌ای در مطالعه عمل متقابل بین دو یا چند پروتئین به کار می‌رود.

یکی از کاربردهای دیگر مهندسی پروتئین، ایجاد پروتئین‌های درمانی با ویژگی‌های بهبودیافته مثل انحلال‌پذیری بالاتر و یا پایداری بیشتر می‌باشد. همچنین از

این روش برای رسیدن به فعالیت‌های بیولوژیکی جدید نیز استفاده می‌شود. مثل تولید آنتی بادی‌های کاتالیتیک، که قادر به کاتالیز واکنشی خاص می‌باشند.

۱-۱-۴ تولید گیاهان تراریخته مقاوم به تنش‌های محیطی

گیاهان دارای پتانسیل تولید بالایی هستند، ولی تنش‌های محیطی زنده (حشرات، ویروس‌ها، قارچ‌ها، باکتری‌ها و ...) و تنش‌های محیطی غیرزنده (شوری، خشکی، گرما، سرما، باد، آلاینده‌های محیطی، تشعشع، غرقاب، کمبود عناصر غذایی و ..) امکان تولید حداکثری گیاهان زراعی و باغی را نمی‌دهند. آمار حاکی از آن است که این تنش‌ها عامل مهم کاهش ۷۵ درصدی عملکرد محصولات کشاورزی می‌باشند. بنابراین تولید و معرفی ارقام متحمل به تنش اهمیت بسیار زیادی دارند. بسیاری از واکنش‌های سازگارکننده گیاهان به تنش، به وسیله عکس‌العمل هماهنگ و هم‌زمان بسیاری از ژن‌ها کنترل می‌شود. بنابراین شناخت فرایندهای بیوشیمیایی که مستقیماً توسط عامل تنش‌زا تحریک می‌شوند، در مهندسی ژنتیک حائز اهمیت می‌باشد.

۱-۱-۵ گیاهان تراریخته مقاوم به تنش‌های زنده

ایجاد مقاومت به حشرات با وارد کردن ژن‌هایی از گیاهان خویشاوند یا با منشاء باکتریایی که پروتئین‌های حشره‌کش را رمز می‌کنند، موفقیت‌آمیز بوده است. برای مثال باکتری *Bacillus thuringiensis* یک پروتئین حشره‌کش به نام پروتوکسین تولید می‌کند که پس از خورده شدن توسط حشره و ورود به روده آن، تحت تأثیر پروتئاز به یک توکسین فعال که سبب مرگ آفت می‌شود، تجزیه می‌گردد. ژن توکسین *Bt* که از این باکتری جدا شده به واسطه آگروباکتریوم به گیاهان انتقال داده شد و تظاهر این ژن در سلول‌های گیاهی هم در سطح رونویسی (یعنی وجود mRNA) و هم در سطح ترجمه (یعنی ستر پروتئین توکسین) تأیید گردید و گیاهان تراریخته حاصل مقاوم به حشرات آفت بودند. همچنین ژن ایزوپنتیل ترانسفراز (*ipt*)^۱ از آگروباکتریوم *تومافاسینس*، ژن *ph* از باکتری *Photorhabdus luminescens* و ژن *pht*^۲ از باکتری *Photorhabdus luminescens* سبب ایجاد مقاومت به حشرات می‌شود. ژن‌هایی نیز با منشاء گیاهی وجود دارند که باعث

1. isopentenyl transferase

2. parathyroid hormone