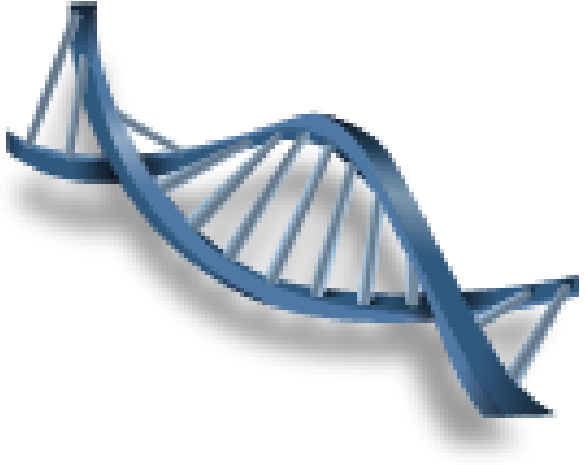


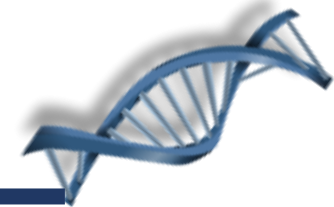
کلونینگ و بیان ژن

- مدت دوره : ۸ ساعت غیر حضوری
- کد تقویم هفتگی : ۵۶۱۳۴
- مدرس : سرکار خانم آزاده اعرابی
- تاریخ آزمون : ۱۵ آبان ۱۴۰۳
- مجری : پژوهشگاه بوعلی
- نحوه اجرا : سامانه سامک
- Samak.mums.ac.ir

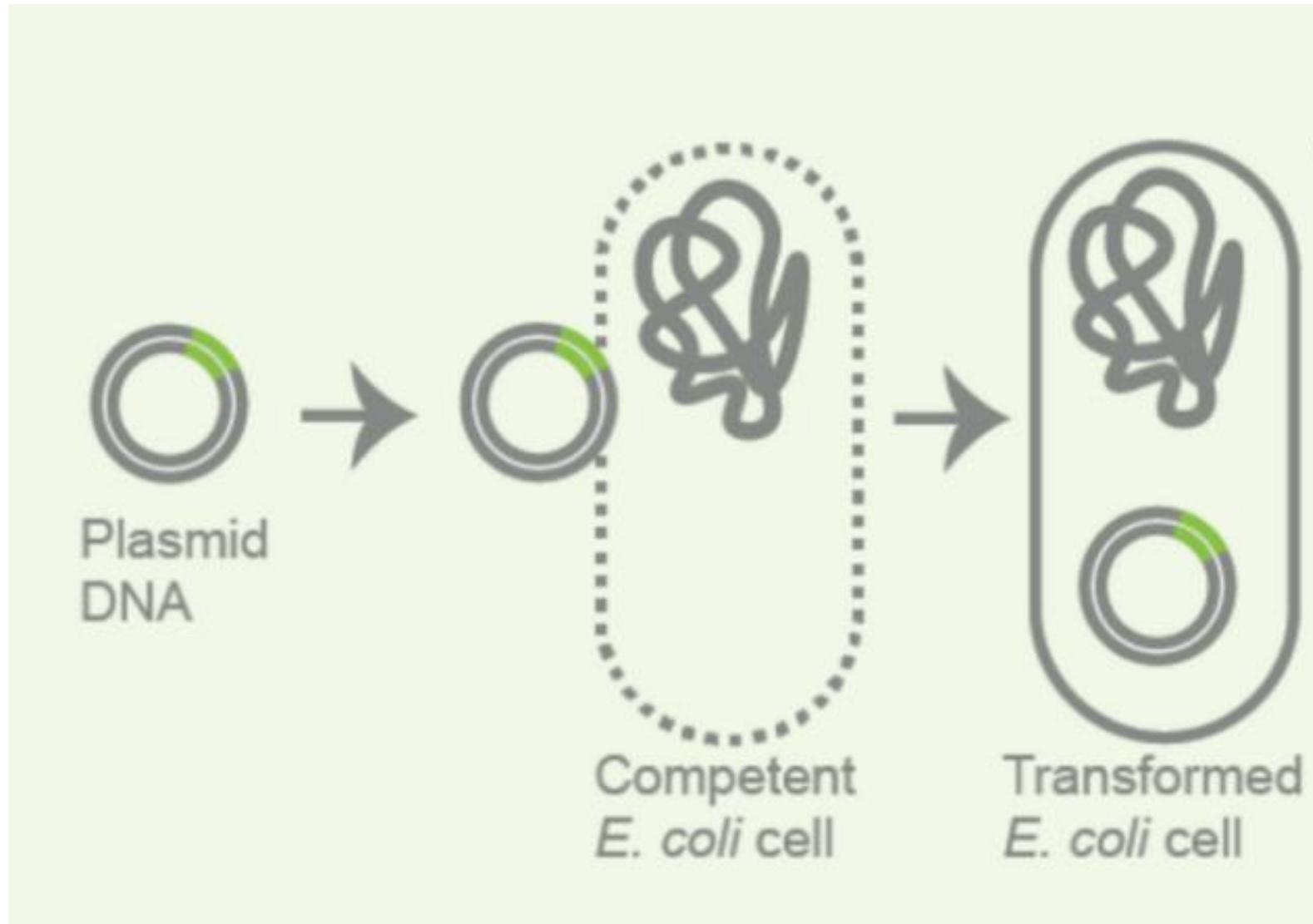
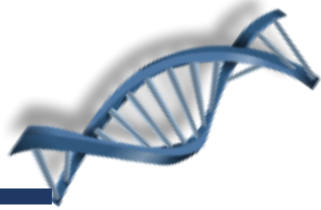


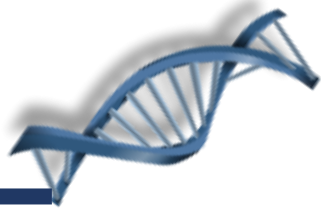
کلونینگ و بیان ژن

کلونینگ ژن چیست؟



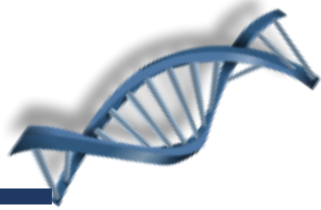
کلونینگ فرآیندی است که طی آن توالی مشخصی از ژنوم را جداسازی می‌کنند و با ادغام آن در یک DNA هدف، نسخه‌های یکسانی از ژنوم را در محیط طبیعی (سلول یا بافت زنده) تکثیر می‌نمایند. هدف از ژن کلونینگ فراهم کردن نسخه‌های متعدد از یک ژن منفرد است که در حوزه‌های مختلف تحقیقاتی مورد استفاده است. به علاوه دارای کاربردهای پزشکی از قبیل ژن درمانی و کاربردهای صنعتی نظیر تولید مقدار زیادی از یک پروتئین می‌باشد.





کلونینگ تولید مثلی یا Reproductive cloning

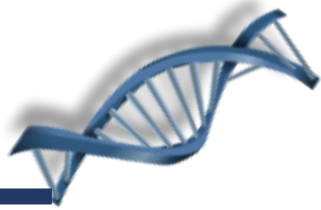
کل بدن یک موجود فقط با استفاده از یک سلول و به روش تولید مثل غیر جنسی ایجاد می شود.
نتیجه آن تولید موجودی است که از نظر ژنتیکی کاملاً مشابه با موجود اصلی است.



طی ۵۰ سال گذشته، دانشمندان آزمایش های شبیه سازی را در طیف وسیعی از حیوانات، با استفاده از تکنیک های مختلف انجام داده اند. در سال ۱۹۷۹، محققان اولین موش های ژنتیکی مشابه را با تقسیم جنین موش، در لوله ی آزمایش و سپس کاشتن جنین های حاصل در رحم موش های ماده ی بالغ تولید کردند.

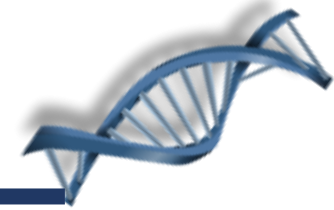
در ادامه، تا سال ۱۹۹۷، محققان اسکاتلندی پس از تلاش های بسیار موفق شدند، اولین پستاندار که بره ای به نام دالی بود را از سلول پستان گوسفندی ۶ ساله شبیه سازی کنند. دو سال بعد، محققان در ژاپن هشت گوساله را از یک گاو کلون کردند، اما تنها چهار گوساله زنده ماندند. علاوه بر گاو و گوسفند، سایر پستانداران که از سلول های سوماتیک شبیه سازی شده اند عبارتند از: گربه، گوزن، سگ، اسب، قاطر، گاو، خرگوش و موش. علاوه بر این، یک میمون توسط تقسیم جنین شبیه-سازی شده است.

کاربردهای حیوانات کلونینگ شده

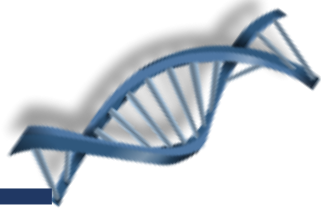


از مزایای کلونینگ حیوانات در زمینه های پزشکی و کشاورزی می توان نام برد. به عنوان مثال، محققان اسکاتلندی که دالی را کلون کردند، گوسفندانی که شیر حاوی پروتئین انسانی ضروری را برای لخته شدن خون دارند، کلون کرده اند. یکی از کاربردهای حیوانات کلونینگ شده، آزمایش داروهای جدید و راهکارهای درمانی است. مزیت بزرگ استفاده از حیوانات کلونینگ شده برای آزمایش دارو، این است که همه آنها از نظر ژنتیکی یکسان هستند، به این معنا که پاسخ آنها به داروها یکسان است. ایجاد جمعیت گونه های جانوری در خطر انقراض یا حتی منقرض شده از دیگر کاربردهای این تکنیک است. همچنین برخی از مردم نیز ابراز علاقه کرده اند تا حیوانات خانگی مرده ی خود را شبیه سازی کنند.

کاربردهای حیوانات کلونینگ شده

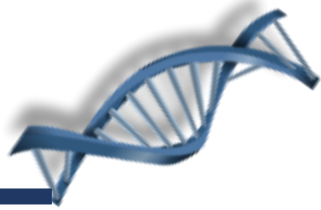


کلونینگ تولیدمثلی، یک تکنیک تقریباً ناکارآمد است و اکثر جنین های کلونینگ شده نمی توانند به افراد سالم تبدیل شوند. به عنوان مثال، دالی تنها کلونی بود که از مجموع ۲۷۷ جنین کلون شده، زنده به دنیا آمد. این کارآیی بسیار پایین، همراه با نگرانی های ایمنی، مانعی جدی برای استفاده از کلونینگ تولیدمثل است. همچنین محققان برخی آثار سوء سلامتی را در گوسفند و سایر پستانداران که کلونینگ شده اند، مشاهده کرده اند. این موارد شامل انواع نقایص در اندام های حیاتی مانند کبد، مغز، قلب و مشکلات مربوط به سیستم ایمنی بدن و همچنین پیری زودرس است.



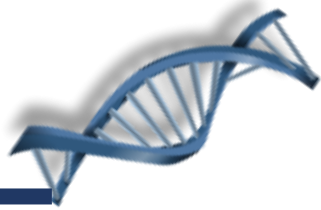
کلونینگ درمانی یا cloning Therapeutic

درمان برخی از بیماریها
جایگزین نمودن بافتهای بیمار یا صدمه دیده



کلونینگ ژن یا Gene cloning

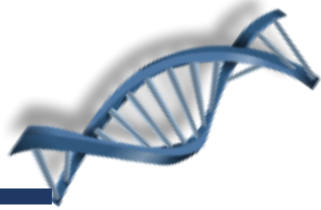
تولید چندین کپی از یک ژن، یک توالی ژنی یا ... با استفاده از PCR



کلونینگ طبیعی یا Natural cloning

در تولید مثل جنسی زمانی که جنین به دو نیم تقسیم شده و دوقلوهای مونوزیگوت تولید می شود.

مواد مورد نیاز برای کلونینگ

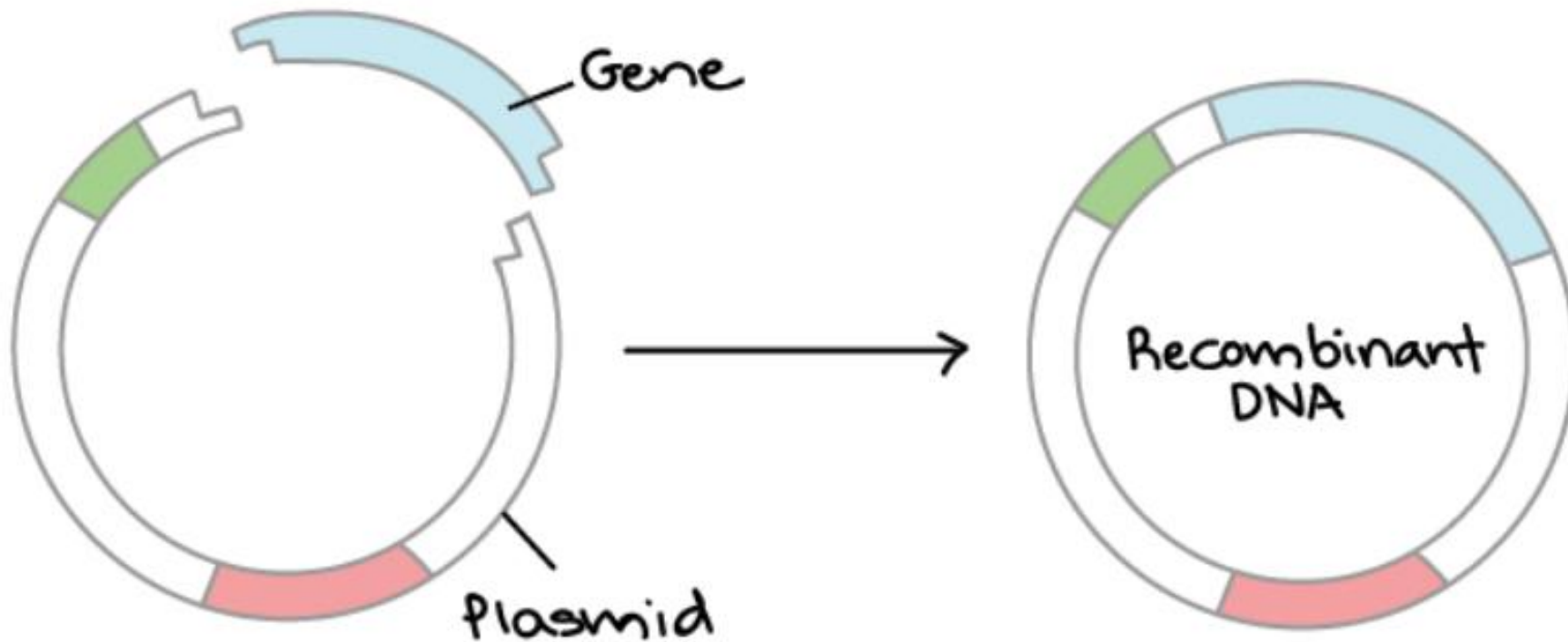


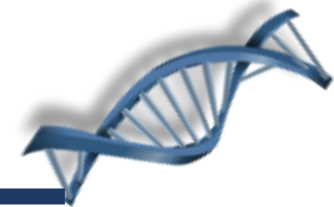
- قطعه DNA

- وکتور

- سلول های مستعد یا component cell

- محیط انتخابی

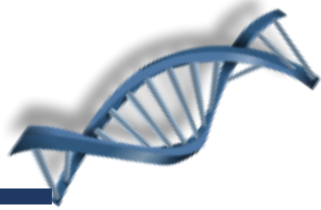




صرف نظر از انتخاب یک ناقل، همه ناقل ها مولکول های DNA حامل هستند. این مولکول های حامل باید به طور کلی دارای چند ویژگی مشترک باشند مانند:

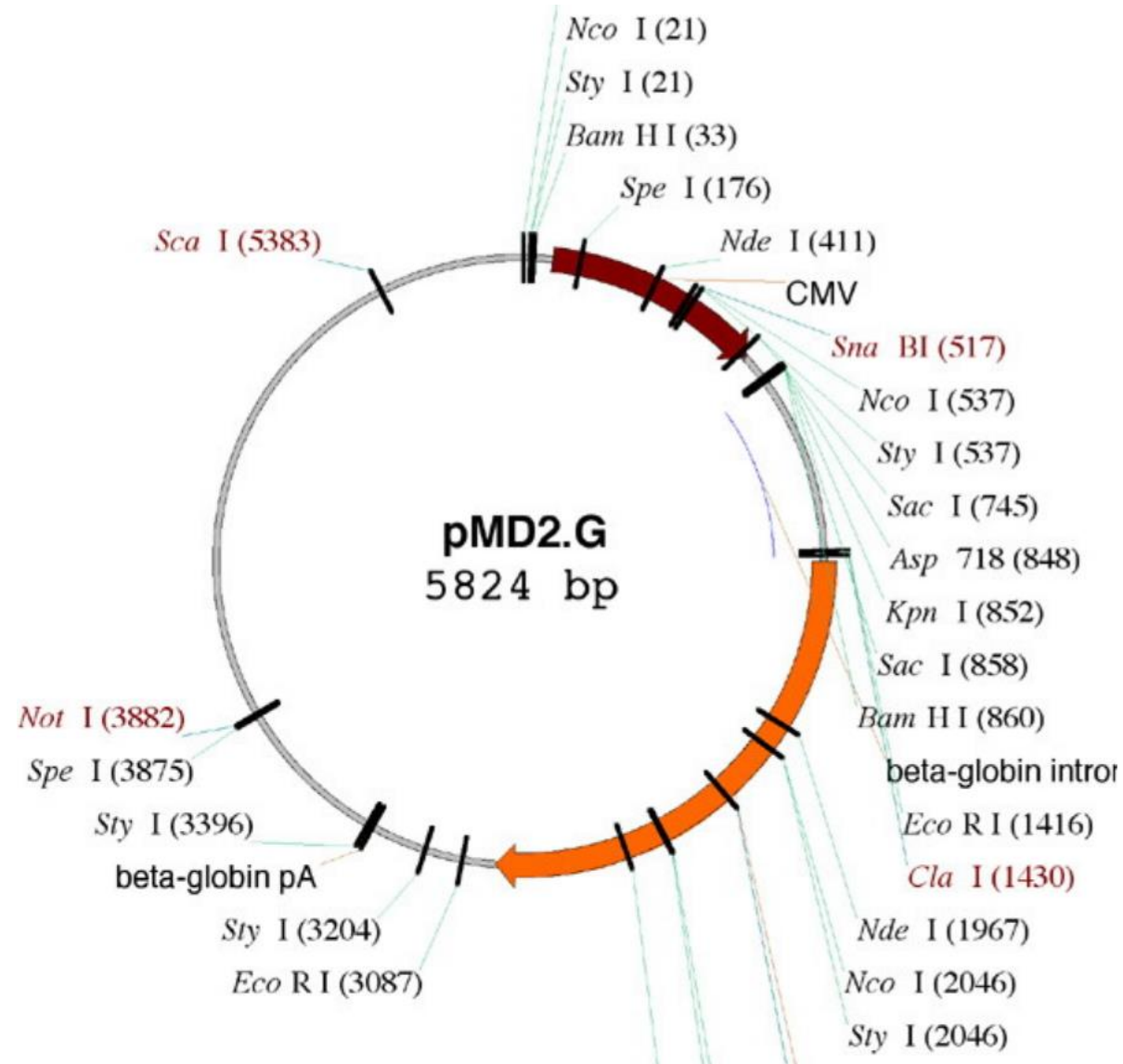
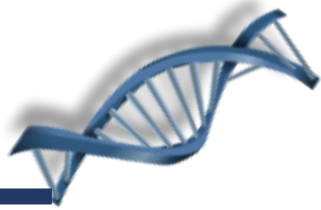
- باید در داخل سلول میزبان خود تکثیر شوند.
- باید یک مکان محدود منحصر به فرد برای آنزیم های RE داشته باشد.
- معرفی قطعه DNA دهنده نباید با خاصیت همانندسازی ناقل تداخل داشته باشد.
- باید دارای یک ژن نشانگر باشد تا بتوان از آن برای شناسایی بعدی سلول نو ترکیب (معمولاً یک ژن مقاومت آنتی بیوتیکی که در سلول میزبان وجود ندارد) استفاده کرد.
- آنها باید به راحتی از سلول میزبان جدا شوند.

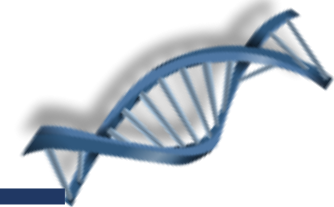
ویژگی های اساسی وکتورهای کلونینگ



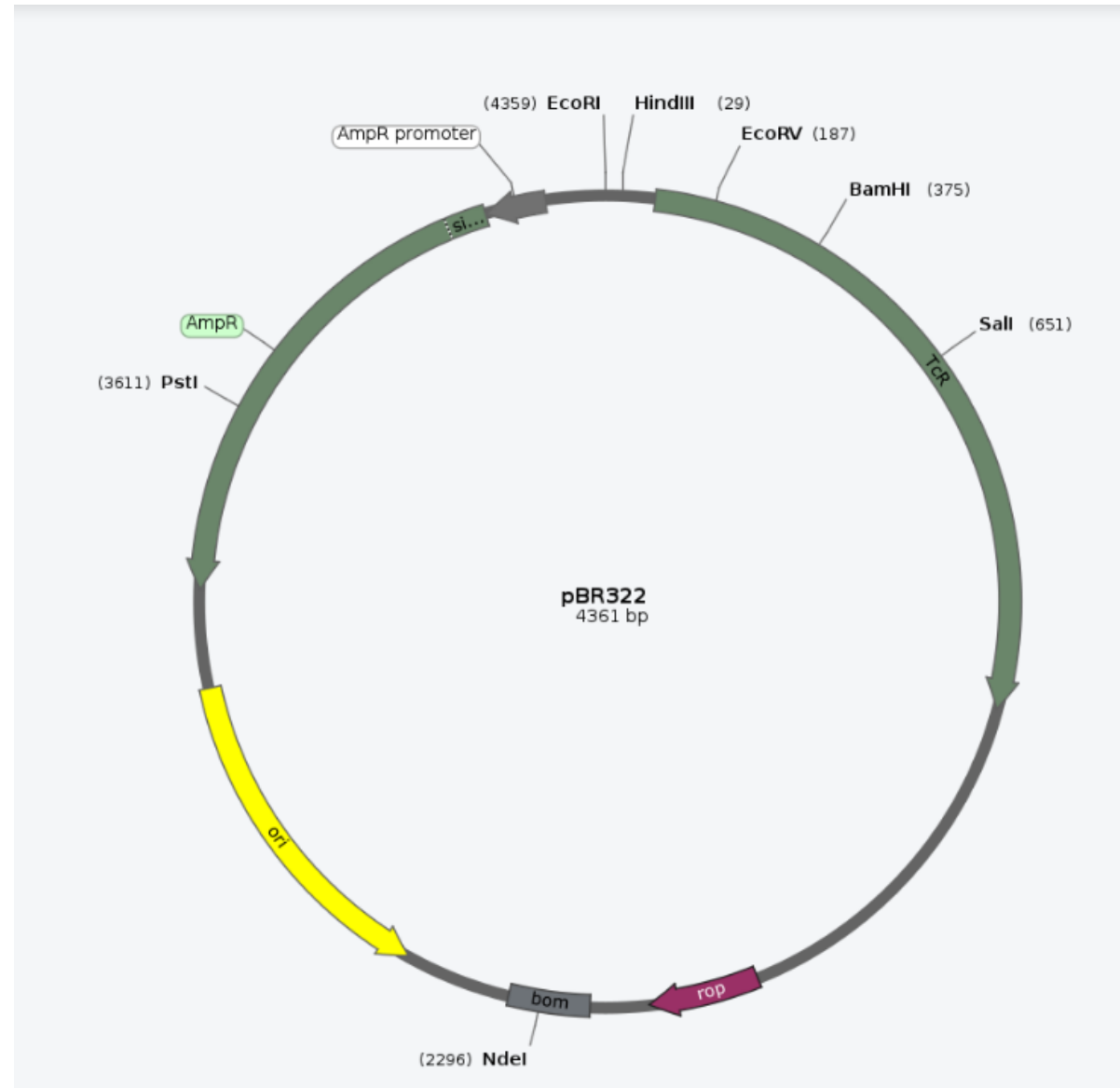
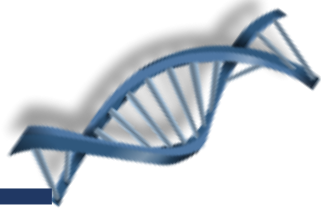
- وکتور یا ناقل های ژنتیکی وسیله ای برای انتقال DNA خارجی به سلول های گیرنده هستند.
- در شبیه سازی مولکولی، وکتور یک مولکول DNA است که به عنوان وسیله ای برای انتقال مصنوعی مواد ژنتیکی خارجی به سلول دیگر، جایی که می تواند تکثیر و یا بیان شود، استفاده می شود.
- وکتورها می توانند به طور مستقل تکثیر شوند و معمولاً شامل ویژگی هایی برای تسهیل دستکاری DNA و همچنین نشانگر ژنتیکی برای تشخیص انتخابی آنها می شوند.

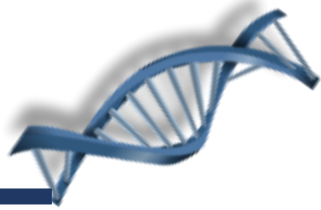
انواع وكتور

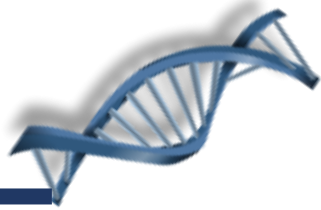




مولکول های DNA حلقوی هستند.
اندازه بین ۲ تا ۲۰۰ کیلوباز دارند و در اکثر موارد یک یا چند ژن حمل میکنند که اغلب مسئول بروز صفات مفیدی برای باکتری میزبان خود هستند.
تعداد کپی های پلاسمید در میزبان ها بسیار متغیر می باشد. برخی از پلاسمید ها تعداد زیادی کپی در سلول های میزبان دارند و برخی دیگر تعداد کم.



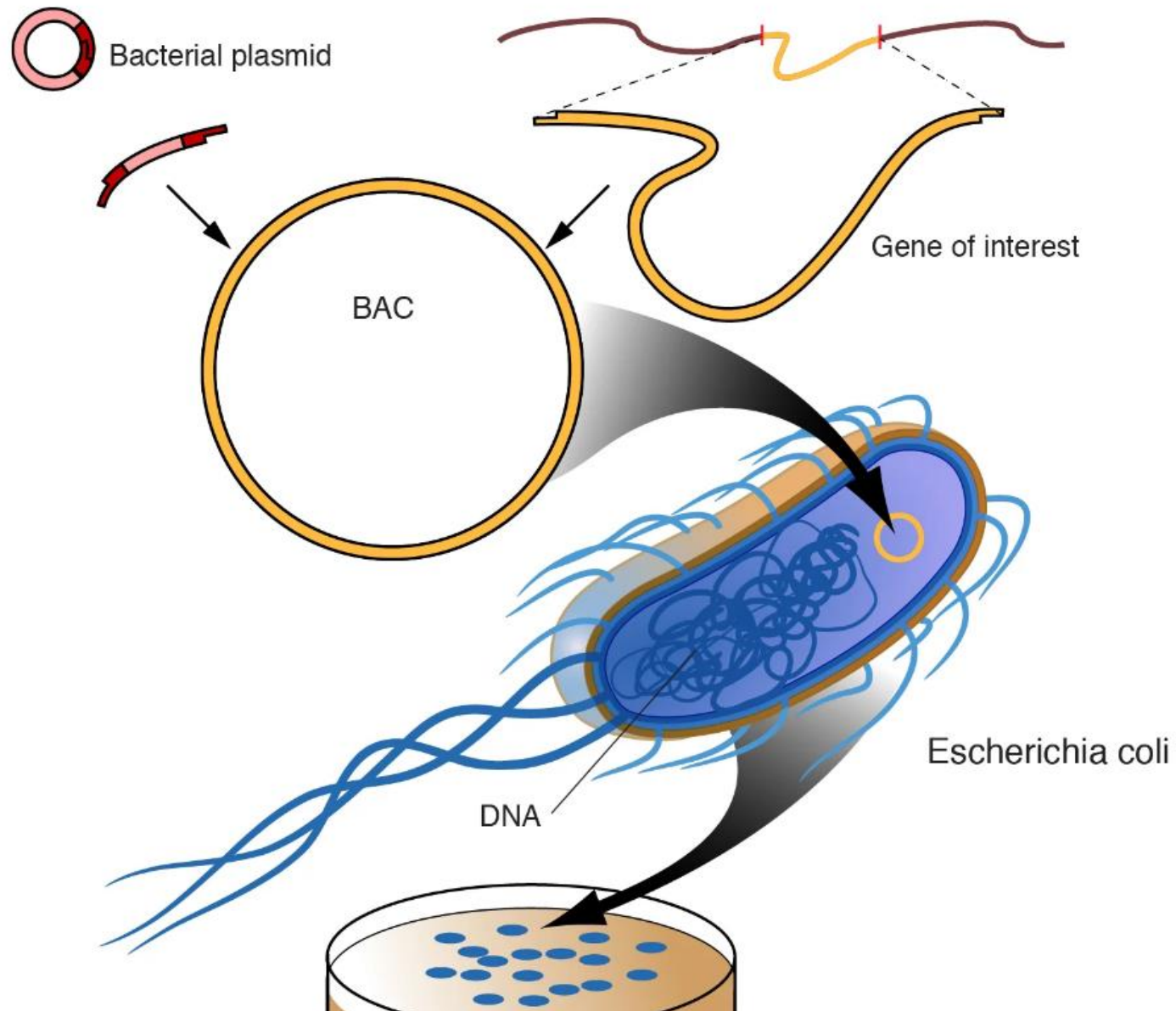
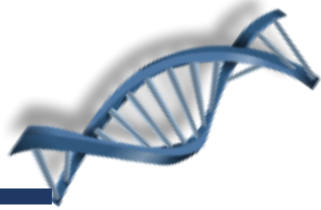




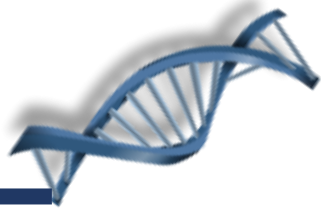
ویروس‌هایی که باکتری‌ها را آلوده می‌کنند، باکتریوفاز نامیده می‌شوند. اینها انگلهای اجباری داخل سلولی هستند که با استفاده از برخی یا همه آنزیمهای میزبان در داخل سلول باکتری تکثیر می‌شوند.

باکتریوفازها مکانیسم بسیار پیشرفته‌ای برای رساندن ژنوم خود به سلول باکتری دارند. از این رو می‌توان از آن به عنوان یک وکتور کلونینگ برای تحویل بخش‌های DNA بزرگتر استفاده کرد. بیشتر ژنوم باکتریوفاز غیر ضروری است و می‌تواند با DNA خارجی جایگزین شود. با استفاده از باکتریوفاز به عنوان یک ناقل، یک قطعه DNA با اندازه تا ۲۰ کیلوباز را می‌توان ترانسفرم کرد.

BAC کروموزوم های مصنوعی باکتریایی

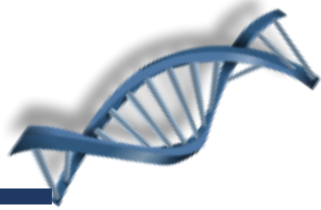


کروموزوم های مصنوعی باکتریایی BAC



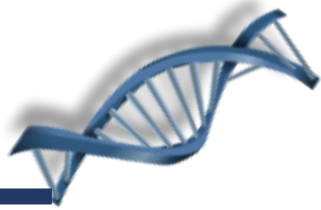
کروموزوم های مصنوعی باکتریایی BACs پلازمید ساده ای هستند که برای کلونینگ قطعات DNA بسیار بزرگ در اندازه های ۷۵ تا ۳۰۰ کیلوباز طراحی شده اند. BAC ها اساساً دارای قسمت نشانگر مانند ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی و منشا بسیار پایدار همانند سازی هستند که توزیع پلازمید را پس از تقسیم سلولی باکتریایی افزایش می دهد و تعداد کپی پلازمید را به یک یا دو در هر سلول حفظ می کند. BAC ها اساساً در تعیین توالی ژنوم موجودات در پروژه های ژنومی استفاده می شوند. برای مثال BAC ها در پروژه ژنوم انسان استفاده شدند. چند صد هزار قطعه DNA را می توان با استفاده از BACs کلون کرد.

کروموزوم های مصنوعی مخمر YAC



YAC ها ناقل بیان مخمر هستند. یک قطعه DNA بسیار بزرگ که اندازه آن از ۱۰۰ کیلوباز تا ۳۰۰۰ کیلوباز متغیر است را می توان با استفاده از YAC کلون کرد. بیشتر YAC ها برای شبیه سازی قطعات DNA بسیار بزرگ و برای نقشه برداری فیزیکی ژنوم های پیچیده استفاده می شوند. YAC ها نسبت به BAC ها در بیان پروتئین های یوکاریوتی که نیاز به تغییرات پس از ترجمه دارند، برتری دارند. اما، YAC ها به تولید اثرات کایمریک معروف هستند که آنها را در مقایسه با BAC ها پایدارتر می کند.

کروموزوم های مصنوعی انسان HAC

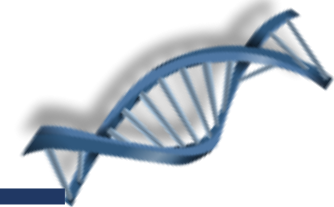


کروموزوم های مصنوعی انسان HACs یا کروموزوم های مصنوعی پستانداران MACs در حال توسعه هستند.

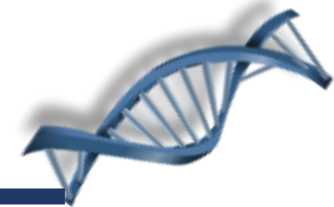
HAC ها میکروکروموزوم هایی هستند که می توانند به عنوان یک کروموزوم جدید در جمعیتی از سلول های انسانی عمل کنند.

اندازه HAC ها از ۶ تا ۱۰ مگاباز است که حامل ژن های جدید معرفی شده توسط محققان انسانی است.

HAC ها را می توان به عنوان ناقل در انتقال ژن های جدید، مطالعه بیان و عملکرد کروموزومی پستانداران نیز با استفاده از این میکروکروموزوم ها در سیستم پستانداران مورد استفاده قرار داد.

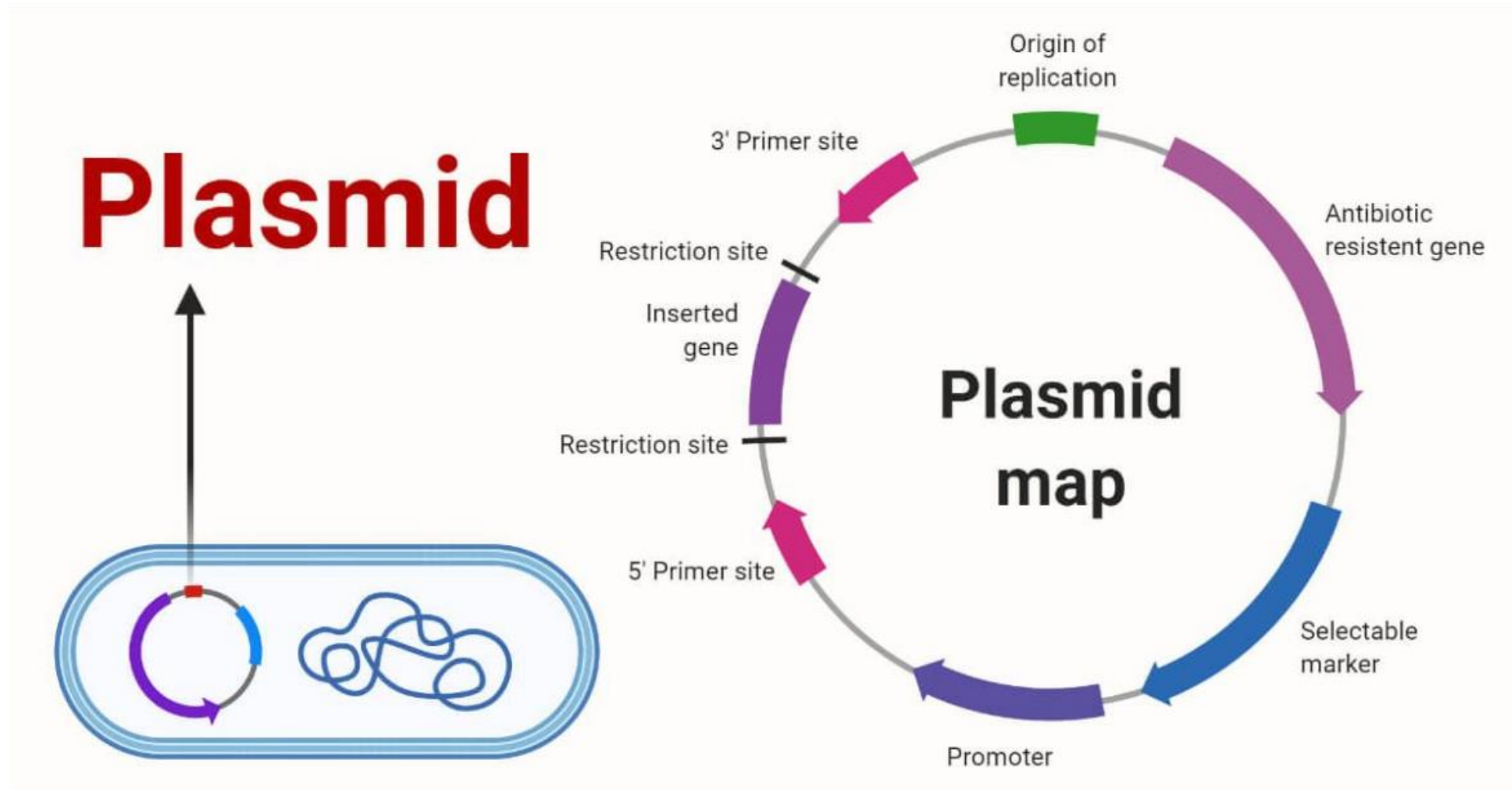
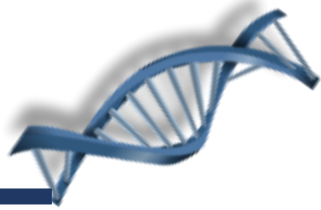


وکتورهایی که به طور خاص برای بیان ژن در سلول هدف طراحی شده اند، وکتورهای بیانی نامیده می شوند و به طور کلی دارای یک توالی پروموتور هستند که بیان ژن تراریخته را هدایت می کند. وکتورهای بیانی، پروتئین ها را از طریق رونویسی قسمت وارد شده به ناقل تولید می کنند که با ترجمه mRNA تولید شده همراه است.



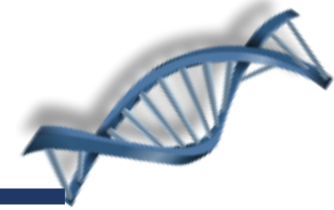
ناقلهای ساده تری به نام وکتورهای رونویسی فقط قابلیت رونویسی را دارند اما ترجمه نمی شوند: آنها را می توان در یک سلول هدف تکثیر کرد اما بر خلاف وکتورهای بیانی بیان نمی شود. ناقل های رونویسی برای تقویت قسمت وارد شده به ناقل، استفاده می شود.

اجزای موجود در یک وکتور پلاسمید

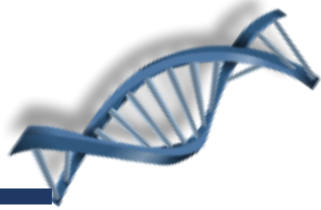


پلاسمید

منشا همانند سازی (Ori)

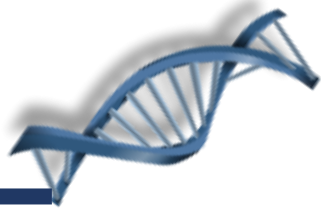


منشا همانندسازی یا ori یک توالی یا جز مورد نیاز روی پلاسمید می باشد که برای همانندسازی آن در داخل میزبان مورد نیاز است.

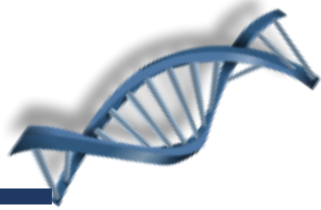


فقط آن دسته از سلول‌های میزبان که ناقل را در داخل خود دارند، در محیطی که فشار انتخاب را دارد رشد می‌کنند، که معمولاً یک آنتی‌بیوتیک است. در حالی که سلول‌های میزبان که ناقل را ندارند، از بین می‌روند زیرا نمی‌توانند آنتی‌بیوتیک را تحمل کنند. به این ترتیب، آزمایش‌کننده قادر خواهد بود سلول‌های میزبان را که دارای وکتور هستند، نسبت به سلول‌هایی که ناقل ندارند، انتخاب کند.

جایگاه چند گانه کلونینگ

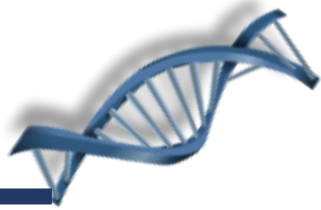


کلونینگ DNA داخل یک وکتور شامل اتصال قطعه‌ای از DNA هدف به DNA وکتور است. این روند به وسیله قطعات DNA ای که انتهای چسبناک دارند، انجام می‌شود؛ بنابراین وکتور انتخابی باید دارای جایگاه اثر آنزیم محدودکننده‌ای باشد که قطعه DNA هدف توسط همان آنزیم محدودکننده ایجاد شده باشد. قطعات DNA با انتهای صاف می‌توانند به یکدیگر متصل شوند. همین‌طور آنزیم‌های محدودکننده‌ای وجود دارند که بعد از برش DNA ، یک نوکلئوتید تنها در انتهای ۳' ایجاد می‌کند که اصطلاحاً به آن انتهای چسبان می‌گویند.

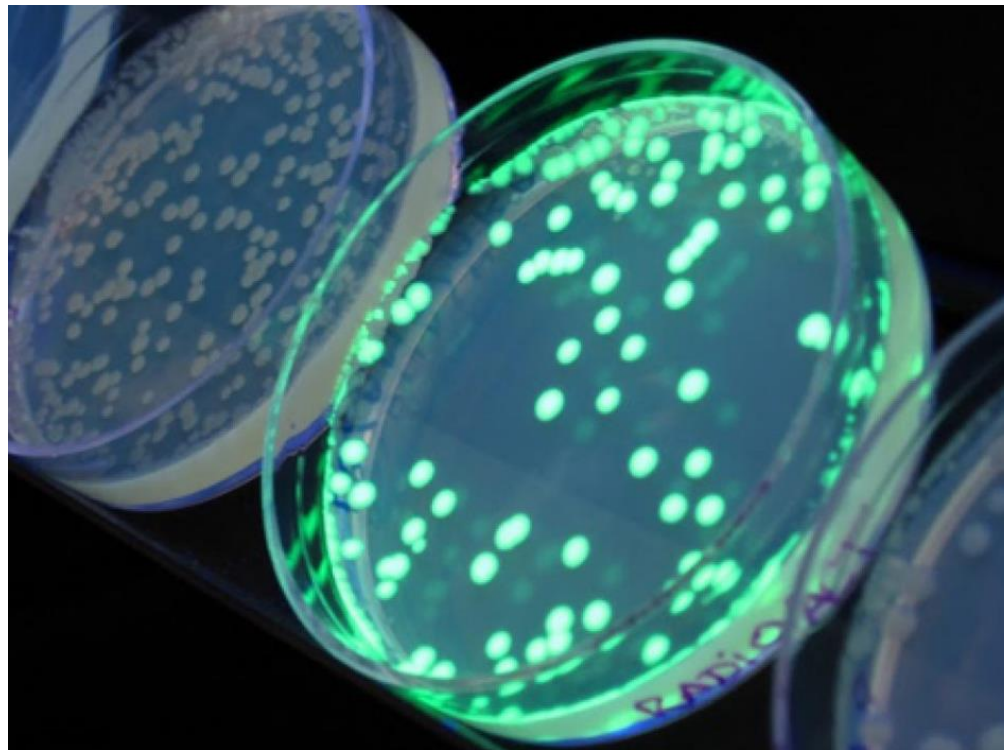


ناحیه ای که بیان پروتئین DNA کلون شده را هدایت می کند.

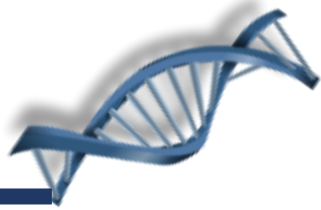
برچسب پروتئین یا protein tag



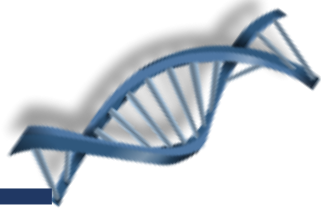
توالی خاصی که پروتئینی با عملکرد خاص تولید می کند و معمولاً به پروتئین نو ترکیب متصل می شود. نمونه ای از برچسب پروتئین لوسیفراز یا GFP است که برای نظارت یا تعیین کمیت پروتئین است.



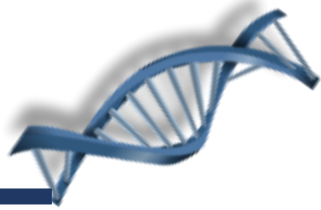
سیگنال پلی آدنیلایسین یا protein tag



جزئی حاوی poly-A که برای تولید پروتئین مهم است.

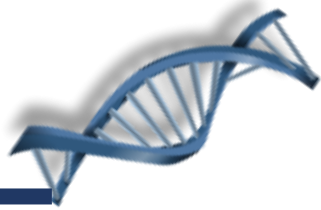


پنج نوع اصلی پلاسمید وجود دارد: پلاسمیدهای F باروری، پلاسمیدهای مقاومتی، پلاسمیدهای virulence، پلاسمیدهای تخریب کننده و پلاسمیدهای Col.

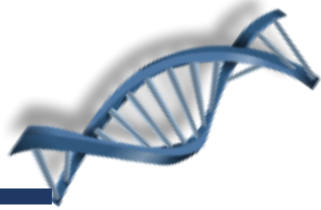


پلاسمیدهای باروری که به عنوان پلاسمیدهای F نیز شناخته می شوند، حاوی ژن های انتقالی هستند که به ژن ها اجازه می دهند از طریق کونژوگه از یک باکتری به باکتری دیگر منتقل شوند. اینها دسته وسیعی از پلاسمیدهای مزدوج را تشکیل می دهند. پلاسمیدهای F پلاسمیدهایی هستند که می توانند به DNA کروموزومی وارد شوند.

باکتری هایی که دارای پلاسمید F هستند به عنوان F مثبت شناخته می شوند و باکتری های بدون آن F منفی هستند. هنگامی که یک باکتری F^+ با یک باکتری F^- کونژوگه می شود، دو باکتری F^+ ایجاد می شود. در هر باکتری فقط یک پلاسمید F وجود دارد.

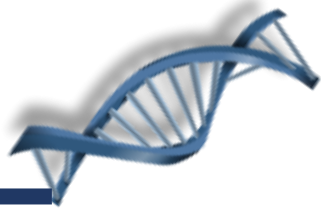


پلاسمیدهای مقاومتی یا R حاوی ژن هایی هستند که به سلول باکتری کمک می کنند در برابر عوامل محیطی مانند سموم یا آنتی بیوتیک ها دفاع کنند. برخی از پلاسمیدهای مقاومتی می توانند خود را از طریق کونژوگه انتقال دهند. هنگامی که این اتفاق می افتد، یک سویه از باکتری ها می توانند به آنتی بیوتیک ها مقاوم شوند.

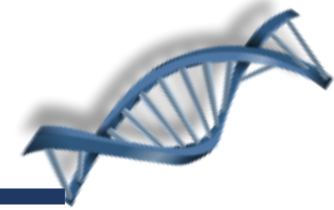


هنگامی که یک پلاسمید virulence درون یک باکتری قرار می گیرد، آن باکتری را به یک عامل بیماری زا تبدیل می کند که عامل بیماری است. باکتری هایی که باعث بیماری می شوند می توانند به راحتی در بین افراد مبتلا پخش و تکثیر شوند. باکتری اشریشیا کلی دارای چندین پلاسمید virulence است.

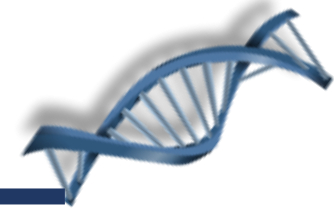
E.coli به طور طبیعی در روده انسان و در حیوانات دیگر یافت می شود، اما گونه های خاصی از E. Coli می توانند باعث اسهال و استفراغ شدید شوند. سالمونلا انتریکا باکتری دیگری است که حاوی پلاسمیدهای virulence است.



پلاسمیدهای تخریب کننده به باکتری میزبان کمک می کنند تا ترکیباتی را که معمولاً در طبیعت یافت نمی شوند مانند کافور، زایلن، تولوئن و اسید سالیسیلیک هضم کند. این پلاسمیدها حاوی ژن هایی برای آنزیم های خاصی هستند که ترکیبات خاصی را تجزیه می کنند.

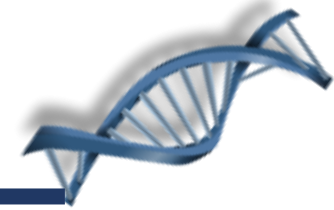


پلاسمیدهای Col حاوی ژن‌هایی هستند که باکتریوسین‌ها را می‌سازند (همچنین به عنوان کولیسین شناخته می‌شوند)، که پروتئین‌هایی هستند که باکتری‌های دیگر را می‌کشند و در نتیجه از باکتری میزبان دفاع می‌کنند. باکتریوسین‌ها در بسیاری از انواع باکتری‌ها از جمله *E. coli* یافت می‌شوند که آنها را از پلاسمید ColE1 می‌نامند.

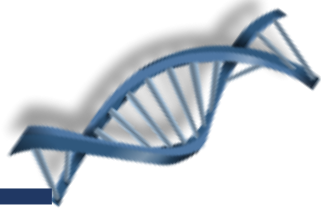


آنزیم های محدود کننده به طور کلی بر اساس ترکیب زیر واحد، موقعیت برش، ویژگی توالی و الزامات کوفاکتور به چهار نوع طبقه بندی می شوند. با این حال، توالی یابی اسیدهای آمینه تنوع فوق العاده ای را در میان آنزیم های محدود کننده کشف کرده است و نشان می دهد که در سطح مولکولی، بیش از چهار نوع مختلف وجود دارد.

آنزیم های نوع اول



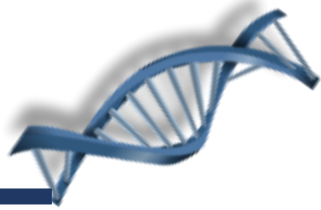
آنزیم‌های نوع I آنزیم‌های پیچیده، چند زیر واحدی و ترکیبی محدودکننده و اصلاح‌کننده هستند که DNA را به‌طور تصادفی و دور از توالی‌های تشخیصشان برش می‌دهند. در ابتدا تصور می‌شد که آنزیم‌های نوع I نادر هستند، اما اکنون از تجزیه و تحلیل ژنوم‌های توالی شده می‌دانیم که آنها رایج هستند. آنزیم‌های نوع I از اهمیت بیوشیمیایی قابل‌توجهی برخوردارند، اما ارزش عملی کمی دارند زیرا قطعات محدودکننده گسسته یا الگوهای باند ژل مجزا تولید نمی‌کنند.



آنزیم های نوع II، DNA را در موقعیت های تعریف شده نزدیک یا درون توالی های تشخیص خود برش می دهند. آنها قطعات محدود کننده گسسته و الگوهای باند ژل متمایز تولید می کنند و کلاس غالب مورد استفاده در آزمایشگاه برای تجزیه و تحلیل معمول DNA و کلونینگ ژن هستند.

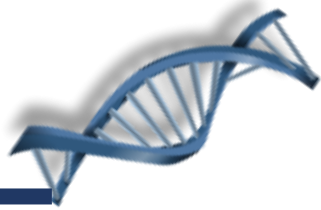
آنزیم های نوع II به جای تشکیل یک خانواده واحد از پروتئین های مرتبط، مجموعه ای از پروتئین های نامرتبط از انواع مختلف هستند. آنزیم های نوع II اغلب از نظر توالی اسید آمینه با یکدیگر و در واقع با هر پروتئین شناخته شده دیگری کاملاً متفاوت هستند، که نمونه ای از کلاس پروتئین هایی هستند که به سرعت در حال تکامل هستند که اغلب نشان دهنده دخالت در تعاملات میزبان-انگل هستند.

آنزیم های نوع III



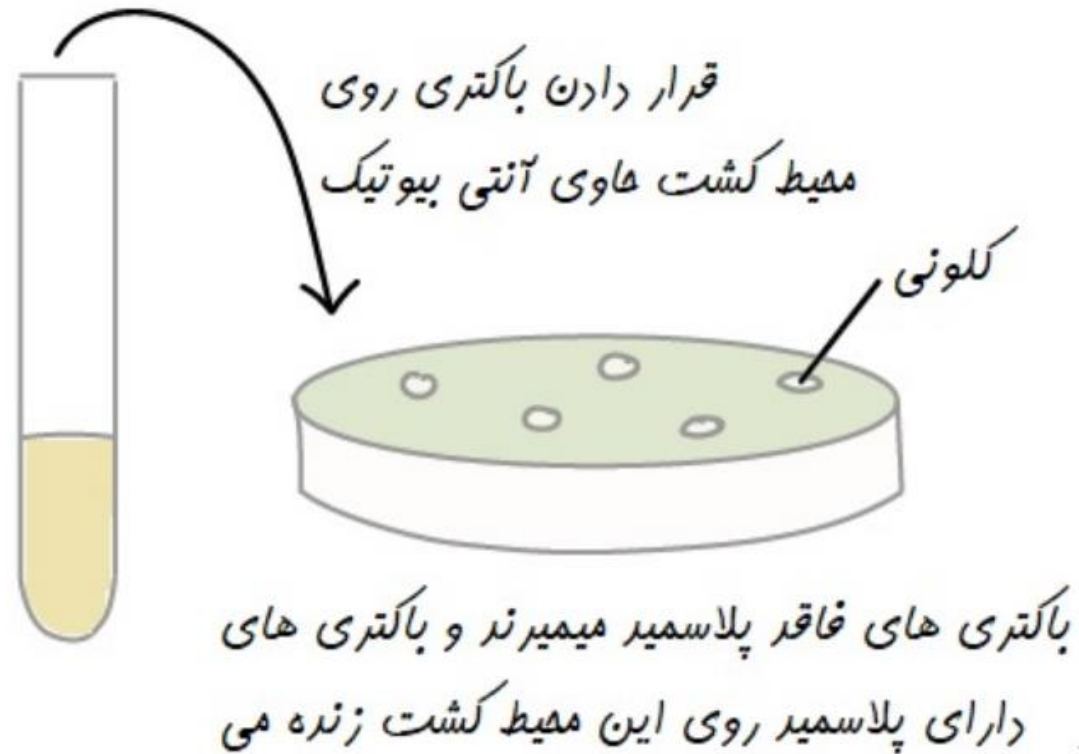
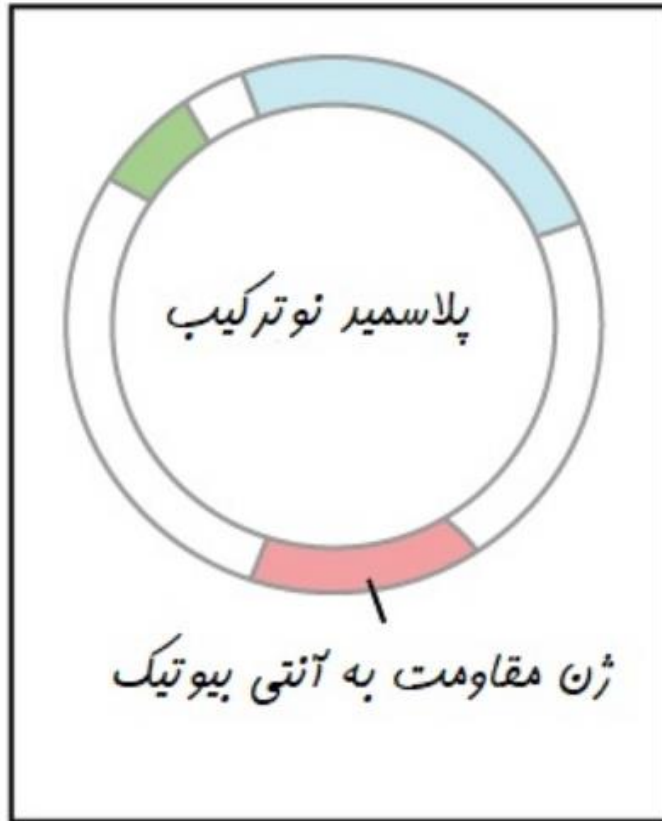
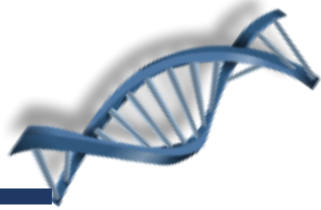
آنزیم های نوع III نیز آنزیم های محدود کننده بزرگی هستند. آنها خارج از توالی های تشخیص خود می شکافند و برای انجام برش به دو توالی در جهت های مخالف در یک مولکول DNA نیاز دارند. آنها به ندرت هضم کامل می دهند.

آنزیم های نوع IV

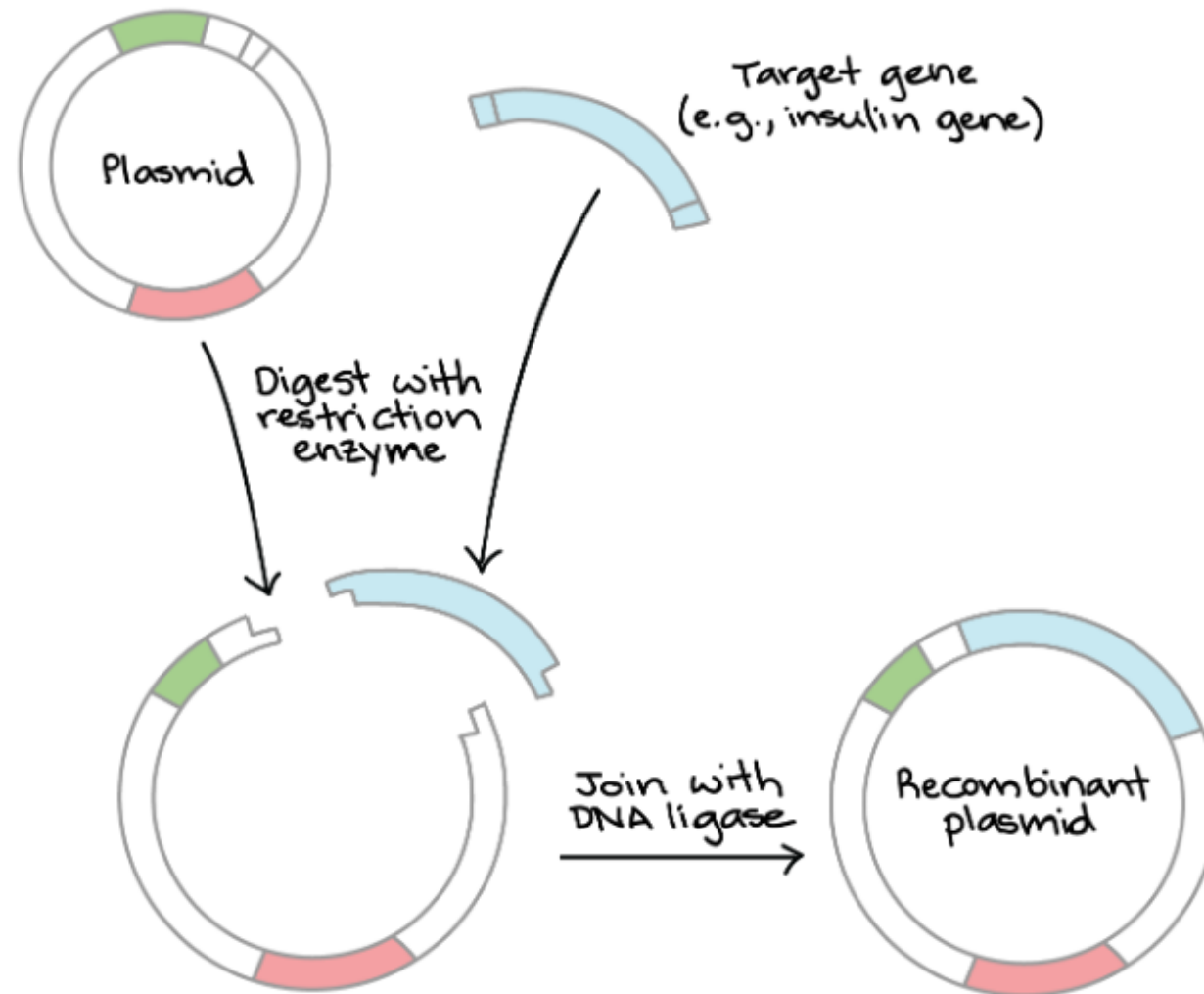
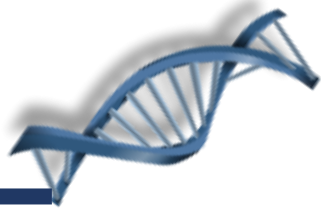


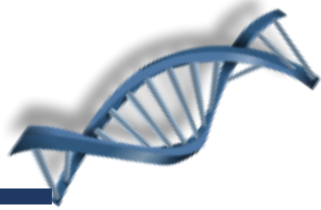
آنزیم های نوع IV، DNA اصلاح شده و معمولا متیله شده را تشخیص می دهند.

مراحل کلونینگ



برش و چسباندن DNA

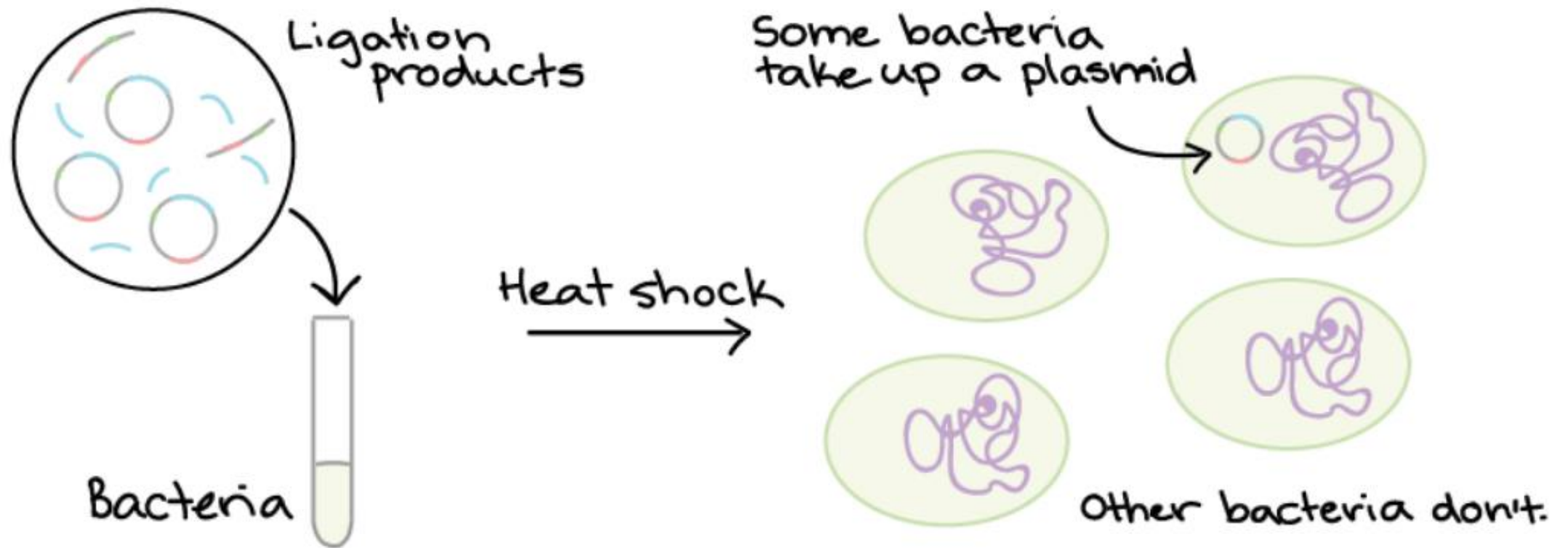
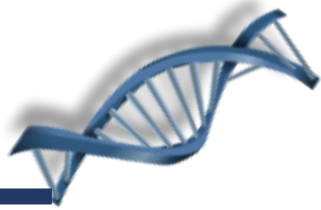


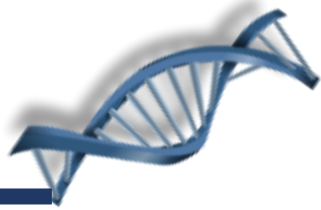


در یک روش معمول از دو نوع آنزیم استفاده می شود: آنزیم های محدود کننده و DNA لیگاز. برای رسیدن به توالی مورد نظر در کلونینگ DNA ژنوم نمونه حاوی آن توالی را استخراج کنید و با پرایمرهای اختصاصی PCR انجام دهید تا مقدار ژن اختصاصی زیاد شود. همچنین پلازمید را استخراج کرده و سپس در معرض آنزیم محدود کننده موردنظر و سپس آنزیم DNA لیگاز قرار دهید.

انتخاب پلاسمید که دارای یک محل برش واحد و مناسب است. قطعه ژن هدف که نزدیک هر انتها دارای یک محل برش برای آن آنزیم است. سپس، قطعات را با DNA لیگاز ترکیب می کنیم که آنها را بهم پیوند می دهد و یک پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن ایجاد می کند.

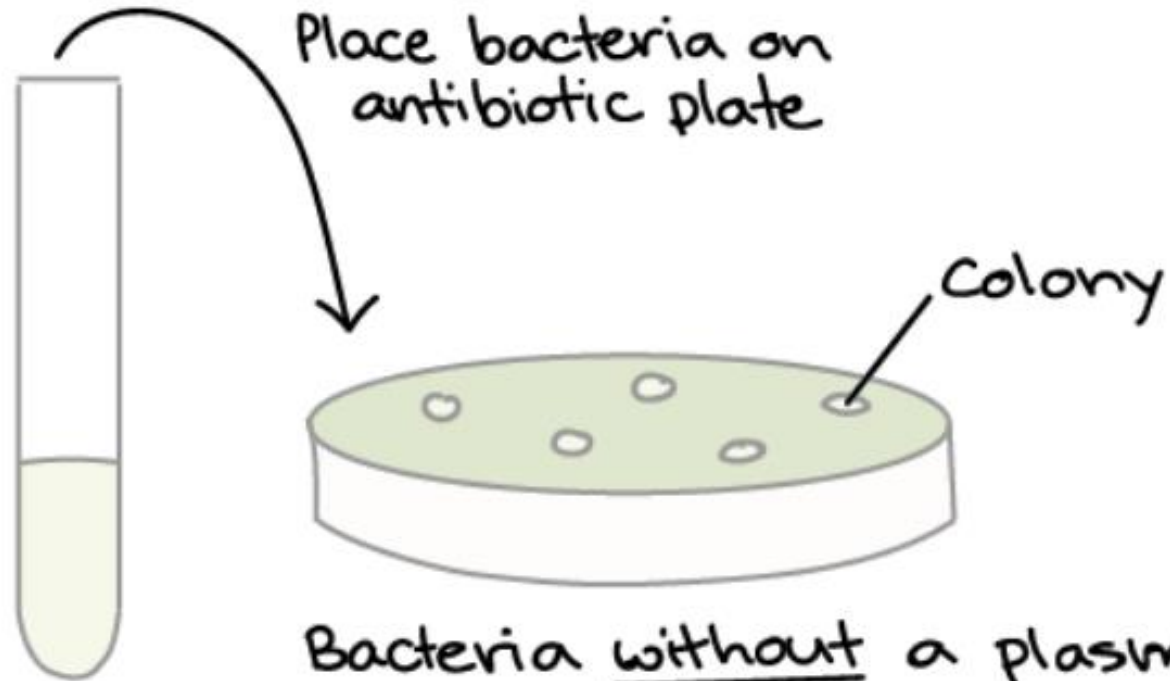
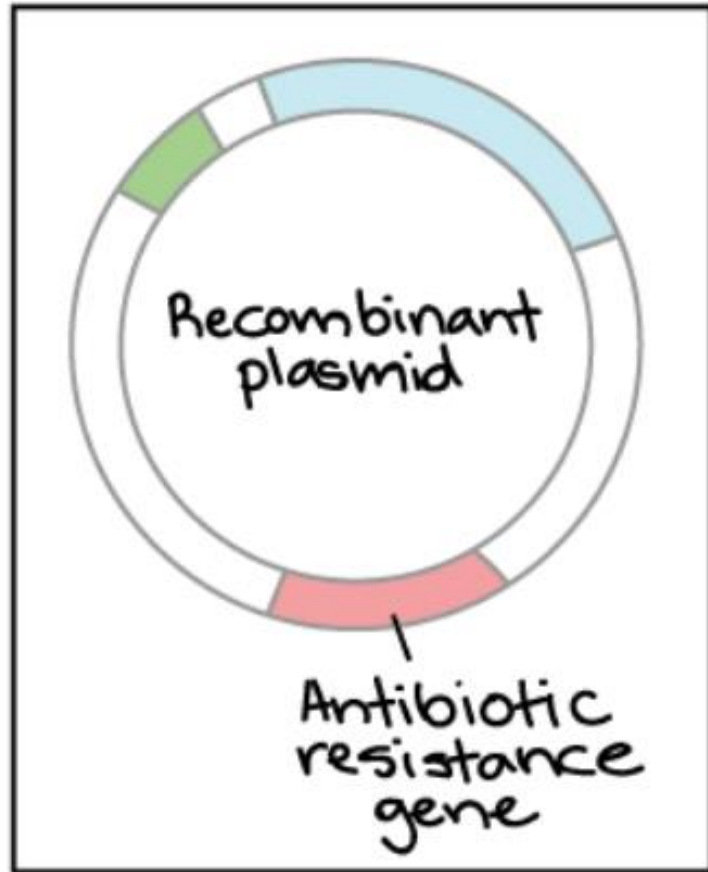
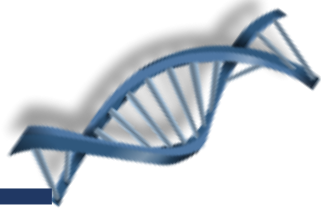
انتقال به باکتری



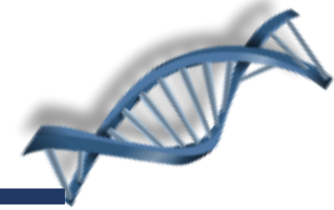


پلاسمیدها و سایر DNA ها می توانند در فرآیندی به نام ترنسفورمیشن یا انتقال، به باکتری ها وارد شوند، معمولا از *E. coli* غیر بیماریزا که در آزمایشگاه ها استفاده می شود. در انتقال به سلولهای باکتری که به طور ویژه آماده شده اند شوک دمایی داده می شود (مانند درجه حرارت بالا) که آنها را به گرفتن DNA خارجی ترغیب می کند.

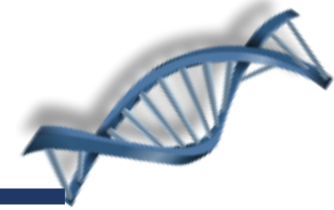
انتخاب باکتری حامل پلاسمید



Bacteria without a plasmid die.
Each bacterium with a plasmid makes a colony.

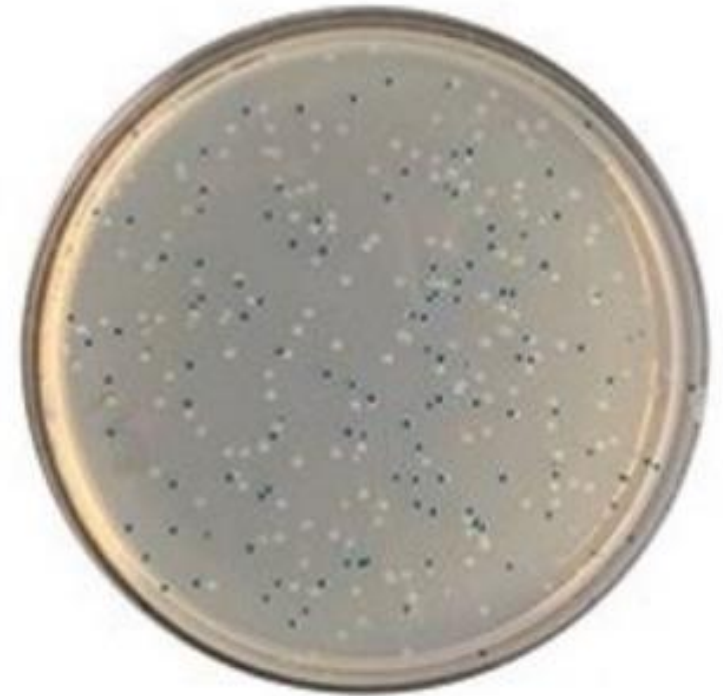
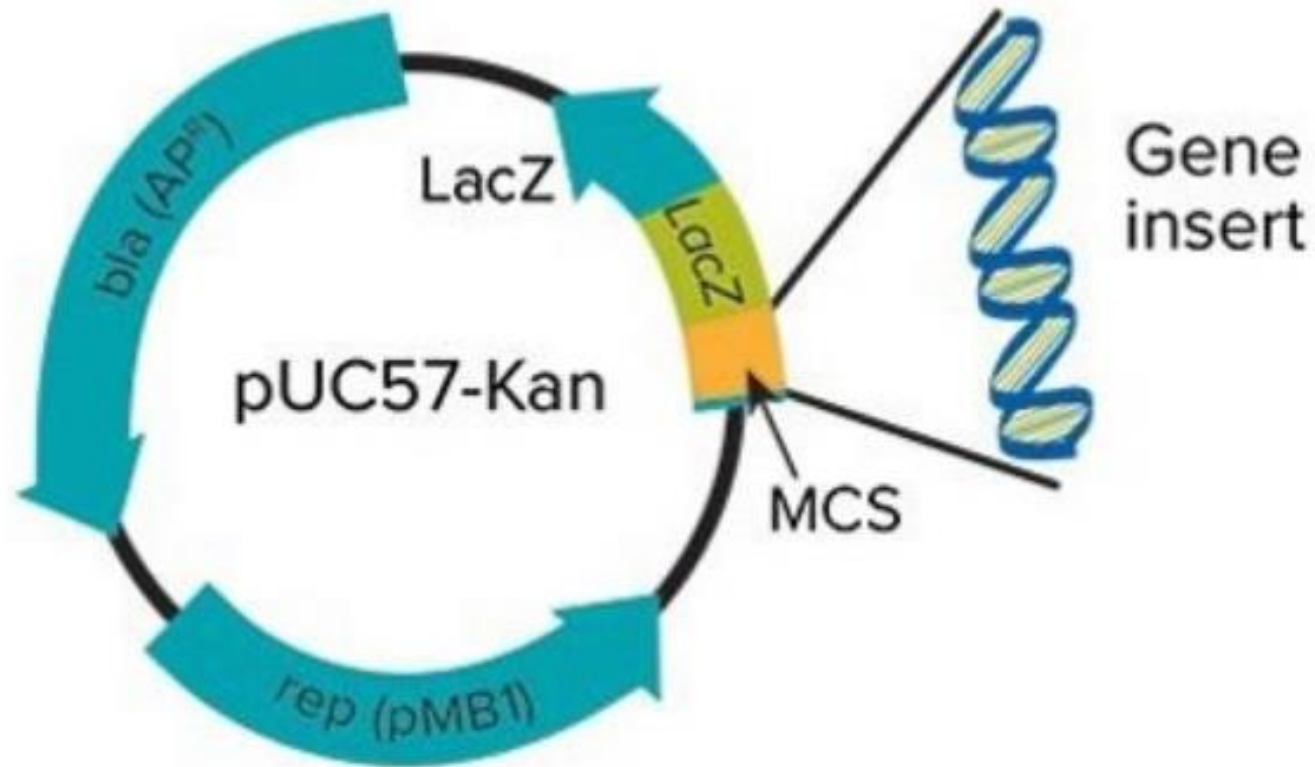
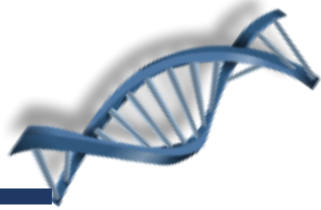


در کلونینگ ژن، پلاسمید معمولاً حاوی یک ژن مقاومت به آنتی بیوتیک است، که زنده ماندن باکتری ها در حضور یک آنتی بیوتیک خاص را امکان پذیر می کند. بنابراین، باکتری هایی که پلاسمید را گرفته اند می توانند در پلیت حاوی آنتی بیوتیک انتخاب شوند. باکتری های فاقد پلاسمید می میرند، در حالی که باکتری های حامل یک پلاسمید می توانند زنده مانده و تولید شوند. هر باکتری زنده مانده یک گروه کوچک نقطه مانند یا کلنی ایجاد می کند که از باکتری های یکسان که همگی پلاسمید یکسانی را حمل می کنند، تشکیل شده است.

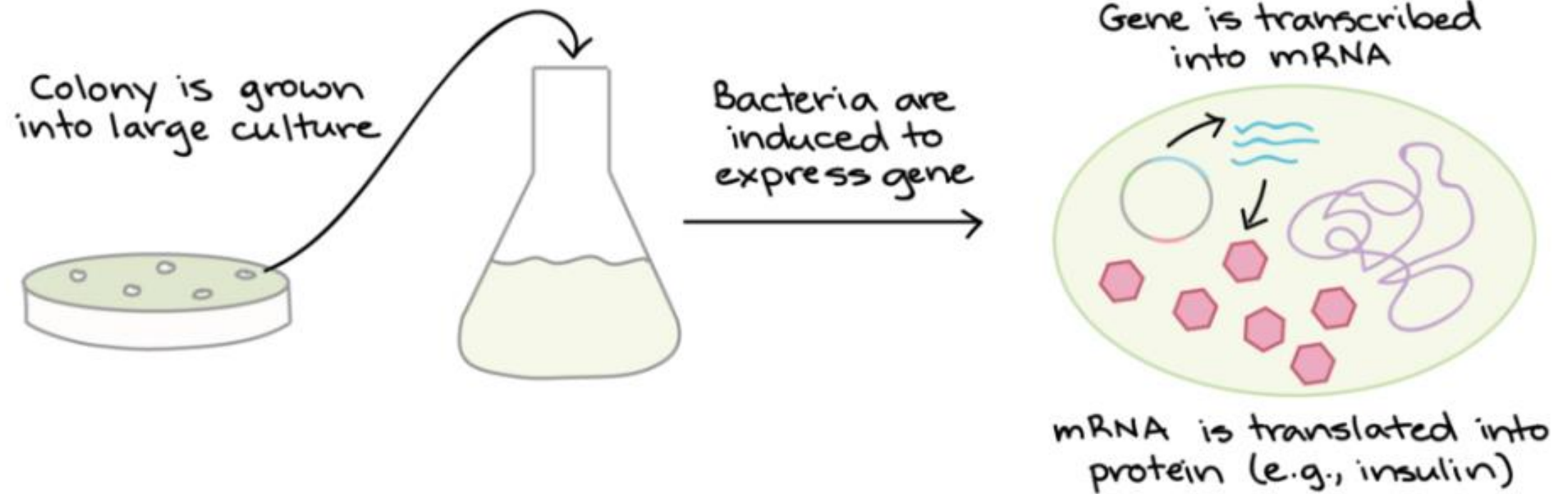
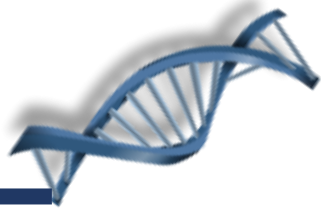


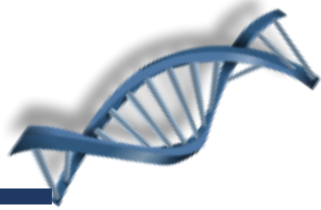
برای انتخاب کلونی هایی که پلاسمید حاوی توالی ژن نوترکیب هستند، روش غربالگری Blue-White Screening بکار برده می شود. در این روش از اپران lacZ که آنزیم بتاگالاکتوزیداز را بیان می کند، استفاده می شود. در صورت حضور ماده X-gal در محیط، آنزیم بتاگالاکتوزیداز آن را به گالاکتوز و یک رنگدانه آبی نامحلول تجزیه می کند و در نتیجه کلونی های آبی رنگ تولید می شود. از این ویژگی اپران lacZ برای غربالگری کلونی هایی که پلاسمید نوترکیب را دریافت کرده اند، استفاده می کنند. در این روش جایگاه برش آنزیم محدودکننده درون اپران lacZ قرار دارد. در صورتیکه کلونینگ به درستی انجام گیرد، توالی ژنی مورد نظر درون این اپران قرار می گیرد و اپران غیرفعال می شود. در نتیجه آنزیم بتاگالاکتوزیداز تولید نمی شود و کلونی های حاصل از این سلول های حاوی پلاسمید نوترکیب، سفید خواهد بود.

غربالگری کلونی های سفید-آبی

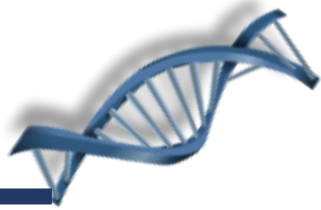


تولید پروتئین

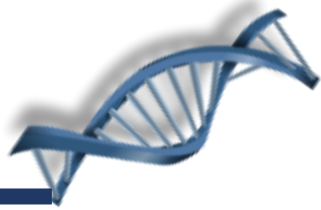




هنگامی که ما یک کلنی باکتری حامل پلاسمید مناسب پیدا کردیم، می توانیم میزان زیادی از باکتریهای حامل پلاسمید را کشت دهیم. سپس، ما یک سیگنال شیمیایی به باکتری ها می دهیم که به آنها دستور می دهد پروتئین مورد نظر را بسازند. با استفاده از این سیگنال، باکتری ها به عنوان “کارخانه های کوچک” عمل می کنند و بیان مقدار زیادی پروتئین غیر ضروری را خاموش میکنند. به عنوان مثال، اگر پلاسمید ما حاوی ژن انسولین انسانی باشد، باکتری ها شروع به رونویسی ژن انسولین و ترجمه mRNA می کنند تا مولکولهای زیادی از پروتئین انسولین انسانی تولید کنند.

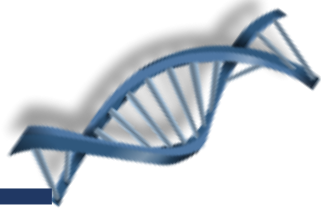


پس از تولید پروتئین، می توان بسته به نوع بیان پروتئین (ترشحاتی یا درون سلولی) پروتئین های بیان شده را تخلیص کرد. بسیاری از پروتئین ها و ماکرومولکول های دیگر به غیر از پروتئین هدف (به عنوان مثال انسولین) در باکتری شناور هستند. به همین دلیل، پروتئین هدف باید خالص شود ، یا با استفاده از روش های بیوشیمیایی از سایر محتویات سلول جدا شود. پروتئین خالص شده را می توان برای آزمایش یا در مورد انسولین برای بیماران استفاده کرد.

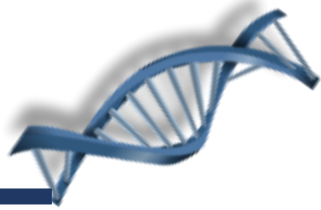


در سال‌های گذشته تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب به‌گونه ترکیب شده با اپی‌توپ‌های پتیدی در صنعت دارو گسترش یافته است. به‌کارگیری از این برچسب‌ها درجه خلوص پروتئین‌های نوترکیب را افزایش می‌دهد.

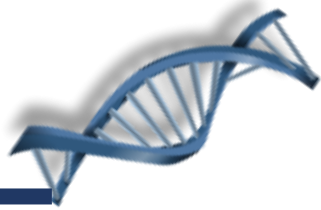
دنباله‌های پتیدی Poly-Arg-, FLAG, C-myc, ly-His- و S-tag رایج‌ترین برچسب‌های به‌کار گرفته شده هستند. تخلیص هر یک از دنباله‌ها در شرایط بافری خاص صورت می‌گیرد



گلو تاتیون S ترانسفراز به صورت کانژوگه با پروتئین هدف تولید می شود و خالص سازی توسط ستون حاوی گلو تاتیون انجام می شود

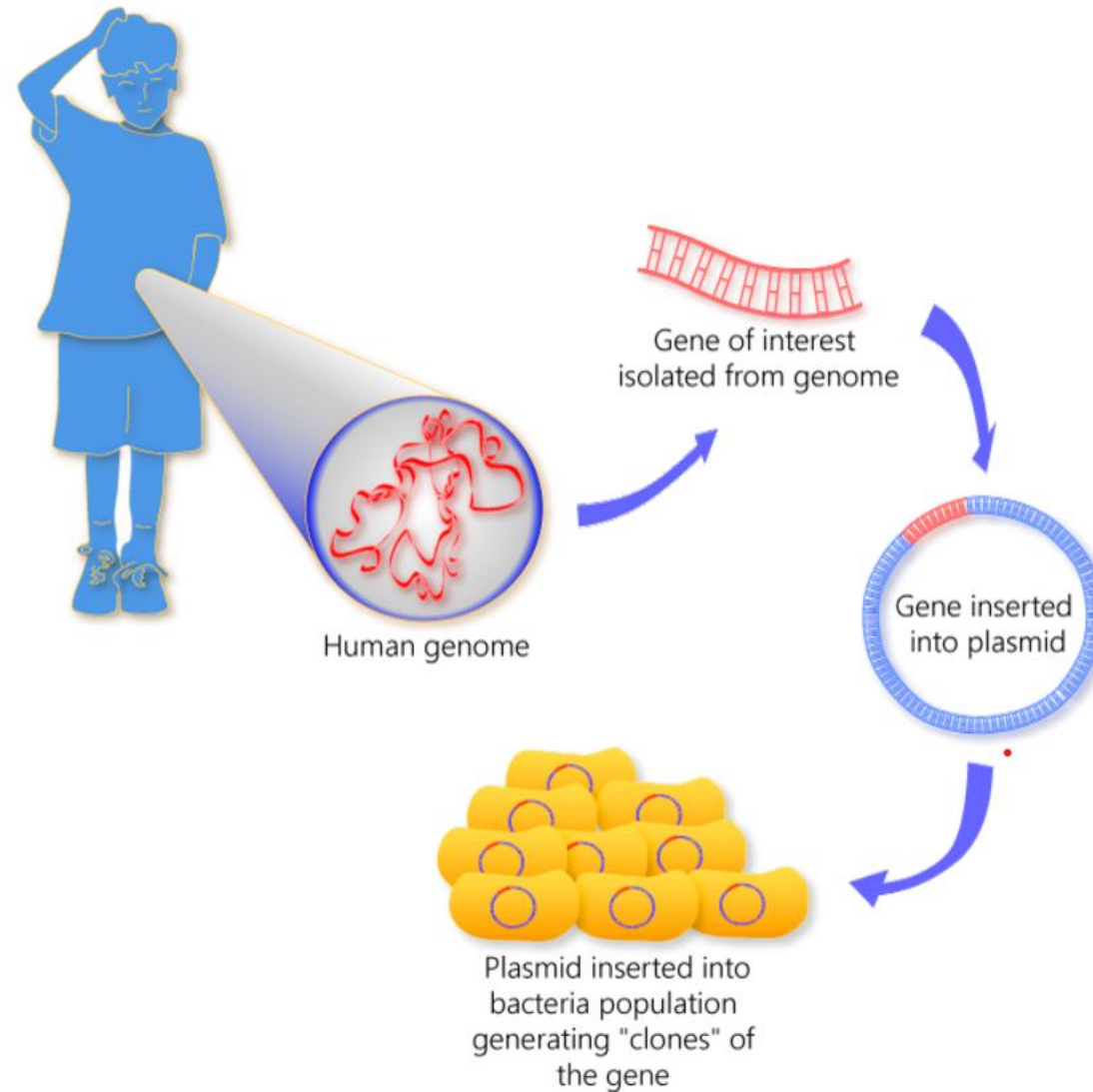
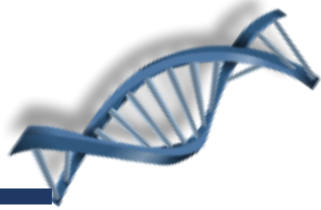


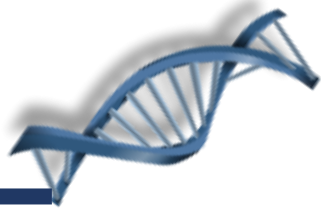
شش اسید آمینه هیستیدین به صورت گانژوگه به پروتین هدف متصل می شود و خالص سازی توسط شبکه نیکل-اسید استیک انجام می شود



- تمام وکتورهای یوکاریوتیک شامل دو مبدا رونویسی می باشند یکی در باکتری ها فعال می باشد یکی هم در یوکاریوتها
- در سیستم های بیان یوکاریوت از سلول های پستانداران و حشرات استفاده می شود
- در سلول های حیوانی به جای واژه ترانسفورماسیون از ترانسفکشن استفاده می شود
- برای بیان پایدار از ویروس ها استفاده می شود زیرا برخی از آنها به صورت فعال وارد ژنوم می شوند. اما برخی از پلاسمیدها نیز با راندمان بسیار کمتر و به صورت تصادفی وارد ژنوم می شوند.

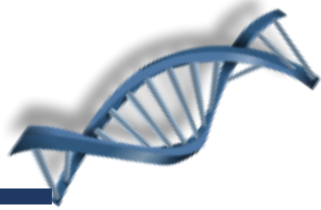
کاربرد های کلونینگ



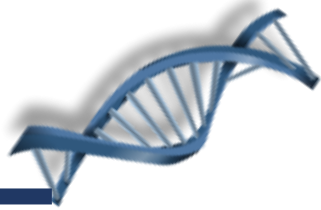


- پروتئین‌ها، واکسن‌ها و آنتی بیوتیک‌ها همگی از طریق فرآیند شبیه سازی تولید می‌شوند.
- در کشاورزی از شبیه سازی برای ایجاد گیاهان مقاوم به آفات استفاده می‌شود.
- شبیه سازی همچنین برای ایجاد حیوانات تراریخته و برای ژن درمانی استفاده می‌شود.
- شبیه سازی در مطالعات علمی برای درک بهتر فرآیندهای بیولوژیکی اساسی حیوانات مورد استفاده در آزمایش‌ها، مانند موش، استفاده می‌شود.

برخی از پروتئین های نو ترکیب تولید شده

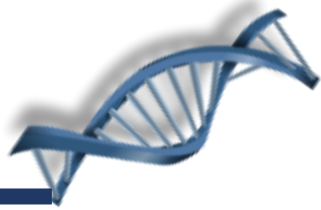


- تولید انتی بادی های مونوکلونال و پلی کلونال
- تولید فاکتورهای رشد یا فاکتورهای مهار کننده پروتئینی
- تولید آنزیم و بررسی اندازه فعالیت آنزیمی
- تولید پروتئین های نو ترکیب با خاصیت داروئی
- تولید سلول های ترانسژنیک یوکاریوتی
- تولید آنزیم در مخمر

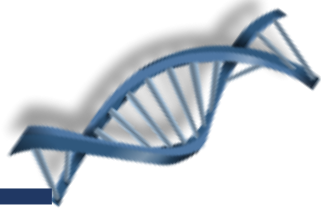


راه کارهای عمومی برای بیان بالاتر پروتئین نو ترکیب

راهبرد	توضیح
سویه میزبان	سویه میزبان بر مقدار بیان تأثیر میگذارد.
نوع ناقل مورد استفاده	تعداد نسخههای ژن همراه با تعداد نسخههای ناقل افزایش مییابد. ماهیت و خصوصیات دیگر ناقل نیز در بازده کل تأثیر فراوانی دارد.
آنتیبیوتیک انتخابی	آنتیبیوتیک انتخابی بر مقدار بیان تأثیر میگذارد.
پروموتور	ضعیف یا قوی بودن پروموتور، قابل القاء بودن یا بیان دائم آن و میزان تنظیم پروموتور در بیان اثر دارد.
خاتمهدهنده رونویسی	کارآمدی و فاصله خاتمهدهنده در پایان رونویسی مهم است.
پایداری mRNA	پایداری mRNA در میزان ترجمه نقش دارد و وجود ساختارهای دوم بهویژه در انتهای 5' نقش مهمی را در پایداری آن بازی میکند.
سیگنالهای ترجمه	محل اتصال ریبوزوم و ساختارهای دوم در انتهای 5' mRNA ممکن است بر میزان در دسترس بودن مکان اتصال ریبوزوم تأثیر گذار باشد.
کدونهای غالب	استفاده از کدونهای اصلی هر ارگانیسم در توالی قطعه کدشونده باعث افزایش بازده بیان میشود.
دما	دما نقش اساسی در تاخوردن پروتئین و پایداری آن بازی میکند.
شرایط کشت/ محیط کشت	شرایط رشد، میزان اکسیژن، سرعت رشد، منبع کربن و نوع فرماتور نقش مهمی در میزان بیان دارند.
پروتئین ادغامی	اتصال پروتئین هدف به پپتیدهایی که بسیار محلول هستند میتواند باعث افزایش حلالیت، پایداری و افزایش بیان پروتئین شود.

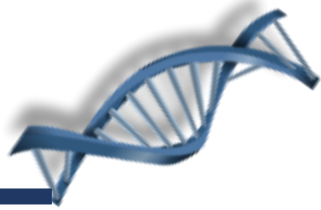


امروزه سیستم بیانی pET قوی ترین سیستمی است که جهت بیان پروتئین نو ترکیب به کار گرفته می شود. ناقل های pET که در سال ۱۹۸۶ شناخته شدند، ژن هدف را توسط توالی های رونویسی و ترجمه باکتریوفاژ T7 کنترل می کند و لذا بیان ژن توسط به کارگیری RNA پلی مرآز T7 در میزبان القاء می شود. آنزیم RNA پلی مرآز T7 با قدرت زیاد هشت مرتبه سریع تر از RNA پلی مرآز E.coli رونویسی را انجام می دهد.



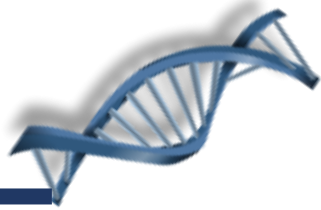
ریشه ی بسیاری از بیماری های انسانی فقدان یا اختلال در عملکرد یک پروتئین است که به طور طبیعی در بدن ساخته نمی شود. اکثر این بیماری ها را می توان با تجویز شکل طبیعی پروتئین به بیمار درمان کرد، اما برای اینکه این روش درمانی امکان پذیر باشد، باید شکل طبیعی پروتئین مورد نظر در مقیاس بالایی در دسترس باشد.

انسولین نو ترکیب



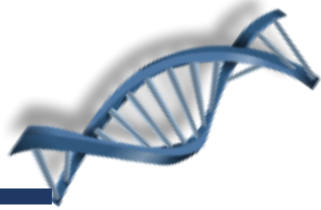
انسولین که توسط سلول های β جزایر لانگرهانس پانکراس ساخته می شود، سطح گلوکز را در خون کنترل می کند. نقص در انسولین باعث بروز دیابت ملیتوس می شود، که مجموعه ای از علائمی ست که اگر درمان نشود، منجر به مرگ بیمار می شود .





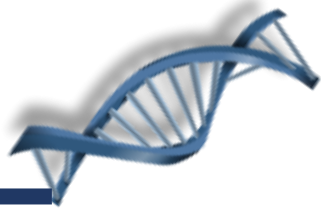
انسولین دارای دو ویژگی است که سبب تسهیل تولید آن از طریق تکنولوژی DNA نو ترکیب می شود:

- انسولین انسانی بعد از ترجمه دچار هیچ تغییری مانند اضافه کردن ریشه قندی نمی شود، بنابراین امکان ساخته شدن انسولین توسط باکتری ها وجود دارد.
- اندازه مولکولی انسولین که یک پروتئین کوچک است و شامل دو پلی پپتید است.

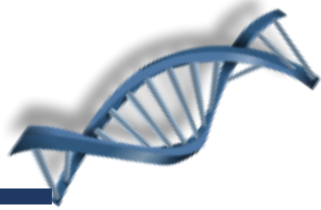


فرآیند ساخت انسولین نو ترکیب از ژن های مصنوعی زنجیر A-B برای ساخت و بیان ژن های مصنوعی انسولین در سال ۱۹۷۸ انجام شد. دو پلاسمید نو ترکیب یکی حامل ژن مصنوعی زنجیره ی A و یکی حامل زنجیره ی B ساخته شد.

ژن مصنوعی، هر زنجیره را به یک قالب باز خواندن 'LacZ' در وکتور Pbr322 متصل کردند. بنابراین ژن انسولین، تحت کنترل پروموتور قوی Lac قرار می گرفت و در نتیجه ژن به صورت یک پروتئین همجوش بیان می شد که شامل چند اسید آمینه ی اول ژن بتاگالاکتوزیداز و پلی پپتیدهای A و b بود.



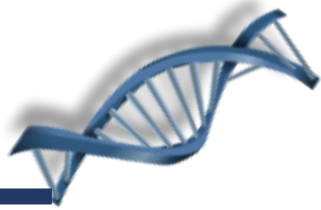
در یک روش پیشرفته تر محققین چارچوب کامل خواندن پره انسولین که شامل زنجیره ی A، زنجیره ی C و زنجیره ی B بود را ساختند. گرچه ساختن DNA به این روش بسیار سخت تر است اما دارای این مزیت خواهد بود که در آن پره هورمون به طور خودبه خود دچار تاخوردگی می شود و ساختار باندهای دی سولفیدی صحیح خود را بدست می آورد. زنجیره های C را هم در نهایت می توان با یک برش پروتئولیتیک جدا کرد.



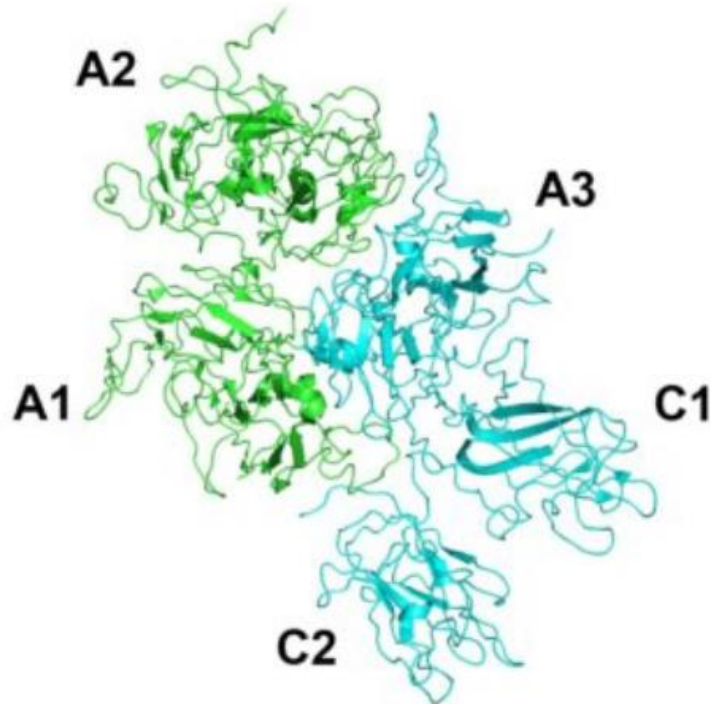
برای ساخت سوماتوتروپین نو ترکیب از مجموعه ای از روش های ساخت ژن مصنوعی و کلونینگ DNA مکمل استفاده شد تا سویه ای از *E.coli* تولید کننده ی سوماتوتروپین بدست آید.

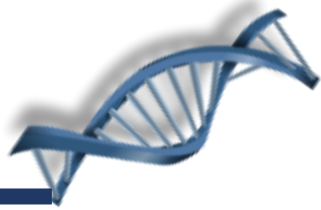
mRNA از هیپوفیز (غده ای که سوماتوتروپین را در بدن تولید می کند) استخراج شد و کتابخانه ی cDNA سوماتوتروپین دارای یک جایگاه آنزیم محدودالایتر *Hae III* که می توانست cDNA را به دو قسمت برش دهد. قسمت بزرگ تر شامل کدون های ۲۴ تا ۱۹۱ بود که برای ساخت پلاسمید نو ترکیب استفاده می شد و قسمت کوچکتر توسط یک مولکول DNA مصنوعی جایگزین شد که شامل ناحیه ی شروع ژن سوماتوتروپین بود و باعث فراهم شدن یک سیگنال صحیح برای ترجمه در *E.coli* می شد و سپس ژن تغییر یافته را وارد یک وکتور بیانی کردند که حامل پروموتور *Lac* بود.

سنتز فاکتور VIII نو ترکیب

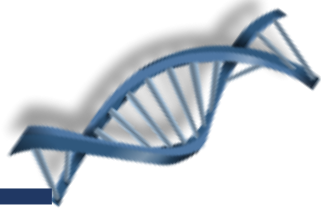


این پروتئین نقشی کلیدی در فرآیند لخته شدن خون دارد. شایع ترین نوع بیماری هموفیلی در انسان ناشی از ناکارایی بدن در تولید همین پروتئین است که منجر به اختلال در مسیر لخته شدن خون و بروز علائم شناخته شده ی این بیماری می شود.



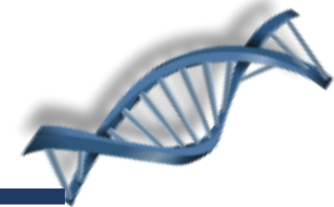


در یک روش دیگر از دو قطعه ی جدای cDNA استفاده شد که یکی ساب یونیت بزرگ تر و یکی ساب یونیت کوچکتر را کد می کرد. هر قطعه ی cDNA درون یک وکتور بیانی در پایین دست پروموتور Ag و بالادست سیگنال پلی آدنیلایسیون ویروس SV40 وارد شد. پلاسمیدها را وارد سلول های هاستر کردند و پروتئین نو ترکیب مورد نظر بدست آمد. بازده پروتئینی در این روش، ده برابر بیشتر از روشی بود که سلول حاوی cDNA کامل بود و همچنین پروتئین بدست آمده از نظر عملکردی از فرم طبیعی آن غیر قابل تمایز بود.

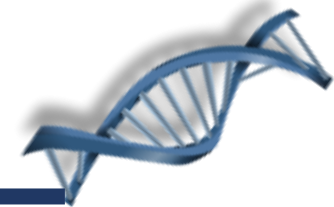


از فارمینگ هم برای تولید فاکتور هشت استفاده کردند. cDNA کامل انسانی را به پروموتور ژن پروتئین اسیدی آب پنیر خوک متصل کردند تا این پروتئین در بافت پستان خوک سنتز شود و متعاقباً منجر به ترشح آن در شیر حیوان شود. فاکتور هشتی که با استفاده این روش تولید شد دقیقاً مشابه همان پروتئین طبیعی انسان بود و عملکرد کاملی را در روند لخته شدن خون از خود نشان می داد.

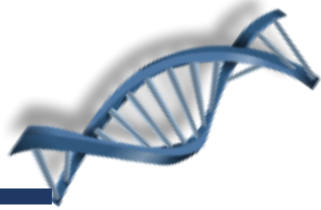
سنتز سایر پروتئین های نو ترکیب انسانی



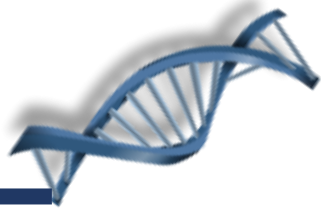
شمار پروتئین های انسانی که بوسیله تکنولوژی نو ترکیبی ساخته می شوند همچنان در حال افزایش است. این تکنولوژی علاوه بر اینکه با تولید پروتئین هایی به منظور جایگزینی پروتئین های دارای نقص عملکردی و یا تامین کمبود آنها، باعث درمان خیلی از بیماری ها شده است، همچنین تعدادی از فاکتورهای رشد مانند ایتترفرون ها و اینترکولین ها که در درمان سرطان قابل استفاده اند را نیز تولید کرده است.



از آنجایی که این پروتئین ها به مقدار بسیار کمی در بدن انسان ساخته می شوند، بنابراین تنها راه بدست آوردن این پروتئین ها با مقادیر بالا برای اهداف بالینی، تکنولوژی نو ترکیبی می باشد. سایر پروتئین ها بسیار آسان تر بدست می آیند (مانند آلبومین)، اما از آنجا که به مقادیر زیادی از آنها نیاز است، تولید آنها هم در میکروارگانیسم ها یک گزینه مورد توجه خواهد بود.

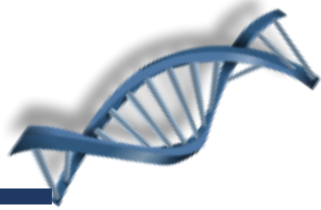


تاکید فرآیند کلونینگ ژن ها برای تولید واکسن نو ترکیب روی این موضوع می باشد که آنتی بادی های اختصاصی ضد ویروس ها علاوه بر اینکه علیه ذرات ویروسی کامل تولید می شوند، می توانند فقط در مواجهه با قسمت جدا شده ی خاصی از ویروس نیز تولید شوند. این موضوع بالاخص در مورد پروتئین های تخلیص شده ای که در پوشش ویروس حضور دارند، صدق می کند.

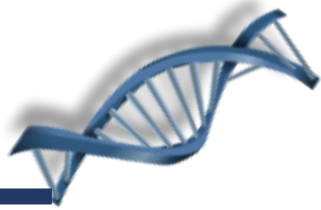


اگر ژن کد کننده ی پروتئین های آنتی ژنیک یک ویروس خاص شناسایی شود و آن را وارد یک وکتور بیانی کنند، بنابراین همان روشی که برای تولید پروتئین های حیوانی استفاده می شد این بار می تواند برای تولید پروتئین های نو ترکیبی به کار رود که به عنوان واکسن استفاده شوند. مزیت این واکسن ها این است که ذره ی ویروسی کامل در آن وجود ندارد و همچنین می توانند در مقادیر بالا تولید شوند.

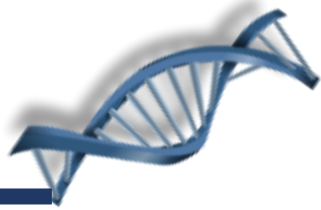
تولید واکسن هپاتیت B



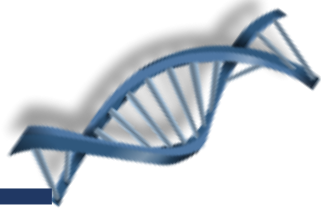
واکسن HbsAg نو ترکیب، به خاطر ویژگی غیر معمول عفونت زایی ویروس موفق است. خون افراد مبتلا نه تنها حاوی ذرات ویروسی کامل هپاتیت B با قطر ۴۲ نانومتر است بلکه حاوی ذرات کروی ۲۲ نانومتری هم می باشد که فقط از پروتئین HbsAg تشکیل شده است. این ذرات ۲۲ نانومتری در مخمر و سلول CHO هم تشکیل می شوند و در واقع همین ذرات هستند که ماده ی موثر واکسن های نو ترکیب را تشکیل می دهند.



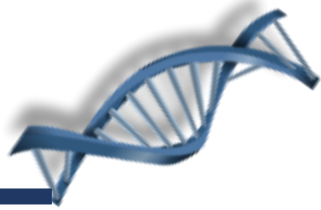
واکسن های نو ترکیب در مورد پاپیلوماویروس انسانی HPV با موفقیت ساخته شده اند که ساب تایپ های مختلف آن انواعی از سرطان ها را ایجاد می کنند. پروتئین پوششی L1 در مخمر ساکارومایسس سرویسیه بیان شده است و باعث افزایش ذرات شبه ویروسی که تجمعی از پروتئین های L1 می باشند، شده است. دقیقاً مشابه HbsAg این ذرات فاقد اسید نوکلئیک بوده و در نتیجه عفونت را نمی باشند.



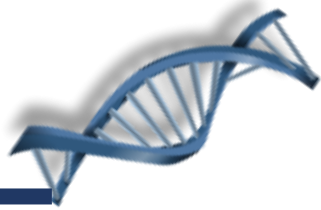
به منظور افزایش سطح تاثیر واکسن HPV نو ترکیب، انواعی از سویه های مخمر نو ترکیب تولید شدند که هر کدام پروتئین L1 از ساب تایپ مختلفی از HPV را سنتز می کردند. سپس این ذرات شبه ویروسی از سویه ها ترکیب شدند تا واکسنی دو ظرفیتی یا چهار ظرفیتی ایجاد کنند. این واکسن ها در بانوان در برابر ابتلا به سرطان دهانه رحم و از آقایان در برابر عفونت منتقله از طریق مقاربت محافظت می کنند.



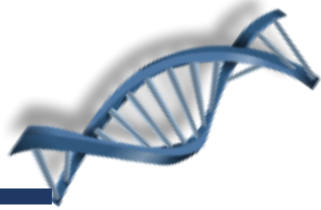
در برخی از اختلالات ژنتیکی، بیماران فاقد شکل عملکردی یک ژن خاص هستند. ژن درمانی سعی دارد نسخه طبیعی ژن را به سلولهای بدن بیمار ارائه دهد.



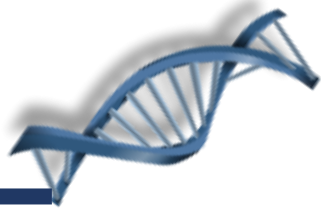
در آزمایشگاه های تحقیقاتی پایه، زیست شناسان اغلب از کلونینگ DNA برای ساختن نسخه های مصنوعی و نو ترکیب ژن استفاده می کنند که به آنها کمک می کند ژن های طبیعی موجود زنده را درک کنند.



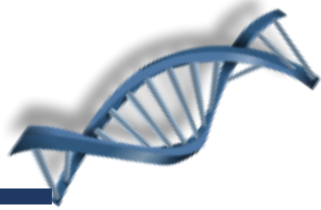
اجماع بین المللی قابل توجهی در مخالفت با همانندسازی زایشی وجود دارد. اما در مورد همانندسازی درمانی برخی معتقدند نیازی به ممنوعیت روند آزمایشهای همانندسازی وجود ندارد، بلکه نیاز امروز اتخاذ مقررات وضوابط لازم در این زمینه است. سازمان ملل متحد از سال ۲۰۰۱ تهیه کنوانسیون بر علیه همانندسازی تولیدمثل را از طریق تشکیل گروه ویژهای مورد توجه قرار داد.



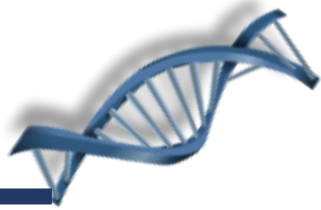
توافقات عمومی جهانی از جانب سازمانهایی چون یونسکو و سازمان بهداشت ، کمیسیون ملی نظارت بر اخلاق جهانی، اتحادیه اروپایی همانندسازی زایشی و انجمن علوم استرالیا همانند سازی زایشی انسان را غیراخلاقی و دارای خطر دانسته و بر لزوم ممنوعیت آن تأکید دارد.



بحثهای اخلاق زیستی ریشه در محتوای فلسفی و مذهبی جوامع در مورد طبیعت زندگی انسان دارد . از دیدگاه بسیاری از مذاهب، جنین انسان از هستی و موجودیتی مشابه سایر انسانها برخوردار است اما مرحله آغاز شأن ، ایجاد نوار اولیه انسانی مورد بحث میباشد. لقاح، جایگزینی در رحم، حلول روح و تولد به عنوان مرحله ایجاد شأنیت انسانی میتوانند محسوب گردند



نظرات علمای شیعه و سنی نشانگر اتفاق آرا در پذیرش همانندسازی درمانی است. اما از آنجا که همانندسازی زایشی انسان با مشکلات اخلاقی و اجتماعی پیچیده‌های همراه است؛ لذا انجام آن توسط برخی علما اسلام ممنوع شمرده شده است.



در حال حاضر اکثریت دانشمندان، متخصصان مراقبتهای بهداشتی، سیاستگذاران، اخلاقیون و مذهبیهها مخالفت خود را با تولد انسان همانندسازی شده اعلام نمودهاند؛ اما در مورد همانندسازی تحقیقاتی و درمانی مخالفت کمتری وجود داشته و اکثراً آنرا ممنوع نمیدانند. نکته مهم این است که اگر پژوهش در رویان اجازه داده شود باید گام هایی برداشته شود تا اطمینان لازم حاصل گردد که اینگونه پژوهشها در چارچوبهای اخلاقی صورت می پذیرند و لذا باید راهنماها و قوانینی معین گردد.