

دست ورزی ژنتیکی

www.ketab.ir

فاطمه ورمقانی

علیرضا فیض بخش

دست ورزی ژنتیکی

فاطمه ورمقانی - علیرضا فیض بخش

ناشر: عاصم

صفحه آرای: واحد هنری انتشارات عاصم

نوبت چاپ: اول/ ۱۴۰۰

تیراژ: ۵۰۰ نسخه

شابک: ۹۷۸-۶۲۲-۷۷۷۰-۳۴-۶

قیمت روی جلد: ۴۰۰/۰۰۰ ریال

سرشناسه	: ورمقانی، فاطمه، ۱۳۷۴-
عنوان و نام پدیدآور	: دست ورزی ژنتیکی، فاطمه ورمقانی، علیرضا فیض بخش.
مشخصات نشر	: تبریز: انتشارات عاصم، ۱۴۰۰
مشخصات ظاهری	: ۱۱۷ ص.: مصور.
شابک	: ۹۷۸-۶۲۲-۷۷۷۰-۳۴-۶
وضعیت فهرست نویسی	: فیبا
یادداشت	: کتابنامه.
موضوع	: مهندسی ژنتیک Genetic engineering
شناسه افزوده	: فیض بخش، علیرضا، ۱۳۵۱-
رده بندی کنگره	: QH۴۴۲
رده بندی دیویی	: ۶۵/۶۶۰
شماره کتابشناسی ملی	: ۸۵۵۵۰۷۰

فهرست مطالب

۵	چکیده
۱۵	مقدمه
۱۷	فصل اول: ساختار ماده‌ی وراثتی
۱۸	ماده‌ی وراثتی
۲۰	واحدهای سازنده‌ی ماده‌ی وراثتی
۲۲	انواع ماده‌ی وراثتی: DNA و RNA
۲۲	برحسب نوع قند و نوع نوکلئوباز در نوکلئوتیدها، دو نوع ماده وراثتی وجود دارد:
۲۲	بازهای آلی نیتروژندار: نوکلئوبازها
۲۴	نوکلئوبازهای پورینی بر دو نوع هستند:
۲۶	دامیناسیون نوکلئوبازها
۲۷	تاتومرها و تامومریزاسیون
۲۹	بیوسنتز پورین‌ها و پیریمیدین
۳۰	تخریب پورین
۳۰	تخریب پیریمیدین‌ها
۳۱	ترکیبات قندی
۳۲	شکل فضایی خمیده‌ی قند
۳۳	نوکلئوزیدها و نوکلئوتیدها
۳۶	آرایش فضایی بازهای آلی و مولکول قند حول پیوند گلیکوزیدی
۳۷	ساختار اول DNA و RNA

۸ دست ورزی ژنتیکی

۳۸.....	ساختمان دوم DNA و RNA
۴۱.....	ویژگی‌های DNA-B یا DNA واتسون-کریک
۴۲.....	ویژگی‌های DNA-A یا DNA
۴۳.....	ویژگی‌های DNA-Z
۴۳.....	ساختار Z-RNA
۴۴.....	ساختارهای دوم غیر معمول DNA
۴۴.....	سه رشته‌ای تریپلکس
۴۸.....	DNA چهار رشته‌ای
۴۸.....	ساختار سوم DNA
۴۹.....	ویژگی‌های توپولوژی DNA
۵۰.....	آنزیم‌های توپوایزومراز: آنزیم‌های سوکت و بست DNA
۵۱.....	DNA توپوایزومرازهای کلاس I
۵۲.....	آنزیم‌های توپوایزومراز کلاس II
۵۲.....	انواع DNA توپوایزومرازهای III در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها
۵۵.....	دانشسته سوپرکوبلی (σ)
۵۶.....	فصل دوم: واکنش زنجیره‌ای پلیمرز
۵۷.....	واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction):
۵۹.....	اصول PCR
۶۰.....	روش کار PCR
۶۳.....	۲-۳. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بی‌درنگ
۶۴.....	نحوه‌ی کار
۶۵.....	واکنش زنجیره‌ای پلیمرز رونویسی معکوس
۶۹.....	کاربردهای Real Time PCR
۷۰.....	فصل سوم: خرابی و بازسازی DNA

۷۱	ترمیم دنا (DNA Repair).....
۷۲	انواع آسیب‌های دنا بر اساس منشأ.....
۷۲	عوامل درونی (Endogenous).....
۷۳	عوامل بیرونی (Exogenous).....
۷۵	انواع آسیب‌های دنا بر اساس مکانیسم اثر.....
۷۷	مسیرهای ترمیم دنا.....
۷۹	ترمیم عدم تطابق (MMR).....
۸۰	ترمیم DNA به روش MMR.....
۸۱	ترمیم برش نوکلئوتید (NER).....
۸۱	ترمیم DNA به روش NER.....
۸۱	ترمیم برش باز آلی (BER).....
۸۲	سیستم ترمیم با استفاده از برش باز آلی.....
۸۳	ترمیم نو ترکیبی همولوگ (HR).....
۸۴	ترمیم DNA با استفاده از همولوژی.....
۸۴	پیوند انتهایی غیر همولوگ (NHEJ).....
۸۵	مقایسه سیستم ترمیم HR و NHEJ.....
۸۶	اختلال در ترمیم دنا.....
۸۹	فصل چهارم: انواع کاربردهای زنجیره‌ی پلیمراز.....
۹۱	کاربرد PCR برای تشخیص بیماری‌های عفونی.....
۹۲	کاربرد PCR در بیماری‌های عفونی.....
۹۳	تقسیم بندی PCR.....
۹۴	کاربرد واکنش زنجیره پلیمراز زمان واقعی RT-PCR.....
۹۶	روش Asymmetric PCR.....
۹۷	تکنیک Helicase-dependent amplification.....

۹۷	Hot-start PCR روش
۹۷	Hot start به کمک آنتی بادی
۹۸	Hot start به کمک Ampliwax
۹۸	Ligation-mediated PCR روش
۹۹	Methylation-specific PCR تکنیک
۹۹	Miniprimer PCR روش
۹۹	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification روش
۱۰۰	Quantitative PCR تکنیک
۱۰۰	RT-PCR روش
۱۰۰	PAN-AC تکنیک
۱۰۱	Touchdown PCR روش
۱۰۱	Long distance PCR روش
۱۰۱	واکنش زنجیره‌ای، پلیمرز نسخه برداری معکوس RT-PCR
۱۰۲	روش‌های تغییر یافته PCR و کاربرد این روش‌ها در شناسایی و درمان
۱۰۳	Multiplex-PCR روش
۱۰۴	RT-PCR روش
۱۰۵	ARMS-PCR روش
۱۰۵	Nested-PCR روش
۱۰۷	Real-Time PCR روش
۱۰۸	Intersequence-specific PCR آزمون
۱۰۸	TAIL-PCR جداسازی
۱۰۸	BAX Dupont-Qualicon آزمون
۱۰۹	Food-proof Roch آزمون
۱۰۹	IQ-Check BioRad آزمون

فهرست ۱۱

۱۱۰	واکنش PCR-ELISA مناسب برای مواد غذایی
۱۱۰	آزمون Probolia Bio RadH
۱۱۱	کیت تشخیص AnDia Tec Salmonella sp
۱۱۲	به حداقل رساندن آلودگی ناشی از DNA
۱۱۳	مشکلات PCR
۱۱۵	بایدها و نبایدها در PCR
۱۱۶	منابع

فهرست جدول‌ها

۲۵	جدول ۱-۱ جایگاه اتم‌های گروه‌های دهنده و گیرنده
۳۴	جدول ۲-۱ نوکلئوزیدها و نوکلئوتیدهای سازنده RNA
۵۴	جدول ۳-۱. انواع بازدارنده های DNA نوکلئوزومرازا در پروکاریوت ها و یوکاریوت ها...
۱۱۱	جدول ۴-۱. مورد آزمون های تجاری تأیید شده برای تشخیص عوامل بیماریزای باکتریایی در مواد غذایی

فهرست شکل‌ها

۱۸	شکل ۱-۱ ماده‌ی وراثتی
۲۰	شکل ۲-۱. اصل بنیادی، مسیر DNA تا پروتئین
۲۱	شکل ۳-۱. واحدهای سازنده‌ی ماده‌ی وراثتی
۲۴	شکل ۴-۱. ساختار انواع نوکلئوبازهای پورین و پیریمیدین موجود در ساختار ماده‌ی وراثتی و نحوه شماره گذاری اتم‌های آن‌ها.
۲۴	شکل ۵-۱. نوکلئوبازهای پورینی
۲۶	شکل ۵-۱. نحوه‌ی آرایش پیوندها هیدروژنی بین بازهای آلی در ساختمان دو رشته‌ای DNA
۲۸	شکل ۶-۱. دامیناسیون نوکلئوبازهای و بازهای حاصل از این تغییر خودبه خودی یا القایی

۱۲ دست ورزی ژنتیکی

- شکل ۷-۱. شیفت‌های تاتومری: تاتومری آمینو و ایمینو در باز آلی آدنین (بالا). شکل تاتومری کتو و انول تیمین (پایین) ۲۸
- شکل ۸-۱. منشأ اتم‌های در نوکلئوبازهای پیریمیدین و پورین. PRPP، ۵-فسفوریبوزیل-۱-پیروفسفات ۳۰
- شکل ۹-۱. واکنش‌های کاتالیز شده توسط گزانتین اکسیدر دوکتاز ۳۰
- شکل ۱۰-۱. تخریب پیریمیدین‌ها. در این مسیر آنزیم سیتوزین دامیناز سیتوزین را یوراسیل اکسید می‌کند و سرانجام این ترکیب به β -آلانین تبدیل می‌شود ۳۱
- شکل ۱۱-۱. ساختار قندهای D-ریبوز و D۲-دآکسی ریبوز ۳۲
- شکل ۱۲-۱. شکل فضایی S (بالا) و N (پایین) قندهای ۵ کربنه ی فورانوزی ۳۳
- شکل ۱۳-۱. انواع ۵-نوکلئوتیدها براساس تعداد فسفات. فقط نوکلئوتیدهای RNA نشان داده شده است. $(d)^{-}$ -ATP $^{4-}$ ، $(d)^{-}$ -ADP $^{3-}$ ، AMP، حرف (d) برای معرفی نوکلئوتیدهای DNA در نظر گرفته شده است ۳۶
- شکل ۱۴-۱. آرایش فضایی آنتی (Anti) و سین (Syn) نوکلئوتیدهای پورین دار هر دو حالت Anti و Syn را دارند نوکلئوتیدهای پیریمیدین دار فقط دارای حالت Syn می‌باشند. ۳۷
- شکل ۱۵-۱. واکنش پلیمریزاسیون که به ساخته شدن پلینوکلئوتید DNA می‌انجامد. ساخته شدن در جهت ۵' به ۳' انجام می‌شود. نوکلئوتیدهای جدید به انتهای ۳'OH آزاد اضافه می‌شود. ۳۹
- شکل ۱۶-۱۸-DNA, B-DNA, Z-DNA ۴۱
- شکل ۱۸-۱. نمایی از پهلوی دهانه‌ای A-DNA ۴۳
- شکل ۱۹-۱. نمایی از ساختار Z-RNA ۴۴
- شکل ۲۰-۱. نمای ترسیمی از تشکیل DNA سه رشته‌ای بین مولکولی. در دوپلکس هدف، رشته‌های پورینی و ۴۶
- پیریمیدینی در نظر گرفته شده‌اند. رشته‌ی سوم TFO از طریق شیار بزرگ به رشته‌ی غنی از پورینی (پلی پیریمیدینی) در دوپلکس هدف متصل می‌شود. ۴۶

فهرست ۱۳

- شکل ۱-۲۱. نمایی از موتیف های پورینی (هوگستین معکوس) و موتیف های پیریمیدینی ۴۷ (هوگستین مستقیم). بین دو رشته ی DNA هدف، پیوندهای هیدروژنی واتسون-کریک وجود دارد در حالی که رشته ی سوم با پیوندهای هیدروژنی هوگستین یا هوگستین معکوس در موتیف پورینی به رشته ی هدف متصل شده اند. ۴۷.....
- شکل ۱-۲۲. H- DNA. در ناحیه ای از H- DNA که دارای رشته ای پُلی پورینی و پُلی پیریمیدینی هستند امکان تشکیل DNA سه رشته ای وجود دارد. ۴۷.....
- شکل ۱-۲۳. DNA چهار رشته ای. (A) در ساختار G تتراپلکس بازهای گوانین با پیوندهای هیدروژنی هوگستین به هم جفت می شوند. (B) تتراپلکس G در محل های دارای واحدهای تکراری غنی از گوانین (C) توالی های غنی از (G- GTracts) توسط لوپ ها غیر گوانینی از هم جدا شده اند. ۴۹.....
- شکل ۱-۲۴. DNA ریلکس و سوکوپل دار ۵۱.....
- شکل ۱-۲۵. موقعیت توالی پروتئینی که گیراز را نشان می دهد. عملکرد DNA گيراز در برش توالی DNA و انواع مهارکننده های آن نشان می دهد. ۵۴.....
- شکل ۱-۲. نشانگر ژنتیکی یک جاندار زنده در زنجیره ی پلیمرز ۶۱.....
- شکل ۲-۲. نمودار فلورسنس سبز سایبر I که در واکنش زنجیره ای پلیمرز ساخته شده. ۶۳.....
- شکل ۲-۳. منحنی ذوب تولید شده در انتهای واکنش زنجیره ای پلیمرز بی درنگ ۶۴.....
- شکل ۲-۴. واکنش زنجیره ای پلیمرز رونویسی معکوس ۶۶.....
- شکل ۲-۵. یک روش آزمایشگاهی زیست شناسی مولکولی برپایه ی رونوشت معکوس ۶۸.....
- شکل ۲-۶. Real time PCR ۶۹.....
- شکل ۳-۱. ترمیم دنا ۷۱.....
- شکل ۳-۲. عوامل درونی ۷۳.....
- شکل ۳-۳. عوامل بیرونی ۷۴.....
- شکل ۳-۴. انواع آسیب های دنا بر اساس مکانیسم اثر ۷۶.....
- شکل ۳-۵. مسیرهای ترمیم دنا ۷۸.....

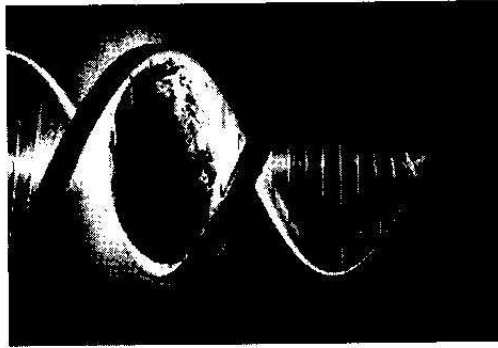
۱۴ دست ورزی ژنتیکی

- شکل ۳-۶. ترمیم DNA به روش MMR ۸۰
- شکل ۳-۷. ترمیم برش باز آلی (BER) ۸۲
- شکل ۳-۸. ترمیم نو ترکیبی همولوگ (HR) ۸۳
- شکل ۳-۹. پیوند انتهایی غیر همولوگ (NHEJ) ۸۵
- شکل ۴-۱. تقسیم بندی PCR ۹۴
- شکل ۴-۲. واکنش زنجیره پلیمرز زمان واقعی RT-PCR ۹۵
- شکل ۴-۳. Assembly PCR ۹۶
- شکل ۴-۴. Asymmetric PCR ۹۶
- شکل ۴-۵. Hot-start PCR ۹۷
- شکل ۴-۶. Ligation-mediated PCR ۹۸
- شکل ۴-۷. Miniprimer PCR ۹۹
- شکل ۴-۸. RT-PCR ۱۰۰
- شکل ۴-۹. Multiplex-PCR ۱۰۴
- شکل ۴-۱۰. ARMS-PCR ۱۰۵
- شکل ۴-۱۱. Nested PCR ۱۰۷
- شکل ۴-۱۲. Real-Time PCR ۱۰۸
- شکل ۴-۱۳. IQ-Check BioRad ۱۱۰

مقدمه

مهندسی ژنتیک، به عنوان بخشی از دانش زیست فناوری؛ به مجموعه روش هایی گفته می شود که به منظور جداسازی، خالص سازی، وارد کردن و بیان یک ژن خاص در یک میزبان بکار می روند و نهایتاً منجر به بروز یک صفت خاص یا تولید محصول مورد نظر در جاندار میزبان می شود. کاربردهای مهندسی ژنتیک تقریباً نامحدود به نظر می رسد. این علم کاربردهای زیادی در علوم پایه، داروسازی، علوم دامی، تولیدات صنعتی، کشاورزی و علوم پزشکی دارد. در زمینه علوم پایه، بررسی هایی مانند مکانیسم های همانندسازی دنا و بیان ژن ها در پروکاریوت ها، یوکاریوت ها و ویروس ها و همچنین چگونگی ساخته شدن و تغییرات پروتئین های داخلی سلول و همچنین سازوکار ایجاد سرطان از جمله کاربردهای مهندسی ژنتیک است. در زمینه کشاورزی که بستر بسیاری از کاربردهای مهندسی ژنتیک است.

در زمینه کاربردهای پزشکی، تشخیص بیماری های ارثی، تولید انسولین انسانی، تولید هورمون رشد انسان و... را می توان نام برد. در سال های اخیر گسترش و توسعه ی تکنیک های سنتز دی ان ای (DNA) نو ترکیب انقلابی را در درمان بسیاری از بیماری های انسانی از جمله انواع سرطان ها، اغلب بیماری های خود ایمنی نظیر دیابت و همچنین تشخیص، پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری های مادرزادی فراهم آورده است.



امروزه دانش و فن مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی مولکولی در عرصه‌های بسیار متنوع مانند کشاورزی، تغذیه و مواد غذایی، دامپروری، شاخه‌های مختلف علوم پزشکی و صنایع دارویی، صنایع تخمیری، صنایع نظامی، انرژی، محیط زیست و بهداشت بشر، استفاده‌های 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 دیان ای به وسیله‌ی جیمز واتسون و فرانسیس کریک در سال ۱۹۵۳ بود. این ساختمان نسبتاً ساده باعث شد تا دانشمندان سیستم‌های مختلف ژنتیکی را بررسی کنند. اما مطلب به همین جا، ختم نشد و دانشمندان مختلف سعی کردند که از این اطلاعات استفاده نمایند. هدف آن‌ها نیز بیان ساده‌ای داشت. آن‌ها خواستند تا یک DNA را از یک موجود بگیرند و در موجود دیگر وارد نمایند تا اثرات آن ژن در موجود ثانویه بروز کند.

این علم نوین که به تدریج جای خود را در بین علوم دیگر پیدا کرد، با عناوینی چون زیست‌شناسی مولکولی، مهندسی ژنتیک و نهایتاً DNA نو ترکیب شناخته می‌شود. مثال معروفی از کاربردهای مهندسی ژنتیک تولید سویه‌ای از باکتری اشرشیاکلی است که قادر به سنتز انسولین انسانی است. تولید گیاهان مقاوم به تنش‌های شوری و خشکی از دیگر مثال‌های شناخته شده‌ی کاربردهای مهندسی ژنتیک است.