مروری بر بیوتکنولوژی جانوری

● گردآوری: دکتر خسرو حسینی‌پژوه
عضو هیأت علمی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران

ظهور و تکامل آنچیزی که امروزه بیوتکنولوژی نامیده می‌شود اساساً به خاطر پیشرفتهای علمی در زمینه‌های میکروسکوپ الکترونی، کامپیوتر، تکنیکها و روشهای جدید بیوشیمی و اختراع و ابداع ابزار و وسایل نوین ممکن شد. تا حدود سال ۱۹۳۱ برداشت انسان از سلول محدود به آن چیزی می‌شد که می‌توانست توسط میکروسکوپ نوری ببیند که قدرت بزرگنمایی ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ برابر را داشت. اما بعد از ۱۹۳۱ با ساخت میکروسکوپ الکترونی محققان توانستند سلول و قسمتهای مختلف آن را تا یک میلیون بار بزرگتر ببینند. از طریق روشهای رنگ‌آمیزی فلزی و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی دانشمندان توانستند قسمت مایع سلول را نیز مورد مطالعه قرار دهند.

پیشرفت علم در بیوشیمی که در سالهای دهه ۱۹۳۰ حاصل شد ابزار مهم دیگری، یعنی آنزیمها را در اختیار دانشمندان قرار داد.

آنزیم را می‌توان یک کاتالیزور بیولوژیک دانست که می‌تواند باعث انجام یا تسریع بعضی تغییرات در یک ملکول شود. در حال حاضر بیش از ۱۰۰۰ آنزیم شناخته شده است. متعاقباً در دهه ۱۹۷۰ دانشمندان آنزیمهایی را در باکتریها کشف کردند که می‌توانستند ملکول DNA را در نقاط توالیهای مشخص بریده و قطع کنند. Arber و Smith و Nathans اولین دانشمندانی بودند که در سال ۱۹۷۰ از این آنزیمهای برش دهنده در محل خاص[1] برای مهندسی ژنتیک استفاده کردند. آنزیم برش دهنده در محل خاص بدین معنی است که می‌تواند DNA را فقط در یک قسمت مخصوص ببرد. از این رو این آنزیمهای برش دهنده در مهندسی ژنتیک و ساخت DNA نوترکیب، در نقشه‌برداری از ژن و در تشخیص بیماریهای ژنتیکی به کار گرفته شدند.

در نتیجهٔ تکامل میکروسکوپ الکترونی و کامپیوتر از یک طرف و دانش مواد بیوشیمیایی مانند آنزیمها از طرف دیگر، دانشمندان توانستند اطلاعات بیشتری دربارهٔ حیات و زندگی به دست آورند. اکنون دانشمندان تکنیکهایی برای دستکاری موجودات زنده و حتی دستکاری DNA به دست آورده‌اند. انتخاب و بکارگیری هر یک از این تکنیکها اساساً به نوع سلول و نتیجه‌ای که مقصود نظر است بستگی دارد که در اینجا بعضی از مهمترین این تکنیکها شرح داده می‌شوند.

الف- مهندسی ژنتیک

همچنان که مشخص شده است ژنها همه چیز از جمله روند تقسیم و ازدیاد را در سلول کنترل می‌کنند.

ژنها در کروموزومهای هر سلول قرار دارند و دو آلل هر ژن خاص به روی یک جفت کروموزوم مشابه (هومولوگ) قرار دارد.

تا این اواخر به نظر می‌رسید که ژنها به عنوان کوچکترین واحد سازنده صفات وراثتی، غیرقابل تغییر باشند. اما اکنون دانشمندان دریافته‌اند که ژنها قابل تغییر هستند.

حتی در طبیعت، ژنها متحمل موتاسیون و تغییر می‌شوند که ناشی از اشتباه در کپی برداری و اثرات مختلف محیطی است. در ۱۹۵۰ دانشمندان کشف کردند که مولکول DNA (دزاکسی ریبونوکلئیک) که از تعدادی نوکلوتید تشکیل شده است یک ساختمان مارپیچی دوتایی دارد. واتسون و کریک مشاهده کردند که هر زنجیر یک مارپیچ دوتایی دارای اطلاعات لازم برای ساخت زنجیر مکملش می‌باشد، یعنی DNA می‌تواند کپی‌هایی مشابه خودش بسازد. این کار همانندسازی[2] نامیده می‌شود. آنزیمها و سایر پروتئینها شکلهای متعددی دارند. در حالت غیر چین خورده هر پروتئین یک زنجیرهٔ ساده از اسیدهای آمینه است که به علت کشش و پیوند بین بعضی از اجزاء تشکیل دهنده‌اش با یکدیگر به صورت چین‌خورده و سه بعدی در می‌آیند. زنجیره غیر چین‌خورده اسیدهای آمینه به عنوان زنجیرهٔ پلی‌پپتید شناخته می‌شود.

وقتی که این زنجیره چین می‌خورد پروتئین تشکیل می‌شود.

ارتباط بین ژنها و پروتئینها به طوری است که در حقیقت توالی نوکلئوتیدها در مولکول DNA، توالی اسیدهای آمینه در پروتئین را مشخص می‌کند. در سلول، سنتز پروتئین هنگامی شروع می‌شود که قسمتی از DNA دو رشته‌اش از هم جدا شود و یک مولکول تک رشته‌ای RNA (اسیدریبونوکلئیک) به وسیلهٔ آنزیمی به نام RNA پلی‌مراز ساخته شود. این عمل رونوشت برداری[3] نامیده می‌شود. برای انتقال اطلاعات و پیامها از DNA به ریبوزوم این RNA که RNA پیامبر یا mRNA نامیده می‌شود ضروری است. اساساً RNA یک اسید نوکلئیک تک رشته‌ای است. RNA از سه جزء قند سادهٔ ریبوز، گروه فسفات و بازهای آلی تشکیل شده است.

در RNA بازتیمین با اوراسیل جایگزین شده است.

سه باز دیگر یعنی آدنین، سیتوزین و گوانین با DNA مشابه است.

mRNA پیام ژنتیکی را از DNA به کارخانهٔ ساخت پروتئین یعنی ریبوزوم حمل می‌کند. پیام همیشه کلمات سه حرفی است مثل AUG، CAG، ACG و ... که هر یک از این گروهها کدون[4] نامیده می‌شود.

هر کدون سه بازی مشخص کننده یک اسید آمینه است و تمام رشته RNA (یک یا چند پروتئین) راکد می‌کند. این پیام کد ژنتیکی نامیده می‌شود.

کشفیات بعدی منجر به اولین تجربه موفقیت‌آمیز مهندسی ژنتیک در ۱۹۷۳ شد و بدین ترتیب دانشمندان توانایی دوباره مرتب کردن ژنها را به دست آورند. دانشمندان اکنون می‌توانند دو قطعه DNA را مانند چسباندن دو قطعه فیلم به یکدیگر متصل نمایند.

به طور کلی ژنهای مورد نظر را به DNA یک باکتری مثل *E. coli* می‌چسبانند. این چنین ترکیبی به‌نام DNA نوترکیب (rDNA)[5] شناخته شده است.

اکنون دانشمندان دریافته‌اند آنزیمهایی که اطراف کروموزوم قرار دارند قادر هستند مولکول DNA را به طرق مختلف تعمیر کرده، پیچ دهند یا پیچ و تاب آن را باز کنند، رونوشت‌برداری کنند، مهار کنند، همانندسازی کرده و یا برش دهند.

برای به هم چسباندن قطعات مختلف DNA ابتدا باید بتوانیم قطعه مورد نظر را با شکستن DNA جدا کنیم. اسیدهای نوکلئیک خصوصاً DNA، مولکولهای بسیار بزرگی می‌باشند. به طوری که نسبت به فشارهای فیزیکی بسیار حساس بوده و به راحتی شکسته می‌شوند. این امکان وجود دارد که DNA را با امواج صوتی با فرکانس بالا یا نظایر آن شکست (در این صورت قطعات مختلفی تولید می‌شوند که دارای دو انتهای مشخص و معین نمی‌باشند). روش مناسب این است که بتوانیم DNA را از محل‌های خاص و مشخص که مورد نظر می‌باشند قطع کنیم.

این عمل را می‌توان با استفاده از آنزیمهای برش دهنده در محل خاص انجام داد. این آنزیمها DNA را در محل توالی‌های خاص قطع می‌کنند که در نتیجه قطعات خاصی از DNA با دو انتهای مشخص ایجاد می‌شود.

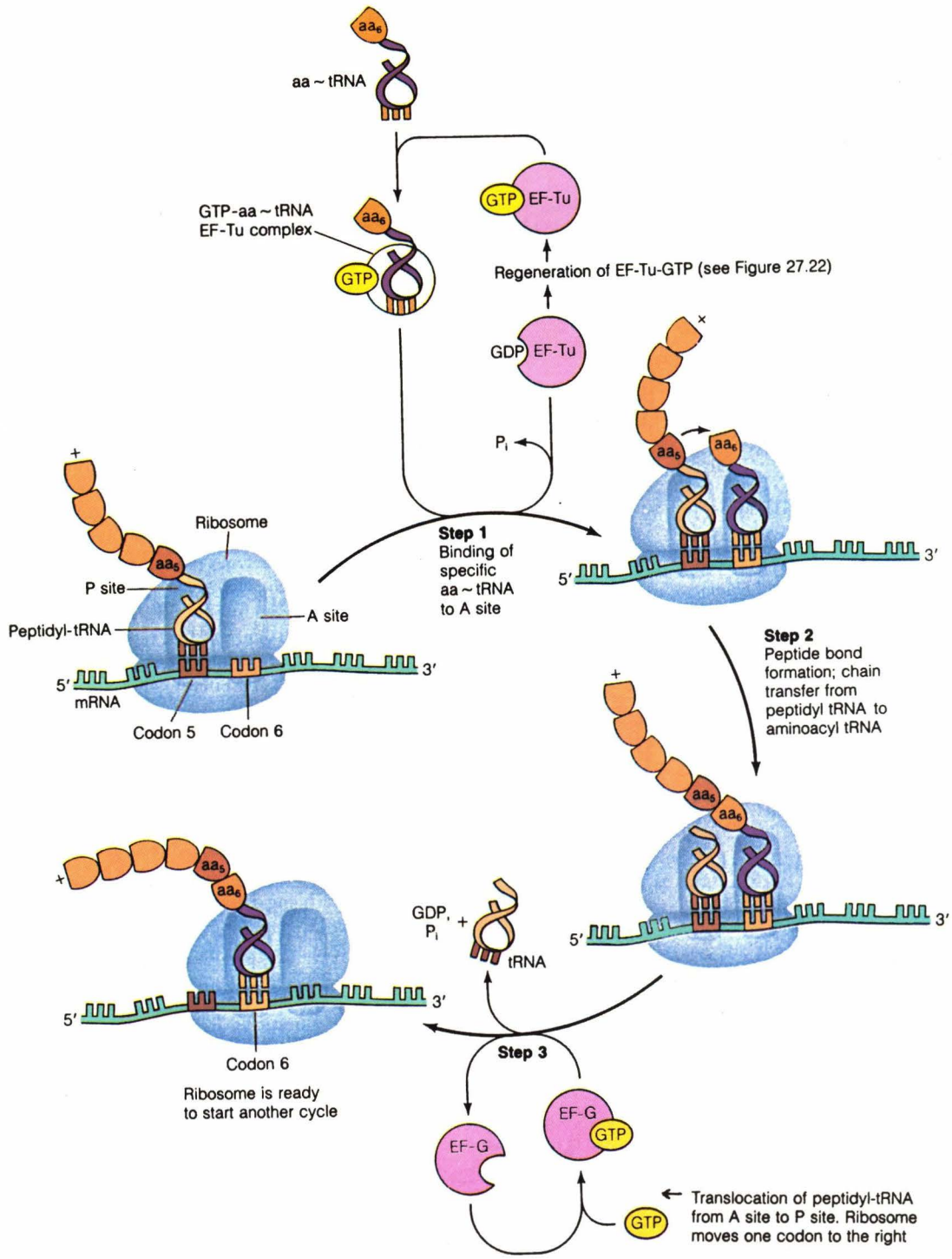
تعداد بسیار زیادی آنزیمهای برش دهنده وجود دارند که هر کدام توالی خاصی از DNA را مورد اثر و برش قرار می‌دهند. در جدول یک تعدادی از این آنزیمها و محل مورد اثر آنها مشخص شده است.

اگر انتهای DNA مربوط به دو DNA مختلف (منشاء مختلف) نزدیک هم آورده شود به هم متصل می‌شوند که بعد از اثر دادن لیگاز[6] یعنی آنزیمی که محلهای برش را در زنجیر قند - فسفات به هم می‌چسباند، DNA نوترکیب (rDNA) ایجاد شده است. این یک مثال ساده از مهندسی ژنتیک (بخصوص کلون کردن ژن) است.

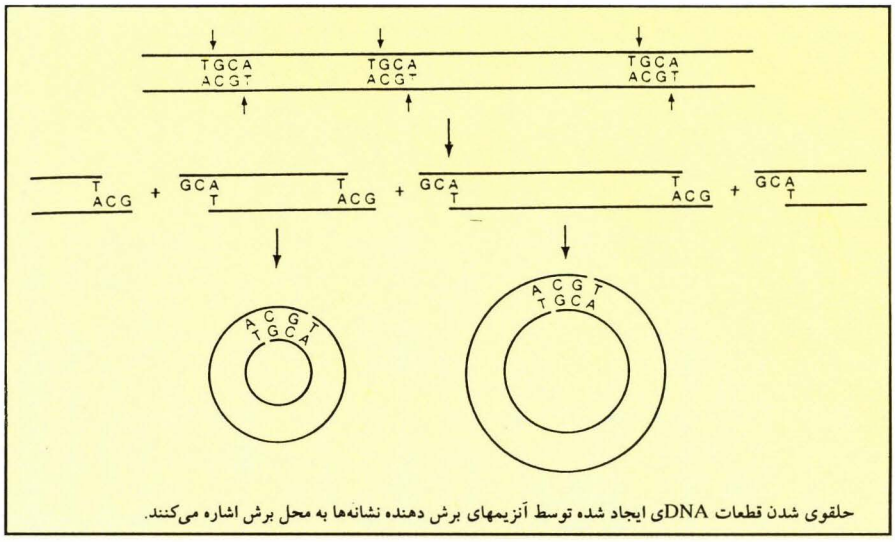
برای مهندسی ژنتیک به طور کلی یک حامل ژن لازم است که به عنوان یک وسیلهٔ نقلیه برای انتقال و قرار دادن آن ژن خاص در داخل سلول میزبان عمل کند.

پراستفاده‌ترین حامل در مهندسی ژنتیک پلاسمید باکتری *E. coli* است.

پلاسمیدها حلقه‌های کوچکی از DNA هستند که جدا از کروموزوم اصلی باکتری هستند. پلاسمید از این باکتری استخراج می‌شود تا ژن مورد نظر به آن چسبانده شود و سپس مجدداً به باکتری *E. coli*



روند طویل شدن زنجیره پروتئینی در سلولهای پروکاریوتی بعد از ترجمه (مرحلهٔ ۳) ریبوزم برای پذیرش آمینواسیل tRNA (aa-tRNA) بعدی آماده است و دورهٔ تکرار می‌شود این عمل تا رسیدن کدون ختم دهنده ادامه می‌یابد.



حلقوی شدن قطعات DNAی ایجاد شده توسط آنزیمهای برش دهنده نشانه‌ها به محل برش اشاره می‌کنند.

برگردد. این پلاسمید جدید وارد شده، همراه سایر مولکولهای DNA همانندسازی می‌کند و در هنگام تقسیم باکتری به سلولهای دختر وارد می‌شود.

برای این که پلاسمید بتواند داخل سلول شود لازم است سلول باکتری را در معرض شوکهای حرارتی یا برودتی در حضور یونهای کلسیم و مواد دیگر قرار داد. گاهی مواقع، تحریک الکتریکی با ولتاژ بالا باعث افزایش نفوذپذیری سلول و در نتیجه افزایش درصد دخول پلاسمیدها به باکتریها می‌شود.

اگر چه در تئوری این روش ساده به نظر می‌رسد اما در عمل بسیار پیچیده است.

البته دانشمندان اغلب مشکلات عملی را حل کرده‌اند در حال حاضر می‌توانیم تقریباً هر ژنی را که بخواهیم کلون کنیم، نه فقط در *E. coli* بلکه در سایرموجودات ذره‌بینی سریع‌الرشد مثل مخمرها این عمل قابل انجام است. این کلید تولید انبوه مواد مورد نظر از طریق مهندسی ژنتیک است.

امروزه مهندسی ژنتیک یکی از پایه‌های اصلی بیوتکنولوژی محسوب می‌شود.

تاکنون تعداد زیادی از محصولات DNA نوترکیب به مرحله تولید انبوه رسیده‌اند و در مقیاس وسیع به فروش می‌رسند از جمله انسولین انسانی، هورمون رشد، پروتروپین[7] (برای درمان کوتولگی[8])، واکسن بیماری تب برفکی در گاو، واکسن هپاتیت B در انسان، واکسن اسهال خوکی (در خوک)، انترفرون (برای درمان بیماریهای مختلف از جمله بعضی انواع سرطان) فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (TPA[9] - برای حل کردن لخته‌های خونی و در نتیجه درمان بیماریهای قلبی) و غیره.

همچنین بسیاری از محصولات دیگر حاصل از DNA نوترکیب در دست آزمایش و بررسی است.

پروبهای DNA[10] سیستمهای مولکولی هستند که به طور بسیار حساس و دقیقی می‌توان از آنها برای تشخیص و تمایز انواع مختلف یک گونه موجودات استفاده کرد (مثلاً تشخیص سویه‌های مختلف یک باکتری یا ویروس).

این روش بر اساس تفاوت در توالیهای نوکلئوتیدی DNA در گونه‌ها و سویه‌های مختلف عمل می‌کند از این روش می‌توان برای تشخیص و تعیین هویت عوامل بیماری‌زای انسان و حیوان استفاده کرد.

همچنین برای تجزیه و تحلیل خطاهای ژنتیکی، جهشها، سرطانها و ... قابل استفاده است. تاکنون ۷۰ پروب مناسب برای این مقاصد در دست است. اگر چه اکثر این پروبها امروزه فقط در آزمایشگاههای تحقیقاتی بسیار معمول و رایج هستند، اما استفاده عملی آنها به مقیاس وسیع و در آینده نزدیک قطعی است.

ب - امتزاج سلولهای[11] جانوری

هر سلول عمل ویژه‌ای را انجام می‌دهد به عنوان مثال سلولهای B در لوزالمعده تولید انسولین می‌کنند. اما اگر پیام مربوطه در DNA از این سلول از طریق مهندسی ژنتیک یا روشهای دیگر به سلول دیگری منتقل شود این سلول بر طبق پیام منتقل شده عمل خواهد کرد.

یکی از این روشها به هم پیوستن سلولها است.

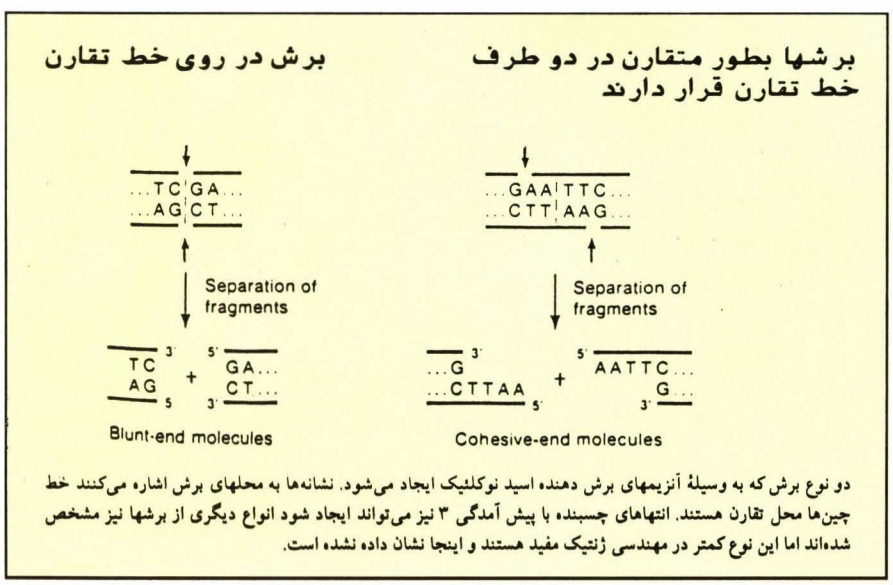
در کشت سلول جانوری، سلولها می‌توانند به طور خودبخود به هم بپیوندند و این عمل را می‌توان با اضافه کردن عوامل محرک پیوند مثل پلی‌اتیلن گلیکول[12] افزایش داد.

محصول پیوند، سلول هتروکاریون (ناجور هسته) دو هسته‌ای است، که سلول هر دو هسته را دست نخورده نگه می‌دارد. در بسیاری از این هتروکاریونها هسته‌ها بهم جوش می‌خورند و هیبرید پایدار تشکیل می‌شود که خصوصیات ژنتیکی هر دو والد را به صورت تجمعی داراست.

اخیراً یک روش امتزاج سلولی با استفاده از الکتریسیته ارائه شده است که نتایج بهتری نسبت به روشهای قبلی داشته است.

تکنیک هیبریدوما که حاصل امتزاج سلولی بوده و به طور گسترده‌ای در تولید پادتنهای مونوکلونال[13] استفاده می‌شود.

اصطلاح پادتن مونوکلونال به پادتنی گفته می‌شود که به وسیلهٔ یک رده سلولی از سلولهای مولد پادتن ساخته شود. بدین جهت این پادتن تولید شده فقط شامل یک نوع ویژه، که فقط به یک شاخص پادگنی ویژگی دارد، می‌باشد. برای تولید این نوع پادتن یک سلول مولد پادتن را با یک سلول میلیوما پیوند می‌دهند. این چنین سلول پیوند یافته‌ای به عنوان هیبرید - میلیوما یا هیبریدوما خوانده می‌شود. این روش ابزار قدرتمندی برای برطرف کردن



دو نوع برش که به وسیلهٔ آنزیمهای برش دهنده اسید نوکلئیک ایجاد می‌شود. نشانه‌ها به محلهای برش اشاره می‌کنند خط چین‌ها محل تقارن هستند. انتهای چسبنده با پیش آمدگی ۳ نیز می‌تواند ایجاد شود انواع دیگری از برشها نیز مشخص شده‌اند اما این نوع کمتر در مهندسی ژنتیک مفید هستند و اینجا نشان داده نشده است.

محدودیتهای روشهای قبلی ایمن‌سازی می‌باشد.

تکنولوژی هیبریدوما توانایی تولید پادتن‌های مونوکلونال مشخص را در شرایط آزمایشگاه و بدون استفاده از حیوان یا اعضاء بدن حیوان به دست داده است.

در سال ۱۹۷۵ جرج کهلر و سزار میلشین به خاطر پیوند دادن دو سلول لنفوسیت موش و میلیومای موش برای تولید هیبریدوما برنده جایزه نوبل شدند.

هیبریدوما از یک سلول تغییر شکل یافته (سرطانی) به دست می‌آید و بنابر این، این سلول توانایی رشد نامحدود را دارد. تمام روند تولید پادتن مونوکلونال به وسیلهٔ هیبریدوما را به صورت زیر می‌توان خلاصه کرد:

۱- ایمن کردن حیوان مناسب با پادگن خاص که احتیاج به خالص‌سازی هم ندارد.

۲- استخراج لنفوسیتهای B فعال شده از طحال حیوان ایمن شده.

۳- پیوند و یکی شدن رده سلول میلیومای مناسب با پلاسماسل‌های به دست آمده از حیوان ایمن شده که بدین ترتیب سلول ۴n کروموزومی به دست می‌آید که هم خاصیت رشد در محیط کشت را دارد و هم قادر به تولید پادتن است.

۴- انتخاب هیبریدومای مناسب با همگروه‌سازی سلولهای هیبریدوما که در محیط کشت پادتن مورد نظر را تولید می‌کنند.

۵- پس از انتخاب کلون مورد نظر از هیبریدوما، سلولهای به دست آمده را جهت تولید پادتن مونوکلونال به محیط کشت وسیع سلولی منتقل کرده و پس از رشد آنها تا سر حد مرگ، مایع رویی کشت جهت جداسازی پادتن برداشته می‌شود.

هر لیتر مایع رویی کشت حاوی ۵۰ mg پادتن خواهد بود.

می‌توان به جای رشد سلولهای هیبریدوما در محیط کشت آنها را به حفره شکمی موش تزریق کرد و از مایع آسیت حیوان جهت استخراج پادتن استفاده کرد. معمولاً حدود ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، پادتن از آسیت موش به دست می‌آید.

پادتن مونوکلونالهای به دست آمده توسط تکنیک هیبریدوما کاربرد فراوانی در تحقیقات زیست پزشکی و در تشخیص و کنترل بیماریها دارد. در حال حاضر بیش از ۲۰۰ پادتن مونوکلونال به‌صورت تجارتی در دست است.

پ - ریز تزریق DNA[14]

یک نقص ارثی در متابولیسم را می‌توان با جایگزین کردن یک ژن طبیعی به جای ژن معیوب برطرف کرد. ریز تزریق DNA تکنیک جدیدی است اگر چه این روش یک روش آزمایشگاهی است که تزریق فقط به روی یک سلول انجام می‌شود، با این حال درصد عدم موفقیت بالا است.

دانشمندان می‌توانند ژنهای جدید را به داخل سلول جنین اولیه (تک سلولی) حیوانات آزمایشگاهی وارد کنند (مثل موش و مگس سرکه).

در موش این عمل با تزریق یک ژن کلون شده توسط یک سوزن بسیار ریز به داخل هسته تخم تازه بارور شده (جنین یک سلولی) انجام می‌شود. این تخمها با شستشوی لوله رحمی حیوان تازه جفتگیری کرده به دست می‌آید. تخمهایی که پس از ژنوم سلول عفونی شده وارد می‌شود. بدین منظور قسمتهای مختلف ژنوم ویروسی به وسیلهٔ ژنی که باید انتقال یابد جایگزین می‌شود. با این روش عمل انتقال ژن در موش انجام شده است.

انتقال ژن و تکنیک ریز تزریق DNA یا پرتاب

اسم انزیم	میکروارگانیسم	توالی هدف و محل برش
انزیمهایی که تولید انتهای چسبنده میکنند (cohesive ends) (دو رشته را در دو نقطه غیر مقابل قطع میکنند)		
EcoRI	E.coli	G A A T T C C T T A A G
Bam HI	Bacillus amyloliquefaciens H	G G A T C C C C T A G G
Hae II	Haemophilus aegytius	Pu G C G C Py Py C G C G Pu
Hind III	Haemophilus influenza	A A G C T T T T C G A A
Pst I	Providencia stuartii	C T G C A G G A C G T C
Taq I	Thermus aquaticus	T C G A A G C T
انزیمهایی که تولید انتهای نوک کند (blunt ends) **میکنند**		
BalI	Brevibacterium albidum	T G G C C A A C C G G T
SmaI	Serratias marcescens	C C C G G G G G G C C C

بعضی از اندونوکلئازهای با اثر در محل خاص منشأ آنها و محل برش: خط چینها محور تقارن را نشان می‌دهند نشانه‌ها محل برش را نشان می‌دهند. آنزیم TaqI تولید انتهای چسبنده‌ای می‌کند که دو قسمت پیش آمده از دو نوکلئوتید تشکیل شده در حالی که در سایر آنزیمها این ناحیه از چهار نوکلئوتید تشکیل شده است.

انجام ریز تزریق زنده مانده باشند به رحم یک مادر خوانده (و یا مادر اصلی‌اش) منتقل می‌شوند تا مراحل رشد جنینی تا تولد را طی کنند.

اگر ژن تزریق شده قبل از این که سلول تخم شروع به تقسیم کند در ژنوم آن جای بگیرد همه سلولها از جمله سلولهای جنسی حیوان حاصل از این تخم حاوی ژن انتقال یافته خواهند بود.

بعد از تولد این نوزاد، موفق بودن عمل انتقال ژن، یعنی ورود ژن تزریق شده به داخل ژنوم حیوان را می‌توان به روش ساترن بلات یادات بلات که روشهایی برای نقشه‌برداری از یک ژنوم است مشخص کرد.

علاوه بر روش فوق در انتقال ژن می‌توان از حاملهای رتروویروسی[15] برای این کار استفاده کرد. رتروویروسها دارای DNA هستند که در سلولهای عفونی شده این DNA به وسیلهٔ آنزیمی به نام ترانس کریپتاز معکوس که در خود ویروس است به‌صورت DNA رونوشت‌برداری می‌شود و به‌داخل DNA در مورد برنامه‌های اصلاح نژاد دامها به منظورهای زیر انجام شده است:

۱- ایجاد یک صفت تازه در حیوان که قبلاً وجود نداشته است.

۲- انتشار سریعتر صفات مطلوب موجود در گله‌های دام

این اهداف را می‌توان با تغییر ژنتیکی سلول تخم در آزمایشگاه عملی کرد.

این روشها در مورد گیاهان نیز قابل اجرا است.

تجربیات موفقی با داخل کردن یک ژن جدید هورمون رشد در ساختمان ژنی مربوط به هورمون رشد در موش صحرایی انجام شده است.

آزمایشات مشابهی به روی دامها برای به دست آمدن رشد سریعتر و بیشتر در حال انجام است.

ت - کشت بافت (یا سلول) حیوانی[16]

کشت آزمایشگاهی بافت یا سلول حیوانی اولین بار در سال ۱۹۰۷ انجام شد. اما استفاده وسیع از این

روش فقط در دو دهه اخیر بوده است. در ابتدا این تکنیک برای تولید ویروس جهت ساخت واکسن مورد استفاده قرار گرفت.

اما در سالهای اخیر از این تکنیک برای تولید پروتئینها و پادتن مونوکلونال برای موارد درمانی نیز استفاده شده است. اولین مرحله از روند کشت سلول جدا کردن و استخراج سلولهای بافت مورد نظر با استفاده از یک آنزیم مثل تریپسین است.

سوسپانسیون سلولی پس از شستشو و خارج شدن آنزیم اضافه شده در یک ظرف پهن پلاستیکی یا شیشه‌ای که حاوی محیط کشت مناسب است ریخته می‌شود. سلولها به ته ظرف می‌چسبند و شروع به تقسیم و تکثیر می‌کنند. این نوع کشت که مستقیماً از بافت تهیه شده است به نام کشت اولیه خوانده می‌شود. پس از تقسیم و ازدیاد، نهایتاً یک فرش سلولی تمام ظرف را می‌پوشاند.

این فرش سلولی که غالباً به اندازه یک سلول ضخامت دارد کشت یک لایه نامیده می‌شود.

بعد از این که کشت یک لایه تشکیل شد محیط کشت خالی می‌شود و محلول حاوی تریپسین به ظرف کشت اضافه می‌شود که در نتیجه سلولها به آسانی از ظرف کنده می‌شوند.

پس از سانتریفوژ کردن محلول داخل ظرف کشت و جدا کردن تریپسین، سلولهای به دست آمده در ظروف کشت متعدد تقسیم می‌شوند. بدین ترتیب کشت سلول ثانویه به دست می‌آید. این عمل کشت مجدد را می‌توان چندین بار تکرار کرد. سلولهایی که بدین ترتیب کشت داده می‌شوند عمر محدودی دارند و فقط تعداد محدودی تقسیم انجام می‌دهند و پس از آن خواهند مرد.

سلولهای انسانی غالباً فقط ۵۰ تا ۱۰۰ بار تقسیم قبل از مرگشان انجام می‌دهند.

محیط کشت و ترکیب آن از مهمترین عوامل برای کشت سلول موفق است.

همچنان که محیط رشد باید استریل باشد، باید تمام نیازهای غذایی سلول را نیز تأمین کند.

با وجود تولید دائم اسید به خاطر متابولیسم سلول، pH محیط باید همیشه در ۷ تا ۷/۳ ثابت باقی بماند.

از آنجایی که سلول اوکاریوتیک (مثل سلولهای جانوران پرسلولی) بر خلاف سلول پروکاریوتیک (باکتریها) دیوارهٔ سلولی ندارد، جهت جلوگیری از پاره شدن و ترکیدن سلول باید فشار اسمزی متعادل برقرار باشد.

کشت سلول جانوری برای مدتهاست که به طور موفقیت‌آمیزی به خصوص برای رشد و تکثیر ویروسها جهت تولید واکسن استفاده می‌شود.

امروزه با در دست بودن تکنیکهای جدید بیوتکنولوژی، بسیاری از محصولات به طور تجارتی برای پیشگیری، تشخیص و درمان بیماریها در دسترس است. از جمله واکسن پولیو، واکسنهای جدید هاری و سرخک، انترفرونها (برای درمان سرطان)، انترلوکینها (برای تنظیم و تغییر سیستم ایمنی).

تکنیک کشت سلول یا بافت جانوری به طور موفقی برای رشد آزمایشگاهی سلولهای پوست برداشته شده از بیماران مبتلا به سوختگی، جهت تولید پوست و پیوند به مناطق سوخته بیمار به کار رفته است.

یکی دیگر از استفاده‌های مهم این تکنیک ارزیابی ترکیبات دارویی و سمی جدید است.

در این روش می‌توان با بررسی تأثیر دارو به روی کشت سلولهای مختلف به جای روشهای قدیمی اثر آن را بر حیوانات آزمایشگاهی، نموده و در هزینه و زمان تحقیق صرفه‌جویی کرد.

مهندسی پروتئین

یکی از اولین کارهای حیاتی سلول ساختن پروتئین است.

بر طبق پیامی که در DNA سلول موجود است، پروتئینهای مختلفی توسط سلولهای مختلف ساخته می‌شوند.

پروتئینها از مهمترین مولکولها در ارگانیسم زنده شمرده شده و به علاوه جزء اصلی ساختمان سلولها هستند. همچنین آنزیمها که نقش کاتالیز کنندهٔ همهٔ واکنشهای بیوشیمیایی در سلولهای زنده هستند، خود پروتئین هستند.

پروتئینها نقش کلیدی را در اعمال تنظیمی سلول و موجود زنده به عهده دارند.

بسیاری از مولکولهایی که پیامدها را از یک سلول یا بافت به سلول یا بافت دیگر انتقال می‌دهند، پروتئینی هستند (مثل انسولین و هورمون رشد).

بنابر این یک پروتئین می‌تواند یک آنزیم، یک گیرنده، یک هورمون، یک پادتن یا یک پروتئین ساختمانی باشد. ساختمان هر پروتئین به طور مستقیم توسط ژن خاصی کنترل می‌شود.

دستگاه سنتز پروتئین که در هر سلول وجود دارد، قادر است تا طبق کدهای ژنتیکی موجود در زنجیره DNA که همان توالی نوکلئوتیدها است، پروتئینهای مخصوصی را بسازد.

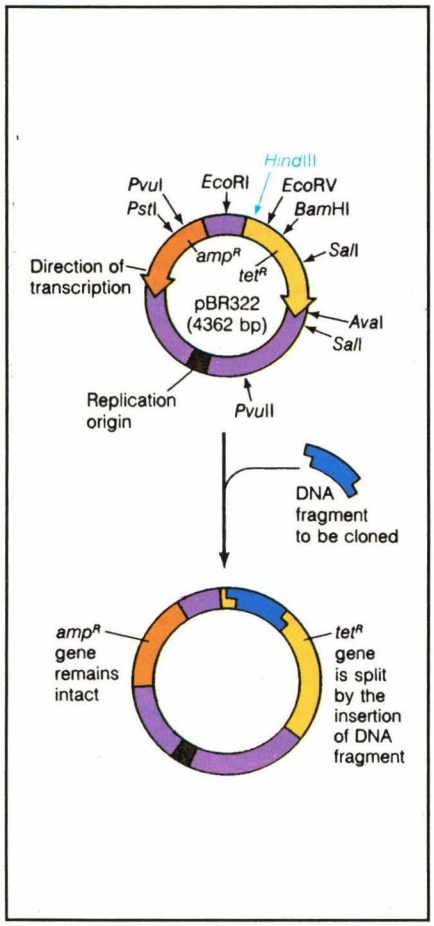
تا سال ۱۹۷۰ تکنیکهای در دسترس برای جدا کردن و شناسایی پروتئینها، تکنیکهای اولیه به حساب می‌آمدند.

با کشف تکنیک DNA نوترکیب و پیشرفتهای تکنولوژیک و اختراع میکروسکوپ الکترونی و کامپیوتر، مهندسی پروتئین نیز به واقعیت پیوست.

امروه پروتئینهای مختلفی را می‌توان با استفاده از این تکنیک در میکروارگانیسمها مثل باکتریها و مخمرها سنتز کرد.

بیوتکنولوژیستها امروزه تلاش می‌کنند تا از طریق مهندسی پروتئین مولکولهایی با خصوصیات کاملاً جدید طراحی و شکل‌دهی کنند، که احتمالاً بسیار مؤثرتر و پایدارتر و بسیار در برابر حرارت و اسیدیته مقاومتر باشند.

ایدهٔ اصلی مهندسی پروتئین بسیار ساده است به جای انتقال یک ژن خارجی به یک میکروارگانیسم برای ساختن یک ماده جدید و خاص، بیوتکنولوژیستها قبل از انتقال ژن آن را



a

دستکاری و به عبارت ساده‌تر، جهت به دست آمدن یک فرمان جدید ژنتیکی آن را تغییر می‌دهند.

بدین ترتیب بعد از انتقال ژن دستکاری شده، سلول یک پروتئین کاملاً جدید می‌سازد.

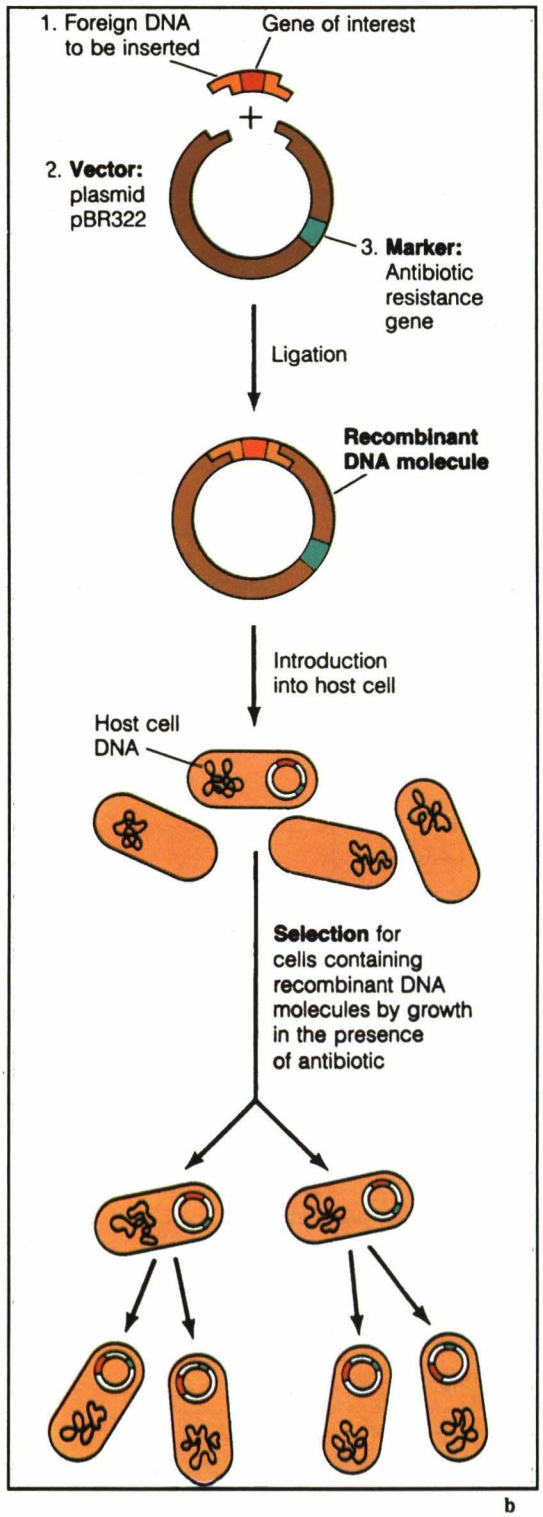
برای این که بتوان مهندسی پروتئین انجام داد اولین مسئله یافتن موقعیت ویژه برای انجام موتاژنز است.

این بدین معنی است که دقیقاً آن قسمتی از ژن را که باعث ایجاد یک خصوصیت یا صفت نامطلوب در پروتئین می‌شود بیابیم و آن قسمت را طوری تغییر دهیم که باعث به وجود آمدن خصوصیت یا صفت مورد نظر در پروتئین شود.

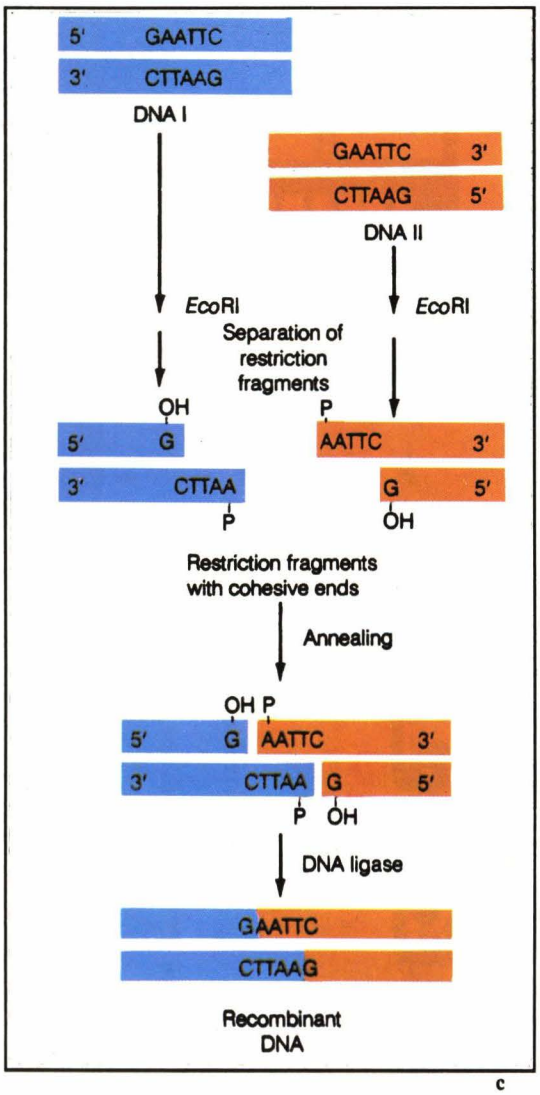
دوم آن که مهندسی پروتئین به دانستن ساختمان بسیار پیچیده پروتئینها یعنی ساختمان سه بعدی آنها نیاز دارد.

برای موفقیت در مهندسی پروتئین دانشمندان باید بدانند که دقیقاً چه قسمتی از مولکول پروتئین (به عبارت دیگر کدام یک از باز و کدهای ژن مربوطه) باید تغییر کند.

در حال حاضر دانشمندان با استفاده از تاباندن اشعه X بر پروتئین کریستال شده از جهات مختلف و به کمک کامپیوتر ساختمان آن را تشخیص



b



c

a- محل اثر بعضی از آنزیمهای برش دهنده اسیدنوکلئیک، جهت ترجمه ژنهای مربوط به مقاومت به آمپی‌سیلین و تتراسیکلین و کلون کردن یک ژن در محل آنزیم.

b- انتقال یک قطعه DNA به یک پلاسمید و وارد کردن پلاسمید به داخل باکتری

c- ساخت مولکول DNA نوترکیب

می‌دهند و گروههای اتمی که مسئول فعالیت پروتئین هستند را مشخص می‌کنند. از طریق شبیه‌سازی کامپیوتر ساختمان سه بعدی پروتئین به تصویر کشیده می‌شود.

با ملاحظه این تصویر سه بعدی از زوایای مختلف دانشمندان قادر خواهند بود آنچه را که در هنگام پیوند دو مولکول رخ می‌دهد مشاهده کنند.

سپس فرد متخصص بیولوژی مولکولی، توالی ژنی مطلوب را از طریق مهندسی ژنتیک می‌سازد.

شرکتهای بیوتکنولوژی در حال تحقیق به روی ساخت یک آنزیم به نام لیزوزیم T۴ که توانایی تجزیه دیواره سلولی را دارد و همچنین تحقیق به‌روی انترلوکین ۲ برای مقاومتر ساختن آن از طریق مهندسی پروتئین هستند.

مهندسی پروتئین تکنیکی برای آینده است و امکاناتی نامحدود دارد، زیرا بدین طریق می‌توان پروتئینهایی طراحی و تولید کرد که تا کنون در طبیعت وجود نداشته‌اند.

هـ - انتقال جنین[۱۸]

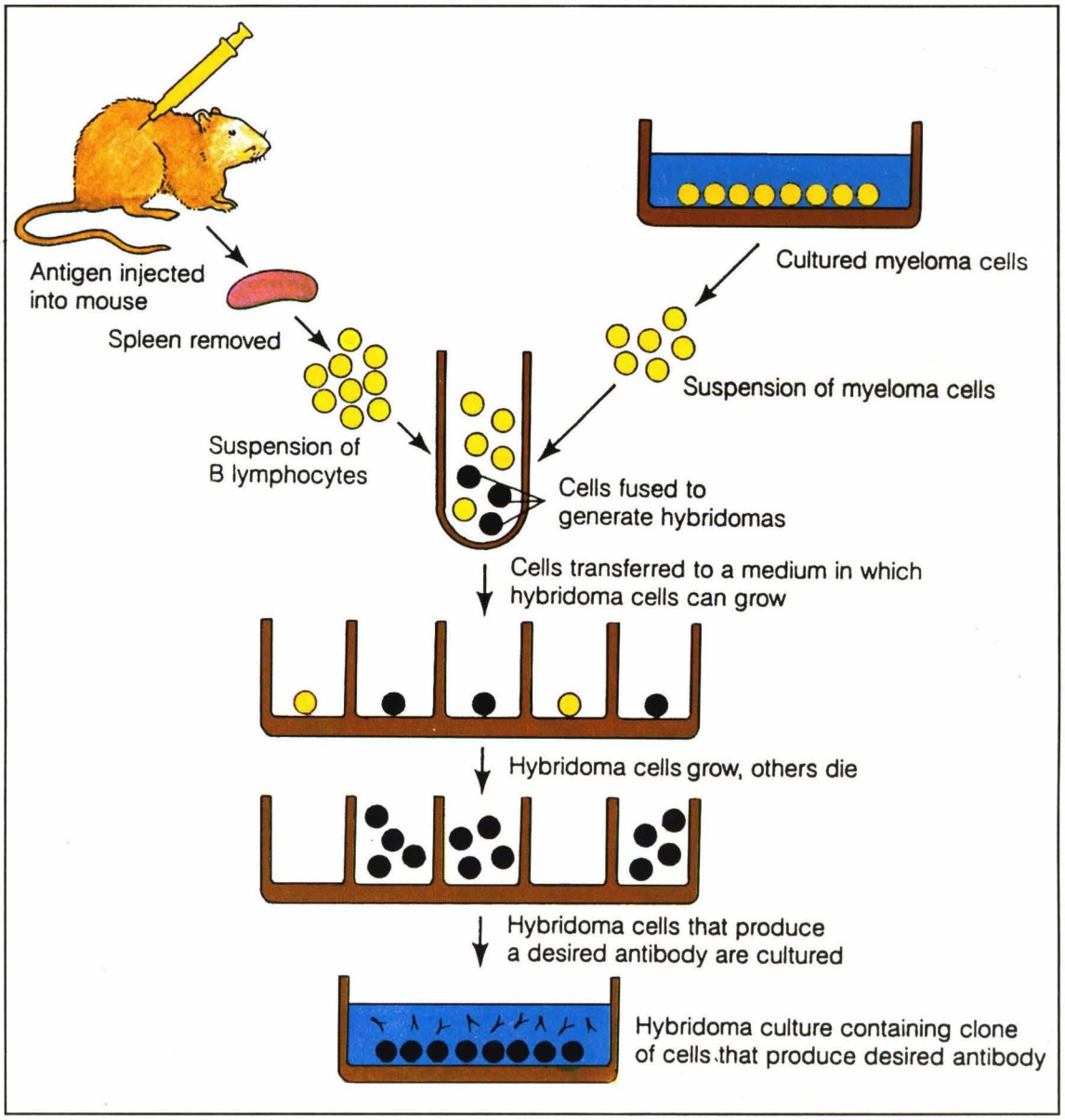
برای افزایش کیفیت و کمیت تولیدات دامی بویژه در مورد گاو، اصلاح نژاد و انتخاب نژادهای برتر با استفاده از تلقیح مصنوعی چند دهه است که رایج شده است.

اما به دو دلیل ۱- تأثیر پایین (حدود ۵۰٪) تلقیح مصنوعی و ۲- زمان طولانی به دست آوردن نسلهای دلخواه، این روش اصلاح نژادی چندان با موفقیت همراه نیست.

برای نیل به این هدف، انتقال جنین یک پیشرفت جدید است.

اولین انتقال جنین موفق در حیوانات در سال ۱۸۹۰ (در خرگوش) انجام شد.

اما از حدود سال ۱۹۷۰ بود که این روش به‌عنوان یک روش عملی برای تسریع و بهبود امر



تولید پادتن مونوکلونال

اصلاح نژاد در حیوانات استفاده شد و از آن زمان نیز این تکنیک تکامل داده شده است.

در یک تعریف ساده، در انتقال جنین از یک حیوان ماده برتر به عنوان دهنده و یک حیوان نر برتر که دارای خصوصیات ژنتیکی مطلوب هستند استفاده می‌شود.

از طریق جفتگیری طبیعی یا تلقیح مصنوعی حیوان ماده انتخاب شده بارور می‌شود. سپس ۵ تا ۷ روز بعد از لقاح، جنینهای تشکیل شده از رحم حیوان ماده خارج می‌شوند که به طور معمول ۴ تا ۱۰ جنین خواهند بود.سپس هر جنین در رحم یک حیوان معمولی (مثلاً گاوهای محلی) که گیرنده خوانده می‌شود کاشته می‌شود.

حیوان گیرنده می‌تواند هر حیوان ماده‌ای (ازهمان نوع دهنده) با دستگاه تولیدمثل سالم باشد.

بنابر این ۴ تا ۱۰ گاو گیرنده معمولی و دارای ارزش ژنتیکی پایین می‌توانند حامل جنینهای دارای ارزش ژنتیکی بسیار بالا و به دست آمده از والدین برگزیده باشند.

به عبارت دیگر به جای این که یک حیوان ماده بسیار با ارزش فقط یک نوزاد در هر سال تولید کند، با این روش می‌تواند ۱۰ تا ۳۰ جنین به وجود آورد، زیرا می‌توان برای هر گاو این عمل را تا ۴ بار در سال تکرار کرد.

برای این منظور حیوان دهنده جنین باید با تجویز یک هورمون جنسی به نام گونادوتروپینها بتواند در هر بار چندین تخمک آزاد کند که آن رااصلاحاً سوپر اوولاسیون می‌نامند.

یکی از تکنیکهای مربوط به انتقال جنین‌شکافتن یا تقسیم جنین است.

اکنون دانشمندان می‌توانند یک جنین را به دو یا چهار قسمت تقسیم کنند که هر قسمت پس از انتقال به رحم یک حیوان ماده توانایی تبدیل شدن به یک جنین کامل را دارد و بدین ترتیب هر ۴ جنین به دست آمده از نظر ژنتیکی کاملاً شبیه هم خواهند بود.

روشهای مختلفی برای شکافتن و تقسیم کردن جنین وجود دارد.

سه روش اصلی در این مورد وجود دارد:

جـدا کـردن بـلاستومرها، تـقسیم مـورولا قـبل از متراکم‌شدن، تقسیم مورولای متراکم و بلاستوسیت.

ایـن اعـمال بـا وسـیلهٔ مـخصوصی کـه اصـطلاحاً مـیکرومانیولاتور یـا وسـیله ریـز دسـتکاری گـفته می‌شود انجام می‌گیرد.

روش جـدا کـردن بـلاستومرها بـر ایـن حـقیقت استوار است که در مراحـل اولیـه تـقسیم، بـلاستومرها به طور محکمی به هم متصل نیستند.

بـــرای در مـــعرض قـرار گـرفتن آنـها ابـتدا زونـاپلوسیدا بـه وسـیلهٔ هـضم آنـزیمی یـا بـه طـور مکانیکی برداشته می‌شود.

سـپس مـی‌توان بـلاستومرها را بـا یک پـیپت از زونا خارج کرد و به وسیلهٔ پیپت از یکدیگر جدا کرد.

بلاستومرها نمی‌توانند در خـارج از زونـاپلوسیدا به رشد خود ادامه دهند و بـنابر ایـن لازم است کـه بـه داخل یک زونا پلوسیدای خالی شده منتقل شوند.

این زونـا را مـی‌توان از آاسیتهای لقـاح نـیافته یـا تخم و جنین دژنره به دست آورد.

همچنین تکنیکهایی برای تـعیین جـنسیت جـنین در هـمان روزهـای اول تشکـیل (و تکـنیکهایی بـرای انتخاب جنسیت جنین) ابداع شده است.

به طوری که بر حسب نیاز، جـنینهای نـر یـا مـاده را در عملیات انتقال جنین انتخاب کرد.

مـی‌توان جـنینها را پس از جـمع‌آوری از حـیوان دهـنده و قـرار دادن در یک مـحلول کشت مـناسب تـا 35^{c}- سرد کـرد و سـپس بـه تـانکرهای مـحتوی ازت مـایع بـا دمـای 198^{c}- انـتقال داد ایـن عـمل بـه نـام نگهداری در انجماد نامیده می‌شود.

بـدین طـریق مـی‌توان جـنینها را در بـانک جـنین برای مدتها و سالها نگهداری کرد.

جنینهای منجمد را مـی‌توان بـه راحـتی از مـحلی به محل دیگر منتقل کرد.

و- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase Chain Reaction) PCR

این روش یک روش ساده بـرای تکـثیر کـپی‌هایی از یک مولکول یا قطعه‌ای پـیدا مـی‌کند، مـی‌توان تـنها در عرض چند ساعت میلیاردها کپی تهیه کرد.

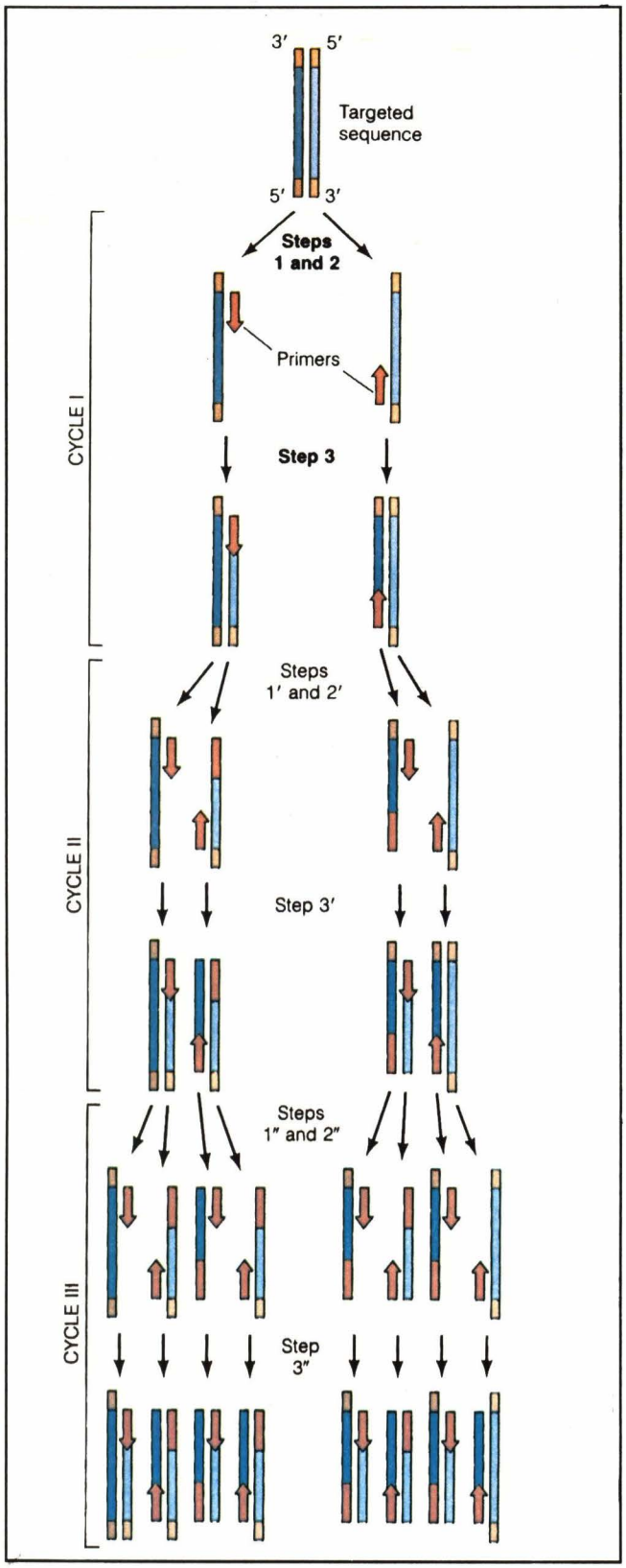
روش PCR بـــه طـــور فـــزاینـده‌ای تـوسط بیولوژیستهای مولکولی به کار می‌رود.

از ایـن طـریق دانشـمندان مـی‌توانـند بـه سـرعت کپی‌های زیادی از یک قطعه DNA (ژن) بـرای انـجام تحقیقات بـه دست آورنـد. کـاری کـه بـه طـرق دیگـر بسیار مشکل است. این قطعه از DNA ممکن است از یک نمونه بافت جانوری، یک رشته مـوی انسـان، یک قطره خون خشک شده از یک صحنه جنایت، بافتهای یک مومیایی یا از یک ماموت ۴۰ هزار ساله منجمد شده در یخ باشد.

این تکنیک در سـال ۱۹۸۳ تـوسط کـری مـولیس در آمریکا طراحی شد. از آن زمـان تـا بـه حـال تـلاش زیادی برای کامل کردن آن انجام شده است.

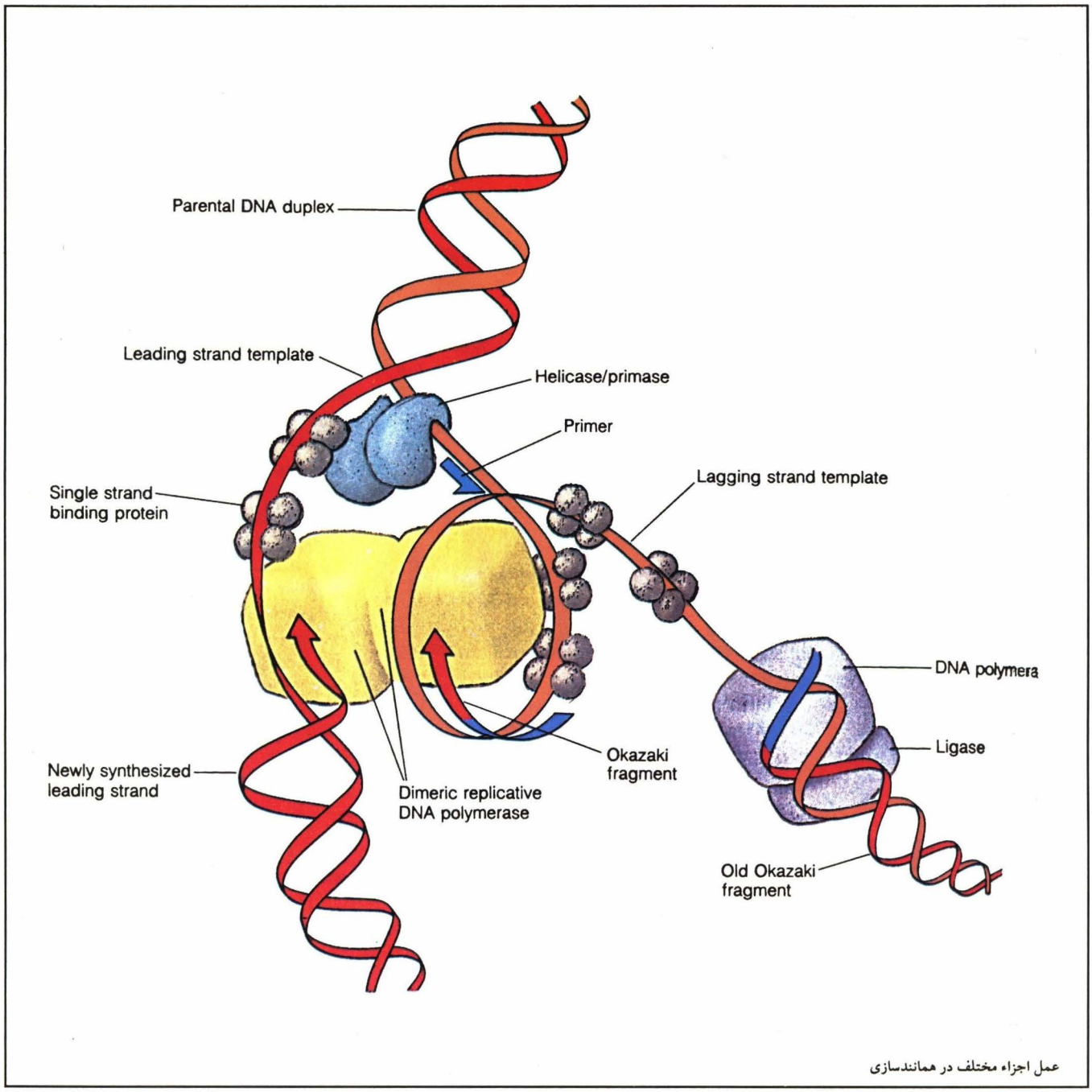
بیش از هـزار مـقاله عـلمی دربـارهٔ تکـنیک PCR نگاشته شده است.

از آنـجا کـه DNA مـانند اثـر انگشت یک تـعیین کننده هویت بـیولوژیک از یک مـوجود است، از ایـن



واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ازدیاد قطعه‌ای از DNA

ش ۲۷/ت ۷۴



عمل اجزاء مختلف در همانندسازی

تکنیک برای تعیین هویت موجودات استفاده می‌شود.

اکنون دانشمندان با استفاده از روش PCR کپی‌های واقعی از DNA به دست آمده از استخوان مومیایی‌های موجود در اهرام مصر درست کرده‌اند.

بدین ترتیب دانشمندان امیدوارند کشفیاتی راجع به خصوصیات انسانهای ۵۰۰۰ سال پیش به دست یابند.

همان طور که گفته شد PCR تکنیکی برای ازدیاد آزمایشگاهی توالی‌های ژنی معین با استفاده از کامل شدن خودبخودی زنجیره‌های DNA است.

استفاده از PCR تا در دسترس قرار گرفتن DNA پلی‌مراز مقاوم بر حرارت محدود بود.

DNA پلی‌مراز سنتز یک رشته DNA را از جهت ۵ به ۳ با استفاده از یک الگوی یک رشته‌ای DNA انجام می‌دهد. اما شروع کار از یک ناحیه ۲ رشته‌ای خواهد بود یعنی از قسمتی به نام Primer یا قسمت جلو دارد. و به این سنتز Primer extension reaction می‌گویند، که اساس تکنیکهای مختلف در تعیین توالی و علامت‌گذاری کردن است.

PCR از همان اصل استفاده می‌کند اما ۲ جلودار (Primer) را به کار می‌گیرد جلودارها طوری برنامه‌ریزی شده‌اند که از هر جلودار سنتز DNA به طرف جلودار دیگری انجام می‌شود.

اجزاء مورد نیاز برای این واکنش ساده هستند و عبارتند از:

دزاکسی نوکلئوتیدها که هم انرژی و هم نوکلئوزیدها را برای سنتز DNA فراهم می‌کنند، DNA پلی‌مراز، جلودارها (Primer),DNA الگو، و بافر حاوی منیزیم.

سنتز می‌تواند با حرارت دادن DNAها برای جدا کردن دو رشته هر DNA و متعاقباً سرد شدن برای کامل شدن رشته‌های جدا توسط آغازگرها و دو رشته‌ای شدن آنها به طور مرتب تکرار شود.

با هر بار گرم کردن و سرد کردن میزان DNA ناحیه مجاور هر Primer تقریباً به طور تصاعدی افزایش می‌یابد.

در حالی که توالی‌های دیگر فقط به صورت خطی افزایش می‌یابند.

بنابر این بعد از چندین دور، بیشتر محصول واکنش، آن قسمتی از DNA که در کنار Primerها قرار گرفته و خود Primer خواهد بود.

دورهٔ گرم کردن و سرد کردن می‌تواند تکرار شود و میزان DNA به طور تصاعدی زیاد خواهد شد تا هنگامی که یکی از مواد واکنش تمام شود یا آنزیم موجود دیگر قادر به سنتز به قدر کافی سریع DNA نباشد.

بنابر این یا افزایش و تکثیر متوقف می‌شود و یا بعد از چند سیکل محصولات غیرمشخصی تولید می‌کند.

تعداد دوره‌های مورد نیاز برای ازدیاد مناسب متغیر است و بستگی به میزان ماده در شروع کار و کارایی هر مرحله از تکثیر دارد.

معمولاً ۲۵ تا ۳۵ مرحله برای تولید ۱۰۰ng تا ۱μg DNA از یک کپی منفرد توالی‌های انسانی تشکیل شده از ۵۰ng DNA ژنومیک کافی است.

یک مرحله انکوباسیون نهایی معمولاً در درجهٔ حرارت 27^{c} منجر به ایجاد مولکولهای دو رشته‌ای کامل از محصولات تازه سنتز شده می‌شود.

مهمترین مسئله PCR مقاومت و پایداری ترکیبات دخالت‌کننده در واکنش در مقابل حرارت دادنهای مکرر است.

در ابتدا از Klenow پلی‌مراز استفاده می‌شد که به علت حساسیت در برابر حرارت می‌بایست بعد از هر مرحله حرارت دهی مجدد به محیط اضافه می‌شد.

اما امروز این ماده با پلی‌مراز Tag که مقاوم به حرارت است جایگزین شده است.

استفاده از آنزیمهای مقاوم به حرارت دو فایده مهم دارند. اول عدم احتیاط به دوباره اضافه کردن آن آنزیم بعد از حرارت دهی که در نتیجه باعث ساده‌تر شدن کار شده و دوم آنکه آنزیم در حرارتهای بالاتر پایدار است، جایی که پیوستن و چسبیدن جلودارهای الیگو نوکلئوتیدی بسیار اختصاصی‌تر است و سنتز DNA بسیار سریعتر است بنابر این انجام PCR با استفاده از DNA پلی‌مراز پایدار در حرارت از نظر تکنیکی آسانتر است و محصولات بسیار اختصاصی‌تری می‌توانند تولید شود.

محصول به دست آمده از PCR در کنار شاهد به وسیلهٔ الکتروفورز بر روی ژل رانده می‌شود که بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیم بروماید، به وسیلهٔ لامپ ماوراء بنفش قابل مشاهده است که با مقایسه با نمونه شاهد خوانده می‌شود.

می‌توان بعد از الکترو فورز ما حصل را از روی ژل به روی غشاء نایلونی یا نیترو سلولزی منتقل کرد که از جهت نگهداری مناسب‌تر و پایدارتر است.

در دهه ۱۹۹۰ احتمالاً این تکنیک به طور قابل ملاحظه‌ای تکامل خواهد یافت.

این تکنیک احتمالاً در تشخیص بیماریها و یافتن علل بیماریهای ژنتیکی غیرعادی و کمیاب بسیار مفید خواهد بود.

PCR می‌تواند به طور موفقیت‌آمیزی برای پیش‌بینی بیماریها ماهها یا سالها قبل از پیدایش اولین علایم آن بیماری به کار رود (بخصوص در بیماریهای ژنتیکی).

در حقیقت با استفاده از این تکنیک می‌توان به محض تولد یک نوزاد بیماریهایی را که این نوزاد احتمالاً در آینده مبتلا خواهد شد پیش‌بینی کرد. در خاتمه روند همانندسازی، DNA شرح داده می‌شود.

این روند را می‌توان به سه مرحله تقسیم کرد.

۱- مرحله شروع (Initiation)، آنزیمهای شرکت‌کننده در این عمل DNA پلیمرازها هستند.

برای شروع سنتز، وجود یک انتهای OH -۳ لازم است زیرا DNA پلی‌مرازهای شناخته شده فقط از یک ترکیب بازی موجود انتهای ´۳ آن را طولانی می‌کنند.

به علت آنکه DNA پلی‌مراز به صورت فعال وجود ندارد، ابتدا در طول DNA قالب توسط یک RNA پلی‌مراز مخصوص به نام پریماز یک قطعه DNA به عنوان جلودار (پیش‌آهنگ Primer) ساخته می‌شود، سپس DNA پلی‌مراز انتهای ۳ قطعه جلودار را طولانی می‌کند.

جلودار در پروکاریوتها ۵۰ تا ۱۰۰ و در پستانداران ۹-۱۰ نوکلئوتید دارد.

این قطعه پس از شروع همانندسازی تجزیه می‌گردد.

محل‌های خالی به وجود آمده، توسط واکنشهای ترمیمی DNA پلی‌مراز نوع B در یوکاریوتها و پلی‌مراز I در پروکاریوتها پر می‌شود.

۲- مرحلهٔ طویل شدن DNA: ازدیاد طول زنجیره جدید DNA از جهت ´۵ به ´۳ است. و بنابر این جهت خواندن رشته مدل از جهت ´۳ به ´۵ است.

بنابر این آنزیم DNA پلی‌مراز نمی‌تواند در یک زمان دو رشته موازی و معکوس را سنتز کند.

چون قطبین دو رشته متفاوت است همانند سازی فقط می‌تواند در یکی از آنها (رشته پیش‌آهنگ) به طور پیوسته در جهت ´۵-´۳ (رشته ثابت) ادامه یابد.

در رشتهٔ دیگر (رشته تعقیب کننده) DNA پلی‌مرازها به صورت منقطع و در جهت عکس در مقایسه با رشته پیش‌آهنگ عمل می‌کنند. قطعات به وجود آمده توسط آنزیمها به نام لیگاز به یکدیگر متصل شده و سپس زنجیره پیوسته‌ای ایجاد می‌گردد (این قطعات به نام قطعات اوکازاکی نامیده می‌شوند).

۳- مرحلهٔ پایانی: با جدا شدن قطعات DNA جلودار و اتصال قطعات اوکازاکی مشخص می‌گردد.

در این عمل DNA پلی‌مراز I و لیگاز شرکت دارند.

پاورقی

1. Restriction enzyme
2. Replication
3. Transcription
4. Codon
5. Recombinant DNA
6. Ligase
7. Protropin
8. Dwarfism
9. Tissue plasminogen activator
10. DNA probes
11. Cell fusion
12. Poly ethylene glycol
13. Monoclonal antibodies
14. DNA Shooting یا Microinjection
15. Retroviruses
16. Mono layer
17. Site specific mutagenesis
18. Embryo transfer

منابع مورد استفاده

۱- بقوزیان، ژرژ، ایمونولوژی نوین

۲- نورزاد، غلامرضا بیولوژی سلولی و بیولوژی مولکولی (۱۳۷۰) انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد

3. Hartl, Freifelder, 1988, Snyder Basic Genetics.

4. Jain S.C., 1992, An introduction to biotechnology.

5. Babiuk, Lorne A., 1989, Animal biotechnology: Comprehensive biotechnology pergamon press.

6. Yang X. et al, 1992, Micromaipulation of mammalian embryo, Theriogenology, pp 315-328.

7. Brem, G. Wagner H.G., 1991, Transgenic livestook, World Animal Review, (67) pp 2-10.

8. Mathews C.K., Van Hold K.E., 1991, Biochemistry.

9. Mcpherson M.J. et al, 1992, PCR, A practial approach, IRL Press.

●