بسم الله الرحمن الرحيم

زیست دوازدهم فصل ۷ (فناوری های نوین زیستی)

گفتار اول (زیست فناوری و مهندسی ژنتیک)

به سفارش معاونت علمی ریاست جمهوری

(ستاد توسعه ی زیست فناوری)

گروه زیست فناوری پژوهشسرای دانش آموزی شهید مطهری اسلامشهر

زمستان۹۹

فهرست مطالب

- زیست فناوری چیست؟
- تاریخچه ی زیست فناوری
- شاخه های زیست فناوری
- مهندسی ژنتیک
- مراحل مهندسی ژنتیک
- کاربرد زیست فناوری (زراعت مولکولی)

فصل ۷

فناوری‌های نوین زیستی

پلاستیک های قابل تجزیه راهکار مناسبی برای پیشگیری از مصرف بی رویهٔ پلاستیک های غیرقابل تجزیه است. امروزه به کمک روش های زیست فناوری، تولید پلاستیک های قابل تجزیه با صرف هزینهٔ کمتر ممکن شده است. این کار با وارد کردن ژن های تولید کنندهٔ بسیاری از این نوع مواد از باکتری به گیاه امکان پذیر است.

چگونه می توان از فناوری های زیستی برای بهبود زندگی انسان و حفظ محیط زیست استفاده کرد؟

آیا می توان با استفاده از آنها همهٔ مشکلات بشر را حل کرد؟

انسان از نظر اخلاقی تا چه حد می تواند این فناوری ها را به خدمت بگیرد؟

زیست فناوری و مهندسی ژنتیک

- جهش در یک ژن و درنتیجه، تغییر در محصول آن می تواند به بروز بیماری منجر شود. اختلال در عملکرد و مقدار عوامل مؤثر در انعقاد خون از این دسته هستند. با توجه به افزایش افراد نیازمند به این ترکیبات، تأمین نیاز دارویی آنها با مشکل مواجه می شود.
- امروزه استفاده از روش های زیست فناوری و مهندسی ژنتیک تحولات مهمی در زمینهٔ تولید چنین فراورده هایی فراهم آورده است.
- تا چندی پیش، انتقال ژن های انسان به داخل یاخته های سایر موجودات زنده و یا استفاده از باکتری ها برای ساختن پروتئین های انسانی غیرقابل تصور بود اما اکنون روش های لازم برای تحقق آن توسعه یافته و کاربرد فراوانی پیدا کرده است.
- آیا می دانید چگونه می توان از باکتری برای ساختن یک پروتئین انسانی استفاده کرد؟ فرض کنید می خواهیم باکتری را برای ساختن هورمون رشد انسانی تغییر دهیم، پس ضرورت دارد تمام احتیاجات این فرایند را در یاختهٔ باکتری فراهم کنیم.

زیست فناوری چیست؟

- به طورکلی به هرگونه فعالیت هوشمندانه آدمی در تولید و بهبود محصولات گوناگون با استفاده از موجود زنده، زیست فناوری گویند.
- زیست فناوری قلمروی بسیار گسترده دارد و روش هایی مانند مهندسی ژنتیک، مهندسی پروتئین و بافت را دربرمی گیرد.
- زیست فناوری از گرایش های علمی متعددی مانند علوم زیستی، فیزیک، ریاضیات و علوم مهندسی بهره می برد. کاربردهای فراوان زیست فناوری، آن را به عنوان نشانهٔ پیشرفت کشورها در قرن حاضر و به یکی از ابزارهای مهم برای تأمین نیازهای متنوع تبدیل کرده است.

تاریخچه ی زیست فناوری

- زیست فناوری سنتی: تولید محصولات تخمیری مانند سرکه، نان و فرآورده های لبنی با استفاده از فرایندهای زیستی.
- زیست فناوری کلاسیک: تولید موادی مانند مواد غذایی، پادزیست و آنزیم با استفاده از روش های تخمیر و کشت میکروارگانیسم (ریزاندامگان).
- زیست فناوری نوین: انتقال ژن از یک میکروارگانیسم به میکروارگانیسم دیگر به منظور تغییر و اصلاح خصوصیات میکروارگانیسم برای تولید ترکیبات جدید با مقادیر بیشتر و کارایی بالاتر.

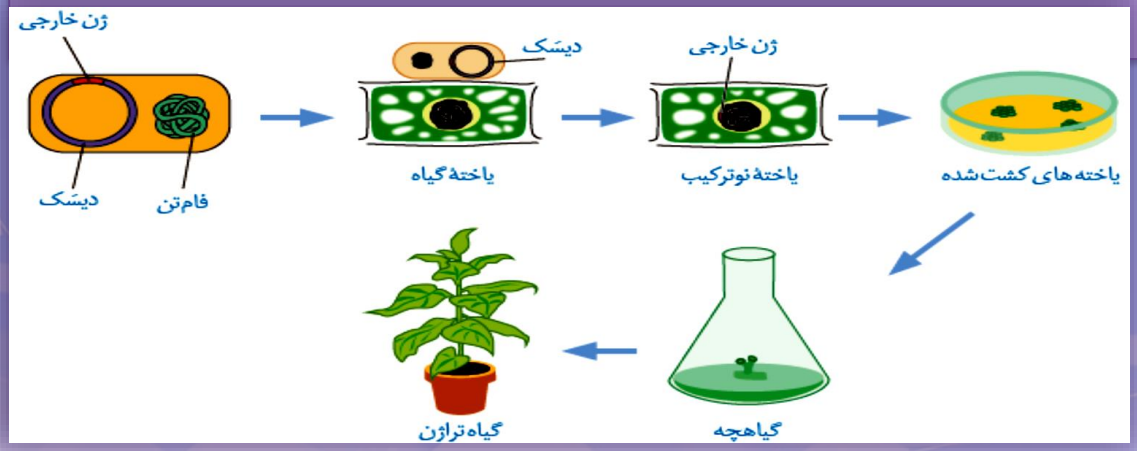
شاخه های زیست فناوری

- سبز (کشاورزی): بهره برداری از گیاهان دست ورزی شده ژنتیکی
- قرمز (پزشکی): بهره برداری از سلول های دست ورزی شده برای درمان، تولید دارو و مسائل قضایی و پزشکی قانونی
- خاکستری (محیط زیست): جلوگیری و رفع مشکلات محیط زیست
- سفید (صنعتی): استفاده از موجودات زنده در مسائل صنعتی مانند ساخت مواد شیمیایی
- آبی (دریایی): بهره وری از فرایندهای دریایی و موجودات آبزی

مهندسی ژنتیک

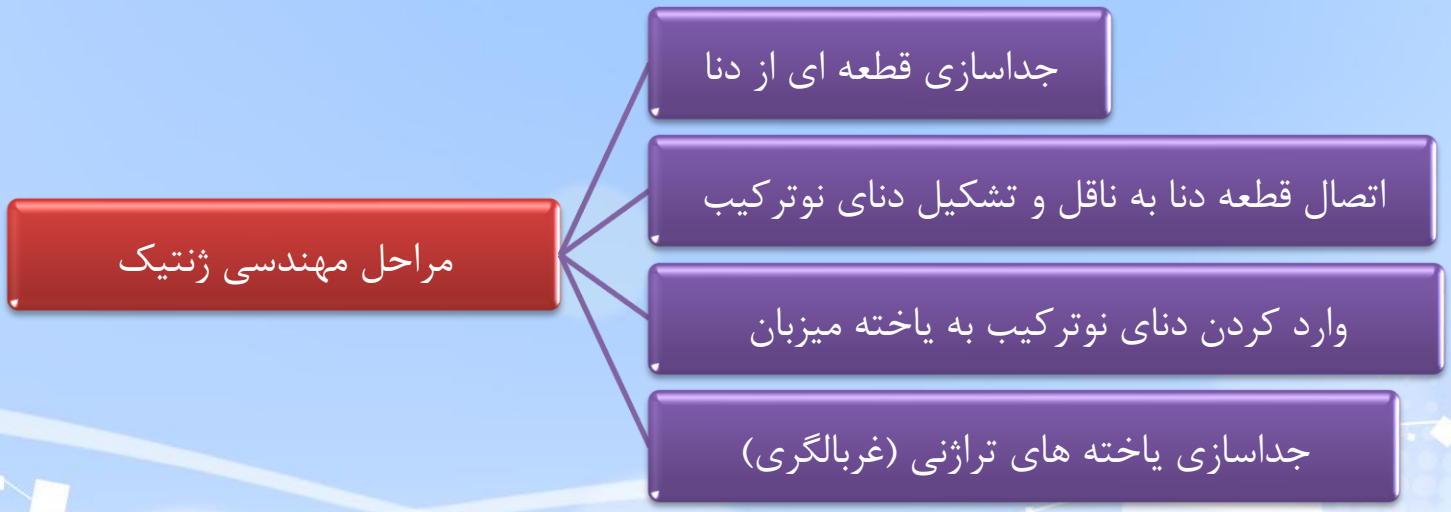
- در مهندسی ژنتیک قطعه ای از دنای یک یاخته توسط ناقل (وِکتور) به یاخته ای دیگر انتقال می یابد در این حالت، یاخته دریافت کننده قطعه دنا دچار دست ورزی ژنتیکی و دارای صفت جدید میشود.
- به جانداری که از طریق مهندسی ژنتیک دارای ترکیب جدیدی از مواد ژنتیکی میشود جاندار تغییر یافته ژنتیکی (Genetically Modified Organism) یا تراژنی (Transgenic Organism) می گویند.
- مراحل تولید گیاهان زراعی تراژنی:

1. تعیین صفات مطلوب موردنظر
2. استخراج ژنِ یا ژنهای مربوط به صفتِ مطلوب
3. آماده سازی و انتقال ژن به گیاه
4. تولید گیاه تراژنی
5. اثبات بی خطر بودن برای انسان و محیط زیست از طریق بررسی دقیق ایمنی زیستی
6. تکثیر و کشت گیاه تراژنی



مراحل مهندسی ژنتیک

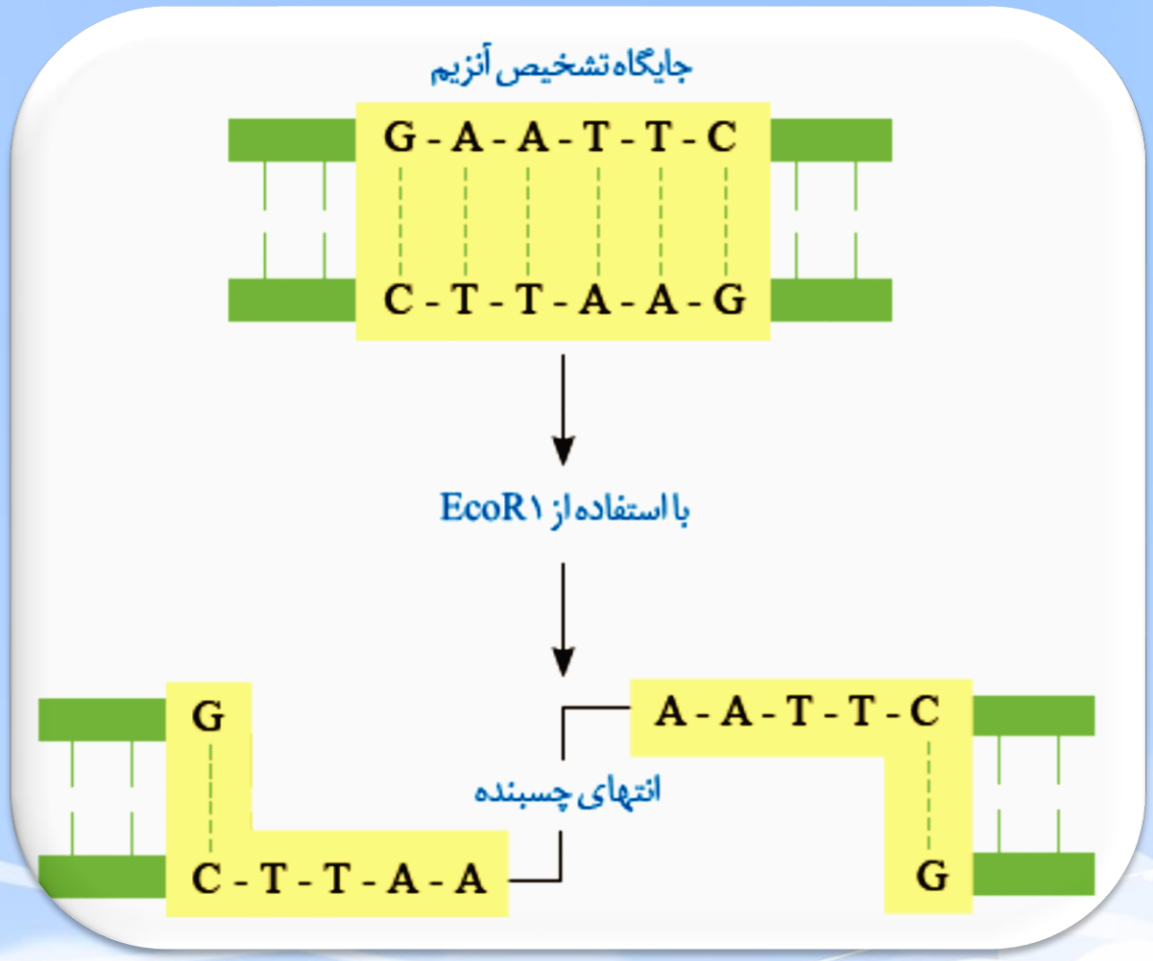
- یکی از اهداف مهندسی ژنتیک تولید انبوه ژن و فرآورده های آن است. این عمل با روش همسانه سازی دنا (DNA Cloning) انجام میشود.
- جداسازی یک یا چند ژن و تکثیر آنها را همسانه سازی دنا میگویند.
- در همسانه سازی دنا ماده وراثتی با ابزارهای مختلفی در خارج از یاخته تهیه و بوسیله یک ناقل همسانه سازی (Cloning Vector) به درون ژنوم میزبان منتقل میشود.
- روش دست ورزی ژنی و تولید جاندار تراژنی ابتدا با باکتری شروع شد اما بعدا گیاهان و جانوران تراژنی نیز تولید شدند.



۱- جداسازی قطعه ای از دنا (برش DNA)

- این کار با آنزیم محدودکننده (Restriction Enzyme) یا برش دهنده انجام میشود.
- آنزیم های محدود کننده بطور طبیعی در باکتری ها وجود دارند و جزئی از سیستم دفاعی آنها محسوب میشوند. آنزیم EcoRI میتواند توالی دورشته ای $\frac{GAATTC}{CTTAAG}$ را شناسایی کرده و برش دهد.
- این آنزیم پیوند فسفودی استر بین نوکلئوتید گوانین دار و آدنین دار هر دو رشته را برش می زند. در نتیجه، انتهایی از مولکول دنا ایجاد میشود که یک رشته ی آن بلندتر از رشته مقابل است و به آن انتهای چسبنده می‌گویند.
- برای اینکه در یک برش انتهای چسبنده ایجاد شود باید علاوه بر پیوند فسفو دی استر پیوند هیدروژنی نیز شکسته شود. با عمل هر بار آنزیم روی جایگاه تشخیص آنزیم دو پیوند فسفو دی استر و هشت پیوند هیدروژنی شکسته میشود.
- برای اینکه یک ژن از وسط یک دنا جدا شود، باید دو عدد برش (یکی قبل از ژن و یکی بعد از ژن) توسط آنزیم برش دهنده انجام شود. اگر این آنزیم EcoRI باشد مجموعا در دوجایگاه برش، چهار عدد پیوند فسفو دی استر برای خارج کردن ژن از داخل دنا شکسته می شود.

برش مولکول دنا توسط آنزیم EcoRI

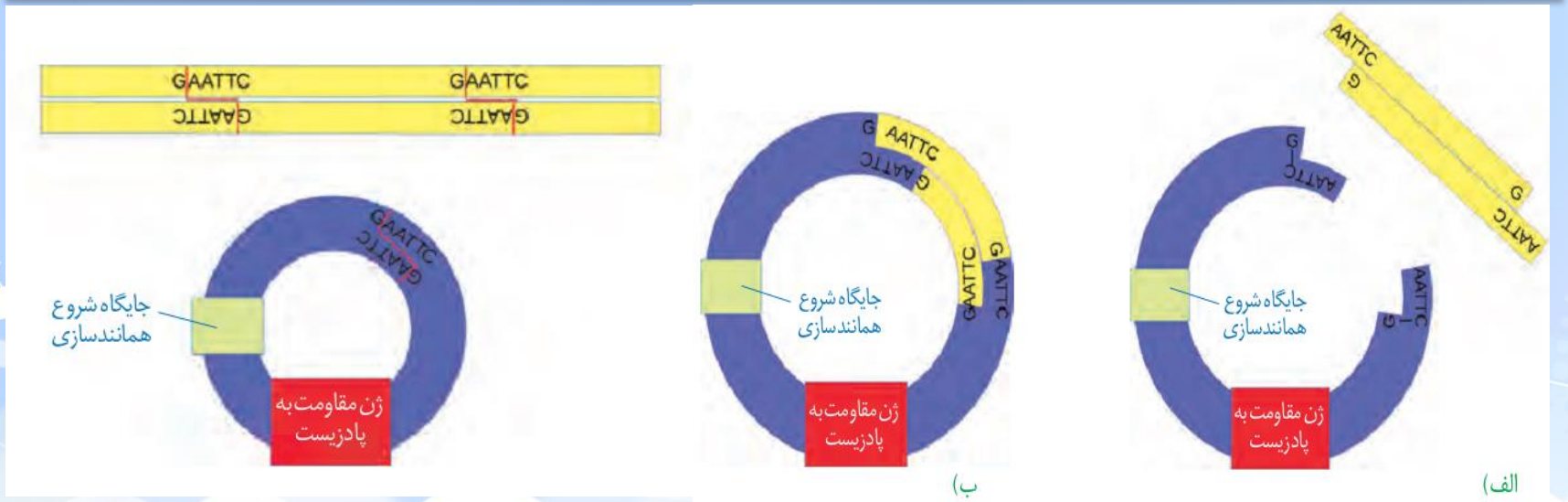


۲- اتصال قطعه دنا به ناقل و تشکیل دنای نوترکیب (Recombinant DNA)

- ناقل توالی دنایی است که در خارج از کروموزوم اصلی باکتری قرار دارد و می تواند بصورت مستقل از آن تکثیر شود. یکی از این مولکول ها دیسک (پلازمید) حلقوی باکتری است.
- دیسک یک مولکول دنای دو رشته ای خارج کروموزومی است که معمولا درون باکتری ها و بعضی قارچ ها مثل مخمرها وجود دارد و میتواند مستقل از ژنوم میزبان همانندسازی کند.
- دیسک ها را کروموزوم های کمکی نیز می نامند چون حاوی ژن هایی هستند که در کروموزوم اصلی باکتری وجود ندارند.
- با هر بار همانندسازی دیسک، دنای مورد نظر موجود در آن نیز همانندسازی میشود.
- دیسک ها دارای یک جایگاه آغاز همانندسازی می باشند و هنگام همانندسازی دو عدد دوراهی همانندسازی تشکیل می‌دهند.
- در مهندسی ژنتیک بهتر است از دیسکی استفاده شود که دارای یک جایگاه برش برای آنزیم محدودکننده باشد، زیرا فقط میخواهیم دیسک باز شود و از حالت حلقوی بصورت خطی درآید تا بتوانیم ژن خارجی را در میان آن قرار دهیم.

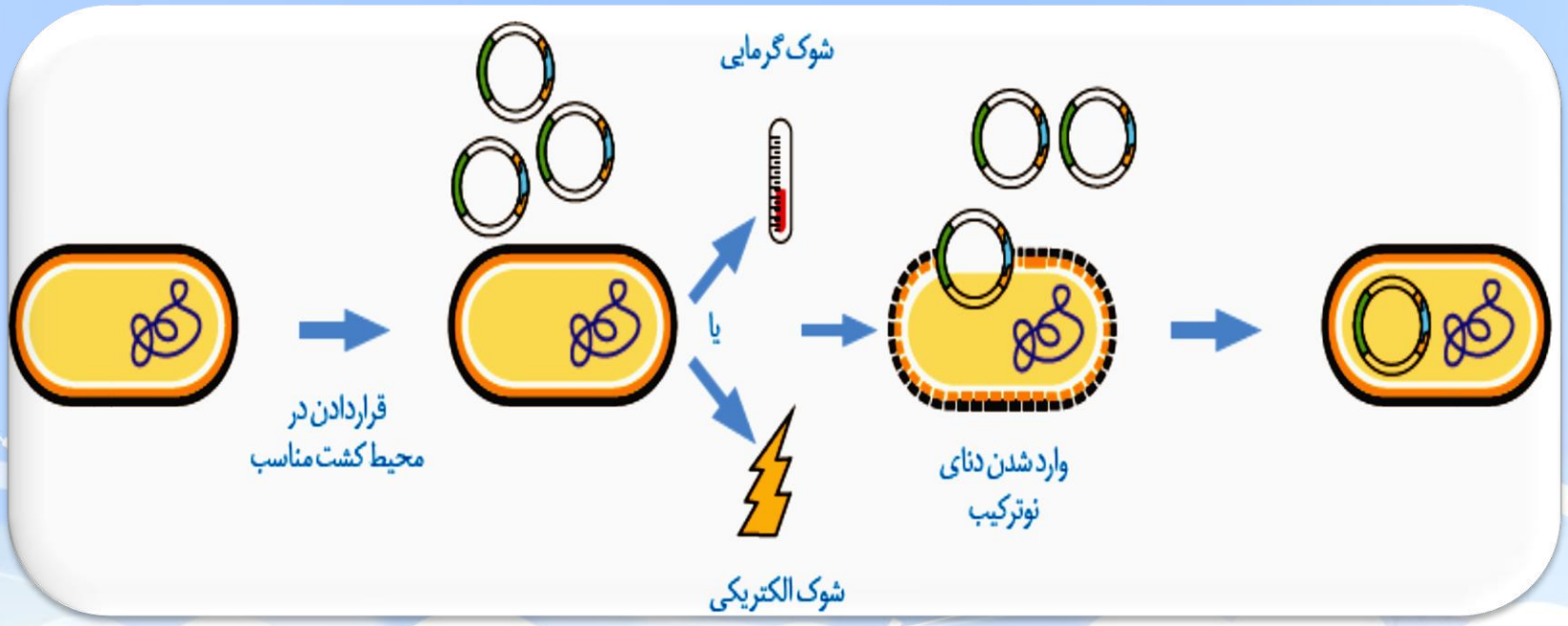
۲- اتصال قطعه دنا به ناقل و تشکیل دنای نوترکیب (Recombinant DNA)

- برش دیسک با آنزیم آن را به یک دنای خطی تبدیل میکند که دارای دو انتهای چسبنده است. همچنین قطعه دنای خارجی نیز دو انتهای چسبنده دارد. برای اتصال دنای مورد نظر به دیسک از آنزیم لیگاز (اتصال دهنده) استفاده میشود. این آنزیم پیوند فسفودی استر بین دو انتهای مکمل را ایجاد میکند.
- برای خارج کردن ژن مورد نظر از داخل دنای اصلی ابتدا پیوندهای فسفودی استر برش داده میشود و سپس پیوندهای هیدروژنی میشکند، اما برای تشکیل دنای نوترکیب ابتدا پیوند هیدروژنی و سپس پیوندهای فسفودی استر تشکیل میشود.
- به مجموعه دنای ناقل و ژن جاگذاری شده در آن، دنای نوترکیب گفته میشود.



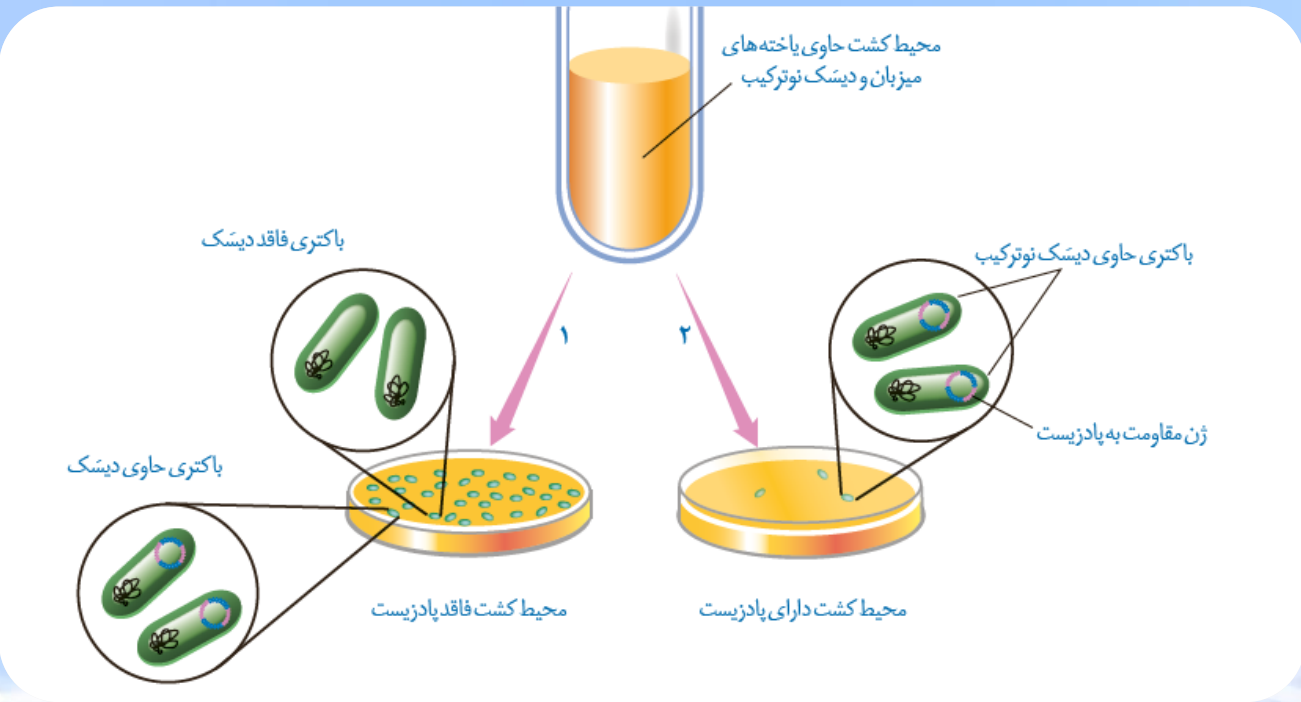
۳- وارد کردن دنای نوترکیب به یاخته میزبان

- در ابتدا دیواره باکتری با روش های مثل شوک الکتریکی، شوک حرارتی و مواد شمیایی، نفوذپذیر میشود و سپس یاخته میزبان به دنای نوترکیب آلوده میشود.
- همه ی یاخته های میزبان آلوده شده ، دنای نوترکیب را دریافت نمی کنند بنابراین لازم است در مرحله آخر باکتری دریافت کننده دنای نوترکیب را از باکتری فاقد آن تفکیک کرد.



۴- جداسازی یاخته های تراژنی (غربالگری)

- یکی از این روش ها استفاده از دیسکی است که دارای ژن مقاومت به پادزیستی مانند آمپی سیلین است. اگر باکتری، دنای نوترکیب را دریافت کرده باشد در محیط حاوی پادزیست رشد می کند. باکتری های فاقد دنای نوترکیب به دلیل حساسیت به پادزیست در چنین محیطی از بین میروند.



زراعت مولکولی (Molecular Farming)

- زراعت مولکولی یک سیستم ارزان برای تولید پروتئینهای نوترکیب (شامل پروتئینها ی صنعتی، دارویی و غیره) از طریق گیاهان میباشد. توانایی گیاهان برای بیان ژنهای انسانی در سال ۱۹۸۶به اثبات رسید و اولین پروتئین دارویی تولید شده در گیاهان هورمون رشد انسانی بود. چند سال بعد پروتئین نوترکیب آلبومین سرم انسانی در گیاهان ترایخته تولید شد به علاوه، پیشرفت مهم دیگری با بیان موفق آنتی بادی فعال در گیاهان در سال۱۹۸۹حاصل شد با اینحال، نخستین پروتئین نوترکیب با هدف تجاری (آویدین) در سال ۱۹۹۷در ذرت تراریخته تولید گردید این دستاوردها نشان داد که گیاهان میتوانند به بیوراکتورهای ارزشمندی برای تولید پروتئینهای نوترکیب در مقیاس بالا تبدیل شوند.

انواع سیستم های بیانی

سیستمهای بارز سازی	مخمر	باکتری	ویروسهای گیاهی	گیاهان تراریخته	کشت سلولهای جانوری	جانوران تراریخته
هزینه نگهداری	ارزان	ارزان	ارزان	ارزان	گران	گران
نوع ذخیره	۲- درجه سانتی گراد	۲- درجه سانتی گراد	۲- درجه سانتی گراد	درجه حرارت اتاق	کشت باید زیر گاز نیتروژن نگهداری شود	مختلف
محدودیت اندازه ژنی(پروتئین)	ناشناخته	ناشناخته	محدود	بدون محدودیت	محدود	محدود
هزینه تولید	متوسط	متوسط	پائین	پائین	بالا	بالا
بازدهی پروتئین	زیاد	متوسط	بسیار زیاد	زیاد	متوسط تا زیاد	زیاد
ریسک درمانی	ناشناخته	بله	ناشناخته	ناشناخته	بله	بله

برخی از پروتئین های نوترکیب تولید شده در گیاه

پروتئین نوترکیب Recombinant protein	کاربرد Application	گیاه میزبان Host plant
واکسن H5N1	واکسن آنفلوانزا H5N1	توتون
واکسن طیور	واکسن کوکسیدیوز طیور	کلزا
آنتی‌بادی CaroRX	درمان پوسیدگی دندان	توتون
آنتی‌بادی DoxoRX	عوارض جانبی درمان سرطان	توتون
آنتی‌بادی RhinoRX	جلوگیری از سرماخوردگی	توتون
آنتی‌بادی‌های Fv	درمان لنفوم غیر هوچکین	توتون
آنتی‌بادی علیه هپاتیت B	تخلیص واکسن	توتون
آنتی‌بادی HIV	واکسن HIV	توتون
آنتی‌بادی Hu-E16	واکسن ویروس نیل غربی	توتون
آنتی‌بادی ZMapp	درمان بیماری ویروس ابولا	توتون
Elelyso	درمان بیماری گوچر	هویج
آلفا گالاکتوزیداز	درمان بیماری فابری	توتون
مریسپاز	درمان سیستیک فیبروز	ذرت
اینترفرون آلفا	درمان هپاتیت B و C	عدس آبی
داروی فیبرینولیتیک	درمان لخته خون	عدس آبی
آپولیپوپروتئین	درمان بیماری قلبی–عروقی	گلرنگ
انسولین	درمان دیابت	گلرنگ
فاکتورهای رشد	مکمل محیط کشت سلولی	جو

سیستم های بیانی مبتنی بر گیاه

- چهار سیستم بیانی عمده مبتنی بر گیاه برای تولید پروتئینهای نوترکیب وجود دارد که هرسیستم ویژگیهای خاص خود را دارد. دردسترس بودن سیستمهای بیانی مختلف مبتنی بر گیاه به محققان اجازه میدهد تا یک سیستم موثر برای تولید یک پروتئین هدف ویژه را به راحتی انتخاب کنند.

- ❑ گیاهان تراریخته ی هسته ای
- ❑ گیاهان تراریخته ی کلروپلاستی
- ❑ بیان موقت ژن هدف
- ❑ کشت سوسپانسیون سلولی گیاه

گیاهان تراریخته ای هسته ای

- این گروه، گیاهانی هستند که به طورژنتیکی با انتقال ژنهای خارجی به ژنوم هسته آنها از طریق فناوری DNA نوترکیب تراریخته شده اند. تاکنون گیاهان تراریخته هسته ای رایجترین سیستم بیانی برای تولید پروتئین های با اهمیت دارویی بوده اند. یکی از مزایای اصلی استفاده از این گیاهان به عنوان بیوراکتور، انعطاف پذیری و کارایی در افزایش مقیاس تولید پروتئینهای نوترکیب است؛ چرا که میتواند به آسانی با کاشت چندین هکتار از محصولات زیست فناوری حاصل گردد.
- مزیت اصلی دیگر این گیاهان، تولید طولانی مدت پروتئین نوترکیب است؛ به این دلیل که ژنهای خارجی به طور پایدار درون ژنوم هسته گیاه میزبان درج میشوند.

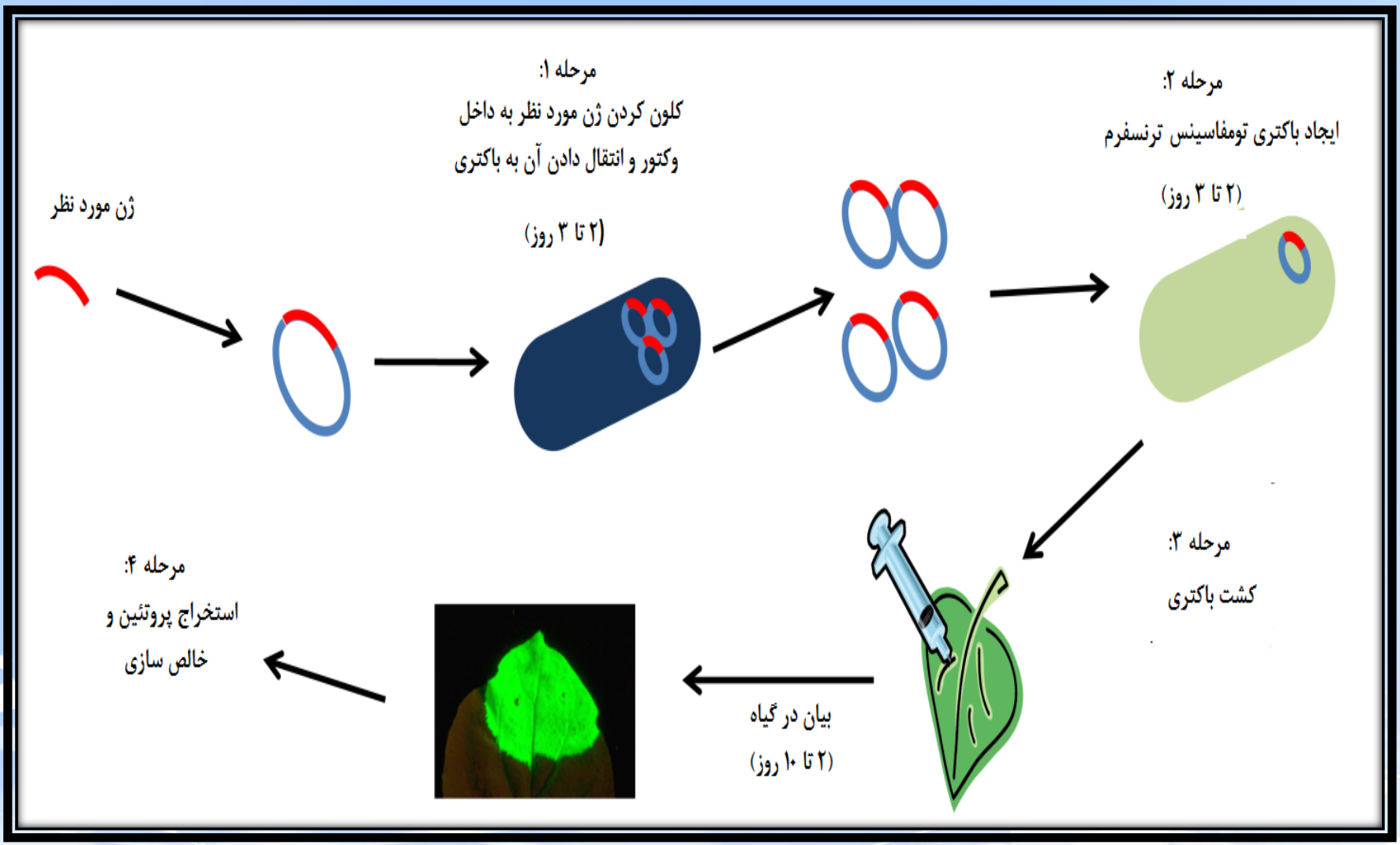
گیاهان تراریخته ی کلروپلاستی

- تراریختی کلروپلاستی یک سیستم بیانی پایدار و جایگزینی مفید برا تراریختی هسته ای جهت تولید پروتئینهای دارویی در گیاهان است.
- مزیت کلیدی تراریختی کلروپلاست در مقایسه با تراریختی هسته ای تجمع فرآورده های پروتئین در سطوح بالا داخل کلروپلاست میباشد. ژنوم پلاستی بسیار پلی پلوئید است و یک سلول برگ توتون حاوی ۱۰۰ کلروپلاست و هر کلروپلاست حاوی بیش از ۱۰۰ نسخه ژنوم پلاستی میباشد. بنابراین ژن خارجی معرفی شده به سلول هدف میتواند تا بیشتر از ۱۰۰۰ نسخه در هر سلول تکثیر شده و منجر به سطوح بالای فرآورده های پروتئین نوترکیب شود.

بیان موقت ژن هدف

- سیستم بیان موقت سریعترین و راحت ترین سیستم در تولید پروتئینهای نوترکیب بوده و میتواند مقادیر قابل توجهی از پروتئین نوترکیب را در مدت زمان اندک تولید نماید.
- در مقایسه با سیستم بیان دائم مزایایی دارد از جمله: بیان موقت وابسته به درج کروموزومی ژنهای خارجی نیست و بنابراین بیان آن تحت تاثیر اثرات مکانی که اغلب در گیاهان تراریخته هسته ای رخ میدهد، قرار نمیگیرد.
- تولید پروتئین نوترکیب آسانتر و ارزانتر از سایر سیستمهای تولیدی میباشد، مقادیر مفیدی از پروتئینهای هدف میتواند در عرض چند روز یا هفته تولید شود.
- سیستم بیان موقت بر اساس رو اگرواینفیلتراسیون است.

روش اگرو اینفیلتراسیون



داروهای زیستی تولید شده به روش بیان موقت

پروتئین نوترکیب Recombinant protein	کاربرد Application	ناقل بیانی Expression vector
واکسن ایدیوتایپ NHL	درمان لنفوم غیر هوچکین	سیستم بیانی Geneware
واکسن ایدیوتایپ NHL	درمان لنفوم غیر هوچکین	سیستم بیانی magnICON
آنتی‌بادی MB-003	درمان بیماری ویروس ابولا	سیستم بیانی magnICON
آنتی‌بادی ZMapp	درمان بیماری ویروس ابولا	سیستم بیانی magnICON
واکسن آنفلوانزا H5N1	درمان آنفلوانزای مرغی	سیستم بیانی Proficia
واکسن چندگانه آنفلوانزا B	درمان آنفلوانزای H1N1، H3N2 و	سیستم بیانی Proficia
واکسن HAI1	درمان آنفلوانزای مرغی	ناقل بیانی مشتق از ویروس TMV
واکسن HAC1	درمان آنفلوانزای خوکی	ناقل بیانی مشتق از ویروس TMV

کشت سوسپانسیون سلولی گیاه

- کشت سوسپانسیون سلولی گیاه یکی دیگر از سیستمهای تولید پروتئینهای دارویی است. این سیستم تولیدی علاوه بر مزیتهای سیستم گیاه کامل از قبیل: ایمنی تولید، تغییرات پس از ترجمه و توانایی ساخت پروتئینهای با بسته بندی صحیح، حائز برخی از مزایای کشتهای سلول حیوانی و میکروبی نیز میباشد. سلولهای گیاهی میتوانند مشابه با باکتریها در محیطهای مصنوعی ساده با استفاده از بیوراکتورهای سنتی رشد کنند.
- عملکرد پایین پروتئین نوترکیب و ناپایداری ژنتیکی از محدودیتهای اصلی این سیستم به شمار میروند. تاکنون تعدادی از پروتئینهای دارویی با موفقیت با استفاده از کشت سوسپانسیون سلولی گیاه تولید شده اند.

تشکر از حسن توجه شما

تهیه کننده گان:
دکتر سلیمان کرد
دکتر نوید دهنوی

گروه زیست فناوری پژوهشسرای دانش آموزی شهید مطهری اسلامشهر