ژنتیک کلاسیک

فصل اول

«اصول توارث»

مقدمه

ژنتیک علمی است که به مطالعه تمامی اشکال توارث، از توزیع صفات انسانی در یک خانواده تا توزیع بیوشیمیایی مواد ژنتیکی در کروموزوم‌ها می‌پردازد. این علم در ارتباط با انتقال، بیان و تکامل ژن‌هاست. ژن‌ها کنترل‌کننده عملکرد، رشد و نمو و ایجاد تصویر نهایی موجودات زنده هستند. پس از اینکه چارلز داروین در سال ۱۸۹۵ تئوری تکامل خود را ارائه داد، زیست‌شناسان متعددی در پی کشف نحوه انتقال صفات بودند. آن‌ها در جستجوی الگوی وراثت صفات پیوسته مانند رنگ پوست، اندازه جمجمه و ... بودند. سرانجام یوهان گرگور مندل (johann Gregor Mendel) کشیش اتریشی در سال ۱۸۶۶ قوانین خود را پیرامون وراثت صفات ناپیوسته ارائه داد. اگرچه در آن زمان کار وی مورد قدردانی و توجه قرار نگرفت، ۳۴ سال بعد، در سال ۱۹۰۰ سه گیاه‌شناس در جستجوی انتقال صفات از گیاه والد به فرزندان، قوانین مندل را مجدداً کشف و تعریف کردند.

آزمایش‌های مندل

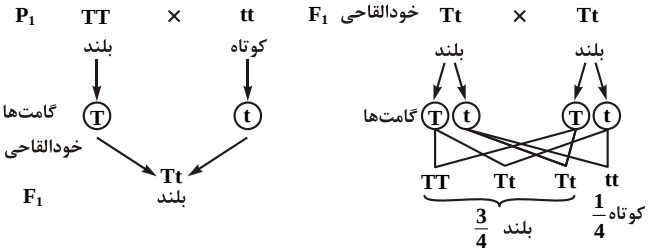
مندل در آزمایش‌های خود تلاش کرد تا گیاهانی با صفات مجزا و غیرهم‌پوشاننده را آمیزش دهد. سپس توزیع صفات را در چند نسل متوالی مشاهده و بررسی کرد. او برای کار خود، گیاه نخودفرنگی معمولی (Pisum sativum) را انتخاب کرد و برای این انتخاب سه دلیل داشت:

۱ـ نخودفرنگی به آسانی کشت می‌شود و چرخه زندگی نسبتاً کوتاهی دارد. ۲ـ این گیاه صفات ناپیوسته و قابل مشاهده‌ای مانند رنگ گل و ساختار نخودفرنگی دارد. ۳ـ گرده‌افشانی آن آسان است به‌طوری که می‌توان گرده نخودفرنگی‌های مختلف را برای انجام لقاح مصنوعی (cross fertilization) استفاده کرد.

در صورتی که گرده یک گیاه بر روی کلاله همان گیاه قرار گیرد و آن را بارور سازد، خودلقاحی (self fertilization) انجام شده است. مندل با باز کردن ناو گل‌ها، قبل از بلوغ بساک‌ها، گرده دیگری را روی کلاله قرار می‌داد و به عبارت دیگر از هیبریدگیری استفاده می‌کرد.

ابتدا مندل، به‌طور معمول نخودفرنگی‌ها را برای دو سال متوالی کشت داد تا از خالص یا هموژن بودن (true breeding or homogeneous) صفات تحت مطالعه خود مطمئن شود. وی ۷ صفت در دانه، غلاف، گل و ساقه نخودفرنگی انتخاب کرد. برای مثال، صفت ارتفاع گیاه را در نظر می‌گیریم. اغلب موارد، ارتفاع و قد به‌صورت یک صفت پیوسته عمل می‌کنند.

مندل گیاهانی را برای آمیزش انتخاب کرد که دو حالت بلند یا کوتاه را نشان می‌دادند. آمیزش شکل زیر نحوه وراثت صفت ارتفاع را نشان می‌دهد. در نسل والدین یا P_1 گیاهان کوتاه و بلند با هم آمیزش داده شده‌اند. زاده‌های حاصل از آمیزش افراد P_1، اولین نسل فرزندی یا F_1 (filial generation first) نام دارند که مندل با نام هیبریدها (hybrids) آن‌ها را می‌خواند؛ زیرا فرزندان والدینِ متفاوت (بلند و کوتاه) بودند. از طرفی، به دلیل این که در این آمیزش تنها یک صفت، ارتفاع، مورد بررسی قرار گرفته است نام مونوهیبریدها (monohybrids) به آن‌ها داده می‌شود. از آنجایی که تمامی نخودفرنگی‌های F_1 بلند بودند، مندل صفت بلندی را غالب یا بارز (dominant) در نظر گرفت. در نتیجه صفت کوتاهی که خود را در F_1 نشان نداد به عنوان صفت مغلوب یا نهفته (recessive) در نظر گرفته شد. شکل‌های مختلف یک ژن که در جمعیت وجود دارند، آلل‌های (alleles) آن ژن نامیده می‌شوند. به عبارت دیگر، کلمه‌های غالب و مغلوب یا بارز و نهفته برای نشان دادن رابطه‌ی بین آلل‌های مختلف یک ژن با صفات تحت کنترل آن‌ها استفاده می‌شوند. همچنین، بارز یا غالب، هم به صفت بلندی و هم به آلل بلندی اطلاق می‌شود.



شکل ۱

نکته۱: بارز بودن یک صفت دلیل بهتر بودن آن صفت نیست.

مندل زاده‌های F_1 را با هم آمیزش داد یا خودلقاحی کرد. در نسل دوم، فرزندان F_2 هر دو صفت بلندی و کوتاهی را بروز دادند: در میان ۱۰۶۴ زاده نسل F_2، ۷۸۷ نخودفرنگی بلند و ۲۷۷ نخودفرنگی کوتاه وجود داشت که نسبت ۱:۲/۸۴ را نشان می‌دهد و به نسبت ۱:۳ نزدیک است. مندل برای دقیق‌تر شدن مطالعاتش، اثر جنسیت را نیز بررسی کرد. برای مثال در نسل P_1، برخی نخودفرنگی‌های بلند را با دانه گرده نخودفرنگی‌های کوتاه گرده‌افشانی کرد و برخی نخودفرنگی‌های کوتاه را با دانه گرده نخودفرنگی‌های بلند گرده‌افشانی کرد. در هر دو حالت نتایج F_1 یکسان بود. در نتیجه، جنسیت در بروز صفات اثری نداشت. تمامی صفاتی که مندل مورد مطالعه قرار داد تحت تأثیر جنسیت نبودند. همان طور که در قسمت‌های بعدی این فصل توضیح خواهیم داد، برخی از صفات تحت تأثیر جنسیت هستند.

مثال۱: کدام مورد از مزایای گیاه نخودفرنگی در آزمایشات مندل نبود؟

۱) لقاح مصنوعی و گرده‌افشانی آن ساده بود.
۲) یک گیاه دوساله با چرخه زندگی کوتاه بود.
۳) دارای صفات ناپیوسته‌ی قابل مشاهده بود.
۴) به آسانی کشت می‌شد.

☑ **پاسخ:** گزینه «۲» گیاه نخودفرنگی گیاهی یک‌ساله است و همین چرخه زندگی کوتاه باعث می‌شد تا مندل در پایان هر سال نتایج خود را به‌دست آورد.

◆ ◆ ◆ ◆

قانون تفکیک یا جدایی (Rule of segregation)

مندل فرض کرد که برای صفت ارتفاع، هر گیاه نخودفرنگی دو عامل (آلل‌های هر ژن) دارد. برای مثال، نخودفرنگی‌های F_1 که همگی هیبرید بودند دارای یک عامل بارز بلندی و یک عامل نهفته کوتاهی برای صفت ارتفاع هستند. بروز صفت کوتاهی نیز به یک جفت عامل کوتاهی نیاز دارد. تنها یک عامل یا آلل به هر گامت انتقال داده می‌شود که پس از لقاح و تشکیل سلول تخم، مجدداً دو آلل از هر ژن در سلول تخم وجود خواهد داشت. در حقیقت صفت نهفته کوتاهی در نسل F_1 پنهان شده و آلل‌های آن بدون هیچ اثری در این نسل، به گامت‌ها انتقال داده شده‌اند. پس از آمیزش میان افراد نسل F_1، این صفت مجدداً در نسل F_2 خود را نشان می‌دهد. انتقال عامل یا آلل هر صفت به‌صورت مجزا، به قانون اول مندل یا قانون تفکیک معروف است.

به عبارت بهتر، قانون تفکیک را به این صورت خلاصه می‌کنیم: هر گامت تنها یک آلل از جفت آلل هر موجود زنده را دریافت می‌کند. لقاح یا ترکیب گامت‌ها باعث جفت‌شدن آلل‌ها در سلول تخم می‌شود. مندل از حروف بزرگ برای نشان دادن صفات بارز و از حروف کوچک برای نشان دادن صفات نهفته استفاده کرد. حرف T برای نشان دادن صفت بلندی نخودفرنگی (Tall) و حرف t کوچک برای صفت کوتاهی در شکل ۱ استفاده شده است.

با توجه به شکل می‌توان چند لغت مهم ژنتیک را توضیح داد:

ژنوتیپ (genotype) ترکیب ژن‌های یک موجود زنده است. برای مثال ژنوتیپ گیاه بلند TT و ژنوتیپ گیاهان F_1، Tt است. **فنوتیپ (phenotype)** به صفات قابل مشاهده موجودات زنده اطلاق می‌شود. برای مثال گیاهانی با ژنوتیپ TT، Tt از لحاظ فنوتیپی بلند هستند و گیاه با ژنوتیپ tt از لحاظ فنوتیپی کوتاه است. ژنوتیپ به دو دسته تقسیم می‌شود: **هموزیگوت (homozygote)** که هر دو آلل یکسان است مانند TT، tt، **هتروزیگوت (hetrozygote)** که آلل‌ها با هم فرق دارند مانند Tt. این دو کلمه در سال ۱۹۰۱ توسط ویلیام باتسون (William Bateson) استفاده شد. کلمه ژن نیز اولین بار در سال ۱۹۰۹ توسط گیاه‌شناس دانمارکی ویلهم یوهانسون (Wilhem Johannson) مورد استفاده قرار گرفت. افراد TT تنها یک نوع گامت T و افراد tt تنها یک نوع گامت t تولید می‌کنند. پس می‌توان گفت که افراد هموزیگوس (homozygous) که ژنوتیپ هموزیگوت دارند، تنها یک نوع گامت تولید می‌کنند.

افراد Tt یا هتروزیگوس (heterozygous) که ژنوتیپ هتروزیگوت دارند، دو نوع گامت T و t با فراوانی یکسان تولید می‌کنند. در نتیجه افراد نسل F_1 که همگی هتروزیگوس هستند گامت‌های متفاوت T و t تولید خواهند کرد. در فرآیند خودلقاحی نخودفرنگی‌های F_1، گامت‌های T و t به‌طور تصادفی با هم ترکیب می‌شوند و سه نوع متفاوت زیگوت‌های TT، Tt و tt را در نسبت‌های مختلف به وجود می‌آورند. پس از آنکه ریگونالد سی.پانت (Regonald C.Punett) برای نشان دادن آمیزش گامت‌های مختلف از جدول استفاده کرد، این جدول مربع پانت نام گرفت.

جدول ۱

	T	t
T	TT	Tt
t	Tt	tt

TT : Tt : tt
1 : 2 : 1

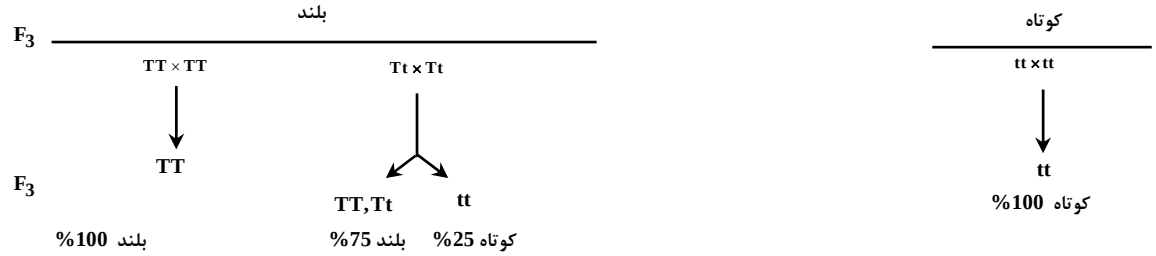
مثال۲: هتروزیگوس به چه معناست؟

۱) مشابه بودن دو آلل در یک لوکوس.
۲) موجودی که دو آلل مشابه برای یک ژن دارد.
۳) موجودی که دو آلل متفاوت برای یک ژن دارد.
۴) متفاوت بودن دو آلل در یک لوکوس.

☑ **پاسخ:** گزینه «۳» متفاوت بودن دو آلل در یک لوکوس، هتروزیگوت نام دارد و موجودی که دو آلل متفاوت را در یک جایگاه ژنی به ارث ببرد هتروزیگوس نامیده می‌شود.

اثبات قانون تفکیک آلل‌ها

با استفاده از جدول مربع پانت می‌توان به نسبت فنوتیپی ۱: ۳ و نسبت ژنوتیپی ۱ : ۲ : ۱ در افراد نسل F_1 پی برد. برای اثبات هرچه بهتر این نسبت‌ها می‌توان از تست نتایج (progeny testing) استفاده کرد. مندل برای تأیید نظریه خود میان افراد F_2 خودلقاحی برقرار کرد تا نسل F_3 به‌وجود آید. نخودفرنگی‌های کوتاه نسل F_2 (tt) با خودلقاحی تنها می‌توانند گیاهان کوتاه تولید کنند:



شکل ۲

نخودفرنگی‌های بلند نسل F_2 (TT، Tt) در اثر خودلقاحی، گیاهان کوتاه و بلند تولید می‌کنند، $\frac{1}{3}$ گیاهان بلند F_2 با ژنوتیپ TT، تنها گامت T تولید کرده و تنها زاده‌های بلند خواهند داشت، در صورتی که $\frac{2}{3}$ گیاهان بلند F_2 با ژنوتیپ Tt، دو نوع گامت T و t با نسبت برابر تولید می‌کنند و حاصل خودلقاحی آن‌ها نسبت ۱: ۳، کوتاه: بلند خواهد بود.

روش دیگر برای تأیید قانون تفکیک، انجام تست‌کراس (testcross) یا آمیزش با هموزیگوس مغلوب است. برای مثال نخودفرنگی‌های بلند F_2 ژنوتیپ مجهول دارند (TT یا Tt). در صورتی که با هموزیگوس مغلوب آمیزش داده شوند و در میان نخودفرنگی‌های F_3، گیاهان کوتاه و بلند مشاهده شود، گیاه مجهول هتروزیگوس است. اما فقط با مشاهده گیاهان بلند می‌توان نتیجه گرفت که گیاه مجهول هموزیگوس بارز بوده است. نوع دیگر آمیزش برای اثبات قانون تفکیک، بَک‌کراس (backcross) یا آمیزش زاده‌ها با والد یا فردی با ژنوتیپ والدی است. در واقع می‌توان گفت تست‌کراس در اغلب موارد نوعی بَک‌کراس است.

قانون جور شدن مستقل (Rule of Independent Assortment)

علاوه بر قانون تفکیک آلل‌ها، مندل به بررسی الگوی توارث هم‌زمان دو صفت پرداخت. برای مثال گیاهان هموزیگوس با دانه‌های گرد و زرد را با گیاهان هموزیگوس با دانه‌های چروکیده و سبز آمیزش داد. نسل F_1 همگی دانه‌های زرد و گرد داشتند که نشان می‌داد صفت زرد بر سبز و صفت گرد بر چروکیده غالب است.

پس از خودلقاحی افراد نسل F_1، زاده‌های نسل F_2 چهار نوع فنوتیپ ممکن را بروز دادند. دانه‌های زرد ـ گرد، سبز ـ گرد، زرد ـ چروکیده و سبز ـ چروکیده که تعداد مشاهده شده هر گروه به ترتیب ۳۲,۱۰۱,۱۰۸,۳۱۵ بود. با تقسیم عددها بر ۳۲، نسبت‌های هر گروه به‌دست می‌آید. نسبت‌های ۱/۰۰:۳/۱۶:۳/۳۸:۹/۸۴ که به نسبت ۱:۳:۳:۹ بسیار نزدیک است. هریک از افراد P_1 تنها یک نوع گامت تولید می‌کنند. والد زرد ـ گرد که برای صفات بارز هموزیگوس است، گامت‌های RY و والد سبز ـ چروکیده که برای صفات نهفته هموزیگوس است، گامت‌های r`y تولید می‌کنند.

جدول ۲

	RY	Ry	rY	ry
RY	**RRYY** زرد ـ صاف	**RRYy** زرد ـ صاف	**RrYY** زرد ـ صاف	**RrYy** زرد ـ صاف
Ry	**RRYy** زرد ـ صاف	**RRyy** سبز ـ صاف	**RrYy** زرد ـ صاف	**Rryy** سبز ـ صاف
rY	**RrYY** زرد ـ صاف	**RrYy** زرد ـ صاف	**rryy** زرد ـ چروکیده	**rrYy** زرد ـ چروکیده
ry	**RrYy** زرد ـ صاف	**Rryy** سبز ـ صاف	**rrYy** زرد ـ چروکیده	**rryy** سبز ـ چروکیده

افراد نسل F_1 که برای هر دو صفت هتروزیگوس هستند (Rr Yy) دی‌هیبرید (dihybrid) نامیده می‌شوند. از خودلقاحی افراد F_1، نسل F_2 به وجود می‌آید که در مربع پانت قابل مشاهده است. هر فرد F_1 می‌تواند ۴ نوع گامت متفاوت با نسبت‌های برابر تولید کند: ry،rY, Ry, RY. در نتیجه مربع پانت آمیزش دی‌هیبرید، ۱۶ خانه خواهد داشت و نسبت زاده‌ها به‌صورت کسری از عدد ۱۶ نشان داده می‌شود.

با مشاهده مربع پانت می‌توان نتیجه گرفت که $\frac{9}{16}$ دانه‌های زرد ـ گرد، $\frac{3}{16}$ دانه‌های زرد ـ چروکیده، $\frac{3}{16}$ دانه‌های سبز ـ گرد و $\frac{1}{16}$ دانه‌های سبز ـ چروکیده دارند. این نسبت‌ها، نشان‌دهنده نسبت ۱:۳:۳:۹ است. همچنین این نسبت‌ها نشان می‌دهند که هر صفت به‌طور مستقل عمل کرده است، یعنی تفکیک آللی و سپس جورشدن مستقل آلل‌های هر صفت. قانون دوم مندل یا قانون جورشدن مستقل، بر رفتار مستقل هر صفت دلالت دارد. تنها شکل دانه‌های نخودفرنگی را در نظر می‌گیریم. هر یک از والدین P_1 تنها یک نوع گامت تولید می‌کنند. والد دانه گرد، گامت R و والد دانه چروکیده، گامت r. نسل F_1 افراد هتروزیگوس هستند که ژنوتیپ Rr دارند و در نتیجه دو نوع گامت با نسبت برابر تولید می‌کنند: $\frac{1}{2}$R, $\frac{1}{2}$r. خودلقاحی نسل F_1 نسبت ۳:۱ فنوتیپی و ۱:۲:۱ ژنوتیپی ایجاد می‌کند. یعنی $\frac{1}{4}$ نخودفرنگی‌ها چروکیده (rr) و $\frac{3}{4}$ آن‌ها گرد (RR,Rr) هستند. از ۵۵۶ نخودفرنگی F_2 مندل، ۱۰۸ + ۳۱۵ نخودفرنگی چروکیده بودند که اعداد ۱۳۳:۴۲۳ و نسبت ۳/۱۸:۱/۰۰ را نشان می‌دهد. این نسبت به نسبت ۳:۱ آمیزش مونوهیبریدها بسیار نزدیک است.

$$Aa \times aa \qquad xy \times x^b x^b$$
$$\downarrow \qquad\qquad \downarrow$$
$$\frac{1}{2}Aa + \frac{1}{2}aa \qquad \frac{1}{2}xx^b + \frac{1}{2}x^b y$$

بنابراین تمام پسران حاصل از این ازدواج دچار کوررنگی می‌شوند و تمام دختران حاصل از این ازدواج دید طبیعی دارند. به احتمال $\frac{1}{2}$ فرزندان حاصل از این ازدواج دچار کوتولگی می‌شوند.

۶۹ـ گزینه «۴» در پدیده گوناگونی فنوکپی افراد دارای ژنوتیپ نرمال، فنوتیپ جهش‌یافته را نشان می‌دهند. در پدیده نفوذپذیری ناقص افراد دارای ژنوتیپ جهش‌یافته، فنوتیپ نرمال را نشان می‌دهند.

۷۰ـ گزینه «۱» Genomic imprinting علامت‌گذاری ژنومی، نقش‌پذیری ژنومی، یک پدیده ژنتیکی است که به موجب آن بیان یک ژن یا یک ناحیه کروموزومی طی تکامل موجب تفاوت بین آللی می‌شود که از پدر یا مادر به ارث می‌رسد، یعنی بیان ژن بستگی به این دارد که آلل به ارث رسیده از پدر باشد یا از مادر (Parent – of – origin – dependent). طی این پدیده فقط یک آلل بیان می‌شود و یکی خاموش می‌ماند (monoallelic experssion) چنین ژن‌هایی را ژن‌های علامت‌گذاری شده (Imprinted genes) می‌گویند که اولین بار در سال ۱۹۸۴ در مطالعات انتقال هسته در c.elegans مورد توجه قرار گرفت و سپس با بررسی دیزومی‌های تک‌واحدی (UPDs) در موش پی‌گیری شد.

می‌دانیم در موجودات دیپلوئید سلول‌های سوماتیکی دوکپی ژنوم دارند که یکی از مادر به ارث می‌رسد و دیگری از پدر و در اکثریت ژن‌های اتوزومی بیان هر دو آلل ژن به‌طور هم‌زمان صورت می‌گیرد، ولی تعداد کمی از ژن‌ها همان‌طور که ذکر شد به‌صورت علامت‌گذاری شده هستند و فقط یک آلل آن (پدری یا مادری) بیان می‌شود. برای مثال در انسان ژن IGF۲ فقط از آللی که از پدر به ارث می‌رسد، بیان می‌شود یا ژن H۱۹ که فقط آلل مادری آن بیان می‌شود.

این ژن‌ها از توارث مندلی تبعیت نمی‌کنند و نتایج تلاقی معکوس در آن مانند توارث مندلی یکسان نیست با تعویض ژنوتیپ والدین با یکدیگر فنوتیپ فرزندان عوض می‌شود در حالی‌که در توارث مندلی تعویض ژنوتیپ والدین روی فنوتیپ فرزند اثر ندارد.

این پدیده در حشرات، پستانداران و گیاهان گلدار مشاهده شده است و در واقع یک فرایند اپی ژنتیکی است که با متیلاسیون و تغییر و تحول هیستون‌ها به منظور کسب بیان منوآللی بدون تغییر توالی DNA عمل می‌کند. این علایم اپی‌ژنتیکی در لایه زاینده پایدار می‌شود و در تمام سلول‌های سوماتیکی جاندار باقی می‌ماند.

واژه Imprinting اولین بار برای شرح وقایع تعیین جنسیت در حشرات راسته pseudococus nipa یا mealybugs (شامل Homotera coccidae) به‌کار رفت. در این گروه حشرات هر دو جنس نر و ماده از تخم لقاح‌یافته به‌وجود می‌آیند، با این تفاوت که در ماده‌ها همه کروموزوم‌ها یوکروماتینی می‌ماند و فعال هستند، ولی در جنینی که قرار است جنسیت نر داشته باشد یک سری هاپلوئیدی کروموزوم‌ها بعد از تقسیم و cleavage ششم هتروکروماتینه می‌شود و در بیشتر بافت‌ها این طور باقی می‌ماند.

ولی در پستانداران imprinting شامل یک فرایندی است که عملکرد نابرابر آلل‌های پدری و مادری را بیان می‌کند. مدارک و مستندات به‌دست آمده بیان می‌کند که ظهور پدیده Genomic imprinting به حدود ۱۵۰ میلیون سال قبل زمانی که پستانداران بچه‌زای اولیه از اجداد تخم‌گذار خود مشتق شده‌اند، برمی‌گردد حدود ۱% – ۰/۱ کل ژن‌های پستانداران علامت‌گذاری شده است و جستجوی کل ژنوم انسان حدود ۱۵۰ ژن علامت‌گذاری شده را مشخص کرده که ۱۱۵ باند کروموزومی را دربر می‌گیرد. اولین ژن Imprint شده در انسان ژن H۱۹ با بیان مادری است.

بسیاری از این ژن‌ها به‌صورت خوشه‌ای روی کروموزوم‌های مختلف ژنوم هستند هر خوشه تحت کنترل یک مرکز کنترلی به‌نام Imprinting center(IC) قرار می‌گیرد. بیان مناسب این ژن‌ها به‌طور کلی برای رشد، تکامل و توانایی زیست موجود مثل رشد جفت و جنین، تکثیر سلولی، تکامل مغز و سیستم عصبی و ایجاد ساختارهای احشایی لازم است و همچنین این ژن‌ها در تکامل زبان (تکلم) و رفتارهای بزرگسالی مثل گرایش و اعتیاد به الکل، شیزوفرنی، اختلالات روانی مثل دو قطبی بودن نقش داشته و بیان نامناسب آنها موجب بسیاری از سندروم‌های کلاسیک مانند سندروم پرادر- ویلی، آنجلمن و سندروم بکت ویت ویدمان و اختلالات دیگر است و همچنین اختلال در این ژن‌ها مسئول بسیاری از بدخیمی‌ها به‌خصوص مواردی که در خردسالی بروز می‌کند، می‌باشد و اخیراً ارتباط این ژن‌ها با دیابت و آلزایمر نیز گزارش شده است و به نظر می‌آید در ناباروری هم مؤثر است.

بیماری‌ها و اختلالات مرتبط با genomic imprinting در انسان بالغ بر ۱۰۰ مورد می‌شود که در نتیجه تغییرات ژنتیکی نامناسب مانند حذف یا دیزومی‌های تک واحدی (uniparental disomy: UDPS) به‌وجود می‌آیند.

به نظر می‌آید تعداد این ژن‌ها در انسان کمتر از موش باشد و معلوم شده که نوع ژن‌ها نیز در انسان و موش متفاوت است و این مسئله کاربرد موش را به عنوان مدل برای مطالعه و بررسی این پدیده در انسان را با سؤالاتی مواجه کرده است.

آزمون فصل اول

۱ـ بیماری ذخیره لیزوزومی که باعث تجمع هپاران سولفات و درماتان سولفات در این اندامک می‌شود، ..... نام دارد.

۱) فنیل‌کتونوریا ۲) بیماری سلول I ۳) سندروم هورلر ۴) آلکاپتونوریا

۲ـ نحوه توارث بیماری این‌کونتی‌نتیاپیگمنتی نوع ۲ کدام است؟

۱) اتوزوم غالب ۲) اتوزوم مغلوب ۳) وابسته به X غالب ۴) وابسته به X مغلوب

۳ـ شدت و ضعف کدام‌یک از بیماری‌های ژنتیکی نام برده تحت تأثیر محیط نمی‌باشد؟

۱) کمبود G6PD ۲) آکوندروپلازیا ۳) کمبود آلفا۱- آنتی‌تریپسین ۴) بیماری سلول داسی

۴ـ به ارث بردن ایزودیزومی مادری ناحیه 15q11-q13 باعث بروز کدام یک از موارد زیر می‌شود؟

۱) سندروم آنجلمن ۲) سندروم لیش- نیهان ۳) سندروم پرادرویلی ۴) سندروم سان- فیلیپو

۵ـ پدر مبتلا به نقص آنزیم گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز، دختر ..... و پسر ..... خواهد داشت.

۱) حامل- سالم ۲) ناقل- بیمار ۳) بیمار- حامل ۴) سالم- بیمار

۶ـ پدر مبتلا به هانتینگتون و مادر مبتلا به راشیتیسم مقاوم به ویتامین D با چه احتمالی صاحب دختر کاملاً سالم خواهند شد؟

۱) $\frac{۱}{۸}$ ۲) $\frac{۱}{۱۶}$ ۳) $\frac{۱}{۴}$ ۴) $\frac{۱}{۳۲}$

۷ـ مادر حامل آلل بیماری وابسته به X مغلوب به ترتیب با چه احتمالی دارای دختر و پسر بیمار خواهد شد؟

۱) $\frac{۱}{۸}$ و $\frac{۱}{۴}$ ۲) صفر و $\frac{۱}{۴}$ ۳) $\frac{۱}{۸}$ و $\frac{۱}{۸}$ ۴) صفر و $\frac{۱}{۸}$

۸ـ زوجی ظاهراً سالم دارای فرزندی مبتلا به فنیل‌کتونوریا شده‌اند. احتمال اینکه فرزند دوم آن‌ها پسر کاملاً سالم باشد، چقدر است؟

۱) $\frac{۱}{۲}$ ۲) $\frac{۱}{۴}$ ۳) $\frac{۱}{۸}$ ۴) $\frac{۱}{۱۶}$

۹ـ قانون تفکیک یا جدایی مندل با کدام گزینه مطابقت دارد؟

۱) هر گامت تنها یک لوکوس از هر جفت ژن والد دریافت می‌کند.
۲) هر گامت هر دو عامل از هر جفت ژن والد را دریافت می‌کند.
۳) هر گامت تنها یک آلل از جفت آلل والد را دریافت می‌کند.
۴) هر گامت هر دو آلل از جفت آلل والد را دریافت می‌کند.

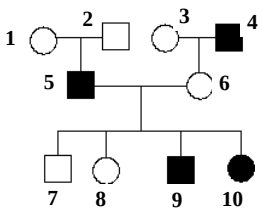
۱۰ـ نسبت هموزیگوت‌های مغلوب در نسل F_2 در آمیزش AABBCCDD × aabbccdd چقدر است؟

۱) $\frac{۴}{۲۵۶}$ ۲) $\frac{۲}{۲۵۶}$ ۳) $\frac{۱۶}{۲۵۶}$ ۴) $\frac{۱}{۲۵۶}$

۱۱ـ در آمیزش AABBCCDDEE × aabbccddee تعداد ژنوتیپ و فنوتیپ مورد انتظار در نسل F_1 به ترتیب کدام است؟

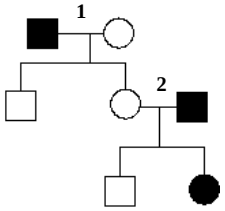
۱) ۵ و ۲۵ ۲) ۱ و ۵ ۳) ۱ و ۱ ۴) ۵ و ۳۲

۱۲ـ شجره‌نامه مقابل متعلق به صفت کوررنگی (وابسته به X مغلوب) است. کدام فرد قطعاً سالم و دارای ژن کوررنگی است؟



۱) ۱
۲) ۲
۳) ۳
۴) ۷

۱۳ـ با توجه به شجره‌نامه مقابل کدام الگوی وراثتی درباره بیماری مطرح شده ممکن نیست؟



۱) اتوزومی غالب
۲) اتوزومی مغلوب
۳) وابسته به جنس غالب
۴) وابسته به جنس مغلوب

۱۴ـ فردی با گروه خونی AB منفی، از کدام‌یک از گروه‌های خونی نمی‌تواند خون بگیرد؟

۱) AB مثبت ۲) A منفی ۳) O منفی ۴) B منفی

۱۵ـ در صورت وجود حالت اپیستازی در یک آمیزش دی‌هیبرید، هموزیگوت مغلوب ژن اول، مانع بروز آلل غالب ژن دوم می‌شود. در این حالت کدام نسبت قابل انتظار است؟

۱) ۷:۹ ۲) ۹:۳:۴ ۳) ۱:۱۵ ۴) ۱۲:۳:۱

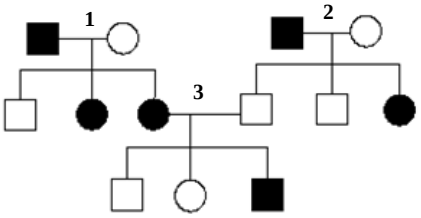
۱۶ـ در یک آمیزش دی‌هیبرید (AABB × aabb) برای تولید رنگ، حضور حداقل یک آلل بارز از هر ژن ضروری است. کدام نسبت در نسل F_2 قابل انتظار است؟

۱) ۱:۳:۳:۹ ۲) ۹:۳:۴ ۳) ۹:۷ ۴) ۱۵:۱

۱۷ـ کدام‌یک از بیماری‌های نام برده، نفوذ کاهش یافته و بیان متغیر دارد؟

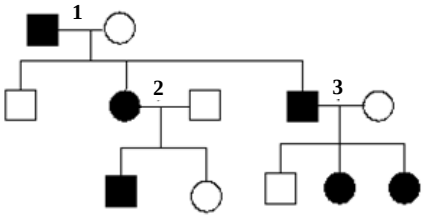
۱) هانتینگتون ۲) هایپرکلسترولمی فامیلی ۳) دیستروفی عضلانی دوشن ۴) نوروفیبروماتوز

۱۸ـ کدام‌یک نمی‌تواند نشان‌دهنده الگوی شجره‌نامه زیر باشد؟



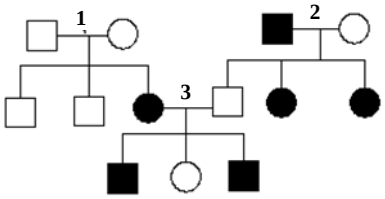
۱) اتوزوم غالب
۲) اتوزوم مغلوب
۳) وابسته به X غالب
۴) وابسته به X مغلوب

۱۹ـ با توجه به شجره‌نامه مقابل، کدام حالت نمی‌تواند در تولید بیماری نقش داشته باشد؟



۱) غالب اتوزومی
۲) مغلوب اتوزومی
۳) غالب وابسته به X
۴) مغلوب وابسته به X

۲۰ـ شجره‌نامه مقابل کدام الگوی وراثتی را نمی‌تواند داشته باشد؟



۱) غالب اتوزومی
۲) مغلوب اتوزومی
۳) غالب وابسته به جنس
۴) مغلوب وابسته به جنس

۲۱ـ مردی مبتلا به یک بیماری غالب وابسته به جنس با زنی سالم ازدواج کرده است. چه نسبتی را برای دخترها و پسرهای حاصل از این ازدواج پیش‌بینی می‌کنید؟

۱) پسرها ۱۰۰% سالم و دخترها ۱۰۰% ناقل ۲) پسرها ۱۰۰% سالم و دخترها ۱۰۰% مبتلا
۳) پسرها ۵۰% سالم و ۵۰% مبتلا و دخترها ۱۰۰% سالم ۴) پسرها ۱۰۰% سالم و دخترها ۵۰% سالم

۲۲ـ در کدام نوع توارث، یک صفت اتوزوم در یک جنس به‌صورت غالب و در جنس دیگر به‌صورت مغلوب به ارث می‌رسد؟

۱) محدود به جنس ۲) وابسته به جنس ۳) متأثر از جنس ۴) هولاندریک

۲۳ـ در مورد بیماری‌های دارای توارث وابسته به X مغلوب کدام‌یک از موارد زیر صحیح است؟

۱) زنان مبتلا فراوانی کمتری نسبت به مردان مبتلا دارند. ۲) یک زن مبتلا به احتمال ۲۵ درصد یک فرزند مبتلا خواهد داشت.
۳) یک مرد مبتلا قطعاً یک مادر مبتلا دارد. ۴) فرزندان مرد مبتلا همه مبتلا خواهند بود.

۲۴ـ زنی مبتلا به بیماری هموفیلی با مردی سالم ازدواج می‌کند. چه احتمالی وجود دارد که آن‌ها دارای فرزند پسر سالم شوند؟

۱) ۱۰۰% ۲) ۵۰% ۳) ۲۵% ۴) هیچ‌کدام

۲۵ـ مادر حامل ژن کوررنگی وابسته به جنس است. در صورتی که آن‌ها صاحب دو دختر بیمار و یک پسر سالم باشند، ژنوتیپ و فنوتیپ پدر چگونه بوده است؟

۱) x^aY و بیمار ۲) x^aY و سالم ۳) x^AY و بیمار ۴) هیچ‌کدام

فصل دوم

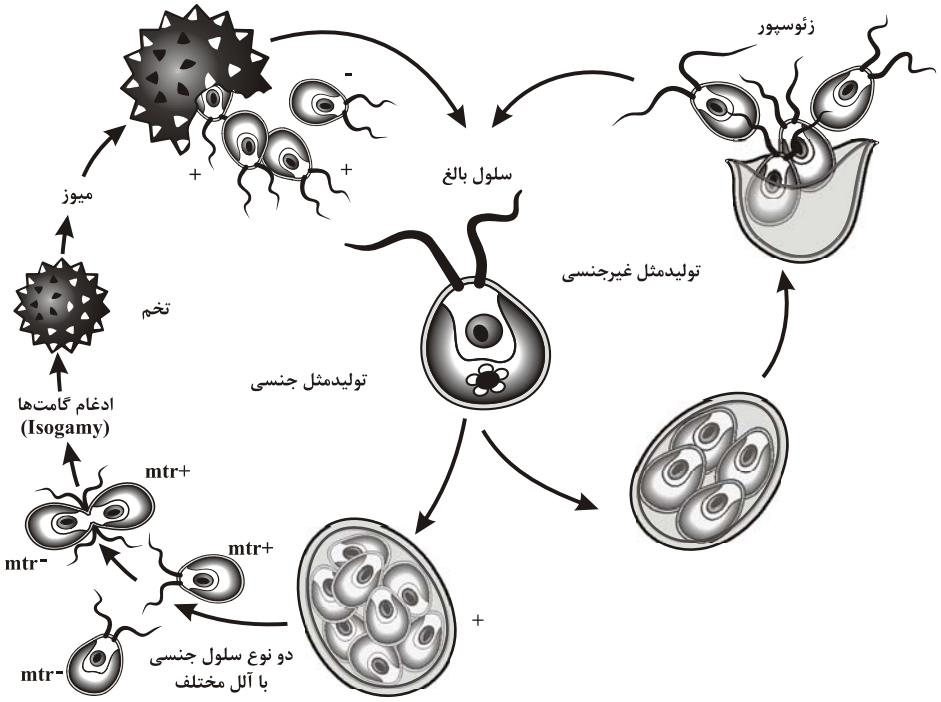
«ژنتیک جنسیت»

مقدمه

در برخی گونه‌های گیاهی و جانوری، افراد در دو جنس مجزای نر (male) و ماده (female) وجود دارند. نرها، گامت جنسی نر (اسپرم، گرده یا میکروسپور) و ماده‌ها، گامت جنسی ماده (تخمک یا ماکروسپور) تولید می‌کنند. اگر دو جنس نر و ماده‌ی یک گونه، کاملاً مجزا باشند به این موجودات، دوپایه dioecious گویند. اما اگر گامت‌های جنسی نر و ماده توسط یک فرد تولید شوند که دارای هر دو اندام تولیدمثلی نر و ماده است، این موجودات، تک‌پایه یا Monoecious می‌باشند. در برخی گونه‌ها، هر دو نوع گامت توسط یک فرد، در یک اندام تولیدمثلی تولید می‌شود، به چنین موجوداتی هرمافرودیت (Hermaphrodite) گفته می‌شود. موجودات از نظر عوامل تعیین‌کننده‌ی جنسیت مشابه نیستند. در برخی گونه‌ها جنسیت، انعکاسی از شرایط محیطی است و در برخی دیگر حضور کروموزوم‌های جنسی یا ژن‌های خاصی برای ایجاد جنسیت معین لازم است. «تمایز جنسی اولیه» شامل غدد مولد گامت‌ها و «تمایز جنسی ثانویه» شامل ظاهر کلی موجود با تفاوت‌های آشکار بین دو جنس است.

تعیین جنسیت

تعیین جنسیت در کلامیدوموناس: کلامیدوموناس یک جلبک سبز تک‌سلولی است. این موجود بیشتر چرخه‌ی زندگی خود را در فاز هاپلوئید و با تولیدمثل غیرجنسی میتوزی سپری می‌کند. ولی در شرایط استرس محیطی، دو سلول mtr^+ و mtr^- که دو تیپ جنسی متفاوت‌اند، با هم ادغام شده و یک سلول دیپلوئید حاصل می‌شود. تخم دیپلوئید می‌تواند شرایط دشوار محیطی را تحمل کند. زمانی که استرس محیطی برطرف شد، تخم، میوز انجام می‌دهد. سلول‌های حاصل از این میوز «زئوسپور» نام دارند که هرکدام یک سلول طبیعی هستند. چهار زئوسپور حاصل از میوز تخم شامل دو mtr^- و دو mtr^+ است. پس تعیین جنسیت در این جلبک سبز به عهده‌ی یک لوکوس ژنی است و دو آلل mtr^+ و mtr^- تعیین‌کننده‌ی تمایز جنسی جلبک سبز هستند.



شکل ۱. چرخه زندگی کلامیدوموناس

گامت‌های mtr^- و mtr^+ ظاهراً مشابه هستند، به همین دلیل به این گامت‌ها، ایزوگامت گفته می‌شود. به موجودات دارای گامت‌های ایزوگامی، **ایزوگاموس** می‌گویند. اگرچه گامت‌های mtr^- و mtr^+ از نظر ظاهر تفاوتی ندارند، از نظر ترکیبات شیمیایی کاملاً متفاوت‌اند. اگر عصاره‌ی یک کلون از سلول‌ها جدا شود و به سلول‌های جنس مخالف اضافه شود، عصاره مثل یک ماده‌ی اتصالی، باعث چسبیدن سلول‌ها به هم می‌شود؛ اما اگر همین عصاره به سلول‌های هم‌جنس اضافه شود، اتصال بین سلولی روی نمی‌دهد. بنابراین با وجود اینکه ایزوگامت‌ها از نظر مورفولوژیکی مشابهند، ولی از لحاظ شیمیایی با هم تفاوت دارند.

مثال۱: کدام مورد در ارتباط با تعیین جنسیت کلامیدوموناس صحیح نیست؟

۱) گامت‌های دو جنس از لحاظ ظاهری مشابه هم هستند.
۲) تعیین جنسیت با استفاده از لوکوس mtr است.
۳) گامت‌ها با استفاده از تقسیم میوز زئوسپور ایجاد می‌شوند.
۴) گامت‌های حاصل از میوز به‌طور برابر از دو جنس هستند.

☑ **پاسخ:** گزینه «۳» گامت‌ها در اثر تقسیم میوز در سلول تخم ایجاد می‌شوند و زئوسپور نام دارند.

◆ ◆ ◆ ◆

تعیین جنسیت در C الگانس: این کرم‌ها دو فنوتیپ جنسی دارند: نرها که تنها گامت نر می‌سازند و هرمافرودیت‌ها که هم گامت ماده و هم گامت نر می‌سازند. نسبت تعداد کروموزوم‌های X به تعداد سری کروموزوم‌های اتوزوم است که باعث نر شدن یا هرمافرودیت شدن می‌شود. اگر در کرم دیپلوئید تعداد کروموزوم‌های X دو عدد باشد، این نسبت ۱ است (دو کروموزوم X و دو سری هاپلوئید) و کرم هرمافرودیت ظاهر می‌شود. اما اگر این نسبت ۰/۵ باشد (یک کروموزوم X به ازای دو سری هاپلوئید)، کرم به صورت نر ظاهر می‌شود. توجه کنید که جنس نر این کرم فاقد کروموزوم Y است.

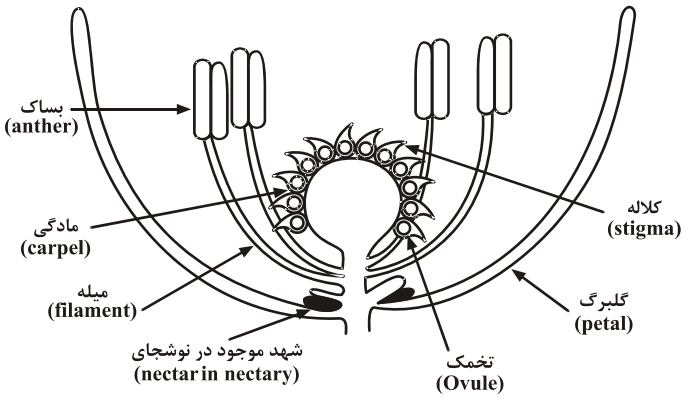
سیستم تعیین جنسیت در گیاهان

گیاهان را از نظر جنسی به سه گروه تقسیم می‌کنند:

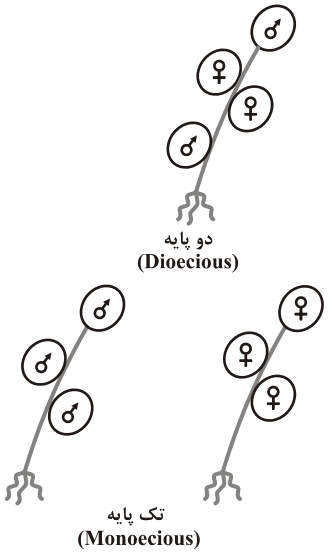
الف) هرمافرودیت: در این گیاهان یک گل، هم تخمک و هم اسپرم تولید می‌کند. در واقع یک گل هم پرچم و هم مادگی را با هم دارد. (شکل ۲)

ب) گیاهان تک‌پایه: یک گیاه دو نوع گل دارد. تعدادی از گل‌ها، گل نر هستند و دارای پرچم و تعدادی گل‌ها ماده‌اند و دارای مادگی. (شکل ۳)

پ) گیاهان دوپایه: یک گیاه گل نر و یک گیاه، گل ماده را تولید می‌کند، پس در این گیاهان دو جنس نر و ماده روی دو پایه قرار دارند. (شکل ۳)



شکل ۲. یک گیاه تک پایه



شکل ۳

تعیین جنسیت ذرت: ذرت یک گیاه تک‌پایه است. گل‌های نر تاجی شکل و گل‌های ماده کاکلی‌شکل (ابریشمی) هستند. گیاهی با ژنوتیپ $b_Sb_ST_S -$ گل تاجی تولید کرده، ولی گل ابریشم تولید نمی‌کند و گیاه نر محسوب می‌شود. اگر گیاه ژنوتیپ $B_S _ t_St_S$ داشته باشد، گل ابریشمی تولید می‌کند و ماده است. پس برای ایجاد گل ابریشم (ماده) آلل B_S و برای ایجاد گل تاجی (نر) آلل T_S لازم است.

اگر ژنوتیپ گیاه $B_S - T_S -$ باشد، هر دو نوع گل تاجی و ابریشمی را می‌دهد. بنابراین دو لوکوس ژنی T_S و B_S، نقش تعیین شکل گل و جنسیت گیاه را به عهده دارند.

جدول ۱

فنوتیپ	ژنوتیپ
تک‌پایه‌ی طبیعی (هر دو نوع گل)	$B_S - T_S$
نر (گل تاجی)	$b_Sb_ST_S -$
ماده (گل ابریشمی)	$B_S - t_St_S$

تعیین جنسیت در گیاه مارچوبه: مارچوبه یک گیاه دوپایه است. در این نوع گیاه با وجود اینکه در گیاه نر، مادگی و در گیاه ماده، پرچم ظاهر می‌شود، اما این مادگی و پرچم‌ها به‌صورت ناکامل رشد می‌کنند و بالغ نمی‌شوند. به هر حال گاهی مادگی در گیاه نر فعال شده و این گیاه می‌تواند خودلقاحی کند که از نظر تئوری این نوع آمیزش، نر در نر می‌باشد. در واقع، جنسیت این گیاه توسط یک لوکوس ژنی کنترل می‌شود و صفت نر بودن یا ماده بودن در مارچوبه تحت توارث مندلی است. آمیزش نر در نر به‌صورت مقابل است: $Aa \times Aa$

$$\frac{۱}{۴}aa, \frac{۲}{۴}Aa, \frac{۱}{۴}AA$$

پس نسبت نر به ماده‌های حاصل این آمیزش ۱:۳ است. گیاهان AA و Aa نر و گیاه aa ماده می‌شوند. یک سوم گیاهان نر خالص و $\frac{۲}{۳}$ گیاهان نر، ناخالص (Aa) هستند.

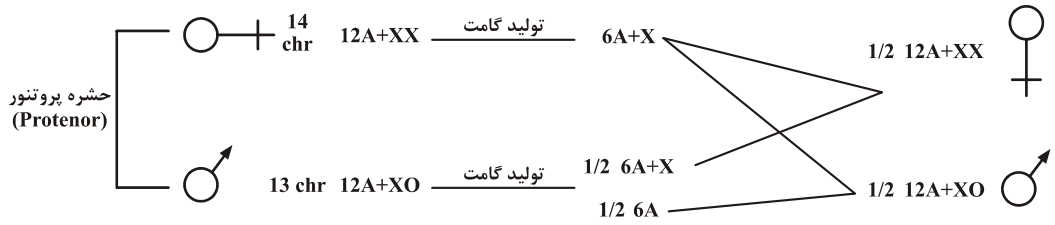
مثال۲: در صورتی که ژنوتیپ گیاه ذرت به صورت $B_s - t_s t_s$ باشد، فنوتیپ آن چگونه است؟

۱) دارای گل ابریشمی، ماده
۲) دارای گل تاجی، نر
۳) دارای گل تاجی، نر و ماده
۴) دارای هر دو گل، نر و ماده

☑ **پاسخ:** گزینه «۱» تعیین جنسیت در گیاه تک‌پایه ذرت به حضور دو ژن B_s و T_s بستگی دارد. در حضور B_s و عدم حضور آلل غالب T_s، گیاه ماده و دارای گل‌های ابریشمی خواهد بود.

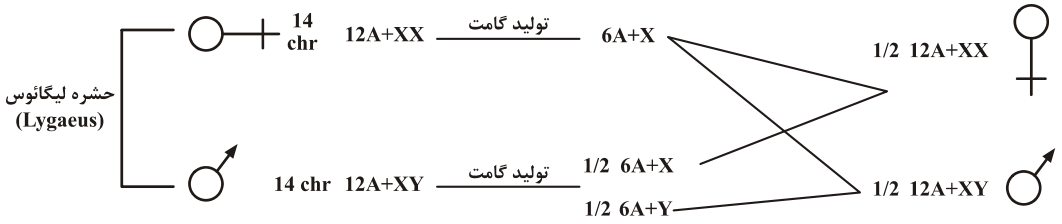
سیستم تعیین جنسیت براساس کروموزوم جنسی

در سال ۱۹۰۶، ویلسون روی حشره‌ی Protenor کار می‌کرد. او متوجه شد که ماده‌ها ۱۴ کروموزوم و نرها ۱۳ کروموزوم دارند. طی پدیده‌ی گامتوژنز در این حشره، ماده‌ها گامت‌هایی با ۷ کروموزوم ایجاد می‌کردند. اما نرها دو نوع گامت ایجاد می‌کردند که برخی ۷ کروموزوم و برخی ۶ کروموزوم داشتند. از آمیزش اسپرم‌های ۷ کروموزومی با تخمک، زاده‌های ماده و از آمیزش اسپرم‌های ۶ کروموزومی با تخمک، زاده‌های نر ایجاد می‌شوند. به این ترتیب نرها دارای یک کروموزوم X‌اند و ماده‌ها دو کروموزوم X دارند. حضور یا فقدان کروموزوم X در اسپرم‌ها، جنسیت زاده‌ها را تعیین می‌کند. این سازوکار را اکنون سیستم XX/XO گویند که Protenor system نام دارد. سیستم جنسی Protenor در ملخ و برخی قورباغه‌ها هم وجود دارد.



شکل ۴

از طرفی ویلسون آزمایشاتی روی حشره‌ی Lygaeus انجام داد. در این حشره هر دو جنس نر و ماده، ۱۴ کروموزوم دارند که ۱۲ کروموزوم آن اتوزوم است. ماده‌ها دو کروموزوم X دارند و نرها یک کروموزوم X و یک هتروکروموزوم کوچک به نام Y دارند. ماده‌ها تنها یک نوع گامت با ساختار $۶A + X$ تولید می‌کنند. اما نرها دو نوع گامت با ساختارهای $۶A + X$ و $۶A + Y$ تولید می‌کنند. به این حالت در تعیین جنسیت، سیستم XX/XY یا lygaeus گویند.



شکل ۵

در هر دو سیستم lygaeus و Protenor یک جنس، از نظر تعداد و نوع کروموزوم، گامت‌های مشابه تولید می‌کند که به این جنس، جنس هموگامت گویند که نقشی در تعیین جنسیت ندارد. اما جنس دیگر از نظر تعداد و نوع کروموزوم، گامت‌های متفاوت تولید می‌کند که به آن، جنس هتروگامت گویند و نوع گامت‌های او که در لقاح شرکت می‌کنند، تعیین‌کننده‌ی جنسیت زاده‌هاست.

همیشه نر جنس هتروگامت نیست. در پرندگان، شبپره‌ها، پروانه‌ها، برخی ماهی‌ها، خزندگان و دوزیستان، ماده جنس هتروگامت است. در مواردی که ماده هتروگامت است، کروموزوم‌های جنسی به صورت ZZ/ZW یا ZZ/ZO نشان داده می‌شوند.

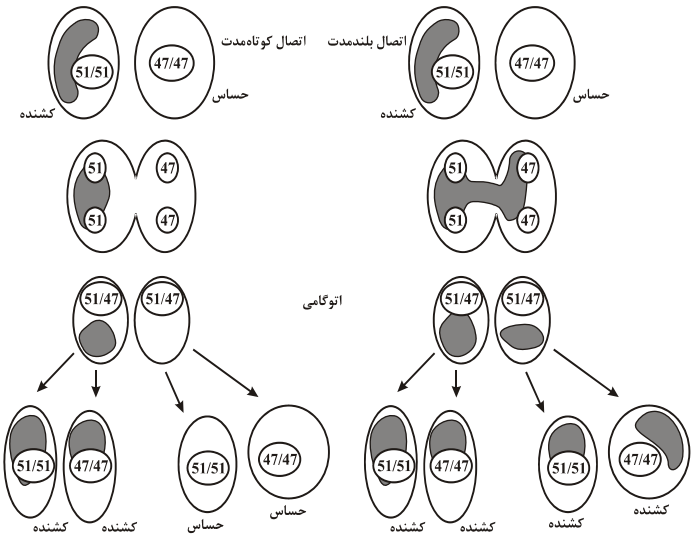
۲. وراثت سیتوپلاسمی موجودات هم‌زیست

پارامسیوم یک نوع پروتوزوآ است و از طریق کانژوگیشن تولیدمثل می‌کند. در سیتوپلاسم برخی از انواع پارامسیوم مثل نژاد ۵۱، ذراتی به نام کاپا وجود دارد. ذرات کاپا در واقع باکتری‌هایی هستند که با فاژهای تولیدکننده پارامایسین هم‌زیستی دارند. پارامایسین یک فاکتور کشنده پارامسیوم است و باعث از بین رفتن سویه‌های حساس پارامسیوم در محیط کشت می‌شود. هر پارامسیوم یک هسته‌ی بزرگ و دو هسته‌ی کوچک دیپلوئید دارد. هر دو هسته‌ی کوچک قبل از آمیزش، میوز انجام داده و ۴ سلول هاپلوئید ایجاد می‌کنند. از ۸ سلول هاپلوئید حاصل، یکی باقی مانده و میتوز می‌کند و بقیه از بین می‌روند.

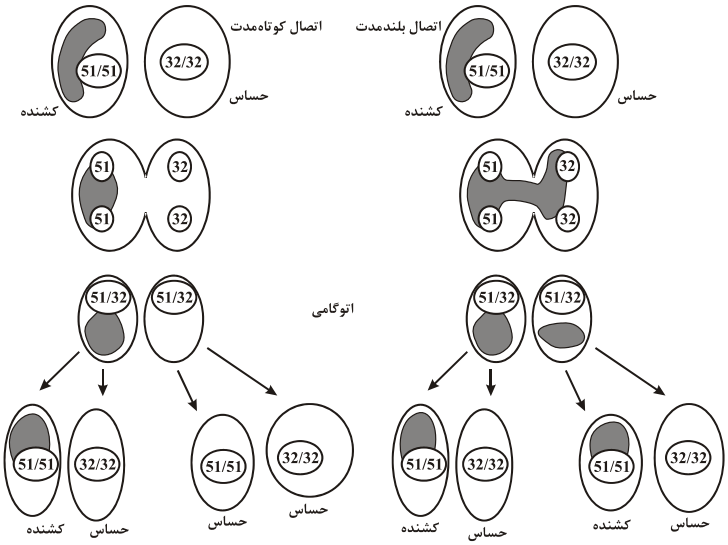
هر سلول پارامسیوم در فرایند کانژوگیشن، هسته‌ی کوچک خود را به دیگری می‌دهد. اگر زمان کانژوگیشن زیاد باشد علاوه بر تبادل هسته‌ها، محتویات سیتوپلاسمی هم می‌توانند مبادله شوند.

ذرات کاپا برای فعال‌شدن به ژن K نیاز دارند. این ژن به‌صورت غالب بیان می‌شود و در هر دو نژاد ۴۷ و ۵۱ پارامسیوم وجود دارد. اما نژاد ۳۱ فاقد ژن K است و ژنوتیپ kk دارد. برای مثال از آمیزش نژاد ۵۱ (دارای ذره‌ی کاپا) با نژاد ۴۷ (فاقد ذره کاپا)، ۵۰% زاده‌ها همانند نژاد ۵۱ والدی، فنوتیپ کشنده را نشان می‌دهند. اگر زمان conjugation زیاد به طول بینجامد ذرات کاپا مبادله شده، تمام زاده‌ها خاصیت تولید پارامایسین را به ارث برده و به اصطلاح کشنده می‌شود.

در آمیزش نژاد ۳۲ با ۵۱ پارامسیوم، اگر زمان کانژوگیشن کم باشد فقط $\frac{1}{4}$ زاده‌ها همانند نژاد ۵۱ والدی پارامایسین تولید کرده و کشنده خواهند شد. اگر زمان کانژوگیشن زیاد باشد $\frac{1}{2}$ زاده‌ها همانند نژاد ۵۱ والدی کشنده می‌شوند.



شکل ۴



شکل ۵

مثال۵: منشأ خاصیت کشندگی در پارامسیوم چیست؟

۱) ذرات کاپا که در واقع فاژهای هم‌زیست با پارامسیوم‌اند.
۲) ذرات باکتری که در واقع انگل سیتوپلاسمی پارامسیوم‌اند.
۳) پارامایسین تولیدشده توسط فاژهای هم‌زیست با ذرات کاپا
۴) ترشح ذرات کاپا به خارج از محیط سیتوپلاسمی

☑ **پاسخ:** گزینه «۳» در سویه‌های حساس پارامسیوم، باکتری هم‌زیست با فاژهای تولیدکننده پارامایسین وجود دارد.

◆ ◆ ◆ ◆

توارث ذرات عفونی در مگس سرکه: مگس سرکه دروزوفیلا اغلب نسبت به حضور CO_2 مقاوم است، ولی برخی نژادهای این حشره در حضور CO_2 خیلی حساس‌اند و سریع می‌میرند. این حساسیت به صورت کاملاً مادری به ارث می‌رسد، به‌طوری که زاده‌های ماده‌ی حساس همگی حساس‌اند و زاده‌های ماده‌ی مقاوم، همگی مقاوم‌اند.

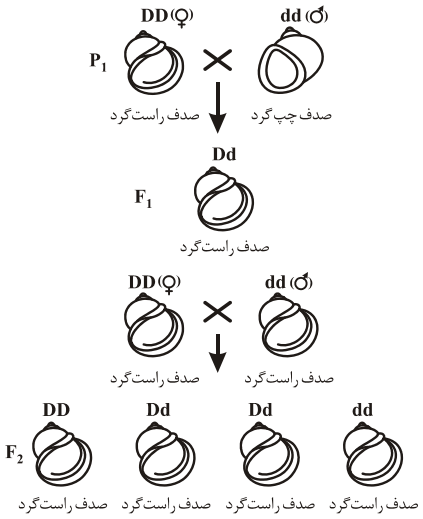
این حساسیت به‌علت حضور ذرات سیگما در سیتوپلاسم است. ذرات سیگما در واقع ذرات شبه ویروسی هستند. پایداری اثر ذرات سیگما به حضور ژن‌های معینی در هسته‌ی سلول بستگی دارد. در بیشتر مواقع در اثر انتقال این ذرات سیگما از مگس سرکه به حشرات دیگر، حساسیت به CO_2 ظاهر نمی‌شود.

۳ـ اثرات مادری (maternal effects)

Maternal effect یا اثر مادری به علت انتقال مواد سیتوپلاسمی تخمک به زیگوت دیده می‌شود. برای مثال در شپشک آرد، ژن بارز A تولید رنگ می‌کند؛ اما از آمیزش ماده‌ی Aa با نر aa تمام زاده‌ها رنگی می‌شوند.

نوزادان دارای ژنوتیپ aa پس از بلوغ به تدریج زال می‌شوند. در نسل F_2 نوزادان aa کاملاً زال خواهند بود، زیرا به علت نبود ژن ماده‌ی رنگی، غلظت آن در سیتوپلاسم سلول‌ها کم می‌شود.

پیچش صدف در حلزون limnaea مثال دیگری از اثر مادری است. ژنوتیپ dd در برخی سویه‌های این حلزون، صدف با پیچش چپ‌گرد و ژنوتیپ DD یا Dd پیچش راست‌گرد یا متمایل به راست را ایجاد می‌کند. این دو آلل نسبت به هم حالت غالب مغلوبی دارند. فرزندان حاصل از حلزون ماده با ژنوتیپ Dd یا DD همواره دارای صدف راست‌گرد هستند و فرزندان حاصل از حلزون ماده با ژنوتیپ dd همواره دارای صدف چپ‌گرد هستند و این مستقل از ژنوتیپ خود فرزندان است.



شکل ۶

مثال۶: حلزون ماده‌ای با ژنوتیپ Dd که صدف راست‌گرد دارد با حلزون نر با ژنوتیپ dd آمیزش کرده است. چند درصد زاده‌ها صدف چپ‌گرد هستند؟

۱) ۵۰% ۲) ۱۰۰% ۳) ۲۵% ۴) ۰%

☑ **پاسخ:** گزینه «۴» فرزندان حاصل از مادر با صدف راست‌گرد، همه راست‌گرد خواهند بود.

نقش ژن‌های مادری در ایجاد بخش قدامی، خلفی و شکمی در جنین دروزوفیلا مثالی از اثر مادری در تکوین است. در تخمک بارور نشده mRNAی این ژن‌ها انباشته شده است. این mRNA توسط سلول‌های پرستار اطراف تخمک ساخته شده و در مناطق خاص سیتوپلاسم سلول تخمک ذخیره می‌شود.

الف) ژن biocide: mRNAی این ژن در بخش قدامی سلول تخمک ذخیره می‌شود. پس از لقاح این mRNA در ناحیه قدامی بیان شده و سبب رپرس شدن (سرکوب شدن) سنتز پروتئین‌های خلفی و فعال شدن پروتئین‌های بخش قدامی می‌شود. اگر مادر دارای ژنوتیپ bcd^- / bcd^- باشد، اگرچه خودش فنوتیپ سالم دارد، جنین حاصل از او هرگز تکوین طبیعی نخواهد داشت و دارای دو شکم بدون سر و سینه خواهد بود، در حالی که اگر مادر حداقل یک آلل نوع وحشی (bcd^+) را داشته باشد، حتی اگر ژنوتیپ جنین به‌صورت جهش‌یافته هموزیگوت باشد (bcd^- / bcd^-)، جنین به صورت طبیعی نمو می‌یابد. بیان ژن biocide، رونویسی ژن hunch back (که تکامل‌دهنده‌ی بخش قدامی است) را فعال می‌کند. بیان این ژن همچنین باعث رپرس ترجمه mRNAی caudal می‌شود که تکامل‌دهنده‌ی بخش خلفی است.

ب) ژن nanos: mRNAی این ژن در بخش خلفی تخمک متمرکز شده است. این ژن یک مورفوژن خلفی است و مانند ژن biocide بعد از لقاح ترجمه می‌شود. پروتئین حاصل از این ژن باعث رپرس (سرکوب) ترجمه‌ی ژن hunch back در بخش قدامی و فعالیت ژن pulimo می‌شود که مورفوژن خلفی است.

ج) caudal: mRNAی این ژن در بخش خلفی تخمک دارای غلظت بیشتری است و همانند دو ژن nanos و biocide بعد از لقاح بیان می‌شود. بیان این ژن باعث تکامل بخش خلفی می‌شود. بیان ژن caudal یک فعال‌کننده‌ی رونویسی ژن‌های بخش خلفی است.

د) ژن pulimo: mRNAی این ژن در تمام سلول تخمک غلظت یکسان دارد. پروتئین حاصل از ژن pulimo همراه با پروتئین حاصل از ژن nanos رپرسور (سرکوب‌کننده) ژن hunch back است.

نکته۵: مورفوژن اصلی قدامی biocide و مورفوژن اصلی خلفی nanos است.

تست‌های طبقه‌بندی شده فصل چهارم

۱ـ کدام گزینه مفهوم صحیح جمله «بسیاری از ناهنجاری‌های میتوکندریایی، هتروپلاسمیک (Heteroplasmic) هستند.» را می‌سازد؟ (سراسری ۸۷)

۱) میتوکندری‌های سلول‌های متفاوت، حاوی آلل‌های مختلفی هستند.
۲) تنها میتوکندری سلول‌های جنسی حاوی دو آلل متفاوت هستند.
۳) میتوکندری موجود در سلول‌های سوماتیک و جنسی تشابه دارند.
۴) یک سلول حاوی ترکیبی از میتوکندری‌های طبیعی و جهش‌یافته است.

۲ـ پارامیسی کشنده با ژنوتیپ KK تحت شرایطی آمیزش داده می‌شوند که سیتوپلاسم بین آن‌ها مبادله می‌شود. اگر در EXCONJUGANT ها اتوگامی (AUTOGAMY) رخ دهد چند نوع زادگان خواهیم داشت؟ (آزاد ۸۷)

۱) $\frac{۱}{۳}$ حساس: $\frac{۲}{۳}$ کشنده
۲) $\frac{۱}{۲}$ حساس: $\frac{۱}{۲}$ کشنده
۳) $\frac{۲}{۳}$ حساس: $\frac{۱}{۳}$ کشنده
۴) همه کشنده

۳ـ دو سویه کشنده و غیرکشنده پارامیسی (Paramecium) با هم مخلوط می‌شوند. ضمن کانجوگاسیون تبادل سیتوپلاسمی انجام می‌شود. حدود ۲۵ درصد کانجوگانت‌های قبلی (exconjugant) حساس و بقیه کشنده‌اند. در کانجوگانت‌های مختلف اتوگامی (autogamy) رخ می‌دهد. کدام‌یک از جملات ذیل درباره کانجوگانت‌های قبلی کشنده صحیح است؟ (آزاد ۸۸)

۱) $\frac{۲}{۳}$ فقط زادگان کشنده و $\frac{۱}{۳}$ زادگان کشنده و حساس تولید می‌کنند.
۲) $\frac{۱}{۲}$ زادگان کشنده و حساس و $\frac{۲}{۳}$ زادگان حساس تولید می‌کنند.
۳) $\frac{۲}{۳}$ فقط زادگان حساس و $\frac{۱}{۳}$ زادگان کشنده تولید می‌کنند.
۴) $\frac{۱}{۳}$ فقط زادگان کشنده و $\frac{۲}{۳}$ زادگان کشنده و حساس تولید می‌کنند.

۴ـ در مورد DNA میتوکندریایی، گزینه صحیح کدام است؟ (سراسری ۸۹)

۱) نسبت به ژنوم هسته‌ای، تراکم ژنی به مراتب کمتری دارد.
۲) ژنوم آن دارای ۳۷ ژن است.
۳) بیش از ۹۵% ژنوم آن DNA تکراری است.
۴) تمام رمزهای ژنتیکی آن همان کلیدهای رمز DNA هسته‌ای است.

۵ـ کدام‌یک از جملات ذیل غلط است؟ (آزاد ۸۹)

۱) در صورت وجود توارث سیتوپلاسمی فنوتیپ زادگان شبیه فنوتیپ مادر است.
۲) در مواردی که یک صفت مستقل از ژن‌های هسته‌ای تفکیک شود، توارث سیتوپلاسمی است.
۳) در پارامیسی که ژنوتیپ هسته‌ای آن kk است، سیتوپلاسم همیشه فاقد کاپاست.
۴) ذرات کاپا در پارامیسی دارای پروتئین ولی فاقد دی‌ان‌ای‌اند.

۶ـ ژن‌های مربوط به پدیده اکسیداسیون سلولی در کجا قرار دارند؟ (سراسری ۹۱ و ۹۳)

۱) بر روی ژنوم میتوکندری
۲) بر روی ژنوم هسته‌ای
۳) بر روی ژنوم کلروپلاستی
۴) بخشی بر روی ژنوم میتوکندری و بخشی بر روی ژنوم هسته‌ای

۷ـ کدام مورد درباره mtDNA صحیح است؟ (ژنتیک مولکولی - دکتری ۹۳)

۱) توالی مشابه ژنوم هسته را ندارد.
۲) بخشی از ژنوم آن سه‌رشته‌ای است.
۳) دارای فراوانی نوترکیبی بالایی است.
۴) دو رشته آن در یک جهت همانندسازی می‌کنند.

۸ـ اگر تمام زاده‌های حلزون مادهٔ Limnea sp. دارای صدف چپ‌گرد (sinsitral) باشند، در حالی‌که خود به لحاظ فنوتیپ یک والد راست‌گرد (Dextral) است، کدام ژنوتیپ‌ها این حلزون و والدین آن را بهتر توصیف می‌کنند؟ (بیوشیمی - دکتری ۹۴)

۱) خود چپ‌گرد خالص (ss) و والدین: مادر چپ‌گرد خالص و پدر راست‌گرد خالص (SS)
۲) خود چپ‌گرد خالص (ss) و والدین: هر دو راست‌گرد ناخالص (Ss)
۳) خود راست‌گرد خالص و والدین: مادر راست‌گرد خالص و پدر چپ‌گرد خالص
۴) خود راست‌گرد خالص و والدین: مادر راست‌گرد خالص و پدر راست‌گرد ناخالص

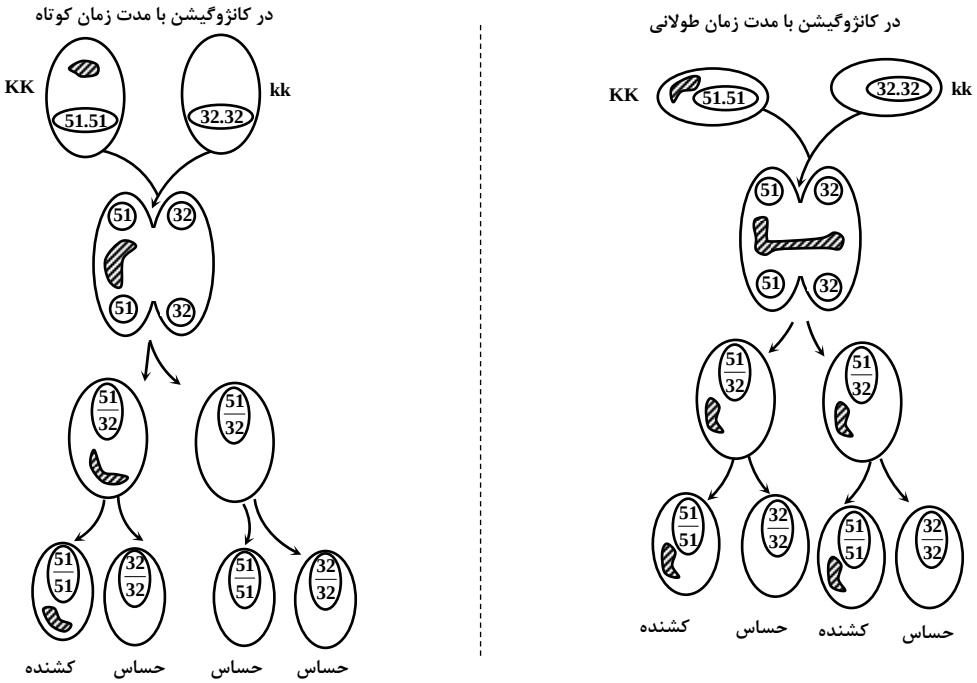
۹ـ علت تفاوت در علائم فنوتیپی بیماری‌زا در بیماری‌های میتوکندریایی در کدام گزینه درست بیان شده است؟ (ژنتیک مولکولی - دکتری ۹۴)

۱) منشأ متفاوت میتوکندری‌های فرد از پدر و مادر
۲) وجود حد آستانه برای جهش‌های میتوکندریائی در بافت‌های مختلف
۳) تجمع جهش‌ها در D لوپ میتوکندری مادری
۴) فقدان پروتئین‌های حفاظتی و نقص در سیستم ترمیم DNA میتوکندری

پاسخنامه تست‌های طبقه‌بندی شده فصل چهارم

۱ـ گزینه «۴» ناهنجاری‌های میتوکندریایی، ناهنجاری‌هایی هستند که به علت جهش در ژنوم میتوکندری ایجاد می‌شوند. چون اسپرم انسان فاقد میتوکندری است، این ناهنجاری‌ها از مادر به ارث می‌رسند (توارث مادری). اگر تمام میتوکندری‌های مادر دارای جهش باشند، ناهنجاری در تمام فرزندان وجود خواهد داشت و مادر حالت homoplasmic دارد. اگر جهش در تعدادی از میتوکندری‌های مادر وجود داشته و در تعدادی دیگر وجود نداشته باشد، مادر حالت Heteroplasmic داشته و شانس داشتن فرزند سالم را دارد.

۲ـ گزینه «۲»



۳ـ هیچ‌کدام از گزینه‌ها صحیح نیست. در اثر اتوگامی، از ۲۵ درصد کانجوگانت‌های حساس، فقط زادگان حساس به‌وجود می‌آید. از ۷۵ درصد کانجوگانت‌های کشنده، در اثر اتوگامی، ۵۰ درصد زادگان حساس و ۵۰ درصد زادگان کشنده ایجاد می‌شود. در نتیجه $\frac{5}{8}$ زادگان حساس و $\frac{3}{8}$ آن‌ها کشنده هستند که با هیچ‌کدام از گزینه‌ها مطابقت ندارد. به عبارت دیگر، $\frac{1}{4}$ زادگان فقط حساس و $\frac{3}{4}$ آنان کشنده و حساس هستند.

۴ـ گزینه «۱» هر سلول دارای تعداد زیادی میتوکندری است و هر میتوکندری دارای چند کپی از ژنوم خود است. اما مجموع تراکم ژنی آن حدود ۱% تراکم ژنی هسته‌ای است. میزان ژن‌های میتوکندری در انسان، گیاهان و مخمر متفاوت است. میتوکندری به علت کوچک بودن اندازه DNA ژنومی، حداکثر استفاده را از ژنوم خود می‌برد؛ یعنی ژن‌های آن اغلب با هم، همپوشانی دارند و مشابه پروکاریوت‌ها فاقد توالی‌های تکراری در ژنوم خود هستند. شباهت دیگر آن با پروکاریوت‌ها فقدان پروتئین‌های هیستونی و وجود پروتئین‌های شبه‌هیستونی است. رمزهای ژنتیکی میتوکندری با رمزهای DNA هسته‌ای متفاوت است و گفته می‌شود میتوکندری به زبان محلی صحبت می‌کند.

۵ـ گزینه «۴» پارامسیوم نوعی پروتوزوآست که از طریق کانژوگیشن تولیدمثل می‌کند. در سیتوپلاسم برخی از انواع پارامسیوم مثل نژاد ۵۱، ذراتی با نام کاپا وجود دارد که در واقع باکتری‌هایی هستند که با فاژهای تولیدکننده پارامایسین هم‌زیستی دارند. پارامایسین یک فاکتور کشنده پارامسیوم است و باعث از بین رفتن سویه‌های حساس پارامسیوم در محیط کشت می‌شود. هر پارامسیوم یک هسته بزرگ و دو هسته کوچک دیپلوئید دارد. هر یک از دو هسته کوچک قبل از آمیزش، میوز انجام داده و چهار سلول هاپلوئید ایجاد می‌کند. از هشت سلول هاپلوئید حاصل، یکی باقی مانده و میتوز می‌کند و بقیه از بین می‌رود. هر سلول پارامسیوم در فرایند کانژوگیشن هسته کوچک خود را به دیگری می‌دهد. اگر زمان کانژوگیشن زیاد باشد علاوه بر تبادل هسته‌ها محتوای سیتوپلاسم هم می‌تواند مبادله شود. ذرات کاپا برای فعال شدن به ژن k نیاز دارند. این ژن به‌صورت غالب بیان می‌شود و در هر دو نژاد ۴۷ و ۵۱ پارامسیوم وجود دارد؛ اما نژاد ۳۱ پارامسیوم فاقد ژن k است و ژنوتیپ kk دارد. از آمیزش نژاد ۵۱ (دارای ذره کاپا) با نژاد ۴۷ (فاقد ذره کاپا)، ۵۰% زاده‌ها همانند نژاد ۵۱ والدی فنوتیپ کشنده را نشان می‌دهند. اگر زمان کانژوگیشن زیاد باشد، ذرات کاپا مبادله شده و تمام زاده‌ها خاصیت تولید پارامایسین را به ارث

برده و کشنده می‌شوند. در آمیزش نژاد ۳۲ با ۵۱ پارامسیوم اگر زمان کانژوگیشن کم باشد فقط $\frac{1}{4}$ زاده‌ها همانند نژاد ۵۱ والدی پارامایسین تولید می‌کنند و کشنده خواهند شد. اگر زمان کانژوگیشن زیاد باشد، $\frac{1}{2}$ زاده‌ها همانند نژاد ۵۱ والدی کشنده می‌شوند.

۶ـ گزینه «۴» پدیده اکسیداسیون سلولی در میتوکندری انجام می‌گیرد و میتوکندری دارای ژن‌های مربوط به این پدیده می‌باشد. اما بعضی از عوامل دخیل در اکسیداسیون، توسط DNAی هسته سلول کد می‌شوند.

۷ـ گزینه «۲» mtDNA به وسیله‌ی پلیمراز گاما رونویسی و به‌وسیله ژنوم هسته‌ای کد می‌شود. رونویسی DNA میتوکندریایی الزاماً با تقسیم میتوکندری همراه نیست به همین دلیل ممکن است در یک میتوکندری چندین نسخه از ژنوم به طور جداگانه موجود باشد که به آن کنکاتامر (concatamer) می‌گویند.

در اغلب پرسلولی‌ها mtDNA از مادر به ارث می‌رسد. مکانیزم‌های این توارث عبارت است از یک رقیق‌سازی ساده (یک سلول تخم شامل ۱۰۰ هزار تا یک میلیون مولکول mtDNA است، در صورتی که یک اسپرم تنها شامل ۱۰۰ تا هزار عدد از آنهاست)، کاهش mtDNA اسپرمی در یک تخم بارور شده و حداقل در تعداد کمی از ارگانیسم‌ها ناکامی mtDNAهای اسپرمی در ورود به تخم. فارغ از اینکه چه مکانیسمی مؤثر واقع شود این الگوی تک‌والدی بودن mtDNA در اکثر جانوران، گیاهان و قارچ‌ها دیده شده است.

در انسان‌ها و احتمالاً به‌طور کلی در همه پرسلولی‌ها در هر سلول بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ کپی متفاوت از mtDNA موجود است (سلول تخم و اسپرم استثنا هستند). در پستانداران هر مولکول mtDNA حلقوی دورشته‌ای شامل ۱۵۰۰۰–۱۷۰۰۰ جفت باز می‌باشد. دورشته mtDNA براساس محتوی هسته ایشان با هم متفاوت می‌شوند به‌طوری‌که رشته با گوانین بیشتر، رشته سنگین‌تر و رشته با سیتوزین بیشتر باعنوان رشته سبک یاد می‌شوند. در یک مجموع ۳۷ ژنی، رشته سنگین ۲۸ ژن و رشته سبک ۹ ژن را کد می‌کند. در این ۳۷ ژن ۱۳ تا برای پروتئین‌ها (پلی‌پپتیدها)، ۲۲تا برای tRNAها و دو تا برای زیربخش‌های کوچک و بزرگ rRNAها هستند. این الگو همچنین در میان اکثر پرسلولی‌ها مشاهده شده است. با وجود این در برخی از موارد یکی یا چند مورد از ۳۷ ژن غایب‌اند و محدوده اندازه mtDNAها بزرگ‌تر است. حتی در میان گیاهان و قارچ‌ها تغییرات بزرگ‌تری در محتوای ژنتیکی و اندازه mtDNAها مشاهده شده است. همچنین به نظر می‌رسد یک زیرمجموعه از ژن‌ها وجود دارد که در همه سلول‌های یوکاریوتی حضور دارد (به استثنای بعضی موارد که به‌طور کلی میتوکندری ندارند). برخی گونه‌های گیاهی مقادیر بسیار زیادی mtDNA دارند (۲۵۰۰۰۰۰ جفت باز در مولکول). با وجود این به طرز غیرمنتظره‌ای حتی این mtDNAهای بزرگ تعداد و انواع برابری ژن در مقایسه با گیاهان با mtDNA کوچک‌تر دارند.

۸ـ گزینه «۲» در صورتی که تمام زاده‌های حلزونی که دارای صدف راست‌گرد است، چپ‌گرد شوند؛ ژنوتیپ والد و زاده‌ها به این صورت است که: والدین هر دو راست‌گرد ناخالص هستند (S_s) و زاده‌ها همگی چپ‌گرد خالص هستند (ss).

۹ـ گزینه «۲» در بیماری‌های میتوکندریایی به علت وجود حد آستانه برای جهش‌های میتوکندریایی صورت گرفته در بافت‌های مختلف، علائم متفاوت فنوتیپی بروز می‌کند.

آزمون فصل چهارم

۱ـ در صورتی که زاده‌های یک حلزون ماده راست‌گرد، همگی راست‌گرد باشند، ژنوتیپ والد نر چه بوده است؟

۱) Dd یا DD ۲) DD ۳) dd ۴) dd یا Dd یا DD

۲ـ کدام گزینه در مورد توارث میتوکندریایی صحیح نمی‌باشد؟

۱) در آمیزش Reciprocal Cross (تعویضی) نتایج زاده‌ها کاملاً تغییر می‌کند.
۲) تعویض هسته‌های سلول‌های زایشی در توارث نقش ندارد.
۳) اصل جدایی در زمان ایجاد گامت در این صفات صادق نیست.
۴) تأثیر هر دو والد در توارث برابر است.

۳ـ کدام گزینه در مورد DNAی میتوکندریایی صحیح است؟

۱) مقدار DNAی میتوکندریایی از DNAی کلروپلاست بیشتر است.
۲) به علت چگالی بیشتر، بعد از سانتریفیوژ شیب غلظت، در ناحیه‌ی پایینDNAی هسته‌ای قرار می‌گیرد.
۳) در مجموع ۳۷ ژن دارد که همگی در زنجیره‌ی انتقال الکترون ایفای نقش می‌کنند.
۴) بیشتر پروتئین‌های میتوکندریایی توسط ژن‌های موجود در DNAی میتوکندری رمز می‌شوند.

۴ـ کدام‌یک از موارد زیر از تفاوت‌های DNAی میتوکندری و DNAی هسته‌ای نمی‌باشند؟

۱) حضور توالی‌های تکراری در ژنوم هسته و عدم حضور توالی تکراری در DNAی میتوکندری
۲) عدم حضور ژن‌های مربوط به RNAهای نان‌کدینگ (بارکدکننده) در DNAی میتوکندری و حضور این ژن‌ها در DNAی هسته‌ای
۳) درصد بالای GC در DNAی میتوکندری نسبت به DNAی هسته
۴) توارث یک‌طرفه‌ی DNAی میتوکندری و توارث دوطرفه‌ی DNAی هسته‌ای

۵ـ DNAی میتوکندری انسان به کدام طریق همانندسازی می‌کند؟

۱) از دو مبدأ در دو جهت ۲) از یک مبدأ در دو جهت
۳) از یک مبدأ در یک جهت ۴) از دو مبدأ در یک جهت

۶ـ یک زن و مرد سالم صاحب سه فرزند شده‌اند که دو فرزند آن‌ها مبتلا به بیماری MERRF می‌باشند و یک فرزند آن‌ها کاملاً سالم است. کدام پدیده این حالت را توجیه می‌کند؟

۱) Imprinting ۲) lyonization ۳) heteroplasmy ۴) incomplete pentrance

۷ـ کدام عبارت در مورد mtDNAی انسان صحیح است؟

۱) حدود ۵۰ ژن بر روی آن قرار دارد. ۲) قطعه‌ی شروع همانندسازی در دو زنجیره یکی است.
۳) در هر نسل فقط تعدادی از ژن‌های آن بیان می‌شوند. ۴) فاقد اینترون و نواحی بین ژنی می‌باشد.

۸ـ علت بیماری MELAS کدام تغییر ژنتیکی زیر می‌باشد؟

۱) تغییر در ژن tRNAی سیتوپلاسمی ناقل لوسین ۲) تغییر در ژن tRNAی میتوکندریایی ناقل لوسین
۳) تغییر در ژن tRNAی میتوکندریایی ناقل لیزین ۴) تغییر در ژن tRNAی سیتوپلاسمی ناقل لیزین

۹ـ از آمیزش پارامسیوم نژاد ۳۱ با ۵۲ اگر زمان مناسب به کانژوگیشن داده شود، چند درصد زاده‌ها کشنده خواهند شد؟

۱) $\frac{۱}{۴}$ ۲) $\frac{۱}{۲}$ ۳) $\frac{۱}{۸}$ ۴) تمام زاده‌ها

۱۰ـ کدام الگوی توارثی هرگز از پدر به فرزند منتقل نمی‌شود؟

۱) توارث وابسته به X غالب ۲) توارث وابسته به X مغلوب
۳) توارث میتوکندریایی ۴) توارث هولاندریک (کروموزوم Y)

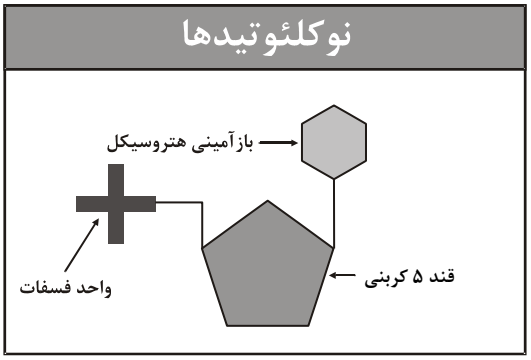
فصل هشتم

«ساختار ژن»

نوکلئوتید

نوکلئوتیدها به‌عنوان واحدهای ساختاری یا بلوک‌های ساختمانی پلیمرهای اسیدنوکلئیک می‌باشند. هر نوکلئوتید از سه جزء قند، باز آلی و فسفات ساخته شده است. اسیدهای نوکلئیک یکی از انواع درشت مولکول‌های زیستی هستند که خود به دو گروه ریبونوکلئیک اسید (RNA) و داکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA) قابل تقسیم هستند.

این دو گروه در نوع قند و دو نوع از بازهای آلی به نام‌های یوراسیل و تیمین با یکدیگر متفاوت‌اند. تفاوت در نوع قند باعث شده تا خصوصیات بیوشیمیایی متفاوتی میان RNA و DNA به‌وجود آید. یکی از مهم‌ترین تفاوت‌ها در دورشته‌ای بودن DNA و تک‌رشته‌ای بودن RNA می‌باشد که منجر به پایداری هرچه بیشتر مولکول DNA شده است. از طرفی DNA با پایداری بالاتر به‌عنوان بانک اطلاعاتی تمامی موجودات زنده عمل می‌کند. در برخی ویروس‌ها این وظیفه برعهده RNA می‌باشد. به هرحال، برعهده داشتن این وظیفه بزرگ تأییدکننده ساختار مناسب اسیدهای نوکلئیک در عمل حفظ و تکثیر دقیق اطلاعات است. در این فصل ابتدا به ساختار و اجزاء تشکیل‌دهنده نوکلئوتیدهای مختلف پرداخته شده است. سپس خصوصیات اسیدهای نوکلئیک مورد بررسی قرار خواهد گرفت.



شکل ۱. ساختار مولکولی عمومی یک نوکلئوتید: قند ۵ کربنی که باز آلی و گروه‌های فسفات به آن متصل می‌شوند

ساختار نوکلئوتید

هر نوکلئوتید از یک باز آلی حلقوی، یک گروه قندی و ۱ الی ۳ گروه فسفات تشکیل شده است.

۱ـ بازهای آلی

بازهای موجود در ساختار اسیدهای نوکلئیک از دو عنصر نیتروژن و کربن ساخته شده‌اند که گروه‌های مختلف مانند آمین، هیدروکسیل، اکسیژن و هیدروژن استخلاف‌های مختلف آن‌ها را پر کرده‌اند و جزء بازهای ناجورحلقه (heterocyclic) محسوب می‌شوند. این مولکول‌ها خود به دو گروه پورین (purine) و پیریمیدین (pyrimidine) قابل تقسیم هستند. بازهای پورینی دوحلقه‌ای و بازهای پیریمیدینی تک‌حلقه‌ای می‌باشند.

از میان ۵ نوع باز آلی موجود در ساختار اسیدهای نوکلئیک، دو باز آدنین (Adenine) و گوانین (Guanine) دوحلقه‌ای و پورین هستند و سه باز سیتوزین (Cytosine)، تیمین (Thymine) و یوراسیل (Uracil) تک‌حلقه‌ای و پیریمیدین هستند. از میان بازهای پیریمیدینی، تیمین مختص به DNA و یوراسیل مختص به RNA است (در برخی موارد باز تیمین در مولکول‌های RNA وارد می‌شود که از آن جمله می‌توان به RNA ناقل اشاره کرد). بقیه بازها شامل آدنین، گوانین و سیتوزین در هر دو نوع اسیدنوکلئیک وجود دارند.

نکته۱: هر نوکلئوتید براساس باز آلی موجود در ساختارش نام‌گذاری می‌شود. برای مثال نوکلئوتیدی که دارای باز آلی آدنین باشد، نوکلئوتید آدنین‌دار یا نوکلئوتید آدنین خوانده شده و با علامت A نشان داده می‌شود. در واقع حرف اول بازهای آلی به عنوان معرف نوکلئوتیدها مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای مثال علامت C در یک ترادف اسید نوکلئیکی نشان‌دهنده نوکلئوتیدهای حاوی باز سیتوزین می‌باشد.

۲ـ قند

قند اسیدهای نوکلئیک شامل دو قند ۵ کربنی ریبوز و داکسی ریبوز (در فرم حلقوی فورانوز) می‌باشد که در فرم حلقوی خودشان وارد ساختار اسیدهای نوکلئیک می‌شوند. این دو قند در استخلاف کربن ۲ با یکدیگر متفاوت هستند. در مولکول ریبوز، کربن شماره ۲ توسط یک گروه هیدروژن و یک گروه هیدروکسیل استخلاف

شده، در صورتی که در قند داکسی ریبوز، کربن شماره ۲ توسط دو گروه هیدروژن استخلاف شده است. ریبوز مخصوص ساختار RNA است و داکسی ریبوز تنها در ساختار DNA یافت می‌شود. گروه اضافه هیدروکسیل روی کربن شماره ۲ قند ریبوز باعث شده که مولکول DNA، حدود ۱۰۰ مرتبه در برابر هیدرولیز مقاوم‌تر از RNA باشد. به احتمال زیاد همین مقاومت باعث شده که این مولکول، از لحاظ تکاملی، به عنوان مخزن اطلاعات ژنتیکی انتخاب شود.

کربن‌های موجود در مولکول قند اسیدهای نوکلئیک با علامت پریم ($'$) نشان داده می‌شوند. برای مثال کربن شماره ۱ به‌صورت $1'$ نشان داده می‌شود. این عمل به این دلیل است که کربن‌های قند با کربن‌های باز آلی اشتباه نشوند. در نتیجه زمانی که برای مثال گفته می‌شود کربن ۴ نوکلئوتید A، به کربن شماره ۴ باز آلی آدنین اشاره دارد. در حالی که وقتی گفته می‌شود کربن $4'$ نوکلئوتید A، به کربن شماره ۴ قند موجود در ساختار نوکلئوتید اشاره دارد.

۳ـ فسفات

هر نوکلئوتید می‌تواند دارای ۱ تا ۳ گروه فسفات باشد که برحسب تعداد به نوکلئوتیدهای منوفسفاته (NMP)، دی‌فسفاته (NDP) و تری‌فسفاته (NTP) تقسیم می‌شوند. گروه فسفات می‌تواند به دو کربن $3'$ یا $5'$ قند متصل شود. نوکلئوتیدهایی که به ساختار اسیدهای نوکلئیک وارد می‌شوند، گروه فسفات را در کربن $5'$ قند حمل می‌کنند و به نوکلئوتیدهای $5'$ تری فسفات معروف هستند. فسفات‌های موجود در نوکلئوتید با نام‌های آلفا (α)، بتا (β) و گاما (γ) معرفی می‌شوند. فسفات آلفا به‌طور مستقیم به کربن $5'$ متصل می‌شود. فسفات بتا به فسفات آلفا متصل شده و در وسط قرار می‌گیرد. فسفات گاما به بتا متصل شده و در انتها قرار دارد. معمولاً نوکلئوتیدهای آزاد به‌صورت سه‌فسفاته هستند، اما هنگامی که در رشته اسید نوکلئیک وارد می‌شوند، دو فسفات را از دست داده و منوفسفاته می‌شوند. پیوندهای میان گروه‌های فسفات بسیار پرانرژی هستند و با شکستن آن‌ها انرژی سایر فرآیندهای سلولی تأمین می‌شود. به‌عبارت دیگر، نوکلئوتیدهای تری‌فسفاته واحدهای پرانرژی موجود در سلول هستند که در بسیاری از واکنش‌ها وارد شده و با شکستن پیوند میان گروه‌های فسفات خود، انرژی سایر واکنش‌ها را تأمین می‌کنند.

نکته۲ : برحسب نوع قند به کار برده شده یا به‌عبارت دیگر، برحسب نوع مولکول اسید نوکلئیک، همچنین برحسب تعداد گروه فسفات، نام‌گذاری نوکلئوتیدها و علامت اختصاری آن‌ها متفاوت است. برای مثال مولکول ATP یک نوکلئوتید دارای باز آلی آدنین، قند ریبوز و سه گروه فسفات است و مخفف عبارت Adenosine tri phosphate می‌باشد. مولکول dADP یک نوکلئوتید دارای باز آلی آدنین، قند داکسی ریبوز و دو گروه فسفات است و مخفف عبارت deoxy Adenosine di phosphate می‌باشد.

مثال۱: کدام باز آلی یک پورین است؟

۱) یوراسیل ۲) تیمین ۳) سیتوزین ۴) گوانین

☑ **پاسخ:** گزینه «۴» دو باز آلی آدنین و گوانین دوحلقه‌ای و پورینی هستند. سه باز یوراسیل، تیمین و سیتوزین تک‌حلقه‌ای و پیریمیدینی می‌باشند.

مثال۲: مولکول dNMP با کدام گزینه مطابقت دارد؟

۱) دارای قند ریبوز و یک گروه فسفات ۲) دارای قند داکسی ریبوز و یک گروه فسفات

۳) دارای قند ریبوز و بدون گروه فسفات ۴) دارای قند داکسی ریبوز و بدون گروه فسفات

☑ **پاسخ:** گزینه «۲» علامت d در ابتدای نام اختصاری مولکول، نشان‌دهنده وجود قند داکسی ریبوز است. این نوکلئوتید در ساختمان DNA به‌کار می‌رود. حرف M نشان‌دهنده یک گروه فسفات است و مخفف کلمه مونو می‌باشد.

مثال۳: کدام باز به‌صورت یک مورد استثنا در مولکول RNA یافت می‌شود؟

۱) آدنین ۲) گوانین ۳) تیمین ۴) یوراسیل

☑ **پاسخ:** گزینه «۳» بازهای آلی آدنین، گوانین، یوراسیل و سیتوزین به‌صورت طبیعی در مولکول RNA وارد می‌شوند. بازهای آلی آدنین، گوانین، تیمین و سیتوزین به‌صورت طبیعی در مولکول DNA وارد می‌شوند. در میان این بازها، باز تیمین در برخی موارد وارد ساختار مولکول‌های RNA می‌شود.

مثال۴: پایداری بالاتر مولکول DNA به کدام دلیل می‌باشد؟

۱) وجود باز تیمین در ساختار DNA ۲) وجود گروه فسفات کمتر در مولکول DNA

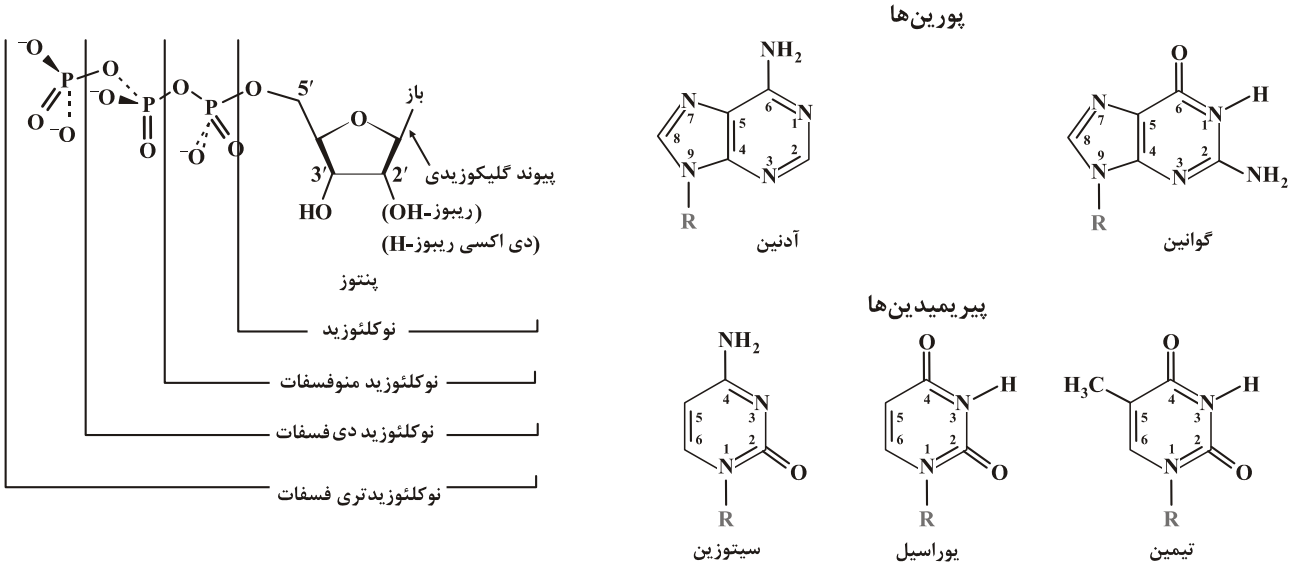
۳) دورشته‌ای بودن مولکول DNA ۴) عدم وجود گروه هیدروکسیل روی قندهای DNA

☑ **پاسخ:** گزینه «۴» مولکول DNA نسبت به RNA حدود ۱۰۰ برابر در مقابل هیدرولیز مقاوم‌تر است. این امر به سبب وجود قندهای متفاوت در ساختار این دو مولکول می‌باشد. قند ریبوز در ساختار RNA روی کربن $2'$ خود گروه هیدروکسیل دارد. در صورتی که قند داکسی ریبوز در ساختار DNA فاقد این گروه است.

نوکلئوزید

از اتصال یک واحد قند و یک واحد باز آلی، نوکلئوزید ایجاد می‌شود. آدنوزین، گوانوزین، سیتیدین و یوریدین نوکلئوزیدهای موجود در RNA و داکسی آدنوزین، داکسی گوانوزین، داکسی سیتیدین و داکسی تیمیدین نوکلئوزیدهای موجود در DNA می‌باشند. پیوند کووالانسی میان قند و باز آلی از اتصالات $\beta-N-$ گلیکوزیدی میان کربن $1'$ قند $(C-1)'$ و نیتروژن ۹ در حلقه پورین‌ها و نیتروژن ۱ در حلقه پیریمیدین‌ها حاصل می‌شود. رسم ساختار استاندارد به‌صورتی است که باز آلی در بالای صفحه قند قرار می‌گیرد. نوکلئوزیدها در محیط‌های قلیایی بسیار پایدارند، اما در محیط‌های اسیدی و تحت حرارت به اجزای تشکیل‌دهنده خود هیدرولیز می‌شوند. این تجزیه در سلول توسط آنزیم نوکلئوزیداز انجام می‌شود، اما به‌طور کلی نوکلئوزیدهای پیریمیدینی از پورینی مقاوم‌تر هستند.

نکته۳: واحدهای نوکلئوزیدی در اثر اضافه شدن ۱ الی ۳ گروه فسفات به نوکلئوتید تبدیل می‌گردند. در زمان سنتز DNA و RNA نوکلئوتیدهایی با سه گروه فسفات مورد استفاده قرار می‌گیرند و با از دست دادن دو گروه فسفات به‌صورت نوکلئوتیدهای مونوفسفاته در اسکلت اسیدهای نوکلئیک مستقر می‌شوند. پیوند فسفات α و β و همچنین بین فسفات β و γ از نوع فسفوانیدریدی یا پروفسفاتی پرانرژی است؛ ولی پیوند بین کربن $5'$ قند و فسفات α از نوع فسفواستری و کم‌انرژی است.



شکل ۲. ساختار مولکولی نوکلئوتیدهای پورینی و پیریمیدینی در اسید ریبونوکلئیک و داکسی ریبونوکلئیک

مثال۵: کدام‌یک از گزینه‌های زیر، واحدهای تشکیل‌دهنده یک نوکلئوتید هستند؟

۱) نوکلئوزید + گروه فسفات ۲) باز پورینی + نوکلئوزید ۳) قند + باز پیریمیدینی ۴) باز پیریمیدین + نوکلئوزید

☑ **پاسخ:** گزینه «۱» توجه داشته باشید که یک نوکلئوزید از یک باز آلی که ممکن است پورین یا پیریمیدین باشد به همراه یک قند تشکیل شده است و با اضافه شدن گروه فسفات به آن یک نوکلئوتید ساخته می‌شود.

مثال۶: پیوند کووالانسی میان قند ریبوز و بازهای پیریمیدینی کدام است؟

۱) کربن $3'$ قند و نیتروژن شماره ۹ باز ۲) کربن $1'$ قند و نیتروژن شماره ۹ باز
۳) کربن $3'$ قند و نیتروژن شماره ۱ باز ۴) کربن $1'$ قند و نیتروژن شماره ۱ باز

☑ **پاسخ:** گزینه «۴» پیوند کووالانسی میان کربن $1'$ قند با نیتروژن شماره ۹ از بازهای پورینی و نیتروژن شماره ۱ از بازهای پیریمیدینی تشکیل می‌شود.

مثال۷: پیوند میان بازهای آلی و مولکول‌های قند در اسیدهای نوکلئیک از کدام نوع است؟

۱) فسفودی استر ۲) N-گلیکوزیدی ۳) اتری ۴) هیدروژنی

☑ **پاسخ:** گزینه «۲» پیوند کووالانسی میان بازهای آلی و مولکول‌های قند، پیوند میان کربن قند و نیتروژن باز آلی است و به پیوند β- N- گلیکوزیدی معروف می‌باشد.

فصل سیزدهم

«سنتز پروتئین»

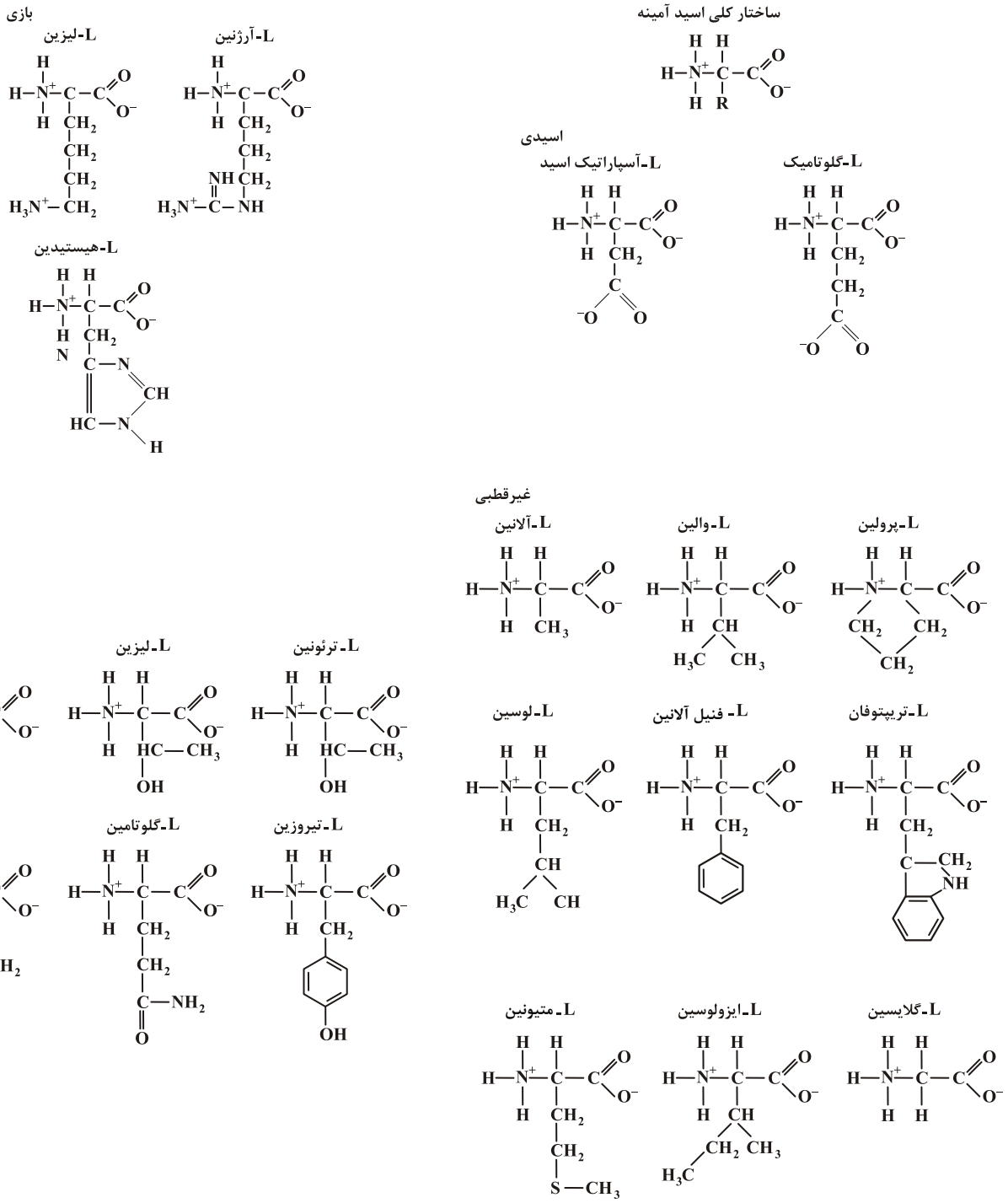
با عبور از اولین مرحله بیان ژن (رونویسی از DNA و تولید نسخه‌های RNA متنوع) مرحله دوم بیان برخی ژن‌ها به‌صورت سنتز پروتئین است. این مرحله آخرین مرحله از اصل central dogma است و مختص به نوع RNA پیامبر، mRNA، می‌باشد. توالی نوکلئوتیدهای DNA به توالی نوکلئوتیدهای RNA تبدیل شده، نهایتاً به‌صورت توالی آمینواسیدی پروتئین‌ها ترجمه می‌شود. تمامی پروتئین‌ها در همه سیستم‌های زنده، تنها از ۲۰ نوع آمینواسید ساخته شده‌اند. البته در میان آن‌ها آمینواسیدهای استثناء نیز مشاهده می‌شوند. برای مثال، سلنوسیستئین یک آمینواسید دیگر است که تنها در ساختار برخی پروتئین‌ها وارد می‌شود. آمینواسیدها به دلیل وجود کربن α در ساختارشان که با ۴ گروه متفاوت در اتصال است، به‌عنوان آمینواسیدهای α نیز معرفی می‌شوند. این ۴ گروه شامل گروه کربوکسیل، گروه آمین، اتم هیدروژن و یکی از ۲۰ نوع متفاوت گروه R یا زنجیره جانبی است. تنها موردی که از این حالت پیروی نمی‌کند، آمینواسید گلیسین است که گروه R آن تنها یک اتم هیدروژن است و در نتیجه کربن α آن به ۴ گروه متفاوت متصل نمی‌باشد. در واقع، می‌توان گفت که خصوصیت ویژه هر آمینواسید وابسته به گروه R می‌باشد که در برخی آمینواسیدها خاصیت بازی، در برخی خاصیت اسیدی، در برخی آروماتیک و در برخی آلیفاتیک است.

تمامی آمینواسیدها دارای گروه آمین هستند و تنها مورد استثنا پرولین است که حاوی یک گروه ایمین به جای آمین می‌باشد و در حقیقت یک ایمینواسید (imino acid) است. این مسأله به دلیل شرکت گروه آمین در ساختار حلقوی این آمینو اسید می‌باشد. به دلیل وجود اتم نامتقارن مرکزی (خاصیت کایرالیته)، آمینواسیدها به جز گلیسین خاصیت نوری (optical property) از خود نشان می‌دهند. در نتیجه خاصیت نوری، دو فرم متفاوت از آن‌ها به‌صورت L و D وجود دارند که تصویر آینه‌ای یکدیگرند. تمامی آمینواسیدهایی که در ساختار پروتئین‌های بیولوژیکی شرکت می‌کنند، فرم L هستند.

اگرچه بسیاری از پروتئین‌ها دارای آمینواسیدهای غیرمعمول هستند، تقریباً می‌توان گفت که تمامی آمینواسیدهای غیرمعمول از تغییرات پس از ترجمه‌ای روی آمینواسیدها حاصل می‌شوند. به هرحال آمینواسید سلنوسیستئین به‌طور مستقیم در ساختار برخی از پروتئین‌ها وارد می‌شود، مانند آنزیم فرمات دهیدروژناز موجود در سلول‌های پروکاریوتی که در جایگاه فعال خود دارای اتم سلنیوم است. سلنوسیستئین توسط یک tRNA جدید شناسایی می‌شود. این tRNA توالی کدون خاتمه UGA را در mRNA شناسایی می‌کند و به شرطی که این کدون خاتمه در یک ساختار ثانویه ساقه ـ حلقه ویژه قرار بگیرد به آن متصل می‌شود. tRNA سلنوسیستئین ابتدا با آمینواسید سرین شارژ می‌شود و سپس سرین به سلنوسیستئین تغییر می‌یابد. علاوه بر ساختار ثانویه ذکر شده در ناحیه کدون UGA، یک فاکتور طویل‌سازی سلنوسیستئین (selenocysteine elongation factor: SEF) در ریبوزوم نیاز است. احتمالاً برای وارد شدن این آمینواسید غیرمعمول به ساختار برخی از پروتئین‌های یوکاریوتی نیز مکانیسم مشابهی استفاده می‌شود.

پروتئین‌ها زنجیره‌های پلی پپتیدی هستند که پس از برقراری اتصال پپتیدی میان آمینواسیدها به‌وجود می‌آیند. هر اتصال پپتیدی میان گروه آمین آمینواسید جدید و گروه کربوکسیل آمینواسید قدیمی به‌وجود می‌آید؛ لذا می‌توان گفت که پروتئین، زنجیره پلی پپتیدی است که در یک انتهای آن گروه آمین آزاد (N-terminal) و در انتهای دیگر آن گروه کربوکسیل آزاد (C-terminal) وجود دارد. پس از این که آمینواسیدها وارد ساختار پروتئین می‌شوند، باقیمانده (residue) نام دارند؛ زیرا برقراری اتصال پپتیدی نیاز به جدا شدن یک مولکول آب دارد.

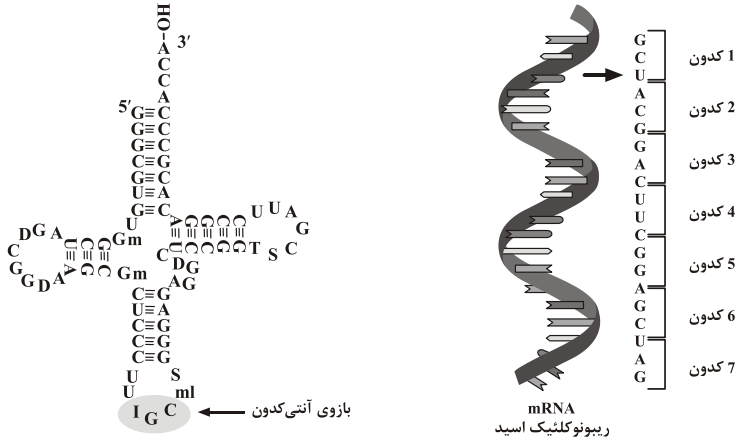
توالی حاصل از پلیمریزه شدن آمینواسیدها تعیین‌کننده ساختار اول (primary structure) پروتئین است. همچنین ساختار اول پروتئین شامل پل‌های دی سولفیدی میان آمینواسیدهای سیستئین نیز می‌شود. پلی پپتیدها می‌توانند درون ساختارهای متفاوت پیچیده شوند که شایع‌ترین آن‌ها شامل ساختار هلیکس α(αhelix) و صفحات β(βsheet) می‌باشد. چنین ساختارهایی در واقع تشکیل‌دهنده ساختار دوم (secondary structure) پروتئین‌ها هستند. برخی پروتئین‌ها به‌صورت خودبه‌خود می‌توانند ساختار ثانویه مناسب خود را به‌دست آورند و برخی دیگر برای رسیدن به این ساختار نیازمند کمک پروتئین‌های دیگر هستند. پیچش بیشتر در این پروتئین‌ها باعث می‌شود تا انواع ساختارهای ثانویه در کنار هم قرار گیرند و ساختار سوم را (tertiary structure) به‌وجود آورند. بسیاری از پروتئین‌ها در حالت فعال خود دارای چند زیرواحد متفاوت یا یکسان می‌باشند. چنین پروتئین‌هایی که از اتصال زیرواحدهای متعدد به‌وجود می‌آیند در ساختار چهارم (quaternary structure) قرار دارند. فرآیند ترجمه یا سنتز پروتئین، فرآیندی است که در آن ساختار اول پروتئین با استفاده از توالی نوکلئوتیدی RNA پیامبر مشخص می‌شود.



شکل ۱. طبقه‌بندی آمینواسیدها براساس گروه R

جایگاه سنتز پروتئین در تمامی سلول‌ها، ماشین ریبونوکلئوپروتئینی ریبوزوم است. اطلاعات موجود در DNA پس از نسخه‌برداری و انتقال به RNA پیامبر، mRNA، توسط ریبوزوم ترجمه می‌شود. هر سه نوکلئوتید موجود در RNA به‌عنوان رمز یا کدون(codon) می‌تواند یک آمینواسید ویژه را به ریبوزوم معرفی کرده و در زنجیره پلی پپتید قرار دهد (شکل ۲).

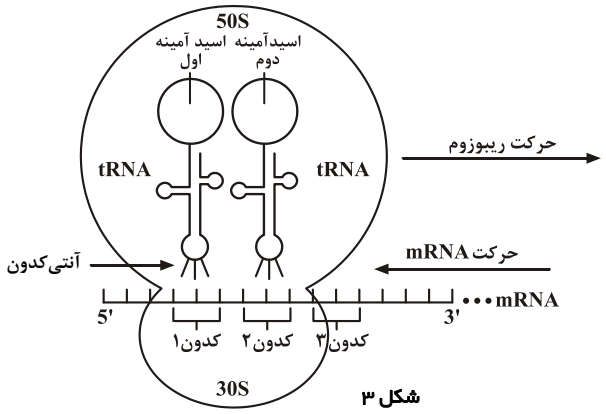
آمینواسیدها تنها زمانی به ریبوزوم انتقال می‌یابند که به RNA ناقل یا tRNA مخصوص خود متصل باشند. هر مولکول tRNA، در نقطه‌ای مقابل به جایگاه اتصال آمینو اسید، دارای توالی ۳ نوکلئوتیدی آنتی‌کدون (anticodon) یا ضدرمز است.



شکل ۲

این توالی مکمل توالی کدون در مولکول mRNA است و به شرط برقراری رابطه مکملی میان کدون و آنتی‌کدون، tRNA آمینواسید خود را به ریبوزوم تحویل می‌دهد تا وارد ساختار پروتئین در حال سنتز شود.

برقراری پیوند پپتیدی میان دو آمینواسید با آزاد شدن tRNA اول و سوار شدن زنجیره در حال رشد روی آمینواسید متصل به tRNA دوم همراه است. پس از این عمل، مولکول mRNA یک کدون به سمت جلو حرکت می‌کند و یک مولکول tRNA جدید می‌تواند به کدون جدید متصل شده و آمینواسید بعدی وارد زنجیره شود. این چرخه ادامه می‌یابد و tRNA قبلی پس از برقراری اتصال پپتیدی میان آمینواسید دوم و سوم، آزاد شده و زنجیره در حال رشد روی tRNA سوم سوار می‌شود (شکل ۳).



شکل ۳

مثال۱: گزینه نادرست را انتخاب کنید.

۱) خصوصیت ویژه هر آمینواسید وابسته به گروه R است.

۲) تنها ۲۰ نوع آمینواسید متفاوت در طبیعت شناخته شده است.

۳) آمینواسید پرولین به دلیل ساختار ویژه حلقوی‌اش یک ایمینواسید محسوب می‌شود.

۴) تمامی آمینواسیدهای موجود در ساختارهای بیولوژیکی فرم L هستند.

☑ **پاسخ:** گزینه «۲» آمینواسیدهای متعدد بسیاری در طبیعت شناخته شده‌اند اما، از میان آن‌ها (غیر از برخی آمینواسیدهای استثناء) تنها ۲۰ نوع آمینواسید تشکیل‌دهنده ساختار پروتئین‌ها هستند.

مثال۲: آمینواسید سلنوسیستئین .....

۱) مانند ۲۰ آمینواسید دیگر در ساختار پروتئین‌ها شایع است.

۲) tRNA آن ابتدا با آمینواسید سیستئین شارژ می‌شود.

۳) در هنگام شارژ شدن tRNA به یک فاکتور طویل‌سازی ویژه نیاز دارد.

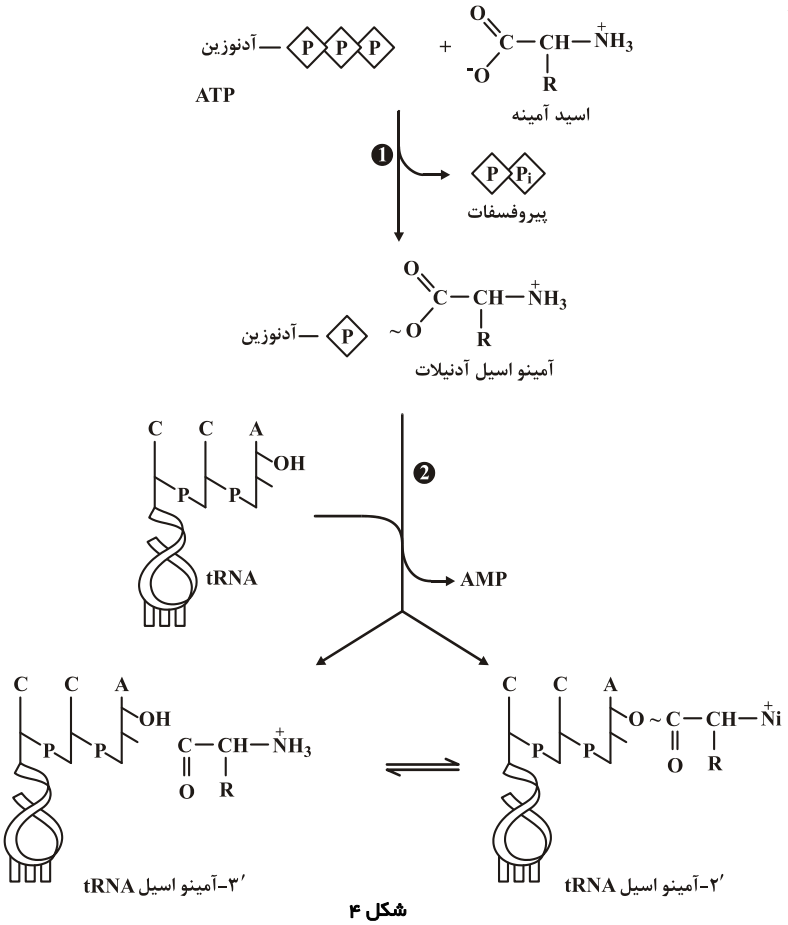
۴) انتقال‌دهنده اتم سلنیوم به جایگاه فعال آنزیم فرمات دهیدروژناز است.

☑ **پاسخ:** گزینه «۴» آمینواسید سلنوسیستئین تنها در برخی پروتئین‌های خاص وارد می‌شود و برای انتقال به ریبوزوم به یک فاکتور طویل‌سازی ویژه نیاز دارد. مولکول tRNA آن ابتدا با آمینواسید سرین شارژ می‌شود. با حضور این آمینواسید در آنزیم فرمات دهیدروژناز، اتم سلنیوم به جایگاه فعال آنزیم انتقال می‌یابد.

مولکول‌های مورد نیاز در مرحله آغاز ترجمه

در واقع عملکرد tRNA، تضمین ورود آمینواسید صحیح و مطابق با کدون mRNA است. مولکول tRNA برای انجام این عمل از ساختار ویژه خود کمک می‌گیرد. هر مولکول tRNA در یک انتها دارای جایگاه اتصال به آمینواسید و در انتهای مقابل دارای توالی آنتی‌کدون متناسب با آمینواسید اتصالی است. آمینواسید صحیح، آمینواسید متناسب با توالی آنتی‌کدون، توسط آنزیم آمینواسیل-tRNA سنتتاز (aminoacyl- tRNA synthetase) به tRNA مناسب متصل می‌شود. مولکول tRNA متصل با آمینواسید مناسب، tRNA شارژ شده (charged tRNA) نام دارد. برای اتصال آمینواسید به tRNA، یک واکنش دومرحله‌ای در سطح آنزیم رخ می‌دهد. در مرحله اول، آمینواسید توسط یک مولکول ATP فعال می‌شود. در مرحله دوم، آمینواسید فعال با پیوند پر انرژی به کربن ′۲ یا ′۳ قند ریبوز نوکلئوتید انتهای ′۳ مولکول tRNA متصل می‌شود. در باکتری‌ها، ۲۰ آنزیم آمینواسیل-tRNA سنتتاز وجود دارد که هر کدام یک آمینواسید را شناسایی می‌کند. در نتیجه، می‌توان گفت که هر آنزیم علاوه بر شناسایی یک آمینواسید ویژه، تمامی مولکول‌های tRNA مربوط به آن آمینواسید را نیز شناسایی می‌کند.

در یوکاریوت‌ها، دو گروه متفاوت شامل ۲۰ آنزیم آمینواسیل-tRNA سنتتاز سیتوپلاسمی و ۲۰ نوع میتوکندریایی وجود دارد که البته تمامی آن‌ها توسط ژنوم هسته کد می‌شوند.

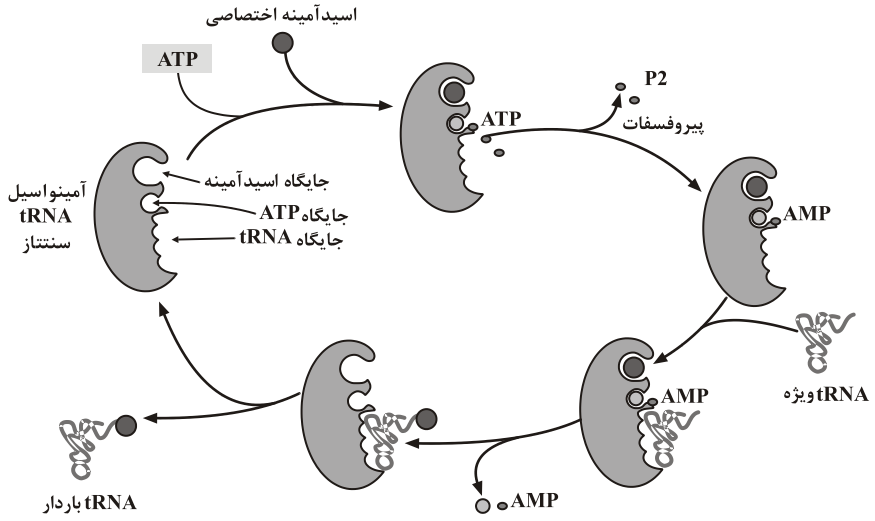


شکل ۴

آنزیم‌های آمینواسیل-tRNA سنتتاز، یک گروه هتروژن آنزیمی‌اند. در سلول E.coli، این آنزیم‌ها از حالت مونومر تا تترامر (دو کپی از دو زیرواحد) یافت می‌شوند. این آنزیم‌ها از لحاظ تشابه توالی، شکل ساختاری آنزیم و اتصال آمینواسید به $2'-OH$ (class I) یا $3'-OH$ (class II)، به دو گروه تقسیم می‌شوند.

برای برقراری اتصال میان آمینواسید و tRNA مناسب، آنزیم قسمت‌های مختلفی از ساختار tRNA را شناسایی می‌کند. چنین مطالعاتی با استفاده از جهش یافته‌های مختلف انجام شده است. در سلول E.coli، حدود ۱۷ آنزیم از ۲۰ آنزیم سنتتاز، با استفاده از آنتی‌کدون، آمینواسید صحیح را شناسایی می‌کنند. این امر نشان‌دهنده این مطلب است که آنتی‌کدون عنصر تعیین‌کننده اصلی در tRNA می‌باشد.

آنزیم آمینواسیل-tRNA سنتتاز همچنین می‌تواند در ابتدا آمینواسید اشتباه را به tRNA متصل کند. برای مثال والین را به جای لوسین به tRNA مربوطه متصل می‌کند. دلیل این اشتباه، شباهت ساختاری دو آمینواسید والین و ایزولوسین است و در نتیجه والین به اشتباه می‌تواند جایگاه فعال آنزیم سنتتاز را پر کند. به دلیل مرحله اصلاح، (proofreading) تنها یک آمینواسید اشتباه از هر ۲۷۰ الی ۸۰۰ اشتباه می‌تواند به tRNA نادرست متصل بماند. در مرحله اصلاح قبل از جدا شدن آمینواسیل-tRNA از جایگاه فعال آنزیم سنتتاز، پیوند میان آمینواسید و tRNA هیدرولیز می‌شود.



شکل ۵

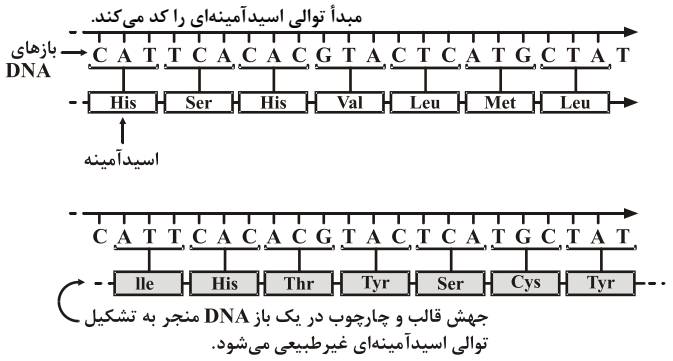
نرخ کلی اشتباه حاصل از دو مرحله شارژ tRNA حدود ۱ آمینواسیل-tRNA نادرست در هر ۶۰۰۰۰ تا ۸۰۰۰۰ مولکول شارژ شده است. در برخی موارد، تعداد آنزیم‌های آمینواسیل-tRNA سنتتاز موجود در سلول کمتر از ۲۰ است. برای مثال در بعضی از آرکی‌باکترها آنزیم سیستئینیل-tRNA سنتتاز وجود ندارد و آنزیم پرولیل-tRNA سنتتاز هر دو آمینواسید سیستئین و پرولین را به‌طور صحیح به tRNA مربوط به آن‌ها متصل می‌کند. در بعضی از یوباکترها نیز آنزیم گلوتامینیل-tRNA سنتتاز وجود ندارد و مولکول گلوتامیل-tRNA از گلوتامیک اسید شارژ شده به‌وجود می‌آید. این فرآیند توسط یک آنزیم آمیدوترانسفراز انجام می‌شود که گروه آمید را پس از مرحله شارژ شدن به گلوتامیک اسید اضافه کرده و گلوتامین به‌وجود می‌آید.

۶۴ کدون ممکن در کدهای ژنتیکی ۳ تایی وجود دارند (۴ باز نوکلئوتیدی در گروه‌های ۳تایی: ۶۴=۴×۴×۴). ۳ تا از این کدون‌ها به عنوان علامت پایان سنتز پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرند. در نتیجه ۶۱ مولکول tRNA برای خواندن ۶۱ کدون غیرپایانی نیاز است. حدود ۵۰ مولکول tRNA در سلول E.coli شناسایی شده است. عدد ۵۰ به جای ۶۱ می‌تواند توسط فرضیه لغزش (wobble phenomenon) شرح داده شود که در جایگاه سوم کدون قرار دارد. مولکول tRNA مربوط به هر آمینواسید به‌صورت قراردادی با نوشتن نام آمینواسید به‌صورت توان مشخص می‌شود. برای مثال $tRNA^{leu}$ ، tRNA مربوط به آمینواسید لوسین است.

مولکول‌های آمینواسیل-tRNA در حین فرآیند سنتز پروتئین به جایگاه مربوطه در ریبوزوم وارد می‌شوند؛ اما آیا ریبوزوم آمینواسید را شناسایی می‌کند و آن را تحویل می‌گیرد یا با شناسایی tRNA مناسب مربوط به کدون، سنتز پروتئین پیش می‌رود؟

یک آزمایش ساده برای پاسخ به این سؤال انجام شد. پس از جمع‌آوری سیستئینیل-tRNA از سلول، در آزمایشگاه و به‌طور شیمیایی، سیستئین به آلانین تبدیل شد. این عمل با استفاده از ترکیب نیکل Raney انجام شد که یک شکل کاتالیزی از نیکل است و قادر به برداشت گروه SH از سیستئین می‌باشد. زمانی که از این آمینواسیل ـ tRNAهای اشتباه در سنتز پروتئین استفاده شد، آلانین به‌طور اشتباه در جایگاه سیستئین وارد ساختار پروتئین شد. این آزمایش نشان داد که مولکول tRNA، و نه آمینواسید، در حین فرآیند سنتز پروتئین مورد شناسایی دستگاه ترجمه قرار می‌گیرد. به عبارت ساده‌تر، آنزیم آمینواسیل-tRNA سنتتاز در یک فرآیند تشخیصی، آمینواسید مناسب را به tRNA مناسب متصل می‌کند. در حین پروتئین‌سازی، با استفاده از برقراری رابطه مکملی میان توالی کدون mRNA و توالی آنتی‌کدون tRNA، آمینواسید مناسب در ساختار پروتئین قرار داده می‌شود و خود آمینواسید به‌طور مستقیم دخیل نیست.

فرآیند سنتز پروتئین یا به عبارت بهتر، ترجمه توالی نوکلئوتیدی به توالی آمینواسیدی، می‌تواند به ۳ مرحله مجزا تقسیم شود: مرحله آغاز (initiation)، مرحله طویل‌سازی (elongation) و مرحله پایان (termination). مرحله طویل‌سازی شامل اضافه شدن مکرر آمینواسیدها به زنجیره پپتیدی در حال رشد است. شروع دقیق فرآیند پروتئین‌سازی بسیار مهم است. همان‌طور که اشاره شد کدهای ژنتیکی از ۳ نوکلئوتید تشکیل شده‌اند. قالب خواندن کدون‌ها به‌طور کامل تغییر کرده و یک پروتئین کاملاً متفاوت تولید خواهد شد که هیچ شباهتی به پروتئین مورد انتظار ندارد (جهش تغییر قالب خواندن (frame shift mutation)



شکل ۶

نیز به همین صورت باعث ایجاد پروتئین متفاوت می‌شود. این جهش در اثر اضافه یا کم شدن یک یا چند باز که مضرب عدد ۳ نمی‌باشند، باعث تغییر نحوه خواندن کدون‌ها می‌شود).

سنتز هر پروتئین در باکتری E.coli با یک آمینواسید تغییر یافته، به نام N-فرمیل متیونین آغاز می‌شود. در هر صورت، می‌توان گفت هیچ یک از پروتئین‌های کامل شده در E.coli دارای این آمینواسید غیرمعمول نیستند. بسیاری از این پروتئین‌ها حتی در انتهای آمین خود، آمینواسید متیونین هم ندارند. در واقع قبل از اینکه هر پروتئین سنتز شده به یک پروتئین عملکردی تبدیل شود، آمینواسید ابتدایی آن تغییرکرده یا حذف می‌شود. در یوکاریوت‌ها، به جای N-فرمیل متیونین، آمینواسید آغازگر، متیونین است. کدون متیونین $5' - AUG - 3'$ است که به عنوان کد آغازی نیز معروف می‌باشد. این آمینواسید دارای دو tRNA با ساختار متفاوت است که هر دو در توالی آنتی‌کدون به‌صورت $3' - UAC - 5'$ هستند. در پروکاریوت‌ها، یکی از آن‌ها که به‌صورت $tRNA_f^{met}$ نشان داده می‌شود، جزئی از کمپلکس آغازگر است. قبل از آغاز ترجمه، متیونین متصل به این tRNA به‌صورت شیمیایی تغییر کرده و به N- فرمیل متیونین تبدیل می‌شود (fMet). مولکول RNA ناقل دیگر به‌صورت $tRNA_m^{Met}$ نشان داده می‌شود و متیونین آن تغییر نخواهد کرد. ماشین ترجمه از این tRNA درون ساختار پروتئین، و نه در ابتدای پروتئین، استفاده می‌کند؛ در نتیجه می‌توان گفت که سلول دارای یک مکانیسم تشخیصی برای تفکیک این دو نوع متیونین و جایگاه‌های قرارگیری آن‌ها می‌باشد. در پروکاریوت‌ها ساختار tRNA آغازی به گونه‌ای است که می‌تواند رمزهای AUG، GUG و به ندرت UUG را به عنوان کدون آغازی شناسایی کرده و به آن‌ها متصل شود. از آنجا که متیونین آغازی در سلول‌های یوکاریوتی فرمیله نیست، با علامت i به معنی آغاز نشان داده می‌شود: $tRNA_i^{Met}$. مانند سلول‌های پروکاریوتی، در یوکاریوت‌ها متیونین درون ساختار پروتئین، توسط tRNA متفاوتی انتقال می‌یابد که با علامت $tRNA_i^{Met}$ نشان داده می‌شود.

مثال۳: در سلول‌های پروکاریوت، توالی موجود در آنتی‌کدون برای شناسایی رمز آغازی کدام است؟

۱) $3' - AUG$ ۲) $3' - UAG$ ۳) $3' - UAC$ ۴) $5' - UAC$

☑ **پاسخ:** گزینه «۳» توالی کدون آغازی در پروکاریوت‌ها، $5' - AUG$ است و برای شناسایی آن دو مولکول tRNA در سلول حضور دارند. یکی از آن‌ها توالی کدون آغازی و دیگری توالی کدون‌های درونی را شناسایی می‌کند. هر دو مولکول tRNA دارای توالی آنتی‌کدون $3' - UAC$ می‌باشند.

مثال۴: در ارتباط با فرآیند آغاز ترجمه، کدام گزینه صحیح است؟

۱) ریبوزوم، تنها tRNA را شناسایی می‌کند و آمینواسید، مورد شناسایی آن قرار نمی‌گیرد.
۲) ریبوزوم، هر دو مولکول tRNA و آمینواسید را شناسایی می‌کند.
۳) مولکول tRNA آغازی در یوکاریوت‌ها $tRNA_f^{met}$ است.
۴) تعداد ۶۱ مولکول tRNA برای شناسایی رمزهای آمینواسیدها لازم است.

☑ **پاسخ:** گزینه «۱» به دلیل وجود فرضیه لغزش، تعداد مولکول‌های tRNA موجود در سلول کمتر از ۶۱ است. ریبوزوم تنها tRNA را شناسایی می‌کند و در صورتی که آمینواسید اشتباه با یک tRNA همراه باشد، این مولکول اشتباه وارد ساختار پروتئین می‌شود.

مثال۵: گزینه صحیح را انتخاب کنید.

۱) آمینواسیدها تنها به انتهای $3'$ مولکول tRNA متصل می‌شوند.
۲) آمینواسیدها تنها به انتهای $2'$ مولکول tRNA متصل می‌شوند.
۳) در آرکی‌باکترها مانند یوکاریوت‌ها، ۲۰ آنزیم آمینواسیل-tRNA سنتتاز در هر سلول حضور دارد.
۴) میتوکندری سلول یوکاریوتی دارای آنزیم‌های آمینواسیل-tRNA سنتتاز مخصوص به خود است.

☑ **پاسخ:** گزینه «۴» در سلول‌های یوکاریوتی ۲۰ نوع آنزیم آمینواسیل-tRNA سنتتاز سیتوپلاسمی و ۲۰ نوع میتوکندریایی وجود دارد.

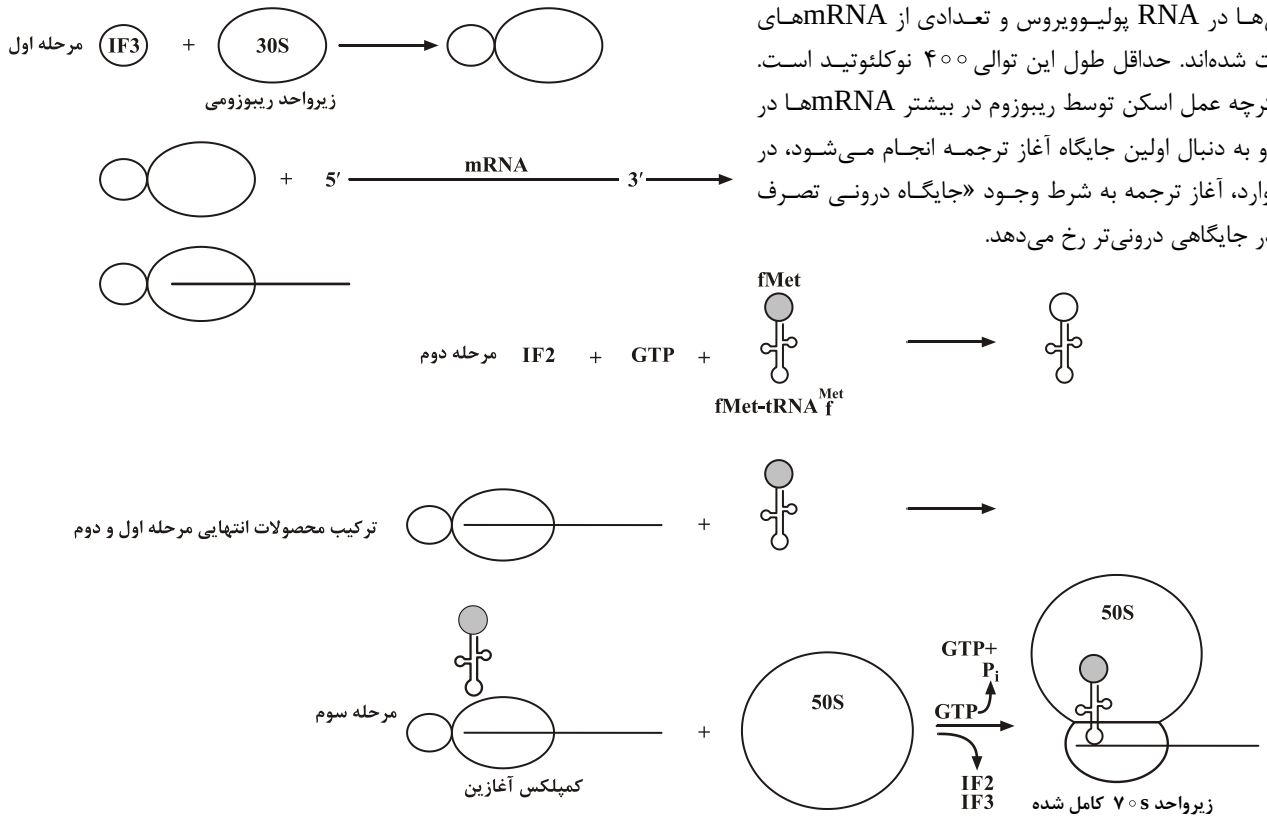
آغاز ترجمه

دو زیرواحد ریبوزوم معمولاً زمانی که در فرآیند ترجمه شرکت نمی‌کنند، به‌صورت دو زیرواحد مجزا از هم درون سیتوزول یافت می‌شوند. برای آغاز ترجمه، یک کمپلکس آغازگر تشکیل می‌شود که در سلول‌های پروکاریوتی از این اجزاء تشکیل شده است: زیرواحد کوچک ریبوزوم (۳۰S)، RNA پیامبر (mRNA)، N- فرمیل متیونین شارژ شده ($fMET - tRNA_f^{Met}$) و سه فاکتور آغازگر (IF۱, IF۲, IF۳). فاکتورهای آغازگر (مانند فاکتورهای طویل‌سازی و فاکتورهای خاتمه) توسط پیوندهای سست غیرکووالانسی به ریبوزوم متصل می‌شوند. اجزاء تشکیل‌دهنده کمپلکس آغازگر در یک سری از مراحل با هم برهمکنش می‌دهند. IF۳ به زیرواحد ۳۰S متصل شده و به آن اجازه می‌دهد که علاوه بر ممانعت از اتصال به زیرواحد ۵۰S، به mRNA متصل شود. همچنین کمپلکسی میان IF۲، N-فرمیل متیونین شارژ شده و یک مولکول GTP تشکیل می‌شود. در نتیجه می‌توان گفت IF۲ مولکول tRNA آغازی را به ریبوزوم تحویل می‌دهد. IF۲ تنها به tRNA آغازی شارژ شده متصل می‌شود و بدون IF۲، tRNA نمی‌تواند به ریبوزوم انتقال یابد. آخرین مرحله برای تشکیل کمپلکس آغازی اتصال این دو جزء با یکدیگر است. هیدرولیز مولکول GTP به GDP و Pi و آزاد شدن انرژی باعث ایجاد تغییر ساختاری می‌شود. این تغییرات ساختاری اجازه می‌دهند که کمپلکس آغازی به زیرواحد ۵۰S ریبوزوم متصل شده و فاکتورهای آغازی به همراه GDP جدا شوند.

در یک سلول، مولکول‌های پرانرژی مانند GTP و ATP با هیدرولیز پیوندهای فسفاته باعث تأمین انرژی فرآیندهای مختلف متابولیکی می‌شوند. به هرحال هیدرولیز مولکول پرانرژی در تشکیل کمپلکس آغازی، باعث تغییرات ساختاری و جدا شدن فاکتورهای آغازی از ریبوزوم ۷۰S می‌شوند. IF۱ به دو فاکتور آغازی دیگر کمک می‌کند تا به زیرواحد ۳۰S ریبوزوم متصل شوند یا به عبارتی باعث پایداری کمپلکس آغازی ۳۰S می‌شود. در سلول‌های یوکاریوتی، فرآیند آغاز ترجمه مشابه پروکاریوت‌هاست. فاکتورهای آغازکننده در یوکاریوت‌ها برای تفکیک از انواع پروکاریوتی با علامت e مشخص می‌شوند: eIF۱، eIF۲ و eIF۳. حداقل ۱۱ فاکتور آغازی در شروع ترجمه یوکاریوت‌ها دخالت دارند که شامل یک پروتئین متصل‌شونده به cap ویژه (eIF4E) نیز می‌شوند.

در سلول‌های پروکاریوت، ظاهراً ریبوزوم از طریق برقراری یک رابطه مکملی میان انتهای ′۳ مولکول ۱۶srRNA و منطقه کمی بالادست جایگاه آغاز ترجمه (AUG) روی mRNA، به mRNA متصل می‌شود. این توالی به توالی شاین-دالگارنو (Shine-Dalgarno sequences) معروف است و بر روی mRNA شامل ۷ نوکلئوتید AGGAGGU می‌باشد. اگرچه میان RNA زیرواحد ریبوزومی کوچک پروکاریوتی و یوکاریوتی همولوژی وجود دارد اما، توالی شاین- دالگارنو در یوکاریوت‌ها وجود ندارد. ترتیب حفاظت‌شده دیگری که به توالی Kozak (کوزاک) معروف است با توالی ′۳ – (GCC)GCCRCCAUGG – ′۵ در سمت ′۵ mRNA یوکاریوتی قرار دارد که احتمالاً نقش مهمی در آغاز ترجمه ایفا می‌کند (R یک نوکلئوتید پورین است). همچنین مکانیسم شناسایی انتهای ′۵ مولکول mRNA در یوکاریوت‌ها می‌تواند براساس شناسایی ′۵cap مولکول mRNA، توسط پروتئین‌های متصل‌شونده به cap و اتصال متعاقب فاکتورهای آغازی دیگر و نهایتاً زیرواحد کوچک ریبوزوم باشد. سپس زیرواحد کوچک در طول mRNA به سمت پایین دست (انتهای ′۳) حرکت می‌کند. این حرکت ادامه می‌یابد تا توالی کدون آغازین توسط ریبوزوم شناسایی شود. این مدل به عنوان فرضیه scanning معروف است. در برخی یوکاریوت‌ها، فرآیندی به نام تغییر جهت (shunting) وجود دارد که در آن اولین کدون AUG به عنوان رمز آغازی استفاده نمی‌شود. پس از آغاز فرآیند اسکن mRNA، قسمتی از منطقه بالادست کدون آغازی میانبر زده می‌شود که این منطقه به رهبر (leader) یا منطقه ترجمه نشده ′۵، (′۵untranslated region : ′۵UTR) معروف است. پس از عبور از این قسمت که دربردارنده یک یا چند رمز آغازی است، ریبوزوم به رمز آغازین درونی‌تری می‌رسد و ترجمه را آغاز می‌کند. احتمالاً دلیل فرآیند تغییر جهت، ایجاد ساختار ثانویه در RNA پیامبر و در قسمت بالادست کدون آغازی یا در منطقه رهبر می‌باشد. در برخی از موارد ژن‌های کوچک یا قالب‌های باز خواندن (ORFs) کوچکی در این مناطق یافت می‌شود. احتمالاً این ORFها در فرآیند تغییر جهت نقش دارند. به‌علاوه به نظر می‌رسد که برخی از ORFها ترجمه می‌شوند و ژن اصلی به دنبال ترجمه آن‌ها، توسط همان ریبوزوم ترجمه می‌شود. این فرآیند به آغاز مجدد (reinitiation) معروف است که در برخی ویروس‌های جانوری و گیاهی مشاهده شده است. در برخی از شرایط، ریبوزوم‌های یوکاریوتی تنها در صورت وجود توالی «جایگاه درونی تصرف ریبوزوم» (internal ribosome entry site) در مولکول RNA پیامبر قادر به آغاز سنتز پروتئین هستند.

این توالی‌ها در RNA پولیوویروس و تعدادی از mRNAهای سلولی یافت شده‌اند. حداقل طول این توالی ۴۰۰ نوکلئوتید است. بنابراین، اگرچه عمل اسکن توسط ریبوزوم در بیشتر mRNAها در انتهای ′۵ و به دنبال اولین جایگاه آغاز ترجمه انجام می‌شود، در برخی از موارد، آغاز ترجمه به شرط وجود «جایگاه درونی تصرف ریبوزوم» در جایگاهی درونی‌تر رخ می‌دهد.



شکل ۷

زمانی که tRNA آغازی به زیرواحد ۳۰S ریبوزوم پروکاریوتی همراه با mRNA آن متصل می‌شود، tRNA آغازی خود را با یکی از سه جایگاه موجود در ریبوزوم متناسب می‌کند. این جایگاه‌ها یا حفره‌های درون ریبوزوم به این شرح هستند: جایگاه آمینواسیل (A site)، جایگاه پپتیدیل (P site) و جایگاه خروج (E site). دو جایگاه A و P باید قبل از تشکیل پیوند پپتیدی دارای مولکول tRNA مربوط به خود باشند. جایگاه P دارای مولکول tRNA (peptidyl-tRNA) متصل به زنجیره پپتیدی در حال رشد است. جایگاه A دارای یک tRNA با تنها یک آمینوآسیل (aminoacyle-tRNA) است.

جایگاه خروج، به tRNAهای خالی شده، پس از تشکیل پیوند پپتیدی کمک می‌کند تا از ریبوزوم خارج شوند. زمان تشکیل ریبوزوم کامل ۷۰S، tRNA آغازی متصل به فرمیل متیونین ($fMet-tRNA_f^{Met}$) به‌طور مستقیم در جایگاه P قرار می‌گیرد. این مولکول در واقع تنها tRNA شارژ شده است که به‌طور مستقیم می‌تواند در جایگاه P قرار گیرد. برقراری اتصال میان ریبوزوم و مولکول‌های tRNA با تشکیل پیوند G-C میان انتهای $CCA-3'$ در مولکول tRNA با یک G در مولکول ۲۳SrRNA زیرواحد بزرگ ریبوزوم انجام می‌شود.

مثال۶: در سلول‌های پروکاریوت، اتصال مولکول mRNA با ریبوزوم ..... است.

۱) در نزدیکی انتهای $16SrRNA\,5'$ ۲) در نزدیکی انتهای $5SrRNA\,3'$

۳) در نزدیکی انتهای $5SrRNA\,5'$ ۴) در نزدیکی انتهای $16SrRNA\,3'$

☑ **پاسخ:** گزینه «۴» توالی حفظ شده شاین-دالگارنو در ابتدای mRNA پروکاریوت‌ها مشاهده می‌شود و با ایجاد رابطه مکملی با rRNA موجود در زیرواحد بزرگ ریبوزوم به آن متصل شده و کمپلکس آغازی تشکیل می‌گردد. این توالی در انتهای $3'$ مولکول $rRNA\,16S$ قرار گرفته است.

مثال۷: «جایگاه درونی تصرف ریبوزوم» باعث می‌شود که ..... .

۱) ریبوزوم فرآیند ترجمه را زودتر از رسیدن به کدون خاتمه پایان دهد. ۲) ریبوزوم فرآیند ترجمه را در منطقه‌ای دورتر از کدون خاتمه پایان دهد.

۳) ریبوزوم فرآیند ترجمه را در اولین کدون آغازی شروع نکند. ۴) ریبوزوم فرآیند ترجمه را در اولین کدون آغازی شروع کند.

☑ **پاسخ:** گزینه «۳» این mRNAها در جایگاه‌های درونی‌تر دارای توالی آغازی هستند. در نتیجه، ریبوزوم از ناحیه ابتدای مولکول عبور کرده و ترجمه را در توالی‌های آغازی پایین‌دست‌تر شروع می‌کند.

مثال۸: UTR چیست؟

۱) توالی‌ای که باعث اتصال ریبوزوم به mRNA می‌شود. ۲) توالی‌ای که فرآیند ترجمه از درون آن آغاز می‌شود.

۳) توالی‌ای که در mRNA حضور دارد اما، ترجمه نمی‌شود. ۴) توالی‌ای که باعث خاتمه زودرس ترجمه می‌شود.

☑ **پاسخ:** گزینه «۳» توالی UTR به معنی ناحیه ترجمه‌نشدنی است. این توالی در ابتدا و انتهای مولکول mRNA حضور دارد اما، توسط ریبوزوم ترجمه نخواهد شد.

طویل‌سازی (Elongation)

مرحله بعد در ترجمه پروکاریوتی، مکان‌یابی tRNA دوم است که با استفاده از کدون موجود در جایگاه A، نوع tRNA دوم مشخص می‌شود. در واقع، قرارگیری tRNA دوم در جایگاه A، همراه با برقراری پیوند هیدروژنی میان توالی آنتی‌کدون tRNA و توالی کدون mRNA موجود در جایگاه A می‌باشد. برای پیشبرد این مرحله به tRNA صحیح شارژ شده، یک مولکول GTP دیگر و دو پروتئین فاکتور طویل‌سازی (elongation factors)، EF-Tu و EF-Ts نیاز است. EF-Tu در اتصال با مولکول پرانرژی GTP، tRNA را به جایگاه A هدایت می‌کند. پس از قرارگیری tRNA دوم در جایگاه A، مولکول GTP به GDP و Pi هیدرولیز شده و همراه با این عمل EF-Tu متصل به GDP، از جایگاه A خارج می‌شود. EF-Ts برای تولید مجدد EF-Tu/GTP از EF-Tu/GDP نیاز است. EF-Ts باعث جدا شدن GDP از EF-Tu می‌شود؛ سپس یک مولکول جدید GTP به EF-Tu متصل می‌شود و حالا کمپلکس EF-Tu/GTP می‌تواند با اتصال به مولکول tRNA شارژ شده جدید، عمل خود را تکرار کند. در این مکان نیز هیدرولیز مولکول GTP به جای پیشبرد یک واکنش متابولیکی و ایجاد پیوند و تأمین انرژی، باعث تغییر ساختار فضایی مولکول می‌شود به‌طوری که EF-Tu/GTP دیگر قادر به اتصال در جایگاه A نبوده و از آن جدا می‌شود. EF-Tu قادر به اتصال به tRNA شارژ شده با فرمیل متیونین نمی‌باشد؛ لذا متیونین فرمیله شده که مخصوص شروع ترجمه است هرگز به جای متیونین‌های درونی، در ساختار پروتئین وارد نمی‌شود. هیدرولیز GTP حدود چند میلی ثانیه طول می‌کشد و پس از آن چند میلی ثانیه زمان لازم است تا EF-Tu/GDP از جایگاه A خارج شود. در طول این دو وقفه زمانی، رابطه مکملی صحیح کدون و آنتی‌کدون به دقت بررسی می‌شود. در صورتی که اتصال کدون- آنتی‌کدون صحیح باشد، پیوند پپتیدی برقرار می‌شود. در صورت عدم صحت رابطه مکملی کدون-آنتی‌کدون، tRNA شارژ شده و آمینواسید آن، از جایگاه A رها می‌شود و EF-Tu/GTP دیگری به همراه tRNA شارژ شده بعدی به جایگاه A وارد می‌شود. نرخ اشتباه در این مرحله حدود ۱ اشتباه در هر ۱۰ هزار آمینواسید وارد شده به ساختار پروتئین است. سرعت سنتز پروتئین در پروکاریوت‌ها حدود ۱۵ آمینواسید در هر ثانیه و در یوکاریوت‌ها ۲ الی ۵ آمینواسید در هر ثانیه برآورد شده است.

اکنون دو آمینواسید و tRNAهای آن‌ها در موقعیتی قرار گرفته‌اند که پیوند پپتیدی تشکیل شود. دو آمینواسید طوری کنار هم قرار می‌گیرند که آنزیم پپتیدیل ترانسفراز (peptidyl transferase)، در واقع زیرواحد بزرگ ریبوزوم، بتواند میان آن‌ها پیوند برقرار کند. در ابتدا تصور بر این بود که این مرکز آنزیمی در زیرواحد بزرگ ریبوزوم، از برخی از پروتئین‌های زیرواحد ۵۰S تشکیل شده است. اکنون متوجه شده‌اند که فعالیت آنزیمی در واقع یک فعالیت ریبوزیمی (ribozymic activity) است که توسط rRNA موجود در زیرواحد بزرگ انجام می‌شود. این فعالیت آنزیمی باعث ایجاد پیوند میان انتهای کربوکسیل N-فرمیل متیونین و انتهای آمین آمینواسید دوم می‌شود. پیوندهای پپتیدی بعدی کاملاً مشابه همین پیوند هستند و میان گروه کربوکسیل

فصل هجدهم

«ابزارهای ژنتیک مولکولی»

مقدمه

سرانجام پیشرفت‌های دانشمندان زیست‌شناسی، به ایجاد تکنولوژی‌هایی برای تعیین موقعیت، جداسازی، آماده‌سازی و مطالعه قطعات DNAی مشتق از کروموزوم‌های بسیار بزرگ‌تر منجر شد. امروزه فناوری کلون‌سازی DNA، به منظور تعیین هویت و مطالعه ژن‌ها، روش‌های شگفت‌انگیزی را فراهم ساخته است. برای انجام تکنیک‌های ژنتیک مولکولی به ابزارهای خاصی نیاز داریم که در اینجا به آن‌ها اشاره می‌کنیم.

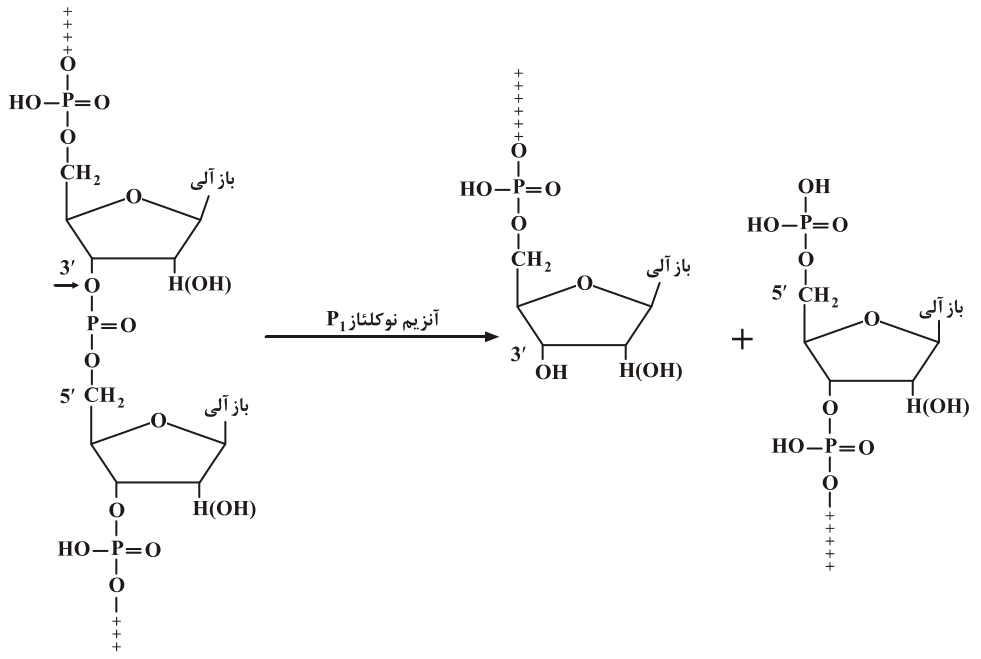
آنزیم‌های نوکلئاز

این آنزیم‌ها، آنزیم‌های هیدرولیزکننده‌ی اسیدهای نوکلئیک هستند که پیوند بین قند و فسفات (پیوند فسفودی استر) را می‌شکنند. نوکلئازها هم در داخل سلول و هم در خارج از سلول (آنزیم‌های دستگاه گوارش) حضور دارند.

براساس سوبسترا، نوکلئازها به دو گروه ریبونوکلئاز (RNase) و دزوکسی ریبونوکلئاز (DNase) تقسیم می‌شوند. البته برخی نوکلئازها مثل فسفودی استراز سم افعی، روی هر دو (DNA , RNA) اثر می‌گذارند.

طبق تقسیم‌بندی دیگری، براساس محل اثر، نوکلئازها را به دو گروه a و b دسته‌بندی می‌کنند. نوکلئازهای گروه a، پیوند فسفو دی استر بین کربن ′۳ قند و فسفات را هیدرولیز می‌کنند و نتیجه‌ی اثر آن‌ها ایجاد ′۵ منوفسفات آزاد است. نوکلئازهای گروه b، پیوند استری بین کربن شماره‌ی ′۵ قند و فسفات را هیدرولیز می‌کنند و ′۳ منوفسفات آزاد ایجاد می‌کنند.

در یک دسته‌بندی دیگر، آنزیم‌های نوکلئاز به دو گروه اگزونوکلئاز و اندونوکلئاز تقسیم می‌شوند. اگزونوکلئازها به انتهای ′۳ یا ′۵ رشته‌ی DNA یا RNA حمله و نوکلئوتیدها را تک تک یا چندتا چندتا، از یک انتها جدا می‌کنند. اندونوکلئازها به پیوندهای داخل رشته‌ای حمله و اسیدهای نوکلئیک را قطعه قطعه می‌کنند.



شکل ۱. نوکلئاز P_1 ، یک اندونوکلئاز از دسته‌ی a است. این نوکلئاز روی RNA و DNAهای تک‌رشته اثر می‌گذارد.

جدول ۱

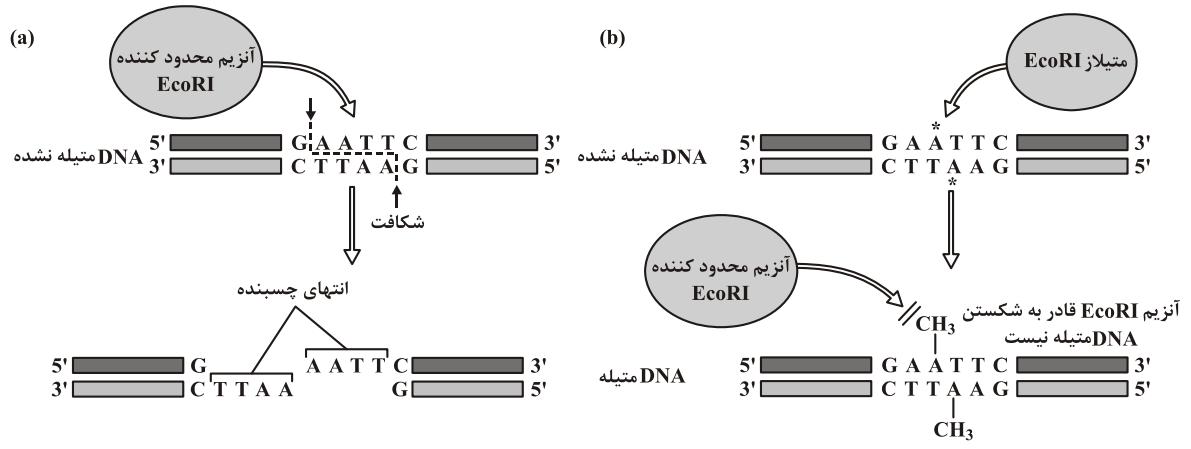
نوکلئاز	اثر	سوبسترا
اگزونوکلئاز I !	۵′ → ۳′ اگزونوکلئاز	DNA تک‌رشته
اگزونوکلئاز III	۵′ → ۳′ اگزونوکلئاز	DNA دورشته
DNase I	اندونوکلئاز	DNA تک‌رشته و دورشته
DNase II	اندونوکلئاز	DNA تک‌رشته و دورشته
AP اندونوکلئاز	اندونوکلئاز	DNA دورشته در نواحی آپورین یا آپیریمیدین

اندونوکلئازهای محدودکننده (Restriction Endonucleases) از مهم‌ترین نوکلئازها هستند که در بسیاری از گونه‌های باکتری وجود دارند. حضور این آنزیم‌ها در واقع یک مکانیسم دفاعی در باکتری به شمار می‌رود. این آنزیم‌ها در باکتری، DNAی خارجی را تشخیص می‌دهند و می‌شکنند (برای مثال DNAی یک ویروس عفونت‌زا). در DNAی سلول میزبان (باکتری) توالی‌های خاصی وجود دارد که متیله شده‌اند.

حضور عامل متیل در این توالی‌ها مانع برش آن‌ها توسط آنزیم‌های محدودکننده‌ی خودی می‌شود. اگر DNAی خارجی وارد سلول میزبان شود، به علت عدم متیلاسیون DNA در این توالی خاص، جایگاه‌ها توسط آنزیم‌های محدودکننده باکتری شناسایی و برش داده می‌شوند. نتیجه‌ی این امر از بین رفتن DNAی بیگانه است. به مجموعه‌ی آنزیم‌های محدودکننده و متیلاز که DNAی بیگانه را در باکتری شناسایی و تخریب می‌کنند، Restriction – Modification system می‌گویند.

سه نوع آنزیم محدودکننده وجود دارد (آنزیم‌های محدودکننده I، II و III). انواع I و III چند زیرواحد دارند و هر دو فعالیت اندونوکلئازی و متیلازی را انجام می‌دهند. اندونوکلئازهای محدودکننده‌ی نوع I، پس از شناسایی توالی خاص خود، DNA را در فاصله‌ی ۱۰۰۰ جفت باز دورتر از توالی، برش می‌دهند. اندونوکلئاز محدودکننده‌ی نوع III، DNA را در فاصله‌ی ۲۵ جفت باز دورتر از توالی خاص خود برش می‌دهد. هر دو نوکلئاز محدودکننده‌ی I و III برای عمل خود به ATP نیاز دارند.

اندونوکلئازهای نوع II، ساده هستند و برای عمل خود به ATP نیاز ندارند. این نوکلئازها DNA را در داخل خود توالی مورد شناسایی، می‌شکنند. این آنزیم برای مهندسی ژنتیک کاربرد فراوانی دارد.



شکل ۲. نقش آنزیم‌های محدودکننده در سلول

در گونه‌های مختلف باکتری، هزاران آنزیم اندونوکلئاز محدودکننده و بیش از ۱۰۰ توالی متفاوت DNA کشف شده است که توسط یک یا چند آنزیم محدودکننده شناسایی می‌شوند. توالی‌هایی که توسط آنزیم‌های محدودکننده شناسایی می‌شوند، معمولاً چهار تا شش جفت نوکلئوتید طول دارند و پالیندروم‌اند (توالی‌های پالیندروم، توالی‌هایی هستند که معکوس و مکمل یکدیگرند).

بعضی اندونوکلئازهای محدودکننده، با اثر بر DNA دورشته‌ای، برش‌هایی با انتهای چسبنده (sticky end) ایجاد می‌کنند. این برش‌ها به‌صورت تک‌رشته باقی مانده‌اند و می‌توانند با قطعه‌ی دیگری جفت شوند. برخی دیگر از اندونوکلئازهای محدودکننده، با اثر بر DNA دورشته‌ای، پیوندهای فسفودی استر مقابل هم را در دو رشته می‌برند و انتهای کور (blind end) ایجاد می‌کنند.

جدول ۲

آنزیم	ارگانیسمی که آنزیم از آن مشتق شده	توالی هدف (cut at* $5' \rightarrow 3'$)
Ava I	Anabaena variabilis	C*C/T C G A /G G
Barn HI	Bacillus amylobquefaciens	G*G A T C C
Bgi II	Bacillus globigii	A* G A T C T
Eco RI	Escherichia coli RY 13	G* A A T T C
Eco RII	Escherichia coli R245	* C C A/ T G G
Hea III	Haemophilus aegyptius	G G * C C
Hha I	Haemophilus haemolyticus	G C G * C
Hind III	Haemophilus inflenzae Rd	A* A G C T T
Hpa I	Haemophilus parainflenzae	G T T * A A C
Kpo I	Klebsiella pneumoniae	G G T A C * C
Mbo I	Moraxella bovis	* G A T C
Mbo I	Moraxella bovis	* G A T C
Pst I	Providencia stuartii	C T G C A * G
Sma I	Serratia marcescens	C C C * G G G
Sst I	Streptomyces Stanford	G A G C T * C
Sal I	Streptomyces albus G	G * T C G A C
Taq I	Thermophilus aquaticus	T * C G A
Xma I	Xanthamonasmal vacearum	C * C C G G G

اندازه‌ی متوسط قطعات DNAی تولید شده توسط آنزیم‌های محدودکننده را می‌توان از فرمول 4^n به‌دست آورد که در آن n تعداد نوکلئوتیدهای جایگاه شناسایی آنزیم است. قبل از خاتمه‌ی واکنش و برش تمام جایگاه‌ها توسط اندونوکلئاز محدودکننده می‌توان واکنش را متوقف کرد؛ به این عمل **هضم نسبی DNA** می‌گویند. برای انجام هضم نسبی DNA می‌توان زمان واکنش یا مقدار آنزیم مورد استفاده در واکنش را کاهش داد.

مثال۱: جایگاه شناسایی آنزیم محدودکننده‌ی HpaI توالی GTT/AAC می‌باشد. از مجاورت این آنزیم با ژنوم انسان طول متوسط قطعات ایجاد شده، چند باز است؟

۱) ۲۲۴۲ ۲) ۱۰۱۴ ۳) ۲۰۲۸ ۴) ۴۰۹۶

☑ **پاسخ:** گزینه «۴» اندازه قطعات حاصل از برش با استفاده از فرمول 4^n به‌دست می‌آید. با توجه به اینکه توالی مورد شناسایی این آنزیم دارای ۶ نوکلئوتید است، در نتیجه اندازه متوسط قطعات ۴۰۹۶ نوکلئوتید خواهد بود.

◆ ◆ ◆ ◆

به علت متفاوت بودن اندازه قطعات حاصل از برش با آنزیم اندونوکلئاز محدودکننده، می‌توان قطعات را با الکتروفورز بر روی ژل آگارز یا ژل پلی‌اکریل آمید از هم جدا کرد. برای جدا کردن یک ژن خاص از ژنوم یک فرد، می‌توان توالی‌های دو طرف ژن را با آنزیم محدودکننده برش داد. در بعضی مواقع در مهندسی ژنتیک، دو انتهای تک‌رشته‌ای حاصل از اثر آنزیم اندونوکلئاز محدودکننده را به قطعه‌ای دیگر که با همان آنزیم‌های محدودکننده برش داده‌اند، متصل می‌کنند. گاهی دو انتهایی که قرار است به هم وصل شوند، مکمل نیستند و به اصطلاح «ناسازگارند»؛ بنابراین به یک قطعه DNAی رابط (Linker) نیاز است که دو انتهای آن مکمل دو انتهای ناسازگار باشد. گاهی دو انتهای کور را می‌توان با اضافه کردن دم پلی A به یکی و دم پلی T به دیگری، با پیوند هیدروژنی به هم مرتبط کرد. برای اتصال دو قطعه‌ی ناسازگار، از DNA دورشته‌ای با نام آداپتور (Adaptor) استفاده می‌شود. آداپتور معمولاً دارای انتهای $5'$ فاقد فسفات است. عدم حضور فسفات در این محل، صحت اتصال آن را افزایش می‌دهد.

مثال۲: یک توالی ۲۲۸۷۶bp چند بار به‌طور متوسط توسط آنزیم محدودکننده‌ی EcoRI با جایگاه شناسایی GAATTC برش می‌خورد؟

۱) ۵ ۲) ۶ ۳) ۷ ۴) ۲

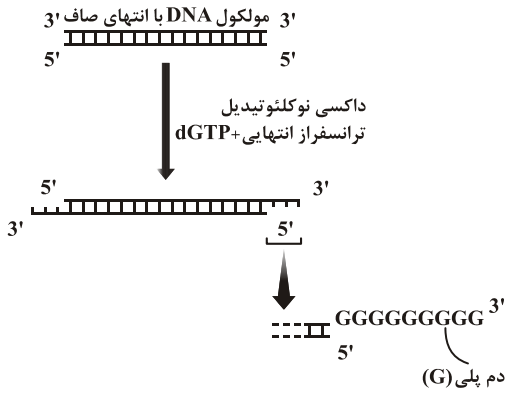
☑ **پاسخ:** گزینه «۱» جایگاه‌های برش این آنزیم با فاصله‌ی $4^n (n=6)$ از هم قرار دارند. $4^6 = ۴۰۹۶$ (اندازه قطعات)؛ پس در ۲۲۸۷۶bp حدود ۵ جایگاه برش وجود دارد.

◆ ◆ ◆ ◆

برخی دیگر از آنزیم‌های دخیل در مهندسی ژنتیک

DNA لیگازها: این آنزیم‌ها دو قطعه‌ی DNA را به هم متصل می‌کنند. در مهندسی ژنتیک اغلب از DNA لیگاز T_4 استفاده می‌شود. این نوع DNA لیگاز از باکتریوفاژ T_4 استخراج می‌شود. بنابراین، DNA لیگاز T_4 نام گرفته است.

ترمینال ترانسفرازها: این آنزیم‌ها بدون نیاز به الگو، DNAسازی کرده، نوکلئوتیدها را به انتهای ′۳ اضافه می‌کنند. اگر این آنزیم به همراه یک نوع نوکلئوتید و قطعه‌ای از DNA انکوبه شود، می‌تواند توالی هموپلیمری در انتهای DNA ایجاد کند، مثلاً توالی پلی A یا پلی T در انتهای DNA. اگر یک لوله آزمایش حاوی رشته‌ی DNA، آدنوزین تری فسفات و آنزیم ترمینال ترانسفراز باشد، به هر انتهای رشته DNA توالی پلی A اضافه می‌شود. در یک لوله‌ی دیگر، علاوه بر رشته DNA و آنزیم ترمینال ترانسفراز، نوکلئوتید مکمل آدنوزین تری فسفات یعنی TTP را اضافه می‌کنیم. در انتهاهای ′۳ قطعه‌ی DNA رشته‌ی پلی T ایجاد می‌شود؛ سپس دو نوع قطعه‌ی DNA ایجاد شده در لوله‌های آزمایش که یکی دارای دم پلی A و دیگری دارای دم پلی T است را با هم مخلوط می‌کنیم. انتهاهای آن‌ها چون مکمل هستند، به هم می‌چسبند.



شکل ۳. با استفاده از ترمینال ترانسفراز می‌توان انتهای چسبناک ایجاد کرد.

پس از چسبیدن آن‌ها می‌توان از DNA لیگاز T_4 استفاده کرد و این دو قطعه را با پیوند فسفو دی استر به هم وصل کرد. به این ترتیب، آنزیم ترمینال ترانسفراز قادر به ایجاد انتهاهای چسبناک خواهد بود.

فسفاتازهای قلیایی (آلکالین فسفاتازها): این آنزیم‌ها فسفات را از انتهاهای ′۵ رشته‌ی DNA برمی‌دارند.

آنزیم DNA پلیمراز I باکتریایی

یک آنزیم پروکاریوتی است که اولین بار توسط آرتور کورنبرگ در سال ۱۹۵۶ در سلول اشریشیاکلی کشف شد. ژن رمزکننده این آنزیم polA نام دارد. آنزیم DNA پلیمراز I حدود ۹۰۰ آمینواسید دارد و توانایی انجام متناوب چندین همانندسازی را دارا می‌باشد. فعالیت‌های این آنزیم را می‌توان به چهار گروه تقسیم کرد:

- فعالیت پلیمرازی ′۵ به ′۳ که نیازمند یک پرایمر جهت تأمین انتهای ′۳ آزاد است.
- فعالیت اگزونوکلئازی ′۳ به ′۵ که عمل proof reading یا ویرایش را هدایت می‌کند.
- فعالیت اگزونوکلئازی ′۵ به ′۳ که در عمل تعمیر DNA نقش دارد.
- فعالیت DNA پلیمرازی وابسته به RNA که این فعالیت با بازده بسیار پایین‌تر از فعالیت پلیمرازی از الگوی DNA انجام می‌شود.

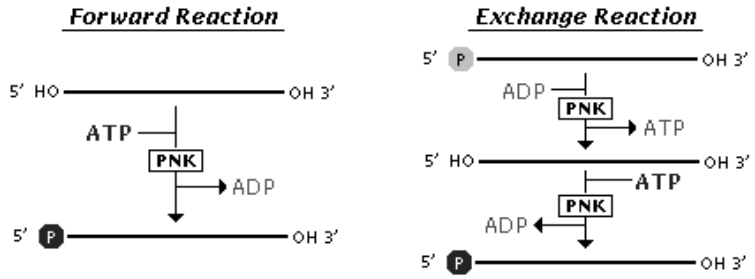
قطعه کلینو (Klenow fragment) یک قطعه پروتئینی بزرگ در این آنزیم است که در صورت تیمار DNA پلیمراز I، با پروتئیناز سوبتیلیزین به‌وجود می‌آید. این قطعه فعالیت پلیمرازی ′۵ به ′۳ و نیز فعالیت اگزونوکلئازی ′۳ به ′۵ دارد. ولی فاقد فعالیت اگزونوکلئازی ′۵ به ′۳ است و این فعالیت اگزونوکلئازی خاص مربوط به قطعه کوچک دیگری از آنزیم DNA پلیمراز I است.

DNaseI (Deoxyribonuclease I)

یک اندونوکلئاز است که توسط ژن انسانی DNase1 کد می‌شود. این آنزیم DNA را در محل پیوندهای فسفودی‌استر و در مجاورت بازهای پیریمیدین می‌شکند و الیگونوکلئوتیدهایی با فسفات آزاد انتهای ′۵ و هیدروکسیل آزاد در انتهای ′۳ ایجاد می‌کند. به‌طور متوسط در اثر عملکرد این آنزیم قطعات تترانوکلئوتید (رشته‌ای متشکل از ۴ نوکلئوتید) ایجاد می‌شود. این آنزیم توانایی عمل بر روی DNA دورشته‌ای، DNA تک‌رشته‌ای و نیز کروماتین (DNA پیچیده شده با پروتئین‌ها) را دارد. علاوه بر این عملکرد، تجزیه برخی از دورشته‌های بدون استفاده و زائد در سلول (waste-management endonuclease) ظاهراً برعهده آنزیم DNaseI می‌باشد. همچنین، این آنزیم در فرایند آپوپتوزیس یا خودکشی سلولی نقش دارد.

پلی نوکلئوتید کیناز (Polynucleotide Kinase, PNK)

آنزیم پلی‌نوکلئوتید کیناز عمل انتقال یک گروه فسفات از ATP به انتهای ′۵ هر دو نوع مولکول RNA و DNA را کاتالیز می‌کند. این آنزیم محصولی از باکتریوفاژ T۴ (یا باکتریوفاژ T۷) است و معمولاً نوع تجاری آن با استفاده از کلون کردن ژن این باکتریوفاژ در باکتری اشریشیاکلی به‌دست می‌آید. این آنزیم در دو گروه از واکنش‌های مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد. در حالت اول واکنش به‌صورت مستقیم (Forward reaction) انجام می‌گیرد. تحت این شرایط انتهای ′۵ مولکول RNA یا DNA، دفسفریله شده یا اینکه مولکول به‌طور مصنوعی سنتز شده است و کمبود فسفات در انتهای ′۵ دارد. از این آنزیم برای انتقال فسفات گامای یک ATP به انتهای مولکول RNA یا DNA استفاده می‌شود. در حالت دوم واکنش تبادلی (Exchange reaction) است. ابتدا یک مولکول فسفات از انتهای ′۵ مولکول‌های RNA یا DNA به یک مولکول ADP انتقال می‌یابد. در مرحله بعد، یک فسفات گاما از یک مولکول ATP به انتهای دفسفریله ′۵ انتقال خواهد یافت. حالت تبادلی معمولاً زمانی انجام می‌شود که به یک انتهای ′۵ نشاندار در مولکول‌های RNA یا DNA نیاز است. در این شرایط مولکول ATP مورد استفاده در مرحله دوم حاوی فسفات نشاندار است. یون آمونیوم و یون فسفات در غلظت‌های بسیار کم و NaCl در غلظت بیش از ۵۰ میلی‌مول، قادر به مهار این آنزیم می‌باشند.



شکل ۴

آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس (Reverse transcriptase)

آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس یا به اختصار RT، توانایی ساختن cDNA یا همان DNA مکمل و ساخته شده از روی الگوی RNA را در فرایندی به‌نام رونویسی معکوس دارد. معمولاً این آنزیم در رتروویروس‌ها یافت می‌شود اما، برخی ویروس‌های دیگر همچون ویروس هپاتیت B که از طریق حد واسط RNA همانندسازی می‌کنند، دارای این آنزیم هستند. مهارکننده‌های آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس به عنوان دارو برای درمان عفونت‌های رتروویروسی استفاده می‌شوند. یکی از فعالیت‌های آنزیم RT تکثیر یا همانندسازی تلومر در کروموزوم‌ها و نیز برخی از ترانسپوزون‌ها است. آنزیمی که انتهای کروموزوم‌ها را همانندسازی می‌کند، نوعی آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس می‌باشد که تلومراز یا ترمینال ترانسفراز نیز نامیده می‌شود. این آنزیم حامل یک مولکول RNA با توالی ویژه در مهره‌داران است که از آن به‌عنوان الگوی ساخت تلومرها استفاده می‌کند. آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس رتروویروسی دارای ۳ عملکرد اصلی می‌باشد:

- فعالیت DNA پلیمرازی وابسته به RNA
- فعالیت ریبونوکلئازی مشابه ریبونوکلئاز H
- فعالیت DNA پلیمرازی وابسته به DNA

این فعالیت‌ها برای ساختن نسخه DNA از روی ژنوم RNA رتروویروس‌ها و الحاق آن به ژنوم میزبان استفاده می‌شود. فعالیت این آنزیم جهت کلونینگ، توالی‌خوانی RNA، آنالیز ژنومی و RT-PCR در ژنتیک مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

آنزیم RNaseH

یک خانواده از آنزیم‌های اندونوکلئاز غیراختصاصی هستند که در یک مکانیسم هیدرولیتیک، RNA را برش می‌دهند. انواع مختلف این آنزیم در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها یافت شده‌اند. این آنزیم پیوند $O-P-3'$ موجود در RNAای که در اتصال با DNA می‌باشد (یا دابلکس DNA/RNA) را باز کرده و $hydroxil-3'$ و $phosphate-5'$ انتهایی آزاد تولید می‌کند. آنزیم RNaseH مسئول حذف RNA پرایمر از DNA تازه همانندسازی شده و تکمیل فرایند همانندسازی است. با توجه به این‌که این آنزیم فقط توانایی تجزیه RNA هیبرید شده با DNA را دارد، در زیست‌شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی برای حذف RNA الگو در ساخت cDNA نیز مورد استفاده است. همچنین، این آنزیم در تکنیک Nuclease protection assay که روشی برای تشخیص یک RNA خاص از میان کل ترانسکریپتوم استخراج شده از سلول است، استفاده می‌شود.

آنزیم RNaseA

این آنزیم از پانکراس گاو به‌دست می‌آید و دارای فعالیت اندونوکلئازی بر روی مولکول‌های تک‌رشته‌ای و دورشته‌ای RNA است. برای حذف RNA در هنگام تخلیص DNA و همچنین شناسایی جهش‌های نقطه‌ای در مولکول mRNA استفاده می‌شود.

مثال۳: قطعه کلینو کدام واکنش(ها) را کاتالیز می‌کند؟

۱) پلیمرازی $5'$ به $3'$ و اگزونوکلئازی $5'$ به $3'$
۲) پلیمرازی $5'$ به $3'$ و اگزونوکلئازی $3'$ به $5'$
۳) اگزونوکلئازی $5'$ به $3'$
۴) پلیمرازی $3'$ به $5'$

☑ **پاسخ:** گزینه «۲» این قطعه فعالیت پلیمرازی $5'$ به $3'$ و نیز فعالیت اگزونوکلئازی $3'$ به $5'$ دارد.

مثال۴: با کمک چه آنزیمی می‌توان DNAی دورشته را در محلولی جداسازی کرد که حاوی انواعی از اسیدهای نوکلئیک است؟

۱) RNase H و RNase A
۲) اگزونوکلئاز I و III و RNase
۳) S_1اندونوکلئاز
۴) ۱ و ۳

☑ **پاسخ:** گزینه «۴» برای تجزیه کردن RNAها از RNase A استفاده می‌شود. RNAهای هیبرید شده با DNA بـا RNase H تجزیـه مـی‌شـوند. DNA تک‌رشته نیز با اندونوکلئاز S_1 تخریب می‌شود؛ بنابراین DNA دورشته‌ای دست‌نخورده باقی می‌ماند.

مثال۵: کدام‌یک از آنزیم‌های زیر برای عمل پلیمریزاسیون به الگو نیاز ندارد؟

۱) DNA پلیمراز ترموس اکواتیکوس
۲) تلومراز
۳) ترمینال ترانسفراز
۴) ترانس‌کریپتاز معکوس

☑ **پاسخ:** گزینه «۳» آنزیم ترمینال ترانسفراز بدون نیاز به الگو، نوکلئوتیدها را به انتهای $3'$ اضافه می‌کند.

حامل‌های کلون

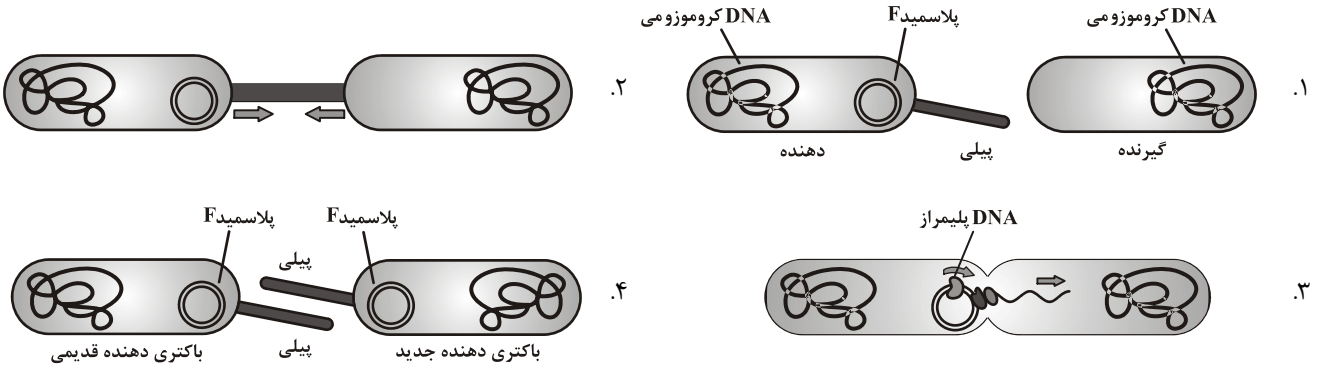
قطعات DNA برای ورود به داخل سلول میزبان لازم است که ابتدا روی یک حامل سوار شوند؛ چرا که DNA های خطی قابلیت ورود به سلول‌های پروکاریوت را ندارند.

پلازمیدها:

پلازمیدها قطعات DNAی حلقوی، دورشته‌ای و قادر به همانندسازی‌اند که در سیتوپلاسم باکتری‌ها جدا از کروموزوم اصلی باکتری قرار دارند. ویژگی‌های خاص پلازمیدها آن‌ها را به‌عنوان یک حامل، بسیار مناسب کرده است. این مولکول‌های کوچک و حلقوی، هنگام استخراج پایداری مناسبی دارند. پلازمید می‌تواند مستقل از DNAی میزبان، همانندسازی کند؛ همچنین تکثیر پلازمید مستقل از چرخه‌ی تقسیم سلولی است. پلازمیدها معمولاً حاوی ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها هستند و به این ترتیب طی عمل Selection یا انتخاب‌گری، می‌توان سلول‌های حاوی پلازمید را از سلول‌های بدون پلازمید جدا کرد.

از نظر تعداد کپی، پلازمیدها را به دو نوع stringent و relax دسته‌بندی می‌کنند. پلازمیدهای stringent، پلازمیدهایی هستند که تکثیر آن‌ها کاملاً تحت کنترل سلول است؛ بنابراین فقط با اجازه‌ی سلول تکثیر می‌شوند. به همین دلیل، تعداد کپی‌های آن‌ها در سلول کم است. پلازمیدهای relax، مستقل از سلول تکثیر می‌شوند؛ بنابراین تعداد کپی‌های آن‌ها زیاد است. تقریباً تمام باکتری‌ها پلازمید دارند. برخی پلازمیدها اطلاعات لازم برای انتقال خود از یک سلول به سلول دیگر را حمل می‌کنند (پلازمید F)؛ برخی دیگر مقاومت دربرابر آنتی‌بیوتیک را کد می‌کنند (پلازمید R)، تعدادی دیگر نیز مجموعه‌های خاصی از ژن‌ها را حمل می‌کنند که برای مصرف متابولیت‌های غیرمعمول لازمند (پلازمیدهای تجزیه‌کننده) و برخی دیگر هیچ ژن کدکننده دارای فعالیت معلومی ندارند (پلازمیدهای ناشناخته).

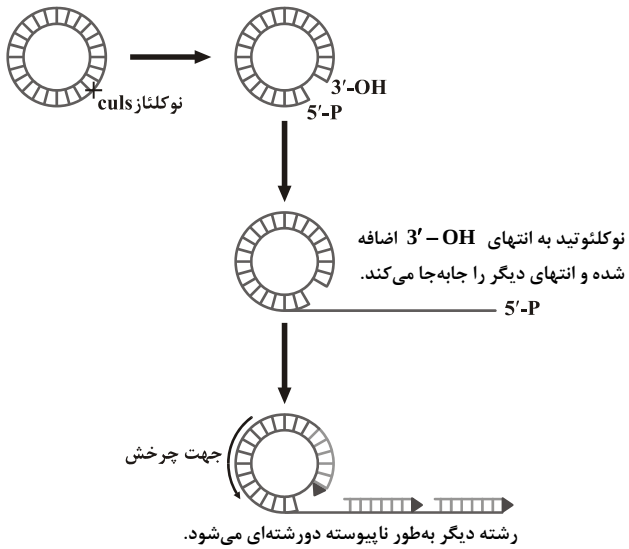
پلازمید F: یکی از مهم‌ترین پلازمیدهای باکتریایی، پلازمید F است. روی این پلازمید ژن‌های تولیدکننده پیلی جنسی (sex pili) باکتری حمل می‌شود. به این ترتیب، باکتری حامل پلازمید F پیلی جنسی دارد و از طریق این پیلی جنسی در کانژوگیشن یا هم‌یوغی (conjugation) یک کپی از این پلازمید را به باکتری دیگری می‌دهد.



شکل ۵

همانندسازی rolling circle

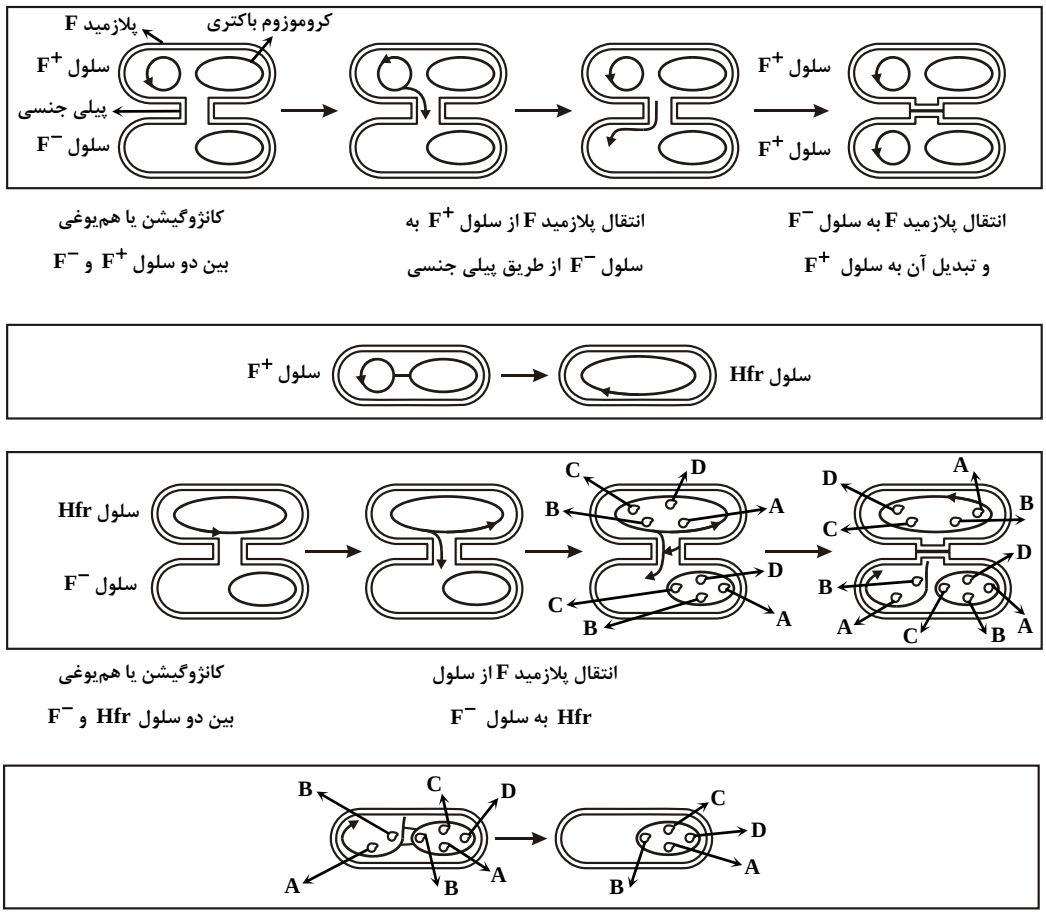
در کانژوگیشن DNAی پلازمید به روش rolling-circle همانندسازی می‌کند. در این روش همانندسازی، انتهای ′۵ یک رشته از DNAی دورشته‌ای پلازمید وارد سلول گیرنده می‌شود. در سلول دهنده (donor)، انتهای ′۳ OH آزاد، به عنوان انتهای آزاد پرایمر عمل کرده و با اتصال نوکلئوتید آزاد به آن، همانندسازی رشته مکمل انجام می‌شود. با باز شدن بیشتر رشته و حرکت آن به درون سلول گیرنده، انتهای ′۳ به دور رشته‌ی دیگر چرخیده و همانندسازی می‌کند. رشته‌ی دارای انتهای ′۵ آزاد، در سلول گیرنده با سنتز قطعه‌ی اکازاکی (همچون یک رشته پیرو)، به‌صورت ناپیوسته همانندسازی می‌کند.



شکل ۶

نکته۱: پلازمید F دارای دو نقطه Ori است. OriV برای همانندسازی پلازمید F در سلول و OriT، برای همانندسازی پلازمید F در ضمن کانژوگیشن است.

در کانژوگیشن، انتقال پلازمید می‌تواند به‌وسیله‌ی مهارکننده‌های آنزیم DNA توپوایزومرازها (مثل نالیدکسیک اسید که DNA جیراز را مهار می‌کند) مهار شود؛ زیرا در هنگام جابه‌جایی پلازمید، توپولوژی DNA دستخوش تغییراتی می‌شود که این تغییرات با کمک توپوایزومرازها صورت می‌گیرد.



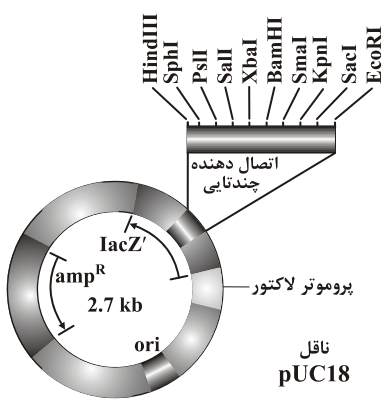
شکل ۷

در بعضی از سلول‌های باکتری ممکن است پلازمید F در اثر کراسینگ اور وارد DNAی میزبان شود؛ به چنین سلولی Hfr گفته می‌شود. در سلول Hfr، پلازمیدی که وارد ژنوم میزبان می‌شود، قادر به همانندسازی در سلول نیست. اما این پلازمید می‌تواند از طریق کانژوگیشن منتقل شود. کانژوگیشن سلول Hfr به این ترتیب است که ابتدا در ناحیه‌ی OriT، پلازمید شکسته می‌شود و ضمن فرآیند کانژوگیشن قسمتی از پلازمید F از سلول Hfr به سلول F' وارد می‌شود. بقیه‌ی پلازمید F که در انتهای کروموزوم باکتری است، آخرین بخشی است که وارد سلول میزبان می‌شود. برای انتقال کامل DNA ۱۰۰ دقیقه زمان نیاز است. ولی چون اتصال دو سلول باکتری به هم پایدار نیست، فرآیند کانژوگیشن Hfr کامل نمی‌شود. زمان انتقال بین دو ژن را می‌توان معیار مناسبی برای به‌دست آوردن فاصله‌ی ژن‌ها در نظر گرفت.

نکته۲: عناصر ژنتیکی که می‌توانند به کروموزوم اصلی وارد شوند و همانندسازی مستقل داشته باشند، اپی‌زوم نام دارند؛ مثلاً فاژ λ و یا پلازمید F که وارد کروموزوم باکتری می‌شوند، اپی‌زوم هستند.

گاهی پلازمید F وارد شده به DNAی کروموزومی، از آن خارج می‌شود؛ اما این خروج دقیق نیست و قسمتی از DNAی کروموزومی باکتری هم همراه پلازمید از کروموزوم خارج می‌شود. به چنین پلازمیدی F' گفته می‌شود. انتقال پلازمید F' به سلول F^- را **سکس داکشن** یا **F داکشن** می‌گویند.

سلول پذیرنده همراه پلازمید یک یا چند ژن را هم دریافت می‌کند. اگر یک نسخه از این ژن‌ها روی کروموزوم اصلی سلول پذیرنده حضور داشته باشد، با دریافت پلازمید، سلول به‌صورت دیپلوئید جزئی (دیپلوئید برای برخی ژن‌ها) درمی‌آید. به این ترتیب، می‌توان رابطه‌ی غالب- مغلوبی اشکال مختلف ژن را با ایجاد حالت دیپلوئید جزئی در سلول، جستجو کرد.



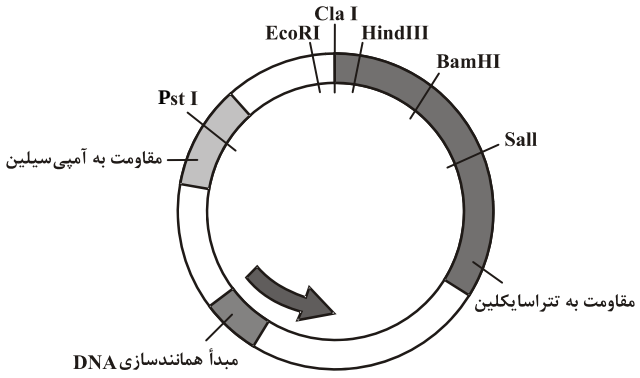
پلازمید PBR322 **شکل ۸**

پلازمید R: این پلازمید از دیگر پلازمیدهای کانژوگیتیو است که حاوی ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک می‌باشد.

پلازمید PBR۳۲۲: این پلازمید یکی از مهم‌ترین پلازمیدهای کاربردی در مهندسی ژنتیک است که با تولید کلرامفنیکل، از سنتز پروتئین‌های سلولی جلوگیری می‌کند و به میزان بسیار زیادی (۱۰۰۰ تا ۳۰۰۰ کپی) در سلول میزبان تکثیر می‌شود. این پلازمید به‌صورت super coil است و به‌وسیله سانتریفیوژ با شیب غلظت سزیم کلراید به‌راحتی از DNAی میزبان جدا می‌شود. همان‌طور که در شکل می‌بینید، این پلازمید مکان‌های زیادی برای اثر آنزیم‌های محدودکننده دارد.

در این پلازمید همچنین دو مارکر مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و تتراسایکلین دیده می‌شود. به این ترتیب، می‌توان طی انتخاب مثبت و منفی، کلونی دلخواه را جدا کرد. در داخل ژن مقاومت به تتراسایکلین، جایگاه شناسایی آنزیم محدودکننده‌ی BamHI و در داخل ژن مقاومت به آمپی‌سیلین، جایگاه شناسایی آنزیم محدودکننده PstI قرار دارد.

اگر به کمک آنزیم محدودکننده قطعه‌ی ژن به یکی از دو ناحیه حاوی ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک وارد شود، به علت ورود ژن خارجی به مارکر ژن، مارکر غیر فعال شده، باکتری نسبت به آن آنتی‌بیوتیک حساس می‌شود. به این فرآیند غیرفعال شدن ژن توسط ژن خارجی (Insertional Inactivation) گفته می‌شود. به این ترتیب اگر پلازمید PBR۳۲۲ توسط BamHI بریده و قطعه‌ی DNA وارد آن شود، پس از ورود وکتور حاوی ژن خارجی به سلول میزبان، این میزبان در محیط حاوی تتراسایکلین قادر به رشد نیست. به چنین انتخابی، انتخاب منفی می‌گویند؛ زیرا کلون نوترکیب در این محیط رشد نمی‌کند اما در محیط حاوی آمپی‌سیلین رشد می‌کند (انتخاب مثبت). از محدودیت‌های پلازمید PBR۳۲۲، داشتن جایگاه‌های اثر کم برای آنزیم‌های محدودکننده است.



شکل ۹

مثال ۶: پلازمیدهای PBR۳۲۲ را با PstI برش داده، در مجاورت قطعه‌ی DNA بریده شده با PstI قرار می‌دهند؛ سپس این پلازمیدها را وارد باکتری حساس به آمپی‌سیلین ـ تتراسایکلین می‌کنند. باکتری‌هایی که در هر دو محیط حاوی آمپی‌سیلین و تتراسایکلین رشد می‌کنند، چه باکتری‌هایی هستند؟

۱) پلازمید را دریافت نکرده‌اند.
۲) پلازمید را دریافت کرده‌اند و ژن خارجی را هم دریافت کرده‌اند.
۳) پلازمید را دریافت کرده‌اند ولی ژن خارجی را دریافت نکرده‌اند.
۴) پلازمید را دریافت نکرده‌اند ولی ژن خارجی را دریافت کرده‌اند.

☑ **پاسخ:** گزینه «۳» این باکتری‌ها پلازمید دست‌نخورده را دریافت کرده‌اند. در این پلازمیدها، هر دو ژن مقاومت دربرابر آنتی‌بیوتیک سالم مانده است.

پلازمید PUC۱۸: این پلازمید دارای پنج جایگاه به شرح زیر است:

۱ـ جایگاه مقاومت به ژن آمپی‌سیلین

۲ـ جایگاه ژن زیرواحدی از بتا گالاکتوزیداز lacz′

۳ـ جایگاه ژن lac I از اپران Lac در Ecoli

۴ـ جایگاه همانندسازی مشتق شده از پلازمید RBP۳۲۲

۵ـ قطعه حاوی محل‌های اثر برای تعداد زیادی آنزیم محدودکننده (به این قطعه اصطلاحاً poly linker گفته می‌شود).

سلول‌های حاوی پلازمید PUC۱۸ دست نخورده، در محیط کشت IPTG (ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید) حاوی آمپی‌سیلین رشد می‌کنند. در این سلول‌ها اپران Lac القا و پروتئین ژن lacz′ تولید می‌شود که این پروتئین به همراه زیرواحدی که توسط بتا گالاکتوزیداز سلول میزبان بیان شده، بتا گالاکتوزیداز کامل هیبرید را تولید می‌کند. در نهایت اگر X gal (۵ برمو ۴ کلرو ایندول بتا گالاکتوزید) در محیط باشد، گالاکتوز محیط به وسیله‌ی بتا گالاکتوزیداز میزبان تجزیه و محیط کشت آبی‌رنگ می‌شود؛ بنابراین می‌توان گفت سلول‌هایی که پلازمید فاقد DNAی نوترکیب را دریافت کرده‌اند، در محیط کشت حاوی X gal رشد می‌کنند و کلونی آبی‌رنگ ایجاد می‌کنند و سلول‌هایی که پلازمید حاوی DNAی نوترکیب را دریافت کرده‌اند، در اثر حضور DNAی خارجی در ژن lacz′، قادر به تولید بتا گالاکتوزیداز فعال نیستند و در محیط کشت IPTG حاوی آمپی‌سیلین، X gal را تجزیه نمی‌کنند؛ درنتیجه رنگ آبی تولید نمی‌شود. سلول‌هایی که پلازمید را دریافت نکرده‌اند، از آنجا که نسبت به آمپی‌سیلین مقاومت ندارند، در محیط کشت IPTG حاوی آمپی‌سیلین قادر به رشد نیستند.

آزمون فصل هجدهم

۱ـ از آنزیم Alkaline phosphatase در مهندسی ژنتیک به چه منظوری استفاده می‌شود؟

۱) جهت حذف گروه‌های فسفات از انتهای ′۵ مولکول DNA
۲) جهت حذف گروه‌های فسفات از انتهای ′۳ مولکول DNA
۳) جهت اضافه کردن گروه‌های فسفات به انتهای ′۵ مولکول DNA
۴) جهت اضافه کردن گروه‌های فسفات به انتهای ′۳ مولکول DNA

۲ـ کدام‌یک از آنزیم‌های زیر برای فعالیت نیازمند پرایمر است؟

۱) آلکالین فسفاتاز ۲) اندونوکلئاز ۳) ترانس‌کریپتاز معکوس ۴) لیگاز

۳ـ کدام‌یک از آنزیم‌های زیر برای هیدرولیز DNA تک‌رشته‌ای به‌کار می‌رود؟

۱) آلکالین فسفاتاز ۲) DNase ۳) S_1 آندونوکلئاز ۴) RNaseH

۴ـ کدام‌یک از موارد زیر را می‌توان از امتیازات مهم مخمر نسبت به باکتری به عنوان سلول گیرنده در مهندسی ژنتیک به شمار آورد؟

۱) ژن را با سرعت بسیار بالایی تکثیر می‌کند.
۲) اینترون‌ها را از رونوشت اولیه‌ی RNA حذف می‌کند.
۳) آنزیم‌های آن مهم و ویژه‌اند.
۴) دوره‌ی زندگی کوتاه دارد و به موجودات پرسلولی شباهت بیشتری دارد.

۵ـ کدام‌یک از آنزیم‌های زیر قادر به تجزیه‌ی DNA تک‌رشته‌ای می‌باشد؛ ولی DNAی دورشته‌ای را برش نمی‌دهد؟

۱) S_1 ۲) نوکلئاز P_1 ۳) اگزونوکلئاز III ۴) ۱ و ۲

۶ـ گزینه‌ی صحیح را انتخاب کنید.

۱) اگر DNA خارجی وارد ژنی در حامل شود، آن ژن را غیرفعال می‌کند. به این پدیده insertional inactivation گفته می‌شود.
۲) در انتقال ژن خارجی با حامل PUC۱۸ کلونی‌های آبی کلونی‌هایی هستند که حامل دارای ژن خارجی را دریافت کرده‌اند.
۳) توالی poly linker توالی‌ای است که به محل‌های مختلف وصل می‌شود.
۴) فاژ لامبدا ژنوم RNA خطی دارد.

۷ـ در کانژوگیشن دو سلول پروکاریوت کدام‌یک از موارد زیر صحیح نمی‌باشد؟

۱) سلول دهنده از طریق پیلی جنسی که خودش ساخته است، با سلول پذیرنده ارتباط برقرار می‌کند.
۲) در همانندسازی DNA ضمن کانژوگیشن، DNA سازی در سلول گیرنده به‌صورت ناپیوسته (قطعات اکازاکی) و در سلول دهنده به‌صورت پیوسته است.
۳) در هر دو سلول دهنده و پذیرنده DNA همانندسازی می‌کند.
۴) سلول پذیرنده در برخی ژن‌ها دیپلوئید می‌شود.

۸ـ در انتقال پلازمید Hfr اولین توالی که منتقل می‌شود، چیست؟

۱) مقداری از ژن‌های کروموزومی سلول دهنده
۲) ژن‌های کروموزومی مقاومت به آنتی‌بیوتیک
۳) قسمتی از توالی پلازمید F
۴) ژن‌های اطراف محل ورود پلازمید F

۹ـ در مورد انتقال DNA کدام مورد زیر صحیح می‌باشد؟

۱) همانندسازی فاژ لامبدا در میزبان به کمک ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک انجام می‌شود.
۲) توالی cos در ژنوم لامبدا برای کلون‌سازی ژن‌ها غیرضروری و قابل جایگزینی است.
۳) فاژ M_{13} می‌تواند بدون آنکه سلول میزبان را نابود کند، به آلوده کردن آن ادامه دهد.
۴) گزینه‌های ۲ و۳

۱۰ـ توالی poly linker توالی‌ای است که ..... .

۱) فاقد محل برش توسط آنزیم محدودکننده است.
۲) دارای محل‌های برش متعدد برای آنزیم‌های محدودکننده است.
۳) به تعداد زیاد در حامل ژن وجود دارد.
۴) دارای مارکر برای تشخیص حضور حامل در سلول میزبان می‌باشد.

فصل نوزدهم

«روش‌های ژنتیک مولکولی»

امروزه امکان بررسی صفات سلول و ویژگی‌های آن در سطح مولکول و حتی در سطح ژن فراهم آمده است. بیولوژی مولکولی شاخه‌ی نوینی از علم زیست‌شناسی است که حیات در سطح مولکولی را پیگیری می‌کند، به ماهیت مولکولی حیات پی می‌برد و رابطه‌ی زیستی بین مولکول‌ها را مورد بررسی قرار می‌دهد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

واکنش PCR یک واکنش مولکولی است که به کمک آن می‌توان قطعه‌ی خاصی از DNA را به تعداد زیاد در محیط خارج سلولی، تکثیر کرد در حالی که بقیه نواحی ژنوم تکثیر نشوند. به کمک PCR (amplification) تکثیر ژن‌ها یا حتی نواحی معینی از ژن‌ها امکان‌پذیر می‌شود. برای PCR نیاز به مقدار زیادی DNA یا RNA نیست و نمونه‌گیری را می‌توان از سلول‌های یک تار مو یا کسر کوچکی از یک قطره خون و یا تعدادی سلول شاخی پوست انجام داد. PCR این امکان را فراهم می‌سازد که بدون نیاز به امکانات سلول و محیط invivo و تکنیک‌های پیچیده‌ی کلونینگ، مقدار زیادی از یک ناحیه‌ی خاص ژنوم تکثیر شود.

در PCR دو قطعه پرایمر الیگونوکلئوتیدی سنتزی که مکمل مناطقی بر روی دو رشته مخالف‌اند و در کنار توالی DNA هدف قرار می‌گیرند، به دو سمت قطعه DNA مورد نظر متصل می‌شوند و به کمک آنزیم DNA پلیمراز خاصی به نام Taq pol، که از باکتری ترموس اکواتیکوس به دست آمده است، از روی آن قطعه ژنوم همانندسازی صورت می‌گیرد؛ سپس دو رشته‌ی DNA از هم جدا و در یک چرخه‌ی جدید دوباره پرایمرها به دو سمت ژن وصل می‌شوند و همانندسازی به کمک Taq pol شروع می‌شود.

مواد واکنش PCR

۱ـ DNA الگو (template) که طی واکنش PCR ناحیه خاصی از آن تکثیر می‌شود.

۲ـ Taq pol یا DNA پلیمراز دیگر مثل Pfu که نسبت به Taq دقت عمل بیشتری دارد؛ زیرا دارای خاصیت proofreading (تصحیح خطا) است.

۳ـ دو پرایمر که هر کدام مکمل انتهاهای $3'$ رشته‌های DNA در دو طرف ناحیه‌ی تکثیرند. این پرایمرها هر کدام حدود ۲۰ نوکلئوتید طول دارند.

۴ـ dNTP که عناصر تشکیل‌دهنده‌ی DNA و پیش‌ساز همانندسازی هستند.

۵ـ محلول بافر که محیط شیمیایی لازم را برای فعالیت اپتیمم آنزیم Taq pol فراهم می‌کند.

۶ـ یون‌های منیزیم، منگنز و پتاسیم

گاهی PCR با دادن گرمای $95^{\circ}C$ به DNAها به مدت ۵ دقیقه شروع می‌شود. به این شروع hot start گفته می‌شود. علت hot start اطمینان از denaturation (تک‌رشته‌ای شدن) تمام رشته‌های DNA برای شروع واکنش است. بعد از این زمان چرخه‌ها آغاز خواهند شد.

مثال۱: کدام گزینه از مواد واکنش PCR نیست؟

۱) محلول بافر ۲) یک جفت پرایمر RNA ۳) آنزیم مقاوم به حرارت ۴) نوکلئوتیدهای dNTP

☑ **پاسخ:** گزینه «۲» جنس پرایمرهای واکنش PCR از DNA و نه RNA است.

◆ ◆ ◆ ◆

مراحل چرخه‌ای PCR

۱ـ Denaturation: اولین مرحله در سیستم تکثیر PCR، دناتوره کردن نمونه‌ی DNA با گرماست. در این مرحله با بالا رفتن دما، دو رشته‌ی DNAای از هم جدا می‌شوند؛ زیرا همان‌طور که می‌دانید همانندسازی در DNA تک‌رشته‌ای انجام می‌شود. به این ترتیب هر رشته می‌تواند الگوی سنتز نیمه حفاظت شده قرار بگیرد. دمای این مرحله حدوداً $95^{\circ}C$ است. این دمای بالا، برای حدود ۱ دقیقه حفظ می‌شود.

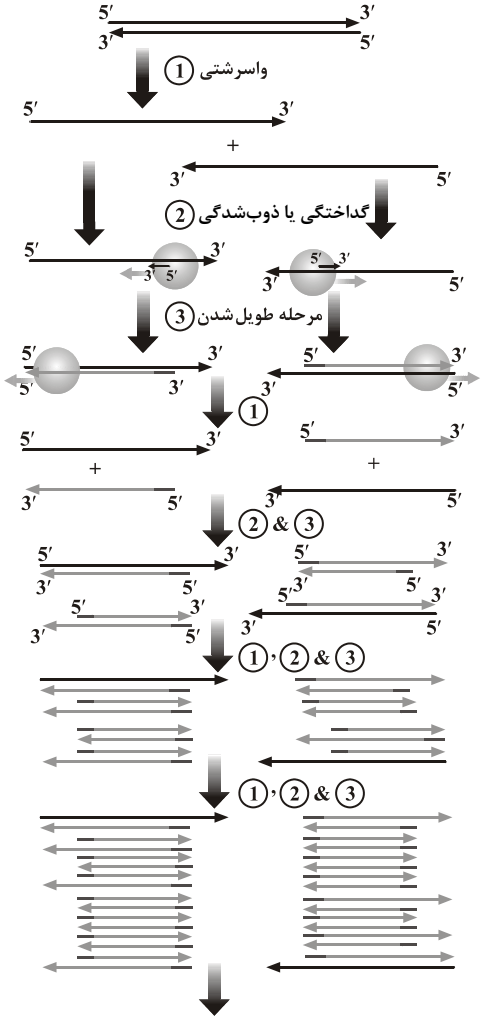
۲ـ Annealing یا اتصال پرایمرها: با کاهش دما امکان اتصال پرایمر به انتها و ابتدای قطعه‌ی DNA فراهم می‌شود. همان‌طور که می‌دانید در همانندسازی، dNTPها باید به انتهای یک پرایمر اضافه شوند و DNA پلیمراز بدون حضور پرایمر قادر به سنتز نیست. دمای annealing حدود $55^{\circ}C$ است.

۳ـ Polymerization: در این مرحله، دما تا حدود $75^{\circ}C$ بالا می‌رود که برای فعالیت DNA پلیمراز Taq ایده‌آل است. سنتز DNA از انتهای $OH-3'$ مربوط به هر یک از پرایمرها آغاز می‌شود. Taq pol، DNA پلیمراز متعلق به باکتری ترموس اکواتیکوس است. این باکتری به حرارت مقاوم است.

Taq pol در دماهای بالای دناتوراسیون DNA $(94^{\circ}C)$، شکل و فعالیت خود را حفظ می‌کند. دمای $75^{\circ}C$ دمای بهینه (اپتیمم) عمل آنزیم Taq pol است.

این سیکل ادامه می‌یابد و بعد از سنتز دوباره، دما تا حد denaturation بالا می‌رود، دو رشته از هم جدا می‌شوند و بعد با کاهش دما پرایمرها مجدداً وصل شده، سنتز DNA انجام می‌شود. یک چرخه PCR معمولاً ۳ تا ۵ دقیقه طول می‌کشد و معمولاً تعداد سیکل‌های PCR، ۳۰ دور است؛ بنابراین با پایان این دوره، DNAی هدف 2^{30} برابر می‌شود، در حالی که در بقیه‌ی ژنوم همانندسازی صورت نگرفته است. برای درک این مطلب که پروتکل PCR چگونه در تکثیر یک قطعه مجزای DNA پیش می‌رود، مهم است که موقعیت هر توالی پرایمر و توالی مکملش را در رشته‌هایی که در طول هر چرخه ساخته می‌شوند، به خاطر بسپاریم. در طی نخستین چرخه از مرحله سنتز، DNA جدیدی که به هر پرایمر متصل شده تا بعد از نقطه پایان توالی که مکمل پرایمر دوم است گسترش می‌یابد.

این رشته‌های جدید که در چرخه دوم مورد استفاده قرار می‌گیرند، الگوی بلند نامیده می‌شوند. در سومین چرخه، الگوهای کوتاه، الگوهای بلند و رشته‌های اصلی، همگی با توالی‌های پرایمر هیبرید می‌شوند و همانندسازی می‌کنند. در چرخه بعدی، الگوهای کوتاه به طور ترجیحی افزایش می‌یابند و پس از سی‌امین چرخه، این رشته‌ها حدود یک میلیون بار بیشتر از رشته‌های اصلی یا الگوی بلند می‌باشند.



شکل ۱. رشد تصاعدی محصول کوتاه

نکته۱: تعداد DNAی هدف بعد از PCR $m\times 2^{n}$ مولکول است (m تعداد DNAهای تک‌رشته در آغاز واکنش؛ n تعداد سیکل‌های PCR).

مثال۲: اگر مقدار DNA در شروع PCR، ۴ مولکول DNA دورشته‌ای باشد، با گذشت ۱۰ دور، مقدار DNA چند برابر می‌شود؟

۱) $(2\times 4)^{10}$ ۲) 2×4^{10} ۳) 4×2^{10} ۴) $2\times 4\times 2^{10}$

☑ **پاسخ:** گزینه «۴» هر مولکول DNA، دو رشته دارد. تعداد رشته‌ها 2×4 است. این مقدار در هر دور، ۲ برابر می‌شود.

بعد از یک سیکل می‌شود : $2\times 4\times 2$ ، بعد از دو سیکل : $2\times 4\times 2\times 2=2\times 4\times 2^{2}$

بعد از سه سیکل : $2\times 4\times 2\times 2\times 2=2\times 4\times 2^{3}$ ، بعد از n سیکل : $2\times 4\times 2^{n}$

مثال۳: مرحله آنیلینگ (Annealung) در واکنش به PCR با کدام گزینه مطابقت دارد؟

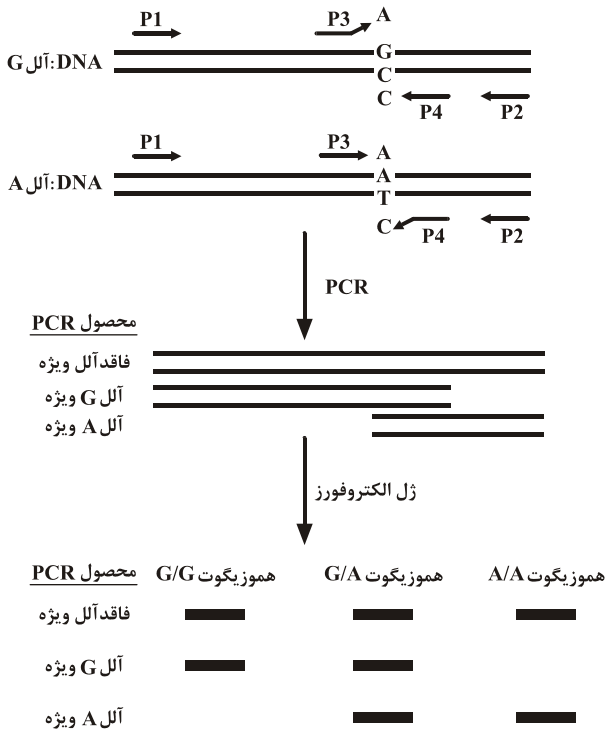
۱) باز کردن دو رشته الگو با استفاده از حرارت
۲) ساختن رشته مکمل در مقابل الگو
۳) جفت شدن پرایمرها با کاهش دما
۴) افزایش تصاعدی محصولات با گذشت هر مرحله

☑ **پاسخ:** گزینه «۳» در مرحله annealing، کاهش دما باعث اتصال پرایمرها به توالی‌های مکمل در DNA الگو می‌شود.

PCR به منظور اهداف متفاوتی مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ به همین دلیل بسته به هدفی که دارد، با روش خاصی انجام می‌شود. البته اصول همه‌ی انواع PCR، همان سه مرحله‌ی اساسی سیکل PCR هستند.

ARMS-PCR

در این روش دو واکنش PCR مجزا با DNA الگو و مواد یکسان در دو لوله مجزا انجام می‌شود. در هر دو واکنش یک پرایمر مشترک و یک پرایمر اختصاصی (مخصوص آلل ویژه‌ای) وجود دارد. یکی از پرایمرهای غیرمشترک، مخصوص آلل نرمال و پرایمر غیرمشترک دیگر، مخصوص آلل جهش‌یافته است. به این ترتیب آلل نرمال فقط در واکنش با پرایمر نرمال و آلل جهش‌یافته فقط در واکنش با پرایمر جهش یافته زیاد می‌شود. برای افراد سالم فقط در واکنش نرمال (حضور پرایمر آلل نرمال و پرایمر مشترک) محصول دیده می‌شود. برای افراد هموزیگوت جهش‌یافته فقط در واکنش جهش‌یافته (حضور پرایمر آلل جهش‌یافته و پرایمر مشترک) محصول دیده می‌شود و برای افراد هتروزیگوت در هر دو واکنش، محصول وجود دارد.



شکل ۲

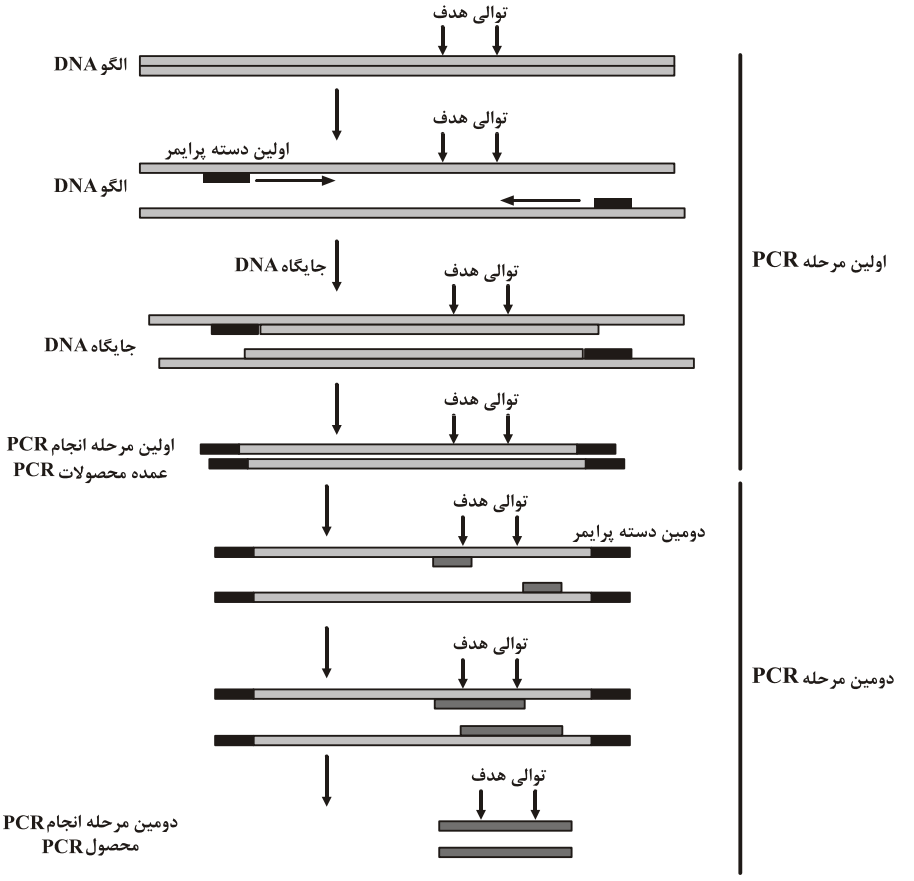
مثال۴: در کدام نوع PCR پرایمر مختص آللی(Allele Specific Primer) به‌کار می‌رود؟

۱) RAPD-PCR ۲) Multiplex-PCR ۳) ARMS-PCR ۴) Real time PCR

☑ **پاسخ:** گزینه «۳» در این روش از پرایمرهای مختص آلل جهش‌یافته استفاده می‌شود.

PCR لانه‌گزینی (nested)

برای افزایش ویژگی و اختصاصیت واکنش PCR، می‌توان از PCR لانه‌گزینی استفاده کرد. در این نوع PCR، ابتدا دو پرایمر مکمل ناحیه‌ی بالاتر و پایین‌تر از دو طرف قطعه مورد نظر، طراحی می‌شوند. بعد از انجام واکنش و استخراج محصول نیز دو جفت پرایمر دیگر برای دو طرف قطعه‌ی مورد نظر وارد می‌شوند. حسن این روش حساسیت بالای آن است. گاهی در PCR دوم، فقط یکی از پرایمرها عوض شده و به قطعه مورد نظر نزدیک‌تر می‌شود. اگر پرایمر واکنش دوم مشابه پرایمر واکنش اول باشد، این واکنش PCR, Semi nested یا نیمه لانه‌گزینی نامیده می‌شود.



شکل ۳. لانه‌گزینی یا nested PCR

مثال۵: کدام گزینه درباره‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمریزاسیون (PCR) صحیح است؟

۱) در nested PCR محصول یک واکنش، الگوی واکنش بعدی است.
۲) در RAPD PCR تنها یک نوع محصول دیده می‌شود.
۳) در RAPD PCR محصول واکنش، الگوی واکنش بعدی است.
۴) در semi nested PCR دو جفت پرایمر مجزا نیاز است.

☑ **پاسخ:** گزینه «۱» در این نوع PCR، ابتدا یک جفت پرایمر برای قطعه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد که قطعه مورد نظر را دربردارد. در مرحله بعد، از محصول این PCR برای تکثیر قطعه مورد نظر استفاده می‌شود و یک جفت پرایمر تخصصی برای این قطعه مورد استفاده قرار می‌گیرد.

RAPD-PCR:

برای تعیین پلی‌مورفیسم‌ها از این نوع PCR استفاده می‌شود. پرایمرهای کوتاه با توالی نوکلئوتیدی دلخواه به صورت تصادفی به DNA وصل می‌شوند و با آنالیز محصولات این PCR بین افراد مختلف تفاوت‌های ژنومی، مشخص و بررسی می‌شود.

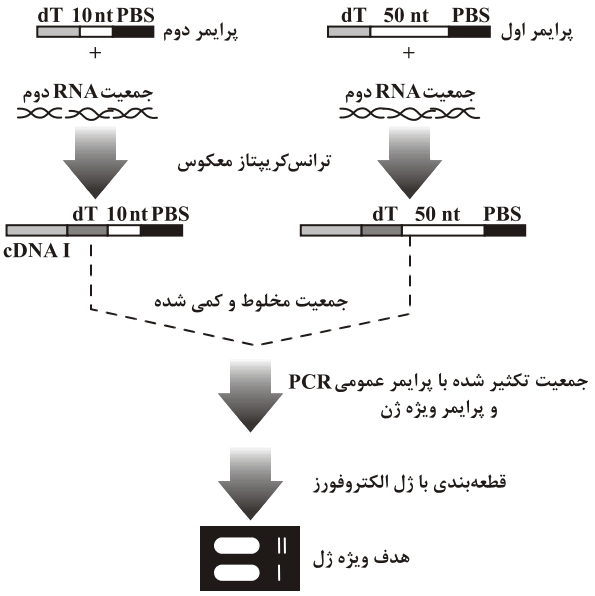
Multiplex-PCR:

در این روش پرایمرهایی برای تکثیر چند قطعه معین روی یک نمونه DNA طراحی می‌شوند و هم‌زمان چند قطعه‌ی DNAی الگو تکثیر می‌شوند.

نکته۲: تفاوت multiplex PCR یا RAPD-PCR این است که در multiplex، قطعات تکثیر شده شناخته شده‌اند؛ ولی در RAPD تکثیر به صورت تصادفی انجام می‌شود.

RT-PCR (Reverse Transcription PCR):

در این روش می‌توان میزان حضور یک ترانس‌کریپت خاص و بیان ژن را در سلول مورد بررسی قرار داد؛ به این ترتیب که ابتدا کل RNAی سلول جدا می‌شود و بعد با یک پرایمر اولیگو نوکلئوتیدی که به دم پلی Aی RNAها وصل می‌شود، آنزیم ترانسکریپتاز معکوس شروع به ساختن رشته‌های cDNA از روی RNA می‌کند. با استفاده از پرایمرهای مکمل انتهاهای cDNAی خاص، آن cDNAی معین تکثیر می‌شود. هرچه میزان اولیه‌ی آن RNA بیشتر باشد، مقدار محصول PCR هم بیشتر خواهد بود.



شکل ۴. بررسی بیان ژن با استفاده از Reverse Transcription PCR

Real time PCR

نوعی PCR است که در آن، ضمن عمل PCR می‌توان مقدار محصول را به صورت کمّی اندازه‌گیری کرد. برخلاف انواع دیگر PCR که مقدار محصول بعد از الکتروفورز آنالیز می‌شود، در این روش مقدار محصول ضمن انجام PCR اندازه‌گیری می‌شود.

در این نوع PCR، محصولات ضمن پلیمریزاسیون، نشاندار هم می‌شوند. دو روش برای نشاندار کردن محصول ضمن Real time PCR وجود دارد.

در **روش اول** یک رنگ فلوئورسنت به‌طور غیراختصاصی به DNAی دو رشته وصل می‌شود و بعد از اتصال به DNA خاصیت فلوئورسنت پیدا می‌کند. به این ترتیب، ضمن افزایش DNA دو رشته در PCR، رنگ‌هایی مثل SYBR Green بین دو رشته قرار می‌گیرد و خاصیت فلوئورسنت محلول افزایش می‌یابد. افزایش خاصیت فلوئورسنت محلول، افزایش مقدار DNAی دورشته را نشان می‌دهد.

چون اتصال رنگ غیراختصاصی است، افزایش دایمر پرایمر یا محصول غیراختصاصی هم باعث افزایش سیگنال فلوئورسنت می‌شود.