به نام خداوند جان و خرد

انتشارات
۵۴۵

ژنتیک مولکولی باکتری‌ها

جرمی دیل- سیمون پارک

ترجمه:
دکتر منصور مشرقی
استاد دانشگاه فردوسی مشهد

سرشناسه: جرمی دیل- سیمون پارک Dale, Jeremy (Jeremy W.)
عنوان و نام پدیدآور: ژنتیک مولکولی باکتری‌ها/ تألیف جرمی دیل، سیمون پارک؛ ترجمه منصور مشرقی.
مشخصات نشر: مشهد: دانشگاه فردوسی مشهد، ۱۳۸۸.
مشخصات ظاهری: ۴۸۸ ص. : مصوّر، جدول، نمودار.
فروست: انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد؛ شماره ۵۴۵.
شابک: ISBN: 978-964-386-214-5
وضعیت فهرست‌نویسی: فاپا.
یادداشت: عنوان اصلی: Molecular Genetics of Bacteria, 4th ed. 2004.
یادداشت: این کتاب در همین سال با ترجمه کامران قائدی ...[و دیگران] توسط دانشگاه اصفهان نیز منتشر شده است
یادداشت: چاپ سوم: پاییز ۱۳۹۵. چاپ چهارم : ۱۴۰۴ (فیپا).
یادداشت: واژه‌نامه.
موضوع: ژنتیک باکتری‌ها
موضوع: ژنتیک مولکولی
موضوع: مهندسی ژنتیک
شناسه افزوده: پارک سایمون، ۱۹۶۴ – م. Park, Simon
شناسه افزوده: مشرقی، منصور، مترجم.
شناسه افزوده: دانشگاه فردوسی مشهد.
رده‌بندی کنگره: ۱۳۸۸ الف ۹ ژ ۹ د / QH ۴۳۴
رده‌بندی دیویی: ۵۷۲ / ۸۲۹۳
شماره کتابشناسی ملی: ۱۸۹۴۷۵۳

ژنتیک مولکولی باکتری‌ها

پدیدآورنده: جرمی دیل، سیمون پارک
ترجمه: دکتر منصور مشرقی
ویراستار علمی: دکتر فرهنگ حداد؛ دکتر عزت عسگرانی
مشخصات: وزیری، ۱۵۰ نسخه، چاپ چهارم، پاییز ۱۴۰۴ (اوّل، ۱۳۸۸)
چاپ و صحافی: همیار
بها : ۵/۳۰۰/۰۰۰ ریال
حق چاپ برای انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد محفوظ است.

انتشارات
۵۴۵

مراکز پخش:

فروشگاه و نمایشگاه کتاب پردیس: مشهد، میدان آزادی، دانشگاه فردوسی مشهد، جنب سلف یاس
تلفن: ۳۸۸۰۲۶۶۶- ۳۸۸۳۳۷۲۷ (۰۵۱)
مؤسّسهٔ کتابیران: تهران، میدان انقلاب، خیابان کارگر جنوبی، بین روانمهر و وحید نظری، بن‌بست گشتاسب، پلاک ۸ تلفن: ۶۶۴۸۴۷۱۵ (۰۲۱)
مؤسّسهٔ دانشیران: تهران، خیابان انقلاب، خیابان منیری جاوید (اردیبهشت) نبش خیابان نظری، شمارهٔ ۱۴۲
تلفکس: ۶۶۴۰۰۲۲۰ – ۶۶۴۰۰۱۴۴ (۰۲۱)

http://press.um.ac.ir Email: press@um.ac.ir

فهرست مطالب

فصل۱: ساختار و عمل اسید نوکلئیک ۱۵
۱- ۱ ساختمان اسیدهای نوکلئیک ۱۵
۱ -۱ -۱ DNA ۱۵
۱ - ۱ - ۲ RNA ۱۷
۱ -۱- ۳ کنش‌های متقابل آب گریزی ۱۷
۱ -۱- ۴ اشکال مختلف مارپیچ دو رشته ای ۱۹
۱ -۱ -۵ تشکیل ابر مارپیچ ۱۹
۱ -۱-۶ دناتوره شدن و هیبریداسیون ۲۴
۱ -۱ -۷ جهت قرار گرفتن رشته‌های اسید نوکلئیک ۲۶
۱- ۲ همانندسازی DNA ۲۷
۱ -۲-۱ باز شدن پیچ و پیچ خوردگی مجدد ۲۸
۱ -۲-۲ صحت همانند سازی: ویرایش ۳۰
۱- ۳ همانند سازی کروموزوم و تقسیم سلولی ۳۱
۱-۴ ترمیم DNA ۳۶
۱ -۴- ۱ ترمیم بازهای ناجور ۳۶
۱ - ۴ - ۲ ترمیم برشی ۳۶
۱ -۴- ۳ ترمیم نوترکیبی (پس از همانند سازی) ۳۷
۱ -۴-۴ ترمیم SOS ۳۸
۱-۵ بیان ژن ۳۹
۱ -۵-۱ نسخه برداری ۴۰
۱-۵-۲ ترجمه ۴۵
۱-۵- ۳ رویدادهای بعد از ترجمه ۵۲
۱ - ۶ سازمان بندی ژن ۵۵
فصل۲: جهش و تنوع ۵۹
۲- ۱ تغییرات و تکامل ۶۰

۲-۱- ۱ آزمایش نوسان ۶۱
۲- ۱-۲ جهش مستقیم در باکتریها؟ ۶۳
۲-۲ انواع جهش ۶۴
۲- ۲- ۱ جهش نقطه‌ای ۶۴
۲- ۲-۲ جهش یافته‌های شرطی ۶۶
۲- ۲-۳ تنوع به علت تغییرات در DNA در مقیاس وسیع ۶۷
۲-۲- ۴ عوامل خارج کروموزومی و انتقال افقی ژن ۶۸
۲- ۳ فنوتیپ‌ها ۶۸
۲-۴ بازیابی فنوتیپ ۷۱
۲-۴-۱ برگشت و ممانعت ۷۱
۲ -۴ -۲ مکمل سازی ۷۵
۲- ۵ نوترکیبی ۷۶
۲- ۶ سازوکار جهش ۷۷
۲ - ۶ -۱ جهش خودبخودی ۷۷
۲- ۶-۲ عوامل جهش زای شیمیایی ۷۹
۲-۶-۳ پرتو فرابنفش ۸۳
۲- ۷ جداسازی و شناسایی جهش یافته‌ها ۸۷
۲- ۷-۱ جهش و انتخاب ۸۷
۲- ۷- ۲ کشت مکرر ۸۹
۲- ۷-۳ غنی سازی با پنی سیلین ۹۱
۲-۷-۴ جداسازی دیگر جهش یافته‌ها ۹۱
۲- ۷- ۵ روشهای مولکولی ۹۳
فصل ۳: تنظیم بیان ژن ۱۰۱
۳-۱ تعداد نسخه ژن ۱۰۴
۳-۲ کنترل نسخه برداری ۱۰۴
۳-۲-۱ پروموترها ۱۰۴
۳-۲-۲ خاتمه دهنده‌ها، خفیف سازها و ضد خاتمه دهنده‌ها ۱۱۵
۳-۲-۳ القا و سرکوب: پروتئین‌های تنظیم کننده ۱۱۶
۳-۲-۴ خفیف سازی: اپرون trp ۱۲۷
۳-۲-۵ سیستم‌های تنظیمی دوجزئی ۱۳۱
۳-۲- ۶ سیستم‌های تنظیمی فراگیر ۱۳۴

۳-۲-۷ فراوانی یا کمبود و ریگلون Rpos ۱۳۶
۳-۲-۸ Quorum sensing ۱۳۶
۳- ۳ کنترل ترجمه ۱۴۱
۳-۳-۱ اتصال به ریبوزوم ۱۴۱
۳-۳-۲ به کارگیری کدون ۱۴۳
۳-۳-۳ پاسخ محکم ۱۴۴
۳-۳-۴ RNAتنظیمی ۱۴۵
۳-۳-۵ تنوع فازی ۱۴۶
فصل ۴: ژنتیک باکتریوفاژها ۱۴۷
۴-۱ باکتریوفاژهای دارای DNA تک رشته ۱۵۲
۴-۱-۱ فاژ φx174 ..... ۱۵۲
۴-۱- ۲ فاژ M13 ..... ۱۵۵
۴ -۲ فاژهای RNA دار: MS2 ..... ۱۵۶
۴-۳ فاژهای DNA دار دو رشته‌ای ۱۵۶
۴- ۳-۱ باکتریوفاژ T4 ..... ۱۵۷
۴-۳-۲ باکتریوفاژ لامبدا ۱۶۰
۴-۳-۳ تنظیم مسیر لیتیک و لیزوژنی در باکتریوفاژ λ ۱۶۷
۴-۴ محدود شوندگی و تغییرات ۱۷۶
۴- ۵ مکمل سازی و نوترکیبی ۱۸۰
۴-۶ چرا باکتریوفاژها مهم هستند؟ ۱۸۳
۴-۶-۱ تیپ بندی فاژ ۱۸۴
۴-۶-۲ فاژ درمانی ۱۸۵
۴-۶-۳ نمایش فاژ ۱۸۶
۴-۶-۴ بیماری زایی باکتریایی و تغییر فاژ ۱۸۸
فصل ۵: پلاسمیدها ۱۹۳
۵-۱ بعضی از خصوصیات باکتری که توسط پلاسمید تعیین می گردد ۱۹۴
۵-۱-۱ مقاومت به آنتی بیو تیک ۱۹۴
۵-۱-۲ کلی سین‌ها و باکتریویسن‌ها ۱۹۵
۵-۱-۳ فاکتورهای ویرولانس ۱۹۵
۵-۱-۴ پلاسمیدها در باکتریهای همراه گیاه ۱۹۶
۵-۱-۵ فعالیتهای متابولیکی ۱۹۷

۵-۲ ویژگی‌های مولکولی پلاسمیدها ۱۹۹
۵-۲-۱ همانند سازی پلاسمید و کنترل ۲۰۳
۵-۳ پایداری پلاسمید ۲۱۵
۵- ۳- ۱ تمامیت پلاسمید ۲۱۷
۵-۳- ۲ تقسیم شدگی ۲۱۹
۵- ۳- ۳ میزان رشد متفاوت ۲۲۳
۵-۴ روشهای مطالعه پلاسمیدها ۲۲۳
۵- ۴-۱ رابطه پلاسمید با فنوتیپ سلول ۲۲۳
۵-۴-۲ طبقه بندی پلاسمیدها ۲۲۶
فصل ۶: انتقال ژن ۲۲۹
۶-۱ ترانسفورماسیون ۲۳۰
۶-۲ هم یوغی یا کانجوگاسیون ۲۳۳
۶-۲-۱ سازوکار هم یوغی ۲۳۶
۶-۲-۲ پلاسمید F ۲۴۰
۶-۲-۳ هم یوغی در دیگر باکتریها ۲۴۲
۶-۳ ترانسداکسیون ۲۴۷
۶- ۳-۱ ترانسداکسیون اختصاصی ۲۴۹
۶-۴ نوترکیبی ۲۵۰
۶-۴-۱ نوترکیبی عمومی (همولوگ) ۲۵۰
۶-۴-۲ نوترکیبی غیرهمولوگ اختصاصی جایگاه ۲۵۸
۶-۵ ژنهای موزائیک و پلاستیسته کروموزوم ۲۵۸
فصل ۷: نقش پذیری ژنومیک : ژنهای متحرک و تنوع مرحله‌ای (فازی) ۲۶۱
۷-۱ توالی‌های درون جاگیری ۲۶۱
۷-۱-۱ ساختار توالی‌های درون جاگیری ۲۶۲
۷-۱-۲ میزان وقوع توالی‌های درون جاگیری ۲۶۴
۷-۲ ترانسپوزون‌ها ۲۶۵
۷-۲-۱ ساختار ترانسپوزون‌ها ۲۶۸
۷-۲-۲ اینتگرون‌ها ۲۷۰
۷-۳ سازوکار ترانسپوزیشن ۲۷۲
۷-۳-۱ ترانسپوزیشن همانند ساز ۲۷۲
۷-۳-۲ ترانسپوزیشن غیر همانند ساز (محافظه کارانه) ۲۷۷

۷-۳-۳ تنظیم عمل ترانسپوزیشن ۲۷۹
۷-۳-۴ فعال شدن ژنها به وسیله عناصر قابل ترانسپوز ۲۸۰
۷-۳-۵ Mu: باکتریوفاژ قابل ترانسپوز ۲۸۱
۷-۳-۶ ترانسپوزون‌های کونژوگاتیو ودیگر عناصر قابل ترانسپوز ۲۸۲
۷-۴ تنوع مرحله‌ای ۲۸۲
۷-۴-۱ تنوع در اثر معکوس شدگی ساده DNA ۲۸۴
۷-۴-۲ تنوع ایجاد شده در اثر معکوس شدن nested DNA ۲۸۶
۷-۴-۳ تنوع آنتی ژنتیک در گنوکوک ۲۸۸
۷-۴-۴ تنوع مرحله‌ای به وسیله جفت شدن ناجور رشته لغزنده ۲۹۰
۷-۴-۵ تنوع مرحله‌ای ایجاد شده به وسیله متیلاسیون DNA افتراقی ۲۹۲
فصل ۸: تغییرات ژنتیکی: توانایی کاربرد باکتریها ۲۹۵
۸-۱ بهینه سازی سویه باکتری ۲۹۵
۸-۱-۱ ایجاد تنوع ۲۹۶
۸-۱-۲ انتخاب واریانت‌های دلخواه ۲۹۶
۸-۲ تولید مازاد متابولیتهای اولیه ۲۹۷
۸-۲-۱ مسیرهای ساده ۲۹۸
۸-۲-۲ مسیرهای متابولیکی منشعب ۳۰۰
۸-۳ تولید مازاد متابولیت‌های ثانویه ۳۰۳
۸-۴ کلون سازی ژن ۳۰۴
۸-۴-۱ برش و به هم پیوستگی DNA ۳۰۴
۸-۴-۲ ناقلهای پلاسمیدی ۳۰۶
۸-۴-۳ ترانسفورماسیون ۳۰۸
۸-۴-۴ ناقلان باکتریوفاژی لامبدا ۳۱۰
۸-۴-۵ کلون ساز قطعات بزرگ تر ۳۱۲
۸-۴-۶ ناقلهای باکتریوفاژی M13 ..... ۳۱۳
۸-۵ کتابخانه‌های ژنی ۳۱۴
۸-۵-۱ ساخت کتابخانه ژنومیک ۳۱۴
۸-۵-۲ غربالگری کتابخانه ژنی ۳۱۶
۸-۵-۳ ساخت کتابخانه cDNA ۳۱۹
۸-۶ محصولات به دست آمده از ژنهای کلون شده ۳۲۰
۸-۶-۱ ناقلهای بیانی ۳۲۰

۸-۶-۲ ساخت ژنهای جدید ۳۲۳
۸-۶- ۳ دیگر باکتریهای میزبان..... ۳۲۶
۸-۶-۴ واکسن‌های جدید..... ۳۲۹
۸-۷ کاربردهای دیگر فناوری ژن ۳۳۱
فصل۹: روشهای ژنتیکی برای بررسی باکتریها..... ۳۳۳
۹-۱ مسیرهای متابولیکی ۳۳۳
۹-۱-۱ مکمل سازی..... ۳۳۴
۹-۱-۲ Cross Feeding..... ۳۳۴
۹-۲ فیزیولوژی میکروبی ۳۳۶
۹-۲-۱ ژنهای گزارشگر ۳۳۸
۹-۲- ۲ لیزوژنی ۳۴۰
۹-۲-۳ تقسیم سلولی ۳۴۱
۹-۲-۴ تحرک و شیمیوتاکسی ۳۴۳
۹- ۲-۵ تمایز سلولی..... ۳۴۵
۹-۳ بیماری زایی باکتریایی..... ۳۵۰
۹-۳-۱ طیف گسترده سازوکارهای بیماری زایی باکتریایی ۳۵۰
۹-۳-۲ شناسایی ژنهای بیماری زا..... ۳۵۲
۹-۴ جهش زایی اختصاصی ۳۵۶
۹-۴-۱جایگزینی ژن ۳۵۷
۹-۴-۲ RNA آنتی سنس ۳۵۹
۹-۵ تاکسونومی، تکامل و اپیدمیولوژی ۳۶۰
۹-۵-۱ تاکسونومی مولکولی ۳۶۰
۹-۵-۲ کاربرد روش PCR در تشخیص..... ۳۶۳
۹-۵-۳ اپیدمیولوژی مولکولی..... ۳۶۴
فصل ۱۰: رسم نقشه ژنی تا ژنومیکس ۳۷۱
۱۰-۱ رسم نقشه ژنی..... ۳۷۱
۱۰-۱-۱ تجزیه و تحلیل هم یوغی ۳۷۲
۱۰-۱-۲ ترانسفورماسیون مشترک و ترانسداکسیون مشترک ۳۷۴
۱۰-۱-۳ روشهای مولکولی تعیین نقشه ژنی ۳۷۶
۱۰-۲ تعیین توالی ژن..... ۳۷۹
۱۰-۲-۱ تعیین توالی DNA..... ۳۸۱

۱۰-۲-۲ تعیین توالی ژنوم ۳۸۴
۱۰-۲-۳ ژنومیکس مقایسه‌ای ۳۸۶
۱۰-۲-۴ بیوانفورماتیک ۳۹۱
۱۰-۳ نقشه‌های ژنتیکی و فیزیکی ۳۹۲
۱۰-۳-۱ حذف و اضافه ۳۹۳
۱۰-۳-۲ جهش زایی ترانسپوزونی ۳۹۴
۱۰ -۳-۳ جایگزینی ژن ۳۹۴
۱۰-۳-۴ جهش زایی هدفمند در جایگاه ۳۹۶
۱۰-۴ تجزیه و تحلیل بیان ژن ۳۹۶
۱۰-۴-۱ تجزیه و تحلیل نسخه برداری ۳۹۷
۱۰-۴-۲ تجزیه و تحلیل ترجمه ۴۰۱
۱۰-۴-۳ تجزیه و تحلیل سیستماتیک عمل ژن ۴۰۵
۱۰-۵ نتیجه گیری ۴۰۶
ضمیمه A ۴۰۷
ضمیمه B ۴۱۲
ضمیمه C ۴۱۵
ضمیمه D ۴۵۲
ضمیمه E ۴۵۹
ضمیمه F ۴۶۲
ضمیمه G ۴۶۳

مقدمه مترجم

باکتریها مدتها است که به عنوان یک ابزار بسیار مناسب برای مطالعات مختلف خصوصا در زمینه بیولوژی مولکولی و ژنتیک مورد استفاده قرار می گیرند به طوریکه کشف بسیاری از فرآیندها و سازوکارهایی که در سلول اتفاق می افتد در اثر تحقیقاتی بوده است که بر روی این موجودات انجام شده است. ساده و کم هزینه بودن کشت این گروه از میکروارگانیسم ها به همراه مدت زمان کوتاهی که برای رشد آنها لازم است سبب شده است تا روشهای نوینی در مطالعات سلولی و مولکولی با استفاده از باکتریها ابداع گردد. امروزه پیشرفتهای شگرفی در زمینه دستکاری ها ی ژنتیکی صورت گرفته است که نتیجه آن در بخش های مختلف صنایع داروسازی، پزشکی و محیط زیست نمایان گردیده است و هر روز به این دانش افزوده می گردد.

اگرچه اصول ژنتیک وبیولوژی مولکولی پروکاریوتها را در کتابهای مختلف می توان به طور پراکنده و در لابلای فصل ها و بخش های مختلف آن کتاب جستجو نمود، اما دسترسی به دسته ای از این اطلاعات بصورت یک مجموعه و در یک حالت طبقه بندی شده می تواند بسیارمفید بوده و مورد استفاده افراد مختلف در تمامی سطوح علمی از دانشجویان کارشناسی، کارشناسی ارشد، دکتری و همچنین اعضای محترم هیئت علمی در گرایش های مختلف زیست شناسی، کشاورزی و پزشکی قرار گیرد. لذا ازتمامی این عزیزان خواهشمند چنانچه نظر، پیشنهاد یا انتقادی داشتند یا در طول مطالعه کتاب با اشکالاتی روبرو شدند حتما اینجانب را مطلع فرمایند تا در چاپهای بعدی یا در کتابهای دیگری که ممکن است دراین زمینه در دست ترجمه یا تألیف باشد در نظر داشته باشم.

در اینجا لازم است تشکر خود را از مساعدتهای فراوان معاونت محترم پژوهشی دانشگاه و همچنین تمامی دست اندرکاران در موسسه چاپ و انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد ابراز نمایم. از ویراستاران محترم ادبی و علمی که در بالا بردن کیفی کتاب نقش مهمی داشته اند نیز بسیار سپاسگزارم.

در خاتمه از همسر و فرزندم که در طول ترجمه و تدوین کتاب با صبر و تحمل خود مرا پشتیبانی نمودند بی نهایت قدردانی می نمایم.

منصور مشرقی

فروردین ۱۳۸۸

مقدمه مولفان

زمانی که اولین چاپ این کتاب در سال ۱۹۸۹ منتشر گردید تعیین توالی DNA تنها به شناسایی ژنهای کلون شده خاصی محدود بود؛ و اگرچه ژنوم بعضی از ویروسها به طور کامل تعیین توالی گردیده بود ولی تعیین توالی کامل ژنوم باکتری هنوز نیازمند زمان بود. حتی در زمان چاپ دوم (۱۹۹۴) پیشرفت دانش در این زمینه به حدی بود که این گونه مطرح شده بود: "پروژه تعیین توالی ژنوم در مورد چندین گونه باکتری در دست اقدام است..." . اولین ژنوم باکتری که به طور کامل تعیین توالی شده بود در سال ۱۹۹۵ گزارش گردید. در چاپ سوم (۱۹۹۸) امکان ارائه فهرستی از باکتریهایی که ژنوم آنها به طور کامل تعیین توالی شده بود به وجود آمد، اگرچه مشخص بود که این فهرست به زودی قدیمی خواهد شد. اکنون دیگر حساسیت زیادی در مورد تهیه چنین فهرستی وجود ندارد. کاربرد گسترده روشهای خودکار و روباتیک سبب شده است که بتوان به توالی یک ژنوم جدید اگر چه نه در یک روز ولی حداقل در مدت یک هفته دست پیدا نمود. به موازات این موضوع می توان از ابداع روش واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) در چاپ اول و روشهای پیشرفته اخیر مانند ریزآرایه و پروتئومیکس نام برد که در این روشها از داده های تعیین توالی ژنوم در جهت آنالیز فراگیر بیان ژن استفاده شده است.

این گونه پیشرفتهای شگرف تکنولوژیکی سبب شده است که بسیاری از روشهای کلاسیک در ژنتیک باکتری به صفحات تاریخ سپرده شود. همچنین این موضوع مشکلات زیادی در نوشتن و به روز نمودن کتابهایی مانند این کتاب به وجود آورده است. کنار گذاشتن روشهای قدیمی به معنی از دست دادن تمامی ادراکاتی است که نحوهٔ پیشرفت مراحل تا رسیدن به موقعیت کنونی را به ما یاد آور می شود. به علاوه محدودیت تکنیکهای صرفاً مولکولی نیز باید در نظر گرفته شود. دیر زمانی نخواهد گذشت که به منظور درک کامل از نقشی که ژنهای اختصاصی در بیولوژی یک موجود زنده بازی می کنند فرد به جای این که فقط توالی DNA آن را در یک رایانه آنالیز کند، باید به مطالعه خود آن موجود زنده بپردازد. بنابر این روش مناسبی که ما به آن دست یافتیم تشریح مختصر روشهای کلاسیک می باشد ولی هنوز به اندازه کافی در مورد این روشها مطلب

وجود دارد که جنبه تاریخی آنها حفظ شده باشد. این موضوع به ما اجازه می دهد که به شرح کاملی از دنیای ژنومیکس و بعد از ژنومیکس (مطالعه توالی ژنوم و به کارگیری این داده ها برای بررسی بیان ژن و دیگر خصوصیات باکتری) بپردازیم. این بینش همچنین سبب گستردگی مباحث مربوط به روشهایی شده است که به وسیله آن دانش ما از ویژگی های بیولوژیکی موجودات زنده از طریق مطالعه ژنتیک باکتریها (با روشهای کلاسیک یا مولکولی) توسعه یابد.

مسلما این روش یک نوع مصالحه است و ممکن است خوشایند برخی افراد نباشد. چرا ما بعضی از موضوعات را اضافه نموده و بعضی را حذف کردیم؟ انتخاب این مسأله یک موضوع شخصی است. باید به خاطر داشت که سعی بر این نبوده است که کتاب حاضر یک کتاب جامع ژنتیک باکتریها باشد، بلکه تلاش گردیده تا مجموعه ای با اندازه متن مناسب ارائه گردد و حاوی موضوعات پایه برای دانشجویانی که واحد ژنتیک باکتریها را انتخاب نموده اند، باشد. این کتاب می تواند برای افرادی که مطالعه کتابهای حجیم ژنتیک برای آنها یک معضل است، نیز مفید باشد. بهرحال امیدواریم موضوعات ارائه شده در این کتاب به اندازه کافی جالب باشد (واقعاً چنین است) که شما را به مطالعه بیشتر در این زمینه ترغیب نماید.

ژرمی دال
سیمون پارک

فصل ۱

ساختار و عمل اسید نوکلئیک

در کتاب حاضر فرض بر این است که خواننده معلومات کافی از اصول زیست شناسی مولکولی خصوصاً ساختمان اسید نوکلئیک و پروتئین و چگونگی سنتز آنها دارد. بنابراین، هدف از این فصل یاد آوری بعضی از مهم ترین نکات و همچنین تأکیدی بر ویژگی‌هایی از این مولکولهاست که خصوصاً برای درک فصول آینده اساسی و پایه می‌باشد.

۱- ۱ ساختمان اسیدهای نوکلئیک

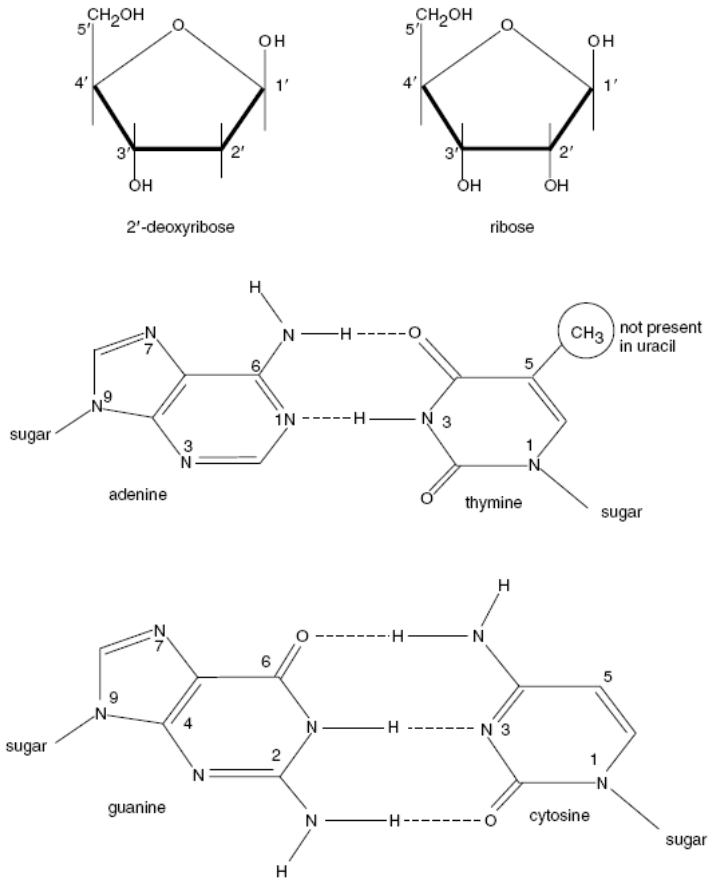
۱-۱-۱ DNA

در باکتریها، ماده ژنتیکی DNA دو رشته می‌باشد، اگرچه باکتریوفاژها (ویروسهایی که باکتریها را آلوده می‌کنند – به فصل چهار مراجعه نمایید) می‌توانند دارای DNA یا RNA تک رشته یا دو رشته باشند. اجزای DNA باکتری (تصویر ۱ - ۱) تشکیل شده است از ۲′ – دی اکسی ریبوز (ستونی را تشکیل می‌دهد که دنباله‌های فسفات به آن متصل شده اند) و چهار باز هتروسیکلیک[1]: ۲ پورین (آدنین و گوانین) و ۲ پیریمیدین (تیمین و سیتوزین). دنباله‌های قندی به وسیله پیوندهای فسفو دی استری به یکدیگر متصل شده‌اند که این پیوند فسفو دی استری از یک طرف به ۵′ و از طرف دیگر به ۳′ یک قند دی اکسی ریبوز اتصال یافته است (تصویر ۱ -۲)، در صورتی که هر یک از چهار باز به موقعیت ۱ هر دی اکسی ریبوز متصل شده‌اند. ترتیب این چهار باز است که اطلاعات ژنتیکی باکتری را مشخص می‌کند.

دو رشته در اطراف یکدیگر پیچ خورده‌اند که اکنون به عنوان مارپیچ دو رشته‌ای شناخته شده

1- heterocyclic bases

است که در آن بازها در مرکز و ستون فسفات و قند در خارج قرار گرفته است. دو رشته با پیوندهای هیدروژنی که بین بازها وجود دارد به یکدیگر متصل شده‌اند. تنها ترتیبی که در آن این بازها شکل پایدارشان را در مارپیچ به طور صحیحی حفظ می‌کنند هنگامی است که آدنین با تیمین و گوانین با سیتوزین جفت شود. بنابراین یک رشته می‌تواند تصویری از رشته دیگر باشد و گفته می‌شود، دو رشته مکمل یکدیگرند. توجه داشته باشید که بازهای پورین از پیریمیدین بزرگترند و آرایش بازها به صورتی است که در هر موقعیت یک پورین در برابر یک پیریمیدین قرار می‌گیرد تا فاصله‌ای که دو رشته را از هم جدا می‌کند، ثابت باقی بماند.



تصویر ۱ -۱ ساختمان عناصر پایه DNA و RNA . RNA حاوی ریبوز به جای دی اکسی ریبوز و اوراسیل به جای تیمین می‌باشد.

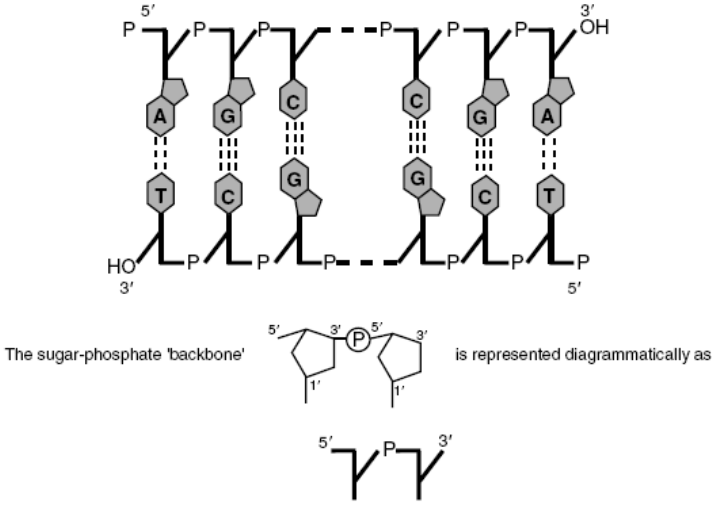
۱ – ۱ – ۲ RNA

ساختمان RNA از DNA، در داشتن قند ریبوز به جای دی اکسی ریبوز و باز اوراسیل به جای تیمین (تصویر ۱ –۱) متفاوت می‌گردد. معمولاً RNA به عنوان اسید نوکلئیک تک رشته شناخته می‌شود، اما تنها به این علت که رشته مکمل معمولاً سنتز نمی‌گردد. هیچ گونه ویژگی ذاتی در RNA وجود ندارد که آن را از تشکیل ساختار دو رشته‌ای ممانعت کند: یک RNA می‌تواند با رشته RNA یا حتی رشته DNA مکمل، جفت (هیبرید) گردد. حتی یک RNA تک رشته بر روی خود تاخورده تا نواحی دو رشته‌ای را تشکیل دهد. اختصاصاً RNA ناقل (tRNA) و RNA ریبوزومی (rRNA) هر دو الگوهای پیچیده‌ای از نواحی جفت شده را تشکیل می‌دهند.

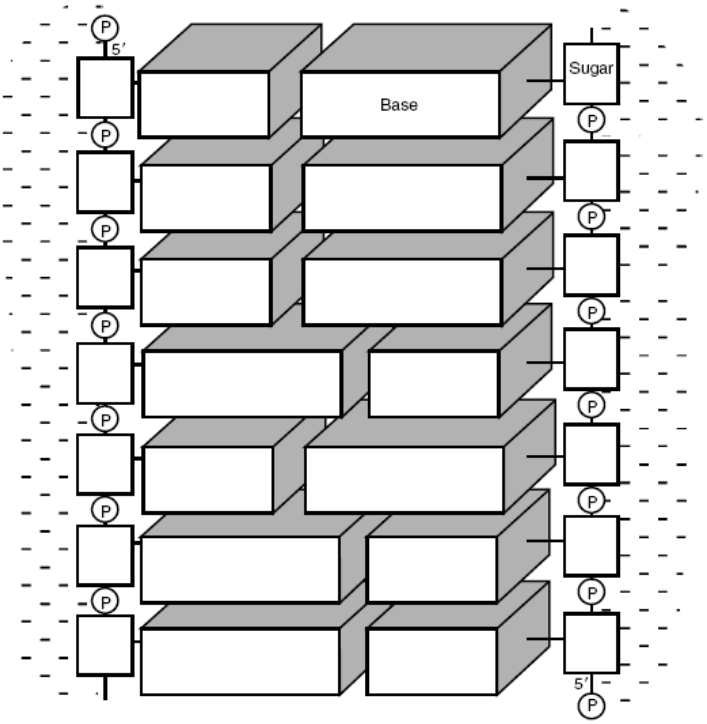
۱ – ۱– ۳ کنش‌های متقابل آب گریزی

اگرچه ژنتیک دانان بر اهمیت پیوند هیدروژنی بین دو رشته تأکید می‌کنند، اما این پیوندها تنها عوامل تأثیر گذار بر روی ساختمان DNA نیستند. بازها خودشان آب گریز می‌با شند و تمایل به تشکیل ساختمان‌هایی دارند که از فاز آبی قابل جدا شدن می‌باشند. خاصیت آب گریزی به خوبی قابل تشخیص خواهد بود خصوصا زمانی که بازها بر روی یکدیگر قرار گیرند (تصویر ۱–۳). ساختار دو رشته‌ای به وسیله کنش‌های آب گریز اضافی بین بازهای دو رشته پایدار خواهد گردید. پیوندهای هیدروژنی نه تنها دو رشته را در کنار یکدیگر قرار می‌دهد بلکه سبب می‌شود تا بازها به میزان کافی نزدیک یکدیگر قرار گرفته تا نیروهای آب گریز بتوانند عمل نمایند. البته پیوندهای هیدروژنی بازها دارای اهمیت خاصی می‌باشند، زیرا سبب می‌شوند تا جفت شدن بین دو باز اختصاصی گردد.

اگرچه بازها آب گریز هستند و از این رو بسیار کم در آب قابل حل می‌باشند، اسیدهای نوکلئیک کاملاً محلول بوده و این عمدتاً به دلیل طبیعت آب دوستی ستون فقرات اسید نوکلئیک خصوصاً غلظت بالای گروههای فسفات دارای بار منفی می‌باشد. این ویژگی برای ساختار مارپیچ دو رشته‌ای مناسب بوده، زیرا بازهای هیدروفوبیک در مرکز قرار گرفته و از آب محافظت می‌شوند و این گروههای فسفات آب دوست هستند که در بیرون قرار می‌گیرند.



تصویر ۱-۲ : ساختار شماتیک DNA.



تصویر ۱-۳ اثرات متقابل هیدروفوبیک بازها در DNA . بازهای هیدروفوبیک در مرکز مارپیچ انباشته شده و سبب کاهش تماسشان با آب می‌شوند.

۱ – ۱– ۴ اشکال مختلف مارپیچ دو رشته ای

بررسی ساختمان کامل DNA بسیار پیچیده خواهد بود، برای این منظور واکنش‌های بین DNA و آب اطرافش را و همچنین تأثیر دیگر مواد محلول[1] و حلال‌ها[2] را نیز باید در نظر گرفت. بنابراین ساختمان DNA می‌تواند تا حدودی بر اساس شرایط تغییر نماید. در محیط لوله آزمایش[3] دو شکل اصلی مشاهده شده است. مدل واتسون و کریک به شکل B اشاره می‌کند که مارپیچ راست گردان می‌باشد که در هر دور آن ۱۰ جفت باز قرار گرفته‌اند (تصویر ۱ –۴). در شرایط معینی DNA جدا شده (ایزوله) به شکل دیگری به نام شکل A تغییر می‌یابد که یک مارپیچ راست گردان بوده، اما متراکم تر می‌باشد به طوری که ۱۱ جفت باز در هر پیچ قرار می‌گیرد. در داخل سلول، DNA به شکلی که بیشتر به شکل B شبیه است، وجود دارد که در این شکل از DNA حدود ۱۰/۴ جفت باز در هر پیچ قرار می‌گیرد (در حالی که تحت کاهش پیچش قرار دارد، به قسمت بعدی مراجعه کنید).

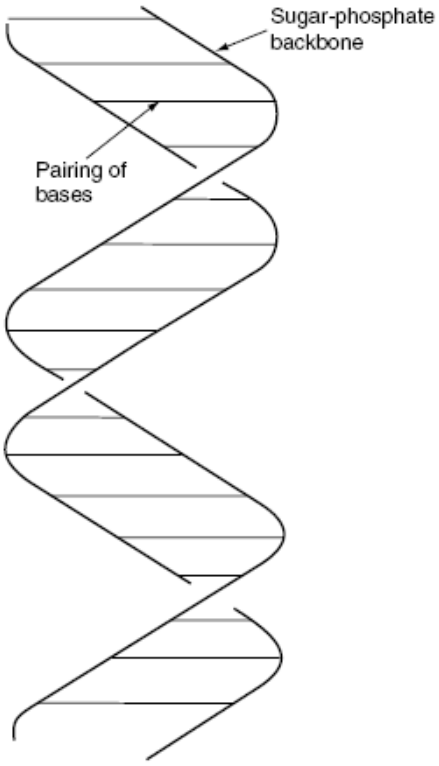
DNA با ترتیب‌های بازی خاصی خصوصا آنهایی که دارای بخش‌های G و C متناوب هستند، متمایل به تشکیل مارپیچ چپ گردانی هستند که فرم Z نام دارد (زیرا ستون قند و فسفر به شکل زیگزاگ وجود دارند در مقایسه با شکل منحنی مانند این ستون در فرم B). اگر چه نخستین بار فرم Z در الیگونوکلئوتیدهای سنتزی نشان داده شد، DNAهایی هم که به طور طبیعی در داخل سلول وجود دارند، می‌توانند حداقل در فاصله کوتاه یا به طور موقت دارای ساختار چپ گردان باشند. تغییر مارپیچ از راست گردان به چپ گردان می‌تواند تاثیر مهمی بر روی بیان ژنها در آن ناحیه داشته باشد.

۱ – ۱ – ۵ تشکیل ابر مارپیچ

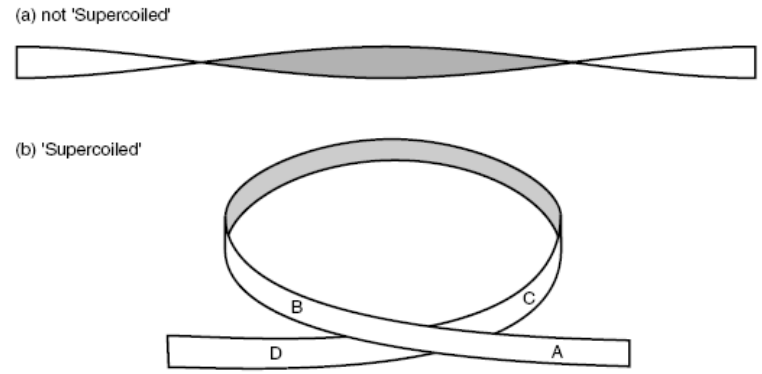
در داخل سلول، مارپیچ DNA پیچ خورده و حلقه‌هایی را تشکیل می‌دهد که به این عمل تشکیل ابر مارپیچ یا سوپرکویل شدن[4] گویند. در تصویر ۱– ۵ این عمل به شکل ساده نشان داده شده است. در این حالت خواننده می‌تواند خودش به راحتی با برداشتن نواری کاغذی و پیچاندن

1- solutes
2- solvents
3- in vitro
4- supercoiling

یک انتها یک پیچ کامل را بوجود آورد (در هر انتهای نوار کاغذ طرف مشابهی به سمت خواننده قرار می‌گیرد). اکنون شکلی که به وجود می‌آید شبیه به تصویر ۱-۵ a می‌باشد. سپس باید دو انتها را به طرف یکدیگر آورده، به طوری که شکل فضایی آن تغییر کرده و همانند آنچه که در تصویر ۱-۵ b آمده است، گردیده که این حالت فرم ساده‌ای از تشکیل ابر مارپیچ می‌باشد. نه تنها نوار کاغذ به صورت ابر مارپیچ در آمده است بلکه به نظر می‌رسد درجه پیچیدگی نوار نیز تغییر کرده باشد (در این مثال اکنون به نظر می‌رسد که اصلاً پیچ نخورده است). اگر هر دو انتها محکم نگهداشته شوند، مارپیچ نوار به طور کامل ناپدید نمی‌شود، و به ندرت به شکل دیگری تبدیل می‌گردد. اگر دو انتها مجدداً از یکدیگر جدا شوند، ساختار به شکل a بر می‌گردد.



تصویر ۱- ۴: ساختار شماتیک فرم B-DNA . دو زنجیره فسفات – قند که به موازات یکدیگر ولی در جهت مخالف می‌باشند یک مارپیچ راست گرد را تشکیل می‌دهند که بازهای آلی در مرکز آن قرار گرفته‌اند. این دو زنجیره به وسیله اندرکنش‌های هیدروفوبیک و پیوندهای هیدروژنی در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند.



تصویر ۱ – ۵ : اندرکنش بین پیچ خوردگی و ایجاد ابر مارپیچ. (a) یک نوار با یک پیچ کامل، بدون ایجاد ابر مارپیچ؛ (b) همان نوار، زمانی که در آن ابر مارپیچ تشکیل گردیده، نوار در این حالت پیچ خوردگی ندارد.

در ایجاد ابر مارپیچ ۳ عامل دخالت دارد: پیچ (T)، شماره اتصال (L)، و پیچ خوردگی (W). پیچ[1] به تعداد چرخش‌های نوار می‌گویند، در صورتی که پیچ خوردگی[2] (اصولاً مقیاسی برای درجه ابر مارپیچی می‌باشد) به تعداد دفعاتی که نوار در یک جهت مشخص خودش را قطع می‌کند، اطلاق می‌گردد. این دو فاکتور بر اساس شکل فضایی از یکدیگر متمایز می‌گردند: در حالت (a) یک پیچ وجود دارد (T=1) ولی ابر مارپیچی وجود ندارد (W=0)، در صورتی که در حالت (b) پیچی وجود ندارد (T=0) و نوار یک بار خودش را قطع می‌کند (W=1). مجموع این دو فاکتور برای تعیین شماره اتصال استفاده می‌گردد به صورت: $L = T + W$. بنابراین شماره اتصال نشان دهنده مقیاس کلی پیچ خوردگی نوار می‌باشد که در مورد DNA شماره دفعاتی است که رشته‌های DNA به دور یکدیگر می‌پیچند.

اگر انتهای نوار برای چرخش آزاد نباشد، شماره اتصال ثابت باقی خواهد ماند. بیشتر مولکولهای DNA که ما در نظر خواهیم گرفت حلقوی خواهند بود بنابراین، انتهایی ندارند که بتواند آزادانه چرخش کند. تا زمانی که شکافی در DNA ایجاد نگردد، هر تغییری در پیچ به وسیله تغییر در ابر مارپیچ متعادل خواهد شد و برعکس. این موضوع در تصویر ۱-۶ به صورت

1- twist
2- writhe

مصور نشان داده شده است.

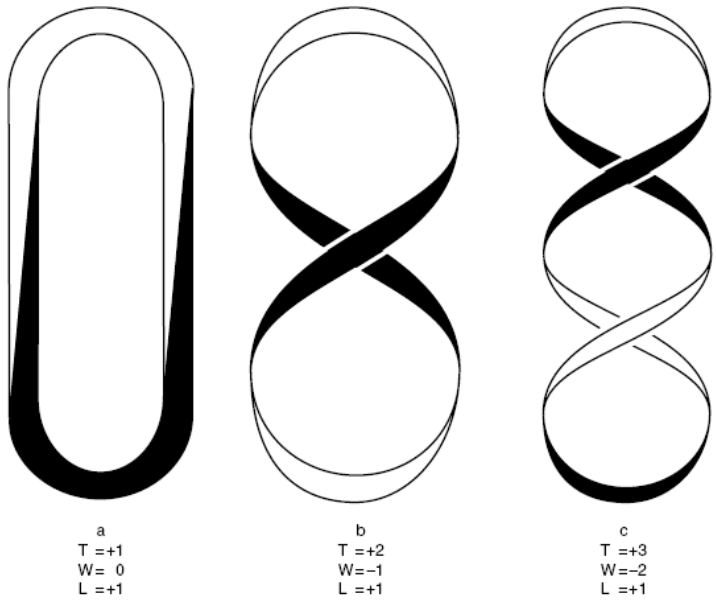
در a ، نوار (یا مولکول DNA) به صورت ابر مارپیچ در نیامده است (W=0) اما دارای یک پیچ کامل است (T= +1)، شماره اتصال (L) ۱+ می‌باشد. درحالت b ، شکل کلی، با چرخش یک انتها از ساختمان تغییر یافته است (به طوری که درجه‌ای از ابر مارپیچ شدگی را ایجاد نموده است). نوار یکبار خودش را قطع می‌کند و براساس قرار داد، وجود یک تقاطع در این جهت با ارزش منفی نشان داده می‌شود به طوری که W=-1 . در همین زمان؛ پیچ تغییر کرده است، در این حالت ۲ پیچ کامل وجود دارد، بنابراین: T= +2 . چون L = T + W می‌باشد، می‌بینیم که L همان (+۱) باقی می‌ماند.

در حالت (c) که با یک چرخش اضافه یک انتهای ساختمان به دست می‌آید، ۲ ابر مارپیچ منفی وجود دارد (W=-2) و ۳ پیچ کامل (T=+3). بار دیگر L ثابت باقی می‌ماند. تغییر در ابر مارپیچ شدگی، درجه پیچ خوردگی را متعاقباً تغییر می‌دهد به طوری که شماره اتصال ثابت باقی می‌ماند. ۳ ساختمانی که در تصویر ۱- ۶ نشان داده شده است به وسیله چرخش یک انتها بدون اینکه حلقه باز شود، قابل تبدیل به یکدیگر می‌باشند. با یک حلقه دست نخورده، پیچ و پیچ خوردگی در ارتباط با یکدیگر و نه جدا از هم تغییر می‌کنند، هر تغییری در ابر مارپیچ شدگی با تغییر در پیچ جبران خواهد شد (و بر عکس)، به طوری که شماره اتصال ثابت باقی می‌ماند. با شکستن یا ایجاد شکاف در DNA و متصل کردن مجدد آن می‌توان شماره اتصال (L) را در رشته‌های DNA حلقوی تغییر داد، به عنوان مثال با عمل توپوایزومرازها (به قسمت بعدی مراجعه کنید).

DNA باکتری به طور طبیعی در وضعیت ابرمارپیچ منفی[1] است. راه دیگر بیان این مطلب این است که بگوییم پیچش‌های DNA باز شده است به طوری که اگر DNA به صورت ابر مارپیچ در نیاید، درجه پیچ خوردگی مارپیچ کمتر از زمانی خواهد بود که در DNA خطی آزاد[2] مشاهده می‌گردد. اگر در DNA شکافی ایجاد گردد (به طوری که یک رشته بشکند و برای چرخش آزاد گردد) به یک حلقه باز در حال استراحت و نه ابر مارپیچی تغییر شکل می‌دهد. DNA کروموزومی معمولا طی لیز سلولی به قطعات خطی شکسته می‌شود، اما پلاسمیدهای باکتریایی (به

1- negatively supercoiled
2- relaxed linear DNA

فصل ۵ مراجعه کنید) معمولا آن قدر کوچک هستند که دست نخورده و به شکل ابر مارپیچ جدا می‌شوند.



تصویر۱-۶: ابر مارپیچ شدگی یک مولکول حلقوی . (a) مولکول دارای یک پیچ بوده و فاقد ابر مارپیچ می‌باشد. چرخش یک انتهای مولکول (b و c) سبب ایجاد ابر مارپیچ‌های منفی و افزایش پیچ خوردگی می‌گردد. چون شماره اتصال (L) ثابت باقی می‌ماند، ۳ شکل مزبور قابل تبدیل به یکدیگر می‌باشند بدون اینکه در حلقه شکافی ایجاد گردد (برای توضیح بیشتر به متن مراجعه نمایید).

ساختمان ابر مارپیچ فشرده DNA از این نظر اهمیت دارد که کروموزوم در حالت گسترده آن، هزاران برابر طولانی تر از خود سلول باکتری (در حدود mm ۱) خواهد بود. به عبارت دیگر، یک اپرون باکتری دارای ۴ ژن، در حالت شکل B فاقد ابر مارپیچ، می‌تواند اندازه آن از یک طرف سلول تا طرف دیگر باشد. ابر مارپیچ شدگی تنها شروع داستان است، همچنان که کروموزوم باکتری شامل تعداد زیادی لوپ‌های ابر مارپیچی است که دراطراف یک مرکز منظم شده‌اند تا ساختار متراکم و سازمان یافته‌ای به نام نوکلئوئید[1] را ایجاد کنند. همچنین ایجاد ابر مارپیچ (و دیگر ویژگی‌های ساختمانی) DNA در تنظیم بیان ژن مهم می‌باشد (به فصل ۳ مراجعه نمایید).

1- Nucleoid

عمل توپوایزومرازها

ابر مارپیچ شدگی DNA باکتری عملاً از طریقی که در تصویر ۱-۶ نشان داده شده است، یعنی پیچ دادن فیزیکی مولکول DNA حلقوی صورت نمی‌گیرد. به جای آن سلول از آنزیم‌هایی استفاده می‌کند به نام DNA توپوایزومرازها و به وسیله این آنزیم‌ها با ایجاد شکاف کنترل شده و اتصال مجدد رشته‌های DNA ابر مارپیچ را در DNA ایجاد یا حذف می‌کند.

DNA توپوایزومرازها را به دو دسته می‌توان تقسیم بندی نمود. توپوایزومرازهای تیپ I به این صورت که بر روی یک قطعه DNA عمل می‌کند یکی از رشته‌ها را شکاف داده و رشته دیگر را از شکاف ایجاد شده عبور می‌دهد و در ادامه شکاف را ترمیم نموده و به هم می‌چسباند. از آنجا که این عمل تعداد مراتبی که دو رشته یکدیگر را قطع می‌کنند را افزایش می‌دهد، شماره اتصال به اندازهٔ ۱ واحد افزایش می‌یابد که این خود سبب افزایش T و W می‌گردد. توپوایزومراز I *E.coli* تنها بر روی DNA ابر مارپیچ منفی عمل می‌کند. افزایش مقدار W به این معنی است که درجه ابر مارپیچ شدگی منفی کاهش می‌یابد (DNA به حالت استراحت در می‌آید).

توپوایزومرازهای تیپ II هر دو رشته DNA را می‌شکند و ناحیه دو رشته‌ای دیگر از طول شکاف عبور می‌کند. در تصویر ۱-۷ در نگاه اول به نظر می‌رسد ساختار A ابر مارپیچ باشد، اما بررسی نزدیک تر نشان می‌دهد که دو نقطه متقاطع در جهت مخالف یکدیگر بوده و بنابراین یکدیگر را خنثی می‌کنند. ساختار A یک حلقه غیر ابر مارپیچی می‌باشد که رسم شده تا نحوهٔ عملکرد آنزیم توپوایزومراز را نشان دهد. اگر هر دو رشته مارپیچ بین نقاط L و M بشکنند و رشته‌های پایین تر (X-Y) در طول شکاف ایجاد شده حرکت کرده و پس از آن شکاف بین L و M مسدود گردد، ساختمان B ایجاد می‌گردد. در اثر این عمل ارزش و علامت W در این نقطه تغییر می‌کند (W از ۱+ به ۱- تغییر می‌یابد) که در نتیجه ارزش کلی W به ۲- تغییر یافته و میزان L نیز تغییر می‌کند. مثال مهمی از این نوع آنزیم DNA جیراز می‌باشد که قادر است در DNAهایی که تازه همانندسازی کرده اند، ابر مارپیچ منفی ایجاد کند.

۱-۱-۶ دناتوره شدن و هیبریداسیون

از آنجاکه دو رشته DNA تنها با نیروهای غیر کووالانس به یکدیگر متصل شده‌اند در آزمایشگاه به راحتی از یکدیگر جدا می‌شوند که این عمل را می‌توان به عنوان مثال با افزایش

درجه حرارت یا pH انجام داد. جدا شدن رشته‌های DNA (دناتوره شدن) به راحتی قابل برگشت می‌باشد. کاهش درجه حرارت یا pH سبب می‌شود پیوندهای هیدروژنی بین ترتیب‌های بازی DNA مکمل دوباره تشکیل شوند که به این عمل بازآرایی[1] می‌گویند (تصویر ۱- ۸). اگر مولکولهای DNA از منابع مختلف، دناتوره شده و مخلوط گردند و اجازه داده شود تا به یکدیگر متصل گردند، امکان ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین DNAها با ترتیب‌های بازی مشابه وجود دارد (هیبریداسیون). این عمل اساس استفاده از شناساگرهای DNA[2] برای شناسایی و تشخیص یک ترتیب بازی اختصاصی از DNA می‌باشد. اختصاصی بودن واکنش هیبریداسیون را می‌توان با تغییر درجه حرارت و یا قدرت یونی تنظیم نمود. درجه حرارت بالاتر و قدرت یونی کمتر سبب ایجاد هیبریداسیون محکم تری می‌گردد. هیبریداسیون با استحکام بالا برای تشخیص ترتیب‌های بازی که قرابت نزدیک یا اختلاف کوچکی با هم دارند به کار برده می‌شود، در صورتی که شرایط هیبریداسیون با استحکام پایین برای تشخیص و ردیابی توالی‌هایی که تنها قرابت دوری با شناساگر یا پروب دارند به کار برده می‌شود. این روش (هیبریداسیون) بخش مهمی از بیولوژی مولکولی جدید را تشکیل می‌دهد.

همچنین نواحی مشخصی از DNA دورشته به طور موقت از یکدیگر جدا می‌شوند که این عمل به عنوان بخش مهمی در فرآیند همانند سازی و نسخه برداری اتفاق می‌افتد. باید توجه داشت که گوانین و سیتوزین با ۳ پیوند هیدروژنی به یکدیگر متصل می‌شوند، در صورتی که آدنین و تیمین تنها با ۲ پیوند هیدروژنی با یکدیگر جفت می‌شوند. بنابراین دو رشته DNA در مناطقی که میزان G+C بیشتر باشد محکم تر به یکدیگر متصل شده‌اند. این نواحی به عمل دوناتوره شدن مقاوم تر بوده و برعکس راحت تر به حالت اولیه برگشته و بازآرایی می‌کنند. تأثیر ترکیب بازی بر تسهیل جداشدگی دو رشته اسید نوکلئیک می‌تواند نقش مهمی در کنترل فرآیندهایی مانند شروع سنتز RNA داشته باشد در جائی که ناحیه غنی از A-T جدا شدن اولیه رشته‌های DNA را تسهیل می‌کند (فصل ۳).

1- re-annealing
2- DNA probes