فصل هفتم

فناوری‌های نوین‌زیستی

گام اول

تعیین پیامدهای مطلوب

ایده‌های کلیدی

- ساختار و عملکرد
- روابط و الگوها
- پایداری، تغییر و زمان
- اندازه‌گیری

پیامدهای شایستگی محور

- ضمن آشنایی با اصول اولیهٔ فناوری‌های نوین‌زیستی، درک مفاهیم و فرایندهای مرتبط، روش‌ها و کاربرد بعضی از این فرایندها را گزارش کند.
- با توجه به اهمیت فناوری‌های نوین‌زیستی در عصر حاضر و پیشرفت سریع علم در این زمینه، درک صحیحی از این فناوری و کاربرد آن در زندگی فردی و اجتماعی به‌دست آورد.
- با اصول اخلاقی کاربرد این فناوری آشنا شده و به آن متعهد باشد.
- نقش و اهمیت کاربرد زیست فناوری را در فرایندهایی مثل مهندسی پروتئین و بافت درک و تحلیل کند.
- نحوهٔ انتقال و اتصال ژن خارجی را در فرایند مهندسی ژنتیک درک کند.
- تغییرات ایجادشده در ساختارهای مولکولی را در طول فرایند مهندسی ژنتیک درک و گزارش کند.
- نوع تغییرات و تمایز یاخته‌های بنیادی را در فرایند رشد و نمو گزارش کند.
- تغییرات ایجادشده در یاخته‌های بدن فرد بیمار را در ژن درمانی گزارش و تحلیل کند.

پرسش‌های اساسی

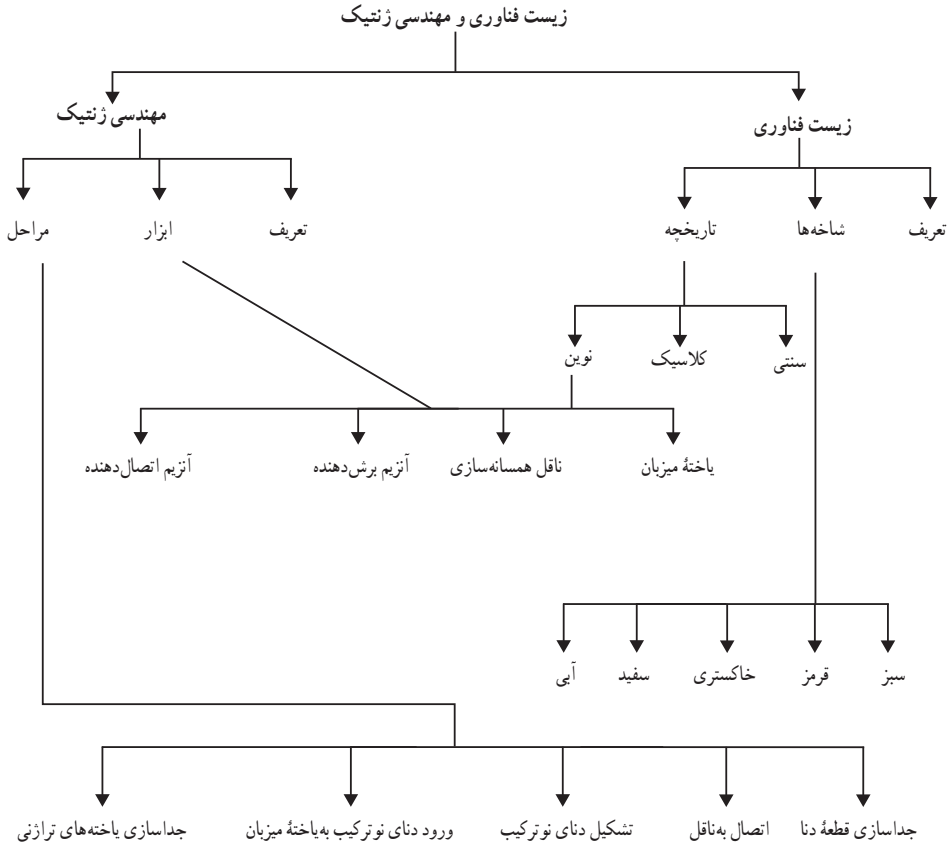
- زیست‌فناوری چیست و در گذر زمان چه تغییراتی داشته است؟
- مهندسی ژنتیک از چه مراحلی تشکیل شده است؟
- ابزار مورد نیاز مهندسی زنتیک و فرایندهای آن چگونه هستند؟
- هدف از پایداری پروتئین‌ها چیست و به چه روش‌هایی انجام می‌شود؟
- منظور از مهندسی بافت چیست و چه کابردهایی دارد؟
- نقش و کاربرد یاخته‌های بنیادی در بدن موجود زنده و همچنین مهندسی ژنتیک چیست؟
- انواع کاربردهای زیست‌فناوری در زندگی چیست و چگونه انجام می‌شوند؟
- رابطهٔ اخلاق و زیست‌فناوری چیست و چرا اهمیت دارد؟

مهارت‌های کلیدی

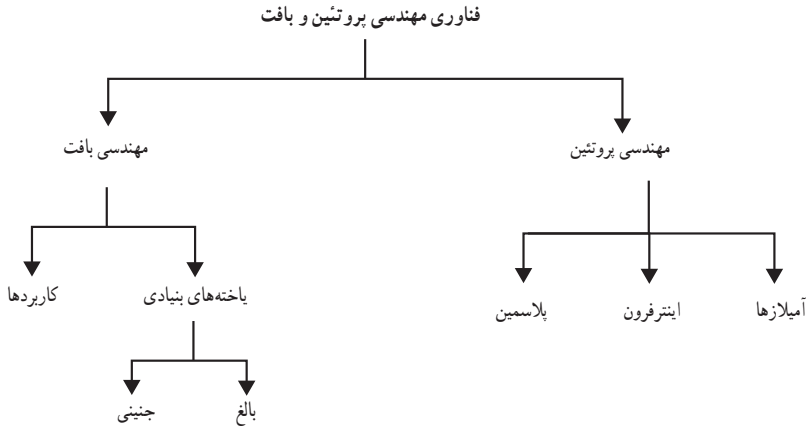
- توصیف و مقایسه
- استنتاج
- تحلیل فرایندها
- تحقیق کتابخانه‌ای و دیجیتال

نقشهٔ مفهومی

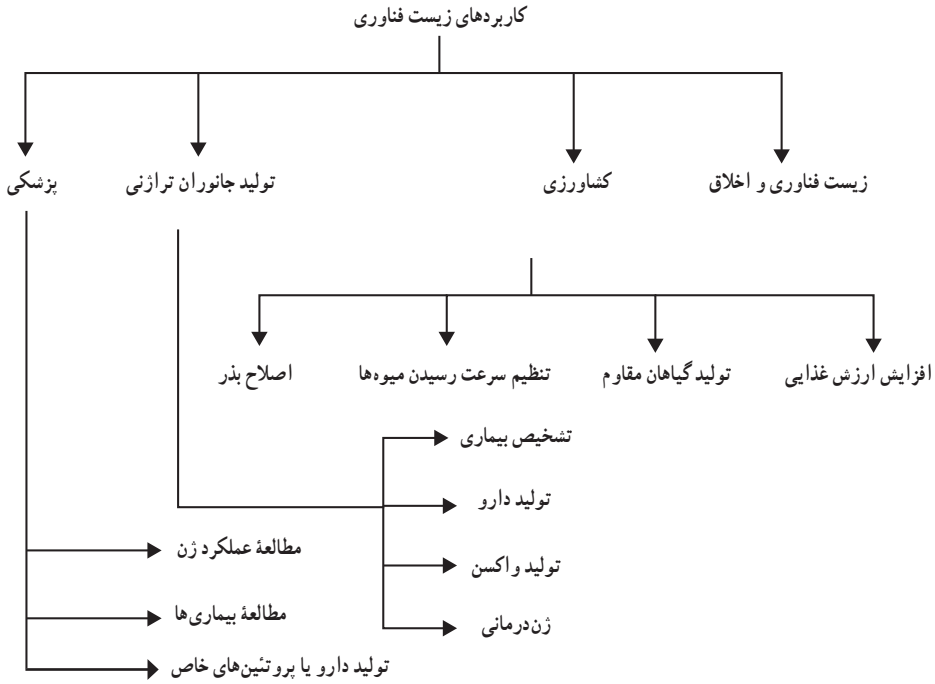
گفتار ۱ : زیست فناوری و مهندسی ژنتیک



گفتار ۲ : فناوری مهندسی پروتئین و بافت



گفتار ۳ : کاربردهای زیست فناوری



گام دوم — فعالیت‌های یادگیری

■ قبل از شروع این فصل لازم است معلم از محتوای آموزشی مرتبط با آن در کتاب‌های علوم متوسطهٔ اول به‌خصوص پایه هشتم و همچنین کتاب‌های زیست‌شناسی پایه‌های دهم و یازدهم اطلاعات کامل داشته باشد. آگاهی و اشراف کامل به‌محتوای فصل اول زیست‌شناسی ۱ (پایهٔ دهم) برای تدریس موفق این فصل بسیار مهم است.

■ ارزشیابی آغازین و اطلاع از پیش دانسته‌های دانش‌آموزان کمک شایانی به معلم در این زمینه می‌کند.

■ بهتر است در ابتدای درس با روش بارش مغزی برای مشارکت هر چه بیشتر دانش‌آموزان شروع کنید. در چنین شرایطی از توجه و همراهی بیشتر آنها در طول فرایند تدریس بهرهٔ زیادی خواهید برد.

■ از دانش‌آموزان بخواهید خود آنان به‌تولید نقشه‌های مفهومی بپردازند. نقشه‌های تولید شدهٔ آنها ممکن است با نقشهٔ مفهومی کتاب راهنما متفاوت باشند و براساس پیش دانسته‌ها و روابط و الگوهایی که در ذهن آنها شکل گرفته تهیه شده باشد، لذا شما می‌توانید با مشاهده و بررسی نقشه‌های تولیدشده به‌تشخیص روابط بین مفاهیم توسط آنها و کج‌فهمی‌های احتمالی آنان پی ببرید. این روش به‌شما فرصت تشخیص و اصلاح کج فهمی‌ها را خواهد داد.

■ می‌توانید با ایجاد فرصت‌های بازدید از مراکز تحقیقاتی زیست‌فناوری، علاقه‌مندی و همچنین ارتباط و درک بیشتر مفاهیم و کاربردهای آن را در دانش‌آموزان فراهم کنید.

■ از دانش‌آموزان بخواهید با تحقیق در مورد انواع کاربردهای زیست‌فناوری، (با تأکید بر ایران) و گزارش آن در کلاس به هر چه غنی‌تر و فعال‌کردن تدریس کمک کنند.

■ طراحی فرایندهای مهندسی ژنتیک به‌صورت مرحله‌به‌مرحله و در جای مناسب به‌تفهیم محتوا کمک زیادی می‌کند.

■ سعی کنید مثلث ارتقای یادگیری را مد نظر قرار دهید : طراحی آموزشی، رسانه‌های پرشمار و ارائهٔ مطلوب آموخته‌ها (برون‌داد)

گفتار ۱:زیست فناوری و مهندسی ژنتیک

آموزش، از یادآوری پیش دانسته‌ها و تجارب آنها شروع می‌شود. دانش‌آموزان تا این پایه و شروع این فصل آموخته‌اند که :

- ژن بخشی از مولکول دنا و حاوی اطلاعات وراثتی است.
- بعضی از جهش‌ها می‌توانند در میزان یا ساختار محصول نهایی ژن تغییراتی ایجاد کنند.
- برای هر نوع واکنش زیستی حداقل وجود یک آنزیم لازم است.
- بین نوکلئوتیدهای یک رشتهٔ دنا پیوند فسفودی استر وجود دارد.
- بعضی از انواع دنا حلقوی هستند.
- بین نوکلئوتیدهای دو رشتهٔ دنا روابط مکملی و پیوند هیدروژنی وجود دارد.
- فرایند همانندسازی دنا توسط آنزیم‌های متعدد و با استفاده از نوکلئوتیدها به‌عنوان پیش‌ساز و طبق روابط مکملی صورت می‌گیرد.
- غشای پلاسمایی یاخته از دو لایهٔ فسفولیپید و پروتئین ساخته شده است و درشت مولکول‌ها نمی‌توانند به‌راحتی از آن عبور کنند.
- پادزیست مولکولی است که در شرایط خاص منجر به‌مرگ یاخته می‌شود.

برای شروع تدریس می‌توان پرسش‌های زیر را مطرح کرد :

ــ ژن چیست؟

ــ انواع جهش را نام ببرید. هر یک چه تأثیری بر مقدار یا عملکرد محصول نهایی خواهد داشت؟

ــ در مورد فناوری‌های نوین‌زیستی چه می‌دانید؟

ــ از مطالبی که در پایه‌های هشتم و دهم خوانده‌اید چه چیزهایی به‌یاد دارید؟

ــ آیا با روش درست‌کردن سرکه و ماست آشنایی دارید؟

ــ خمیرمایه چیست و چرا آن را به خمیر نان اضافه می‌کنند؟

از پاسخ‌هایی که دانش‌آموزان به‌سؤال‌های مطرح شده می‌دهند واژه‌های کلیدی را استخراج کنید و روی تابلو بنویسید.

با روش سنتی تهیهٔ سرکه و ماست و پنیر شروع کنید و مفهوم زیست‌فناوری را به‌ساده ترین شکل توضیح دهید. اجازه دهید دانش‌آموزان خود به این مفهوم دست یابند و به این نتیجه برسند که هر گونه فعالیتی که منجر به‌بهبود کیفیت و یا تولید یک محصول جدید توسط موجودات زنده شود در زمرهٔ زیست‌فناوری قرار می‌گیرد. بنابراین زیست‌فناوری الزاماً فقط شامل فعالیت‌های مولکولی پیشرفته نمی‌شود.

دانش‌آموزان از سال‌های قبل به‌یاد دارند هر کدام از گونه‌های جانداران دارای خزانهٔ ژنی مشخصی است. با یادآوری این مفهوم می‌توانید مبحث تراژنی را شروع کنید. دانش‌آموزان می‌دانند با توجه به مفاهیم ژنوم و خزانهٔ ژنی، هر جاندار دارای صفات مشخصی است، لذا ایجاد یک صفت جدید به‌دو صورت ممکن است : جهش در ژن‌های موجود و یا انتقال ژن از ژنوم یک فرد به‌فرد جدید.

در این قسمت درس، بر انتقال ژن تأکید کنید و از دانش‌آموزان بخواهید نظرات خود را دربارهٔ انتقال ژن بیان کنند. با استفاده از پیش‌دانسته‌های آنان در مورد ساختار دنا، نوکلئوتیدها فرایند همانندسازی و آنزیم‌های آن، شما قادر خواهید بود فرایند مهندسی ژنتیک را آموزش دهید. اجازه دهید در هر یک از مراحل، خود آنها فرایند را پیش‌بینی کنند و به‌نتیجه برسند و شما با دادن واژه‌های کلیدی و هدایت فکری آنها در نتیجه‌گیری صحیح نقش داشته باشید. در چنین شرایطی دانش‌آموز همانند یک محقق که در آزمایشگاه در حال آزمون و خطاست، در ذهن خود فرضیه می‌نویسد، آزمایش طراحی می‌کند و نتیجه می‌گیرد. فراموش نکنید که رسم مراحل روی تابلو در یادگیری خیلی مؤثر است. گاهی طراحی اشکال به‌صورت فرایندی و مرحله‌به‌مرحله، خیلی بهتر از فیلم‌ها و انیمیشن‌های آموزشی است.

دانستنی‌هایی برای معلم

پلازمید

پلازمید طبیعی یک مولکول دنای دو رشته‌ای معمولاً حلقوی است که می‌تواند به‌طور مستقل از کروموزوم باکتری همانندسازی کند. البته در بعضی سویه‌های باکتریایی پلازمیدها می‌توانند خطی باشند. اندازهٔ پلازمیدها از یک تا بیش از هزار کیلو جفت‌باز می‌تواند متفاوت باشد. تعداد پلازمیدها از یک نوع می‌تواند بین یک تا هزاران عدد در یک یاخته باکتری باشد.

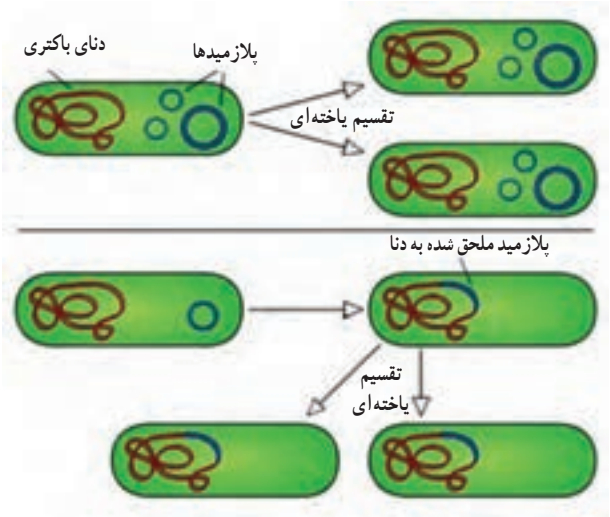
شکل ۱ــ یاختهٔ باکتری حاوی پلازمید را نشان می‌دهد.

انواع پلازمید

دسته‌بندی پلازمیدها براساس توانایی ورود به‌ژنوم میزبان

۱ پلازمیدهایی که توانایی وارد شدن به درون کروموزوم میزبان را نداشته و به‌طور کاملاً مستقل همانندسازی می‌کنند.

۲ پلازمیدهایی که می‌توانند به درون کروموزوم میزبان وارد شوند و به آنها اپی زوم نیز گفته می‌شود، بنابراین **اپی زوم**، پلازمیدی است که گاهی اوقات می‌تواند درون سیتوپلاسم و کاملاً مستقل از کروموزوم باکتری باشد، در حالی که در زمان دیگر می‌تواند به درون کروموزوم باکتری وارد شود.



شکل ۲ــ دو نوع پلازمید باکتریایی : پلازمید مستقل (بالا) و اپی‌زوم (پایین)

دسته‌بندی پلازمیدها براساس توانایی انتقال یافتن

۱ پلازمیدهایی که توانایی انتقال به سایر سلول‌ها را دارند و می‌توانند فرایند هم‌یوغی (conjugative plasmid) را انجام دهند.

۲ پلازمیدهایی که توانایی انتقال به سایر سلول‌ها را ندارند و نمی‌توانند فرایند هم‌یوغی (non–conjugative plasmid) را انجام دهند.

دسته‌بندی پلازمیدها براساس عملکرد

طبقه‌بندی براساس عملکرد، دسته‌بندی‌ای است که بسیار معمول است و بر این اساس پنج دسته پلازمید وجود دارد :

۱ پلازمیدهای جنسی : توانایی هم‌یوغی را دارند.

۲ پلازمیدهای مقاومتی : ژن‌هایی را حمل می‌کنند که مقاومت علیه آنتی بیوتیک‌ها یا سموم را باعث می‌شوند.

۳ پلازمید Col : ژن‌های تولیدکنندهٔ باکتریوسین‌ها را حمل می‌کنند. باکتریوسین‌ها پروتئین‌هایی هستند که سایر باکتری‌ها و نه میزبان حامل را از بین می‌برند.

۴ پلازمیدهای تجزیه‌کننده : توانایی تجزیهٔ مواد غیر معمول مثل تولوئن یا اسید سالیسیلیک را دارند.

۵ پلازمیدهای تهاجمی : باکتری حامل را به‌یک عامل بیماری‌زا یا پاتوژن تبدیل می‌کنند.

با تغییراتی که در توالی پلازمیدها ایجاد می‌کنند، صفات خاصی در آنها به‌وجود می‌آید که در مهندسی ژنتیک می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. چنانچه مبدأ همانندسازی دو پلازمید از یک منشأ باشد هنگام ورود به یاخته با هم رقابت می‌کنند و فقط یکی از آنها وارد می‌شود، اما اگر منشأ مبدأ همانندسازی آنها متفاوت باشد هر دو می‌توانند وارد یاختهٔ باکتری شوند. این مسئله در همسانه‌سازی اهمیت زیادی دارد. اندازهٔ ژنی که به‌وسیلهٔ پلازمید دریافت می‌شود در حدود ۱۰ کیلو باز است و پلازمیدها معمولاً ژن‌های بزرگ‌تر از آن را نمی‌توانند تکثیر کنند.

باکتریوفاژها

ویروس‌های حاوی دنای تک‌رشته‌ای هستند که به باکتری‌ها حمله می‌کنند و آنها را از بین می‌برند. مزیت فاژها را می‌توان در موارد زیر خلاصه کرد :

۱ امکان همسانه‌سازی قطعات دنای تا ۲۳ کیلو باز توسط فاژ وجود دارد.

۲ به‌خاطر داشتن پروتئین‌های خاص، قدرت نفوذ بسیار مؤثر و اختصاصی دارند.

۳ بیان ژن در آنها پایدارتر است.

۴ فاژ لامبدا به‌اشریشیا کلی حمله می‌کند و کارایی آلوده‌سازی بسیار بالاتری نسبت به‌پلازمید دارد.

۵ دارای راه‌اندازهای خاص هستند که به‌خوبی توسط یاخته‌های میزبان شناخته می‌شوند.

۶ قدرت تکثیر ژنوم خود را در نسخه‌های بسیار زیاد دارند.

۷ در داخل ژنوم خود مناطقی برای کنترل و افزایش نسخه‌برداری دارند.

آنزیم‌های مورد نیاز در مهندسی ژنتیک

- نوکلئازها شامل اگزونوکلئازها و اندونوکلئازها
- لیگازها
- پلیمرازها
- آنزیم‌های تعدیل‌کننده
- توپوایزومرازها

به‌طور کلی آنزیم‌های مورد استفاده در فرایند مهندسی ژنتیک را آنزیم‌های تغییردهندهٔ دنا می‌گویند و در بین آنها آنزیم‌های برش‌دهنده (از نوع اندونوکلئازها) و آنزیم‌های اتصال‌دهنده (لیگازها) بیشترین کاربرد را دارند.

آنزیم‌های برش‌دهنده یا اندونوکلئازها به‌آنزیم‌هایی گفته می‌شوند که توالی‌های نوکلئوتیدی خاصی را در مولکول دنا تشخیص می‌دهند و برش می‌زنند. تاکنون سه گروه متفاوت از این آنزیم‌ها به‌نام‌های ۱ و ۲ و ۳ شناسایی شده است. این آنزیم‌ها را براساس شاخص‌های متعددی دسته‌بندی می‌کنند که مهم‌ترین آنها عبارت‌اند از :

- براساس نوع انتهای ایجادشدهٔ دنا بعد از برش (برش با انتهای صاف و برش با انتهای چسبنده)
- براساس تعداد بازهای مورد شناسایی
- براساس حساسیت به متیل‌گذاری

ژن‌های نشانگر

به این دلیل که ورود دنای خارجی به‌درون تمام یاخته‌های میزبان صورت نمی‌گیرد و جداسازی یاخته‌های تراژنی از سایر یاخته‌ها مشکل است، بهترین کار استفاده از نشانگرهای انتخابی است.

۱ **ژن‌های نشانگر مقاومت به‌آنتی‌بیوتیک‌ها :** مهم‌ترین ژن‌های نشانگر هستند. تاکنون از ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های متعددی نظیر کانامایسین، آمپی‌سیلین، جنتامایسین، استرپتومایسین، کلرامفنیکل، تتراسایکلین و... استفاده شده است. اگر یاخته ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک را داشته باشد، آنزیمی را رمز خواهد کرد که آنتی بیوتیک را خنثی می‌کند. با توجه به اینکه ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها از نظر ایمنی غذایی در گروه‌های مختلف طبقه‌بندی می‌شوند، نوع ژن گزینش‌گر باید با احتیاط مورد استفاده قرار گیرد. کانامایسین فراوان‌ترین نشان‌گر گزینش‌گر قابل استفاده در محصولات تراژنی است.

۲ **ژن‌های نشانگر مقاومت به علف‌کش‌ها :** این ژن‌ها قابلیت زنده ماندن در برابر علف‌کش‌ها را به‌یاخته می‌دهند و در انتخاب یاخته‌های تراژنی گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

۳ **ژن‌های نشانگر گزارشگر :** این ژن‌ها بلافاصله در یاخته تراژنی بیان می‌شوند. از موارد کاربرد

ژن‌های نشانگر گزارشگر می‌توان به بررسی زمان، مکان و میزان بیان ژن مورد نظر با استفاده از راه‌انداز ژن اصلی و اتصال آن به ژن گزارشگر و مطالعهٔ تأثیر عوامل مختلف بر راه‌انداز ژن مورد بررسی و نحوهٔ کنترل بیان آن اشاره کرد. قبل از انتقال ژن باید ژن‌های نشانگر نیز با ژن مورد نظر در پلازمید جاسازی شوند.

ورود دنای نوترکیب به‌درون یاختهٔ میزبان

برای ورود دنای نوترکیب به درون یاختهٔ میزبان از روش‌های متفاوتی استفاده می‌شود. با توجه به شکلی که در کتاب آمده است، اگر باکتری در غلظت‌های مشخصی از کاتیون‌های دو ظرفیتی مثل کلسیم تیمار داده شود، نسبت به دنای نوترکیب نفوذپذیر می‌شود. در چنین شرایطی دنای نوترکیب از منافذ ایجاد شده در دیوارهٔ باکتری به درون آن راه می‌یابد. همچنین اگر مخلوطی از باکتری و دنای نوترکیب را که در یخ قرار دارد به‌طور ناگهانی شوک حرارتی دهیم (۴۲ درجه سلسیوس) و بلافاصله به یخ برگردانیم، دنای نوترکیب به درون باکتری نفوذ می‌کند. نفوذ دنای نوترکیب به‌درون یاختهٔ میزبان را می‌توان به روش‌های شوک الکتریکی نیز انجام داد.

به‌طور کلی روش‌های انتقال ژن به‌موجودات زنده را در دو گروه اساسی مبتنی بر ناقل و روش‌های مستقیم طبقه‌بندی می‌کنند. در روش‌های مبتنی بر ناقل، انتقال دنا از طریق پلازمید یا فاژ صورت می‌گیرد. روش‌های انتقال مستقیم شامل روش‌های فیزیکی و شیمیایی می‌شود.

روش‌های فیزیکی

انتقال ژن به‌روش بمباران ذره‌ای (تفنگ ژنی) : این روش مهم‌ترین و کاراترین روش انتقال مستقیم ژن برای تراریزش انواع مختلفی از موجودات زنده است و به‌خصوص دربارهٔ گیاهان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این روش از ریزپرتابه‌ها برای فرستادن دنا به‌درون یاخته‌های زنده استفاده می‌شود.

انتقال ژن به‌روش الکتروپوریشن : وقتی بافت‌های گیاهی تحت تأثیر پالس‌های الکتریکی قوی در مدت خیلی کوتاه قرار می‌گیرند، غشای پلاسمایی شکسته می‌شود و قابلیت نفوذ آن به دنا و رنا افزایش می‌یابد.

انتقال ژن به روش درشت تزریقی : در این روش محلول حاوی ۵ تا ۱۰ میکرولیتر از دنا به‌وسیلهٔ یک میکروپیپت به داخل بافت تزریق می‌شود. این روش در گیاهان کاربرد دارد.

انتقال ژن به‌روش الکتروفورز : در این روش یاخته‌های میزبان و دنا در میدان الکتریکی قرار می‌گیرند به‌طوری که مولکول‌های دنا به سمت یاختهٔ هدف حرکت می‌کنند و به داخل آن وارد می‌شوند و نهایتاً به ژنوم یا اندامک هدف می‌رسند.

انتقال ژن با ایجاد شکاف‌های ریز در یاختهٔ میزبان : این روش به کمک لیزر انجام می‌شود. با استفاده از لیزر منافذ ریزی در دیواره سلول گیاهی ایجاد می‌شود که دنا از آن وارد می‌شود.

انتقال ژن با استفاده از امواج فراصوت : نمونه در بافر خاص حاوی پلازمید نوترکیب قرار می‌گیرد و در معرض پالس‌هایی با قدرت ۵ وات بر سانتی‌متر مربع به مدت ۳۰ دقیقه قرار می‌گیرند.

روش‌های شیمیایی

انتقال ژن با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول : غشاهای یاخته‌ای و مولکول‌های دنا بار الکتریکی منفی دارند و این امر باعث کندی جذب دنا می‌شود. پلی‌اتیلن گلیکول آب‌دوست است و به‌دلیل جذب مولکول‌های آب آزاد، دافعه را به‌حداقل می‌رساند. این ماده همچنین از طریق حفاظت از دنا در مقابل نوکلئازها و افزایش خاصیت نفوذپذیری غشای یاخته باعث تسهیل جذب دنا می‌شود.

انتقال ژن با استفاده از لیپوزوم : وزیکول‌های غشایی مصنوعی هستند که از فسفولیپیدها ساخته شده‌اند. از موارد استفاده از آنها می‌توان به‌انتقال داروها، واکسن‌ها و دنا اشاره کرد.

گفتار ۲: فناوری مهندسی پروتئین و بافت

آموزش، از یادآوری پیش‌دانسته‌ها و تجارب آنها شروع می‌شود. دانش‌آموزان تا این پایه و شروع این فصل آموخته‌اند که :

- پروتئین‌ها از واحدهایی به‌نام آمینواسید ساخته شده‌اند که با پیوند پپتیدی به یکدیگر اتصال دارند.
- پروتئین‌ها ممکن است از یک یا چند زیر واحد ساخته شده باشند.
- پروتئین‌ها ساختارهای متعددی دارند و عملکرد هر پروتئین ارتباط تنگاتنگی با ساختار فضایی آن دارد.
- ساختار فضایی طبیعی هر پروتئین به‌توالی آمینواسیدهای آن بستگی دارد که از روی ژن آن پروتئین رمز می‌شود.
- ساختار فضایی پروتئین‌ها تحت تأثیر عواملی مثل گرما، تغییرات اسیدیته و... دستخوش تغییر می‌شود.
- به‌مجموعهٔ یاخته‌های هم شکل که به‌طور هماهنگ کار معیّنی را انجام می‌دهند بافت گفته می‌شود.
- همهٔ یاخته‌های بدن از یک یاختهٔ اولیه به‌وجود آمده‌اند که در فرایند تمایز دچار تغییرات ساختاری و عملکردی شده‌اند.
- یاخته‌های بنیادی، یاخته‌های تمایز نیافته‌ای هستند که قدرت تکثیر و تمایز زیادی دارند.

برای شروع تدریس می‌توان پرسش‌های زیر را مطرح کرد :

- توالی آمینواسیدها در ساختمان اول پروتئین‌ها بر چه اساسی صورت می‌گیرد؟

■ بین شکل و عمل پروتئین چه رابطه‌ای وجود دارد و چگونه؟
■ وظیفهٔ آنزیم چیست و چگونه نقش خود را ایفا می‌کند؟
■ منظور از مهندسی پروتئین و بافت چیست؟
■ تمایز با رشد و نمو چه فرقی دارد؟
■ چرا سرعت تکثیر یاخته‌ها در محیط‌های کشت بسیار متفاوت است و بعضی از یاخته‌ها به‌سختی در محیط کشت تکثیر می‌شوند؟
■ یاختهٔ بنیادی چیست؟ آیا انواع یاخته‌های بنیادی را به‌یاد دارید؟
■ به‌نظر شما آیا آدمی قادر است به‌کمک فناوری‌های نوین‌زیستی، پروتئین یا بافت دلخواه خود را بسازد که از نظر عملکردی نیز پاسخگوی نیاز بدن باشد؟

با توجه به‌اینکه عنوان گفتار با واژهٔ مهندسی شروع شده است، می‌توان تدریس را با این واژه و مفهوم آن شروع کرد. بدین صورت که مهندسی کردن به‌صورت عام یعنی چه؟ و یک مهندس چه کاری انجام می‌دهد؟ سپس وارد بحث اصلی شوید و مهندسی پروتئین را مطرح کنید.

برای تفهیم هر چه بیشتر محتوا از یک تغییر ژنتیکی که منجر به تغییر ساختاری و عملکردی پروتئین شده است مثال بزنید. تغییر پروتئین هموگلوبین در بیماری کم‌خونی داسی‌شکل که دانش‌آموزان قبلاً نیز با آن آشنا شده‌اند مثال خوبی است. در نظر داشته باشید در این قسمت بحث حتماً بر تفاوت‌های بین آمینواسیدها از نظر ساختاری و میزان قطبیت تأکید کنید. زیرا جایگزینی آمینواسیدهای با خصلت متفاوت در ساختار اول پروتئین، منجر به‌تغییرات شکل فضایی و در نتیجه عملکرد پروتئین می‌شود. اما مهم است در اینجا اشاره کنید که در فرایند مهندسی پروتئین هر نوع جایگزینی در توالی ممکن نیست، لذا جایگزینی‌هایی مورد قبول هستند که نه تنها بر عملکرد پروتئین تأثیر منفی ندارند بلکه در شرایط خاص منجر به‌افزایش کیفیت آنها نیز می‌شوند.

نکتهٔ مهم دیگر این است که یادآوری کنیم ساختارهای پروتئینی و به‌خصوص آنزیم‌ها در شرایط خاص دستخوش تغییر می‌شوند. مثلاً در دماهای بالا و تغییرات pH، ساختار پروتئین‌ها تغییر می‌کند و در نتیجه فعالیت آنها کم یا کاملاً غیرفعال می‌شوند. زیرا در چنین محیط‌هایی پیوندهای موجود در مولکول‌ها، به‌خصوص در ساختارهای سوم و در صورت داشتن ساختار چهارم تغییر می‌کند. همچنین کاربرد فرایند مهندسی پروتئین در رابطه با آنزیم‌ها می‌تواند عملکرد آنزیمی‌آنها را بهبود بخشد؛ مثلاً منجر به افزایش سرعت واکنش، افزایش تمایل آنزیم به پیش‌ماده و... شود.

برای ورود به مبحث مهندسی بافت بهتر است از یادآوری یاخته‌های بنیادی شروع کنید. دانش‌آموزان می‌دانند که در بدن انواع یاخته‌های بنیادی وجود دارد. در اینجا لازم است سه مفهوم رشد، نمو و تمایز

در کلاس به بحث و گفت‌وگو گذاشته شود. بسیاری از دانش‌آموزان تعاریف این مفاهیم را می‌دانند ولی کج‌فهمی در این مفاهیم زیاد است. آوردن مثال برای هر مفهوم را به عهدهٔ دانش‌آموزان بگذارید و مثال‌های آنان را روی تابلو بنویسید. سپس از آنان بخواهید دلایل خود را شرح دهند و اشتباهات آنها را به کمک خودشان تصحیح کنید. هدف از این کار، رسیدن به درک درستی از مفهوم تمایز است. وقتی از این موضوع اطمینان حاصل شد، می‌توانید با طرح پرسش‌های از پیش برنامه‌ریزی شده، مهندسی بافت را شروع کنید.

دانستنی‌هایی برای معلم

نیمه عمر پروتئین : نیمه عمر پروتئین‌ها تحت شرایط طبیعی از چند دقیقه تا چند ساعت متغیر است. این تفاوت در پایداری هم به‌میزان تشکیل پیوندهای دی سولفیدی و هم به حضور آمینواسیدهای خاص در انتهای آمین بستگی دارد. به‌عنوان مثال زمانی که آمینواسیدهای معیّنی به انتهای آمین آنزیم بتاگلوکوزیداز اضافه شود، طول عمر پروتئین اصلاح شده از حدود ۲ دقیقه به بیش از ۲۰ ساعت افزایش می‌یابد. آمینواسیدهای افزودنی را که احتمال پایداری ذاتی یک پروتئین را بالا می‌برند می‌توان به‌راحتی در ژن‌های کلون شده قرار داد.

افزایش پایداری پروتئین : معمولاً برای ایجاد پایداری در پروتئین مورد نظر، حضور فقط یک آمینواسید اضافی در انتهای آمین آن کافی است. پروتئین‌هایی که عمر طولانی دارند می‌توانند در سلول تجمع پیدا کنند و مقدار محصول را افزایش دهند. این پدیده هم در یوکاریوت‌ها و هم در پروکاریوت‌ها دیده می‌شود. برخلاف وجود آمینواسیدها در انتهای آمین توالی که پایداری پروتئین را افزایش می‌دهند، توالی‌های آمینواسیدی در داخل پروتئین وجود دارند که آن را به‌تجزیه پروتئولیتیک حساس‌تر می‌کنند. این مناطق از پروتئین که به آنها توالی‌های PEST گفته می‌شود، غنی از پرولین (P)، گلوتامیک اسید (E)، سرین (S) و ترئونین (T) هستند. این توالی‌ها اغلب، و نه همیشه، در مجاورت توده‌ای از آمینواسیدهای دارای بار مثبت هستند و به‌منظور نشانه‌گذاری پروتئین‌ها برای تجزیه در داخل سلول به‌کار می‌روند. می‌توان پایداری یک پروتئین را با دست‌کاری ژنتیکی در مناطق PEST افزایش داد. واضح است این دست‌کاری‌ها در عملکرد پروتئین مورد نظر تغییر ایجاد نخواهد کرد.

آمیلاز : این آنزیم در بدن انسان در بزاق، ترشحات لوزالمعده و رودهٔ باریک یافت می‌شود. این آنزیم باعث تجزیهٔ زنجیره‌های پلی‌ساکارید مانند نشاسته به اجزای کوچک‌تر و دی‌ساکاریدهایی مانند مالتوز می‌شود و نقش مهمی در هضم کربوهیدرات‌ها دارد. سایر بافت‌ها نیز تا حدودی فعالیت آمیلازی دارند، مثل : تخمدان‌ها، رودهٔ باریک و بزرگ و عضلات مخطط.

انواع آمیلاز

۱ آلفا آمیلاز (اندوآمیلاز) یا آمیلاز حیوانی که در انسان هم وجود دارد. این آمیلاز از وسط بر زنجیرهٔ پلی‌ساکاریدی اثر می‌کند و آن را می‌شکند.

۲ بتا آمیلاز (اگزوآمیلاز) که مخصوص گیاهان و باکتری‌ها است و از انتهای زنجیرهٔ پلی‌ساکاریدی عمل می‌کند.

دو ایزو آنزیم عمدهٔ آمیلاز مربوط به‌پانکراس و غدد بزاقی است. آمیلاز به‌طور طبیعی از سلول‌های ترشحی برون‌ریز لوزالمعده به‌مجرای لوزالمعده و سپس دوازدهه ترشح می‌شود و در روده، نشاسته را به‌قندهای ساده‌تر تجزیه می‌کند. آلفا آمیلاز موجود در بزاق، نشاسته را به‌طور جزئی تجزیه می‌کند؛ چون مدت توقف غذا در دهان ناچیز است ولی قسمت عمدهٔ فعالیت این آنزیم مربوط به‌آمیلاز لوزالمعده است. pH مطلوب برای این آنزیم حدود ۷ است.

آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ نشاسته : آنزیم‌های بسیاری برای تجزیهٔ نشاسته در دسترس هستند، از جملهٔ آنها :

۱ آلفا آمیلازها یا اگزو آمیلازها : نشاسته را در موقعیت α-۱,۴ زنجیرهٔ پلیمری تجزیه می‌کنند.

۲ بتا آمیلازها یا اندو آمیلازها : مالتوز یا مالتوتریوز را از انتهای غیراحیاکننده جدا می‌کنند.

۳ گلوکوآمیلاز یا آمیلوگلوکوزیداز : مالتوز را به‌دو مولکول گلوکز تقسیم می‌کنند.

۴ پولولانازها : پیوندهای α-۱,۶ ترجیحاً پولولان[1] و همچنین آمیلوپکتین را تجزیه می‌کنند.

۵ ایزوآمیلازها : پیوندهای α-۱,۶ آمیلوپکتین را با سرعت بالاتری نسبت به‌پولولان تجزیه می‌کنند.

آمیلازها آنزیم‌هایی هستند که نشاسته را هیدرولیز می‌کنند. آمیلازها از مهم‌ترین آنزیم‌ها در زیست‌فناوری محسوب می‌شوند و اهمیت آمیلازها به‌علت کاربرد گستردهٔ این آنزیم‌ها است که از جنس‌های باسیلوس به‌دست می‌آید.

بسیاری از گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم‌ها توانایی تولید آنزیم آمیلاز را دارند ولی این آنزیم با منشأ میکروبی دارای مصارف صنعتی است. در این بین، جنس باسیلوس طیف گسترده‌ای از آنزیم آمیلاز را تولید می‌کند که کاربرد مهمی در صنعت دارد. تولید آنزیم آمیلاز به‌عواملی از جمله سویه‌ها، ترکیب محیط کشت، روش کشت، رشد سلول و زمان گرماگذاری بستگی دارد.

آمیلازها، یکی ازمهم‌ترین آنزیم‌های عمدهٔ صنعتی هستند که حدود ۲۵درصد از بازار جهانی آنزیم‌ها را به‌خود اختصاص می‌دهند. از مهم‌ترین کاربردهای آنزیم آمیلاز در صنایع مختلف می‌توان به مواردی از جمله نساجی، صنایع تولیدکنندهٔ شوینده‌ها، کاغذسازی، داروسازی و صنایع غذایی مانند شیرین‌سازی

۱- **پولولان** (Pullulan) یک ترکیب شیمیایی با فرمول $(C_6H_{12}O_5)n$ است و شکل ظاهری آن، به‌صورت پودر سفید است.

و فراوری نشاسته اعم از تهیهٔ شربت‌های فروکتوز، گلوکز و آب میوه‌ها اشاره کرد. تحقیقات بسیاری در ارتباط با کاربرد آنزیم‌های آمیلولیتیک تولید شده توسط اعضای جنس باسیلوس، در زمینه‌های مهم تولید قند، صنایع غذایی، شوینده‌ها انجام شده است. گستردگی کاربرد آنزیم‌های آمیلولیتیک، موجب می‌شود که تحقیقات برای مشخص‌شدن ویژگی‌های آنزیم‌ها همچنان ادامه داشته باشد.

آلفا آمیلازها، اندوآمیلازهایی هستند که هیدرولیز مهم و اولیهٔ نشاسته به الیگوساکاریدهای کوتاه‌تر را از طریق شکست پیوندهای گلیکوزیدی α-۱,۴ کاتالیز می‌کند. ویژگی‌های آلفا آمیلازها مثل مقاومت نسبت به گرما و pH باید با کاربردهای آن متناسب باشد بنابراین گستردگی کاربرد آنزیم‌ها، موجب شده است که تحقیقات برای مشخص شدن ویژگی‌های آنزیم‌ها ادامه داشته باشد. نرخ هیدرولیز نشاسته، توسط آلفا آمیلاز وابسته به شرایطی همچون دما، منشأ پیش‌ماده، غلظت پیش ماده، غلظت آنزیم، وجود یا نبود یون کلسیم است.

اغلب میکروارگانیسم‌ها آنزیم‌هایی را که یک واکنش را هدایت می‌کنند می‌توانند تولید کنند. در هنگام شناسایی یک میکروارگانیسم مولد یک آنزیم مطلوب، برای تبدیل آن به یک سویهٔ مناسب در مقیاس تجاری چند مرحله وجود دارد که ضروری است. در اولین مرحله به یک سویهٔ صنعتی خوب که بتواند مقدار زیادی آنزیم با تراکم بالا تولید کند نیاز است. در مرحلهٔ بعد باید بتوان مهار کاتالیتکی را کاهش داد یا آن را رفع کرد که برای انجام این کار می‌توان از تغییرات ژنتیکی و بهینه‌سازی محیط استفاده کرد.

آلفا آمیلازها توسط تعداد زیادی از باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شوند. یکی از مهم‌ترین سویه‌های صنعتی که در حال حاضر توسط شرکت‌های تولید کنندهٔ آلفا آمیلاز استفاده می‌شود Termamyl LC است. این سویه از گونهٔ باسیلوس لیکنی فورمیس (Bacillus licheniformis) است که با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک توانستند چهار جهش روی ژن آلفا آمیلاز آن ایجاد کنند و در نتیجه باعث شده است که پایداری آنزیم تولیدشده در دما و pH بالا و غلظت پایین کلیسم بیشتر شده است.

کاربرد آمیلاز در محصولات صنایع آرد و نان : آلفا آمیلاز قارچی مشهورترین آنزیم مورد استفاده در صنایع وابسته به آرد و پراستفاده‌ترین آنزیم در صنایع پخت نان‌های حجیم است. امروزه آلفا آمیلازها در سطح جهان کاربرد گسترده‌ای دارند و یکی از مهم‌ترین اصلاح کننده‌های آرد به‌منظور افزایش حجم نان مورد استفاده قرار می‌گیرند. به‌طور کلی این آنزیم با تبدیل نشاستهٔ آرد به‌قند قابل استفاده برای مخمر، فعالیت تخمیری را افزایش می‌دهند و گاز مناسبی جهت افزایش حجم، تولید می‌کنند. این آنزیم به‌طور کامل در دمای $70^{\circ}C$ (دمای معمولی فِر) غیرفعال می‌شود و به پروتئین قابل هضم برای دستگاه گوارش تبدیل می‌شود و آنزیمی است که از میکروارگانیسم طبیعی تهیه شده و هیچ‌گونه تغییرات ژنتیکی در آن به‌وجود نیامده است. آلفا آمیلاز بیشترین حجم آنزیم در بین آنزیم‌های تشکیل‌دهندهٔ بهبوددهنده‌های نان را در سراسر جهان به‌خود اختصاص داده و باعث افزایش حجم، ایجاد ظاهری مطلوب و بویی دلپذیر در نان تولیدی می‌شود.

کاربرد آمیلاز در نساجی

آهارزدایی پارچه : در تولید پارچه، دوک نخ در طی بافت تحت فشار مکانیکی زیادی قرار دارد. استفاده از چسب، نشاسته یا آهارزنی، نخ دوک را محکم می‌کند، از پاره‌شدن نخ در اثر فشار ماشین بافندگی و همچنین از ایجاد الکتریسیتهٔ ساکن جلوگیری می‌کند. با این حال برای فراوری بعدی پارچه (رنگ‌آمیزی، شست‌وشوی شیمیایی و پرداخت‌زدن) نشاسته باید کاملاً زدوده شود. امروزه آنزیم‌های آمیلاز در عملیات آهارگیری به‌کار برده می‌شوند. آنزیم‌های آمیلاز، آهار نشاسته را بی‌آسیب به‌سلولز، تجزیه می‌کنند. روش‌های آهارزدایی مداوم که به‌پایداری آلفا آمیلازها در دمای بالا بستگی دارد، شیوه‌ای اساسی برای زدودن آهار است. لازم به‌یادآوری است که در روش‌های دیگر آهارگیری، از مواد اکسیدکننده و یا اسید استفاده می‌شود که در استحکام کالای پنبه‌ای اثر منفی می‌گذارد. تجزیهٔ کامل نشاسته به کمک آمیلاز منجر به تشکیل گلوکز می‌شود که قابل حل در آب است.

کاربرد آمیلاز در صنایع غذایی مهم‌ترین پلی‌ساکاریدی که در صنایع غذایی استفاده می‌شود، نشاسته است. تولید آنزیمی گلوکز با استفاده از آنزیم آمیلاز به‌دست آمده از باسیلوس سوبتیلیس و آمیلوگلوکوزیداز حاصل از آسپرژیلوس، جایگزین روش‌های قدیمی هیدرولیز اسیدی شده است سرعت عمل، عدم آلودگی و امکان تولید دکستروز در مقیاس صنعتی از مزایای عمدهٔ روش آنزیمی است. البته با پیشرفت فناوری دنای نوترکیب، امکان تولید آنزیم‌های میکروبی پایدار در دمای بالا جهت هیدرولیز آنزیمی و بالطبع تولید صنعتی و گستردهٔ گلوکز فراهم شده است. همچنین با استفاده از آنزیم آلفاآمیلاز می‌توان نشاسته را به‌شربت‌هایی با معادل دکستروز پایین تبدیل کرد. اگر علاوه بر این آنزیم از آنزیم‌های گلوکوآمیلاز و گلوکزایزومراز نیز استفاده شود، می‌توان محصولی با شیرینی معادل ساکارز به‌نام HFCS تولید کرد. فروکتوز نیز یک ماده شیرین‌کننده است که در بسیاری از محصولات غذایی عمدتاً به‌عنوان جایگزین ساکارز (شکر معمولی) مورد استفاده قرار می‌گیرد. یکی از دلایل افزایش محبوبیت فروکتوز در کارخانه‌های ساخت مواد غذایی، در دسترس بودن مقدار زیاد نشاستهٔ غلات است که با روش آنزیمی، در مقیاس صنعتی به‌فروکتوز تبدیل می‌شود.

یک منبع ارزان‌تر و جایگزین فروکتوز ممکن است فروکتان باشد که کربوهیدرات ذخیره‌ای در بسیاری از گیاهان است. فروکتان‌ها، پلیمرهای مولتی فروکتوز (پلی‌فروکتوز) هستند که می‌توانند به‌صورت آنزیمی‌یا شیمیایی هیدرولیز شوند تا فروکتوز به‌دست آید.

فروکتان‌های گیاهی، شیرین هستند، اما آنزیم‌هایی که بتوانند زنجیره‌های گلیکوزیدی آنها را از بین ببرند در دستگاه گوارش انسان وجود ندارند. در نتیجه، فروکتان‌ها اجزای غذایی کم‌کالری هستند. از این خاصیت برای تولید شیرین‌کننده‌های کم‌کالری طبیعی در صنایع غذایی ــ بهداشتی استفاده می‌شود که آن را به‌صورت آنزیمی در بیوراکتورها تولید می‌کنند. در میان باسیل‌ها، پسودوموناس و استرپتوکوک با کمک آنزیم‌های خارج سلولی، شکر را به‌فروکتان‌های باکتریایی تبدیل می‌کنند.

آشنایی با مفاهیم پایه در مهندسی بافت

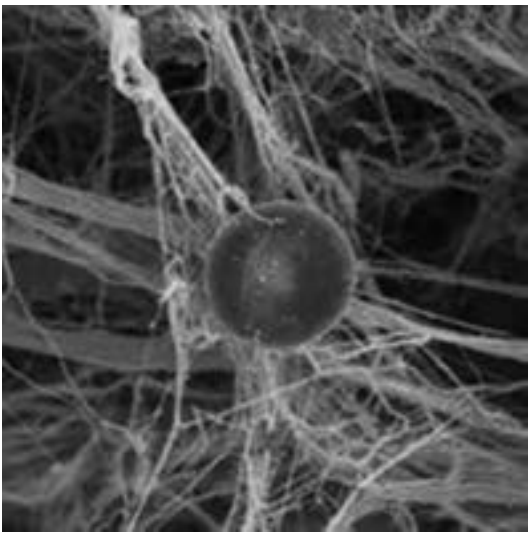
مفهوم مهندسی بافت : همان‌طور که از نام مهندسی بافت پیداست، ما به‌دنبال مهندسی کردن بافت‌های زنده هستیم، بنابراین قبل از هر چیز باید دانست منظور از مهندسی چیست و برای تحقق آن، چه اطلاعاتی لازم است. تعریف کلی مهندسی در هر شاخه‌ای از علم، آن است که هندسه و در واقع مختصات و ویژگی‌های هدف مورد نظر شناخته شود و براساس آن، طراحی و سپس ساخت انجام گیرد، بنابراین در مهندسی بافت باید بافت مورد نظر به‌خوبی شناخته شود تا براساس خصوصیات مختلف آن مهندسی صورت گیرد، بنابراین در یک جمله می‌توان گفت : «مهندسی بافت یعنی ادای طبیعت را درآوردن (Bio–mimicking) و شرایط درون تنی (In vivo) را در بیرون بدن (In vitro) تقلید کردن.»

شناخت بافت : بدن انسان دارای ساختاری سلسله مراتبی است و در پایین‌ترین سطح از واحدهای زنده و مستقلی به نام یاخته، ساخته شده است، یاخته‌ها، بافت‌ها را تشکیل می‌دهند، مجموع چند بافت یک اندام را می‌سازد و نهایتاً چند اندام یک دستگاه را به‌وجود می‌آورند و بدن مجموعه‌ای از این دستگاه‌هاست. اما هر بافت از بدن، خود دارای ساختاری سلسله مراتبی است و از چندین سطح تشکیل شده است که از مقیاس ماکروسکوپی (محدودهٔ سانتی‌متری) آغاز می‌شود و تا سطح مولکولی (محدودهٔ نانومتری) ادامه می‌یابد. کوچک‌ترین سطحی را که عملکرد اساسی بافت از آن ناشی می‌شود زیر واحد عملکردی (functional subunit) گویند که معمولاً در مقیاس حدوداً ۱۰۰ میکرومتر است، در حالی که یاخته‌های مختلف اندازه‌ای در حدود ۱۰ میکرومتر دارند، بنابراین یاخته‌ها در ریزمحیطی (microenvironment) قرار گرفته‌اند که در مقیاس کوچک‌تر از آن عملکرد بافت مشاهده نمی‌شود و اگر بخواهیم شرایط محیط زندگی یاخته در بدن را بشناسیم باید درک صحیحی از این زیستگاه (niche) یاخته پیدا کنیم و این مفهوم دقیق‌تر مهندسی بافت است؛ *«تقلید کردن ریزمحیط طبیعی یاخته با تمام پیچیدگی‌هایش توسط فنون‌های مهندسی.»*

ریزمحیط یاخته

ریزمحیط یا همان محل زندگی یاخته، محیطی شلوغ و پر رفت‌وآمد، با رمز و رازهایی است که هنوز بسیاری از آنها شناخته نشده‌اند و در میان آنها دو عامل مهم توجه عمدهٔ تحقیقات را به‌خود جلب کرده‌اند. یکی از این دو، بستری است که سلول روی آن قرار دارد، این بستر را زمینهٔ خارج یاخته‌ای (Extracellular Matrix) می‌نامند که به‌طور عمده از پروتئین‌ها، پروتئوگلایکان‌ها و پلی ساکاریدها ساخته شده است. دومین عاملی که در تعیین بسیاری از رفتارهای حیاتی یاخته نقش دارد، بیومولکول‌های فعالی هستند که در محیط زیستی اطراف یاخته به حالت محلول وجود دارند و پیام‌هایی را به مرکز فرماندهی یاخته (هسته) می‌فرستند و از این طریق رفتار یاخته را تحت کنترل دارند. این بیومولکول‌ها شامل پروتئین‌های کوچکی

چون فاکتورهای رشد (Growth Factors)، استروئیدها و هورمون‌ها می‌شوند که از این میان، فاکتورهای رشد از همه مهم‌تر و عمدهٔ تحقیقات بر آنها متمرکز شده است.



شکل ۱ــ سلول‌ها در بدن روی بستری به‌نام زمینهٔ خارج یاخته‌ای قرار دارند.

مفهوم داربست : پیش از این گفتیم که یاخته‌ها در بدن روی بستری آرام گرفته‌اند که زمینهٔ خارج یاخته‌ای نامیده می‌شود، بنابراین اولین قدم در مهندسی بافت آن است که بستری مشابه با آن بسازیم که یاخته روی آن احساس آرامش کند و آن را بیگانه نداند. در واقع باید یاخته را فریب دهیم تا پاسخ منفی نشان ندهد و فعالیت طبیعی خود را به‌درستی انجام دهد. پس اولین نکته‌ای که در ساختن بستر باید رعایت کنیم آن است که جنس مواد سازندهٔ آن کاملاً زیست سازگار (Biocompatible) باشد و برای یاخته سمی‌نباشد. ماده‌ای که چنین خصوصیتی داشته باشد، زیست ماده (Biomaterial) نامیده می‌شود. نکتهٔ مهم دیگر این است که بستری که برای یاخته ساخته می‌شود بایستی سازه‌ای سه بعدی و متخلخل باشد و حفرات آن کاملاً به‌هم پیوسته باشند. علت وجود چنین تخلخلی آن است که یاخته‌ها بتوانند درون بستر رفت و آمد (مهاجرت) کنند و نیز امکان رسیدن مواد غذایی به‌درون بستر و دفع مواد زائد از آن وجود داشته باشد. این سازه را می‌توان به‌داربست (Scaffold) ساختمانی و یاخته‌ها را می‌توان به‌آجرها تشبیه کرد. همان طور که برای بنای ساختمان لازم است ابتدا اسکلتی سه بعدی ساخته شود و سپس آجرها در آن جاسازی شوند، برای ساخت یک بافت نیز لازم است یاخته‌ها درون فضایی سه بعدی و متخلخل که «داربست» نامیده می‌شود جاسازی شوند.

نکتهٔ قابل توجه آن است که این سازه کاملاً موقتی است و قرار نیست که جزئی از بافت نهایی باشد. بلکه

تنها در نقش ابزاری است که به‌یاخته‌ها این امکان را می‌دهد که با قرار گرفتن در شرایط فیزیکی، شیمیایی و مکانیکی مناسب، زمینهٔ خارج یاخته‌ای طبیعی خود را در فضایی سه بعدی تولید کنند و بافت مورد نظر را به‌تدریج بسازند. بنابراین مادهٔ سازنده داربست باید علاوه بر زیست‌سازگاری، زیست تخریب‌پذیر (biodegradable) هم باشد تا به مرور زمان، هم‌زمان با شکل‌گیری بافت جدید و با سرعتی هماهنگ با آن تخریب شود. داربست‌ها می‌توانند طبیعی و یا مصنوعی باشند. داربست‌های مصنوعی را می‌توان با استفاده از تکنیک‌های مهندسی مواد (به‌خصوص مهندسی پلیمر) به‌اشکال مختلف تهیه کرد.

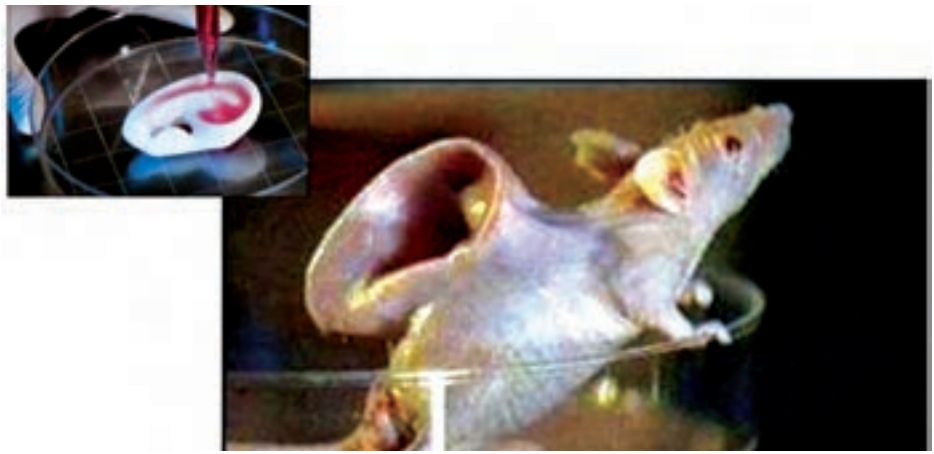
مراحل فرایند مهندسی بافت : فرایند کلی مهندسی بافت به زبان ساده در شکل زیر نشان داده شده است :

شکل ۴ــ مراحل مهندسی بافت

ابتدا داربست به شکل مورد نیاز ساخته می‌شود. سپس یاخته‌های مربوط به‌بافت هدف (مثلاً فیبروبلاست برای پوست) به تعداد کافی روی آن کشت داده می‌شوند. کشت یاخته در یک سرم بیولوژیکی (محیط کشت) که حاوی مواد مغذی لازم برای رشد و حیات آن است انجام می‌گیرد. حضور فاکتورهای رشد در محیط کشت برای دریافت یک پاسخ مناسب از یاخته‌ها و کمک به رفتار بهتر آنها ضروری است. پس از گذشت زمان کافی، یاخته‌ها در تمام فضای داربست جاسازی می‌شوند و یک سازهٔ سه بعدی محتوی یاخته به‌دست می‌آید که آماده کاشت در بدن است. این کامپوزیت توسط جراح در ناحیه‌ای از بدن که دچار ضایعه شده است کاشته می‌شود و فضای آسیب دیده را پر می‌کند. با رگ‌زایی و نفوذ مویرگ‌های اطراف به‌داخل داربست، مواد غذایی و اکسیژن به یاخته‌ها رسانده می‌شود و مواد زائد حاصل از متابولیسم آنها دفع می‌شود و به این ترتیب با گذشت زمان یاخته‌ها شروع به‌ساخت زمینهٔ خارج یاخته‌ای طبیعی خود و ساخت بافت جدید می‌کنند و داربست نیز هم‌زمان با تشکیل بافت جدید به مرور زمان تخریب می‌شود، تا اینکه با شکل‌گیری کامل بافت، به کلی از بین می‌رود. در نهایت بافت جدید با بافت طبیعی مجاور خود در هم آمیخته و کاملاً یکپارچه می‌شود.

موش گوش‌پشت : اولین پروژهٔ موفق مهندسی بافت

پروفسور لنگر و دکتر وکنتی برای نخستین بار، داربستی پلیمری به‌شکل گوش انسان ساختند و یاخته‌های غضروف (کندروسیت) را روی آن کشت دادند و سپس آن را به یک موش آزمایشگاهی پیوند زدند. این پیوند کاملاً موفقیت‌آمیز بود به‌گونه‌ای که گوش پیوندی به‌خوبی با بافت اطراف خود یکپارچه شد و هیچ اثری از پس زدن آن مشاهده نشد. به این ترتیب موشی که گوش انسان را به‌پشت داشت، به‌نمادی از مهندسی بافت تبدیل شد.



شکل ۵ــ موشِ گوش پشت، نمادی از مهندسی بافت

بعدها همین روش برای تهیهٔ گوش از یاخته‌های غضروف و سپس پیوند آن به‌انسان انجام شد و برای جایگزینی گوش‌های آسیب دیده مجروحان جنگی مورد استفاده قرار گرفت.

یاخته‌های بنیادی و مهندسی بافت

یکی از چالش‌های مهم در مهندسی بافت، عدم دسترسی کافی به‌منابع یاخته‌ای مورد نیاز است. در واقع برای ساخت هر بافتی از بدن، تعداد زیادی از یاخته‌های اختصاصی آن بافت مورد نیاز است و این در حالی است که یاخته‌هایی که از بافت‌های بالغ بدن جدا می‌شوند، اغلب توانایی تکثیر به‌مقدار لازم را ندارند، بنابراین دسترسی به منابع یاخته‌ای از بدن با قابلیت تکثیر زیاد ضرورتی اجتناب‌ناپذیر است. یاخته‌های بنیادی به سبب خصوصیات منحصر به‌فرد خود، گزینه‌های بسیار مناسبی برای رفع این مشکل هستند. دو ویژگی مهم یاخته‌های بنیادی، آنها را از دیگر یاخته‌های بدن متمایز ساخته است : ۱) خود نوزایی

(Self–renewal) یعنی توانایی زایش و تکثیر به یاخته‌های مشابه خود آن هم به تعداد بسیار زیاد و ۲) تمایز (Differentiation) یعنی قابلیت تبدیل شدن به انواع یاخته‌های سازندهٔ بافت‌های انسان. یاخته‌های بنیادی کاملاً هوشمند هستند و به انواع پیام‌هایی که از محیط اطراف دریافت می‌کنند پاسخ نشان می‌دهند و یکی از سرنوشت‌های چهارگانهٔ خود را انتخاب می‌کنند : خودنوزایی، تمایز، عدم تغییر وضعیت(Quiescence) و حتی مرگ برنامه‌ریزی شده (Apoptosis). بنابراین با شناخت و کنترل عوامل مؤثر بر رفتار یاختهٔ بنیادی می‌توان آنها را به سرنوشت دلخواه هدایت کرد. این شاخه از پزشکی تحت عنوان «مهندسی یاخته‌های بنیادی» شناخته می‌شود.

گفتار ۳: کاربردهای زیست فناوری

آموزش از یادآوری پیش‌دانسته‌ها و تجارب آنها شروع می‌شود. دانش‌آموزان تا این پایه و شروع این فصل آموخته‌اند که :

■ بعضی از پروتئین‌ها به‌صورت مولکول پیش‌ساز ساخته می‌شوند و به کمک آنزیم‌های ویژه‌ای به پروتئین فعال تبدیل می‌شوند.

■ بعضی از پروتئین‌ها دارای ساختار چهارم هستند. یعنی از چند زیرواحد ساخته شده‌اند و به کمک پروتئین‌های دیگر به ساختار نهایی و فعال خود می‌رسند.

■ در بعضی از بیماران مبتلا به دیابت مقاومت به انسولین وجود دارد و به همین دلیل به انسولین پاسخ مناسب نمی‌دهند.

■ ویروس مولد بیماری ایدز می‌تواند مدتی در یاخته‌های بدن مخفی بماند و در این مدت احتمال انتقال ویروس به سایر افراد وجود دارد.

برای شروع تدریس می‌توان پرسش‌های زیر را مطرح کرد :

■ چرا کاربرد روش‌های کشاورزی نوین میزان تنوع ژنتیکی محصولات را کاهش می‌دهد؟

■ کاهش تنوع محصولات کشاورزی چه عواقبی دارد؟

■ مصرف آفت‌کش چه تهدیدی برای زیست بوم و موجودات زنده دارد؟

■ آیا انواع بیماری دیابت را به یاد دارید؟

■ چرا گاهی واکسن‌ها خطرناک هستند؟

■ چرا نمی‌توان تمام مراحل ساخت یک دارو یا واکسن نوترکیب را در باکتری انجام داد؟

■ آیا می‌توان ژن جهش یافته را درمان کرد؟

■ چه ارتباطی بین اخلاق و فناوری‌های نوین‌زیستی وجود دارد؟

این گفتار دربارهٔ بعضی کاربردهای زیست‌فناوری تدوین شده است. گفتارهای قبلی فصل، مقدمه‌ای برای تدریس این گفتار هستند و یادگیری مفاهیم و فرایندهای مطرح شدهٔ آنها در درک صحیح مطالب این گفتار نقش بسزایی دارد.

پیشنهاد می‌شود بعد از پایان گفتار دوم این فصل، از دانش‌آموزان بخواهید دربارهٔ کاربردهای زیست‌فناوری تحقیق کنند. می‌توان تدریس را با ارائهٔ مثال‌هایی که دانش‌آموزان مطرح می‌کنند شروع کرد. انواع کاربردهایی را که آنها مثال می‌زنند در کلاس به بحث بگذارید و از آنها بخواهید توضیح دهند که چگونه چنین فرایندی ممکن است. دانش‌آموزان با پیش‌دانسته‌هایی که از گفتارهای قبلی دارند مطالبی را عنوان خواهند کرد و خواهید دید که توانسته‌اند بخشی از فرایند را درست تشریح کنند و بسیاری از احتمالات آنها درست است.

دربارهٔ تهیهٔ گیاهان مقاوم به‌آفت، دانش‌آموزان باید به‌درک درستی از عملکرد سم در لولهٔ گوارش حشره برسند. همچنین ممکن است دانش‌آموزان بپرسند که چرا باکتری از خاک وارد گیاه نمی‌شود و آن را مقاوم نمی‌کند؟ و یا اینکه اگر حشره بعد از خوردن گیاه مقاوم شده می‌میرد پس مقاوم‌سازی گیاه چه فایده‌ای دارد؟ برای جلوگیری از کج‌فهمی لازم است بر ساختار گیاه و مسیر جذب مواد از خاک، یادآوری صورت بگیرد و همچنین تأکید شود که حشره با خوردن کمی‌از گیاه مقاوم شده می‌میرد و به دو دلیل سطح آسیب کمتر است. یکی کاهش جمعیت آفت و دیگر اینکه خوردن کمی‌از گیاه مقاوم شده، آن را از بین نمی‌برد و در اینجا منظور از آسیب، یک گیاه نیست بلکه میزان آسیب به‌طور کلی در سطح مزرعه کمتر می‌شود و در نتیجه میزان محصول افزایش می‌یابد.

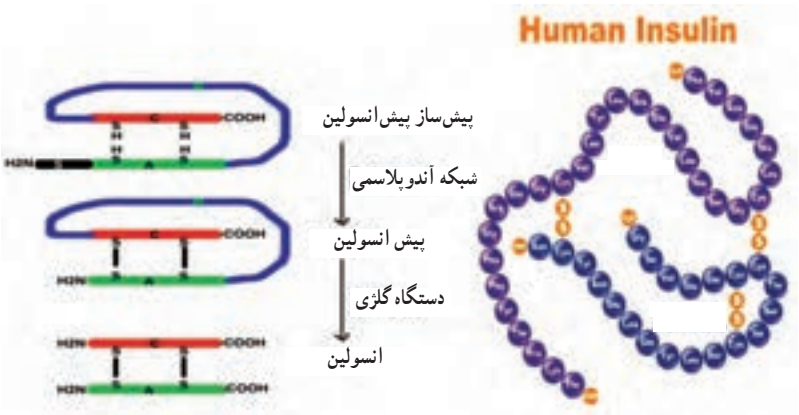
در مورد تهیهٔ انسولین از منابع حیوانی مثل گاو و خوک لازم است یادآوری کنید که مقدار انسولین به‌دست آمده از لوزالمعده و یا خون جانور زیاد نیست؛ بنابراین برای تأمین انسولین مورد نیاز بیماران لازم است که حیوانات زیادی مورد استفاده قرار بگیرند. همچنین توالی آمینواسیدهای انسولین حیوانی با انسولین انسانی متفاوت است و باعث می‌شود که عملکرد ضعیف‌تری در بدن انسان داشته باشد و همچنین در بعضی افراد هم باعث بروز واکنش‌های آلرژیک می‌شود.

توجه داشته باشید که دانش‌آموزان نباید به این نتیجه برسند که زنجیره‌های A و B انسولین از روی دو ژن متفاوت ساخته می‌شوند. در واقع توالی‌های A و C و B پیش انسولین همه از روی یک ژن ساخته شده‌اند که در مراحل بعدی قسمت C زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی حذف می‌شود، اما در فرایند تولید انسولین نوترکیب بخش‌های رمزگردان زنجیره‌های A و B ژن انسولین به‌صورت مصنوعی تهیه و به‌صورت جداگانه در پلازمیدهای متفاوتی جاسازی می‌شوند و پس از انتقال به‌باکتری‌های مجزا، بیان و ترجمه می‌شوند.

دانستنی‌هایی برای معلم

انسولین نوترکیب

این ماده که به‌عنوان یک دارو برای درمان افراد دیابتی استفاده می‌شود تا سال ۱۹۸۲ از غدهٔ لوزالمعدهٔ حیوانات استخراج می‌شد. پس از آن محققان موفق به تولید انسولین نوترکیب انسانی در اشریشیا کلی و ساکارومایسزسرویزیه شدند. انسولین در یاخته‌های بتای لوزالمعده به‌صورت پری پروانسولین ساخته می‌شود و سپس به‌پروانسولین تبدیل می‌شود و در دستگاه گلژی ذخیره می‌شود. وقتی که محرک آن وجود داشته باشد پروانسولین به‌وسیلهٔ پروتئازهای متصل به غشا، به۳ زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی (A, B, C) تجزیه می‌شود. زنجیره‌های A و B به‌وسیلهٔ ۳ پیوند دی سولفیدی به هم متصل می‌شوند و انسولین فعال را تشکیل می‌دهند. زنجیرهٔ C آزاد و تجزیه می‌شود.



شکل ۶ــ فرایند تبدیل پیش ساز انسولین به‌انسولین فعال (چپ) و انسولین فعال انسانی (راست)

روش سنتی تولید انسولین

در روش سنتی، انسولین از پانکراس خوک یا گاو با استفاده از ۱ــ بوتانول استخراج می‌شد. انسولین را به‌وسیلهٔ نمک Zn رسوب دهی می‌کردند که به‌راحتی متبلور و سپس به‌وسیلهٔ ژل کروماتوگرافی تخلیص می‌شد. یکی از مشکلات اصلی تولید انسولین به‌وسیلهٔ روش سنتی این بود که انسولین تهیه شده از یک خوک یا گاو نیاز یک انسان بیمار را به‌ترتیب فقط تا ۳ و ۱۰ روز پوشش می‌داد. علاوه بر این انسولین انسانی با انسولین خوک و گاو در یک یا دو آمینواسید متفاوت بود که گاهی اوقات منجر به بروز واکنش‌های آلرژیک در بدن بیماران می‌شد. به‌طور موقت مشکل آلرژیک بودن انسولین حیوانی به‌وسیلهٔ کربوکسی پپتیدازY که آلانین موجود در انتهای کربوکسیل انسولین را با تریونین جابه‌جا می‌کرد حل شد. سنتز شیمیایی انسولین در سال ۱۹۶۴ در چین و آلمان صورت گرفت ولی ثابت شد که از لحاظ اقتصادی غیر عملی است.

روش بیولوژیکی تولید انسولین : دو روش تولید انسولین نوترکیب

۱ تولید شیمیایی ژن زنجیره‌های A و B انسولین و جاسازی آنها در دو گروه ناقل و انتقال آن به‌دو گروه باکتری متفاوت

۲ تخلیص mRNAحاصل از ژن انسولین و رونویسی معکوس و تولید cDNA (complementary) و جاسازی آن در یک گروه ناقل و انتقال آن به‌یک گروه باکتری

تولید انسولین نوترکیب با روش تولید شیمیایی دنا

■ گام اول : در این روش ابتدا با دئوکسی ریبونوکلئوتیدها ژن تولید انسولین را تولید می‌کنند، طوری که دو سر آن مطابق با الگوی برش آنزیم برش‌دهنده باشد.

■ گام دوم : برش پلازمیدتوسط آنزیم‌های برش‌دهنده

■ گام سوم : اتصال ژن ساخته‌شده به‌پلازمید توسط آنزیم لیگاز

■ گام چهارم : جاسازی یکی از قطعات زیر قبل از ژن تولید انسولین در ناقل

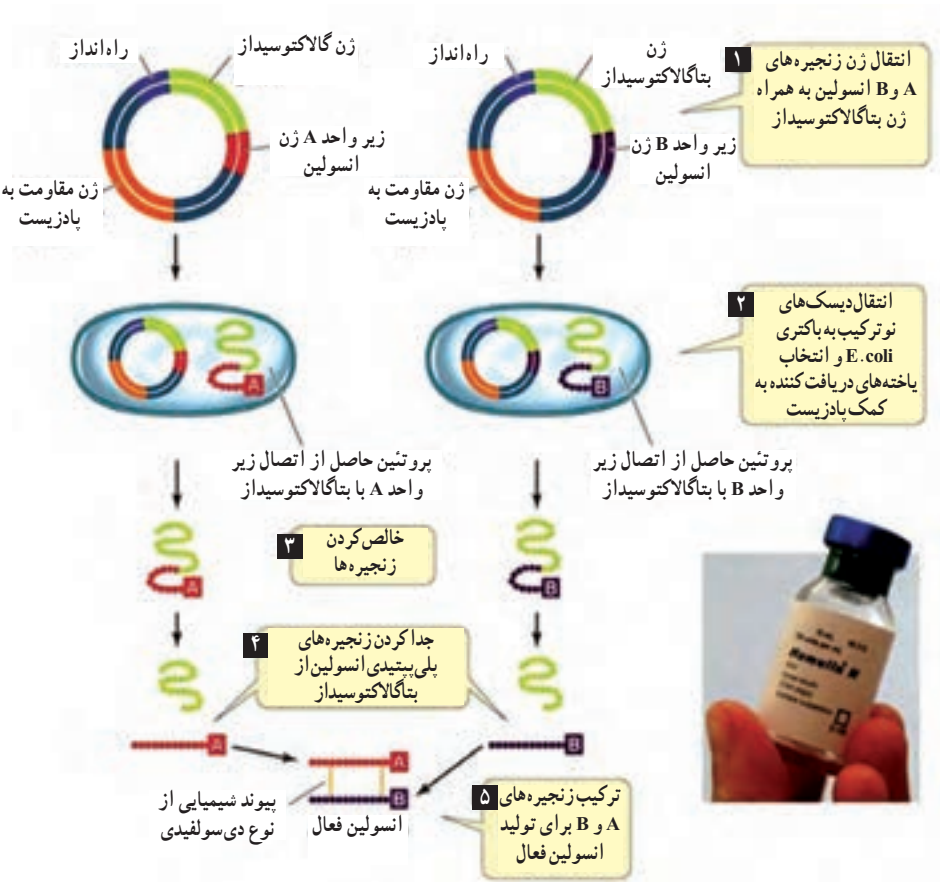
ــ یک قطعهٔ DNA اپران لاکتوز شامل اپراتور و راه‌انداز و ۱۰۰۶ کدون لازم برای ساختن بتاگالاکتوزیداز.

ــ یک قطعهٔ DNA اپران تریپتوفان شامل اپراتور و راه‌انداز و۱۹۰ کدون لازم برای ساختن تریپتوفان.

■ در مراحل بعدی ژن رمز کنندهٔ آمینواسید متیونین را برای نشان‌دار کردن جایگاه برش، بعد از ژن بتاگالاکتوزیداز قرار می‌دهند.

پس ترتیب قرارگرفتن ژن‌ها در ناقل به‌این صورت است که ابتدا ژن بتا گالاکتوزیداز و پس از آن توالی رمز کنندهٔ متیونین و در آخر هم ژن ساخته شده برای تولید انسولین قرار می‌گیرند.

پس از بیان دنای نوترکیب توسط باکتری، زنجیره‌های انسولین به‌متیونین و بتا گالاکتوزیداز متصل است. این ترکیب باید تحت تیمار سیانوژن بروماید قرار بگیرد. سیانوژن بروماید از جایگاه متیونین برش می‌زند و زنجیره‌های انسولین را از متیونین و بتاگالاکتوزیداز جدا می‌کند. سپس زنجیره‌های انسولین تحت اثر اسید سولفوریک قرار می‌گیرند تا بنیان‌های سولفات به زنجیره‌های انسولین متصل شود و در مرحله آخر محصول در معرض اکسیژن هوا قرار می‌گیرد و با اکسیدشدن بنیان‌های سولفات، پیوندهای دی‌سولفیدی بین دو زنجیرهٔ A , B برقرار می‌شود و مولکول انسولین کامل می‌شود. انسولین تولید شده با روش کروماتوگرافی از محیط خالص می‌شود.



شکل ۷ــ فرایند تولید انسولین نوترکیب انسانی (شکل کتاب درسی ساده شدهٔ این شکل است.)

تولید انسولین نوترکیب با cDNA

در این روش ابتدا باید رنای کامل از یاخته‌های بتای لوزالمعده جدا شود. با توجه به اینکه mRNA در انتهای خود دارای دم پلی A است می‌توان آن را از رناهای دیگر جدا کرد؛ سپس با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس از روی آن، cDNA را تولید کرد. در نتیجه یک هیبرید cDNA ــ mRNA به‌دست می‌آید. در مرحلهٔ بعد mRNA از cDNA جدا می‌شود و یک رشتهٔ cDNA به‌دست می‌آید. برای قرار دادن این cDNA در پلازمید باید آن را دو رشته‌ای کرد، پس رشتهٔ مکمل این cDNA هم ساخته می‌شود. دنای دو رشته‌ای ساخته شده برای ورود به‌ناقل مناسب است. سرانجام به‌انتهای ۵ cDNA یک توالی AUG که اسیدآمینه متیونین را کد می‌کند اضافه می‌شود تا محلی برای برش بتاگالاکتوزیداز از پروانسولین فراهم کند.

■ قابل ذکر است که در صورت تفهیم محتوای گفتارهای اول و دوم فصل، آموزش گفتار سوم چالش زیادی ندارد. توصیه می‌شود برای کاربردهای مطرح شده در این گفتار و همچنین کاربردهای مشابه با آنان، از دانش‌آموزان بخواهید در زمینهٔ مورد علاقهٔ خود تحقیق کنند و در کلاس درس گزارش دهند. می‌توانید فرایند کاربرد زیست‌فناوری در تشخیص زودهنگام بیماری ایدز، تولید واکسن‌ها، محصولات کشاورزی و جانوران تراژنی را پیشنهاد کنید.