شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir

Trans formation

ترانسفوماسیون برای نخستین بار در سال 1928 توسط *Griffith* مشاهده شد و بعدها در سال 1944 در سطح مولکولی توسط *Avery* . *O* کسی که نشان داده *DNA* ماده ژنتیکی باکتری می باشد مورد بررسی قرار گرفت جزئیات این آزمایش ها در فصل بعد مورد بررسی قرار می گیرد.

در ترانسفورماسیون یک سلول *DNA* خارجی را که در محیط می یابد جذب می کند و آن را با ژنوم خود از طریق نو ترکیبی ترکیب می کند. همه سلول ها در فرآیند ترانسفورماسیون شرکت نمی کنند و همه *DNA* های خارجی نیز در انتقال شرکت نمی کنند برای اینکه *DNA* خارجی انتقال داده شود باید دو رشته ای و نسبتاً بزرگت باشد. و برای اینکه یک سلول *DNA* خارجی را به درون خود منتقل کند باید دارای پروتئین سطحی *competence factor* بستگی دارد. در *drosophila* باشند که طی یک فرآیند انرژی گیر به *DNA* خارج سلولی متصل می شود.

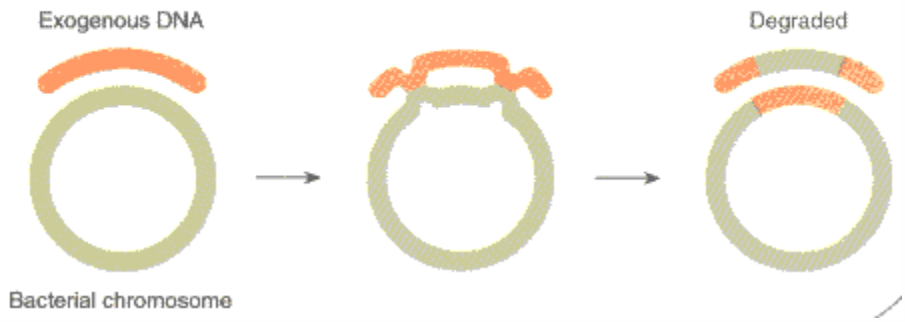
مکانیسم ترانسفورماسیون :

هنگامی که *DNA* خارجی به درون سلول آورده می شود یکی از رشته ها بوسیله یک آنزیم درون سلولی *DNAase* هیدرولیز می شود و انرژی حاصل از هیدرولیز برای کشیدن بقیه رشته *DNA* به درون سلول می شود. تک رشته حاصل سپس می تواند طی نوعی فرآیند *cross sin g over* با *DNA* میزبان یکی شود.

شکل 1

شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir

Exogenous linear genetic material can be incorporated into a circular bacterial chromosome by two crossovers.



توجه کنید که برخلاف $cross\sin g\ over$ در یوکاریوت ها این فرآیند یک فرآیند دو طرفه نیست. کروموزوم باکتری با بخشی از DNA خارجی یکی می شود و DNA تک رشته ای باقیمانده بوسیله آنزیم های سلول میزبان تخریب می شود. DNA خطی در پروکاریوت ها به سرعت تخریب می شود.

ترانسفورماسیون روش بسیار کارآمدی برای نقشه برداری دربرخی از باکتری ها است بویژه آنها یی که در آن ها سایر روش های جذب DNA مانند $transduction$ نا کار آمد است. برای مثال نقشه ژنی خوبی برای $Bacillus\ subtilis$ از طریق فرآیند ترانسفورماسیون تهیه شده است. $E.coli$ فاقد سیستم کارآمد برای ترانسفورماسیون می باشد لذا از روش های دیگری برای نقشه برداری از کروموزومش استفاده می شود.

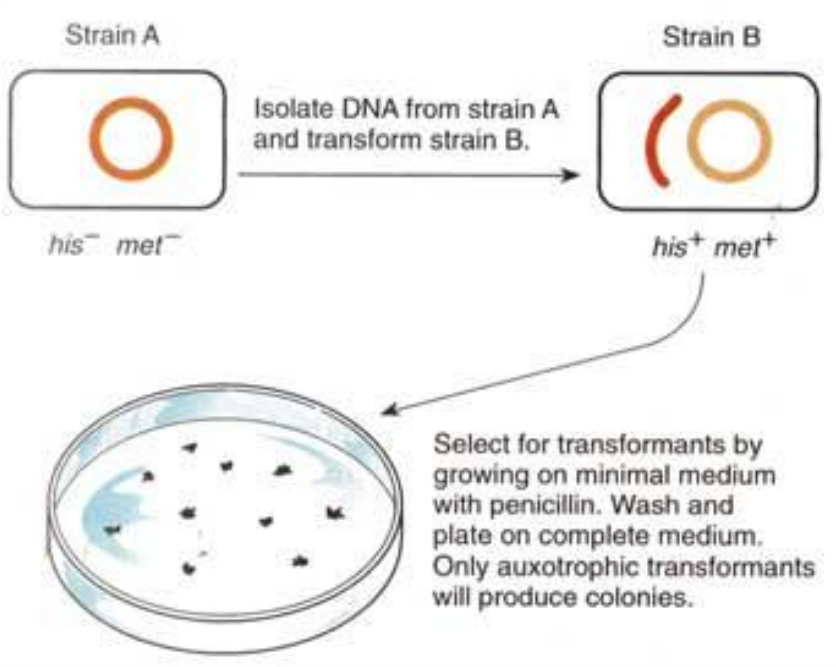
:Transformation mapping

مراحل اصلی نقشه برداری ترانسفورماسیونی در زیر می آید. دو سویه باکتری به نحوی انتخاب می شوند که یک سویه در دو جایگاه ژنی جهش یافته باشد. برای مثال سویه B ممکن است برای سنتز آمینو اسید هیستیدین و متیونین دارای آلل وحشی باشد (His^+) و (met^+) بنابراین سویه A باید برای هر دو اسید آمینه هیستیدین و

شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir

متیونین اکسوتروف باشد $DNA\ (His^{-}, met^{-})$ از سویه A جداسازی شده و در محیط کشت سویه B تحت شرایط مناسب برای ترانسفورماسیون قرار داده می شود (برای مثال با افزودن کلرید کلسیم میزان جذب DNA به شدت افزوده می شود) بعد از گذشت زمان مناسب برای ترانسفورماسیون سویه B برای مشخصات مربوط به His و met مورد بررسی قرار می گیرد (شکل **1**) از آنجا که ما به انتقال یابنده ها ($transformant$ یا $auxotrophs$) علاقه مندیم سلول های $nontransformed$ می توانند به راحتی توسط محیط کشت کمینه حذف شوند. اکسوتروف ها در این محیط رشد نمی کنند و بنابراین نمی میرند ولی پروتوتروف های $nontransformed\ (His^{+}, met)$ کشته می شوند پس از شستشوی پنی سیلین سلول های باقیمانده در محیط کشت کامل قرار داده می شوند. با کشت یک نسخه از کلنی های حاصله در محیط کشت فاقد متیونین و یا هتیدین می توان فنوتیپ هر سلول ترانسفر شده را تعیین نمود. هر ترانسفورماسیون به دو $cross\ over$ احتیاج دارد که یکی از آن ها باید در خارج از ناحیه $His - Met$ باشد. $crossover$ دوم می تواند هم در بین دو سر ناحیه ($double\ transformant$) و هم بین جایگاهها رخ دهد ($single\ transformant$). نسبت $single\ transformants$ به همه ترانسفورمنت ها رخ دادن نسبی $cross\ over$ بین دو جایگاه را نشان خواهد داد. هر چه این عدد بزرگتر باشد احتمال بیشتری وجود دارد که بین دو جایگاه $cross\ over$ رخ داده باشد و بنابراین دو جایگاه ژنی از یکدیگر دورترند. برای مثال اعداد زیر از آزمایش شکل زیربدست آمده اند.

شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir



34 His^- Met^+ *transformants*

28 His^+ Met^- *transformants*

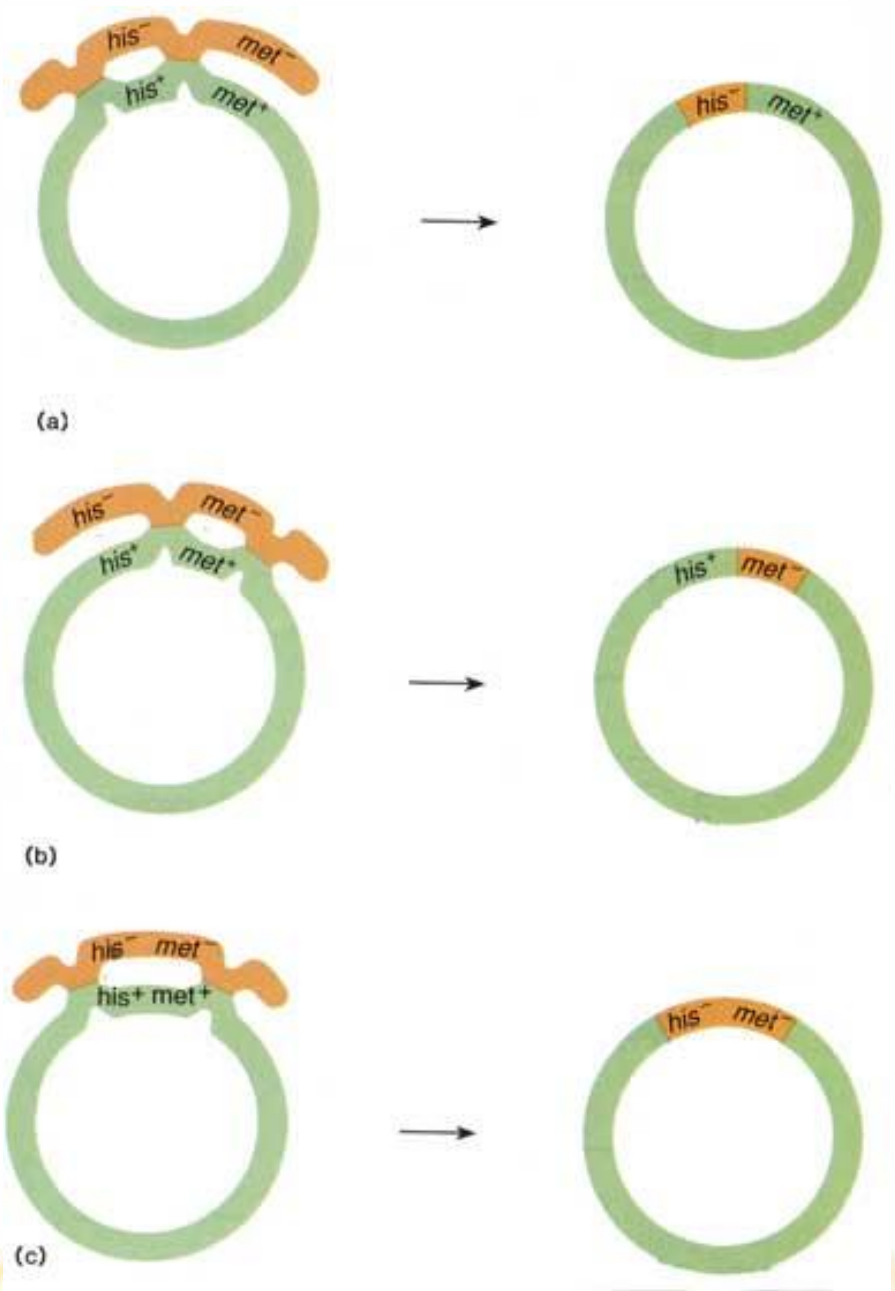
194 His^- Met^- *transformants*

فرکانس نوترکیبی نسبی برابراست با :

$$\frac{\textit{number of single transformants}}{\textit{total number of transformants}} = \frac{34+28}{34+28+194} = 0.24$$

شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir

(شکل)



شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir

دوباره به تفاوت های بین نقشه برداری آن بار یوکاریوت ها نظیر *Drosphila* توجه کنید. هـر کروماتیـد در مکانی قرار گرفته است که بصورت تتراد *crossover* کند. در این جا فقط تعداد معدودی از کروموزوم ها دستخوش ترانـسفورماسیون مـی شـوند کـه بـه جـذب *DNA* خـارجی و احتمـال جهـت گیـری مناسـب *DNA* بـرای *cros sin gover* بستگی دارد.در *Drosphila* درصد نوترکیبی را مستقیماً به عنوان فاصله نقشه می گیریم. در این جا ما باید از رخ دادن نسبی *crossover* بین جایگاه های ژنی سلولی های استفاده کنیم کـه حـداقل در یکـی از جایگاه های ژنی ترانسفورم شده اند. به بیان دیگر در این جا ما باید در ابتدا همه *transformants* را انتخاب کنیم و سپس رخ دادن نسبی *crossover* بین جایگاه ها را به منظور ضریب نو ترکیبی نسبی محاسبه کنیم.

بر خلاف تعیین نقشه در یوکاریوت ها که فرزندان معمولاً *parental* یا *recombinant* هستند. آزمایـشات ژنتیک پروکاریوتی معمولاً شامل تکنیک های انتخابی هستند که سلول هـای دارای ویژگـی هـای خـاص در ابتـدا انتخاب شده و سپس در بین آن ضریب نسبی محاسبه می شود. تکنیک های انتخابی که آن ویژگی را ندارند از بین می برند. هر چند در هر دو سیستم فاصله بیشتر بین دو جایگاه احتمال بیشتری برای وقوع یـک *crossover* بـه همراه دارد. با آزمایش سیستماتیک تعدادی جایگاه ترتیب نسبی می تواند تعیین شود. برای مثال اگر جایگاه A به نزدیکی جایگاه B و B به C متصل باشد ما می توانیم ترتیب $A-B-C$ را در نظر بگیریم بوسیله این روش ایـن امکان وجود ندارد که ترتیب دقیق تعداد زیادی ژن متصل شده از نزدیک را پیدا کنـیم. بـرای بدسـت آوردن ایـن اطلاعات لازم است که به سراغ *transduction* بردیم که در همین فصل بررسی می شود. هر چند ترانسفورماسیون این امکان را داد که بتوانیم تعیین کنیم که نقشه ژنی *B.Subtilis* حلقوی است پدیده ای که در همه پروکاریوت ها و بسیاری از فاژها دیده می شود.

شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir

شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir