ژن:

sequence(ترادفی) از پلی نوکلئوتید است که پلی پپتید و tRNAوrRNA از ان ساخته میشود.

ژن قطعه ای از اسید نوکلئیک است که از ژن رونویسی صورت گرفته وRNA ساخته میشود که این RNA میتواند mRNA باشد و از ان پروتئین یا پلی پپتید ساخته شود و یا از ان tRNA یا rRNAساخته شود. میتوان بین ژن های مسئول ساخت RNA و پروتئین تفاوت قائل شد.

- **cisterna:**

قطعه ای از ژن است که از ان یک پلی پپتید ساخته میشود. ساخت پلی پپتید←ترجمه← mRNA ←ساخت← cisterna

گاهی اوقات در باکتری ها از یک mRNA چند پلی پپتید ساخته میشود یعنی mRNA پلی سیسترونیک است.

تفاوت بین یاخته های پروکاریوتیک در مورد باکتریهای حقیقی(به جزآرکی باکترها) با سلول های یوکاریوت:

در باکتری های حقیقی به جز ارکی ها اینترون نیست اما در ژن یوکاریوتیک و ارکی باکتر ها اینترون و اگزون داریم.

در سیستم های باکتریایی و ویروسی coding information در cistron معمولا پیوسته است.

آرکی باکتر ها را باکتریهای کهن یا باستانی هم نامیده اند اما برخی خصوصیات یوکاریوتیک من جمله وجود اینترون ها را دارند.

توجه: بعضی ژن های یوکاریوتیک اینترون ندارند مثل ژن هیستون

❖ *DNA* در باکتریها

DNA باکتری ها 2 رشته اند: 1-رشته sense strand یا template strand یا transcribe strand←مسئول سنتز RNA 2- رشته antisense یا non template S.

توجه: رونویسی از '3 به'5 رشته .sense Sصورت میگیرد و جهت ساخت mRNA '5 به '3 است.

- **پروموتور:**

توالی از DNA که بر روی رشته .sense S قرار دارد که معمولا در فرادست(upstream) ژن واقع شده است. پروموتور به معنای راه انداز بوده که بخشی از ژن است که توسط آنزیم RNA پلیمراز شناخته شده و RNA پلیمراز از طریق شناسایی ترادفهای پروموتور به جایگاه اتصالی خودش (RNA polymerase biding site)متصل شده و باز شدن 2 رشته DNA رخ میدهد.از DNA در نهایت یا پروتئین ساخته میشود یا تنها RNA. پس پروموتورهم مسئول ژنهای سیسترونی و هم ژنهایی که پروتئین ترجمه نمیشوند هست. شروع ژن با پروموتور است.

پروموتور دارای 2 جایگاه است:

www.JozveKade.com

1-RNA polymerase recognition site

35 باز از نقطه شروع رونویسی فاصله دارد
(این نقطه روی رشته anti sense با توالی '5'TTGACA3 قرار دارد)

2-RNA polymerase binding site

10 باز از نقطه شروع فاصله دارد

RNA polymerase biding site توالی '5'TATAAT3 دارد که به علت اتصالات سست این ناحیه آنزیم میتواند DNA را باز کند.

نکته انحرافی: ژن اگر open reading frame باشد بدین معناست که در صورت وجود پروموتور ترجمه شده شروع به ساخت پروتئین خاص میکند.(توالی از DNA که از یک کدون آغازگر (start codon) شروع و به کدون پایان ختم می شود.)

همانطور که گفته شد اولین جز ژن پروموتور بود حال سایر اجزای ژن را بررسی میکنیم:

- **Anti leader**

پلیمراز RNA، leader را از روی این توالی رونویسی میکند.

* **shine dalgarno:**

قطعه از leader است که مکمل یک توالی در 16srRNA است که محلی جهت اتصال ریبوزوم برای پروتئین سازی است.

- **coding region:**

ناحیه ای است که از ان pro ساخته میشود.اولین کدون بعد از ناحیه leader کدون AUG است که کلیدی جهت افزودن اولین اسیدامینه فرمیله شده (فرمیل متیونین) است. N فرمیل متیونین اولین آمینواسید است که در بیشتر پروتئین های پروکاریوتی حضور دارند.

- **anti trailer region:**

trailer ساخته شده از ان در تنظیم و خاتمه ترجمه نقش دارد و خودش ترجمه نمیشود.

- **terminator:**

جایگاه stop رونویسی است.(یعنی محل خاتمه کار RNA پلیمراز)

تغییرات ژنتیکی در قسمت های مختلف ژن میتواند رخ دهد. اگر تغییر در ناحیه پروموتور رخ دهد امکان افزایش بیش از حد بیان ژن وجود دارد که معمولا در مهندسی ژنتیک برای تولید فراورده هایی با کاربرد درمانی از این روش استفاده میشود.

- **نواحی تنظیم ژن:**

در ناحیه پروموتور و اطراف ان وجود دارد و محل نشست inducer و repressor است. برخی ناحیه regulatory را جز پروموتور میدانند. پروتئین های تنظیمی به نواحی تنظیمی ژن متصل میشوند که پروتئین ها در محدوده خارج از ژن ساخته میشوند. معمولا باکتری ها موجوداتی مقتصد اند. هیچ

www.JozveKade.com

باکتری در حضور GLC ژن اپران لاکتوز را روشن نمیکند. زیرا سوداوری باکتری برای تولید ATPاز گلوکز نسبت به لاکتوز بیشتر است. اگر باکتری دچار موتاسیون در ناحیه تنظیمی شود به ان constitutive mutation میگویند که میتواند برای همیشه موجب بیان یک ژن که به ان نیاز نیست شود.

* **CAP(catabolic activated protein):**

پروتئینی تنظیمی برای ناحیه regulator است که میتواند موجب فعال شدن یا عدم فعال شدن ژن شود. operator و CAP biding site جز سلولی تنظیمی به شمار میروند.

* **اپران:**

در باکتری جهت ساخت آنزیم ها و پروتئین ها وجود دارد. دسته ژن های باکتری که توسط یک پروموتور روشن شود. به پروموتور اپرون، operator میگوییم. 2 نوع اپران داریم: A ←اپران هایی مثل لاکتوز جهت ساخت mRNA که بعد از پروتئین از ان ساخته میشود. اپران لاکتوز سبب میشود چند آنزیم فعال شوند تا در نهایت لاکتوز مورد استفاده قرار گیرد. B ←اپرون ریبوزومی [5srRNA یا 23s یا16s] ←در ساختمان ریبوزوم و tRNA که مسئول حمل aa در سیستم ترجمه است را میسازد.

در اپرون ریبوزومی بعد از رونویسی از DNA، RNA ساخته شده در فضا روی خود برگشته، loop میزند(با پیدا کردن باز های مکمل خود). در فاصله بین لوپ های 23sو16s، spacer tRNAداریم که بعد از ان tRNA ساخته میشود. همچنین در انتها trailer tRNA داریم که به tRNA تبدیل میشود. توالی های کد کننده tRNA توسط توالی های spacer کوچکی از هم جدا شده اند که این spacerها توسط ریبونوکلئازهای خاصی حذف میشوند. تمامی rRNAها بصورت یک مولکول پیشساز بزرگ رونویسی میشوند که بعدا به وسیله ریبونوکلئازها بریده شده و rRNAنهایی ساخته میشود. قطعات DNA مربوط به این اپران ها دارای یک راه انداز، توالی anti leaderو anti trailer است. عملکرد توالی leader مسخص نیست ولی trailer برای رونویسی ضروری است. leader و trailer حین بلوغ RNA اولیه حذف میشوند. در E.Coli ، نواحی pre tRNA spaces trailer حاوی ژنهای tRNA هستند.

در صورت بروز موتاسیون در 16s عوامل ضد میکروبی (انتی بیوتیکها) بر روی میکروب اثر ندارد. چرا که سیستم ترجمه ای یکی از اهداف مهم انتی بیوتیک ها است. کلرامفنیل به زیر واحد 23s حمله میکند.

❖ کاربرد های *Auxotroph*:

- **1- مطالعه فرایند تنظیم ژن در موجودات**

ژاکوب و مونو با ایجاد موتاسیون در یک ژن جهت وابستگی میکروب به یک ماده غذایی فرایند تنظیم ژن را بررسی کردند. بعد از ایجاد موتاسیون ایجاد complementation میکنند یعنی partial diploid ساخته و ژن سالم را وارد سلول کردند تا نقص ژن معیوب بر طرف شود و

متوجه ایراد شوند(برای اینکه بفهمند کدام قسمت DNA و کدام ژن دچار جهش شده، ژن های سالم مختلفی را وارد کردند تا ببینند در کدام حالت نقص بر طرف میشود)

www.JozveKade.com

- **2 - Auxotrophy typing:**

میکروب ها از نظر وابستگی به مواد غذایی متفاوت هستند. مثال: اعضای یک جمعیت از گونه های خاص مثل نایسرایی ها(لیزین مثبت، لیزین منفی) هستند.

- **3 - تستAMES:**

aoxutroph علت موتاسیون به وجود میاید. جهت پی بردن به جهش زا(سرطان زا) بودن یک ماده را در مجاورت auxotroph میگذاریم چنانچه به protroph تبدیل شدند این ماده جهش زا است.

Salmonella typhimurium جهت جهش زایی و اثرات سرطان زایی مواد مناسب است زیرا قدرت proof reading ان کم است همچنین قدرت editing در خطای replication پایین است(یعنی این باکتری سریع نمیتواند خطای خود را اصلاح کند). در coloning count(یا شمارش میکروبی) هر تعداد پروتروف بیشتر باشد جهش زایی ماده مشکوک بیشتر است. فایده این کار این است که ما در مقیاس بسیار بزرگ این کار را انجام می دهیم. در لوله آزمایش 10 میلیارد باکتری داریم.

توجه: علاوه بر اثر مواد سرطان زا در تبدیل اگزوتروف به پروتروف، موتاسیون میتواند خودبخودی(spontanous)باشد(اگر ماده جهش زا نباشد) که معمولا 1 موتاسیون در 10^8 جمعیت از باکتری رخ میدهد.

سوال: چرا در بررسی جهش زا بودن در باکتریها، تبدیل پروتوتروف ها به اگزوتروف ها ملاک جهش زا بودن قرار نگرفته است در حالی که احتمال این اتفاق بیشتر است؟ استاندارد این روش است.

❖ موتاسیون

Biochhemical M.: موتاسیونهایی هستند که در بیوشیمی سلول تغییر ایجاد می کنند و عمدتاً یک مسیر بیوسنتتیک را غیر فعال می کنند و غالباً باعث اگزوتروف شدن ارگانیسم نسبت به ماده ی خاصی که در گذشته نسبت به آن پروتوتروف بوده است می شود و یا برعکس تبدیل اگزوتروف به پروتروف.

نکته: می توان برای تست جهش زایی یک ماده از اگزوتروفی و پروتروفی استفاده کرد. در اینصورت باید باکتری قدرت Proof و تصحیح کمی داشته باشد تا ما همه موتاسیونها را ببینیم.

- **انواع موتاسیون ها:**

* **موتاسیون خود به خودی (Spontaneous M):**

نوعی خطای همانند سازی محسوب می شوند که با یک کسر مشخصی (معمولا 10^{-11} تا 10^{-7}) در جامعه بروز می کنند و هیچ عامل القایی خارجی در پیدایش آن موثر نبوده است.

www.JozveKade.com

علل بروز موتاسیون خود به خودی عبارتند از: 1- خطاهای حین سازی DNA 2- آسیبهای وارده به DNA از طرف عواملی چون گرما و تابش پرتو۷(در طبیعت) 3- فعالیت Transposonها

* **Induced M:**

موتاسیون تحت تاثیر یک عامل خارجی تحمیل شده به سلول رخ می دهد. از جمله این عوامل موتاژن می توان به موارد زیر اشاره کرد: تابش UV ، تابش ۷ (در مورد پرتو۷ توافق نظر وجود ندارد و چون در طبیعت هم مواجهه با آن بسیار اتفاق می افتد بعضی آن را جزو القاگرهای موتاسیون به حساب نمی آورند) ، مواد شیمیایی مختلف ، گرما و موتاسیونهای هدفمند یا site specific mutagenesis که در آزمایشگاه توسط PCR به ارگانیسم تحمیل می شوند.

* **Forward mutation:**

موتاسیونی که در فرم وحشی ایجاد شود. **فرم وحشی (wild-type)** فراوانترین فرم یک ژن در طبیعت است. این موتاسیون ممکن است تغییرات فنوتیپی هم در ارگانیسم به وجود آورد. اثر این موتاسیون می تواند توسط موتاسیون ثانویه ای اصلاح و خنثی شود ، در این صورت به این موتاسیون ثانویه mutation می گویند. reversion mutation به حالت های زیر ممکن است دیده شود:

- اگر موتاسیون ثانویه در همان نقطه ی موتاسیون اول رخ داده باشد و همان موتاسیون را اصلاح کرده باشد به آن Back M می گویند.

- Suppressor mutation: اگر موتاسیون برگشتی (reversion) در یک محل ثانویه رخ داده باشد

موتاسیون سرکوب کننده نامیده می شود که دو نوع دارد:

الف) Intragenic M: حالتی که موتاسیون دوم در همان ژن اما در محل دیگری غیر از موتاسیون اولیه رخ داده باشد. به این جهش Second site Mutation هم می گویند.

ب) Extragenic M: حالتی که موتاسیون ثانویه خارج از ژن مفروض اتفاق بیافتد اما اثر آن به گونه ای باشد که بتواند آنرا موتاسیون اول را اصلاح کند.

* **موتاسیونهای تغییر چارچوب:**

در اثر حذف یا اضافه شدن مضرب غیر صحیحی از 3 جفت باز به وجود می آیند. اگر این جهش در ابتدای ژن رخ دهد ممکن است سبب بهم ریختن کل ساختار پروتئینی شود. اما اگر جهش در انتهای ژن رخ داده باشد ممکن است تغییرات ایجاد شده در پروتئین خیلی شدید نباشد Pr بتواند عملکرد خود را داشته باشد. در جاهایی که یک توالی کوتاه تکرارشده(short repeated nucleic sequence) وجود دارد اتفاق می افتد.

* **موتاسیون نقطه ای (Point mutation):**

بیشترین نوع جهش که در آن فقط یک جفت باز دچار تغییر میشود.

این موتاسیون می تواند گستره ی وسیعی از اثرات را داشته باشد از جمله:

www.JozveKade.com

الف) Slent mutation: به علت وجود خاصیتی بنام codon degeneracy با وجود چند کدون برای بسیاری از اسید آمینه ها ممکن است تغییر فنوتیپی منجر نشود. مثلاً تبدیل کدون CGU به CGC که هر دو آرژینین را کد می کنند. این جهش ها فقط با روشهای sequencing قابل ردیابی هستند.

ب) Missense mutation: جانشینی یک باز به جای باز دیگری در DNA که منجر به تغییر کدون یک aa به یک aa دیگر می شود. مثلاً GAG (برایGLU) به GUG (برای Val) تبدیل می شود. این جهش ها می تواند گاهی به از دست رفتن فعالیت Pr حاصله بیانجامد و گاهی ممکن است هیچ تغییری در عملکرد Pr ایجاد نکند.

بسیاری از پروتئینها حتی بعد از جانشینی یک aa هم فعالیت خود را حفظ می کنند.

جایگزینی یک اسید آمینه ی غیر قطبی به جای یک اسید آمینه قطبی در نواحی داخلی Pr می تواند تغییرات شدیدی در ساختار سه بعدی و عملکرد پروتئین برجای بگذارد. جایگزینی یک اسید آمینه ی مهم در جایگاه فعال آنزیم می تواند فعالیت آنزیم را نابود کند. گاهی جایگزینی یک اسید آمینه ی قطبی به جای یک اسید آمینه قطبی دیگر در سطح پروتئین می تواند به تغییرات ناچیزی در عملکرد و ساختار پروتئین بیانجامد یا گاهاً هیچ تاثیر مخلی نداشته باشد. این نوع جهش ها برای رخداد تکامل و ایجاد تنوع ژنتیکی (ایجادgenetic pool) حائز اهمیت اند.

ج) Non sense M: تبدیل یک کدون معنی دار به یک کدون بدون معنی (کدون خاتمه) که منجر به ختم زود هنگام ترجمه می شود. این جهش هم بسته به جایگاه نسبی خود می تواند اثرات کم یا شدیدی برمحصول ترجمه بگذارد.

د) frameshif M.(تغییر چارچوب): حذف یا اضافه شدن کمتر از 3 جفت باز که باعث تغییر چارچوب خواندن برای تمام کدونها از ان فقط میشود. این جهش باعث تولید پروتئینهای غیرعملکردی و در نتیجه باعث ایجاد فنوتیپ جهش یافته میشود. درنهایت باعث ایجاد یک کدون پایان نیز میشود که در نتیجه پپتید تولیدی ان کوتاه تر از حد طبیعی خواهد بود. فنوتیپ حاصله ممکن است بواسطه جهش ثانویه بهبود یابد.

❖ Mutation detection:

همانطور که گفته شد موتاسیونها عموما نادرند(با فرکانس حدود 10^{-7} تا 10^{-11}). بنابراین تکنیکهای بسیار حساسی برای ردیابی انها مورد نیاز است. گاهی میتوان بطور مستقیم به وقوع جهش پی برد.(مثل وقوع فنوتیپ البینو). یکی از روشهایی که در شناسایی موتانتهای اگزوتروفی سودمند است، replica plating است.

• Selection methods:

منظور از روشهای تشخیصی جهش، تشخیص باکتریهایی است که متحمل جهش و در نتیجه تغییراتی شده اند. برای این منظور روش زیر کاربرد دارد:

1- مقاومت یا عدم مقاومت باکتریهای جهش یافته نسبت به باکتریوفاژها، انتی بیوتیکها یا دما

2- به کارگیری سوبسترا(substrate utilization mutation): در مورد جهش هایی که باکتری را به یک سری مواد وابسته(اگزوتروف) میکند، افزودن سوبسترا کمکی به رشد باکتری نمیکند.(باکتری به ماده نهایی نیازمند است). از این طریق میتوان باکتریهای جهش یافته را تشخیص داد.

همان طور که گفته شد، موتاسیون ها 2 دسته اند: خودبخودی(spontaneous)و القایی(induced)

www.JozveKade.com

در باکتری ها همیشه موتاسیون خودبخودی را در کسری از جمعیت خواهیم داشت ولی این موتاسیون به علت اثرات موتاسیون زایی مواد نیست. پس تجویز انتی بیوتیک سوش باکتری ها ها را مقاوم نمیکند بلکه مصرف نادرست ان، تجویز نادرست یا خراب بودن انتی بیوتیک باعث select و انتخاب شدن موتانت ها(باکتری های جهش یافته) میگردد. به عبارتی اجازه رشد به موتانت های مقاوم میدهد و باکتری های حساس را از بین میبرد(نه انقدر کامل است که همه را از بین ببرد از طرفی چون انتی بیوتیک است بر روی حساس ها اثر میگذارد ولی روی مقاوم ها بی اثر است). توجه شود که به وجود امدن موتانت های مقاوم معلول انتی بیوتیک نیست بلکه موتانت های مقاوم خودبخود به وجود میایند. (در تست سرطانزایی هم همانطور که گفته شد همیشه امکان دارد تعدادی موتانت از بین auxotrophها بوجود امده باشد.) پس در .spontaneous M(موتاسیون خودبخودی) که انواع دارد، مثل .pointM(موتاسیون نقطه ای) که جهش بسیار مهم است. در میکروبشناسی پزشکی خیلی از مقاومت های دارویی بخاطر بروز .pointM است. علل مختلف این موتاسیون ها: 1-خطای همانندسازی 2-تشعشع 3-دمای خیلی زیاد 4- action of transposons(عمل ترانسپوزون ها)

* **ترانسپوزون:**

ژن هایی که حرکت میکنند و قطعات یا ژن هایی که آنزیم transposase را میسازند(ترادف هایی دارند که آنزیم transposase را میسازنند) و این آنزیم، 2 سر DNA ترانسپوزون را میگیرد و ان را در طول کروموزوم جابجا میکند. پس ترانسپوزون ها با حرکت در طول کروموزوم موجودات(نه فقط باکتری ها) میتوانند موتاسیون ها را بوجود اورند. تاکید میشود که ترانسپوزون ها خاص میکروب ها نیستند و در موجودات عالیتر هم هستند مثل گیاهان. پس ترانسپوزون ها بخاطر عمل آنزیم ترانسپوزاز امکان حرکت و جابجایی در طول کروموزوم را دارند و نیز دارای توانایی جابجایی بین کروموزوم و پلازمید هستند و از این طریق به جابجایی ژن ها بین موجودات (باکتری های)مختلف کمک می کنند.

برای کشف موتاسیون ها ابزار های مختلفی داریم. لازم به ذکر است فراوانی موتاسیون ها 10^{-11} تا 10^{-7} است(فرکانس رخداد اغلب موتاسیون ها) اما موتاسیون هایی داریم که شایعتر از این مقدارند(این اعداد 10^{-11} تا 10^{-7} به صورت کلی و میانگین بیان شده است) مثلا فراوانی 10^{-7} به این معناست که از هر 10^{7} باکتری در محیط کشت یکی دچار موتاسیون میشود(در یک ژن خاصی).

فراوانی جهش دراغلب ژن های مقاومت 10^{-8} است ضربدر یک ضریب که میتواند 1/2، 1/5، 1/8 یا ...باشد[10^{-8}×(...،1/8، 1/5، 1/2)] به عبارتی اغلب از هر 100 میلیون باکتری، 200 میلیون، 180 میلیون [10^{-8}×(...،1/8، 1/5، 1/2)] این حدود موتاسیون هایی است مربوط به مقاومت در باکتری هایی که در پزشکی مطرح هستند و باید اعداد انان را بدانیم. این موضوع به ما کمک میکند در مورد برخی بیماری ها چگونه عمل کنیم که باعث acquired resistance(مقتومت اکتسابی) نشویم[حاشیه=≪ acquired R با primary derived R متقاوت است، در primary derived .Rمریض هنگام رجوع به ما بیماری را دارد(قبل از اینکه ما دارو را تجویز کنیم) بلکه میکروب از ابتدا(primary)مقاوم بوده است و ما گناهی نکرده ایم! ولی در حالت دیگر سوش باکتری مریض هنگام مراجعه به ما کاملا wild type است و هیچگاه به خاطر مصرف انتی بیوتیک ها تحت selective pressure قرار نگرفته است به عبارتی هنوز مقاوم نشده است و ما با تجویز ناکافی یا نا مناسب باعث میشویم میکروب مقاوم شود یا در حالتی بیمار پس از مدتی مصرف فکر میکند خوب شده و دیگر نیازی به مصرف انتی بیوتیک نیست(به عبارتی عدم تمکین بیمار از ما!) این ها همه باعث نوعی از مقاومت در باکتری میگردد که ان را(acquired resistance)میگوییم.] به عنوان پزشک در مورد برخی بیماری ها بسیار مهم است که تشخیص دهیم نوع مقاومت باکتری از نوع acquired بوده یا primary.

یا از انواعی از مقاومت(MDR یا XDR یا TDR یا، به ترتیب مخفف multi drug resistance – extensive drug R.و total drug R.) را باید تشخیص دهیم. از لحاظ اپیدمیولوژیکی اگر در جمعیت MDR از نوع primary باشد خیلی بد است چرا که به این معناست که بیمار بیچاره، تحت هیچ

www.JozveKade.com

درمانی قرار نگرفته است و از یک مجموعه بیمار یا فرد بیماری، MDR را کسب کرده است. پس در جامعه به سرعت پخش میشود. این تقسیم بندی بیشتر برای سل(TB) مطرح است.

اگر مقاومت باکتری از نوع acquired باشد ما به عنوان پزشک خوب که مطالب یاد گرفته در دانشگاه رابه خوبی فرا گرفته است و به خوبی در حرفه مان بکار میبریم!! میتوانیم انرا کنترل کنیم. به این ترتیب که چون این نوع مقاومت تازه بوجود امده است، ما باید دنبال علت بگردیم به این طریق که از ازمایشگاه بخواهیم جواب انتی گرام(antigram)را کاملا به ما بدهد تا نسخه را اصلاح کنیم وبیمار نجات یابد. در غیر اینصورت بیماری طول میکشد(مزمن میشود) و نهایتا تلف میشوند (میزان تلفات در این بیماری ها خیلی بالا است) و در عین حال خطر بیشتر، اشاعه بیماری در جامعه است. پس در کل بروز موتاسیون ها، فراوانی انها، چگونگی پیشگیری از انها و داروهایی که تجویز میکنیم، به کاهش دردسر های اقتصادی، بهداشتی، درمانی، اجتماعی و فرهنگی کمک میکند.

گاهی کشف موتاسیون ها ساده است مثل تغییر رنگ کلونی. مثلا کلونی ما پیگمنته بوده رنگ دانه زرد داشته و ناگهان سفید میشود. پس شاهد تغییرات فنوتیپی هستیم. گاهی سوش مورد نظر حساس بوده، پس از بروز موتاسیون در جمعیت موردنظر مقاوم میشود(موتانت مقاوم) اگر در محیط حاوی انتی بیوتیک، این میکروب را کشت دهیم، تعدادی رشد میکنند(که در حالت طبیعی نباید رشد کنند). این تعداد کم (مثلا 10 کلونی) در 100 میلیون موتانت کم است که به وجود اورده است. گاهی باکتری باید به طور طبیعی نسبت به یک فاژ خاص حساس باشد(فاژ ویروس باکتری خوار است. اگر فاژ بر باکتری حساس اثر کند باکتری پس از متلاشی شدن ایجاد پلاک فاژی میکند به عبارتی ایجاد لایه شفاف(translucent)میکند که دیگر مات و کدر نیست). اگر باکتری نسبت به فاژ مقاوم باشد دیگر پلاک فاژی تشکیل نمیشود. باکتریوفاژ معمولا بر روی سلول باکتری دارای رسپتور است. روی ان مینشیند و وارد باکتری میشود و آن را متلاشی میکند. در صورت بروز این نوع از موتاسیون، رسپتور فاژی از بین میرود و دیگر فاژ نمیتواند داخل شود فلذا پلاک فاژی هم تشکیل نمیشود و لایه شفافی نخواهیم داشت و از اینطریق میتوان موتانت بودن یا نبودن را بررسی کرد. برای همه موارد مذکور، کاربرد های تشخیصی و درمانی پیدا شده یعنی صرفا علوم پایه نیست بلکه از هر کدام مثال هایی موجود است و این مهم است که ما دید داشته باشیم و نسخه هایمان به نحوی باشد که بیمار برنگردد یا اگر برگشت، لااقل با مشکل اضافی بر نگردد!!(اونوقت ما چطوری نون بخوریم؟!) [ایجاد مقاومت سوش باکتریایی به علت: عدم تکلیف بیمار -ماندن زیاد در داروخانه -عدم کیفیت ترکیب دارویی] که اینها همه به فیزیولوژی باکتری بر میگردد که از ان جهت اهمیت دارد که ما نیازها و پیچیدگی های باکتری را بشناسیم تا در برخی بیماری ها با ان مبارزه کنیم یا اینکه به عنوان یک دانشمند فراورده و انتی بیوتیکی بسازیم که وقتی وارد بازار میشود در زمینه ایجاد مقاومت یا عدم ایجاد کیفیت مناسب را داشته باشد که در همه این موارد دانش میکروب شناسی به ما کمک میکند.

تست سرطان زایی مواد(Ames test) گرچه کاملا بیان شد ولی دراسلاید کامل بخوانید. تستAMESیکmutational reversion assay است. نکته مهم این است که برای اثبات سرطانزایی مواد لازم است به محیط کشت، حتما عصاره کبد انسان یا حیوان اضافه شود. چون متابولیسم خیلی از مواد سرطان زا در کبد انجام میشود و در کبد است که سرطانزایی افزایش پیدا میکند. ماده جهش زا تغییراتی پیدا میکند و تازه سرطان زاییش اغاز میشود(تحت اثر فعل و انفعالات کبد). بنابراین ترکیباتی مثل آفلاتوکسین که ماده سرطان زایی هست وقتی وارد کبد شود متابولیزه میشود و اثراتش تازه ظاهر میشود.حالا میخواهیم مبحث جدیدی را شروع کنیم که به نظر استاد برای ما جالب است!!!

www.JozveKade.com

❖ حرکت DNA به سلول پذیرنده (movement of the DNA to the recipient cell) (DNA

که اینجا منظور از سلول، باکتری است. باکتری ها به چند طریق جابجایی ژنتیک را بین خود انجام میدهند. باکتری ها همانطور که در مورد استفاده از انرژی و روشن کردن ژن ها هوشمندانه عمل میکردند، این توانایی را نیز دارند که دست به تبدیل ژنتیکی به مقیاس گسترده بین خود بزنند. باکتری ها تولید مثل جنسی(میوز) ندارند. باکتری این توانایی را دارد که انقدر دست به تبادل ژنتیکی بزند گویی اینکه تولید مثل جنسی دارد.

recombination الل ها با هم (مثل ژنتیک مندلی) سبب میشود در برخی باکتری ها فراوانی الل های جدید تا حدی باشد که انگار از قوانین مندل تبعیت میکنند. این موضوع درباره برخی باکتری ها صحیح است(تبادل ژنتیکی بالا) ولی برخی باکتری ها هستند که توانایی تشخیص باکتری خودی از غیر خودی را دارند و بهیچ وجه اجازه ورود داده ژنتیکی از غیر خودی را نمیدهند. اینها، خودی بودن یا نبودن را بر اساس ترادف(sequence)های DNA ای که میخواهند وارد آنها شود میسنجند. این ترادف ها اگر اسم رمز باکتری باشد، یک توالی خاص است که باکتری اجازه ورود را میدهد(خودی) و بالعکس اگر توالی رمز نداشته باشد...برخی دیگر از باکتری ها اصلا خودی و غیر خودی برایشان یکسان است. به طور کلی پوشینه دارند و خود را محفوظ کرده اند و اگر در 5 قاره هم از انها نمونه بگیریم تفاوتی ندارند و دقیقا یکسان اند(recombination بین خودشان ندارند پس تنوع نداریم). پس از لحاظ به اشتراک گذاشتن ژنها تفاوتهایی بین باکتری ها هست.

یک گروه مثل نایسریاها و ریبوزوم ها بسیار غنی هستند(تبادل ژنتیکی بالا). گروهی مثل سالمونلاها تا حدی تبادل ژنتیکی دارند به طوری که سروتیپ هایشان خیلی گوناگون است ولی ژنوتیپ های یکسان دارند یا بروسلاها اینطور هستند که گستردگی و تنوع ژنتیکی بالایی ندارند. تا حدی استاف اورئوس(همان استافیلوکوکوس اورئوس) هم اینطور است. TB(مایکو باکتریوم توبرکلوز سل) هم همینطور است. ولی مثلا نایسریا اینطور نیست و تبادل های ژنتیکی متعددی دارد.(پس در یک تقسیم بندی کلی: باکتری ها←تبادل ازاد یا نسبی(با خودی ها) یا عدم تبادل – تبادل و تنوع ژنتیکی بالا: نایسریا یا ریبوزوم، تبادل کم: سالمونلا یا بروسلا یا TB و تا حدی استافورئوس) حالا سئوال این است که این تبادل چگونه انجام میشود؟

- **conjugation**

این را هم یوغی ترجمه کرده اند که یوغ به معنای دو چیز است که به هم متصل کرده و زمین را با ان شخم میزنند که این، تعبیر غلطی است. چرا که اینها تماس فیزیکی دارند و به هم میچسبند. 1- یا تماس کامل است و دو باکتری به هم مماس میشوند مثل انتروکوک ها ویا 2- به وسیله خار جنسی(sex pili) است مثل E.Coli یا کرپسلا. در باکتری E.Coli دهنده ایجاد خار جنسی میکند که این خار جنسی، به باکتری گیرنده گیر میکند و به ان متصل میشود و باکتری گیرنده را به نوعی جذب خود میکند. پس !dna را از طریق خار به گیرنده میفرستند. این همان conjugation(هم آغوشی) است که دو باکتری به هم وصل میشوند یا از طریق خار جنسی یا از طریق مماس فیزیکی(cell-cell contact)که کاملا به هم میچسبند. هم یوغی از طریق ازاد شدن فراورده های پروتئینی(فرومون های جنسی) است. در واقع فرومون های جنسی که در گیاهان یا پستانداران خوانده ایم، در باکتری ها هم هست. این فرومون ها کوچکتر از فرومون سایر موجودات است و بسیار اختصاصی است. مثلا باکتری میسنجد که پلی پپتید گلیسین باکتری دیگر به او میخورد یا نه؟ اگر تطابق بر قرار بود باکتری به باکتری دیگر جذب میشود. پس فعل و انفعالات شیمیایی انجام میگیرد که غشای بین دو باکتری را در ناحیه تماس حل میکند. مثلا دو باکتری cocci گرم+ وقتی بهم چسبیدند و مماس شدند، ماده ای ازاد میشود که غشای بین دو باکتری را در نقطه تماس حل و سوراخ میکند تا امکان تبادل DNA فراهم شود(استاد در پاسخ یکی از بچه ها فرمودند که این کار با گونه دیگر هم انجام میشود ولی کمتر است). این باکتری ها راحت همدیگر را میشناسند و تعیین میشود که هم یوغی بین کدام دو باکتری انجام گیرد. تا این حد اختصاصی است. یک فرد ژاپنی که

www.JozveKade.com

در این زمینه مطالعاتش را انجام داده است حداقل 10ها نوع فرومون جنسی را شناسایی کرده است و دقیقا مشخص شده که این فرومون ازاد شده از این باکتری باعث conjugation بین این باکتری و باکتری دیگر شده است.

پس از انتقال و تبادل DNA، حالا لازم است دو باکتری از هم جدا شوند. به عبارتی پس از فعل و انفعالات شیمیایی و اتمام تبادل، با ارسال سیگنال هایی دو باکتری از هم جدا میشوند و غشا دوباره بسته میشود. هم یوغی برای باکتری یک مزیت محسوب میشود چرا که اگر در شرایط فشار قرار گیرد ژن مقاومت را از این طریق(هم یوغی) کسب کرده است. مثلا ژن مقاومت به گلیکوزید ها به این شکل بین انتروکوک ها جابجا میشود. مکانیسم هم یوغی بسیار با فراوانی بالاست(فکر میکنم منظور این است که فراوانی هم یوغی در واحد زمان یا سرعت هم یوغی بالاست). کافیست در یک اتاق یک بخش از بیمارستان، یک میکروب مقاومت از مریض باشد. ظرف مدت کوتاهی تمام بخش های بیمارستان آلوده میشود.

در حال حاظر بحث مقاومت نسبت به آسینتوباکتر(Acinetobacter) در بیمارستان ایران حاد و شدید شده بطوریکه باکتری ها انقدر مقاوم شده اند که به هیچ چیز جواب نمیدهند. تا چند سال پیش مشکل بیمارستان سودوموناس بود. الان آسینتوباکتر از سودوموناس هم پیشی گرفته یا مثلا استافیلوکوکوس اورئوس تا 80 درصد نسبت به متیسیلین مقاوم شده است. انتروکوک هاکه در سال 2000 نسبت به ونکومایسین خیلی کم مقاومت بودند، الان بسیار مقاوم شده اند و تعدادشان زیاد شده است.

سوال یکی از بچه ها: چی تعیین میکنه که یک باکتری چه وقت هم یوغی کند؟ بر اساس دوره است یا به محیط وابسته است یا ...؟ استاد: باکتری موجودی اجتماعی است! و با همراهانش تعامل دارد. باکتری دهنده اگر مزیتی داشته باشد حتما به اشتراک میگذارد. از خود موادی ازاد میکند و گیرنده را جذب میکند

[پس وجود مزیت در دهنده و آزاد شدن مواد خاص هم یوغی را تعیین میکند] ادامه سوال دانشجو: یعنی مثلا پس از هم یوغی با یک باکتری، دهنده میتواند بلافاصله باکتری دیگری را دارای ژن کند یا نیاز به طی دوره زمانی مشخصی است؟ استاد: میتواند بلافاصله باکتری دیگر را درگیر کند به شرط اینکه شرایط رشد مناسب و رشد در مرحله exponential باشد و باکتری فعال باشد، میتواند این کار را انجام دهد. ولی اگر دچار رکود باشد این کار را ممکن است با تاخیر انجام دهد. به عبارتی باکتری ها در محیط کشت مرتب با هم در تماس اند. یعنی موبایلشون همیشه انتن میده![من عاشق این جور مثالهام!] حتی اگر یک باکتری دارای ژن مفید باشد تعدادی باکتری دور آن حلقه میزنند و از ان مواد ژنتیکی میگیرند. البته باید ذکر کرد که دهنده ابتدا یک کپی از ژن مفید را ایجاد میکند و انچه انتقال میابد کپی ژن است و باکتری دهنده پس از تبادل هم ژن مفید را دارد از این رو میتواند بارها تبادل انجام دهد. پس انچه انتقال میابد کپی اطلاعات ژنتیکی است. بطور کلی هم یوغی به دو شکل است:

گرم – مثل E.Coli ←از طریق خار جنسی

گرم + مثل انتروکوکوس ←از طریق cell-cell contact←تماس فیزیکی مستقیم و کامل

تمام مطالبی که تا بحال بیان شد مربوط به هم یوغی(1-conjugation)بود. روشهای دیگر انتقال:

- **Transformation**

مثل باکتری عامل ذات الریه که این روش توسط گریفیت کشف شد

www.JozveKade.com

- **Transduction**

در این روش انتقال از طریق فاژها صورت می گیرد به این ترتیب که فاژها وارد سلول باکتری میشوند، سیستم پروتئین سازی درون سلول را بکار میگیرند تا برایشان فراورده های فاژی بسازد مثل سر و دم و نوکلئیک اسید. سپس این مواد را داخل سر بسته بندی میکنند.

پس از جفت و مونتاژ(assembly)شدن، پیکر یک فاژ کامل(phase particle) شکل میگیرد. گاهی اشتباه پیش میاید و بجای اینکه DNA ویروس در سر بسته بندی شود، قسمتی از DNA باکتری که تجزیه شده داخل سر قرار میگیرد. پس سر بجای اینکه مغز فاژ باشد قطعه ای از ژنوم باکتری است. بجای اینکه درونش ژنوم ویروس باشد قطعه کوچکی از ژنوم باکتری را در خود جای داده است. این فاژ همچنان قدرت عفونت زایی دارد به عبارتی هنوز میتواند در سطح رسپتور باکتری قرار گیرد و DNA خود را به درون سلول باکتری تزریق کند ولی در اینجا بجای اینکه DNA خودش را تزریق کند DNA باکتری قبلی را تزریق میکند. به این طریق فاژ DNA را از یک باکتری به باکتری دیگر منتقل میکند.

transductionها انواع مختلف دارند. انچه دربالا گفته شد general Transduction نام دارد. گاهی اوقات فاژ روی DNA باکتری مینشیند بلند که شد قطعه ای از DNA باکتری را با خود میکند و وارد خودش میکند[مرجع: فاژ].

این DNA کوچک است، نه بزرگ. بسته بندی در صورتی انجام میپذیرد که DNA باکتری کوچک باشد. همین قطعه کوچک DNA را وارد باکتری دیگر میکند و از این طریق انتقال ژن را انجام میدهد.

در پروژه های ژنومی باکتریها، یکی از مسائل مهمی که وجود دارد این است که باکتری مثل استرپتوکوکوس پیوژنز، تمام توالی ژنومیش را میسنجند و از این طریق بررسی میکنند که چند فاژ وارد پیکره ژنوم این باکتری شده است چرا که ورود فاژها داخل کروموزوم باکتری با تغییراتی در باکتری همراه است که گاهی باعث افزایش virulence میکروب(بیماریزایی) میشود یا اینکه صفات میکروب را بطور کلی تغییر میدهد که باعث تغییر نوع میکروب به لحاظ موضعی (تا حدی) میشودکه همه اینها قابل ردیابی است.

وقتی DNA وارد باکتری شد چه اتفاقاتی رخ میدهد؟ همانطور که قبلا گفته شد باکتری خودی را از غیر خودی می شناسد. اگر DNA از باکتری غیر خودی باشد، احتمالا آنزیم های اندونوکلئاز باکتری، این DNA را شناسایی و تجزیه میکند. اما اگر DNA خارجی که وارد پیکره باکتری شده، تجزیه نشد(خودی تلقی شد) چه رخ میدهد؟ باکتری در حین تقسیم به سلول های دختر تقسیم میشود و DNA آن هم در این جریان تقسیم میشود ولی این DNA که وارد شده تقسیم نمیشود پس به مرور رقیق میگردد و از بین میرود.

پس راز بقای این کروموزوم چیست؟ 1) یا اینکه برود روی کروموزوم بنشیند با کروموزوم همانندسازی کند و تقسیم شود و بین سلول ها توزیع گردد 2) یا اینکه خودش دارای واحد همانندسازی مستقل باشد←پلازمید

* **پلازمیدها**

واحد های دارای توانایی همانندسازی اند و انها را به عنوان replicon مستقل میشناسند. پس پلازمید ها میتوانند در سلول باکتری باقی بمانند و معمولا پلازمید تابع نظم باکتری خواهد بود و همانندسازی پلازمید به صورت بی رویه نیست و سیگنال های همانندسازی که برای کروموزوم باکتری هست، به پلازمید هم دقیقا میرسد.(در پاسخ به سوال یکی از بچه ها استاد فرمودند: منشا پلازمید ها خارجی است) پس DNA خارجی یا باید روی کروموزوم میزبان بنشیند یا خودش واحد همانندسازی مستقل داشته باشد در غیر اینصورت از بین خواهد رفت.

www.JozveKade.com

توضیحاتی درباره پلازمید ها: اغلب حلقوی اند و در موارد نادر به صورت خطی است مثل borrelia (عامل lyme disease). اطلاعات ژنتیکی پلازمید برای میزبان لازم نیست و میتواند حذف شود. فقط زمانی که میزبان در شرایط ناگوار قرار گیرد و ژن پلازمید خوب و مفید باشد، حضور پلازمید ضروری خواهد بود. مثل شرایط کشت میکروب در محیط حاوی انتی بیوتیک که اگر پلازمید ژن مقاومت را داشته باشد برای باکتری ضروری و خوب است. تعداد پلازمید ها(copyهای پلازمید) در یک سلول باکتریایی میتواند تا 40 هم برسد حتی تا 100 هم میتواند برسد. پلازمید ها باید با هم سازگاری داشته باشند تا در سلول بمانند(همگی).

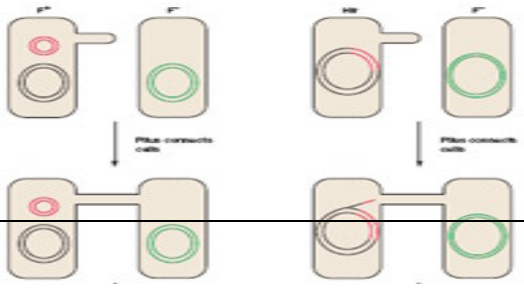
اگر incompatible باشند نمیتوانند درون باکتری بمانند.[نا سازگاری(**incompatibility**): توضیح میدهد که چرا 2 پلازمید شبیه اما متفاوت معمولا در یک سلول دیده نمیشوند. دو پلازمید را که قسمت تنظیمی مشترک داشته باشند(sharing one or more elements of replications system) را ناسازگار گویند.] اندازه پلازمید ها با هم متفاوت است. باکتری هایی که معمولا در پزشکی با انها سروکار داریم پلازمید های خیلی بزرگی ندارند[کمتر از 30 ژن-اندازه پلازمید ها از 1 تا Kbp 2000 میتواند باشد،کروموزوم E.Coli Kbp 4639 است.] گرچه conjugative plasmidهایی که ما در انتروکوک ها میشناسیم ممکن است اندازه شان بالای Kbp 90 باشد. اپیزم یا عامل جنسی یا پلازمید جنسی که از طریق خار جنسی منتقل میگردد نیز دارای اندازه بزرگی است(حدود Kbp 90)

* **تعریف اپیزم در اسلاید:**

پلازمیدی که میتواند بیرون کروموزوم(در پلازمید) یا داخل کروموزوم باشد به عبارتی بین کروموزوم و باکتری جابجا شود. در مورد E.Coli چندین نوع اپیزم مجود دارد که یکی از انها F.Factor (fertility factor) است. باکتری هایی مثل E.Coli که f.factor دارند میتوانند conjugation را انجام دهند. F.factor که نوعی اپیزم است دارای سایز بزرگی است (94/5 bp) و میتواند پروتئین هایی را بسازد که باعث عمل conjugation بین باکتری گیرنده و دهنده شود و از این طریق DNA جابجا شود. اپیزم دارای سایز بزرگی است ولی اغلب کروموزوم هایی که در باکتری ها میشناسیم غیر از اپیزم دارای سایز کوچک هستند. ولی باکتری هایی که در صنعت و کشاورزی مورد استفاده قرار میگیرند ممکن است پلازمید هایی با اندازه بسیار بزرگ (بیش از Kbp 400) هم داشته باشند.

f.factor، insertion sequence هم دارد.(IS نوعی ترانسپوزون با سایز کوچک است). ما علاوه بر F.factor، resistance factor هم میشناسیم(عامل مقاومت نسبت به انتی بیوتیک) که از طریق conjugation و خار جنسی میتواند به سرعت بین سویه های بیمارستانی پخش شود.

الان سه مطلب بیان میشود که همیشه در امتحان ها مورد سوال است ≪1- ایجاد F^+ و F^- : F^+ باکتری است که دارای اپیزم است و میتواند اپیزم را بطور کامل به باکتری F^- منتقل کند. F^- اپیزم ندارد ولی میتواند از طریق Conjugation از F^+ اپیزم بگیرد. پس از اینکه F^+ ژنهای خود را بطور کامل به F^- منتقل کرد، ان را هم F^+ میکند. به عبارتی اگر اپیزم به طور کامل منتقل شود F^- , F^+ خواهد شد. این F^- که حالا F^+ شده، این توانایی را نیز دارد که سایر باکتری های F^- را F^+ کند. در F^+، اپیزم میتواند برود روی کروموزوم بنشیند، قطعه ای از DNA کروموزوم را بکند و تولید F' کند که در یک سرش DNA کروموزوم قرار گرفته است. پس F' از کروموزوم بیرون میاید و میشود پلازمید حلقوی و باکتری F' میتواند مثل باکتری F^+، بقیه باکتری ها را F' کند. پس F' , همان F^+است با این تفاوت که قطعه ای از DNA کروموزوم باکتری به ان متصل شده است.



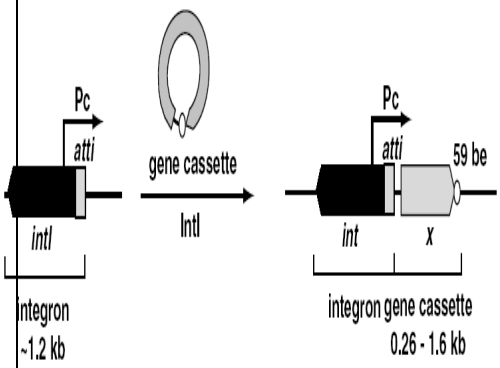
حالت دیگر این است که F برود روی کروموزوم بنشیند. وقتی F روی کروموزوم است هنوز خاصیت conjugative دارد خار جنسی هم دارد. اما یک اشکال دارد و ان این

www.JozveKade.com

که زمان انتقال DNA اپیزم به باکتری گیرنده حد مشخصی دارد که از آن فراتر نمیتواند برود. (dead lineدارد که حد مشخصی است که در این محدوده باید این کار "اتصال" کامل شود). این dead line برای انتقال اپیزم به صورت پلازمید خارج از کروموزوم کافیست و انتقال کامل صورت میگیرد. ولی وقتی روی کروموزوم میرود، روند کار کند میگردد و انتقال کامل صورت نمیگیرد. یعنی conjugative شروع می شود ولی نمیتواند همه DNA را بطور کامل منتقل کند و امر انتقال اپیزم کامل نخواهد شد. اتفاقاتی که رخ میدهد: DNA که از کروموزوم بلند میشود قسمتی از DNA کروموزوم باکتری گیرنده را کنده و conjugation در حال انجام است. DNA با سرعتی به سلول گیرنده منتقل میشود. فرایند کامل میشود و قطع میگردد. باکتری دهنده، HFR نام دارد(high frequency recombination). وجود لفظ recombination به این علت است که باکتری قطعه ای از DNA میزبان را گرفته اما دیگر F^+ نخواهد شد و توان انتقال این DNA را به باکتری دیگر نخواهد داشت. پس در این حالت باکتری دهنده DNA را بطور کامل دارد و میتواند conjugation را انجام دهد ولی باکتری گیرنده اطلاعات لازم برای conjugation را نخواهد داشت. بنابر این باکتری دهنده(میزبان) مرتب طی عمل conjugation، قطعه ای از DNA را منتقل میکند در جمعیت (دلیل انتخاب واژه high frequencyهمین است) اما باکتری گیرنده F^- خواهد ماند در عین حال که قطعه ای از DNA را گرفته است.

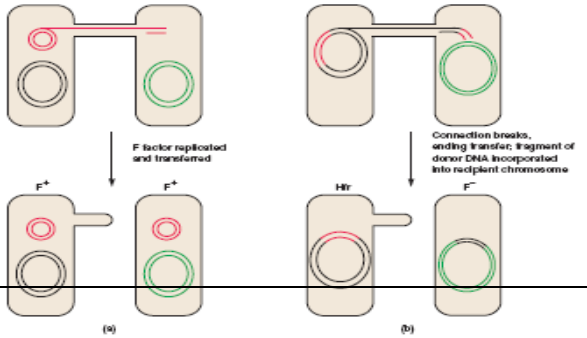
از این، در مهندسی ژنتیک استفاده های بهتر از این برای انتقال ژنها استفاده میشود. خیلی وقت ها لازم است در یک میزبان خاص ژنی را مطالعه کنیم که به هیچ طریقی منتقل نمیشود الا اپیزم های جنسی یا ژن هایی که در conjugation درگیر میشوند(حدود 27-25 پروتئین را شناسایی کرده اند که fecundation(لقاح) انجام میدهند[f.factorاند] یا درگیر این conjugation اند). این مکانیسمی پیچیده ولی فعال و مهم در باکتری ها است.(استاد فرمودند مطالب اسلاید را بخوانید در امتحان میاید)

مرور اسلاید51 توسط استاد: 1- ارتباط دو باکتری از طریق خار جنسی برقرار شده و میتواند مواد ژنتیکی خود را جابجا کنند. 2- در اسلاید نحوه تشکیل خار نشان داده شده است خار از باکتری دهنده به گیرنده میاید. دو باکتری بهم متصل میشوند. سوراخ بین دو غشا از بین رفته(منظور این است که دو غشا ادغام شده اند یا بینشان سوراخ حل شده) قطعه ای از پلازمید(قرمز) نشان داده شده و کروموزوم ها دریک باکتری به رنگ سیاه و در دیگری برنگ سبز است. یک شکستگی در رشته ای از DNA بوجود بیایدو مثل نخ قرقره باز میشود و وارد سلول باکتری دیگر میشود. از همین جا پلازمید همانندسازی میکند و کامل میشود میچرخد و دو پلازمید کامل ایجاد میشود.



در حالت **HFR**: پلازمید روی کروموزوم قرار گرفته، بعد خار تشکیل شده. بعد قطعه پلازمید برداشته میشود و وارد سلول باکتری گیرنده میشود ولی در نهایت گیرنده F^- باقی میماند. این HFR است که میتواند مقادیر زیادی از DNA میزبان را منتقل کند.(باید ساختمان insertion sequence را از اسلاید بخوانیم چون در امتحان میاید)

آخرین مبحث integron است: integron تعدادی واحد اسید نوکلئیکی(mRNAهای بدون پروموتوراست یا DNA بدون پروموتور یا نواحی coding بدون پروموتورکه در ژن پراکنده است). منشا آن از mRNA است. به این صورت که mRNA درون سلول بوده. آنزیم ترانس کریپتاز معکوس(reverse transcriptase) باکتری از این DNA ساخته است در نتیجه DNA ساخته شده پروموتور ندارد. روح این DNA پروموتور ان است. پس باید پروموتور را فراهم کنیم تا کار کند. عنصری هست بنام روح بخش به نام آنزیم integrase که روح



www.JozveKade.com

DNA (پروموتور) را برایش فراهم میکند. آنزیم integrase قطعات DNA هایی را که پروموتور ندارند ولی پتانسیل بیان و ترجمه دارند کنار هم جمع و بهم میچسباند بعد انها را به برق وصل و روشن میکند. یعنی کنارشان پروموتور میگذارد(فکر کنم استاد فرمودند پروموتور قطعه ای است از آنزیم integrase یا اینکه روی آنزیم integrase است و integrase آن را میچسباند به سایر DNA.) DNAهای بدون پروموتور را Cassette میگویند. پس آنزیم integrase، cassetteهای ژنی را بر میدارد و بهم میچسباند. چسباندن این قطعات DNA بهم قاعده دارد. در اینجا آنزیم integrase خودی را از غیر خودی شناسایی میکند.

markerای که توسط آنزیم integrase شناسایی میشود 59 base element نام دارد. 59 یا مضربی از 59 باز یا نوکلئوتید دارد که آنزیم integrase آنرا شناسایی میکند و متوجه میشود که این قابلیت را دارد که بیان و ترجمه شود. پس آنزیم integrase، ناحیه 59 base element را شناسایی میکند و انها را به ناحیه attach site میچسباند. سپس این عوامل را با پروموتور روشن میکند. اکنون مشخص شده است که بسیاری از مقاومت های چندگانه یک میکروب(مثال برجسته←کلبسیلا) به دلیل فعالیت کاست های ژنیست و حضور integron. integronخود میتواند روی پلازمید، کروموزوم یا روی transposon باشد.

همه اینها نشانگر این است که سلول بسیار جنب و جوش دارد. مثلا در موارد ژن،همانندسازی باکتری، mRNA ، ترجمه و ... شدت این پویایی و جنب و جوش به حدی است که در باکتری ژن در حال همانندسازی است. هنوز همانندسازی تمام نشده رونویسی صورت میگیرد و قبل از اتمام رونویسی ترجمه اغاز میشود. به همین دلیل است که سرعت تقسیم در برخی باکتری ها خیلی زیاد است(در برخی سرعت کم است).[mobile DNA element را از روی اسلاید ها بخوانید]

در پایان با طرح سوالی مرور میکنیم: فرق پلازمید، ترانس پوزون، اینتگرون، composite transposon و insertion sequence و فاژ چیست؟

**فرق transposon و composite transposon: نوع composite ممکن است علاوه بر ژن ترانسپوزاز، ژن مقاومت هم داشته باشد. درحالی که ترانسپوزون فقط ترانسپوزاز دارد.

**فرق ترانس پوزون با پلازمید: 1)پلازمید دارای واحد همانندسازی مستقل است در حالیکه ترانس پوزون اینگونه نیست(در پی سوالی فرمودند که ترانس پوزون میتواند منشا خودی داشته باشد میتواند از خارج از سلول بیاید) 2)ترانس پوزون ممکن است خودش باعث conjugation هم شود. ما conjugative transposon هم داریم. کما اینکه conjugative plasmid هم داریم.

نکته: یکی از بچه ها پرسیده که اینتگرون ها ذاتا پروموتور ندارند یا بعدا از دست میدن؟ پاسخ: اینتگرون وقتی شکل بگیرد پروموتور خواهد داشت. این کاست ها هستند که پروموتور ندارند.

کاست های ژنی قطعه ای از DNA هستند که promoterless open reading frame هستند یعنی توانایی ساخت قطعه ی پلی پپتید را دارند اما پروموتور ندارند. اینتگرون حاوی آنزیم اینتگراز و پروموتور است که کاست ها به آن متصل می شوند. در مورد کلبسیلا تعداد کاست ها 8 تاست. گاهی ممکن است سوپراینتگرون هم داشته باشیم که ده ها کاست دارند(مثل وبا). در وبا کار کاست ها مشخص نیست.

از اینجا به بعد مطالب اسلایدها ترجمه شده است(از جزوه 86)، می توانید به جای اینها، اسلایدها را بخوانید: جا دارد از زحمات تایپیست محترم آقای دهقانی تشکر شود!

www.JozveKade.com

❖ انواع پلازمید ها: (فکر کردید تموم شد؟ سخت در اشتباهید!!)

- **Episome:**

پلازمیدی است که میتواند با یا بدون درگیر شدن در ساختمان کروموزوم میزبان همچنان در محیط باقی بماند. این پلازمید میتواند روی کروموزوم میزبان قرار بگیرد و موقع خارج شدن یک سری ژنها را هم خارج کند و به این ترتیب به نوترکیبی کمک کند. در مهندسی ژنتیک از اپیزوم برای نقل و انتقال ژنهایی که به راحتی وارد باکتری نمی شوند استفاده میشود.

- **Conjugative plasmid:**

حاوی ژنهایی برای ساختن پیلی است و میتواند کپی هایی از انها را حین هم یوغی به باکتریهای دیگر منتقل کند. در واقع پلازمیدی که بتواند انتقال خود به یک نژاد جدید را میانجیگری کند conjugative و درغیراین صورت non conjugative نامیده میشود. پلازمیدهایی را که هیچ عملکرد مشخصی جز همانندسازی خود ندارند cryptic plasmid مینامند.

- **Fertility factor:**

پلازمیدی با حدود 94.5kbp طول که حاوی ژنهای مسئول اتصالات سلولی و انتقال پلازمید بین نژادهای باکتریایی خاص حین هم یوغی است. دارای tra operon است که حاوی 21 ژن برای کد کردن sex pili است که سلول F^+ (دارای فاکتورF) را به سلول F^- (فاقد فاکتورF) متصل میکنند. فاکتور F دارای قطعات متعددی به نام insertion sequence است. F.factor، اپیزومی است که روی کروموزوم باکتری مینشیند. حال اگر این اپیزوم قطعه ای کروموزوم را همراه خود بکند و به باکتری دیگری منتقل کند به ان F' میگویند. این فاکتور در واقع نوعی اپیزوم است که میتواند چه در داخل و چه در خارج از کروموزوم باکتری وجود داشته باشد.

- **Resistance factor:**

حاوی ژنهایی هستند که آنزیمهایی را کد میکنند که قادر به نابود کردن یا تغییر دادن انتی بیوتیکها(مثل امپیسیلین، کلرامفنیکل و کانامایسین) هستند. بعضی از این Rپلازمید ها تنها شامل یک ژن مقاومت هستند در حالی که برخی تا 8 ژن مقاومت دارند. غالبا ژنهای مقاومت درون یک ترنسپوزون قرار دارند. بنابراین نژاد های باکتریایی قادرند پلازمیدهای چند مقاومتی(multiple resistance plasmids) بسازند.

فاکتورهای مقاومت موجود در ارگانیسمهای موجود در فلور طبیعی انسانها و حیوانات میتوانند به ارگانیسمهای پاتوژن انتقال یابند. شواهدی یافت شده است که این فاکتورهای مقاومت به عنوان نتیجه مستقیم استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها به وجود نیامده اند چرا که افرادی که در نواحی جغرافیایی دور افتاده که در معرض عوامل ضد میکروبی قرار نداشته اند هم فلورهای میکروبی حاوی فاکتور های مقاومت داشته اند. منشا این پلازمید ها احتمالا مواجهه با ضد میکروبهای موجود در محیط طبیعی بوده است. فاکتور های مقاومت مرتبط با پلازمیدها در بسیاری از باکتریها به خوبی مشخص شده اند(یک استثنای قابل ملاحظه ان rickettsia است) از انجایی که بسیاری از فاکتور های مقاومت جزو conjugative plasmidsها هستند میتوانند سریعا در یک جمعیت پراکنده شوند(البته نه به سرعت پراکنده شدن فاکتورهای F) اغلب فاکتورهای مقاومتی که از نوع non conjugative هستند هم در حین هم یوغی هایی که توسط پلازمیدها ممکن شده اند انتقال میابند. پلازمیدهای self-transferable که حاوی ژنهای کد کننده همولیزین،

www.JozveKade.com

باکتریوسین و مقاومت به انتی بیوتیک هستند در باکتری E.Hirae یافت شده. پلازمیدهای conjugative که کد کننده HLG-R، همولیزین و فاکتورهای مقاومت هستند در E.Faecalis یافت شده اند.

- **Col plasmid :**

پلازمیدی است که مسئول ساخت یک سری مواد پلی پپتیک کوچک(باکتروسینها) است که مجال رشد را از باکتریهای رقیب همجنس میگیرند. باکتروسینها این کار را با مکانیسم مختلفی انجام میدهند از جمله تشکیل کانالهایی در غشای پلاسمایی و در نتیجه افزایش نفوذ پذیری ان، از بین بردن DNA یا RNA یا حمله به پپتیدوگلیکینها و در نتیجه تضعیف دیواره سلولی. گلیسین باکتریوسینی است که توسط E.Cal ساخته میشود.

- **پلازمیدهای دیگر:**

* **Virulence plasmid:**

قابلیت بیماریزایی باکتری میزبانش را افزایش میدهد چراکه انرا نسبت به پاسخهای ایمنی میزبان مقاوم میکند و به باکتری قدرت تولید سم میدهد.

* **Metabolic plasmid:**

ژنهایی رامنتقل میکنند که انزیمهایی راکد میکنند که قادرند سوبستراهایی چون ترکیبات اروماتیک(مثل تولوئن) را تجزیه کنند. این پلازمیدها در ریبوزوم یافت میشوند و میتوانند سبب ایجاد گره ها(nodules) و در نتیجه تثبیت نیتروژن شوند.

❖ انواع *transposable elements* در *E.Coli*:

1- Insertion sequence(IS):

کوچکترین transposable sequence است که 800-2500 جفت باز دارد و باکتریهای گرم مثبت، منفی و ارکی باکتر ها یافت میشود و فقط شامل ان دسته ژنهایی است که برای سنتز انزیم ترنسپوزاز ضروری هستند. دو انتهای ان توسط توالی های یکسان یا بسیار مشابهی از نوکلئوتیدها که در جهت مخالف هم قرار دارند(inverted repeat-توالی معکوس) محدود میشوند. تواليهای معکوس از حدود 15-25 جفت باز تشکیل شده اند و بین ISاهای مختلف فرق میکنند. تعداد کپی های IS در یک سویه باکتری مشخص است مثلا 10-6 کپی از IS1 در E.Coli و بیش از 50 کپی از ان در گونه های شیگلا میتوانند وجود داشته باشند. IS ممکن است روی کروموزوم، پلازمید یا باکتریوفاژ باشد.

Composite transposon: این ترنسپوزون ها علاوه بر ژنهای لازم برای transposition میتوانند ژنهای دیگری چون ژنهای مقاومت راهم داشته باشند. انها معمولا دارای یک ناحیه مرکزی از ژنهای اضافی و ژن مربوط به transpositionهستند که در دو طرف توسط ISاهای مشابه محدود شده است.

Conjugative transposition: این فرایند نخستین بار در سویه های بدون پلازمید Enterococcus hirae مشاهده شد. قطعات این چنینی توسط فرایند cell-cell contact جابجا میشوند. این قطعات میتوانند از کروموزوم جدا شوند، فرم واسط حلقوی ایجاد کنند و از طریق conjugation به باکتری دیگر منتقل شوند، E.Hirae دارای توالی Tn916(18kb) است که حاوی المان مقاومت به تتراسایکلین نیز میباشد. این توالی میانجی فرایند انتقال ترانسپوزون به باکتری هم نوع دیگر(enterococci)است.

www.JozveKade.com

اینتگرون ها را بر اساس نوع اینتگرازشان گروه بندی می کنند که تاکنون 8 گروه متفاوت از آنها شناسایی شده که گروه های 1و2و3 در ارتباط با کاست های مقاومت چند دارویی(multi drug resistant cassette) هستند.

اینتگراز موجب ترکیب جایگاه اتصال خودش(attI) با جایگاه اتصال کاست(attC) یا همان 59 base element می شود. جایگاه اتصال کاستattC معمولا به یک ژن ORF(open reading frame) که کارکرد سازش(adaptive function) را بیان می کند متصل است. به ساختار ORF-attC یک کاست ژنی می گویند.(یک کاست ژنی از جایگاه اتصال (attC)و بخشی که می تواند پلی پپتید بسازد(ORF) تشکیل شده است.) ترکیب دو جایگاه اتصال اینتگراز و کاست(attI & attC) منجر به قرارگیری کاست ژنی در پایین دستِ (downstream) پروموتوری که در داخل اینتگرون قراردارد می شود که در نتیجه محصول بیان می شود.

- **کاست ها:**

در میان دو بخش حفاظت شده(conserved)، قسمت متغیر وجود دارد که می تواند بین 0 تا 8 کاست داشته باشد.

گسترش ژن های مقاومت وقتی که آنها بخشی از یک کاست ژنی متحرک باشند، بسیار بیشتر است.

حضور اینگرون ها در Klebsiella pneumonia isolates می تواند دلیل مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی(multiple antibiotic resistance) آنها باشد.

بیش از 70 ژن مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های متفاوت که بیشتر داروهای ضدمیکروب در حال استفاده را پوشش می‌دهد در ساختار کاست های ژنی حضور دارند.

اینتگرون ها می توانند گاهی در عناصر متحرک DNA مثل ترنسپوزون یا پلازمید های conjugative قرار داشته باشند که این عناصر نقش حامل درون گونه ای ویا بین گونه ای آنها را دارند و ژنهای مقاومتی را که توسط اینتگرون ها به هم پیوسته اند(amassed by integrons) را انتقال می دهند.

❖ *Transformation:*

انتقال یک قطعه عریان DNA از محیط به درون سلول و ورود این قطعه DNA به کروموزوم به گونه ای که قابل به ارث رسیدن باشد. مثلا وقتی یک باکتری میمیرد DNAی ان در محیط رها میشود. دراینصورت باکتریهای زنده میتوانند DNA را از محیط جذب کنند. شایان ذکر است برخی باکتری ها هر DNAای را جذب نمیکنند بطور اختصاصی برخی DNAهای موجود در محیط را انتخاب میکنند. هر چند برخی دیگر از باکتریها انواع DNAهای محیط را جذب میکنند. DNA خود باکتری را Endogenous DNA گویند. این DNA خارجی مانند هر DNAی exogen دیگری ممکن است یکی از سه سرنوشت زیر را پیدا کنند:

1-توسط سیستم اندونوکلئازی باکتری به عنوان عامل بیگانه تلقی شده و تجزیه شود.

2-باکتری انرا بیگانه تلقی نکند و اجازه بدهد در محیط سلول باقی بماند اما وارد کروموزوم میزبان نمیشود و با روشهایی مثل متیلاسیون نوکلئوتیدها به سیستم انودونوکلئازی مقاومت پیدا کند. اما به هر حال برای اینکه به تدریج در جمعیت باکتریایی حذف نشود باید منشا همانندسازی پیدا کند

www.JozveKade.com

یعنی OPR(origin of replication) داشته باشد و بتواند به عنوان یک replicon مستقل عمل کند(replicon حلقه های DNA است که اطلاعات ژنتیکی لازم برای تکثیر خود را دارند). به عبارتی باید به یک پلازمید تبدیل شود.

3-در ترانسفورماسیون طبیعی DNA از یک باکتری دهنده به دست میاید. در این حالت DNA وارد کروموزوم باکتری میشود. در این حالت DNAپایدار است و از بین نمیرود.

توجه: باکتری میتواند اهداف مختلقی را از ایجاد ترانسفورماسیون را در نظر داشته باشند مثل بدست اوردن ژنی خاص.

ترانسفورماسیون طبیعی در باکتریهای زیر مشاهده شده است:

Acinetobacter,moroxella,Neisseria,haemophilus,yhermoactinomyces,bacillus,streptococcus, pseudomonas,azotobacter

این فرایند بصورت رندوم اتفاق نمیافتد. هر قسمتی از ژنوم ممکن است بین باکتریها منتقل شود.

برای انجام transformation باکتری گیرنده باید competency یا شایستگی جذب DNA از محیط را داشتته باشد. گونه های یکسان بطور طبیعی competentهای نیرومندی هستند، یعنی باکتریها بیشتر تمایل به جذب DNA گونه های یکسان با خودشان را دارند. فرکانس ترانفورماسیون در سلول های دارای شایستگی بالا(وقتی DNA در محیط فراوان داشته باشد) حدود 10^{-3} است. competency، یک پدیده پیچیده است که به شرایط مختلفی وابسته است. باکتری دارای این خصوصیت، competency factor را ترشح میکند که تولید 10-8 پروتئین جدید که برای ترانسفورماسیون ضروری هستند را تحریک میکند. هموفیلوس انفولانزا از جمله باکتریهای مستعد است که میتواند DNA را از گونه های نزدیک نیز برداشت کند. برای ترانسفورماسیون، DNA بیگانه باید توالی '5'AAGTGCGGTCA3 را داشته باشد. این توالی حدود 600 بار در ژنوم هموفیلوس انفلانزا تکرار شده است. بنابراین برخی باکتریها DNAای را جذب نمیکنند و اختصاصی عمل میکنند. اما برخی دیگر غیر اختصاصی عمل میکنند و هر DNAای را وارد خود میکنند.

باکتریها برای مستعد شدن باید در مرحله خاصی از رشد باشند. بطور مثال streptococcus pneumonia در فاز تصاعدی رشد، وقتی جمعیت به حدود 10^{7} تا 10^{8} سلول در هر میلی لیتر میرسد مستعد میشود. توالی آمینواسیدی استنباط شده از(deduced of) پروتئین ComA از استرپتوکوکوس پنومونیا بسیار مشابه پروتئین همولیزین(HylB) از E.Coli و پروتئین انتقال دهنده وابسته با ATP در بسیاری از گونه های باکتریایی دیگر است. بنابراین احتنالا ComA انتقال pneumococcal competence factor در عرض غشای سیتوپلاسمی را بر عهده دارد.

❖ Transduction:

عبارت است از انتقال ژنهای باکتریایی توسط ویروس ها. مکانیسم این فرایند از این قرار است که طی چرخه زندگی ویروسی، ژنهای باکتریایی به اشتباه وارد کپسید فاژ میشوند و ویروس حاوی این ژنها سرانجام انها را به باکتری دیگری تزریق میکند. transduction رایجترین روش در مبادله ژن و نوترکیبی در باکتریهاست. برای مثال استرپتوکوکها در گذشته عامل مخملک بودند اما امروزه به علت جابجایی ژنتیکی توسط فاژ ها تظاهرات جدیدی از عفونت استرپتوکوکها بوجود امده است. همانند گلودرد و ایجاد چرک و درماتیسم چرکی.

www.JozveKade.com

- **انواع transduction**

1).general T

2).specialized T

* **General T.:**

حین چرخه لیتیک فاژهای بیماریزا و معتدل رخ میدهد و میتواند هر قسمتی از ژنوم باکتریایی انتقال دهد. علت ان اینست که DNA سلول پس از الودگی با فاژ قطعه قطعه شده و قطعاتی از DNA سلول که به اندازه DNA ویروس هستند هنگام مونتاژ قطعات ویروس در داخل ذرات ویروس قرار میگیرند. از انجایی که کپسید میتواند مقدار محدودی DNA را در خود نگه دارد مقداری یا همه DNA ویروسی

جا میماند. مقدارDNA باکتریایی منتقل شده بستگی به سایز کپسید دارد. مثلا فاژ P22 از سالمونلا تیفی موریوم معمولا حدود یک درصد از ژنوم باکتریایی را منتقل میکند در حالی که فاژ P1 از E.Coli 2.5-2 درصد از ژنوم را برداشت میکند. ذره ویروسی حاصله غالبا DNA را به سلول باکتریایی دیگری منتقل میکند ولی یک چرخه لیتیک را اغاز نمیکند چون قسمتی یا همه ژنوم ویروس خارج شده است.

DNA تزریق شده باید در کروموزوم سلول گیرنده داخل شود تا ژنهای انتقال یافته DNA حین جابجایی دو رشته ای باقی میماند و هر دو رشته در ژنوم باکتری میزبان داخل میشود. DNA در زمان انتقال دورشته ای می ماند و هر دو رشته با کروموزوم میزبان ادغام می شوند. حدود 70 تا 90% DNA منتقل شده ادغام نمی شود اما قادر به بقا و بیان خود است.

* **Abortive transduction:**

باکتریهایی که حاوی DNA میباشند که از طریق transduction وارد سلول شده ولی درون کروموزوم آنها قرار ندارد و همین علت بطور جزیی دیپلویید به نظر میاید.(partial diploid)

* **Specialized T.:**

یا restricted T. حالتی است که درآن قطعه جابجا شده فقط بخشهای خاصی از ژنوم باکتریایی را حمل میکند. این وضعیت در اثر اشتباهی در چرخه زندگی لیزوژنی فاژ اتفاق میافتد و زمانی رخ میدهد که DNA ویروس که به داخل DNA باکتری وارد شده است از ان جدا شده و قسمتی از DNA مجاور حود را نیز منتقل نماید. از انجا که اغلب فاژهای لیزوژنیک در نواحی به خصوصی از DNAباکتری جای میگیرند، ژنهای سلولی مجاور انها نیز که انتقال میابند معمولا به همان ویروس اختصاص دارند. بنابراین ژنوم فاژ حاصله کسری از کروموزوم باکتری (حدود 10-5%) را با خود جابجا میکند. مثال بارز این نوع transduction، فاژ لامبدا است که ژنوم خود را در جایگاه خاصی از کروموزوم میزبان که به عنوان attachment site یا att site شناخته میشود وارد میکند. هم فاژ و هم باکتری دارای att site هایی هستند که مشابه هم هستند ولی یکسان نیستند و میتوانند با هم مکمل شوند. در E.Coli، att site برای فاژ لامبدا مجاور ژنهای bio وgal قرار دارد. بنابراین ژن حاصله از specialized T. حاوی این ژنهای باکتریایی خواهد بود.

HFT lysate و LFT lysate:

lysate یا محصولات حاصل از لیز سلولی از فاژ نرمال و تعدادی ذره جابجا شونده ی ناقص تشکیل شده است.

www.JozveKade.com

LFT lysates

- Normal phage has a complete att site
- Defective transduction particles (LFT) have a nonfunctional hybrid integration site that is part of bacterial and part phage in origin.
- Integration of the defective phage chromosome does not readily take place.
- Transducing phages also may have lost some genes essential for reproduction
- LFT lysate and those produced by generalized transduction have one transducing particle in 10^5- or 10^6 phages

Low-frequency transduction lysates (LFT lysates)

- lysate, or products of cell lysis, resulting from the induction of lysogenized E. coli contains normal phage and a few defective transducing particles.
- These particle are called lambda dgal, because they carry the galactose utilization genes. Because these lysates contain only a few transducing particles, they are often called low-frequency transduction lysates (LFT lysates)

HFT lysate

- Defective lambda phages carrying the gal genes can integrate if there is a normal lambda phage in the same cell.
- The normal phage will integrate, yielding two bacterial/phage hybrid att site where the defective lambda dgal phage can insert.
- It also supplies the genes missing in the defective phage.
- The normal phage in these instance is termed the helper phage because it aids integration and reproduction of the defective phage.
- HFT lysates contain transducing particles with a frequency of about 0.1 to 0.5

HFT lysate

- These transductants are unstable because the prophages can be induced to excise by agents such as UV radiation. Excision, however, produces a lysate containing a fairly equal mixture of defective lambda deal phage and normal helper phage. Because it is very effective in transduction, the lysate is called high-frequency transduction lysate (HFT lysate). Re-infection of the bacteria with these mixture will result in the generation of considerably more transductants

... اگر خواستی و نتوانستی، معذوری...اما اگر امروز توانستی و نخواستی نگران روزی باش که بخواهی و نتوانی...

* اصلاحیه جزوه شماره 2:

دوستان سه خط آخر صفحه 10 جزوه 2، تعریف لیپد A می باشد نه lps .

www.JozveKade.com