حدیث احمدیان، ۴۰۰۲۱۱۵۲۴

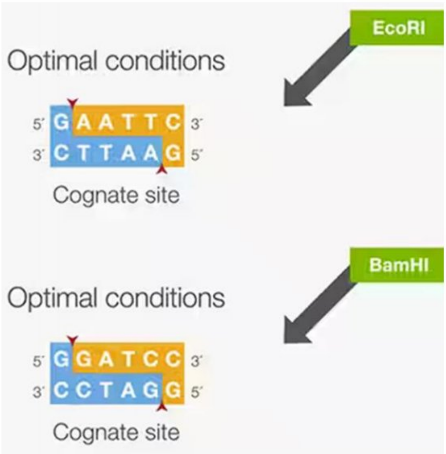
الف)

Traditional cloning

در این روش ابتدا تمپلیت مورد نظر که اصولا یک ژن است و میخواهیم آن را کلون کنیم را با استفاده از PCR امپلیفای میکنیم.

با استفاده از restriction anzyme ها DNA هدف و تمپلیت های خودمان را از نقاط مشخص میبریم به طوری که در دو انتهای برش ها restriction site های مشخص قرار بگیرند. این عمل باعث میشود دو انتهای بریده شده ی تمپلیت ما و DNA هدف مکمل یکدیگر باشند و در واقع بتوانند مانند پازل با هم جفت شوند.

عملکرد دو restriction enzyme نمونه :



سپس تمپلیت و هدف را با استفاده از DNA ligase به یکدیگر متصل میکنیم. در واقع کارکرد این آنزیم این است که واکنش اتصال رشته های DNA را سرعت میبخشد.

سپس DNA به دست آمده درون سلول (اصولا باکتری) مورد نظر قرار داده میشود و این باکتری تغییر یافته در ظروف کشت قرار میگیرد تا رشد کند و تکثیر شود.

ب)

روش توضیح داده شده در بالا از restriction enzyme ها استفاده میکند بنابراین ما باید با بررسی رشته های هدف و تمپلیت خود و انجام جستجو و در نظر گرفتن قیود زیادی بررسی کنیم دقیقا از کدام آنزیم بهتر است استفاده شود و کجای رشته ها باید بریده شود و restriction site ها دقیقا چه باشند (مثلا نیاییم از جایی رشته را ببریم که خودش ژن بوده است و ترجمه میشده است یا بدون اینکه نیاز داشته باشیم به جای یک محل، از چندین جا رشته بریده شود و ...) و همیشه هم این جستجو به نتیجه ی مطلوب نمیرسد.

سایر روش های cloning

Ligation Independent Cloning (LIC)

Seamless Cloning (SC)

Recombinational Cloning

TA Cloning

توضیح درمورد seamless cloning :

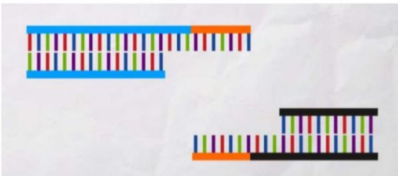
متدی برای کلون کردن DNA است که هدف اصلی آن انجام کلونینگ بدون استفاده از restriction enzyme هاست و روش های زیادی بر بیس این متد هستند که کیت هایی دارند که میتوان خریداری کرد و از آن ها استفاده کرد. تمام روش هایی که بر بیس متد seamless cloning هستند دارای قدم ها و ایده های اصلی زیر هستند :

ابتدا هدف و تمپلیت با PCR امپلفای میشود با این تفاوت که در این مرحله به انتهای هردو یک sequence کوتاه یکسانی اضافه میشود که در حدود 15bp طول دارد.

با استفاده از آنزیم هایی به نام Exonuclease ها بخشی از انتهای هر دو هدف و تمپلیت بریده میشود (یک رشته از دو رشته ای DNA بریده میشود). به این عمل به اصطلاح chew back گفته میشود.

این باعث میشود مشابه قسمت قبل انتهای تمپلت و هدف ما با هم جفت شوند و توانایی اتصال به یکدیگر را داشته باشند.

برای مثال در تصویر زیر قطعات نارنجی رنگ در pcr اضافه شده اند وسپس رشته ی مقابل آن ها توسط exonuclease ها chew back شده که به شکل زیر رسیدیم و هدف و تمپلیت میتوانند با هم جفت شوند.



■ $A + E \xrightarrow{K} B + E$ ⓐ $\rightsquigarrow x' = C_0 x \rightsquigarrow x = C_1 e^{C_0 t}$

$dA/dt = -KAE \rightsquigarrow$ طبق ⊛ و ⓐ $: A_0 e^{-KEt} = A(t)$

$dE/dt = 0 \rightarrow E =$ عدد ثابت ⊛

$dB/dt = KAE \rightsquigarrow$ طبق ⊛ و ⓐ $: B(t) = B_0 e^{KEt}$

■ $3A \xrightarrow{K} B$

$dA/dt = -3KA^3$ (1)

$dB/dt = 3KA^3$ (2)

$(1) \longrightarrow \dfrac{dA/dt}{A^3} = -3K \longrightarrow \displaystyle\int \frac{dA/dt}{A^3}\, dt = \int -3K\, dt$

$\longrightarrow \displaystyle\int \frac{dA}{A^3} = \int -3K\, dt \rightsquigarrow \frac{-1}{2A^2} = -3Kt + C_0$

$\rightsquigarrow 1 = 2A^2 \times (3Kt + C_1) \rightarrow A^2 = \dfrac{1}{6Kt + A_0} \rightsquigarrow$

$A(t) = \pm \dfrac{1}{\sqrt{6Kt + A_0}}$ (در هر مرحله ما به ثابت‌ها ساده شدند)

(2) $\cancel{dB/dt}$ $\underbrace{\displaystyle\int \frac{dB}{dt}\, dt}_{B(t)} = \int 3K A(t)^3\, dt =$

$= \pm (3K) \underbrace{\displaystyle\int A(t)\, dt}$ $+ B_0$

$\displaystyle\int \left(\frac{1}{\sqrt{6Kt + A_0}}\right)^3 dt = \int \frac{1}{(6Kt + A_0)^{3/2}}\, dt$

$$\xrightarrow[du = ۶K\,dt]{u = ۶Kt + A_0} = \int \frac{1}{u^{۳/۲}}\, du * \frac{1}{۶K} = \frac{-۲}{u^{۱/۲}} * \frac{1}{۶K} = \frac{-۱}{۳K\sqrt{u}}$$

$$\rightarrow dt = du/۶K$$

$$= \frac{-۱}{۳K\sqrt{۶Kt + A_0}}$$

$$\Rightarrow B(t) = \pm ۳K \times \frac{-۱}{۳K\sqrt{۶Kt + A_0}} + B_0 =$$

$$\frac{\pm ۱}{\sqrt{۶Kt + A_0}} + B_0$$

(دقت که انتشار B با همان نرخ تولید می‌شود که A مصرف می‌شود.)

همچنین چون A باید مصرف شود و B تولید، نرخ A منفی خواهد بود (از بین حالت ±) و نرخ B مثبت.

$$۳A + ۴B \underset{K_۲}{\overset{K_۱}{\rightleftharpoons}} C + D \xrightarrow{K_۳} E + A$$

$$\frac{dA}{dt} = -۳K_۱A^۳ * ۲K_۱B^۲ + K_۲CD + K_۳CD$$

$$\frac{dB}{dt} = -۳K_۱A^۳ * ۴K_۱B^۲ + K_۲CD$$

$$dC/dt = ۳K_۱A^۳ * ۲K_۱B^۲ - K_۲CD - K_۳CD$$

$$dD/dt = \quad '' \qquad '' \qquad ''$$

$$dE/dt = K_۳CD$$

Question THREE

$$X + S_x \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} x^* \quad (1)$$
$$x^* + D_0 \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} D_1 \quad (2)$$
$$D_1 + P + [Y_i] \xrightarrow[k_5]{} D_1 + P + Y$$

معادلات

در حالت عادی

$$\frac{dX}{dt} = -k_1 X S_x + k_2 x^* = dS_x/dt$$

$$\frac{dx^*}{dt} = -k_3 x^* D_0 + k_4 D_1 + k_1 X S_x - k_2 x^*$$

$$\frac{dD_0}{dt} = \frac{dx^*}{dt}$$

$$\frac{dD_1}{dt} = k_3 x^* D_0 - k_4 D_1 + 0$$

$$= -k_5 D_1 P [Y_i] = \frac{d[Y_i]}{dt}$$

$$dP/dt = 0 \longrightarrow P = \text{عدد ثابت}$$

$$dY/dt = k_5 D_1 P [Y_i] \leftarrow$$ نرخ تولید پروتئین

فرض:

ساده‌سازی 1, 2

با 1 و 2

$$dx^*/dt = 0$$

$$dD_1/dt = 0 \longrightarrow D_1 = \text{عدد ثابت}$$

$$\hookrightarrow k_3 x^* D_0 - k_4 D_1 = 0$$

$$\text{(Quasi S-S)} \longrightarrow D_1 = \frac{k_3}{k_4} x^* D_0$$

$$\frac{dx^*}{dt} = 0 \Rightarrow -k_3 x^* D_0 + \cancel{k_4} \times \frac{k_3}{\cancel{k_4}} x^* D_0 + k_1 X S_x - k_2 x^* = 0 \longrightarrow$$

$$x^* = \frac{k_1}{k_2} X S_x$$

در سیستم معادلات حالت Quasi S-S

Question Four

الف

$Mr \rightarrow$ mrna

$Y \rightarrow$ protein

$$\frac{dMr}{dt} = \boxed{\underbrace{\beta m}_{\text{تولید}} - \underbrace{\alpha m\, Mr}_{\text{degraded}}} \quad \text{(III)}$$

$$\frac{dy}{dt} = \boxed{P\, Mr - \alpha Y} \quad \text{(I)}$$

تولید مثال

مثل

degrade شده

$\boxed{\text{ب}}$ $\dfrac{dM_r}{dt} = B_m - \alpha_m M_r \longrightarrow$

$$M_r(t) = M_{r\_max}\left(1 - e^{-\alpha_m t}\right)$$

$$\xrightarrow[\text{time ?}]{\text{response}} m_{r\_max}\left(1 - e^{-\alpha_m t}\right) = \tfrac{1}{2} M_{r\_max}$$

$$\longrightarrow e^{-\alpha_m t} = \tfrac{1}{2} \rightsquigarrow \boxed{t_{\substack{mrna\\ response}} = \frac{\text{Log}\, 2}{\alpha_m}}$$

به شکل مشابه بالا response time پروتئین داریم:

$$\boxed{t_{y\text{-response}} = \log 2 / \alpha}$$

فرض ⇐ $\alpha_m \gg \alpha \rightarrow \boxed{\log(2)/\alpha_m \ll \log(2)/\alpha}$ ⊛

فرض Quasi SS نوسان یعنی ... ⟶ تقریباً می‌توان ... در نظر گرفت که : $\boxed{dM_r/dt = 0}$ II

در مقایسه با $M_r(t)$ و $y(t)$

II و III ط $\longrightarrow \underbrace{M_r'(t)}_{0} = B_m - \alpha_m M_r(t)$

$\longrightarrow \dot{M}_r(t) = B_m / \alpha_m$ IV

IV و I ط $\longrightarrow dY/dt = P\left(\dfrac{B_m}{\alpha_m}\right) - \alpha Y$

$\longrightarrow \beta = \dfrac{B_m}{\alpha_m} \times P$

Question Five

$$\left(\frac{x}{k}\right)^n \gg 1 \longrightarrow \frac{dx}{dt} = \frac{B}{(x/k)^n} - \alpha X = \frac{Bk^n}{X^n} - \alpha X$$

$$\xrightarrow[\text{در } x^n]{\text{ضرب دو طرف}} \frac{dX\, X^n}{dt} = Bk^n - \alpha X X^n \xrightarrow[du = (n+1)X^n\, dx]{u = X^{n+1}}$$

$$\frac{du}{dt} = (n+1)\left[Bk^n - \alpha u\right] \xrightarrow[\text{نسبت به } u \text{ ثابت}]{\text{تمام مقادیر}}$$

($u' = B - \alpha u$ مثل)

$$u' = \left[(n+1)Bk^n\right] - \left[\alpha(n+1)\right]u$$

$$\Rightarrow u = u_m\left(1 - e^{-(n+1)\alpha t}\right) \xrightarrow{u = x^{n+1}}$$

$$X = X_m\left(1 - e^{-(n+1)\alpha t}\right)^{[1/(n+1)]}$$

$$\xrightarrow[\text{time ?}]{\text{response}} X_m\left(1 - e^{-(n+1)\alpha t}\right)^{\left[\frac{1}{(n+1)}\right]} = \tfrac{1}{2} X_m$$

$$\rightsquigarrow \left(1 - e^{-(n+1)\alpha t}\right)^{\frac{1}{n+1}} = 1/2 \longrightarrow$$

$$1 - e^{-(n+1)\alpha t} = \frac{1}{2^{n+1}} \longrightarrow e^{-(n+1)\alpha t} = \frac{2^{n+1} - 1}{2^{n+1}}$$

$$\longrightarrow \boxed{t_{\substack{res\\auto}} = \frac{1}{(n+1)\alpha} \log\left(\frac{2^{n+1}}{2^{n+1} - 1}\right)}$$

طبق سوال 4 حالت

$$dx/dt = B - \alpha x$$

$$\boxed{t_{\substack{res\\Simple}} = \frac{\log 2}{\alpha}}$$ [illegible]

$n = 1$: $t_{\substack{res\\auto}} = \frac{1}{2\alpha} \log\left(\frac{4}{3}\right) \simeq 0.1\ldots$

$\frac{t_{res\text{-}auto}}{t_{res\text{-}Simple}} = \frac{\log 4/3}{2 \times \log 2} \simeq 0.2$

$n = 2$: $\frac{1}{3\alpha} \log\left(\frac{8}{7}\right) \rightarrow \frac{\log \frac{8}{7}}{3 \log 2}$

$n = 3$: $\frac{1}{4\alpha} \log \frac{16}{15} \rightarrow \frac{\log 16/15}{4 \log 2}$

$n = 4$: $\frac{1}{5\alpha} \log \frac{32}{31} \simeq 0.02$

$\rightsquigarrow \frac{\log 32/31}{5 \log 2} \simeq 0.009$

$$\rightarrow \frac{t_{res\_auto}}{t_{res\_simple}} \begin{cases} n=1 \Rightarrow 0/2 \\ n=2 \Rightarrow 0/06 \\ n=3 \Rightarrow 0/02 \\ n=4 \Rightarrow 0/009 \end{cases}$$

با افزایش n ، نسبت response time حالت NA نسبت به حالت ساده کمتر می‌شود. یعنی سریع‌تر پاسخ می‌دهد.

Question SIX

[illegible] تعادل

(*)

(الف)

$$E + S \underset{K_m}{\rightleftharpoons} ES \xrightarrow{K} EP$$

$$+$$

$$I$$

$$\Big\Updownarrow K_I$$

$$EI$$

(*) $\boxed{K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}}$ (1) $\longrightarrow$ $[ES] = \frac{[E][S]}{K_m}$ (1')

$\Rightarrow$ $\boxed{K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}}$ (*) (2) $\longrightarrow$ $[EI] = \frac{[E][I]}{K_I}$ (2')

we know $\longrightarrow$ $[E]_{tot} = [E] + [ES] + [EI]$ $\xrightarrow[(2')\text{و}]{(1')\text{از}}$

$$[E]_{tot} = [E] + \frac{[E][S]}{K_m} + \frac{[E][S]}{K_I} \longrightarrow [E]_{tot} = [E]\left(1 + \frac{[S]}{K_m} + I/K_I\right)$$

$$\Rightarrow [E] = [E]_{tot} \Big/ \left(1 + \frac{[S]}{K_m} + \frac{[I]}{K_I}\right) \quad (I)$$

$$\alpha = 1 + \frac{I}{K_I}$$

(I) از و (1') $\Big\}$ $[ES] = \dfrac{[E]_{tot}[S]}{K_m\left(1 + \frac{[S]}{K_m} + \frac{[I]}{K_I}\right)}$

rate of reaction $ES \rightarrow E + P$ $\Big\}$ $v = K \cdot [ES] = \dfrac{\overbrace{K[E]_{tot}}^{V_{max}}[S]}{K_m + [S] + \frac{K_m[I]}{K_I}} = \boxed{\dfrac{V_{max}[S]}{K_m\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]}}$

$v = \frac{v_{max} S}{K_m + S}$ = حالت عادی ← مقایسه

می‌توان دید مستقیماً به دلیل وجود inhibitor سرعت کاهش می‌یابد (ضریب یک term مشترک در K_m و ارزش نشان مخرج)

بعدی قابل تصور این هست که کاهش سرعت نهایی به دلیل ضرب ضریب در K_m است

$$E + S \rightleftharpoons ES \xrightarrow{k} E + P \qquad v = k[ES] \ (*)$$

$$ES + I \underset{K_I}{\rightleftharpoons} ESI$$

$$K_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \longrightarrow [ESI] = \frac{[ES][I]}{K_I} \quad (a)$$

ب

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} \longrightarrow [ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \quad (b)$$

we know :

$$[E]_{tot} = [E] + [ES] + [ESI] \xrightarrow[(b)]{(a),\ ط} [E]_{tot} = [E] + \frac{[E][S]}{K_m} + \frac{[ES][I]}{K_I}$$

$$\xrightarrow{(b)\ ط} [E]_{tot} = [E] + \frac{[E][S]}{K_m} + \frac{[E][S][I]}{K_m K_I} \rightarrow [E]_{tot} = [E]\left(1 + \frac{[S]}{K_m} + \frac{[S][I]}{K_m K_I}\right)$$

$$\longrightarrow [E] = \frac{[E]_{tot}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_m} + \frac{[S][I]}{K_m K_I}\right)} \quad (c)$$

$$(b), (*)\ ط \longrightarrow v = k \times \frac{[E][S]}{K_m} \xrightarrow{(c)\ ط} v = \frac{\overbrace{k[E]_{tot}}^{v_{max}}[S]}{K_m\left(1 + \frac{[S]}{K_m} + \frac{[S][I]}{K_m K_I}\right)} =$$

$$\frac{v_{max}[S]}{K_m + [S](1 + [I]/K_I)} \longrightarrow \beta = \left(1 + I/K_I\right)$$

☑ مانند قسمت قبل اشتباه به دلیل وجود inhibitor سرعت کاهش یافته ← (ضرب یک term مثبت در S و بزرگ شدن مخرج)

☑ مشکل قبل تصحیح اول هست که اینجا ضریب در S ضرب شده