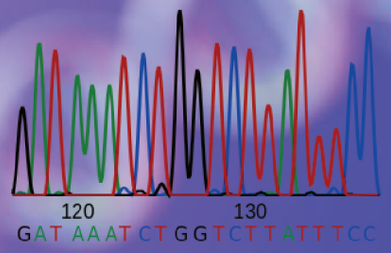
دانشگاه گیلان
۱۳۵۳_1974

مقدمه‌ای بر مهندسی ژنتیک

تألیف:
دکتر دزموند اس. تی. نیکُل
استاد علوم بیولوژی دانشگاه وست اسکاتلند
ترجمه:
دکتر رضا شیرزادیان خرم آباد
دانشیار دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان
دکتر احمد روحی بخش
استادیار دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان
دکتر صدیقه نصر رمزی

چاپ اول
۱۳۹۸
اداره چاپ و انتشارات دانشگاه گیلان



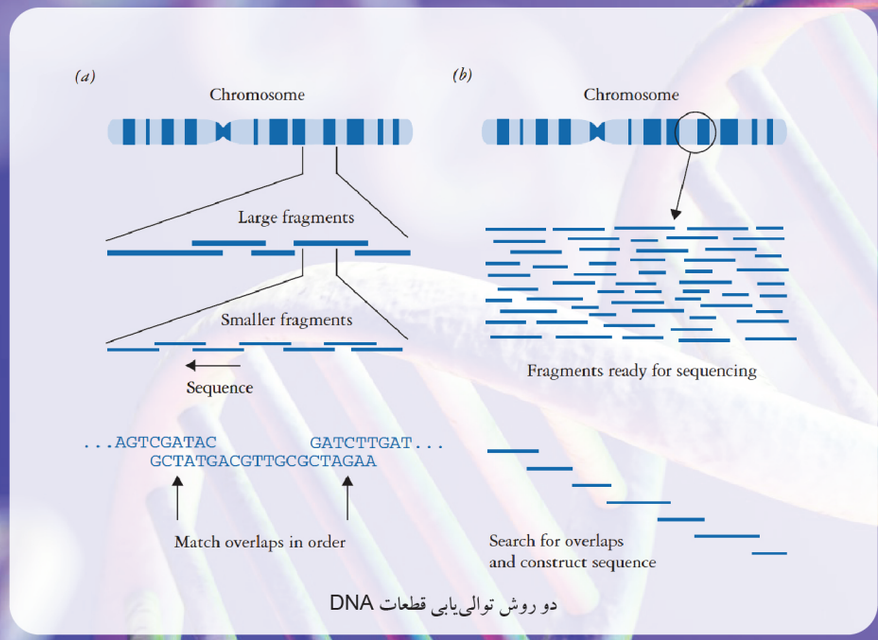
مقدمه‌ای بر مهندسی ژنتیک

تألیف: دکتر دزموند اس. تی. نیکُل
ترجمه: دکتر رضا شیرزادیان خرم آباد، دکتر احمد روحی بخش، دکتر صدیقه نصر رمزی

An Introduction to Genetic Engineering

By:
Desmond S. T. Nicholl
Translated by:
Reza Shirzadian-Khorramabad, Ph. D
Ahmad Rouhibakhsh, Ph. D
Sedigheh Nasr Ramzi, Ph. D

University of Guilan Press
2019



دو روش توالی‌یابی قطعات DNA

ISBN: 978-600-153-213-9

مقدمه ای بر مهندسی ژنتیک

مؤلف:

دزموند اس. تی. نیکُل

استاد علوم بیولوژی دانشگاه وست اسکاتلند

ترجمه:

دکتر رضا شیرزادیان خرم آباد

دانشیار دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان

دکتر احمد روحی بخش

استادیار دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان

دکتر صدیقه نصر رمزی

انتشارات دانشگاه گیلان

۱۳۹۸

دانشگاه گیلان
1974-۱۳۵۳

شابک: ۹ـ۲۱۳ ـ ۱۵۳ ـ ۶۰۰ ـ ۹۷۸

سرشناسه : نیکل، دزموند اس. تی.
Nicholl, Desmond S. T.

عنوان و نام پدیدآور : مقدمه‌ای بر مهندسی ژنتیک/مولف دزموند اس.تی. نیکل ؛ ترجمه رضا شیرزادیان‌خرم‌آباد، احمد روحی‌بخش، صدیقه نصر رمزی ؛ ویراستار علمی فرزام عجمیان ؛ ویراستار ادبی فرشته گلچین راد.

مشخصات نشر : رشت: دانشگاه گیلان، انتشارات، ۱۳۹۸.

مشخصات ظاهری : ۴۶۵ ص.: جدول(بخشی رنگی)، نمودار(بخشی رنگی).

شابک : 978-600-153-213-9

وضعیت فهرست نویسی : فیپا

یادداشت : عنوان اصلی: An introduction to genetic engineering,3rd ed.,2008.

یادداشت : واژه‌نامه.

موضوع : ژنتیک -- مهندسی

موضوع : Genetic engineering

شناسه افزوده : شیرزادیان خرم‌آباد، رضا، ۱۳۴۶ -، مترجم

شناسه افزوده : روحی‌بخش، احمد، ۱۳۴۵ -، مترجم

شناسه افزوده : نصر رمزی، صدیقه، ۱۳۶۶ -، مترجم

شناسه افزوده : گلچین راد، فرشته، ۱۳۶۵-، ویراستار

شناسه افزوده : دانشگاه گیلان. انتشارات

رده بندی کنگره : QH۴۴۲

رده بندی دیویی : ۶۶۰/۶۵

شماره کتابشناسی ملی : ۵۸۵۱۸۵۲

اداره چاپ و انتشارات دانشگاه گیلان

نام کتاب : **مقدمه ای بر مهندسی ژنتیک**

مولف : **دزموند اس. تی .نیکل**

مترجمان : **دکتر رضا شیرزادیان خرم آباد، دکتر احمد روحی بخش، صدیقه نصر رمزی**

ویراستار علمی : **فرزام عجمیان**

ویراستار ادبی : **فرشته گلچین راد**

نوبت چاپ : **اول، ۱۳۹۸**

ناشر : **انتشارات دانشگاه گیلان**

شمارگان : **۱۰۰۰ جلد**

قیمت : **ریال**

* هر گونه چاپ و تکثیر فقط در اختیار انتشارات دانشگاه گیلان است.*

مقدمه ناشر

ویرایش سوم

دزموند نیکول در این نسخه از کتاب معروف که برای مقطع کارشناسی تهیه کرده، در معرفی مهندسی ژنتیک، درک مفاهیم اولیه و اصول اساسی آن ضروری می‌داند. بنابراین، همچنان که کتاب به طور کامل به روز رسانی شده، اما همچنان تمرکز خود را بر اصول اساسی مورد استفاده در دست‌ورزی ژن حفظ کرده است. متن کتاب به سه بخش تقسیم شده است: بخش اول روی مقدمه‌ای بر زیست شناسی مولکولی پایه؛ بخش دوم روی روش‌های مورد استفاده برای دست‌ورزی ژن‌ها؛ و بخش سوم روی کاربرد این فناوری تمرکز دارد. فصل جدیدی در آن به اهمیت در حال رشد بیوانفورماتیک به عنوان یک رشته متمایز اختصاص داده شده است. دیگر ویژگی‌های اضافه شده به این نسخه شامل کادرهای متنی است که جنبه‌های مهم موضوعات مورد بحث را برجسته می‌کند و خلاصه فصل، که شامل اهداف و نتایج یادگیری است. این ویژگی‌ها همراه با لیست کلمات کلیدی، نقشه‌های مفهومی و واژه نامه، دانشجویان را قادر می‌سازد تا مطالعات خود را متناسب با روش‌های یادگیری خود انتخاب و در نهایت به درک کاملی در موضوع که معمولا دانشجویان را دچار مشکل می‌کند منجر شود.

دزموند اس. تی. نیکل استاد علوم زیستی دانشگاه West of Scotland, Paisley, UK است.

مقدمه نویسنده بر نسخه سوم

همانطور که در هنگام تهیه نسخه دوم این کتاب یافتم، پیشرفت در علم ژنتیک به قدری بسرعت در حال افزایش است که در هنگام نوشتن مقدمه ای در خصوص این موضوع، مشکلاتی را ایجاد می کند. در سال‌های پس از انتشارچاپ دوم، بسیاری از کاربردهای جدید فناوری دست‌ورزی ژن توسعه یافت، به‌طوری‌که طیف گسترده ای از رشته‌ها و کاربردها را پوشش می‌داد. هیجان تهیه نسخه سوم، همان‌طور که در مورد نسخه‌های قبلی آن نیز وجود داشت، تمرکز بر کاربردها و نادیده گرفتن اصول اساسی این فناوری بود. هرچند در تهیه اولیه این نسخه، متقاعد شدم که تمرکز بر یک مقدمه تکنیکی پایه مرتبط با موضوع باید در متن مورد توجه قرار گیرد. بنابراین برخی از روش‌های اصلی استفاده شده در دست‌ورزی ژن، حتی اگر برخی از آنها کمتر استفاده شده یا منسوخ شده باشند به عنوان نمونه‌هایی از این‌که چگونه این فناوری توسعه یافت ارایه شده‌اند. از نقطه نظر آموزشی، این موضوع باید به خواننده کمک کند تا در مواجهه با اطلاعات تخصصی‌تر در ارتباط با موضوع، درک صحیحی از اصول اساسی آن بخش مهمی از هر مقدمه‌ای بر مهندسی ژنتیک محسوب می شود. من مجددا از نظرات مثبت بسیاری در مورد نسخه دوم تشکر می‌کنم و امیدوارم که این نسخه جدید به عنوان بخشی از ادبیات مقدماتی در مورد این موضوع جذاب همچنان مفید باشد.

در تلاش برای تعادل بین روش‌شناسی و کاربردهای دست‌ورزی ژن، من متن را به سه بخش تقسیم کردم. بخش اول، مقدمه‌ای بر زیست‌شناسی مولکولی پایه، بخش دوم، روش‌های دست‌ورزی ژن‌ها و بخش سوم، به کاربردهای مهندسی ژنتیک اختصاص داده شده است. این بخش‌ها ممکن است در صورت لزوم بسته به اطلاعات مورد نیاز هر بخش، از نظم مذکور خارج شده باشند. علاوه بر یک بازنگری کلی از فصل‌های باقیمانده از نسخه دوم، برخی تغییرات اضافی نیز انجام شده است. یک فصل جدید به بیوانفورماتیک به عنوان یک رشته متمایز و مهم اختصاص داده شده است. برای کمک به دانشجوی مهندسی ژنتیک، دو بخش اضافی در این نسخه گنجانده شده است. برخی از جنبه‌های مهم در ارتباط با موضوع در کادرهای متنی به صورت برجسته مشخص شده‌اند و خلاصه فصل که شامل اهداف و نتایج یادگیری است همراه با فهرستی از کلمات کلیدی ارائه شده است. همراه با نقشه‌های مفهومی، امیدوارم که این ضمائم به خواننده کمک کند تا موضوعات را درک و حامی مطالعه محتوا باشد. با استفاده از خلاصه‌ها، کلمات کلیدی، کادرهای متنی و نقشه‌های مفهومی، دانشجویان باید بتوانند مطالعات خود را با توجه به روش‌های یادگیری فردی خود

ساماندهی کنند. امیدوارم که اعمال این تغییرات، تعادلی بین موضوع ایجاد کرده باشد و در عین حفظ ماهیت مقدماتی متن، افزایش کلی متن قابل قبول باشد

از همکاران من، پیتر بیرچ و جان مک‌لین، برای توضیحات در مورد بخش‌های مختلف این کتاب، همچنین دان پاول از موسسه Wellcome Trust Sanger برای مشاوره و نظرات بسیار مهم در خصوص فصل ۹ تشکر می‌کنم. کمک آنها موجب بهبود کیفیت کتاب شده و البته هرگونه خطا و تفسیر اشتباه به عهده خودم است. با تشکر از کاترینا هالیدی و همکارانش در انتشارات دانشگاه کمبریج، و کیتی گریزیلو از شرکت آپتارا، برای مشاوره و صبر و شکیبایی خوب خود که کمک کردند تا این پروژه به نتیجه برسد. نهایتا از همسرم، لیندا و شارلوت، توماس و آنا تشکر می‌کنم. در طول نوشتن این نسخه، آنها به همراه من متحمل رنج شدند و بیش از آنکه توانش را داشتند تحمل کردند. من این نسخه جدید را به آنها تقدیم می کنم، با تشکر فراوان.

دزموند اس. تی. نیکل

پیزلی ۲۰۰۷

عنوان **صفحه**

مقدمه ناشر ..... أ
پیشگفتار مترجمین ۱
فصل اول: مقدمه
خلاصه فصل/نتایج یادگیری ۳
۱-۱) مهندسی ژنتیک چیست؟ ۴
۱-۲) شکل گیری مبانی این علم ۷
۱-۳) اولین مراحل ۸
۱-۴) در مخزن چیست؟ ۱۰
نقشه مفهومی فصل اول ۱۳
بخش اول: اساس مهندسی ژنتیک
فصل دوم: معرفی زیست شناسی مولکولی
خلاصه فصل دوم ۱۷
۲-۱) مسیری که سیستم‌های زنده سازمان‌دهی می‌شوند ۱۸
۲-۲)جریان اطلاعات ژنتیکی ۲۰
۲-۳) ساختمان DNA و RNA ۲۳
۲-۴) سازماندهی ژن ۲۷
۲-۴-۱) آناتومی یک ژن ۲۷
۲-۴-۲) ساختار ژن در پروکایوت‌ها ۲۹
۲-۴-۳) ساختار ژن در یوکاریوت‌ها ۳۰
۲-۵) بیان ژن ۳۳
۲-۵-۱) از ژن‌ها تا پروتئین‌ها ۳۳
۲-۵-۲) رونویسی و ترجمه ۳۴
۲-۵-۳) تنظیم بیان ژن ۳۶
۲-۶) ژن‌ها و ژنوم‌ها ۳۸
۲-۶-۱) اندازه پیچیدگی ژنوم ۳۸

۲-۶-۲) سازماندهی ژنوم ۴۰
۲-۶-۳) ترانس‌کریپتوم و پروتئوم ۴۲
نقشهٔ مفهومی فصل دوم ۴۳

فصل سوم: روش کار با اسیدهای نوکلئیک

خلاصه فصل/نتایج یادگیری ۴۵
۳-۱) تجهیزات آزمایشگاهی ۴۶
۳-۲) جداسازی DNA و RNA ۴۸
۳-۳) تهیه و کمیت سنجی اسیدهای نوکلئیک ۵۰
۳-۴) نشاندارکردن اسیدهای نوکلئیک ۵۲
۳-۴-۱) کدام نشانگر رادیواکتیوی یا خیر؟ ۵۲
۳-۴-۲) نشاندار کردن انتهایی ۵۴
۳-۴-۳) روش درزگیری (ترجمه شکاف) ۵۴
۳-۴-۴) نشاندار کردن با استفاده از روش بسط آغازگر ۵۵
۳-۵) هیبریداسیون نوکلئیک اسید ۵۷
۳-۶) الکتروفورز ژل ۵۸
۳-۷) توالی‌یابیDNA ۶۰
۳-۷-۱) اصول توالی‌یابی DNA ۶۱
۳-۷-۲) آماده‌سازی قطعات DNA ۶۳
۳-۷-۳) توالی‌یابی با روش ماکسام و گیلبرت (روش شیمیایی) ۶۵
۳-۷-۴) توالی‌یابی با روش سنگر-کالسون (روش دی دزوکسی یا آنزیمی) ۶۶
۳-۷-۵) الکتروفورز و خواندن توالی‌ها ۶۹
۳-۷-۶) انجام اتوماتیک توالی‌یابی DNA ۷۰
نقشهٔ مفهومی فصل سوم ۷۲

فصل چهارم: ابزارها و روش‌های کار

خلاصه فصل / نتایج یادگیری ۷۳
۴-۱) آنزیم‌های برشی محدودالاثر – برش DNA ۷۴

۴-۱-۱) اندونوکلئازهای برشی محدودالاثر نوع دوم ۷۵
۴-۱-۲) کاربرد اندونوکلئازهای برشی محدودالاثر ۷۶
۴-۱-۳ تهیه نقشه بر مبنای مکان‌های برشی آنزیم‌های محدودالاثر ۷۹
۴-۲) آنزیم‌های تغییردهنده DNA ۸۰
۴-۲-۱) نوکلئازها ۸۱
۴-۲-۲) پلیمرازها ۸۳
۴-۲-۳) آنزیم‌های تغییر دهنده انتهای مولکول‌های DNA ۸۵
۴-۳) DNA لیگاز– متصل کننده مولکول‌های DNA ۸۶
نقشهٔ مفهومی فصل چهارم ۸۷
بخش دوم: روش شناسی دست ورزی ژنی
فصل پنجم: سلول‌های میزبان و ناقل‌ها
خلاصه فصل/نتایج آموزنده ۹۱
۵-۱) انواع سلول‌های میزبان ۹۳
۵-۱-۱) میزبان‌های پروکاریوتی ۹۳
۵-۱-۲) میزبان‌های یوکاریوتی ۹۵
۵-۲) ناقلین پلاسمیدی برای استفاده در *E. coli* ۹۶
۵-۲-۱) پلاسمیدها چه هستند؟ ۹۶
۵-۲-۲) پلاسمیدهای پایه همسانه‌سازی ۹۸
۵-۲-۳) ناقلین پلاسمیدی اندکی عجیب‌تر ۱۰۰
۵-۳) ناقلین باکتریوفاژ برای استفاده در *E.coli* ۱۰۳
۵-۳-۱) باکتریوفاژها چه هستند؟ ۱۰۴
۵-۳-۲) ناقلین بر مبنای باکتریوفاژ لامبدا ۱۰۹
۵-۳-۳) ناقل‌هایی بر اساس باکتریوفاژ M13 ..... ۱۱۴
۵-۴) سایر ناقل‌ها ۱۱۶
۵-۴-۱) ناقلین هیبریدی پلاسمید/فاژ ۱۱۶
۵-۴-۲) ناقلین مورد استفاده در سلول‌های یوکاریوتی ۱۱۷

۵-۴-۳) کروموزوم‌های مصنوعی..... ۱۲۱
۵-۵) ورود DNA به داخل سلول‌ها..... ۱۲۲
۵-۵-۱) ترانسفورماسیون و ترانسفکشن..... ۱۲۲
۵-۵-۲) بسته بندی DNA فاژ تحت شرایط *in vitro*..... ۱۲۵
۵-۵-۳) دیگر روش‌های انتقال DNA..... ۱۲۶
نقشهٔ مفهومی فصل پنجم..... ۱۲۹
فصل ششم: راهبردهای همسانه‌سازی
خلاصه فصل/نتایج آموزنده..... ۱۳۱
۶-۱) بهترین روش کدام است؟..... ۱۳۲
۶-۲) همسانه‌سازی mRNA..... ۱۳۵
۶-۲-۱) ساخت DNA مکمل (cDNA)..... ۱۳۶
۶-۲-۲) همسانه‌سازی cDNA در وکتورهای پلاسمیدی..... ۱۴۰
۶-۲-۳) همسانه‌سازیcDNA در باکتریوفاژها..... ۱۴۴
۶-۳) همسانه‌سازیDNA ژنومی..... ۱۴۶
۶-۳-۱) کتابخانه ژنومی..... ۱۴۷
۶-۳-۲) تهیه قطعات DNA برای همسانه‌سازی..... ۱۴۹
۶-۳-۳) الحاق، بسته بندی و تکثیر کتابخانه‌ها..... ۱۵۲
۶-۴) روش‌های پیشرفته همسانه‌سازی..... ۱۵۵
۶-۴-۱) ساخت و همسانه‌سازیcDNA..... ۱۵۶
۶-۴-۲) بیان مولکول‌های همسانه‌سازی شده DNA..... ۱۵۸
۶-۴-۳) همسانه‌سازی قطعات بزرگ DNA در وکتورهای YAC و BAC..... ۱۶۱
نقشهٔ مفهومی فصل ششم..... ۱۶۴
فصل هفتم: واکنش زنجیره‌ای پلی مراز
خلاصه فصل/ نتایج آموزنده..... ۱۶۵
۷-۱) تاریخچه PCR..... ۱۶۶
۷-۲) روش شناسی PCR..... ۱۷۱

۷-۲-۱) ویژگی‌های مهم واکنش PCR.....۱۷۱
۷-۲-۲) طراحی آغازگرها برای PCR.....۱۷۴
۷-۲-۳)DNA پلی مرازها جهت استفاده در PCR ۱۷۷
۷-۳) تکنیک‌های پیچیده تر PCR ۱۷۸
۷-۳-۱) PCR با استفاده از الگوهای mRNA ۱۷۹
۷-۳-۲) PCR تو در تو (آشیانه‌ای) ۱۸۰
۷-۳-۳) PCR معکوس ۱۸۲
۷-۳-۴) RAPD و چند کلمهٔ اختصاری دیگر.....۱۸۳
۷-۴) پردازش محصولات PCR.....۱۸۶
۷-۵) کاربردهای PCR ۱۸۷
نقشهٔ مفهومی فصل هفتم ۱۸۹

فصل هشتم: گزینش، غربال و آنالیز نوترکیب‌ها

خلاصهٔ فصل ۱۹۱
۸-۱) روش‌های گزینش و غربالگری ژنتیکی.....۱۹۳
۸-۱-۱) استفاده از سوبستراهای رنگ‌زا ۱۹۳
۸-۱-۲) غیرفعال‌سازی ناشی از ورود قطعه الحاق شده ۱۹۶
۸-۱-۳) غربالگری با استفاده از موتانت های معین ۱۹۸
۸-۱-۴) سایر روش‌های گزینش ژنتیکی ۱۹۹
۸-۲) غربالگری با استفاده از هیبریداسیون اسید نوکلئیک‌ها.....۲۰۰
۸-۲-۱ کاوشگرهای اسید نوکلئیک ۲۰۱
۸-۲-۲) غربالگری بانک های کلون ۲۰۴
۸-۳) استفاده از PCR در پروتکل‌های غربالگری.....۲۰۷
۸-۴) غربالگری ایمنولوژیکی برای ژن‌های بیان شده ۲۰۹
۸-۵) بررسی ژن‌های کلون شده.....۲۱۰
۸-۵-۲) نقشه‌یابی با آنزیم‌های محدودگر ۲۱۴
۸-۵-۳) تکنیک‌های لکه گذاری (بلاتینگ).....۲۱۴

۸-۵-۴) توالی‌یابی DNA ۲۱۸
نقشهٔ مفهومی فصل هشتم ۲۲۰

فصل نهم: بیوانفورماتیک

خلاصه فصل / نتایج یادگیری ۲۲۱
۹-۱) بیوانفورماتیک چیست؟ ۲۲۳
۹-۲) نقش کامپیوتر ۲۲۵
۹-۳) مجموعه داده‌ای بیولوژیکی ۲۲۶
۹-۳-۱) تولید و سازماندهی اطلاعات ۲۲۸
۹-۳-۲) پایگاه‌های داده‌ای اسیدنوکلئیک ۲۲۸
۹-۳-۳) پایگاه‌های داده‌ای پروتئین ۲۳۳
۹-۴) استفاده از بیوانفورماتیک به عنوان یک ابزار ۲۳۵
۹-۴-۱) اثر اینترنت و شبکه گسترده جهانی ۲۳۶
۹-۴-۲) جلوگیری از اثر "GIGO"– آزمون‌های واقعی ۲۳۷
۹-۴-۳) خودداری از آزمایش- آزمون‌های محاسباتی ۲۳۸
۹-۴-۴) ارائه اطلاعات پایگاه داده‌ای ۲۳۸
نقشهٔ مفهومی فصل نهم ۲۴۲
بخش سوم: مهندسی ژنتیک در عمل ۲۴۳

فصل دهم: شناسایی ژن، ژنوم و Otheromes

خلاصه فصل/نتایج یادگیری ۲۴۵
۱۰-۱) آنالیز ساختار و عملکرد ژن ۲۴۶
۱۰-۱-۱) یک نگاه دقیق‌تر به توالی‌ها ۲۴۷
۱۰-۱-۲) یافتن مناطق مهم ژن‌ها ۲۴۷
۱۰-۱-۳) بررسی بیان ژن ۲۵۰
۱۰-۲) از ژن تا ژنوم ۲۵۲
۱۰-۲-۱) بیان ژن در یک زمینه ژنومی ۲۵۴
۱۰-۲-۲) آنالیز ژنوم ۲۵۵

۱۰-۲-۳) تهیه نقشه ژنوم ۲۵۹
۱۰-۳) توالی‌یابی ژنوم ۲۶۱
۱۰-۳-۱) فناوری توالی‌یابی ۲۶۳
۱۰-۳-۲) پروژه‌های ژنومی ۲۶۴
۱۰-۴) پروژهٔ ژنوم انسان ۲۶۷
۱۰-۴-۱) ژنوم چه کسی استفاده می‌شود و چه تعداد ژن در آن قرار می‌گیرد؟ ۲۶۹
۱۰-۴-۲) نقشه‌های فیزیکی و ژنتیکی ژنوم انسان ۲۷۰
۱۰-۴-۳) بهدست آوردن و سرهم کردن توالی‌ها ۲۷۴
۱۰-۴-۴) ارائه و طرح مسائل مربوط به توالی ۲۷۵
۱۰-۵) otheromes ۲۷۷
۱۰-۵-۱) ترانسکریپتومیکس ۲۷۸
۱۰-۵-۲)پروتئوم ۲۸۰
۱۰-۵-۳) متابولوم و اینتراکتوم ۲۸۲
۱۰-۶) زندگی در وراء ژنوم ۲۸۴
نقشهٔ مفهومی فصل دهم ۲۸۶

فصل یازدهم: مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی

۱۱-۱) ساخت پروتئین ۲۸۹
۱۱-۱-۱) پروتئین‌های اصلی و اتصالی ۲۹۰
۱۱-۱-۲) سیستم‌های بیانی مخمر ۲۹۳
۱۱-۱-۳) سیستم بیانی باکیولو ویروس ۲۹۴
۱۱-۱-۴) لاین‌های سلولی پستان‌داران ۲۹۵
۱۱-۲) مهندسی پروتئین ۲۹۶
۱۱-۲-۱) طرح منطقی ۲۹۷
۱۱-۲-۲) تکامل هدایت شده ۳۰۰
۱۱-۳) از آزمایشگاه تا تولید ۳۰۱
۱۱-۳-۱) تفکر بزرگ - صنعت بیوتکنولوژی ۳۰۱

۱۱-۳-۲) سیستم‌های تولید ۳۰۵
۱۱-۳-۳) ارتقاء توجهات ۳۰۶
۱۱-۳-۴) فعالیت‌های پائین دستی ۳۰۷
۱۱-۴) نمونه‌هایی از کاربردهای بیوتکنولوژیکی فناوری DNA نوترکیب ۳۰۸
۱۱-۴-۱) تولید آنزیم ۳۰۸
۱۱-۴-۲) داستان سوماتوتروپین گاوی نوترکیب ۳۱۰
۱۱-۴-۳) محصولات درمانی برای استفاده در بهداشت و درمان انسان ۳۱۴
نقشهٔ مفهومی فصل یازدهم ۳۲۲

فصل دوازدهم: کاربردهای پزشکی و پزشکی قانونی دست‌ورزی ژن

۱۲-۱) تشخیص و تعیین ویژگی‌های شرایط پزشکی ۳۲۵
۱۲-۱-۱) تشخیص آلودگی ۳۲۵
۱۲-۱-۲) الگوهای توارث ۳۲۶
۱۲-۱-۳) شرایط بیماری ژنتیکی ۳۳۰
۱۲-۲) درمان با استفاده از فناوری DNA نوترکیب - ژن درمانی ۳۴۲
۱۲-۲-۱) انتقال ترانس ژن‌ها به بیماران ۳۴۴
۱۲-۲-۲) ژن درمانی برای کمبود آدنوزین دی‌آمیناز ۳۴۷
۱۲-۲-۳) ژن درمانی برای فیبروزسیستیک ۳۴۷
۱۲-۲-۴) وضعیت آینده ژن درمانی ۳۵۰
۱۲-۳) RNA مداخله گر - کشف اخیر با پتانسیل زیاد ۳۵۱
۱۲-۳-۱) RNA مداخله‌گر چیست؟ ۳۵۱
۱۲-۳-۲) استفاده از RNA مداخله‌گر به عنوان ابزاری برای مطالعه بیان ژن ۳۵۴
۱۲-۳-۳) RNA مداخله‌گر به عنوان یک درمان بالقوه ۳۵۴
۱۲-۴)پروفایل DNA ۳۵۶
۱۲-۴-۱) تاریخچه انگشت نگاری ژنتیکی ۳۵۷
۱۲-۴-۲) پروفایل DNA و قانون ۳۵۹
۱۲-۴-۳) اسرار گذشته توسط تشخیص دهنده‌های ژنتیکی آشکار شد ۳۶۳

نقشهٔ مفهومی فصل دوازدهم ۳۶۵

فصل سیزدهم: گیاهان و حیوانات تراریخته

خلاصه فصل/نتایج یادگیری ۳۶۷

۱۳-۱) گیاهان تراریخت ۳۶۸

۱۳-۱-۱) چرا گیاهان تراریخت؟ ۳۶۹

۱۳-۱-۲) پلاسمید Ti به عنوان وکتور برای سلول‌های گیاهی ۳۷۰

۱۳-۱-۳) تولید گیاهان تراریخت ۳۷۵

۱۳-۱-۴) بهکارگیری فناوری ۳۷۷

۱۳-۲) حیوانات تراریخته ۳۸۸

۱۳-۲-۱) چرا حیوانات تراریخته؟ ۳۸۹

۱۳-۲-۲) تولید حیوانات تراریخته ۳۹۰

۱۳-۲-۳) کاربردهای فناوری حیوانات تراریخت ۳۹۱

نقشهٔ مفهومی فصل سیزدهم ۳۹۹

فصل چهاردهم: سایر منابع کلون سازی

۱۴-۱) عقاید اولیه و آزمایش‌ها ۴۰۳

۱۴-۱-۱) اولین مراحل بسوی کلون سازی ۴۰۴

۱۴-۱-۲) توتی پوتنسی هسته ای ۴۰۶

۱۴-۲) قورباغه، وزغ و هویج ۴۰۸

۱۴-۳) گوسفند مشهور- یک دستاورد مهم ۴۱۰

۱۴-۴) فراتر از دالی ۴۱۴

نقشهٔ مفهومی فصل چهاردهم ۴۱۶

فصل پانزدهم: ایجاد دنیایی جدید یا کابوس ژنتیکی؟

۱۵-۱) آیا علم از نظر خوب و بد اخلاقی بی طرف است؟ ۴۱۸

۱۵-۲) فاکتورهای مباحث اخلاقی ۴۱۸

۱۵-۲-۱) نقش دانشمند ۴۲۱

۱۵-۲-۲) نقش جوامع ۴۲۲

۱۵-۳) آیا هیولای فرانکستین درون جعبهٔ پاندورا زندگی می‌کند؟ ۴۲۲
پیشنهادات برای مطالعه بیشتر ۴۲۴
کتاب‌ها ۴۲۴
مجلات مروری ۴۲۴
استفاده از شبکه جهانی وب ۴۲۵
شروع به کار ۴۲۵
احتیاط! ۴۲۷
انواع وب سایت ۴۲۷
واژه‌نامه ۴۳۱

پیشگفتار مترجمین

مهندسی ژنتیک یکی از گرایش‌های نوین علوم زیستی محسوب می‌شود که کاربردهای زیادی در علوم پایه، کشاورزی و علوم پزشکی دارد. به نظر می‌رسد مهندسی ژنتیک بخش بسیار عظیمی از آینده علم را به خود اختصاص خواهد داد و شاید برای این علم جنجال برانگیز پایانی نمی‌توان متصور شد. امروزه این علم و کاربردهای آن با بسیاری از گرایش‌های علوم زیستی پیوند خورده است.

نویسنده کتاب، در نسخه سوم تمرکز خود را بر اصول اساسی مورد استفاده در دست‌ورزی ژن قرار داده و معتقد است که آگاهی از این اصول برای درک بهتر مهندسی ژنتیک ضروری است. مطالب کتاب در این نسخه به گونه‌ای ارائه شده که استفاده از کادرهای درون متنی، خلاصه فصل، اهداف و نتایج یادگیری و کلمات کلیدی به صورت مجزا در هر فصل به درک بهتر خواننده منجر شود. این کتاب با تاکید بر زیست‌شناسی مولکولی پایه، روش‌های مورد استفاده برای دست‌ورزی ژن‌ها و بیوانفورماتیک، در نهایت خواننده را با کاربردهای مهندسی ژنتیک آشنا می‌کند و به عنوان کتابی مرجع برای دانشجویان رشته‌های کشاورزی، مهندسی ژنتیک، علوم پایه پزشکی، بیوتکنولوژی و زیست شناسی قابل استفاده است.

ترجمه و ویرایش علمی و ادبی این کتاب با دقت فراوان انجام شده است، اما با وجود تلاش فراوان مترجمین، داوران و ویراستار محترم، خالی از اشکال نیست لذا از اساتید و دانشجویان گرامی خواهشمند است که نظرات اصلاحی خود را جهت اعمال در چاپ بعدی ارائه فرمایند. در نهایت از همکاری صمیمانه مدیریت انتشارات حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان جهت چاپ این کتاب قدردانی می‌شود.

فصل اول: مقدمه

اهداف:

* تعریف مهندسی ژنتیک بر مبنای تعریفی که در این کتاب ارائه خواهد شد؛
* ارائه اجمالی بخش‌های اصلی مهندسی ژنتیک؛
* توصیفی در خصوص ظهور فناوری دست‌ورزی ژن؛
* ارائه خلاصه‌ای از ساختار کتاب حاضر.

خلاصه فصل/نتایج یادگیری

بعد از خواندن این فصل به اطلاعات زیر دست خواهید یافت:

* هدف و طبیعت موضوع؛
* مراحل مورد نیاز برای همسانه‌سازی ژن؛
* ظهور و توسعهٔ زود هنگام تکنولوژی؛
* مباحث اخلاقی در خصوص مهندسی ژنتیک.

لغات کلیدی

مهندسی ژنتیک، دست‌ورزی ژن، همسانه‌سازی ژن، فناوری DNA نوترکیب، تغییرات ژنتیکی، ژنتیک نوین، کشاورزی مولکولی، DNA ligase، آنزیم‌های برشی، پلاسمید، عناصر فرا کروموزومی، رپلیکون[1]، جعبه متن، اهداف، خلاصه فصل، نتایج آموزنده، نقشه کلی.

[1] Replicon

۱-۱)مهندسی ژنتیک چیست؟

پیشرفت در هر فرایند علمی به‌میزان قابلیت دسترسی به روش‌ها که موجبات گسترش و انجام آزمایشات پیچیده را امکان‌پذیر می‌سازد بستگی دارد. این موضوع در طی ۳۵ سال گذشته و یا بیشتر، با ظهور مهندسی ژنتیک به نحوی ویژه نشان داده شد. این موضوع علمی به سرعت تا جایی توسعه یافت که در بسیاری از آزمایشگاه‌های دنیا در سرتاسر جهان آزمایشاتی چون جداسازی یک قطعه DNA از ژنوم موجود، تعیین توالی و بررسی فعالیت آن، از آزمایشاتی معمول به حساب می‌آیند. این فناوری در بسیاری از زمینه‌های دیگر نیز کارایی دارد مانند بررسی‌های پزشکی قانونی از آثار به جامانده در صحنه جرم، بیماری‌های توارثی، تشخیص بیماری، نقشه یابی و توالی‌یابی ژنوم و بیوتکنولوژی صنعتی. آنچه فناوری دست‌ورزی ژن را ویژه و قابل توجه ساخته است این جنبه است که بهره گیری از این فناوری به‌طور آسان و راحت بدون نیاز به سرمایه زیاد، تجهیزات وسیع و گسترده آزمایشگاهی برای محققین قابل دسترس می‌باشد. اگرچه این فناوری در سال‌های اخیر با پیشرفت پروژه‌های توالی‌یابی ژنوم گسترده‌تر شده است هنوز هم توسط اکثر محققین علوم زیستی قابل دسترسی و بهره گیری است.

ممکن است جهت توصیف فناوری‌های موجود در زمینه دست‌ورزی ژن چندین اصطلاح به‌کار برده شود.

اصطلاح مهندسی ژنتیک عموماً تصور می‌شود که یک اصطلاح بدیهی است که احتمالاً اکثر مردم آن را می‌شناسند. به هر حال، چندین اصطلاح دیگر از جمله دست‌ورزی ژن، همسانه‌سازی ژن، تکنولوژی DNA نوترکیب، تغییرات ژنتیکی و ژنتیک نوین می‌توانند برای توصیف فناوری فوق مورد استفاده قرار گیرد. همچنین تعاریف رسمی خاصی توسط مکانیزم‌های اجرا کننده در کشورهای استفاده کنندهٔ از مهندسی ژنتیک ارائه شده است.

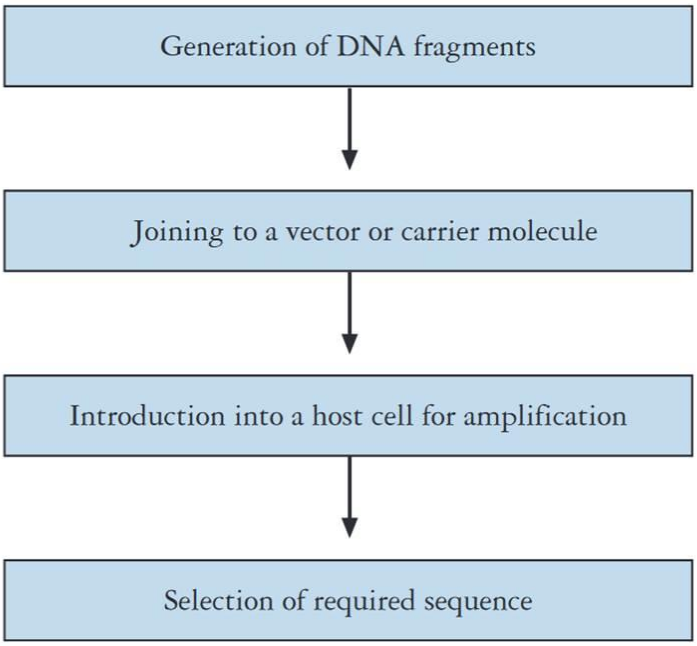
مواد ژنتیکی منابع غنی از اطلاعات کد شده از جفت بازهای موجود در توالی DNA به شمار می‌روند.

اگرچه روش‌ها و تکنیک‌های متفاوتی در این فناوری وجود دارد، اما اصول اولیه دست‌ورزی ژنتیکی به دلایل منطقی ساده است. اساسی که بر مبنای آن این فناوری شکل گرفته این است که اطلاعات ژنتیکی موجود در DNA که به‌صورت ژن‌ها در کنار هم قرار گرفته‌اند به‌عنوان یک منبع مهم است که می‌تواند به روش‌های مختلفی برای رسیدن به اهداف معین در علوم پایه و کاربردی و پزشکی دست‌ورزی شود. بهره‌گیری از دست‌ورزی ژن در زمینه‌های متعددی دارای اهمیت است. از جمله:

* تحقیقات پایه روی فعالیت و ساختمان ژن؛
* تولید پروتئین‌های مفید توسط روش‌های جدید؛

* تولید حیوانات و گیاهان مهندسی شده؛
* درمان و تشخیص در زمینه پزشکی؛
* آنالیز ژنوم توسط توالی‌یابی DNA.

در فصل‌های بعدی به شرح برخی از این روش‌ها در زمینه دست‌ورزی ژن خواهیم پرداخت.



شکل ۱-۱) چهار مرحله در یک ازمایش کلون کردن ژن.

اصطلاح «همسانه (کلون)» از همسانه‌های سلول‌های میزبان مشابه که در طی تکثیر قطعات همسانه شده ایجاد شده‌اند، به‌دست می‌آید. از همسانه‌سازی ژن گاهی به «همسانه‌سازی مولکولی» اشاره می‌شود که این اصطلاح جهت تمایز آن از «همسانه‌سازی یک ارگانیسم کامل» به‌کار می‌رود. توانایی جداسازی یک توالی DNA خاص از ژنوم، مهم‌ترین بخش فناوری دست‌ورزی ژن است. در واقع کلون کردن یک قطعه DNA در چهار مرحله انجام می‌شود (شکل ۱-۱). موفقیت در انجام این مراحل منجر به تهیه یک قطعه خاص از DNA شده که می‌تواند با اهداف مختلفی استفاده شود . تشابه جالب در این زمینه این است که کلون کردن ژن می‌تواند به‌عنوان یکی از نمونه‌های کشاورزی مولکولی محسوب شود، که در واقع تولید مقادیر زیادی (در مهندسی ژنتیک به معنی

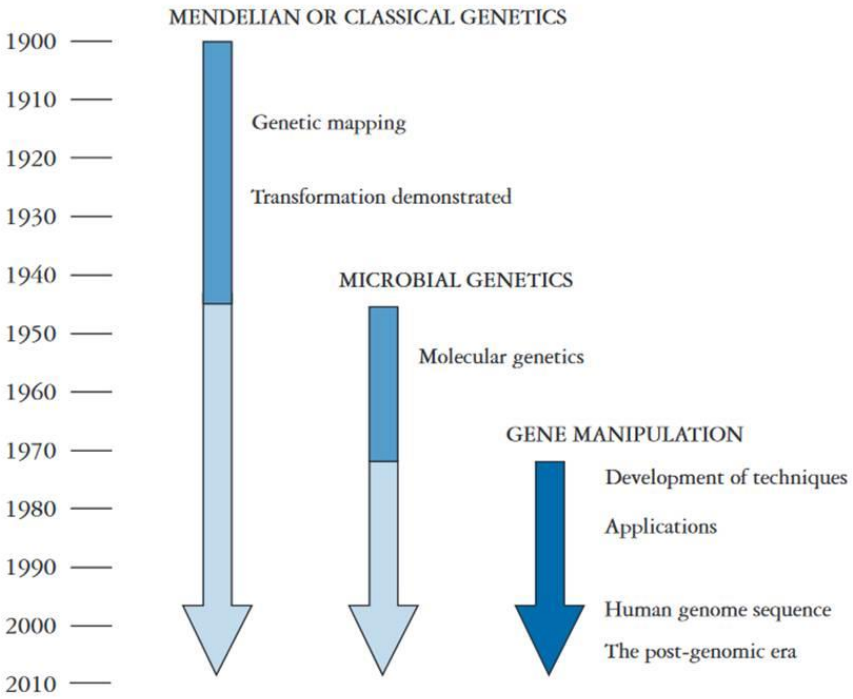
میکروگرم یا میلی‌گرم) از یک توالی خاص DNA است. حتی در پروژه‌های بزرگ توالی‌یابی DNA، توانایی جداسازی یک توالی خاص به عنوان یکی از جنبه‌های مهم در دست‌ورزی ژن محسوب می‌شود که در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی سرتاسر جهان هر روز انجام می‌شود.

همسانه‌سازی امکان جداسازی و شناسایی تک تک ژن‌ها را فراهم می‌سازد.

یکی از جنبه‌های ژنتیک نوین که موجبات نگرانی را فراهم می‌سازد، بحث در خصوص کاربردهای بالقوه این فناوری است. اصطلاح "Genethics" به‌منظور توضیح و شرح مشکلات خاصی که در اثر ژنتیک مدرن حاصل شده‌اند، ایجاد شده است که احتمالاً از نظر تعداد و پیچیدگی در حال افزایش هستند. استفاده از گیاهان و حیوانات مهندسی شده، بررسی ژنوم انسان، ژن درمانی و بسیاری از موضوعات مرتبط دیگر، به‌عنوان نگرانی‌هایی نه تنها برای محققین بلکه برای کل جامعه مطرح است.

پیشرفت‌های اخیر در زمینهٔ غذاهای تغییر یافته ژنتیکی، نگرانی‌های عمومی را علیه این فناوری برانگیخت. پیشرفت‌های بیشتر در زمینه همسانه‌سازی موجودات و لقاح مصنوعی موجب طرح پرسش‌های بیشتری در این زمینه شد. اگرچه کلون کردن موجودات جزئی از دست‌ورزی ژن محسوب نمی‌شود، ولی ما برخی از جنبه‌های آن را در این کتابمطالعه می‌کنیم . زیرا یکی از بخش‌های نگران‌کننده محسوب شده و در تعاریف کلی‌تر، خود نوعی دست‌ورزی ژنتیکی به حساب می‌آید. تحقیقات روی سلول‌های بنیادی و سودمندی‌های مرتبط با توانایی‌های بالقوهٔ این روش به‌عنوان بخشی از پیشرفت‌های فناوری ژنتیک، از دیگر عوامل نگران کننده در این خصوص هستند.

علم ژنتیک نوین، علاوه بر نگرانی‌های تکنیکی و علمی، پرسش‌های بسیاری در خصوص موارد اخلاقی مطرح می‌کند.



شکل ۱-۲) تاریخچه علم ژنتیک از سال ۱۹۰۰.
پیکان‌های رنگی نشان دهندهٔ پیشرفت‌های عمده در هر بخش از این علم است.

۱-۲) شکل گیری مبانی این علم

اگرچه روش‌های استفاده شده در دست‌ورزی ژن تقریباً جدید هستند اما باید به یاد داشته باشیم که توسعه این روش‌ها بر مبنای دانش و مهارت‌های فراهم شده از ژنتیک میکروبی است. می‌توان توسعه در علم ژنتیک را در سه بخش قرار داد (شکل ۱-۲). علم ژنتیک در واقع با کشف کارهای گریگور مندل[1] شروع و با تلاش بعدی ۴۰ ساله در خصوص توصیف اصول وراثت و نقشه یابی ژنتیکی ادامه یافت. ژنتیک میکروبی در اواسط دهه ۱۹۴۰ مطرح و نقش DNA به‌عنوان ماده ژنتیک تأیید شد. در طول این مدت پیشرفت‌های قابل‌توجهی در زمینه مکانیسم‌های انتقال ژن بین باکتری‌ها و سپس یک مبنای گسترده علمی بر اساس پیشرفت‌های بعدی شکل گرفت.

از "گریگور مندل" به‌عنوان پدر علم ژنتیک یاد می‌شود.

[1] Gregor Mendel

کشف ساختمان DNA توسط واتسون و کریک [1] در سال ۱۹۵۳ زمینه‌هایی را برای توسعه ژنتیک در سطح مولکولی فراهم کرد و سال‌های بعد از آن به‌عنوان دوره ای از فعالیت‌های مضاعف و پر هیجان در خصوص بخش‌های اصلی ژن و بیان آن تعیین و تعریف شد. این فعالیت‌ها با تأیید ماهیت کد ژنتیکی در سال ۱۹۶۶ (زمان ظهور ژنتیک نوین) تکمیل شد.

شاید مارپیچ دو رشته‌ای واتسون و کریک معروف‌ترین و شناخته‌ترین مولکول در جهان باشد.

۱-۳) اولین مراحل

در اواخر دهه ۱۹۶۰ یک احساس ناامیدی در بین محققین بیولوژی مولکولی وجود داشت. تحقیقات به نقطه‌ای از توسعه رسیده بود که دیگر پیشرفت آن تحت تأثیر محدودیت‌های تکنیکی قرار داشت، همچنان که آزمایشات جالب توانسته بود به خواندن کدهای ژنتیکی کمک کند، این یافته نمی‌تواند کمکی به بررسی ژن‌ها در مقیاس‌های جزئی‌تر نماید. به هر حال تعدادی از پیشرفت‌ها انگیزه‌های مورد نیاز برای اینکه دست‌ورزی ژنتیکی به عنوان یک واقعیت مطرح باشد را فراهم کرد. در سال ۱۹۶۷ آنزیم DNA لیگاز [2] شناسایی شد. این آنزیم توانایی الحاق دو قطعه DNA را دارد و به عنوان یک پیش نیاز برای ساخت مولکول‌های نوترکیب وارد عرصه تحقیقات گردید که می‌تواند به عنوان چسب مولکولی مطرح باشد. این یافته با جدا کردن اولین آنزیم برشی [3] در سال ۱۹۷۰ که در واقع تحولی بزرگ در توسعه مهندسی ژنتیک بود، همراه شد. آنزیم‌های برشی به عنوان قیچی‌های مولکولی مهم هستند که می‌توانند DNA را در نقاط دقیقی از توالی آن ببرند. این آنزیم‌ها می‌توانند برای تولید قطعات DNA که برای الحاق به قطعات دیگر مناسب هستند به‌کار گرفته شوند. بنابراین تا سال ۱۹۷۰، روش اصلی مورد نیاز برای ساخت دیگر ساختارهای نوترکیب DNA برای محققان قابل دسترس گردید.

در پایان سال ۱۹۶۰ بیشتر لوازم ضروری برای ظهور تکنولوژی ژن مهیا شده بود.

اولین مولکول DNA نوترکیب در دانشگاه استنفورد [4] در سال ۱۹۷۲ با استفاده از خواص برشی آنزیم‌های برشی و توانایی آنزیم لیگاز در الحاق قطعات DNA تولید شد. اهمیت این آزمایشات اولیه قابل تصور نبود. در حال حاضر محققین می‌توانند قطعات مختلف DNA را به یکدیگر متصل کنند و حتی می‌توانند یک قطعه DNA را از موجودی کاملاً متفاوت به قطعه DNA دیگر متصل کنند. در سال ۱۹۷۳ روش فوق توسعه بیشتری یافت به این صورت که قطعات DNA به

---

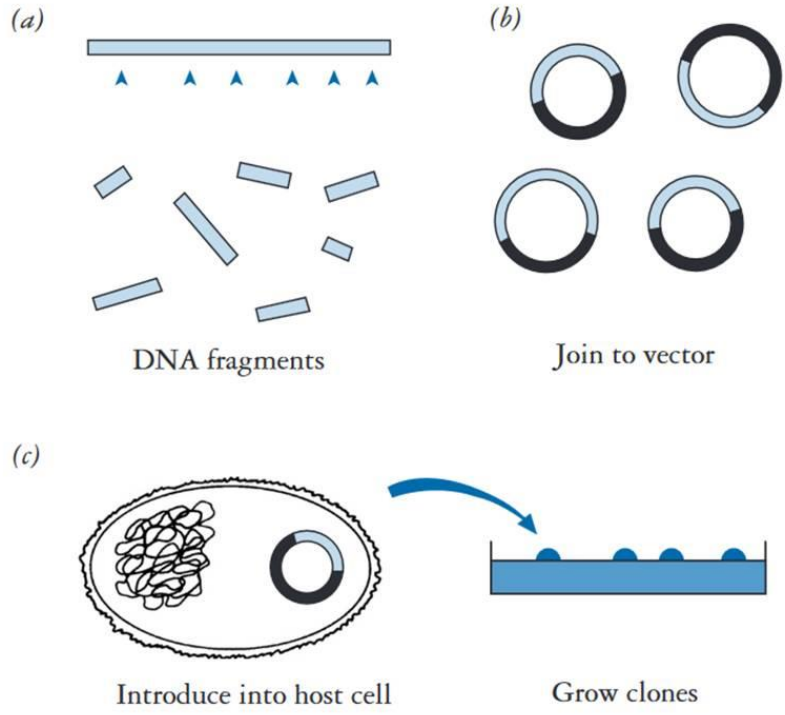
[1] James Watson and Francis Crick
[2] DNA ligase
[3] Restriction enzyme
[4] Stanford

پلاسمید pSC101، که یک کروموزوم اضافه در باکتری *E.coli* است، متصل شد. این قطعات همچون رپلیکون رفتار می‌کنند و وقتی به *E.coli* منتقل می شوند می‌توانند تکثیر شوند. لذا با تولید مولکول‌های نوترکیب در محیط *in vitro* و سپس قرار دادن آن در داخل سلول باکتری (محیط *in vivo* جهت همانندسازی)، می‌توان قطعات خاص DNA را از کلونی‌های باکتری‌هایی که بعد از قرار گرفتن روی محیط کشت آگار کلون ها را ایجاد کردند (کلونی‌های تشکیل شده از یک سلول همه مشابه هستند) جدا نمود. این توسعه و پیشرفت به‌عنوان ظهور فناوری همسانه‌سازی ژن شناخته شد (شکل ۱-۳).

کلید اصلی برای همسانه‌سازی ژن، اطمینان یافتن از این است که توالی هدف در یک سلول میزبان مناسب همانندسازی کند.

اکتشافات سال‌های ۱۹۷۲ و ۱۹۷۳ موجب ایجاد بزرگ‌ترین تحول علمی در علم ژنتیک نوین شد. استفاده از فناوری نوین خیلی سریع فراگیر شد و موجی از ضرورت همراه با هیجان را در دنیا به‌وجود آورد. این روند با ارائه نظراتی همچون فناوری جدید می‌تواند موجب افزایش تولید موجودات مضر شود که خصوصیات غیرقابل قبولی را از خود بروز می‌دهند، قدری دچار ضعف و نقصان شد. این رخداد در واقع موضوع را متوجه جامعه زیست شناسی کرده تا شرایط را ارزیابی و میزان استفاده از دست‌ورزی ژن را کنترل نماید و گسترش آن در بخش‌های چالش انگیز را تا کسب اطلاعات بیشتری در ارتباط با نتایج و اثرات احتمالی آن بر موجوداتی که حاوی DNA نوترکیب هستند مشخص شود، محدود نمایند. به هر حال توسعه موجودات تغییر یافته ژنتیکی[1] (GMO) به‌ویژه گیاهان زراعی دوباره این نگرانی و شک را در زمینه سلامت این موجودات و اثرات آزادسازی آنها در محیط زیست به‌وجود آورد. مضافاً بسیاری از مزایای احتمالی این روش‌ها در پزشکی، ژنتیک و بیولوژی سلولی موجب ایجاد سوالات مرتبط را می‌نماید که پاسخ به آنها خیلی آسان نیست. ما به برخی از این مشکلات در کتاب حاضر خواهیم پرداخت.

[1] Genetically modified organisms (GMOs)



شکل ۱-۳) همسانه‌سازی قطعات DNA. (a) یک قطعه DNA از منبع مناسب جدا و به قطعات مورد نیاز برش داده می‌شود. (b) قطعات به یک ناقل مناسب متصل و مولکول‌های DNA نوترکیب ایجاد می‌شود. در این شکل ناقل مورد استفاده پلاسمید است. (c) مولکول‌های DNA نوترکیب برای تکثیر و ایجاد کلون وارد یک میزبان (در مثال فوق باکتری میزبان است) می‌شوند.

توسعه و استفاده از موجودات تغییر یافته ژنتیکی (GMO) بعضی سؤالات سخت را در حوزه اخلاق ایجاد می‌کند که چنین مسائلی در سایر موضوعات مثل همسانه‌سازی ژن مطرح نیست.

۱-۴) در مخزن چیست؟

در آماده کردن چاپ سوم از کتاب حاضر، ساختار کلی چاپ دوم حفظ شده است. محتوای این نسخه جهت نشان دادن تأثیر مثبت کاربردهای فناوری DNA نوترکیب و ژنتیک به‌روز رسانی شده و چندین مورد نیز به بسیاری از بخش‌ها اضافه شده است. با این حال توضیحات مقدماتی در خصوص بیولوژی مولکولی با کار روی اسیدهای نوکلئیک و روش‌های پایه و اصلی دست‌ورزی ژن را

در این چاپ آورده‌ام. امیدوارم که چاپ جدید از کتاب حاضر به‌عنوان مقدمه‌ای تکنیکی در ارتباط با موضوع بحث مفید باشد، این کتاب از سه بخش تشکیل شده است:

بخش اول (مبانی مهندسی ژنتیک، فصول۲ تا ۴)

به معرفی مقدماتی موضوع و روش‌های وابسته در این علم می‌پردازد. فصل دوم (مقدمه‌ای بر بیولوژی مولکولی) و فصل سوم (کار با اسیدهای نوکلئیک) اطلاعاتی در خصوص DNA و روش‌های مورد استفاده در کار با آنها ارائه می‌کند. فصل چهارم (ابزارهای کار در مهندسی ژنتیک) به بررسی آنزیم‌های مورد نیاز در خصوص دست‌ورزی ژن می‌پردازد.

بخش دوم (روش‌های دست‌ورزی ژن، فصول ۵ تا ۹)

به بررسی روش‌ها و راهبردهای مورد نیاز برای همسانه‌سازی و شناسایی ژن می‌پردازد. فصل پنجم (سلول‌های میزبان و ناقلین) و فصل ششم (راهبردهای همسانه‌سازی) سیستم‌ها و پروتکل‌های مختلف را که در خصوص همسانه‌سازی ژن استفاده می‌شوند، توضیح داده است. فصل هفتم در خصوص واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است که اصلی‌ترین و مهم‌ترین بخش از بیولوژی مولکولی مدرن است. فصل هشتم (انتخاب، غربالگری و آنالیز نوترکیب‌ها) به چگونگی انتخاب توالی‌های خاص DNA از یک مجموعه از قطعات کلون شده می‌پردازد. فصل نهم (بیوانفورماتیک) فصل جدیدی است که به چاپ جدید کتاب حاضر اضافه شده است.

بخش سوم (مهندسی ژنتیک در عمل، فصول ۱۰ تا ۱۵)

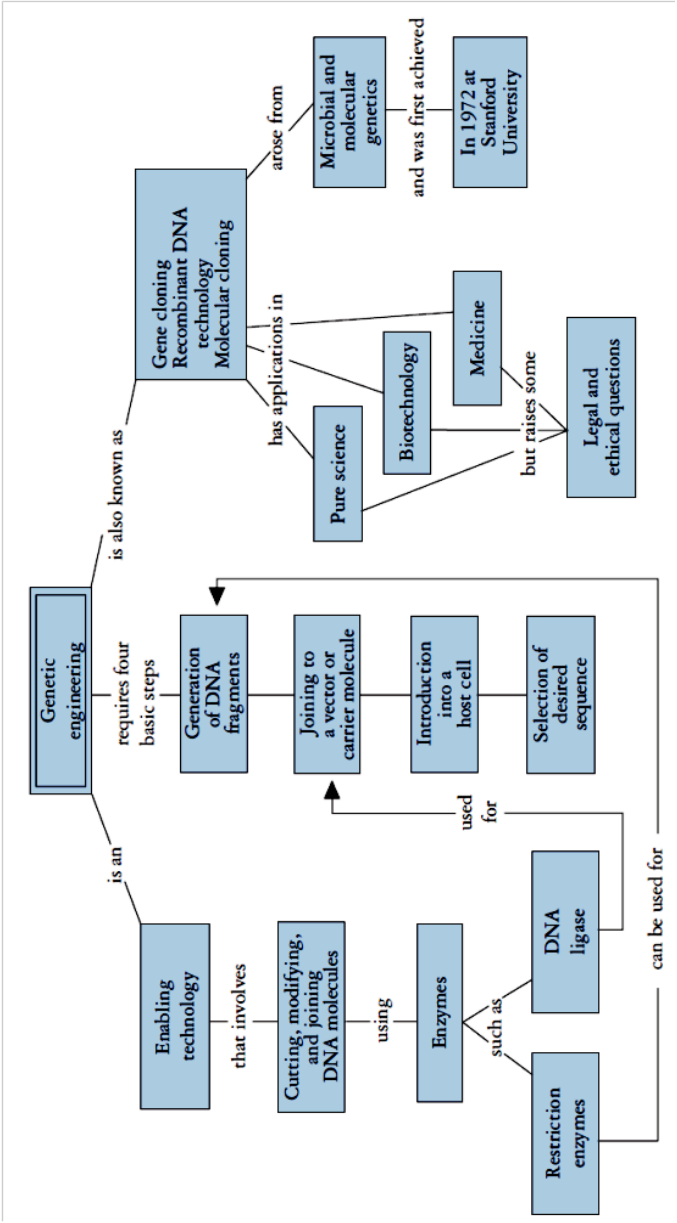
به کاربردهای دست‌ورزی ژن و فناوری‌های مربوط به آن پرداخته است. فصل‌های آن شامل شناسایی ژن، ژنوم و otheromes در فصل دهم، مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی در فصل یازدهم، کاربردهای پزشکی و پزشکی قانونی دست‌ورزی ژن در فصل دوازدهم و گیاهان و حیوانات تراریخته در فصل سیزدهم می‌شوند. همسانه‌سازی موجودات در فصل چهاردهم (سایر منابع همسانه‌سازی)، مباحث اخلاقی پیرامون مهندسی ژنتیک در فصل پانزدهم (ایجاد دنیایی جدید یا کابوس ژنتیکی؟) شرح داده شده است.

هر فصل دارای چندین رهنمود است تا خواننده را برای مطالعهٔ سودمندانه کتاب حاضر تشویق نماید.

در چاپ سوم کتاب حاضر سعی بر آن شده تا طیفی از بخش‌هایی که به‌عنوان کمک مطالعه برای تقویت دوره‌های علمی خاص مفید هستند، توضیح داده شوند. لذا در فصل‌های مختلف کتاب جعبه‌های متنی (نکات متنی) آورده شده است. این نکات در کادرهای رنگی آمده و مفهومی

خلاصه و مفید از متن ارائه می‌دهد. در ابتدای هر فصل اهداف آن ذکر شده است و در ادامه خلاصه‌ای از فصل همراه با نتایج آموزنده آن آورده شده است. البته این قسمت به‌صورت کلی نوشته شده، لذا استاد یا آموزگار می‌تواند این بخش را متناسب با جزئیات مورد نیاز هر بخش تغییر دهد. فهرستی از لغات کلیدی هر فصل در ادامه ذکر شده است. همانند چاپ اول و دوم یک نقشهٔ مفهومی از هر فصل در انتهای آن ذکر شده است. نقشهٔ مفهومی روشی است که می‌تواند اطلاعات ساختاری از مطالب هر فصل و ارتباط موضوعات مختلف آن فصل را به زیبایی بیان کند. نقشه مفهومی این فصل خلاصه‌ای از موارد ذکر شده را بیان می‌کند. امیدوارم که این نقشه ابزاری مفید جهت افزایش دانش دانشجویان رشته مهندسی ژنتیک باشد.

در انتهای این کتاب پیشنهادهایی برای مطالعه بیشتر به همراه نکاتی برای استفاده از اینترنت و شبکه جهانی وب ذکر شده است. هیچ منبعی برای مفاهیم اولیه آورده نشده، چون این‌گونه مطالب از کتاب‌ها و مقالات و با جستجو در سایت‌های مربوط به یافتن مقالات قابل دسترسی است. همچنین بسیاری از مجلات علمی و کتاب‌های مفید در حال حاضر به‌صورت آنلاین از اینترنت قابل دسترسی هستند. یک واژه‌نامه از اصطلاحات کتاب حاضر نیز در آخر تهیه شده است. این بخش می‌تواند برای خوانندگانی که با اصطلاحات بیولوژی مولکولی ناآشنا هستند، مفید باشد.



نقشه مفهومی فصل اول

بخش اول: اساس مهندسی ژنتیک

فصل دوم: معرفی زیست شناسی مولکولی
فصل سوم: کار با اسیدهای نوکلئیک
فصل چهارم: ابزارهای تجارت

فصل دوم: معرفی زیست شناسی مولکولی

خلاصه فصل دوم

اهداف:

* نشان دادن نحوه سازمان‌دهی سیستم‌های زنده در سطح ژنتیکی؛
* توصیف ساختار و عملکرد DNA و RNA؛
* تعیین طرح کلی سازمان ژن‌ها و ژنوم؛
* توصیف فرآیندهای دخیل در بیان ژن و تنظیم آن.

خلاصه فصل/نتایج یادگیری:

بعد از خواندن این فصل به اطلاعات زیر دست خواهید یافت:

* سازمان‌دهی سیستم‌های زنده و درک ویژگی‌های مضر؛
* شیمی سلول‌های زنده؛
*کد ژنتیکی و جریان اطلاعات ژنتیکی؛
* ساختار DNA و RNA؛
* ساختار ژن و سازمان آن؛
* رونویسی و ترجمه؛
* ضرورت تنظیم بیان ژن؛
* سازمان‌دهی ژنوم؛
* ترانس‌کریپتوم و پروتئوم.

لغات کلیدی:

ساختار، عملکرد، ویژگی‌های در حال توسعه، باندهای کووالانسی، اتم، مولکول، ماکرومولکول، لیپید، کربوهیدرات، پروتئین، اسید نوکلئیک، سنتز دهیدراته، هیدرولیز، غشای سلول، غشای پلاسمایی، دیواره سلول، مواد ژنتیکی، پروکاریوت، یوکاریوت، هسته، آنزیم، هتروپلیمر، کد، فراوانی، RNA پیک، رونویسی، ترجمه، مفاهیم بنیادی، تکثیر، آنزیم رونوشت بردار معکوس، جهش، نوکلئوتید، پلی نوکلئوتید، آنتی‌پارالل، پورین‌ها، پیریمیدین‌ها، نوکلئیک اسید دو رشته‌ای، RNA ریبوزومی (rRNA)، RNA ناقل (tRNA)، ریبوزوم، ژن، کروموزوم، جایگاه، هومولوگ، آلل، رشته سنتز کننده پروتئین، پیشبر، واحد رونویسی، اپرون، عمل کننده، پلی سیسترونیک، سیسترون، اینترون، اگزون، پردازش RNA، RNA پلیمراز، آنتی کدون، تنظیم انطباقی، تفکیک، تنظیم توسعه‌ای، ژن خانه‌دار، ژن ساختاری، کاتابولیک، تحریک شونده، پروتئین ممانعت کننده، ژنوم، C-value، پارادوکس C-value، توالی‌های تکراری معکوس، توالی متقارن، DNA پیچیده، توالی تکراری، توالی تک‌نسخه‌ای، خانواده چند ژنی، ترانس کریپتوم، پروتئوم.

این فصل به ارائه مرور مختصری از ساختار و عملکرد DNA و سازماندهی آن در درون ژنوم (کل عناصر ژنتیکی یک موجود) می‌پردازد. همچنین نگاهی به نحوهٔ بیان ژن‌ها پرداخته و روش‌های تنظیم بیان آنها را بررسی می‌کنیم. هدف این فصل این است که خوانندگان غیر تخصصی با مقدمه زیست شناسی مولکولی سلول آشنا شوند اما مطالب کتاب می‌تواند اطلاعات مفیدی را برای افرادی که دارای دانش زمینه‌ای در خصوص DNA هستند ارائه کند. برای کسب توضیحات بیشتر موضوعاتی که در این کتاب بحث شده است، به منابع ارائه شده در قسمت پیشنهادها مراجعه شود.

۲-۱) مسیری که سیستم‌های زنده سازمان‌دهی می‌شوند

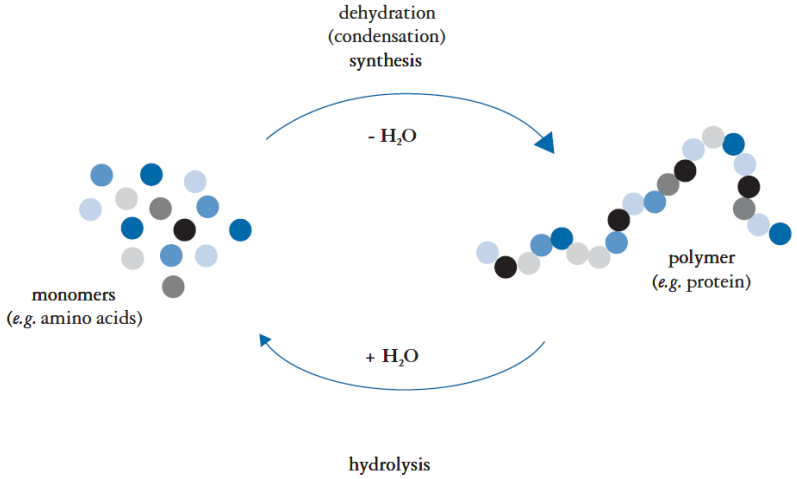
قبل از آنکه نگاهی به زیست‌شناسی مولکولی بیندازیم، شاید بهتر باشد کمی درباره آن فکر کنیم که سلول‌ها چه هستند و سلول‌های زنده چگونه سازماندهی می‌شوند. دو موضوع در این‌جا مفید خواهد بود. اول این که ارتباط خیلی نزدیکی بین ساختار و عملکرد سیستم‌های زنده وجود دارد. دوم این که سیستم‌های زنده نمونه بسیار خوبی برای ویژگی‌های ظهور یافته می‌باشند. این نظریه شبیه این جمله است که «کل مجموعه از مجموع بخش‌ها بزرگ‌تر است»" که بر اساس آن، سیستم‌های زنده به طور سلسله مراتبی سازمان‌دهی می‌شوند که در آن هر مرتبه از سازمان پیچیده‌تر می‌شود. در این سیستم، بخش‌های فعال به‌عنوان اجزاء جدیدی حدوث می‌یابند که به شکل پیچیده‌تری در کنار هم قرار می‌گیرند. مثالی که اغلب در این موارد ارائه می‌شود سدیم فلزی واکنش دهنده و کلر یک گاز سمی می‌باشد که در ترکیب با هم کلرید سدیم (نمک طعام معمولی) را به‌وجود می‌آورند. نمک طعام ماده‌ای غیر سمی است (البته اگر به میزان زیاد مصرف شود مضر خواهد بود). معمولاً پیش‌بینی ویژگی‌های یک سیستم پیچیده‌تر به وسیله بررسی بخش‌های تشکیل دهنده آن مشکل یا غیر ممکن خواهد بود که این یک مشکل عمومی برای دستاوردهای علوم تجربی است.

سیستم‌های زنده به صورت سلسله مراتب و بر مبنای نزدیکی در ساختار و عملکرد آن‌ها سازمان‌دهی می‌شوند.

شیمی سیستم‌های زنده بر عنصر کربن استوار است که می‌تواند چهار پیوند کوالانسی با سایر اتم‌ها تشکیل دهد. با اتصال اتم‌های کربن به هم و مشارکت سایر اتم‌ها، مولکول‌ها به وجود می‌آیند که این مولکول‌ها نیز به نوبه خود به هم متصل می‌شوند تا ماکرومولکول‌ها را به وجود آورند. زیست‌شناسان معمولاً ماکرومولکول‌ها را در چهار گروه لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک قرار می‌دهند. ساخت ماکرومولکول‌ها بر مبنای یک واکنش تغلیطی بین گروهای فعال در مولکول‌هایی که بهم اتصال می‌یابند صورت می‌گیرد. این فرایند دهیدراسیون نام

دارد که با حذف مولکول‌های آب موجب شکل‌گیری یک پیوند کوالانسی می‌شود. در مورد ماکرومولکول‌های پلیمری بزرگ در سلول‌ها (پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک) شاید صدها، هزاران یا حتی میلیون‌ها واحد مونومر به این طریق به هم متصل شوند. پلیمرها را می‌توان با افزودن عناصر آبی جهت تشکیل مجدد گروهای اصلی، به مونومرهای سازنده شان تبدیل کرد. به این فرایند هیدرولیز گفته می‌شود (که در اصل هیدرولیز یا شکست مولکول‌های آب می‌باشد). چرخه مونومر – پلیمر و دهیدراسیون – هیدرولیز در شکل ۲-۱ نشان داده شده است.

مولکول‌های پیچیده (ماکرومولکول‌ها) از اتصال مولکول‌های کوچک با استفاده از فرایند دهیدراسیون تولید می‌شوند.



شکل ۲-۱) چرخه مونومر – پلیمر.

در این مثال نمونه‌ای از اسیدهای آمینه و پروتئین‌ها نشان داده شده است. اسیدهای آمینه (مونومرها) با خروج مولکول‌های آب در فرآیند دهیدراسیون به هم متصل می‌شوند. وقتی به پروتئین دیگر نیازی نباشد، این پروتئین با دریافت مجدد آب (H_2O) در جریان هیدرولیز تجزیه می‌شود. اگرچه بر اساس آن چه که در شکل نشان داده شده است. اگر چه این سیکل ساده به نظر می‌رسد، اما ساخت پروتئین به ترکیبات متعددی نیاز دارد که عملکرد آن‌ها در جریان پیچیده فرآیند ترجمه به نحو مناسبی هماهنگ می شود.

سلول واحد بنیادی یک سازمان در سیستم‌های زنده می‌باشد. اگر چه انواع مختلفی از سلول‌ها وجود دارد، اما برخی ویژگی‌ها در میان تمام سلول‌ها یکسان هستند. غشای سلولی (غشای پلاسمایی) در همه سلول‌ها وجود دارد که به‌صورت یک دیوار، بین محتوای درون سلول و محیط بیرونی عمل می‌کند. برخی سلول‌ها مانند باکتری‌ها، مخمرها و سلول‌های گیاهی ممکن است دارای

دیواره سلولی نیز باشند و بدین وسیله از سلول‌های آن محافظت بیشتری به عمل آید. وجود برخی از مواد ژنتیکی (معمولاً DNA) در سلول، برای تأمین اطلاعات جهت فعالیت سلول‌ها ضروری است و ساختار این اطلاعات ژنتیکی، ابزاری برای طبقه بندی سلول‌ها به شمار می‌رود. در سلول‌های پروکاریوتی (مانند باکتری‌ها)، DNA از بقیه بخش‌های سلول تفکیک نشده است در حالی‌که در سلول‌های یوکاریوتی، DNA درون یک هسته محصور با غشاء قرار گرفته است. همچنین در سلول های یوکاریوتی از غشاهای مختلفی برای ایجاد ساختارهای درونی دیگری استفاده می‌شود. سلول های پروکاریوت عموماً از لحاظ اندازه نسبت به سلول‌های یوکاریوت کوچکترند اما تمام سلول‌ها از نظر اندازه دارای محدودیت هستند. این محدودیت، بیشتر به‌دلیل فائق آمدن بر محدودیت‌های پدیده "انتشار" است، چون انتشار فرایندی ضروری برای تبادل گازها و مواد مغذی درون سلول است. بدین ترتیب سلول‌های باکتریایی دارای ضخامت ۱-۱۰ میکرون و سلول‌های گیاهی و جانوری به ضخامت ۱۰-۱۰۰ میکرون می‌باشند. در یوکاریوت‌های چند سلولی، افزایش اندازه موجود از طریق بزرگتر شدن سلول‌ها صورت نمی‌گیرد بلکه تعداد سلول‌ها بیشتر می‌شوند.

سلول واحد اصلی سازمان در سیستم‌های زنده محسوب می‌شود. سلول‌های پروکاریوتی فاقد هسته سازمان یافته اند، در حالی‌که سلول‌های یوکاریوتی دارای هسته مشخص سازمان یافته هستند.

۲-۲)جریان اطلاعات ژنتیکی

برای درک بهتر مفهوم ساختار اسیدهای نوکلئیک بهتر است کمی در خصوص آنچه در اصطلاح، اطلاعات ژنتیکی گفته می‌شود و برای انجام فعالیت‌های مختلف سلول مورد نیاز است، فکر کنیم. این یک واقعیت جالب توجه است که ویژگی‌های یک موجود زنده به وسیله چهار حرف الفباء و به‌صورت کد سه حرفی رمز شوند. این حروف عبارتند از بازهای نیتروژن دار آدنین (A)، گوانین (G)، سیتوزین (C) و تیمین (T). چگونه این بازها به سلول‌ها امکان می‌دهند تا وظایف خود را انجام دهند؟

حیات به‌وسیله چهار باز نیتروژن دار آدنین (A)، گوانین (G)، سیتوزین (C) و تیمین (T) هدایت می‌شود.

بیان اطلاعات ژنتیکی در نهایت بصورت پروتئین‌ها، به ویژه آنزیم‌هایی که واکنش‌های متابولیکی را کاتالیز می‌کنند بروز می یابد. پروتئین‌ها هتروپلیمرهای فشرده‌ای هستند که از اسید آمینه ها، که تعداد ۲۰ تا از آنها در ساختار پروتئین های طبیعی مورد استفاده قرار میگیرند، ساخته شده‌اند. با توجه به این که یک پروتئین ممکن است دارای چند صد اسید آمینه باشد، و با فرض این که توالی صحیح اسیدهای آمینه از روی اطلاعات ژنتیکی تعیین می‌شود، تعداد پروتئین‌های متفاوتی که

می‌توانند ساخته شوند نامحدود است. از آنجایی که بازها اجزاء اطلاعاتی مهمی به شمار می‌آیند، ما به آسانی محاسبه می‌نماییم که استفاده از هر کدام از بازها به تنهایی نمی‌تواند منجر به ایجاد زمینه کافی (تنها چهار آرایش ممکن) برای کد کردن بیست اسید آمینه شود، زیرا تنها چهار کد ممکن (ترکیبی A, G, C, T) وجود خواهد داشت. در صورتی که بازها به صورت جفتی در کنار هم قرار گیرند، 4^2 یا ۱۶ ترکیب ممکن ایجاد می‌شود که باز هم کافی نیست. ترکیبات سه گانه، 4^3 یا ۶۴ ترتیب مختلف را به وجود می‌آورد که بیش از میزان مورد نیاز است. بنابراین با استفاده از یک سیستم ساده کد دهی می‌توان به تنوع زیادی از اشکال پروتئین و عملکرد آن دست یافت که بنابراین برای نیل به این هدف، به کد سه حرفی تعیین کننده اسیدهای آمینه نیاز است. لذا یک پروتئین ۳۰۰ اسید آمینه‌ای باید حداقل دارای ۹۰۰ نوکلئوتید روی هر رشته DNA باشد. کد ژنتیکی یا "فرهنگ لغت"، همانند مارپیچ دوگانه، بخشی از زیست شناسی مولکولی است که به سمبلی از زیست شناسی تبدیل شده است. اگرچه تعداد کدهای محتمل بیشتری مورد نیاز است (۶۴ در برابر ۲۰)، که سه تا از آنها کد توقف هستند. برای برخی از اسید امینه‌ها تعداد بیشتر از یک کد مورد نیاز است که این وضعیت «هرز کد»[1] نامیده می‌شود. اصطلاح موقعیت لرزان[2] برای نشان دادن اهمیت بیشتر دو باز ابتدایی نسبت به باز سوم در هر کد ژنتیکی به کار می‌رود. این ویژگی‌ها را می‌توان در ارائه استاندارد کد ژنتیکی که در جدول ۲-۱ نشان داده شده است مشاهده کرد.

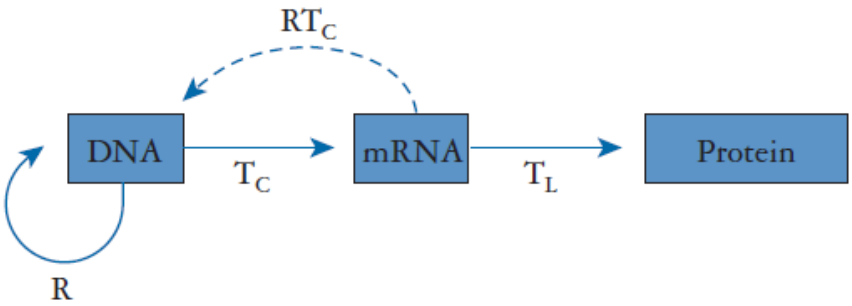
جریان اطلاعات ژنتیکی به طور یک طرفه از DNA به پروتئین به وسیله RNA پیک (mRNA) به‌عنوان یک واسطه صورت می‌گیرد. رونوشت برداری RNA از روی DNA، رونویسی (T_C) و تبدیل اطلاعات ژنتیکی آن به پروتئین، ترجمه (T_L) نامیده می‌شود. این شکل کلی جریان اطلاعات، به‌عنوان **مفهوم بنیادی** در زیست شناسی مولکولی و یک اصل اساسی در کلیه مطالعات بیان ژن شناخته می‌شود. جهت تکمیل این نظریه، دو جنبه دیگر جریان اطلاعات را می‌توان به این الگوی اساسی افزود. اول این که دو برابر شدن مواد ژنتیکی قبل از تقسیم سلولی بیانگر تبدیل DNA به DNA به عنوان تکثیر مولکول DNA شناخته می‌شود. دوم این که بعضی از ویروس‌ها به جای DNA به عنوان ماده ژنتیکی، دارای RNA هستند که برای یک مهندس ژنتیک دارای اهمیت می‌باشد. این ویروس‌ها (عمدتاً از گروه رتروویروس) دارای آنزیمی به نام ترانس کریپتاز معکوس (DNA پلیمراز وابسته به RNA) هستند که از روی ژنوم RNA تک رشته‌ای، مولکول DNA دو رشته‌ای می‌سازد. بنابراین در ویروس‌های دارای RNA، جریان اطلاعات ژنتیکی برعکس جریان اطلاعات طبیعی (مفهوم بنیادی زیست شناسی مولکولی) صورت می‌گیرد. مفهوم بنیادی زیست شناسی مولکولی در شکل ۲-۲ به طور خلاصه نشان داده شده است.

جدول ۲-۱. کدهای ژنتیکی

First base (5′ end)	Second base U	C	A	G	Third base (3′ end)
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

توجه. کدها در جهت 5' به 3' خوانده می‌شوند، بنابراین AUG اسید آمینه متیونین (Met) را کد می‌کند. مخفف سه حرفی برای اسیدهای آمینه عبارتند از: Ala= آلانین، Arg= آرژنین، Asn= آسپاراژین، Asp= آسپارتیک اسید، Cys= سیستئین، Gln= گلوتامین، Glu= گلوتامیک اسید، Gly= گلایسین، His= هیستیدین، Ilu= ایزولوسین، Leu= لوسین، Lys= لیزین، Met= متیونین، Phe= فنیل آلانین، Pro= پرولین، Ser= سرین، Thr= ترئونین، Trp= تریپتوفان، Tyr= تیروزین، Val= والین. سه کد ژنتیکی UAA، UAG و UGA هیچ اسید آمینه‌ای سنتز نمی‌کنند و موجب توقف ترجمه می‌شوند.

جریان اطلاعات ژنتیکی از DNA به RNA و سپس به پروتئین با انجام رونویسی (T_C) و ترجمه (T_L) صورت می‌گیرد. این جریان اطلاعات ژنتیکی، مفهوم بنیادی زیست شناسی مولکولی نامیده می‌شود.



شکل ۲-۲) مفهوم بنیادی

بیانگر این است که جریان اطلاعات ژنتیکی به صورت یک طرفه و از جهت DNA به RNA پیک و سپس به پروتئین صورت می‌گیرد. جریان رونویسی (TC)، ترجمه (TL) و تکثیر DNA از این قانون پیروی می‌کنند. یک استثناء در رتروویروس‌ها (ویروس‌های دارای RNA) وجود دارد، ژنوم این ویروس‌ها دارای RNA بوده و برای ساخت یک نسخه از DNA ژنوم در زمان آلودگی سلول میزبان، از رونویسی معکوس استفاده می‌کنند.

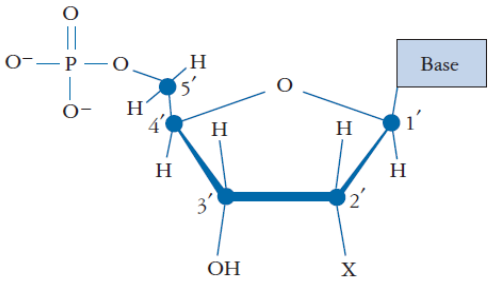
۲-۳) ساختمان DNA و RNA

در بیشتر موجودات، DNA دو رشته‌ای، مادهٔ ژنتیکی اصلی محسوب می‌شود. این مولکول باید دارای چه ویژگی‌هایی باشد؟ در مرحله اول باید پایدار باشد چرا که اطلاعات ژنتیکی در یک موجود زنده باید برای مدت صد سال یا بیشتر به وظایف خود عمل کند. در درجه دوم این مولکول باید قابلیت تکثیر داشته باشد تا انتشار مواد ژنتیکی هم‌زمان با تولید سلول‌های جدید طی رشد و نمو رخ دهد. در درجه سوم این مولکول باید دارای ظرفیت تحمل تغییرات اندک مواد ژنتیکی (جهش) بوده تا فشار تکاملی بتواند تغییرات خود را اعمال کند. مولکول DNA تمام معیارهای ذکر شده یعنی پایداری، قابلیت تکثیر و جهش پذیری را در خود دارد و وقتی که با RNA مقایسه می‌شود نمونه بسیار خوبی برای نشان دادن ارتباط نزدیک بین ساختار، نقش و ویژگی‌های ناشی از آن می‌باشد.

اسیدهای نوکلئیک هتروپلیمرهای متشکل از مونومرهایی به نام نوکلئوتید هستند. در نتیجه زنجیره اسید نوکلئیک، یک پلی نوکلئوتید محسوب می‌شود. مونومرها متشکل از سه جزء؛ یک مولکول قند، یک گروه فسفات و یک باز نیتروژن‌دار هستند. دو نوع اسید نوکلئیک (DNA و RNA) براساس قند موجود در نوکلئوتیدها نام گذاری شده اند که قند موجود در DNA از نوع ۲'-دی اکسی ریبوز (بنابراین DNA، دئوکسی ریبو نوکلئیک اسید خوانده می‌شود) و قند موجود در RNA از نوع ریبوز (ریبو نوکلئیک اسید) می‌باشد. اجزای قند یا فسفات یک نوکلئوتید در تعیین

ویژگی‌های ساختاری پلی نوکلئوتیدها اهمیت داشته و بازهای نیتروژن‌دار در ذخیره اطلاعات و ویژگی‌های انتقال آن‌ها نقش دارند. ساختار یک نوکلئوتید در شکل ۲-۳ خلاصه شده است.

اسیدهای نوکلئیک پلیمرهای متشکل از نوکلئوتید هستند. DNA، دئوکسی ریبو نوکلئیک اسید و RNA، ریبو نوکلئیک اسید می‌باشد.



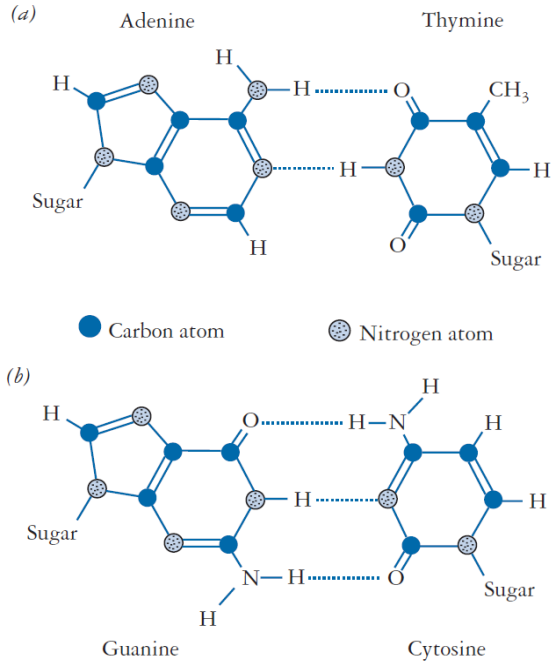
شکل ۲-۳) ساختمان یک نوکلئوتید.

اتم‌های کربن با دوایر توپر و با شماره‌های '1 تا '5 نشان داده شده‌اند. قند در مولکول DNA از نوع دئوکسی ریبوز می‌باشد که در موقعیت X دارای یک اتم هیدروژن (H) است. در مولکول RNA، قند از نوع ریبوز می‌باشد که در موقعیت X دارای یک گروه هیدروکسیل (OH) است. بازهای نیتروژن دار در DNA از نوع آدنین (A)، گوانین (G)، سیتوزین (C) و تیمین (T) و در RNA از نوع آدنین، گوانین، سیتوزین و یوراسیل (U) می‌باشد.

نوکلئوتیدها به وسیلهٔ پیوند فسفودی‌استری در جهت '5 به '3 به هم متصل می‌شوند که مسیر پلی نوکلئوتیدی را تعیین می‌کند. بنابراین انتهای '5 مولکول دارای یک گروه فسفات آزاد و انتهای '3 دارای یک گروه هیدروکسیل آزاد خواهد بود. این موقعیت‌ها نقش مهمی روی ساختار، عملکرد و دست‌ورزی اسیدهای نوکلئیک دارد. در یک مولکول اسید نوکلئیک دو رشته‌ای مانند DNA، زنجیره‌های قند - فسفات، در دو رشته در خلاف جهت هم با یک آرایش موازی و معکوس نسبت به هم قرار می‌گیرند. بازهای نیتروزن دار به دلیل نقش کدگذاری از اجزای مهم اسیدهای نوکلئیک به شمار می‌آیند. بازهای موجود در DNA که در بخش ۲-۱ فهرست شده‌اند عبارتند از آدنین (A)، گوانین (G)، سیتوزین (C) و تیمین(T). در RNA، باز تیمین به وسیله یوراسیل جای‌گزین شده است که عملکرد هر دوی آن‌ها یکسان است. از لحاظ شیمیایی آدنین و گوانین، پورین محسوب شده و دارای یک ساختار دو حلقه‌ای هستند در حالی‌که سیتوزین و تیمین (یوراسیل)، از گروه پیریمیدین بوده و دارای یک حلقه در ساختار خود هستند. در DNA باز آدنین با تیمین و باز سیتوزین با گوانین مکمل هستند. به دلیل محدودیت فضایی مولکول DNA، تنها آرایش قابل

قبول برای جفت شدن بازها، جفت شدن بازهای گروه پورین با بازهای گروه پیریمیدین خواهد بود. بازهای نیتروژن دار به وسیله پیوندهای هیدروژنی به هم متصل می‌گردند که بین تیمین و آدنین دو پیوند و بین سیتوزین و گوانین سه پیوند هیدروژنی برقرار می‌گردد. ساختار و آرایش جفت شدن بازها در چهار باز نیتروژن دار DNA در شکل ۲-۴ نشان داده شده است.

در DNA، بازهای مکمل به‌صورت آدنین – تیمین و گوانین – سیتوزین می‌باشند. جفت شدن بازها به صورت مکمل، کلیدی برای ذخیره، انتقال و استفاده از اطلاعات ژنتیکی می‌باشد.

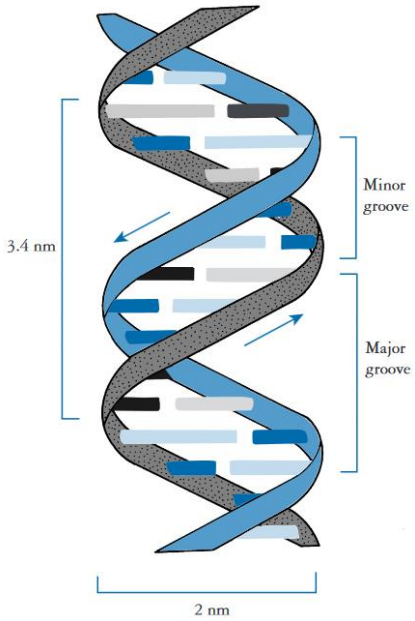


شکل ۲-۴) نحوه جفت شدن بازها در DNA. (a) جفت شدن بازهای آدنین و تیمین توسط دو پیوند هیدروژنی. (b) جفت شدن بازهای گوانین و سیتوزین توسط سه پیوند هیدروژنی.

مولکول DNA در درون سلول زنده معمولاً به‌صورت یک مارپیچ دو رشته‌ای راست گرد به نام شکل B[1] وجود دارد. این ساختار توسط واتسون و کریک در سال ۱۹۵۳ پیشنهاد شده است. دیگر اشکال DNA شامل مارپیچ راست گرد به نام شکل A[2] و مارپیچ چپ گرد به نام شکل Z[3] می‌باشد. همچنین ساختار DNA خود یک بحث پیچیده است به‌ویژه موقعی که آرایش‌های

[1]. B-form
[2]. A-form
[3]. Z-form

پیچیده‌تری از DNA مد نظر باشد. البته در اینجا فقط یک نمایش ساده کافی خواهد بود که در شکل ۲-۵ نشان داده شده است.



شکل ۲-۵) مارپیچ دو رشته‌ای: ملکول DNA در فرم رایج از نوع B است. این مارپیچ راست گرد به قطر ۲ نانومتر است و طول هر پیچ آن ۳/۴ نانومتر با ۱۰ جفت باز در هر پیچ می‌باشد. اسکلت قند-فسفات آنتی پارالل و در جهت 5' به 3' می‌باشد. یکی از زنجیرهای قند-فسفات برای فهم بهتر سایه دار نشان داده شده است. جفت بازهای پورین – پیریمیدین در عرض محور مارپیچ قرار دارند.

ساختار RNA مشابه با DNA است. اختلافات شیمیایی عمده شامل وجود ریبوز به جای ۲'-دئوکسی ریبوز و باز نیتروژن‌دار یوراسیل به جای تیمین در مولکول RNA است. همچنین RNA معمولاً تک رشته‌ای است، اگرچه ممکن است بخش‌های کوتاهی از RNA به‌دلیل وجود بازهای مکمل در توالی خود، دو رشته‌ای باشد. سه نوع اصلی از مولکول RNA در سلول‌ها یافت می‌شود. RNA پیک[۱]، RNA ریبوزومی[۲] وRNA ناقل[۳] RNA ریبوزومی فراوانترین نوع مولکول RNA است که ۸۵ درصد کل RNA سلول را تشکیل می‌دهد. این RNA در ارتباط با ساختار ریبوزوم است که از اجزای ضروری ماشین ترجمه محسوب می‌شود. RNA انتقال در حدود ۱۰ درصد از کل RNA سلول را تشکیل می‌دهد و دارای یک بخش اختصاصی است که امکان الحاق اسید آمینه صحیح در پروتئین در حال ساخت را فراهم می‌کند. RNA پیک، همان گونه که از نامش

مشخص است به عنوان حامل اطلاعات ژنتیکی از DNA به ماشین ترجمه عمل کرده و معمولاً کمتر از ۵ درصد کل RNA سلولی را به خود اختصاص می‌دهد.
RNA ریبوزومی، RNA پیک و RNA ناقل سه نوع مهم از مولکول RNA هستند.

۲-۴) سازماندهی ژن

ژن را می‌توان به‌عنوان واحد پایه اطلاعات ژنتیک در نظر گرفت. ژن‌ها از قرن گذشته، هنگامی که علم ژنتیک پایه ریزی شد مورد مطالعه قرار گرفتند. قبل از پیدایش علم زیست شناسی مولکولی و پیش از درک این واقعیت که DNA از ژن‌های مختلف تشکیل شده است، معمولاً مطالعه ژن به‌صورت غیر مستقیم صورت می‌گرفت، اثرات ژن‌ها در فنوتیپ مشاهده می‌شد و رفتار ژن‌ها آنالیز می‌شد. با وجود محدودیت‌های زیاد این دستاورد، اطلاعات زیادی درباره نحوه عملکرد ژن‌ها به دست آمد و اصول اصلی علم ژنتیک انتقال شکل گرفت.
ژن واحد اساسی اطلاعات ژنتیکی محسوب می‌شود. ژن‌ها روی کروموزوم در جایگاه ژنتیکی ویژه‌ای قرار دارند. اشکال مختلف یک ژن، آلل نامیده می‌شود.
همچنان که ژن‌ها به طور جزئی و دقیق‌تر مطالعه می‌شدند، واژه‌شناسی مربوط به این بخش از ژنتیک، گسترده‌تر شد و نظریات مربوط به ژن‌ها تغییر کرد و اصلاح شد. اصطلاح ژن معمولاً برای بیان اطلاعات ژنتیکی رونویسی شده به یک مولکول RNA است که به نوبه خود به یک پروتئین ترجمه می‌شود. البته استثناهایی برای ژن‌ها وجود دارد که مولکول‌های RNA را کد می‌کنند (مانند rRNA و tRNA) که ترجمه نمی‌شوند. به علاوه نام گذاری که برای سلول‌های پروکاریوتی استفاده می‌شود به‌دلیل روش‌هایی که ژن‌های آن‌ها سازماندهی می‌شوند اندکی متفاوت است. ژن‌ها روی کروموزوم‌ها قرار دارند و ناحیه‌ای از کروموزوم که یک ژن خاص در آن یافت می‌شود، جایگاه آن ژن (لوکوس) نامیده می‌شود. در موجودات دیپلویید که کروموزوم‌های آن‌ها به صورت جفت‌های همولوگ آرایش یافته‌اند، اشکال مختلف یک ژن، آلل نامیده می‌شود.

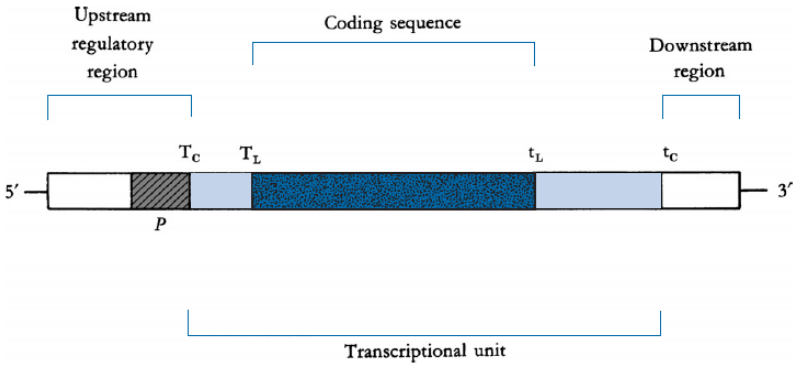
۲-۴-۱) آناتومی یک ژن

اگرچه چیزی به‌عنوان یک فرم آناتومی رایج[1] برای ژن وجود ندارد، اما هر ژنی برای عملکرد خود دارای یک سری نیازهای اساسی است. در حالت عادی هر ژن باید حاوی اطلاعاتی برای بیان یک پروتئین خاص (یا ساخت یک مولکول RNA) باشد. مولکول DNA دو رشته‌ای دارای قابلیت ذخیره اطلاعات ژنتیکی در هر رشته است، اگرچه در بیشتر موجودات برای بیان اطلاعات هر ژن

[1]. Typical gene

فقط از یک رشته استفاده می‌شود. اسامی مختلفی برای این دو رشته به کار می‌روند که ممکن است کمی گیج کننده باشد، از جمله نام‌هایی که برای آن استفاده می‌شود عبارتند از: رشته کد کننده / غیر کد کننده، سنس / آنتی سنس، مثبت / منفی، رونویسی شونده / غیر رونویسی شونده، و رشته الگو / رشته غیر الگو. در برخی موارد، مولفین مختلف از واژه‌های مشابه به روش گوناگون استفاده می‌کنند که به ابهام در این زمینه می‌افزاید.

توصیه‌های اتحادیه بین‌المللی بیوشیمی و اتحادیه بین المللی شیمی محض و کاربردی حاکی از علاقمندی آنها به استفاده از واژه کدکننده و غیر کدکننده می باشد، با توجه به اینکه رشته کدکننده DNA به عنوان رشته شبیه RNA پیک در نظر گرفته می‌شود. در این کتاب نیز این توصیه رعایت می‌شود. از اصطلاح رشته الگو و غیر الگو برای توصیف رشته‌های DNA زمانی استفاده خواهد شد که هیچ عمل کدگذاری همچنانکه در کپی برداری رشته‌های DNA طی روش همسانه‌سازی صورت می‌گیرد، انجام نشود. بنابراین اطلاعات ژنتیکی به وسیله رونویسی رشته غیر کدکننده DNA بیان می‌شود، به طوری که یک مولکول RNA پیک از روی رشته غیر کدکننده DNA ساخته می‌شود دارای توالی شبیه رشته کد کننده DNA می‌باشد (اگرچه RNA به جای تیمین دارای یوراسیل است. شکل (a) ۲-۹) را ببینید. معمولاً زمانی توالی رشته کدکننده گزارش می‌شود که نیاز به اطلاعات توالی یابی DNA باشد، چرا که توالی RNA، در واقع همان توالی رشته کدکننده است. این کار باعث دسترسی آسان به توالی RNA می‌شود.



شکل ۲-۶) سازماندهی ژن. واحد رونویسی مورد نظر مولکول RNA را تولید می‌کند که بوسیله مکان شروع روتویسی (T_C) و پایان رونویسی (t_C) تعریف می‌شود. درون واحد رونویسی، توالی کد کننده، از مکان شروع ترجمه (T_L) تا مکان پایان (t_L) ترجمه قرار دارد. ناحیه تنظیم کننده فرادست علاوه بر پیشبر=پروموتر (P)، احتمالاً دارای عناصر کنترل کننده بیان ژن مانند فعال کننده‌ها یا اپراتورها می‌باشد که محل اتصال RNA پلیمراز می‌باشد.

علاوه بر توالی بازهائی که کدها را در یک ژن کدکننده پروتئین تعیین می‌کنند، توالی‌های تنظیم کننده دیگری نیز در ژن‌ها وجود دارند (شکل ۲-۶). مکانی برای آغاز رونویسی نیاز است که برای این منظور ناحیه‌ای به نام پروموتور[1] وجود دارد که RNA پلیمراز به آن متصل می‌شود. همچنین مکان‌هایی برای شروع و توقف رونویسی وجود دارند. گاهی توالی‌های بین محل شروع و پایان رونویسی در DNA که به RNA رونویسی می‌شود، واحدهای رونویسی نامیده می‌شوند. شاید در بین واحدهای رونویسی، مکان‌های کنترل کننده شامل یک محل آغاز و یک محل توقف برای ترجمه و بیان ژن وجود داشته باشند. سایر توالی‌های مؤثر در کنترل بیان ژن ممکن است در نواحی فرادست یا فرودست ژن وجود داشته باشند.

ژن‌ها دارای نواحی مهم مختلفی هستند. وجود پیشبر برای اتصال RNA پلیمراز به رشته DNA، ضروری است. واحد رونویسی، ناحیه بین شروع و پایان رونویسی محسوب می‌شود.

۲-۴-۲) ساختار ژن در پروکایوت‌ها

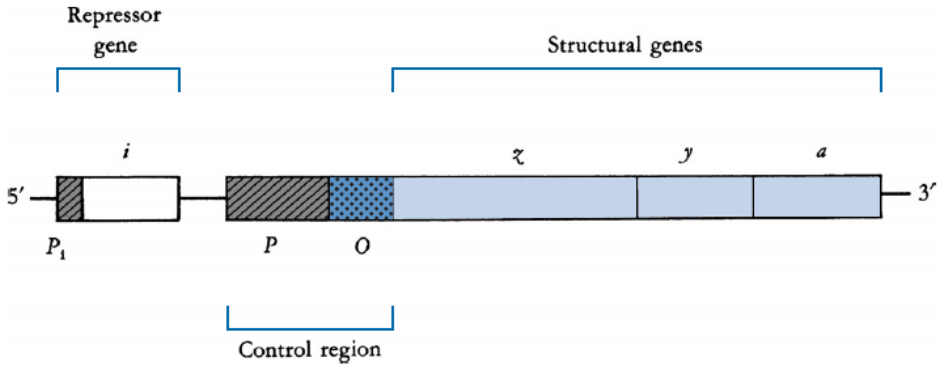
در سلول‌های پروکاریوت مانند باکتری‌ها، ژن‌ها معمولاً به‌صورت گروهی و به شکل اپران[2] وجود دارند. اپران مجموعه‌ای از ژن‌ها است که به هم وابسته هستند (معمولاً آنزیم‌ها را به شیوه متابولیک سنتز می‌کنند) و همگی تحت کنترل یک ناحیه پیشبر/ ناحیه تنظیم کننده قرار دارند. شاید اپران لاکتوز[3] بهترین نمونه از این نوع آرایش باشد (شکل ۲-۷) که آنزیم‌های مربوط به سوخت و ساز لاکتوز را می‌سازد. درون اپران لاکتوز، سه ژن (به نام ژن‌های ساختاری) وجود دارند که چند پروتئین مختلف را کد می‌کنند، همچنین یک ناحیه کنترل کننده در ناحیه فرادست وجود دارد که دارای توالی پیشبر و یک ناحیه تنظیم کننده به نام اپراتور[4] می‌باشد. در این ناحیه کنترلی، یک ناحیه دیگر نیز وجود دارد که به یک مجموعه آدنوزین منوفسفات حلقوی (cAMP) و پروتئین پذیرنده آدنوزین منوفسفات حلقوی (CRP) متصل می‌شود که بصورت تنظیم مثبت در تحریک رونویسی نقش دارد. خارج از ناحیه اپران، ژن ممانعت کننده قرار دارد که پروتئینی به نام لاکتوز[5] را کد می‌کند که با اتصال به اپراتور، موجب ممانعت از اتصال RNA پلیمراز به پیشبر شده و در نتیجه به‌صورت کنترل منفی اپران عمل می‌کند. این واقعیت که ژن‌های ساختاری در پروکاریوت‌ها معمولاً به‌صورت گروهی قرار دارند بدان معنا است که RNA پیک رونویسی شده ممکن است حاوی اطلاعاتی برای بیش از یک پروتئین باشد. چنین مولکولی یک RNA پیک پلی سیسترونیک

---

1. Promoter
2. Operon
3. *lac* operon
4. Operator
5. Lac repressor

نامیده می‌شود به طوری که واژه سیسترون معادل "ژن" بوده که قبلاً تعریف آن ارائه شد (یعنی هر سیسترون یک پروتئین را می‌سازد). بنابراین بیشتر اطلاعات ژنتیکی در باکتری‌ها از طریق RNA پیک پلی سیسترونیک بیان می‌شود که ساخت آن‌ها بر اساس نیاز سلول در هر زمان خاص تنظیم می‌شود. این سیستم منعطف و موثر بوده و سلول را قادر می‌سازد تا به سرعت بتواند با تغییر شرایط محیطی سازگار شود.

ژن‌ها در پروکاریوت‌ها به صورت گروهی در یک اپران، با ژن‌های متعدد تحت کنترل یک ناحیه تنظیمی قرار دارند.



شکل ۲-۷) اپران لاکتوز. ژن‌های ساختاری *lacZ*، *lacY* و *lacA* (با حروف z، y و a مشخص شده است) به ترتیب آنزیم‌های بتا گالاکتوزیداز، گالاکتوزید پرمئاز و ترانس استیلاز را می‌سازند. این مجموعه ژنی توسط یک پیشبر (P) و یک اپراتور (O) کنترل می‌شود. اپراتور مکان اتصال برای پروتئین ممانعت کننده می‌باشد که توسط ژن lacI (i) ساخته می‌شود. ژن سرکوب کننده خارج از اپرون مربوط به خود قرار دارد و توسط پیشبر مربوطه (Pi) کنترل می‌شود.

۲-۴-۳) ساختار ژن در یوکاریوت‌ها

ویژگی مهم سلول‌های یوکاریوتی، وجود یک هسته دارای غشاء می‌باشد که درون آن DNA به شکل کروموزوم ذخیره شده است. در نتیجه، رونویسی درون هسته صورت می‌گیرد و محل رونویسی از محل ترجمه که در ستوپلاسم انجام می‌گیرد، مجزا است. همچنین پیچیدگی فرآیندهای رونویسی و ترجمه در سلول‌های یوکاریوتی با وجود اطلاعات ژنتیکی موجود در میتوکندری‌ها (سلول‌های گیاهی و حیوانی) و کلروپلاست‌های آنها (فقط در سلول‌های گیاهی) بیشتر می‌شود، چون این اندامک‌ها دارای ژنوم مجزا هستند که برای فرآیندهای رونویسی و ترجمه نیز نیاز به مقادیر زیادی از ترکیبات اختصاصی خود دارند. تفکیک ساختارهای ژنومی ارگانل ها و

هسته در یوکاریوت‌ها دارای اثرات مهمی بر تنظیم ژنتیکی و متابولیکی این سلول‌ها دارد و بنابراین ساختار ژن و عملکرد آن در یوکاریوت‌ها بسیار پیچیده‌تر از پروکاریوت‌ها است.

مهم‌ترین کشفی که درباره ژن‌های یوکاریوتی صورت گرفت مربوط به سال ۱۹۷۷ است که طی آن مشخص شد که ژن‌های یوکاریوتی دارای قطعات "اضافی" در DNA خود هستند که در RNA پیک بالغ وجود ندارند. این توالی‌ها، اینترون یا توالی‌های بین ژنی نام دارند و توالی‌هایی که در ساخت RNA پیک بالغ نقش دارند اگزون نامیده می‌شوند. در بسیاری از موارد تعداد و مجموع طول اینترون‌ها از اگزون‌ها بیشتر است. برای مثال در ژن اوالبومین[1] مرغ که دارای ۷ اینترون است، اینترون‌ها بیش از ۷۵ درصد ژن را تشکیل می‌دهند.

ژن‌های یوکاریوتی از ژن‌های پروکاریوتی پیچیده‌تر بوده و معمولاً حاوی توالی‌های بین ژنی (اینترون) می‌باشند. توالی‌های اینترونی قسمتی از رونوشت اولیه در بیان ژن را تشکیل می‌دهند که در جریان پردازش به RNA پیک بالغ، حذف می‌شوند.

همچنان که دانش و اطلاعات ما در این مورد رو به فزونی است، این موضوع که ژن‌های یوکاریوتی معمولاً خیلی پیچیده‌تر هستند و ممکن است واقعا خیلی بزرگ باشند بیشتر شناخته می‌شود. در جدول ۲-۲ چند نمونه از پیچیدگی ژن‌های انسانی نشان داده شده است. این جدول دامنه وسیعی از طول ژن‌های انسانی را نشان می‌دهد که کوچکترین آن‌ها شاید تنها به طول چندصد جفت باز باشند. از طرف دیگر، ژن دیستروفین، بیش از ۲/۴ مگابیس از DNA را روی کروموزوم ایکس به خود اختصاص می‌دهد. این ژن دارای ۷۹ اگزون است که این مقدار، تنها ۰/۶ درصد از طول ۲/۴ مگا بیسی DNA آنرا شامل می‌شود.

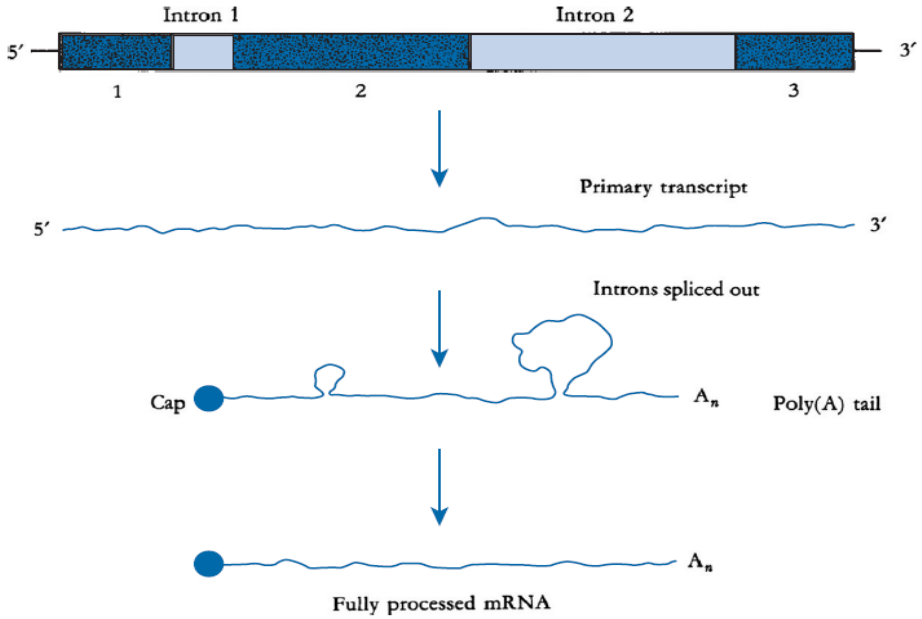
جدول ۲-۲) اندازه و ساختار تعدادی از ژن‌های انساتی

Gene	Gene size (kbp)	Number of exons	% exon
Insulin	1.4	3	33
β-globin	1.6	3	38
Serum albumin	18	14	12
Blood clotting factor VIII	186	26	3
CFTR (cystic fibrosis)	230	27	2.4
Dystrophin (muscular dystrophy)	2400	79	0.6

[1] Ovalbumin

توجه: طول ژن‌ها به جفت کیلوباز (kbp) ارائه شده است. تعداد اگزون‌ها نشان داده شده‌اند و درصد اگـزون نیز در ستون پایانی آورده شده است.

بدیهی است که وجود اینترون‌ها از نقش مهمی در بیان اطلاعات ژنتیکی در یوکاریوت‌هـا برخـوردار هستند و لذا برای آنکه RNA پیک بتواند ترجمه شود، باید حذف شوند. این کـار در هسـته انجـام می‌شود جایی‌که اینترون‌ها از رونوشت اولیه با عمل پیرایش حذف می‌شوند. تغییرات درون سـلولی دیگری در هسته از قبیل افزودن یک کلاهک در انتهای '5 و یک دنباله چند آدنینی بـه انتهـای '3 RNA پیک انجام می‌گیرد. تغییرات مذکور بخشی از یک فرایند محسوب مـی‌شـوند کـه پـردازش RNA[1] نامیده می‌شود و محصول نهایی آن یک RNA پیک عمل کننده است که جهـت ترجمـه به سیتوپلاسم منتقل می‌شود. ساختارهای ژن بتا گلوبین پستانداران و RNA پیک پـردازش شـده آن در شکل ۲-۸ برای نشان دادن ساختار ژن یوکـاریوت و نحـوه پـردازش RNA آن آورده شـده است.



شکل ۲-۸) ساختار و بیان ژن بتا گلوبین پستانداران. این ژن دارای دو توالی بین ژنی یا اینتـرون مـی‌باشـد. توالی‌های بیان شده (اگزون‌ها) با شماره و به رنگ تیره مشخص شده‌اند. رونوشـت اولیـه پـس از پیـرایش و حذف اینترون‌ها و با اضافه شدن کلاهک و دم چند آدنینی به RNA پیک فعال تبدیل می‌شود.

[1] RNA processing

۲-۵) بیان ژن

همچنان که در شکل ۲-۲ نشان داده شده است، جهت جریان اطلاعات ژنتیکی از DNA به سمت پروتئین است. درحالی که برای درک اصول مهندسی ژنتیک نیازی به داشتن اطلاعات جزئی و مفصل از بیان ژن نیست اما، آشنایی با ویژگی‌های اساسی رونویسی و ترجمه و نیز داشتن اطلاعاتی درباره نحوه کنترل بیان ژن، مفید و قابل استفاده خواهد بود.

۲-۵-۱) از ژن‌ها تا پروتئین‌ها

در اینجا شاید سودمند باشد تا به مقایسه‌ای که من آن را در باره نقش ژن‌ها در تعیین ساختمان و عمل سلول مفید یافته‌ام، بپردازم. ممکن است واژه انگشت نگاری ژنتیکی[1] را که برای توصیف ژنوم به‌کار می‌رود، شنیده باشید. هر چند این یک مثال خیلی ساده‌ای است، من ترجیح می‌دهم از مقایسه یک برنامه تهیه غذا برای توصیف نحوه عمل ژن‌ها و پروتئین‌ها استفاده کنم. اجازه دهید تصور کنیم که می‌خواهیم یک کیک درست کنیم، دستورالعمل کار (ژن) در یک کتاب مشخص (کروموزوم)، در صفحه‌ای مشخص از آن (لوکوس)، و به شکل اطلاعاتی در قالب کلمات (کدون‌ها) خواهد بود. در بخشی از دستورالعمل ممکن است بخوانید "۴۰۰ گرم شکر اضافه کنید و خوب هم بزنید" که این جمله نسبتاً واضح و بدون ابهام است. زمانی که تمام اجزا در کنار هم قرار گیرند و کیک پخته شود نتیجه کار یک کیک می‌باشد که شما نمی‌توانید شکر را به عنوان یک ترکیب مشخص در آن ببینید، اما از سوی دیگر، کشمش یا زغال اخته را می‌توان به صورت مجزا و یک بخش قابل تشخیص کیک، مشاهده کرد. به طور مشابه، برخی ویژگی‌های یک موجود به وسیله ژن‌های متعددی تعیین می‌شوند که در آن، محصول یک ژن خاص، قابل ردیابی نخواهد بود. برعکس در صفات تک ژنی، اثر یک ژن خاص ممکن است به آسانی به صورت یک ویژگی فنوتیپی مشخص گردد.

شاید بهتر باشد به جای انگشت نگاری ژنتیکی، از مفهوم «دستورالعمل کاری» برای توصیف اطلاعات ژنتیکی استفاده شود.

جهش نیز می‌تواند در این دستور کار مورد توجه قرار گیرد به طوری که شدت نسبی هر جهش می‌تواند ایده‌ای برای اثر جهش‌های مختلف ارائه دهد. اگر به مثال شکر خودمان بازگردیم، اثر قرار گرفتن ۱ به جای صفر رقم آخر در عدد ۴۰۰ گرم شکر و در نتیجه ۴۰۱ گرم شکر چه خواهد بود؟ این تغییر تقریباً قابل ردیابی نخواهد بود. با این وجود اگر ۴ در عدد ۴۰۰ به عدد ۹ تغییر یابد یا یک صفر دیگر به عدد ۴۰۰ اضافه شود در این حالت داستان فرق خواهد کرد (و خیلی شیرین‌تر

---

[1]. Genetic blueprint

خواهد شد!). بنابراین جهش‌ها در بخش‌های غیر ضروری ژن، ممکن است بدون تأثیر باشند، در حالی که جهش در نواحی مهم می‌تواند عواقب خیلی بدی داشته باشد. در برخی موارد اضافه شدن یا جایگزینی یک باز می‌تواند اثر چشمگیری داشته باشد (تصور کنید به جای g یک k در جلوی ۴۰۰g قرار گیرد). مثال دستورالعمل، تشبیه خوبی است چراکه اولاً نقش خود دستورالعمل (بعنوان عاملی که مشخص می‌کند چه اجزایی باید در کنار هم قرار بگیرند) را تعیین می‌کند و همینطور بعد، نشان می‌دهد که اطلاعات موجود در دستورالعمل تنها بخشی از ماجرا است. اگر کیک، حتی با وجود نسبت‌های صحیح اجزای تشکیل دهنده آن به خوبی مخلوط یا پخته نشود، موفقیتی حاصل نخواهد شد. ژن‌ها حاوی اطلاعاتی درباره تعیین نوع پروتئین‌ها هستند اما کل فرایند باید به‌طور دقیق کنترل و تنظیم شود تا سلول به طور کارآمد نقش خود را ایفا نماید.

اثرات ناشی از جهش بر اساس نوع جهش و مکان آن در توالی ژن، می‌تواند محدود یا شدید باشد.

۲-۵-۲) رونویسی و ترجمه

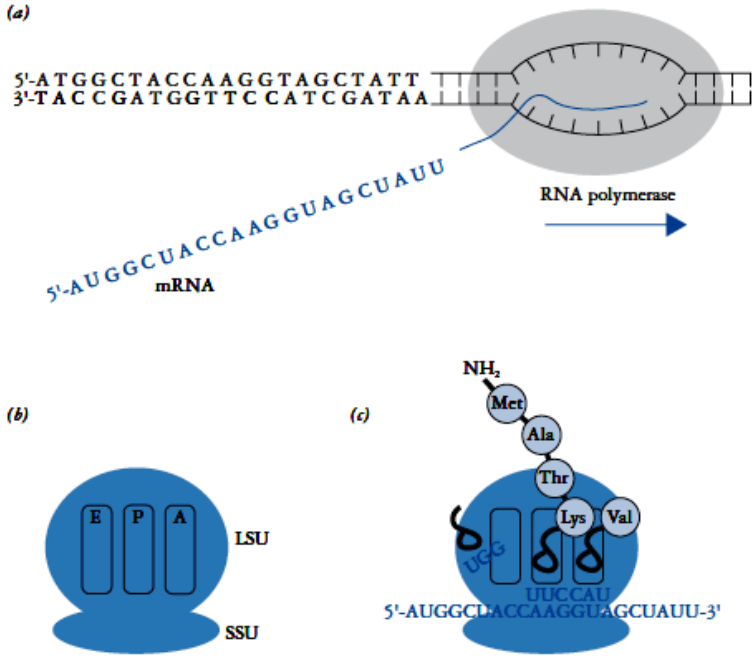
رونویسی و ترجمه دو فرایند بسیار مهم در تولید پروتئین‌های فعال در سلول هستند. رونویسی، ساخت یک RNA از روی رشته الگوی DNA می‌باشد که از روی رشته غیر کد کننده مجموعه رونویسی انجام می‌شود. آنزیم مسئول رونویسی، RNA پلیمراز (RNA پلیمراز وابسته به DNA) می‌باشد. در پروکاریوت‌ها تنها یک آنزیم RNA پلیمراز وجود دارد، اما در یوکاریوت‌ها سه نوع آنزیم RNA پلیمراز وجود دارند (RNA پلیمراز ۱، ۲ و ۳). این آنزیم‌ها در یوکاریوت‌ها به ترتیب مسئول ساخت RNA های ریبوزومی، RNA پیک و RNA منتقل کننده 5S ریبوزومی می‌باشند. تمام RNA پلیمرازها، پروتئین‌های بزرگ چند زیرواحدی با وزن مولکولی حدود ۵۰۰۰۰۰ دالتون هستند.

رونویسی دارای چندین مرحله است: ۱) اتصال RNA پلیمراز به رشته DNA، ۲) شروع ساخت رشته RNA، ۳) طویل شدن رشته RNA، ۴) اتمام ساخت رشته RNA و آزاد سازی RNA ساخته شده. ساختار پروموتر در تعیین مکان اتصال RNA پلیمراز مهم است اما در این جا بحث ما در مورد پیشبر نیست. زمانی‌که مولکول RNA ساخته می‌شود ممکن است بدون تحمل تغییر، برای ترجمه مورد استفاده قرار گیرد (همانند آن چه در پروکاریوت‌ها اتفاق می افتد) و یا این که RNA آزاد شده قبل از ترجمه، پردازش شده و آنگاه برای ترجمه، از هسته به سیتوپلاسم منتقل شود (همانند آن چه که در یوکاریوت‌ها صورت می‌گیرد).

در فرایند ترجمه به یک مولکول RNA پیک، مجموعه‌ای از RNAهای انتقال دهنده (مولکول‌های RNA انتقالی به همراه واحدهای اسید آمینه مربوطه) و ریبوزوم‌ها (شامل RNA ریبوزومی و پروتئین‌های ریبوزومی) نیاز می‌باشد. ریبوزوم مکانی است که در آن پروتئین سازی

صورت می‌گیرد. در پروکاریوت‌ها، ریبوزوم‌ها از سه RNA ریبوزومی و ۵۲ پروتئین ریبوزومی مختلف تشکیل شده ا ند. ریبوزوم دارای ساختار پیچیده‌ای است که در واقع به عنوان یک «jig» عمل می‌کند و RNA پیک را به گونه‌ای نگه می‌دارد که کدون‌ها با آنتی کدون‌های مناسب موجود در RNA انتقالی منطبق می‌شوند و بنابراین اطمینان حاصل می‌شود که اسید آمینه مناسب به زنجیر پلی‌پپتید در حال ساخت اضافه خواهد شد. مولکول RNA پیک در جهت 5' به 3' ترجمه می‌شود و طویل شدن پلی‌پپتید از جهت انتهای آمینی[1] به سمت انتهای اسیدی[2] صورت می‌گیرد.

فرایند تطابق کدون/آنتی‌کدون بیانگر رابطه بین اسید نوکلئیک و پروتئین است.



شکل ۲-۹) رونویسی و ترجمه. (a) رونویسی، روند ساخت RNA پیک توسط RNA پلیمراز می‌باشد. بخشی از توالی DNA و RNA پیک نشان داده شده است. RNA پیک دارای توالی مشابه رشته کد کننده پروتئین در DNA (رشته غیر الگو) می‌باشد که البته باز یوراسیل به وسیله باز تیمین جایگزین شده است. (b) ریبوزوم، متشکل از قطعه بزرگ (LSU[3]) و قطعه کوچک (SSU[4])، مکانی برای ترجمه پروتئین محسوب می‌شود که هر جز آن از مولکول‌های RNA ریبوزومی و پروتئین‌های مختلفی تشکیل شده است. سه جایگاه در هر ریبوزوم وجود دارد: مکان‌های آمینواسیل (A) و پپتیدیل (P) در جایگذاری

---

[1]. N terminus
[2]. C terminus
[3] Large subunit
[4] Small subunit

ترکیب مناسب RNA انتقالی و حامل اسید آمینه مربوطه در زنجیره پلی‌پپتید در حال ساخت، نقش دارند. جایگاه خروج (E[1])، عمل آزاد سازی RNA انتقالی بعد از تشکیل باند پپتیدی بین اسید آمینه های مربوطه و خروج متعاقب آنرا تسهیل می‌کند. (c) شروع ترجمه RNA پیک. اسید آمینه مناسب در تطابق بین کدون و آنتی کدون، به زنجیره پروتئینی اضافه می‌گردد. اولین اسید آمینه به وسیله کدون AUG در RNA پیک (آنتی کدون TAC در RNA انتقالی) تعیین می‌شود که متیونین دارد (برای شناخت کدهای ژنتیکی به جدول ۲,۱ مراجعه شود). توالی‌های بعدی به همین روش ترجمه می‌شوند. ریبوزوم با ساختن پلی‌پپتید از جهت انتهای آمینی خود، RNA پیک را در جهت '5 به '3 ترجمه می‌کند. واحدهای زنجیره پلی‌پپتید به وسیله پیوندهای پپتیدی به هم متصل می‌شوند.

اگرچه رونویسی و ترجمه فرایندهای پیچیده‌ای هستند، اما ویژگی‌های مهم آن (با توجه به جریان اطلاعات ژنتیکی) به طور خلاصه در شکل ۲-۹ نشان داده شده اند. این شکل همراه با توضیحات مختصری که قبلا ارائه شد می‌تواند اطلاعات پایه‌ای مناسبی درباره ساختار و بیان ژن فراهم آورد و در فصول بعدی هر جا که لازم باشد به این مطالب ارجاع می‌شود.

۲-۵-۳) تنظیم بیان ژن

رونویسی و ترجمه، ساز و کارهایی را فراهم می‌آورند که طی آن ژن‌ها بیان می‌شوند. با این وجود واضح است که بیان ژن به گونه‌ای صورت می‌گیرد که محصولات واقعی ژن در زمان مناسب درون سلول تولید شود. چرا این تنظیم بسیار اهمیت دارد؟ بیایید دو نوع سلول را در نظر بگیریم. یک سلول باکتریایی و یک سلول انسانی. سلول‌های باکتریایی نیاز دارند تا بتوانند بر تغییرات متعددی که در شرایط محیطی‌شان صورت می‌گیرد غلبه کنند. بنابراین باید تمام مواد ژنتیکی خود را به صورت آماده باش در آورند تا هر جا که نیاز به فرآورده ژن باشد فورا از روی ژنوم خود آن را بسازند. باکتری‌ها با نگهداشتن ژنوم خود در حالت آماده باش، انرژی خود را حفظ می‌کنند (از طریق جلوگیری از تولید پروتئین‌های غیر ضروری) و می‌توانند به سرعت بر هر تغییر احتمالی در دسترسی به مواد غذایی پاسخ دهند. این مثالی از تنظیم سازگار[2] بیان ژن می‌باشد.

بیان ژن‌های پروکاریوتی معمولاً در واکنش به پیام‌های خارجی مانند دسترسی به مواد غذایی تنظیم می‌شوند.

در مقایسه با باکتری‌ها، سلول‌های انسانی معمولاً شرایط محیطی بسیار متفاوتی را تجربه می‌کنند. سلول‌های انسانی خیلی تخصصی و تمایز یافته می‌باشند و شرایط محیطی آن‌ها که به وسیله مکانیسم‌های خود کنترلی سلول تنظیم می‌شود معمولاً ثابت است و این سیستم موجب می‌شود تا

[1] Exit
[2]. Adaptive regulation

نوسانات زیادی در شرایط محیطی سلول به وجود نیاید. بنابراین تخصص یافتگی سلول انسانی موجب عملکرد پیچیده‌تر آن می‌شود، اما این سلول‌ها برای ایفای نقش خود به شرایط کنترل شده‌تری نیاز دارند. تمایز (سلول‌ها) در طی فرآیند رشد (ارگانیسم) حاصل می‌شود و بنابراین میزان بیان ژن‌ها در یوکاریوت‌های چند سلولی، معمولاً در مرحله نمو تنظیم می‌شوند. تنظیم بیان ژن طی نمو و چرخه زندگی یک موجود زنده، همچنان که انتظار می‌رود، پیچیده است. علاوه بر ژن‌هایی که بیان آنها کنترل و تنظیم می‌شوند، نمونه‌های متعددی از فرآورده‌های ژنی وجود دارند که در تمام عمر سلول، بیان آنها لازم هستند. چنین ژن‌هایی گاهی ژن‌های اصلی یا خانه‌دار[1] نامیده می‌شوند که فعالیت این ژن‌ها در سلول، غیر قابل تنظیم هستند و پروتئین‌هایی را می‌سازند که بیان آنها در تمام زمان‌ها برای سلول لازم می‌باشند (همانند آنزیم‌های مسیرهای کاتابولیک اولیه).

ژن‌های یوکاریوتی معمولاً در واکنش به عوامل درونی موجود زنده تنظیم می‌شوند.

اگرچه بحث مفصل کنترل بیان ژن خارج از حوصله این کتاب است اما می‌توان اصول اصلی بیان ژن را با ارئه نحوه تنظیم اپران‌های باکتریایی نشان داد. یک سلول باکتریایی (که خارج از محیط آزمایشگاهی زندگی می‌کند) دامنه وسیعی از شرایط محیطی را تجربه می‌کند. به ویژه تغییراتی که در قابلیت دسترسی به مواد غذایی رخ می‌دهند. اگر سلول بخواهد زنده بماند باید انرژی خود را حفظ کند ~~که~~ و برای این منظور باید از ساخت پروتئین‌های غیر ضروری خودداری نماید. بنابراین سلول‌های باکتریایی مکانیسم‌هایی دارند که می‌توانند فعالیت اپران‌ها (که در تنظیم بیان ژنها دخالت می کنند) را با میزان حساسیت بالایی کنترل کنند. اپرانی که پروتئین‌های مسیر کاتابولیک را کد می‌کند (مسیری که مواد را می‌شکند تا انرژی آزد کند) معمولاً زمانی فعال خواهد شد که ماده مورد نظر در محیط خارجی سلول وجود داشته باشد. بنابراین هنگامی‌که ماده مورد نظر در دسترس وجود نداشته باشد، سیستم‌هایی وجود دارد که اپران‌های کاتابولیک را به حالت خاموش در می‌آورد. این نوع اپران‌ها را اپران‌های **القائی** گویند و معمولاً به وسیله یک مکانیسم کنترل منفی تنظیم می‌شوند که در این مکانیسم یک **پروتئین سرکوبگر** از دسترسی RNA پلیمراز به پیشبر جلوگیری می‌کند. مثال بارز و معروف یک اپران کاتابولیک، اپران لاکتوز است (که ساختار آن در شکل ۲-۷ نشان داده شده است). زمانی که لاکتوز حضور نداشته باشد پروتئین سرکوبگر به اپراتور متصل شده و سیستم خاموش خواهد ماند. سیستم اپران لاکتوز اندکی "نشتی" دارد به این معنی که مقادیر کم پروتئین‌های ساخته شده توسط این اپران (گالاکتوزیداز، پرمئاز و ترانس استیلاز) همواره در سلول وجود دارند وقتی که لاکتوز در محیط وجود داشته باشد، این لاکتوز به

[1]. Housekeeping genes or constitutive genes

وسیله آنزیم پرمئاز به درون سلول منتقل شده و با اتصال به سرکوبگر سبب تغییر آرایش فضائی (شکلی) آن شده به گونه‌ای که پروتئین سرکوبگر نمی‌تواند به اپراتور متصل شود. بنابراین کنترل منفی برداشته می‌شود و لذا RNA پلیمراز به اپران دسترسی خواهد داشت. سطح دوم کنترل بر اساس میزان آدنوزین منو فسفات حلقوی (cAMP) شکل می‌گیرد به طوری که فعالیت کامل اپرون تنها در زمانی شکل می‌گیرد که لاکتوز در محیط وجود داشته باشد و سطح انرژی هم پایین باشد. این مکانیسم کنترل دوگانه یک راه بسیار موثر برای تنظیم بیان ژن است و سطوح بیان ژن را به گونه‌ای تنظیم می‌کند که می‌توان گفت بجای یک کلید روشن – خاموش، بیشتر شبیه به یک کلید دوپل عمل می‌کند. اپران‌های کاتابولیک مانند سیستم اپران لاکتوز، به گونه‌ای عمل می‌کنند که تنها زمانی بیشترین میزان آنزیم‌های این سیستم در سلول ساخته می‌شود که واقعاً به وجود آن‌ها نیاز باشد.

تنظیم بیان ژن در باکتری‌ها به معنی ایجاد شرایطی است که در آن شاهد سطوح مختلف بیان ژن‌ها هستیم بجای اینکه فقط شاهد خاموش/ روشن شدن آنها باشیم.

۲-۶) ژن‌ها و ژنوم‌ها

هنگامی‌که روش‌های آزمایشگاهی اندازه گیری DNA شکل گرفت، طبیعتاً اولین تلاش‌ها معطوف به شناسایی ساختار ژن گردید. اگر چه ژن‌ها به تنهایی وجود ندارند اما بخشی از ساختار ژنوم موجود را تشکیل می‌دهند. طی چند سال اخیر تلاش‌ها در زیست شناسی مولکولی کمی تغییر مسیر داده و ما امروزه با اطمینان بیشتری ژنوم را به عنوان یک جزء کلی‌تر (تقریبا به عنوان نوعی اندامک سلولی) و نه فقط مجموعه‌ای از ژن‌ها در نظر می‌گیریم. پروژه ژنوم انسانی (در فصل ۱۰ بحث شده است) مثال خوبی از گسترش گرایش بیوانفورماتیک به‌عنوان یکی از فعال‌ترین زمینه‌های تحقیقاتی در زیست شناسی مولکولی مدرن است.

ژنوم به مجموعه محتویات DNA سلول اطلاق می‌گردد.

۲-۶-۱) اندازه پیچیدگی ژنوم

میزان DNA در ژنوم هاپلویید، C-value نامیده می‌شود. تصور این‌که با افزایش پیچیدگی یک موجود، طول ژنوم آن باید افزایش یابد، منطقی به نظر می‌رسد لذا تعداد ژن بیشتری برای ایجاد پیچیدگی ژنوم نیاز است. اطلاعات جدول ۲-۳ نشان می‌دهد که طبق انتظار، اندازه ژنوم با میزان پیچیدگی موجود رابطه مستقیم دارد. ژنوم باکتری‌ها، مخمرها، مگس میوه و انسان از این الگو تبعیت می‌کنند. با این وجود موش، توتون و گندم ژنوم بسیار وسیع تری نسبت به انسان دارند. این امر، نسبتا عجیب به نظر می‌آید چرا که تصور مستقیم این است که گیاه گندم به پیچیدگی نوع

انسان نیست. همچنین از آنجایی که باکتری *E.coli* تقریبا دارای ۴۰۰۰ ژن است به نظر می‌رسد که ژنوم گیاه توتون باید دارای ظرفیت کد کردن ۴۰۰۰۰و۴۰۰۰۰ ژن را داشته باشد. اما این افزایش، حتی با احتساب افزایش اندازه و پیچیدگی ژنهای توتون که به‌عنوان ژنوم یوکاریوتی باید دارای طول و پیچیدگی بیشتری باشند، اتفاق نمی‌افتد. این انحراف معنی گاهی پارادوکس C-value نامیده می‌شود.

جدول ۲-۳) طول ژنوم در تعدادی از موجودات

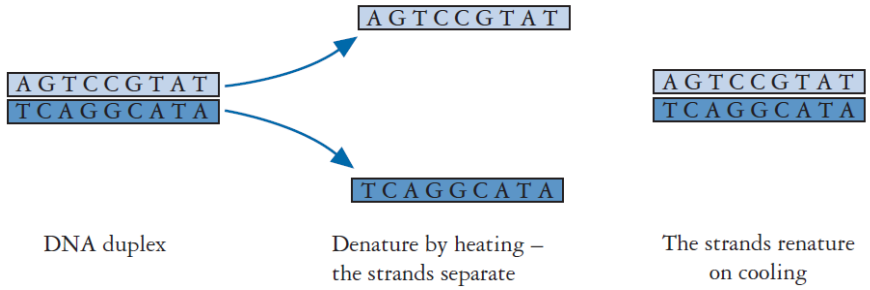
Organism	Genome size (Mb)
Escherichia coli (bacterium)	4.6
Saccharomyces cerevisiae (yeast)	12.1
Drosophila melanogaster (fruit fly)	150
Homo sapiens (man)	3000
Mus musculus (mouse)	3300
Nicotiana tabacum (tobacco)	4500
Triticum aestivum (wheat)	17000

توجه. طول ژنوم به جفت مگا بیس نشان داده شده است (یک جفت مگا بیس = $۱۰^{۶}$ ×۱ بیس).

علاوه بر طول ژنوم، پیچیدگی ژنوم نیز با پیچیده‌تر شدن موجود بیشتر می‌شود. بررسی باز سرشته یا رناتوره شدن[1] DNA، روشی برای مطالعه پیچیدگی ژنوم می‌باشد. اگر دو رشته DNA با حرارت از هم جدا و واسرشته یا دناتوره شوند، آنگاه با کاهش درجه حرارت، رشته‌های مکمل مجددا به حالت اولیه خود باز گشته یا رناتوره می‌شوند (شکل ۲-۱۰). برای شناخت پیچیدگی توالی DNA، می‌توان از این ویژگی بهره برد؛ توالی‌هایی که به‌صورت نسخه‌های متعدد در ژنوم وجود دارند نسبت به توالی‌هایی که تنها یک نسخه در ژنوم دارند سریع‌تر به حالت اولیه دو رشته‌ای باز خواهند گشت. با انجام این روش می‌توان نشان داد که DNA یوکاریوتی از چهار کلاس با فراوانی متفاوت تشکیل شده است. اولین کلاس DNA یوکاریوتی از لحاظ سرعت بازگشت به حالت اولیه، آن دسته از DNA هایی هستند که فوراً ساختار دو رشته‌ای تشکیل می‌دهند زیرا رشته‌های واسرشته شده در این حالت دارای نواحی مکمل، مانند **توالی‌های تکراری معکوس** (**Inverted Repeats**) یا توالی‌های برگشتی مشابه[2] (**توالی های پالندرومیک**) هستند که

[1]. Renaturation
[2]. Palindromes

روی یکدیگر پیچیده یا تنیده می‌شوند و ساختار لوپ مانند سنجاق سری[1] به‌وجود می‌آورند. این نوع از DNA معمولاً DNA **فولد بک**[2] نامیده می‌شود. دومین کلاس DNA یوکاریوتی بر اساس سرعت بازگشت به حالت اولیه پس از دناتوره شدن، DNA هایی هستند که دارای توالی‌های **پر تکرار** (Repetitive Sequences) بوده و به وفور در ژنوم وجود دارند. دسته سوم توالی‌های DNA با تکرار متوسط هستند و درنهایت در رده چهارم، توالی‌های DNA تک نسخه‌ای یا منفرد (منحصربفرد) قرار می‌گیرند که به ندرت تحت شرایط به کار رفته برای این آزمایش، به حالت اولیه پس از باز سرشته بر می‌گردند. در فصول ۱۰ و ۱۲ نحوه استفاده از توالی‌های تکراری DNA برای نقشه برداری ژنوم[3] و تهیه پروفایل DNA[4] بررسی خواهد شد.



شکل ۲-۱۰) اساس هیبریداسیون اسید نوکلئیک.

این ویژگی مولکول‌های DNA، یک بخش مهم در زمینه فرآیندهای موثر بر دست ورزی ژن و همچنین یک ویژگی مهم حیاتی بشمار می رود. بنابراین جفت شدن بازهای آدنین با گوانین و سیتوزین با تیمین (شکل ۲-۴) مفهوم ژرفی برای سیستم‌های زنده و کاربردهای فناوری DNA نوترکیب ارائه می‌دهد.

ژنوم یوکاریوتی می‌تواند دارای انواع مختلفی از توالی‌های تکراری باشد.

۲-۶-۲) سازماندهی ژنوم

پارادوکس C-value و پیچیدگی توالی ژنوم‌های یوکاریوتی، پرسش‌هایی را درباره نحوه ساماندهی ژنوم پدید می‌آورد. ویروس‌ها و باکتری‌ها نشان‌دهنده استفاده بهینه و حداکثری از DNA در کدکردن ژن‌های‌شان می‌باشد که این موضوع نتیجه (و همینطور توصیف کننده) اندازه کوچک ژنوم

---

1. Hairpin loop
2. Foldback
3. Genome mapping
4. DNA profiling

آن‌ها است. در مقابل در ژنوم انسان تنها حدود ۳ درصد از مجموع DNA، توالی کدکننده هستند. حتی زمانی‌که اینترون‌ها و توالی‌های کنترل کننده نیز به مجموع این توالی کد کننده DNA اضافه شوند، بخش اعظم DNA عملکرد مشخصی ندارد. این توالی‌های غیر کد کننده گاها DNA آشغال[1] نامیده می‌شوند هر چند شاید این طرز تفکر در باره این DNAهای زائد (Redundant) اشتباه باشد.

قسمت عمده ژنوم انسان در تولید پروتئین نقش ندارد.

تخمین تعداد صحیح ژن‌ها در یک موجود خاص معیار علمی دقیقی ندارد و از روش‌های مختلفی برای این منظور استفاده می‌شود. البته زمانی که توالی کامل ژنوم موجودی تعیین شود، واضح است که شناسایی ژن‌ها نیز بسیار آسان‌تر صورت می‌گیرد، باوجوداین موارد متعددی وجود دارند که توالی‌های کد کننده ژن شناسایی شده‌اند اما عملکرد بیولوژیکی ناشی از پروتئین تولید شده آن‌ها مشخص نیست.

تعداد زیادی از ژن‌ها در یوکاریوت‌ها فقط دارای یک نسخه هستند و تمایل دارند که در میان کروموزوم‌های متعدد موجود در هسته سلول‌های یوکاریوتی پراکنده باشند. سایر ژن‌ها بخشی از **خانواده‌های چند ژنی**[2] را تشکیل داده و ممکن است به صورت گروهی در یک جایگاه کروموزومی خاص قرار گرفته یا به صورت پراکنده روی کروموزوم‌ها قرار گیرند. در مطالعه ساختار ژن در قالب تعریف ژنوم، مفاهیمی چون چگالی ژنی، طول ژن، طول RNA پیک، فاصله بین ژنی و طول اینترون/اگزون شاخص های مهمی هستند. اولین بررسی‌ها روی DNA انسان نشان داد که میانگین طول یک ناحیه کند کننده تقریباً حاوی ۱۵۰۰ جفت باز است و میانگین طول یک ژن حدود ۱۰-۱۵ جفت کیلو باز است. چگالی ژنی یک ژن تقریباً در هر ۴۰-۴۵ جفت کیلو-بیس و فاصله بین ژنی هم تقریباً ۲۵-۳۰ جفت کیلو-بیس است. هر چند، همان گونه که قبلا نیز دیدیم، ساختار ژن در یوکاریوت‌ها می‌تواند خیلی پیچیده باشد و بنابراین استفاده از تخمین‌های "میانگین" کمی گمراه کننده‌اند. واضح است که در حال حاضر بررسی ژنوم‌ها اطلاعات جدیدتری در باره ساختار ژن و عملکرد آن فراهم می‌کند و همینطور که پروژه‌های توالی‌یابی ژنوم، اطلاعات و داده‌های بیشتری در دسترس قرار می‌دهند، وارد دوره ای آنی می‌شویم که گاهی دوره بعد از ژنومی (Post-genomic) نامیده می‌شود.

---

1. Junk
2. Multigene families

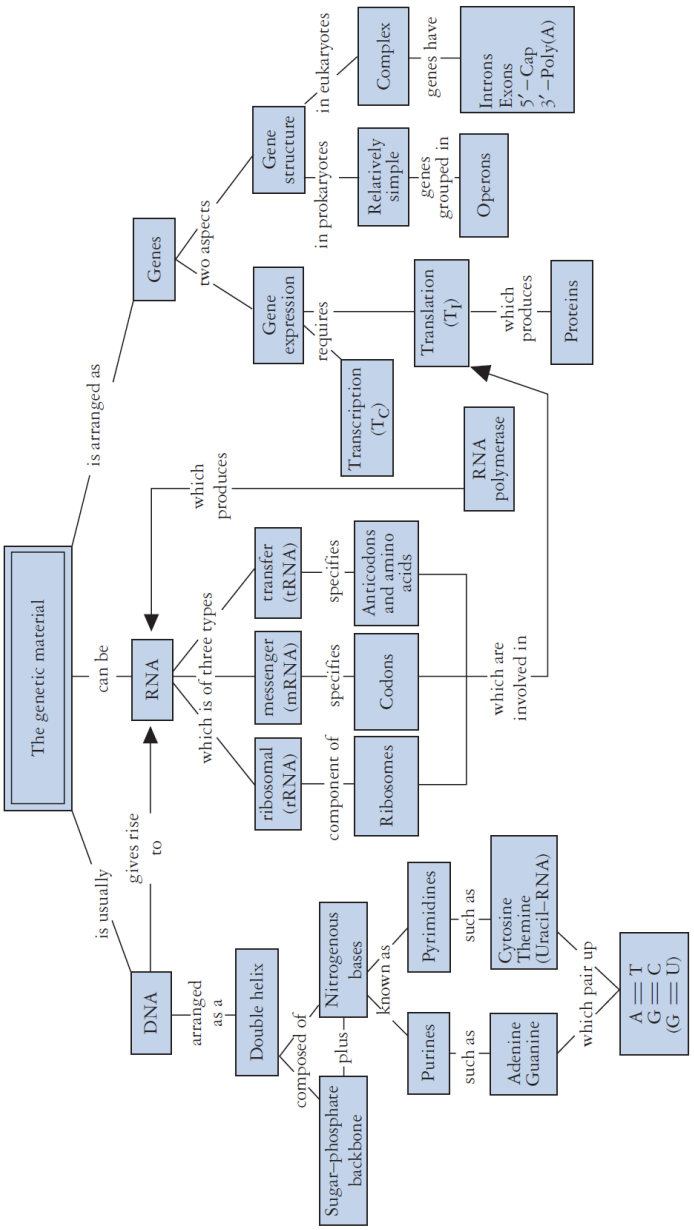
۲-۶-۳) ترانس‌کریپتوم و پروتئوم

جهت تکمیل مبحث ژنوم، ما بحث زیست‌شناسی مولکولی در این کتاب را با دو موضوع ترانس‌کریپتوم و پروتئوم به پایان می‌رسانیم. کاربرد این واژه‌ها از زمانی شروع شد که محققین به طور گسترده پژوهش در زمینه بیوانفورماتیک سلولی را آغاز کردند. به مجموعه رونوشت‌ها در هر لحظه از عمر سلول، **ترانس‌کریپتوم** گفته می‌شود. این بیان لحظه ای اطلاعات زنتیکی یا ترانس‌کریپتوم درواقع منعکس کننده اثر عوامل مختلفی است که در هر لحظه بر وضعیت و امکان وجودی سلول اثر می گذارند. در هر لحظه نه تنها ژن‌های اساسی خانه‌دار که برای رفع نیازهای پایه سلول ضروری هستند، بیان می‌شوند، بلکه همچنین ژن‌های مخصوص بافتی و یا شاید حتی ژنهائی که در طی روند تکوین سلول، فعالتشان ضروری است نیز هم در هر لحظه بیان می شوند. بنابراین آنالیز ترانس‌کریپتوم تصویر مناسبی از آن‌چه که سلول در لحظه با آن مواجه و مقابله است به‌دست می‌دهد.

توالی‌یابی ژنوم موجب درک عمیق ما در مورد عملکرد ژن‌ها شده است.

پروتئوم بسط منطقی ژنوم است و ترانس‌کریپتوم جمعیت پروتئین‌ها را در سلول نشان می‌دهد. پروتئوم منعکس کننده ترانس‌کریپتوم یا همان منعکس کننده ژنوم در مقیاس وسیع‌تری است، اگر چه ممکن است برخی رونوشت‌ها در سلول وجود داشته باشند که به طور موثر ترجمه نشده‌اند. همچنین ممکن است پروتئین‌هایی در سلول وجود داشته باشند که رونوشت آن‌ها از چرخه بیان حذف شده باشد. در حال حاضر تعداد زیادی از زیست شناسان پذیرفته‌اند که فهم پروتئوم در شناخت کامل از نحوه کارکرد سلول‌ها، حیاتی است. حتی برخی از زیست شناسان پروتئوم را به‌عنوان مفهومی بغایت پیچده و دشوار بلحاظ درک دانسته و آن را با تئوری یکنواخت سازی در فیزیک مقایسه می‌کنند. دلیل آن هم این است که اگر ما از عملکرد پروتئین‌ها در سلول آگاهی داشته باشیم، قطعاً فهم کاملی از ساختار سلول و عملکرد آن خواهیم داشت. همانند بیشتر وقایع زیست شناسی این موضوع نیز یک فرایند ساده نخواهد بود اگرچه ظرف چند سال آینده همچنان که رموز بیان ژن با جزئیات بیشتری آشکار می‌شود زیست‌شناسان به اطلاعات بسیار جالبی در این زمینه دست خواهند یافت.

آنالیز ترانس کریپتوم و پروتئوم، اطلاعات مفیدی درباره این که کدام یک از ژن‌های یک سلول در یک زمان معین بیان می‌شود ارائه می‌دهد.



نقشهٔ مفهومی فصل دوم

فصل سوم: روش کار با اسیدهای نوکلئیک

اهداف:

* ارائه نکات مهم ومورد نیاز درکار با اسیدهای نوکلئیک ؛
* تشریح روش‌های تخلیص، نگهداری مناسب و تغییر اسیدهای نوکلئیک؛
* تشریح اصول اصلی هیبریداسیون اسیدهای نوکلئیک، الکتروفورز و توالی‌یابی DNA.

خلاصه فصل/نتایج یادگیری

بعد از خواندن این فصل به اطلاعات زیر دست خواهید یافت:

* مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای دست‌ورزی ژن؛
* روش‌های مورد استفاده برای تخلیص اسیدهای نوکلئیک؛
* نگهداری مناسب و کمیت سنجی DNA و RNA؛
* برچسب‌گذاری اسیدهای نوکلئیک؛
* جداسازی اسیدهای نوکلئیکبا استفاده از الکتروفورز؛
* اصول توالی‌یابی DNA؛
* روش‌های توالی‌یابی DNA؛
* مواد مورد نیاز برای توالی‌یابی مولکول‌های DNA در حجم زیاد.

لغات کلیدی:

محتوای فیزیکی، محتوای زیست شناختی، پروتئین‌زدایی، ریبونوکلئاز، کرماتوگرافی[1] تمایلی، سانتریفیوژ بر اساس شیب، میکروگرم، نانوگرم، پیکوگرم، اتیدیوم بروماید، ایزوپروپانول، اتانول، علامت گذاری با رادیواکتیو، شمارش‌گر چشمک‌زن، کاوشگر نشاندار، فعالیت ویژه، نشاندار کردن انتها، پلی نوکلئوتید کیناز، ترجمه شکاف[2]، DNA پلی مرازI، DNase I، بسط آغازگر، آغازگر الیگونوکلئوتید، قطعه کلنو، هیبریداسیون نوکلئیک اسید، اتورادیوگراف، الکتروفورز، پلی‌آنیونیک، آگارز، پلی آکریل آمید، SAGE، PAGE، توالی‌یابی DNA، نقشه کشی بر مبنای آنزیم‌های برشی، قطعات تودرتو، روش توالی‌یابی منظم، روش توالی‌یابی با روش شات گان، دای دئوکسی نوکلئوزید تری فسفات.

[1] Affinity chromatography
[2] Nick translation

قبل از بررسی تکنیک‌های خاصی که در دستکاری ژن استفاده می‌شوند، بهتر است به بررسی روش های پایه مورد نیاز جهت نگهداری مناسب، کمیت سنجی و آنالیز اسیدهای نوکلئیک بپردازیم. برقراری ارتباط بین جنبه‌های علمی و عملی یک موضوع اغلب کار دشواری است و زمانی مفید بودن روش‌های مورد استفاده در کارهای معمول اسیدهای نوکلئیک شناخته می‌شوند که جزئیات بیشتری از تکنیک‌های پیچیده مانند کلون کردن و آنالیز ژن، تشریح شود.

۳-۱) تجهیزات آزمایشگاهی

یکی از جنبه‌های برجستهٔ تکنولوژی دست‌ورزی ژن این است که بسیاری از این روش‌ها با آماده‌سازی یک آزمایشگاه در اندازهٔ متوسط قابل انجام هستند. اگر چه کارکردهایی مانند توالی‌یابی قطعات بزرگ DNA و تولید محصولات بیوتکنولوژی نیازمند تسهیلات و سرمایه‌گذاری بیشتری است، اما هنوز هم کارهای با کیفیت بالا در آزمایشگاهای معمولی صورت می‌گیرند. تجهیزات در سه عنوان زیر خلاصه می‌شوند:

- تسهیلات کلی آزمایشگاه
- کشت سلول و کنترل آن
- فرآوری و آنالیز

تسهیلات عمومی شامل مواردی چون طراحی آزمایشگاه و تجهیزاتش و زیرساخت سرویس‌های ضروری آن مثل آب (شامل دستگاه آب مقطر گیری و یا دستگاه دیونیزه کننده آب)، نیروی الکتریکی، گاز، هوای متراکم شده، سیستم‌های ایجاد کننده خلاء، زهکشی و مانند این‌ها است. در یک آزمایشگاه، بسیاری از خدمات معمولی باید بدون صرف هزینه و مشکل خاصی در مقایسه با حالت معمول وجود داشته باشند.

می‌توان دست‌ورزی ژن را با استفاده از امکانات آزمایشگاهی نسبتاً محدود انجام داد.

جهت رشد ارگانیسم‌ها و لاین‌های سلول‌هایی که در تحقیق مورد نیازند، وجود تسهیلات مربوط به کشت سلول و تجهیزات دقیق مربوط به آن ضروری است. بیشتر آزمایشگاه‌ها به یکسری تسهیلات و تجهیزات برای رشد سلول‌های باکتریایی نیازمند هستند. در این خصوص به تجهیزاتی مانند اتوکلاو[1]، انکوباتور[2] (ثابت و چرخان)، سانتریفوژ و کابینت‌های حفاظت شده جهت انجام دست‌ورزی ژن نیاز است. کشت سلولی پستانداران به تسهیلات آزمایشگاهی پیشرفته‌تری نیاز دارد و کشت گیاه و جلبک نیز معمولاً به سیستم روشنائی اضافی در اتاقک کشت وابسته است. در بسیاری از

1. Autoclave
2. Incubatore

موارد بهره گیری از برخی مهار کننده های فیزیکی جهت جلوگیری از فرار یا از دست رفتن ارگانیسم‌ها طی انجام مراحل دست‌کاری، ضروری است. در مجموع، میزان مهار کننده‌های فیزیکی ضروری در این رابطه وابسته به نوع میزبان، ناقل مورد استفاده و چگونگی ترکیب آنها درآزمایش دارد که معمولاً سطحی از مهارهای بیولوژیکی را فراهم می‌کند بنحوی که عموماً میزبان نمی‌تواند درخارج از شرایط آزمایشگاهی زنده بماند. در مجموع، معمولاً میزان محدودیت‌ها به وسیله سازمان‌های ملی یک کشور که تنظیم کنندگان دست‌کاری ژن هستند، اعمال می‌شود و این محدودیت‌ها ممکن است، تسهیلات مربوط به کشت سلول‌های پستانداران و باکتری‌ها را نیز شامل شود. لذا در یک آزمایش همسانه‌سازی ساده با *E.coli* ممکن است فقط به روش‌های میکروبیولوژی معمولی نیاز باشد، در حالی که در یک آزمایش جهت همسانه‌سازی ژن‌های انسانی با استفاده از ناقلین ویروسی در خطوط سلول پستانداران ممکن است به سیستم‌های ایمنی دقیق‌تری نیاز باشد.

زیست شناسی دست‌ورزی ژن به تسهیلاتی برای رشد، تهیه و انجام برخی عملیات روی انواع مختلف سلول‌ها و ارگانیسم‌ها نیاز دارد.

جهت انجام برخی عملیات و مطالعه سلول‌ها و اجزاء سلولی مانند DNA، انتخاب تجهیزات مورد نیاز دشوار است. در اغلب موارد نوع پیپت‌های اتوماتیک و تیوب‌های میکروسانتریوفوژ حائز اهمیت هستند. کار کردن با پیپت‌هایی که به صورت مناسب کار نمی‌کنند و یا تیوپ‌هایی که درب آن‌ها به سختی باز می‌شود، اغلب محقق را دلسرد می‌کند. تجهیزاتی مانند التراسانتریفیوژ[1] و توالی‌یاب-های DNA که به صورت اتوماتیک عمل می‌کنند، به سرمایهٔ زیاد و دقت بسیار نیاز دارند. اغلب تجهیزات دیگری که مورد استفاده قرار می‌گیرند نسبتاً کوچک و کم هزینه‌اند و در این خصوص پژوهشگران مختلف مارک‌های متفاوتی را برای تجهیزات مورد استفاده خود، ترجیح می‌دهند.

علاوه بر آنچه ممکن است اصطلاحاً امکانات زیربنایی و تجهیزاتی از آنها نام برده شود، هزینه‌های بعدی آزمایشگاه نیز باید در نظر گرفته شود که این موضوع می‌تواند مهم‌ترین بخش هزینه ها در یک سال پس از شروع کار محسوب شود. در شروع هر تحقیق علمی تأمین سرمایهٔ مورد نیاز برای تحقیق از اهمیت بالایی برخوردار است. توانائی جذب سرمایهٔ مورد نیاز برای تحقیق، بخش مهمی از یک پروسهٔ علمی است. یک گروه تحقیقاتی با اندازه متوسط در یک دانشگاه (متشکل از سه عضوعلمی، پنج دستیار پسا دکتری، شش دانشجوی دکتری یا ارشد و چهار تکنسین) ممکن است به آسانی حدود یک میلیون پوند در طی یک سال را هزینه کنند البته در صورتیکه حقوق، مخارج کلی، تجهیزات و مواد مصرفی آن‌ها نیز به حساب آید. لذا، سهم قابل‌توجهی از زمان یک دانشمند

[1] Ultracentrifuge

تازه کار ممکن است جهت تأمین گرانت برای انجام پروژه‌های مختلف صرف شود، اگر چه اغلب اوقات هیچ تضمینی جهت تأمین دراز مدت این گرانت وجود ندارد.

پیشرفت در علم وابسته به ذهن‌های خلاق، فناوری پیشرفته و وضعیت دانش رایج است. در این خصوص وجود سرمایه لازم را ن می‌توان نادیده گرفت.

۳-۲) جداسازی DNA و RNA

هر آزمایش دست ورزی ژن به یک منبع نوکلئیک اسید به‌صورت یکی از دو فرم DNA وRNA نیاز دارد. لذا استفاده از روش‌های معتبر جداسازی جهت جدا کردن هریک ازاین ترکیبات از اهمیت خاصی برخوردار است. سه مرحله جهت جداسازی وجود دارد: ۱) متلاشی نمودن سلول جهت دست یابی به نوکلئیک اسید برای انجام بررسی‌های بیشتر، ۲) جداسازی نوکلئیک اسید از دیگر اجزاء سلول و ۳) حصول نوکلئیک اسید به صورت شکل خالص شده آن. تکنیک‌های مختلفی در این خصوص ممکن است استفاده شوند؛ از روش‌های ساده با مراحل کوتاه گرفته تا تخلیص‌های پیچیده که شامل چندین مرحله می‌شوند. امروزه بیشتر کمپانی‌های زیست شناسی مولکولی کیت‌هایی را می‌فروشند که قادر به تخلیص نوکلئک اسید از دیگر مواد هستند.

اولین گام در هر پروتکل ایزوله‌سازی، متلاشی کردن مواد شروع کننده است که ممکن است این مواد ویروسی، باکتریایی، گیاهی و یا حیوانی باشند. متلاشی کردن سلول تا آنجایی که امکان دارد باید به آرامی صورت گیرد. این کار با استفاده از آنزیم‌هائی که دیوارهٔ سلول را تجزیه می‌کنند (اگر در دسترس باشند) و مواد شوینده[1] که غشاء سلول را هضم می‌کنند، انجام می‌شود. اگر به روش‌های قوی‌تری جهت متلاشی کردن سلول نیاز باشد (مانند برخی از انواع سلول‌های گیاهی) خطر شکسته شدن قطعات بزرگ DNA وجود دارد و این امر می‌تواند مانع تولید مولکول‌های نوترکیب در حین انجام مراحل بعدی آزمایش شود.

برای دست‌یابی به اسیدهای نوکلئیک باید سلول‌ها را باز کرد. برای اجتناب از شکسته شدن مولکول‌های بزرگDNA باید سلول‌ها را به آرامی باز کرد.

بعد از متلاشی کردن سلول، بیشتر روش‌ها شامل یک مرحلهٔ حذف پروتئین می‌باشند. این کار از طریق استفاده یک یا چند باره از ماده فنل یا مخلوطی از فنل و کلروفورم انجام می شود. جهت جداسازی فازها، تهیه امولوسیون و انجام سانتریفوژ ضروری است که طی آن مولکول‌های پروتئین در فاز فنول تفکیک شده و در قسمت میانی رسوب می‌کنند. اسیدهای نوکلئیک اغلب در فاز آبدار فوقانی باقی می‌مانند و ممکن است با استفاده از ایزوپروپانول یا اتانول در محلول ته نشین شوند

[1].Detergent

(بخش ۳-۳ را نگاه کنید). برخی از روش‌ها نیازی به استفاده از ترکیبات فنولی داشته و از این رو ایمن‌تر بوده و لذا نسبت به روش‌هایی که در آن‌ها از ترکیبات فنلی استفاده می‌شود، ترجیح داده می‌شوند.

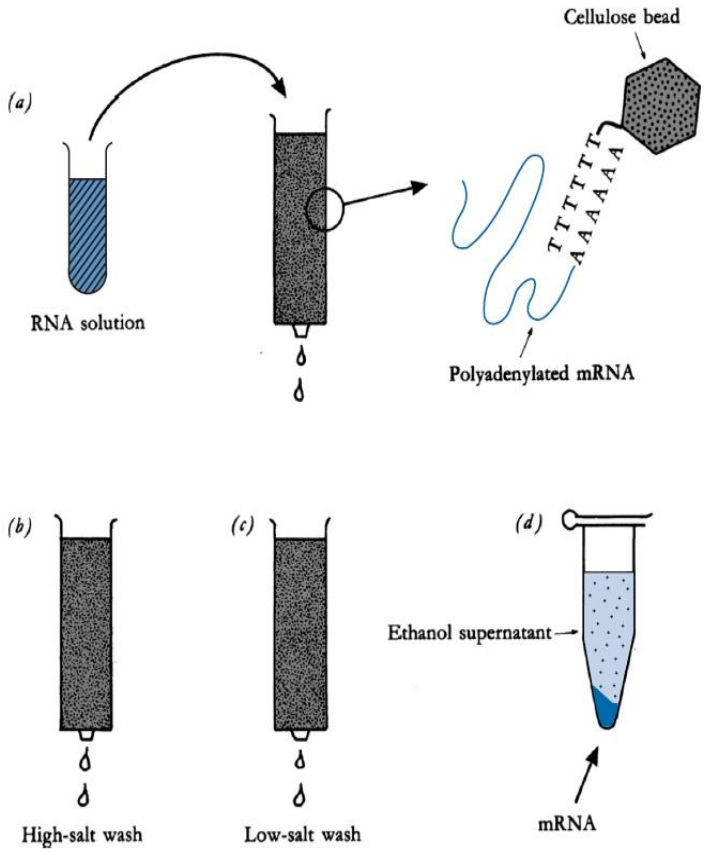
بعد از متلاشی کردن سلول و حذف پروتئین‌ها، می‌توان با روش‌های خاصی اسیدهای نوکلئیک را استخراج کرد. در برخی موارد حضور نوکلئیک اسید با خلوص بالا ضروری است اما در برخی موارد DNA یا RNA با خلوص کمتر نیز قابل استفاده اند.

اگر نیاز به تهیه DNA باشد، با استفاده از آنزیم ریبونوکلئاز[1] (RNase) می‌توان RNA ها را از نمونه حذف کرد. اگر جهت سنتز cDNA به mRNA نیاز باشد، می‌توان یک خالص سازی در سطح بالا بوسیلهٔ **کروماتوگرافی اتصالی**[2] با استفاده از الیگو(dT) سلولز جهت اتصال به دم پلی آدنین mRNA های سلول‌های یوکاریوتی انجام داد (شکل ۳-۱). این روش موجب تخلیص مقدارقابل‌توجهی از mRNAشده و قادر به جداکردن آلودگی‌هایی مثل DNA، rRNA و tRNA از mRNA استخراجی است.

تکنیک **سانتریفیوژ گرادیانت**[3] اغلب جهت تهیه DNA خالص به‌ویژه پلاسمید DNA[4] (pDNA) به‌کار می‌رود. در این تکنیک محلول سزیم کلراید (CsCl) حاوی DNA در یک دستگاه اولتراسانتریفیوژ با سرعت بالا قرار می گیرد. در طی یک زمان طولانی (گاهی بیشتر از ۴۸ ساعت) شیب چگالی تشکیل می‌شود و pDNA در لوله سانتریفوژ در یک مکان خاص یک باند تشکیل می‌دهد. این باند رامی‌توان جداسازی کرده و پس از حذف CsCl از آن با استفاده از روش دیالیز به یک pDNA خالص دست یافت. به جای تکنیک سانتریفیوژ شیب‌دار می‌توان از روش کرماتوگرافی براساس اندازه (جداسازی با استفاده از ژل) و یا از روش‌های مشابه دیگر استفاده کرد.

---

1. Ribonuclease
2. Affinity chromatography
3. Gradian centrifugation
4. Plasmid



شکل ۳-۱) تهیه mRNA با روش کرماتوگرافی اتصالی با استفاده از الیگو (dT) سلولز. کل محلول mRNA از یک ستون حاوی بافر با غلظت نمک زیاد عبور داده شده و الیگو (dT)ها به دنبالهٔ پلی آدنین mRNA متصل می‌شوند. (b) باقیمانده RNA با یک بافر حاوی غلظت زیاد نمک شسته می‌شود و (c) mRNA با بافر (با غلظت کم از نمک) شسته می‌شود. (d) mRNA بوسیله اتانول رسوب داده و سپس با سانتریفوژ جمع آوری می‌شود.

۳-۳) تهیه و کمیت سنجی اسیدهای نوکلئیک

در یک آزمایش کلون کردن، اغلب به میزان خیلی کمی از نوکلئیک اسید (معمولاً **میکرو-**، **نانو-** و یا **پیکوگرم**) نیاز است. بدیهی است که کار با این مقادیر بسیار کم به‌صورت مستقیم امکان پذیر نیست و لذا اغلب از اندازه‌گیری محلول‌های رقیق شده DNA و RNA در فازآبی استفاده می‌شود. غلظت یک محلول اسید نوکلئیک بوسیلهٔ سنجش میزان جذب نور توسط آن محلول

درطول موج ۲۶۰ نانومتر و در یک دستگاه اسپکتروفتومتر[1]انجام می‌شود. یک A_{260} برابر با 1.0 معادل غلظت 50µg/ml از DNA دو رشته‌ای و یا 40µg/ml برای DNA تک رشته‌ای و یاRNAمی باشد. اگر A_{280} نیز اندازه‌گیری شود، نسبت A_{260}/A_{280} نشان‌دهنده وجودآلودگی‌های باقیمانده اعم از فنول یا پروتئین در محلول حاوی اسید نوکلئیک است. نسبت A_{260}/A_{280} برای نمونه های DNA خالص باید حدود ۱/۸ و برای RNA خالص ۲ باشد.

محلول‌های اسیدهای نوکلئیک در مقادیر بسیار کم تهیه تا به آسانی استفاده، اندازه‌گیری و مصرف بهینه شان ممکن شود.

علاوه بر روش‌های اسپکتروفتومتری، غلظت DNA توسط بررسی باندهای فلورسنس **اتیدیوم بروماید**[2] نیز قابل تخمین است. این رنگ بین بازهای DNA قرار می‌گیرد و زمانی‌که به آن اشعه ماوراء بنفش (uv) بتابانیم، فلورسنس نارنجی رنگی را از خود ساطع می‌کند. با مقایسه فلورسنس نمونه با انواع استاندارد می‌توان غلظت تخمینی نمونه را به دست آورد. این روش می‌تواند مقادیر کم DNA مانند ۵-۱ نانوگرم را شناسایی کند و نیز می‌تواند هنگامی که دستگاه اسپکتروفتومتر نتواند میزان اشعه ماورابنفش جذب شده را بدست آورد مورد استفاده قرار گیرد. با تعیین میزان غلظت محلول نوکلئیک اسید، از نظر تئوری می‌توان هر مقداری را با استفاده از حجم مناسبی از محلول بدست آورد. در این روش مقادیر نانوگرم و یا پیکوگرم را نیز می‌توان با دقت بسیار زیاد بدست آورد.

رسوب اسیدهای نوکلئیک، تکنیکی مهم است که در گستره متنوعی از آزمایشات مورد استفاده قرار می‌گیرد. دو ماده‌ای که به طور متداول در رسوب دادن مورد استفاده قرار می‌گیرند، **اتانول** و **ایزوپروپانول** نام دارند که در بیشتر آزمایشات اتانول انتخاب ترجیحی است. هنگامی که در یک محلول DNA با حجمی به نسبت۲:۱در حضور ۰/۲ M نمک، اتانول اضافه شود، موجب خروج اسیدهای نوکلئیک از محلول می‌شود. اگر چه این استدلال وجود دارد که این روش باید در دماهای پایین (۲۰- یا ۷۰- درجه سانتی گراد) صورت گیرد، اما این دما مطلق نیست و ممکن است صفر درجه سانتیگراد نیز دمای مؤثری در این خصوص باشد. بعد از رسوب نوکلئیک اسید می‌توان آن را با استفاده از سانتریفیوژ جمع آوری کرد که این کار موجب ایجاد پلیت نوکلئیک اسید در انتهای تیوپ آزمایش می‌شود. پلیت را می‌توان خشک کرد و نوکلئیک اسید را در یک بافر مناسب برای ادامه آزمایش حل کرد.

---

[1].Spectrophotometer
[2]. Ethidium bromide

اسیدهای نوکلئیک DNA و RNA را می‌توان با استفاده از الکل رسوب داد. رسوب با استفاده از سانتریفیوژ جمع آوری شده و در مقدار مورد نیاز از بافر مناسب حل می‌شود.

۳-۴) نشاندارکردن اسیدهای نوکلئیک

یکی از مشکلات اصلی در انجام مراحل کلون‌سازی، بازیافت مقادیر اندک اسیدهای نوکلئیک مورد دست ورزی است. این مشکل در هر مرحله حادتر می‌شود زیرا در هر مرحله از آزمایش، مقداری از اسیدهای نوکلئیک بکار رفته در آزمایش از دست می‌روند. جهت ردیابی و نشاندار کردن اسیدهای نوکلئیک از چند نوع مارکر استفاده می‌شود که بوسیلهٔ آن‌ها می‌توان مواد بکار رفته در آزمایش را در هر مرحله رهگیری کرد. بنابراین پرسش این است: چه چیزی می‌تواند به‌عنوان یک ماده نشاندار استفاده شود؟

۳-۴-۱) کدام نشانگر رادیواکتیوی یا خیر؟

ردیاب‌های رادیواکتیو در سطح وسیع و دوره زمانی طولانی در آزمایشات بیوشیمی و بیولوژی مولکولی مورد استفاده قرار گرفته اند و امروزه روش‌های زیادی بر پایهٔ آن‌ها بنا شده است. اغلب ایزوتوپ‌هایی که عموماً مورد استفاده قرار می‌گرفتند عبارتند از تریتیوم (^{3}H)، کربن-۱۴ (^{14}C)، سولفور- ۳۵ (^{35}S)، فسفر-۳۲ (^{32}P). تریتیوم و کربن- ۱۴ انرژی کمی از خود ساطع می‌کنند، ^{35}S انرژی متوسط و ^{32}P انرژی بالایی را از خود ساطع می‌کند. لذا ^{32}P بیش‌ترین خطر را نسبت به بقیهٔ ایزوتوپ‌ها داراست و باید با دقت بالایی مورد استفاده قرار گیرد. موارد قانونی سختی نیز جهت ذخیره و دفع مواد آلوده به رادیواکتیو وجود دارد. این موارد تا حدی به دلیل ایجاد خطرات توارثی توسط مواد رادیواکتیو دارای سطوح بالای انرژی است که سبب شده تا استفاده از تکنیک‌های جای‌گزین مانند رنگ‌های فلورسنس یا آنزیم‌های متصل به مواد نشاندار در سال‌های اخیر فراگیر شوند. اگرچه این روش‌ها دارای مزایای کاربری عملی (مانند کاربرد درتوالی‌یابی DNA)هستند، اما هنوز هم روش معمول درآزمایشات ردیابی، استفاده از مواد رادیواکتیواست. در مورداستفاده از مواد رادیواکتیو، اغلب اصطلاح **رادیونشاندارکردن**[1] جهت تشخیص نوع تکنیک، مورد استفاده قرار می‌گیرد.

اغلب برای نشان‌دار کردن اسیدهای نوکلئیک از ایزوتوپ‌های رادیواکتیو استفاده می‌شود، هر چند که نسبت به نشانگذارهای غیر رادیواکتیو، این مواد دارای خطرات بیشتری هستند.

---

[1].Radiolabelling

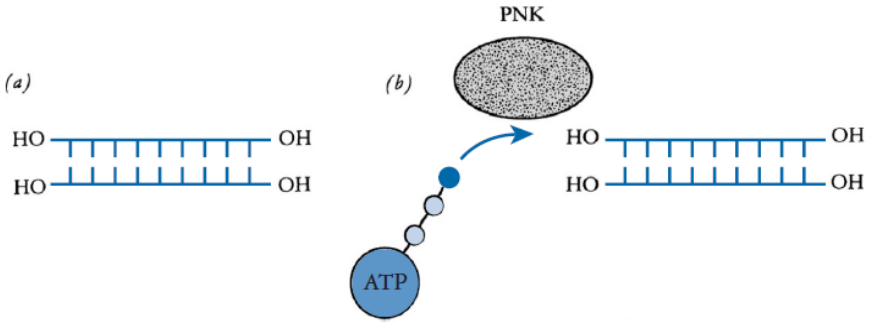
یکی از روش‌های ردیابی نمونه‌های DNA و RNA، نشاندار کردن اسیدهای نوکلئیک با ملکول رادیواکتیو (عموماً یک دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP) نشاندار شده با ^{3}H یا ^{32}P) است، به طوری که نمونه‌هائی ازهر واکنش در یک دستگاه **سنتی لاتور شمارش‌گر**[1] جهت تعیین مقدار نوکلئیک اسید موجود در آن نمونه، مورد استفاده قرار می گیرد، که این کار معمولاً با استفاده از محاسبه مقدار تشعشع رادیواکتیو موجود در نمونه مورد آزمایش بدست می‌آید.

برای شناسایی توالی‌های مورد جستجوی DNA یا RNA، کاوشگرهای رادیواکتیو بسیار مفید هستند.

کاربرد دوم مواد رادیونشاندار، تهیه مولکول‌های نوکلئیک اسید با رادیواکتیویته بالا است که در آزمایشات هیبریداسیون[2] مورد استفاده قرار می‌گیرند. چنین مولکول‌هایی به **کاوشگرهای رادیواکتیو**[3] معروف هستند و موارد استفاده متنوعی دارند (بخش‌های ۳-۵ و ۸-۲ را نگاه کنید). تفاوت بین نشاندار کردن جهت ردیابی با نشاندار کردن جهت ساخت کاوشگرها، به میزان زیادی به فعالیت ویژه مولکول‌هائیکه نشاندار می شوند، دارد که این موضوع در واقع در ارتباط مستقیم با اندازه‌گیری میزان فعالیت رادیواکتیویتی آنهاست. در نشاندارکردن به منظور آزمایشات ردیابی، میزان پایین رادیواکتیویتی و اختصاصی بودن مولکول نشاندارشده هم کافیست، درحالیکه در نشاندارکردن جهت فعالیت یک ملکول به عنوان کاوشگر، هر دو موضوع اختصاصی بودن و فعالیت رادیواکتیویتی نشانگر باید بالا باشد. در آماده‌سازی کاوشگرها، ماده رادیواکتیو معمولاً β-emitter ^{32}P است که انرژی بالایی دارد. برخی از روش‌های رایج نشاندار کردن مولکول‌های نوکلئیک اسید در ادامه شرح داده شده‌اند.

---

1. Scintillation counter
2. Hybridisation
3. Radioactive probs



شکل ۳-۲) نشاندار کردن انتهای مولکول DNA با استفاده از آنزیم پلی نوکلئوتیدکیناز (PNK). (a) مولکول DNA با استفاده از آنزیم فسفاتاز جهت ایجاد گروه‌های ´۵-OH دفسفریله می‌شود. (b) فسفات انتهایی از [γ^{-32}P] مولکول ATP (دایره توپر) برداشته شده و سپس به انتهای ´۵ با استفاده از PNK متصل می‌شود. واکنش فوق همچنین می‌تواند با استفاده از تعویض یک فسفات ´۵ انتهایی نیز انجام شود است.

۳-۴-۲) نشاندار کردن انتهایی[1]

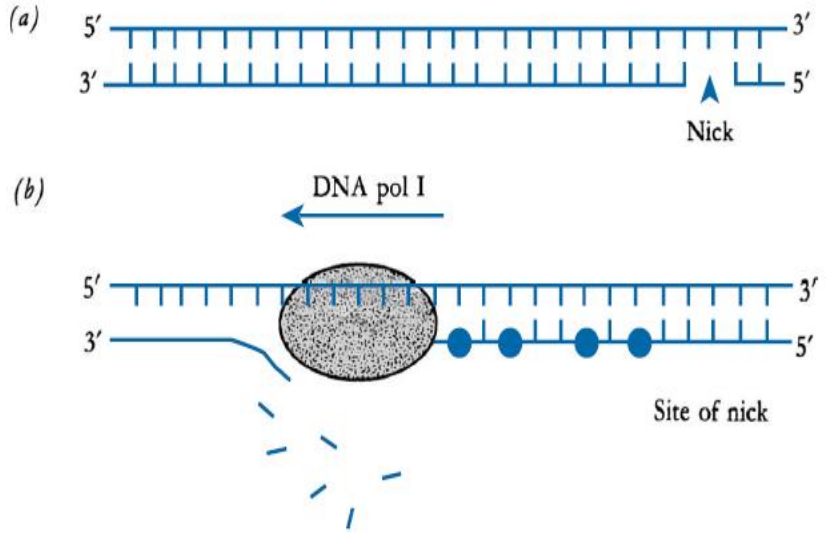
در این روش آنزیم **پلی نوکلئوتید کیناز**[2] (PNk) موجب انتقال گروه فسفات انتهایی از ATP به پایانه ´5-OH مولکول نوکلئیک اسید می‌شود. اگر ATP دهنده با فسفات رادیواکتیورادیونشاندارشده باشد، در این صورت یک مولکول نوکلئیک اسید نشاندار، با فعالیت کم رادیواکتیوی ایجاد می‌شود زیرا فقط انتهای این مولکول نشاندارشده است (شکل ۳-۲).

۳-۴-۳) روش درزگیری (ترجمه شکاف)[3]

این روش بر مبنای توانایی آنزیم DNA پلی مراز I (بخش ۴-۲-۲ را ببینید) جهت ترجمه (ترمیم) (به صورت حرکت در طول DNA) در اسکلت فسفو دی استر از مارپیچ دو رشته‌ای DNA است. شکاف‌ها یا به‌صورت طبیعی و یا توسط غلظت‌های پایین DNA نوکلئاز (DNaseI) در محیط واکنش ایجاد می‌شوند. DNA پلیمراز I یک رشته جایگزین را در واکنش سنتز می‌کند، به طوری که رشته فوق حاوی dNTPs های جدید در زنجیره DNA است. اگر یکی از dNTPs های مورد استفاده در این واکنش رادیواکتیو باشد، نتیجه آن ایجاد یک مولکول DNA نشاندار است (شکل ۳-۳).

---

1. End labeling
2. Polynucleotide kinase
3. Nick translation



شکل ۳-۳) نشاندار کردن DNA با استفاده از روش ترجمه (ترمیم) شکاف. (a) یک شکاف تک رشته‌ای در اسکلت فسفودی استر یکی از رشته‌های DNA بوسیلهٔ DNase I ایجاد می شود. (b) سپس DNAپلی مرازI، یک نسخه از رویرشته الگو سنتز کرده و در عین حال،رشته غیر الگو با استفاده از فعالیت اگزونوکلئازیاین آنزیم ازجهت ´۵ به سمت ´۳ تخریب می‌شود. اگر در این واکنشاز dNTP[α-^{32}P] استفاده شوداین ماده در رشته جدید ساخته شده وجود خواهد داشت (دوایرتوپر).

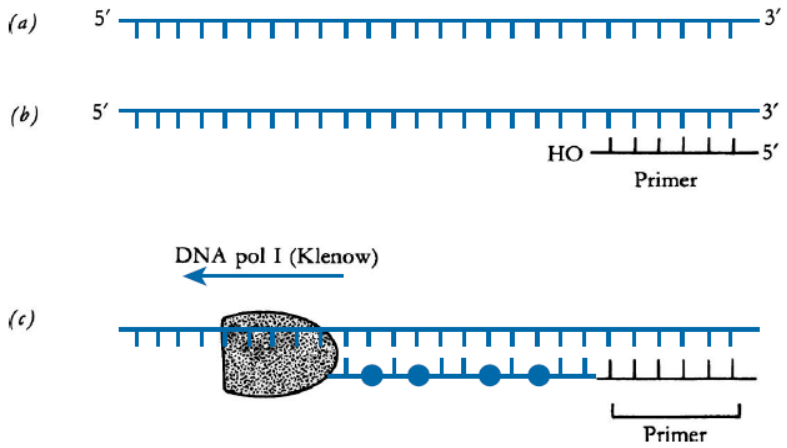
۳-۴-۴) نشاندار کردن با استفاده از روش بسط آغازگر[1]

نشاندار کردن با استفاده از روش بسط آغازگر اشاره به تکنیکی دارد که در آن از الیگونوکلئوتیدهای تصادفی (معمولاً توالی‌های مولکولی هگزادزوکسی ریبونوکلئوتیدی- توالی‌های شش دزوکسی نوکلئوتیدی) جهت شروع سنتز یک رشته از DNA با استفاده از آنزیمDNA پلی مراز، استفاده می‌شود. جهت نشاندارکردن ابتدا مولکول‌های DNA توسط گرمادهی واسرشته شده و سپس **پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی**[2] به مولکول DNA تک رشته‌ای متصل می شوند. سپس **قطعه کلنو**[3]از آنزیم DNA پلی مراز (بخش ۴-۲-۲ را ملاحظه نمایید) می‌تواند یک نسخه از روی رشته الگو را سنتز کند که پروسه از پایانه ´۳-OH الیگو نوکلئوتید شروع می‌شود. اگر از یک dNTP نشاندار جهت سنتز این رشته جدید استفاده شود، DNA جدید بسیار اختصاصی تولید خواهد شد (شکل ۳-۴).

---

1. Primer extension
2. Oligonucleotide primers
3. Klenow fragment

در بسیاری از واکنش‌های نشاندارسازی امکان وارد شدن تمام dNTP های نشاندار در توالی هـدف وجود ندارد و لذا معمولاً ایزوتوپ‌های رادیواکتیوی که وارد توالی هدف نشده‌اند را قبل از استفاده از نشانگر (با شستشو) حذف می نمایند.



شکل ۳-۴) نشاندار کردن DNA با استفاده از روش بسط آغازگر (نشاندارسازی الیگونوکلئوتید[1]). (a) جهت ایجاد مولکول‌های تک رشته‌ای، DNA دناتوره می‌شود. (b) سپس اتصال آغازگر الیگونوکلئوتیـدی موجـب ایجاد یک ناحیه دو رشته‌ای کوتاه -حاوی گروه ۳´-OH آزاد می‌شود. (c) سپس قطعه کلنو از آنزیم DNA پلی مراز I یک نسخه از روی رشته الگو را از ناحیه آغازگر سنتز می‌کند. که اینکار -با وارد کردن [α-32P] dNTP (دوایر توپر) به رشته سنتز شده سبب تولید یک مولکول نشاندار با فعالیت اختصاصی بالا می‌شود.

در واکنش رادیونشاندارسـازی اغلـب لازم اسـت کـهDNA هـای نشاندارشـده را از نوکلئوتیـدهای نشانداری که وارد ساختار رشته سنتز شده نشده و در ترکیب محیط واکنش باقی مانـده انـد، جـدا شوند. یک روش ساده در این خصوص، استفاده از ژل فیلتر کننده در مقیاس کوچک بـا اسـتفاده از حلال مناسب است. کلیهٔ فرایندهای فوق می‌تواند در یک پیپت پاستور[2] انجام مـی‌شـود کـه در آن ابتدا DNA نشاندار و بدنبال آن نوکلئیک‌های آزاد از ستون عبور خواهند کرد. نمونه های محلـول خروجی جهت بررسی میزان رادیواکتیویتی جمع‌آوری و بررسی شده و داده‌های بدست آمـده بـرای محاسبه کل فعالیت DNA، فعالیت اختصاصی آن و همینطور درصـد ایزوتـوپ‌هـای وارد شـده در ساختار DNA ساخته شده، مورد استفاده قرار می‌گیرند.

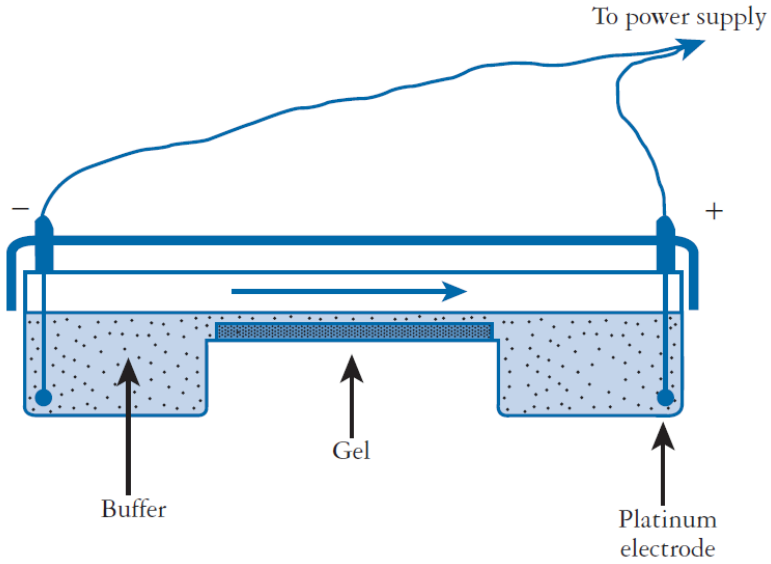
[1].Oligolabelling
[2].Pasteur pipette

۳-۵) هیبریداسیون نوکلئیک اسید

هیبریداسیون اسید نوکلئیک هسته ای، علاوه بر در اختیار گذاری اطلاعاتی در زمینه پیچیدگی توالی‌ها(بخش ۲-۶-۱)، می‌تواند به عنوان یک روش شناسایی با حساسیت بسیار بالا استفاده شود که قادر است توالی‌های اختصاصی-DNA را از کمپلکسی پیچیده جدا کند. معمولاً یک توالی خاص با ^{32}P نشاندار شده و به عنوان یک کاوشگر مورد استفاده قرار می‌گیرد. کاوشگر قبل از استفاده دناتوره می‌شود و لذا رشته‌های دناتوره شده جهت اتصال به توالی‌های مکمل‌هایشان آزاد هستند.

ارتباط ساده جفت شدن بازها بین توالی‌های مکمل دارای نتایج مهمی برای سلول و عملکردش و همچنین برای پژوهشگرانی که این ویژگی ارتباطی را بررسی می‌کنند می باشد.

.



شکل ۳-۵) سیستم مورد استفاده در الکتروفورز ژل آگارز. در تکنیک مذکور ژل با مقدار کمی از بافر، فقط پوشیده و بنابراین گاهی به این تکنیک، تکنیک الکتروفورز ژل آگارز غوطه‌ور در بافر (SAGE[1]) نیز گفته می‌شود. نمونه‌های نوکلئیک اسید درون ژل به سمت الکترود مثبت مهاجرت می‌کنند که مسیر این حرکت با استفاده از یک فلش افقی در شکل بالا مشخص شده است.

توالی DNA ایکه قرار است به کاوشگر مبدل شود نیز باید وارشته شود و معمولاً به یک غشاء نیتروسلولزی یا نایلونی متصل می‌شود. هیبریداسیون معمولاً در کیسه‌های پلاستیکی مهر و موم

[1] Submerged agarose gel electrophoresis

شده و یا درون تیوپ‌های آزمایشگاهی در دمای ۶۸-۶۵ درجه سانتی‌گراد و برای مدت چندین ساعت انجام می‌شود تا هیبرید دو رشته‌ای (دوبلکس) تشکیل گردد. سپس کاوشگرهای اضافی شسته شده و درجه هیبریداسیون شمارش نمونه مورد نظر در یک دستگاه اسپکترومتر سنتی لاتور و یا بوسیله تهیه یک **اتورادیوگراف** که در آن نمونه در معرض اشعه X قرار می‌گیرد، مشخص میگردد. برخی از موارد کاربرد هیبریداسیون نوکلئیک اسید به عنوان روشی جهت شناسایی قطعات DNA کلون شده در فصل ۸ مورد بحث قرار خواهند گرفت.

۳-۶) الکتروفورز ژل

تکنیک الکتروفورز ژل در مهندسی ژنتیک یک روش اصلی جهت مشاهده مستقیم قطعات نوکلئیک اسید می‌باشد. این روش متکی بر این حقیقت است که اسیدهای نوکلئیک در pH خنثی به‌صورت **پلی آنیونیک**[1] هستند، بدین معنی که آن‌ها چندین بار منفی را حمل می‌کنند که به علت وجود گروه‌های فسفات روی ستون فسفودی استری رشته‌های نوکلئیک اسید است. از این رو زمانیکه این مولکول‌ها در یک فضای الکتریکی قرار می‌گیرند به سمت الکترود مثبت حرکت خواهند کرد. بارهای منفی به صورت یکنواخت در طول مولکولDNA پخش شده‌اند و نسبت بار به جرم ثابت است و بنابراین حرکت، به طول قطعه DNA بستگی دارد. این تکنیک با استفاده از یک ترکیب ژلی انجام می‌شود که تفکیک مولکول‌های نوکلئیک اسید را بر اساس اندازه‌شان انجام می‌دهد. نحوه انجام الکتروفورز نوکلئیک اسید در شکل ۳-۵ نشان داده شده است.

جداسازی زیست مولکول‌ها با استفاده از الکتروفورز یکی ازمهمترین تکنیک‌ها در زیست شناسی مولکولی است.

نوع ماده زمینه‌ای مورد استفاده در الکتروفورز از نظر درجه جداسازی قطعات حاصله دارای اهمیت است که این موضوع به درجه خلل و فرج ژل بستگی دارد. در این خصوص دو نوع ژل معمولاً مورد استفاده قرار می‌گیرند: آگارز[2] و **پلی اکریل آمید**[3]. آگارز از جلبک دریایی استخراج می‌شود و می‌توان آن را به صورت پودر خشک خریداری کرده و سپس در یک غلظت مناسب از بافرکه معمولاً در رنج (w/v) ٪۲-۰/۳ است، ذوب نمود. پس ازخنک کردن این محلول، آگارز تشکیل ژل می‌دهد. ژل‌های آگارز معمولاً در داخل دستگاهی که در شکل ۳-۵ نشان داده شده است، با استفاده از تکنیک الکتروفورز ژل آگارز غوطه‌ور در بافر[4] (**SAGE**) انجام می‌شوند.

---

[1].Polyanionic
[2].Agarose
[3]. Polyacrylamide
[4]. Submerged Agarose Gel Electrophoresis (SAGE)

جدول ۳-۱) خصوصیات جداسازی برای ژل‌های آگارز و پلی اکریل آمید.

Gel type	Separation range (base pairs)
0.3% agarose	50000 to 1000
0.7% agarose	20000 to 300
1.4% agarose	6000 to 300
4% polyacrylamide	1000 to 100
10% polyacrylamide	500 to 25
20% polyacrylamide	50 to 1

منبع: از Schleif و Wensimk (۱۹۸۱)، روش‌های عملی در بیولوژی مولکولی، Springer-Verlag، نیویورک. بازنوشت با کسب اجازه.

گاهی اوقات جهت جداسازی قطعات کوچک، از الکتروفورز بر پایه ژل پلی اکریل آمید[1] (**PAGE**) استفاده می‌شود . از جمله در برنامه‌های **توالی‌یابی DNA**[2] (بخش ۳-۷) چون اندازه منافذ در آن نسبت به ژل آگارز کوچک‌تر است. دامنه تفکیک دو ژل آگارز و پلی اکریل آمید در جدول ۳-۱ نشان داده شده‌اند.

الکتروفورز با قرار دادن نمونه‌های نوکلئیک اسید در ژل و ایجاد یک اختلاف پتانسیل (الکتریکی) در سرتاسر ژل صورت می‌گیرد. اختلاف پتانسیل فوق تا زمانی در سیستم وجود دارد که مهاجرت DNA که با رنگ مارکر (معمولاً بروموفنول بلو، که قبل از بارگزاری به نمونه‌ها اضافه می‌شود) مشخص است، به انتهای ژل برسد. اسیدهای نوکلئیک ی موجود در ژل معمولاً بوسیله رنگ آمیزی با رنگ اتیدیوم بروماید که در بین دو رشته جای می‌گیرد و سپس بررسی آن تحت نور uv قابل مشاهده اند. اسیدهای نوکلئیک موجود در ژل با باندهای نارنجی نشان داده می‌شوند که می‌توان از آن‌ها برای تهیه رکورد عکس گرفت-(شکل ۳-۶). اطلاعات به دست آمده می‌توانند جهت تخمین اندازه قطعات ناشناخته مورد استفاده قرار گیرند، که البته این کار با ساخت یک منحنی درجه بندی استاندارد که با استفاده از قطعات استاندارد با اندازه معلوم ساخته می‌شود، انجام می گیرد بنحوی که میزان مهاجرت با استفاده از نسبت معکوس لگاریتم ۱۰–($\log_{10}$) تعداد جفت بازها به‌دست می‌آید. این کار مخصوصاً در تهیه نقشه‌های برش با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر[3] مورد استفاده قرار می‌گیرد (بخش ۴-۱-۳ را نگاه کنید).

[1].Polyacrylamide-based gel electrophoresis
[2]. DNA sequencing
[3].Restriction mapping

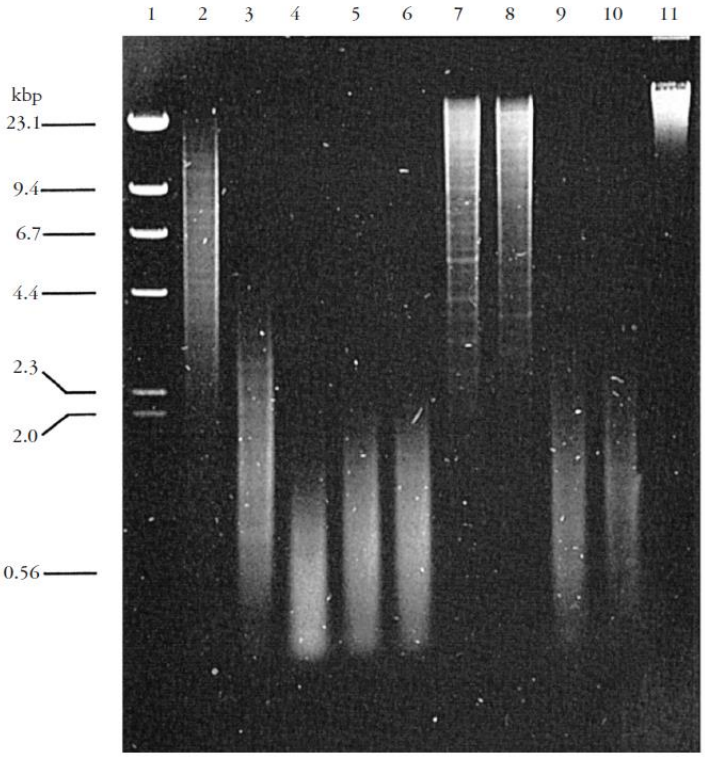
الکتروفورز PAGE علاوه بر اینکه در بررسی اسیدهای نوکلئیک به‌کار می‌رود، بطور گسترده در بررسی پروتئین‌ها نیز کاربرد دارد. اگرچه روش کار در اینجا در مقایسه با روش مورد استفاده در مورداسیدهای نوکلئیک متفاوت است، اما اصول پایه این دو روش مشابه هم هستنداست. یک تکنیک رایج در این خصوص SDS-PAGE نام دارد که در آن از ماده شوینده SDS (سدیم دودسیل سولفات[1]) جهت دناتوره کردن پروتئین‌های چند زیرواحدی و پوشاندن مولکول‌های پروتئینی با بار منفی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش بار ذاتی (مثبت) پروتئین استتار شده و نسبت بار به جرم ثابت می‌ماند. بنابراین پروتئین‌ها به روشی مشابه با مولکول‌های DNA می‌توانند بر اساس اندازه شان جدا شوند.

۳-۷) توالی‌یابی DNA

توانایی تعیین توالی بازهای DNA یکی از بخش‌های مهم در زیست شناسی مولکولی مدرن محسوب می‌شود که در واقع اطلاعاتی را در مورد ساختمان نهایی DNA فراهم می‌کند. روش‌های سریعی جهت آنالیز توالی‌ها در اواخر دهه ۱۹۷۰ مطرح شدند که امروزه در بسیاری از آزمایشگاه‌های جهان مورد استفاده قرار می‌گیرند. در سال‌های اخیر تکنیک‌های پایه توالی‌یابی بگونه‌ای متحول شده که با بهبود بخشیدن تکنیک‌ها، توالی‌یابی ژنوم را ممکن ساخته‌اند.

---

1. Sodium dodecyl sulphate



شکل ۳-۶) عکس سیاه و سفید از یک ژل آگارز رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید و تحت تأثیر اشعه UV. نمونه‌های DNA بصورت اسمیرهای نارنجی و یا باندهای نارنجی بر روی یک پس زمینه ارغوانی مشاهده می‌شوند. باندهای منفرد (خط ۱) نشان‌دهنده قطعات مجزای DNA هستند. قطعات فوق مربوط به DNA فاژ لامبدا بوده که توسط آنزیم محدودالاثر *Hin*dIII بریده شده‌اند. اندازه هر یک از قطعات (به صورت Kbp) معین و مشخص می‌باشد. مابقی خطوط مربوط به نمونه‌های DNA جلبک بوده که با آنزیم‌های محدودالاثر مختلفی بریده شده‌اند. به دلیل اینکه نمونه‌ها هتروژنوس یا ناجور ترکیب هستند، قطعات با هم ادغام شده و تشکیل یک اسمیر را روی ژل داده‌اند. نمونه‌هایی که بیش‌ترین فاصله مهاجرت را در ژل داشتند (خطوط ۳، ۴، ۵، ۹ و ۱۰) حاوی قطعات کوچک‌تری نسبت به آن‌هایی که در قسمت بالای ژل قرار گرفته‌اند می باشند(خطوط ۲، ۷، ۸ و ۱۱). عکس از دکتر N. Urwin.

۳-۷-۱) اصول توالی‌یابی DNA

بنابرتعریف، تعیین توالی یک DNA به شناسایی توالی بازها با استفاده از توانائی توالی‌یابی یک پردازشگر دارد به‌طوری که هر یک از بازها را در جای خود و به نوبت شناسایی کند. سه شرط جهت دستیابی به این امر وجود دارد:

- ابتدا باید قطعات DNA را برای توالی‌یابی به صورت یک شکل مناسب آماده سازی کرد.
- تکنیک مورد استفاده باید به گونه‌ای باشد که هر یک از بازهای موجود را به‌صورت مناسب شناسایی کند.
- روش شناسایی باید امکان تشخیص سریع و دقیق بازها را فراهم کند.

اصول توالی‌یابیDNA بسیار آسان است. اما روش‌های استفاده شده برای حصول نتیجه دلخواه پیچیده هستند.

تهیه و آماده سازی قطعات DNA از نظر تکنیکی بسیار ساده است. قطعات فوق اغلب توالی‌های کلون شده‌ای هستند که جهت توالی‌یابی در یک ناقل مناسب قرار گرفته اند که کار کلون سازی نیز به شکل دقیق و تقریبا آسان قابل انجام است. بیش‌ترین مشکل "مشکل اطلاعاتی" در مورد مکان قرارگیری قطعات فوق در درون ژنوم است که در این خصوص دو رویکرد وجود دارد که در بخش ۳-۷-۲ شرح داده خواهند شد.

پروتکل توالی‌یابی در واقع یک پروسه تکنیکی بوده و نه یک آزمایش. چندین پروتکل پایه در این خصوص وجود دارد، اما بیشتر تکنیک‌های مورد استفاده بر پایه روش‌های آنزیمی هستند (با جزئیات بیشتر در قسمت ۳-۷-۴ آمده است). به هر حال در روش آنزیمی، نتایج دلخواه با تولید مجموعه‌ای از قطعات همپوشان بدست می‌آیند که هر قطعه در طول خود با بازهای متفاوتی پایان می یابد و بنابراین از نظر طول، قطعات تنها در یک نوکلئوتید با هم متفاوت هستند. این ساختار به صورت یک مجموعه از **قطعات تودرتو**[1] شناخته می‌شود. فرض کنید که این تکنیک یک مجموعه از قطعات تودرتو را ایجاد کند. گام نهایی در پروتکل توالی‌یابی، مرحله شناسائی است. این کار عموماً شامل جداسازی قطعات بر روی یک ژل پلی اکریل آمید است. ژل‌های نازک و بلند[2]که در آن‌ها قطعات با رادیواکتیو نشاندار شده‌اند، تولید یک تصویر رادیوگراف می‌کنند. روش‌های اتوماتیک توالی‌یابی از برچسب‌های فلورسنت و الکتروفورز مداوم جهت جداسازی قطعات استفاده کرده و همچنانکه قطعات عبور می کنند مورد شناسایی قرار می گیرند.

دو روش توالی‌یابی در سال ۱۹۷۰ معرفی شدند؛ روش شیمیایی و آنزیمی. روش‌های مدرن توالی‌یابی DNA بر اساس روش آنزیمی هستند.

جهت توالی‌یابی DNA دو روش وجود دارد. در یک روش که توسط آلن ماکسام و والتر گیلبرت[3] پایه‌گذاری شد، از مواد شیمیایی جهت برش DNA در یک مکان مشخص استفاده می‌شود و در نهایت یک مجموعه از قطعات تولید می‌شود که از نظر یک نوکلئوتید با هم متفاوت هستند. نتیجه

---

[1].Nested fragments
[2]. Slab
[3].Allan Maxam and Walter Gilbert

مشابهی از یک راه متفاوت با استفاده از روش دوم بدست می‌آید، که توسط فرد سنگر و آلن کالسون[1] ابداع شده است که شامل سنتز آنزیمی رشته DNA می‌باشد که دراین روش، رشته سنتز یافته DNA به یک نوکلئوتید تغییر یافته ختم می شود. آنالیز قطعات در هر دو روش مشابه است و شامل الکتروفورز ژل و اتورادیوگرافی (با این فرض که از یک برچسب رادیواکتیو در این خصوص استفاده شده) می‌باشد. امروزه اکثراً روش آنزیمی (و انواعی از آن) جایگزین روش شیمیایی شده‌است، اگرچه در برخی موارد توالی‌یابی با روش شیمیایی که جهت تأیید اطلاعات بدست آمده با روش آنزیمی انجام می شود، می‌تواند اطلاعات مفیدی را در اختیار قرار دهد.

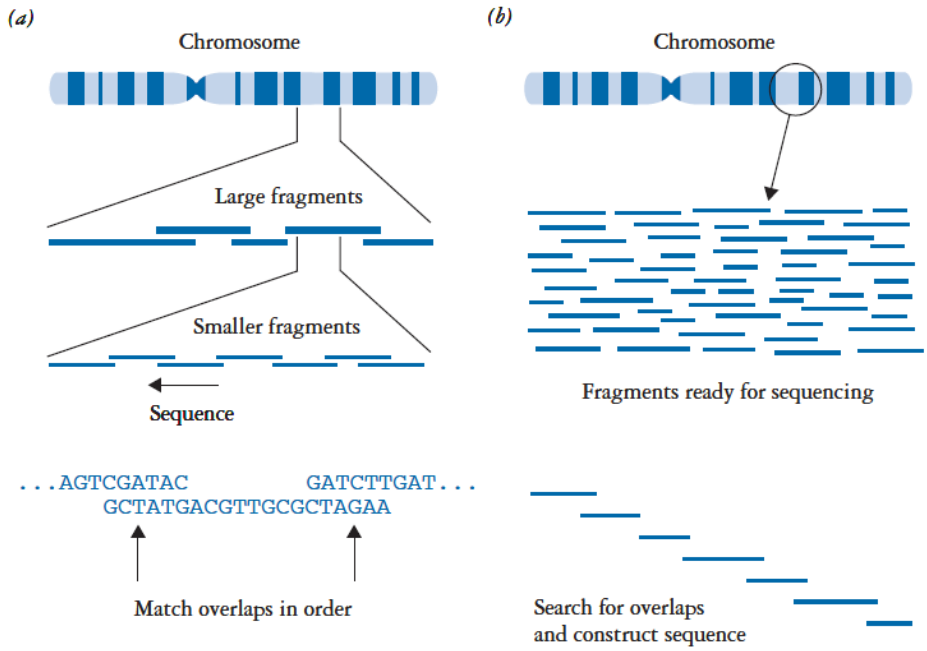
همان طور که اشاره شد، روش‌های شناسایی فلوروگرافیک می‌توانند جای‌گزین استفاده از ایزوتوپ‌های رادیواکتیو شوند. این امر در توالی‌یابی DNA دارای اهمیت بسیار است-سرعت فرایند را بالا برده و امکان خودکارشدن فرایند را فراهم می کند-فرایند فوق با جزئیات بیشتر هنگام بررسی توالی‌یابی ژنوم در فصل ۱۰ بحث خواهد شد.

۳-۷-۲) آماده‌سازی قطعات DNA

دشواری آماده‌سازی یک قطعه جهت توالی‌یابی به میزان زیادی وابسته به نوع پروژه توالی‌یابی است. اگر هدف، توالی‌یابی بخشی از ژن باشد که این بخش قبلا جداسازی و شناسایی شده است، انجام فرایند توالی‌یابی نسبتاً سرراست بوده و معمولاً نیاز به طول و شکل مناسبی از آن قطعه جهت انجام توالی‌یابی دارد.

---

1. Fred Sanger and Alan Coulson



شکل ۳-۷) دو روش جهت توالی‌یابی قطعات بزرگ DNA. (a) یک روش ترتیبی نشان داده شده است در آن موقعیت نسبی قطعات کلون شده مشخص می‌باشد. این رویکرد از اطلاعات نقشه‌های فیزیکی جهت مکان یابی کلون‌ها روی بخش‌های خاصی از کروموزوم استفاده می‌کند. در ادامه این رویکرد، همچنانکه قطعات کلون شده کوچک‌تر می‌شوند (و نهایتاً به اندازه مناسب جهت توالی‌یابی می‌رسند)،-داده‌های توالی‌ها به عنوان مجموعه ای از توالی‌ها مرتب شده، می‌توانند با هم تجمیع شوند. این روش گاهی اوقات به نام روش کلون کانتیگ[1] شناخته می‌شود. (b) این قسمت روش شات گان[2] را نشان می‌دهد. در روش فوق هیچ کوششی جهت تعیین ترتیبی مکان نسبی قطعات مورد توالی‌یابی انجام نمی‌شود. در عوض، قطعات به صورت تصادفی تولید و توالی‌یابی می‌شوند. نتایج توالی‌یابی با استفاده از تطابق نواحی همپوشان با هم تجمیع می‌شوند. هر دو روش دارای مزایایی هستند. روش ترتیبی اول، در مرحله همسانه‌سازی و توالی‌یابی دشوار است. اما تجمیع توالی‌ها در روش دوم نسبت به روش شات گان آسان‌تر است.

پروژه‌های توالی‌یابی درمقیاس وسیع، به تعداد زیادی فاکتور وابسته هستند اما همه آنها نهایتا انتخاب بین یکی از دوروش‌توالی‌یابی ترتیبی یا شات گان هستند.

با این حال، اگر هدف، توالی‌یابی یک قطعه بزرگ DNA (مانند کل کروموزوم) باشد، مشکل بزرگ‌تر خواهد بود. در این مورد نوع روش توالی‌یابی دارای اهمیت بوده و در این خصوص دو روش

---

[1]. Clone contig
[2]. Shotgun

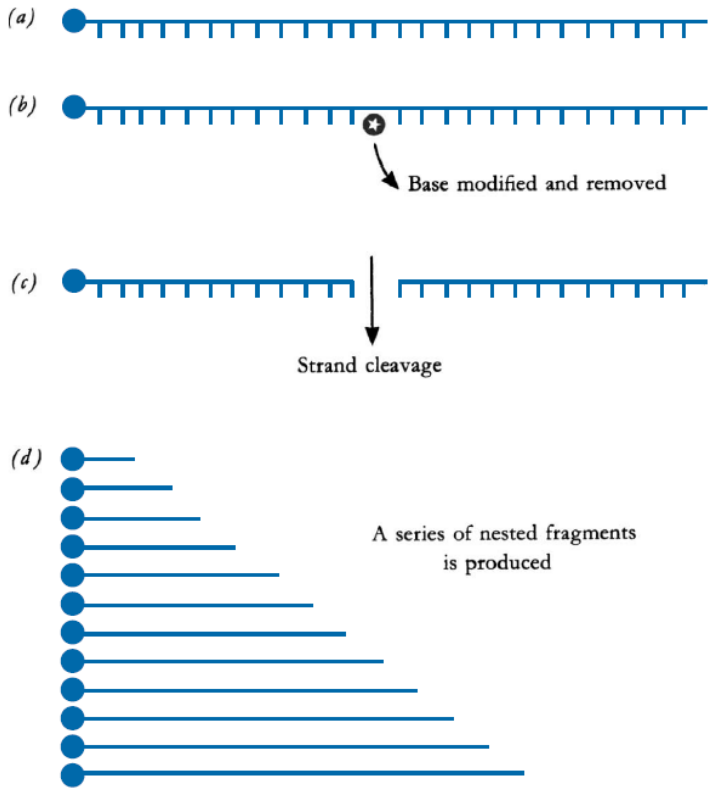
وجود دارد. اولین روش توالی‌یابی ترتیبی[1] نام دارد (اغلب تحت عنوان روش «کلون به کلون» یا «کلون کانتیگ[2]» شناخته می‌شود: کانتیگ مخفف کلمه پیوسته[3] است). در این روش قطعات به‌عنوان بخشی از پروژه توالی‌یابی ردیابی می‌شوند و ترتیب نسبی آنها همچنانکه پروژه به پیش میرود، تعیین می‌گردد. توالی‌ها برمبنای رفرنس و براساس ترتیب، کنار هم قرار می‌گیرند. روش دوم، توالی‌یابی شات گان[4] نام دارد که در آن قطعات به طور تصادفی تولید و توالی‌یابی می‌شوند. در نهایت تجمیع کردن توالی‌ها بر اساس نواحی همپوشان با استفاده از کامپیوتر انجام می‌شود. این دو روش در شکل ۳-۷ شرح داده شده‌اند.

۳-۷-۳) توالی‌یابی با روش ماکسام و گیلبرت (روش شیمیایی)

در این روش به‌عنوان ماده شروع کننده نیاز به یک قطعه معین از DNA است. در این روش نیازی به کلون کردن قطعه مورد نظر در یک ناقل پلاسمیدی نیست، لذا این تکنیک برای هر نوع قطعه‌ای از DNA قابل استفاده است. مولکول DNA با استفاده از ^{32}P در انتهای ´۵ هر رشته نشاندار می‌شود و جهت دستیابی به یک جمعیت از رشته‌های نشاندار برای واکنش‌های توالی‌یابی، رشته‌ها وارشته، جداسازی و خالص می‌شوند (شکل ۳-۸). مرحله بعد، ایجاد یک تغییر شیمیایی در بازهای رشته DNA است. این کار در طی چهار یا پنج واکنش که که هر کدام دارای ویژگی ها¬وشرایط واکنشی منحصربفرد خود هستند انجام می شود و بنابراین به طور میانگین، فقط یک تغییر در هر نسخه از مولکول DNA القاء می‌گردد. سپس بازهای تغییر یافته ازگروه‌های قندی که به آن‌ها متصل هستند جدا شده و رشته‌ها در این مکان‌ها با استفاده از ماده شیمیایی پاپریدین برش می خورند. تئوریآزمایش این است که با توجه به تعداد زیاد مولکولهای بدست آمده و واکنش‌های متفاوت انجام شده، این فرایند مجموعه‌ای از قطعات تو در تو[5] را ایجاد خواهد کرد (**مترجم:** که در اندازه فقط از نظر یک نوکلئوتید متفاوت هستند).

---

1. Ordered sequencing strategy
2. Clone contig
3. Contiguous
4. Shotgun approach
5. Nested Fragments

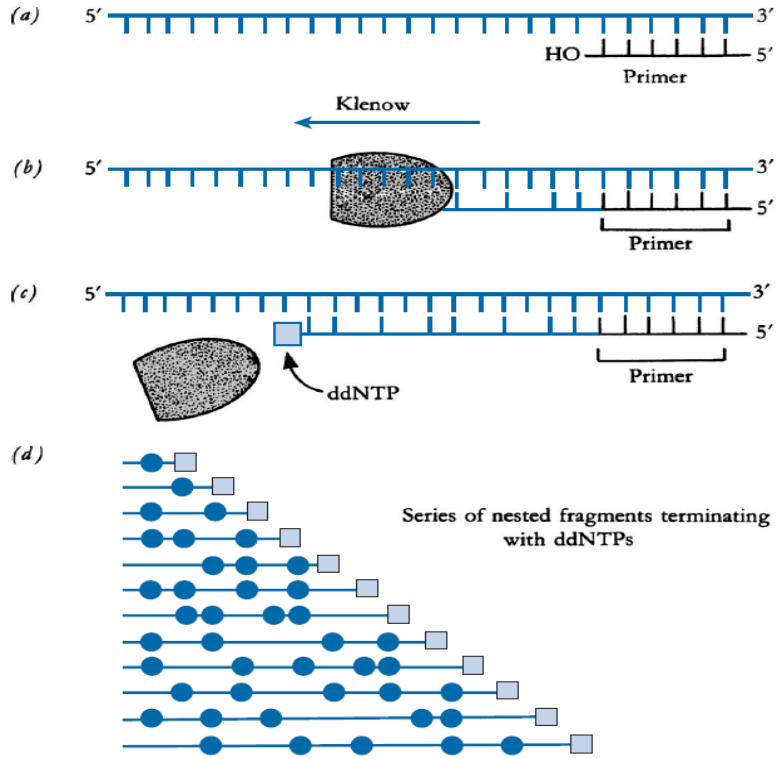


شکل ۳-۸) توالی‌یابی DNA با استفاده از روش شیمیایی (ماکسام-گیلبرت). (a) ابتدا مولکول DNA تک رشته‌ای رادیو نشاندار تولید می‌شود. (b) بازهای DNA به صورت شیمیایی تغییر یافته و حذف می‌شوند: به طور میانگین یک باز در هر مولکول، حذف می‌گردد. (c) سپس ستون فسفودی استری با استفاده از ماده پاپریدین شکسته می‌شود. (d) در نهایت مجموعه‌ای از قطعات که از نظر طولی فقط دریک نوکلئوتید با هم متفاوت هستند، ایجاد می‌شوند-که در انتهای ´۵ خود نشاندار می باشند.

۳-۷-۴) توالی‌یابی با روش سنگر-کالسون (روش دی دزوکسی یا آنزیمی)

اگرچه این روش نتیجه مشابهی با روش شیمیایی دارد، اما روش سنگر-کالسون در اساس با روش ماکسام و گیلبرت متفاوت است. در این روش، نسخه‌ای از DNA که قرار است توالی‌یابی شود با استفاده از قطعه کلنو از آنزیم DNA پلیمراز سنتز می‌شود (بخش ۴-۲-۴ را ببینید). توالی الگو برای این واکنش، مولکول DNA تک رشته ای و یک آغازگر که انتهای ´۳ برای فعالیت آنزیم DNA پلیمراز به منظور شروع سنتز رشته جدید را فراهم می‌کند، باید استفاده شود (شکل ۳-۹). تولید قطعات تودرتو با یک dNTP تغییر یافته در هر واکنش، انجام می‌شود. این dNTPs فاقد

یک گروه هیدروکسیل در مکان ´۳ دئوکسی ریبوز است-که البته حضور آن جهت طویل شدن زنجیره ضروری است. این dNTPs تغییر یافته تحت عنوان دی دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات[1] (ddNTPs) شناخته می‌شوند. چهار ddNTPs (به شکل‌های A، T، C و G) در سریای از چهار واکنش مجزا شرکت می‌کنند که هر کدام از آن واکنش ها، حاوی هرچهارنوع dNTPs طبیعی هستند.

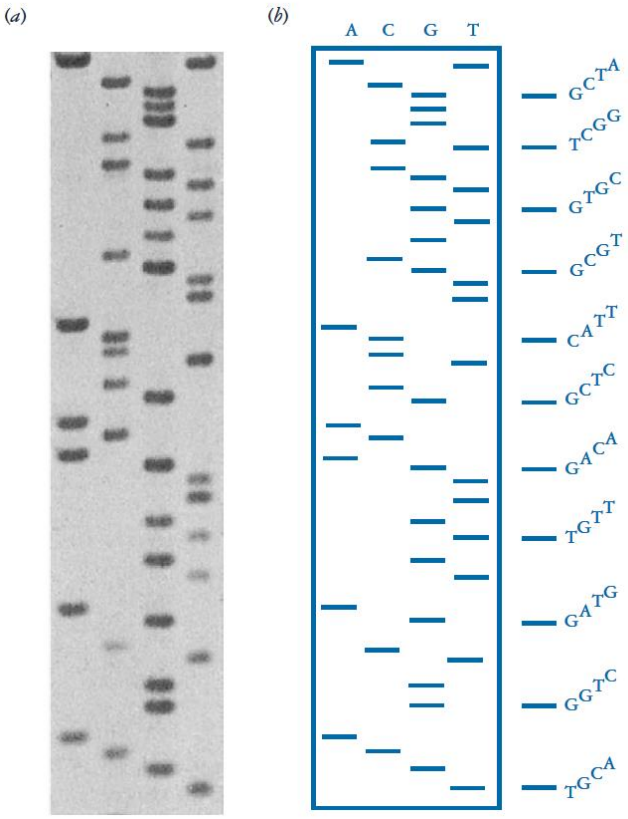


شکل ۳-۹) توالی‌یابی DNA با استفاده از روش ختم زنجیره دی دزوکسی (سنگر- کالسون). (a) یک آغازگر به رشته الگو تک رشته‌ای متصل می‌شود و (b) قطعه کلنو از آنزیم DNA پلیمراز I جهت سنتز یک نسخه از DNA مورد استفاده قرار می گیرد. یک dNTP رادیو نشاندار (اغلب [α-^{35}S]dNTP، دوایر توپر) درون مولکول DNA قرار می‌گیرد. (c) زمانی که دی دئوکسی نوکلئوزید تری فسفات (ddNTPs) وارد واکنش شود سنتز زنجیره پایان می یابد. (d) یک سری از چهار واکنش، هر یک حاوی یک ddNTP و چهار dNTPs مورد نیاز جهت طویل شدن زنجیره است که در نهایت یک سری از قطعات رادیونشاندار که در اندازه فقط از نظر یک نوکلئوتید متفاوت هستند، را ایجاد می‌کند.

[1].Dideoxy nucleoside triphosphates

غلظت فرم دی دزوکسی به گونه ای است که به تعداد اندکی وارد زنجیره در حال ساخته شدن گردد. بنابراین هر واکنش، یک سری از قطعات ختم شده به یک نوکلئوتید خاص را تولید می‌کند و چهار واکنش با هم مجموعه ای از قطعات تو در تو با اندازه متفاوت در یک نوکلئوتید را ایجاد می‌کنند. زنجیره DNA با استفاده از یک dNTP رادیواکتیو موجود در واکنش نشاندار می‌شود که این کار معمولاً با استفاده از $[\alpha\text{-}^{35}S]dATP$ انجام میگیرد که موجب خواندن توالی‌های بیشتری از روی یک ژل ساده نسبت به $^{32}P\text{-}$ dNTPs نشاندار که در گذشته از آن استفاده می‌شد، می گردد.

تولید قطعات در روش توالی‌یابی دی دئوکسی نسبت به روش توالی‌یابی شیمیایی پیچیده‌تر است و معمولاً این کار با انجام چندین مرحله همسانه‌سازی در ناقلین مختلف انجام می‌شود. بسیاری از ناقلین پلاسمیدی اکنون در دسترس هستند (بخش ۵-۲) و برخی از انواع آن‌ها را می‌توان مستقیماً در آزمایشات توالی‌یابی به کار برد. روش دیگر،همسانه‌سازی DNA در ناقلی مانند باکتریوفاژ M13 است (بخش ۵-۳-۳) به گونه‌ای که DNA تک رشته‌ای را در طی فرایند آلوده‌سازی ایجاد می‌کند. این کار سوبسترای قابل قبولی را برای فرایندهای توالی‌یابی ایجاد می‌کند.



شکل ۳-۱۰) خواندن توالی DNA. (a) یک اتورادیوگراف از بخشی از ژل توالی یاب و (b) یک تصویر ردیابی از اتورادیوگراف. هر خط نشان‌دهنده یک واکنش حاوی یکی از چهار ddNTPs مورد استفاده در تکنیک توالی‌یابی DNA با روش ختم زنجیره‌ای است. توالی از سمت پایین ژل خوانده می‌شود. قطعات پیاپی فقط در یک نوکلئوتید با هم تفاوت دارند. چند صد باز را می‌توان از روی یک اتورادیوگراف خوب خواند، اگرچه ممکن است نواحی ناواضحی نیز در ژل وجود داشته باشد که در این صورت نیاز به بررسی مجدد دارد. معمولاً برای دستیابی به بهترین اطلاعات، هر قطعه از DNA چندین بار توالی‌یابی می‌شود. عکس از دکتر N. Urwin.

۳-۷-۵) الکتروفورز و خواندن توالی‌ها

جداسازی قطعات DNA تولید شده در یک واکنش توالی‌یابی با استفاده از PAGE انجام می‌شود. برای یک آزمایش استاندارد (در مقیاس کوچک و به طور غیر خودکار)، از سیستم ژل منفرد استفاده می‌شود. ژل‌ها معمولاً حاوی ٪۲۰-۶ پلی اکریل آمید و اوره ۷ مولار هستند که بعنوان مواد واسرشته کننده، از اثرات ایجاد ساختار ثانویه DNA می‌کاهند. این کار بسیار پراهمیت است، زیرا

قطعاتی که تنها به اندازه یک باز از نظر طول با هم متفاوت هستند را می‌توان با این روش از هم جدا کرد. ژل‌ها بسیار نازک هستند (۰/۵ میلیمتر و یا کمتر) و در جریان الکتریکی قوی بارگذاری می شوندبه طوری که دمای آن‌ها را به ۷۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد می‌رساند. خود این امر نیز به ایجاد شرایط مناسب برای دناتوره‌سازی کمک می‌کند. گاهی جهت دستیابی به حداکثر اطلاعات توالی یابی، دو نوع نمونه روی یک ژل مشابه در دو زمان متفاوت بارگذاری می‌شوند.

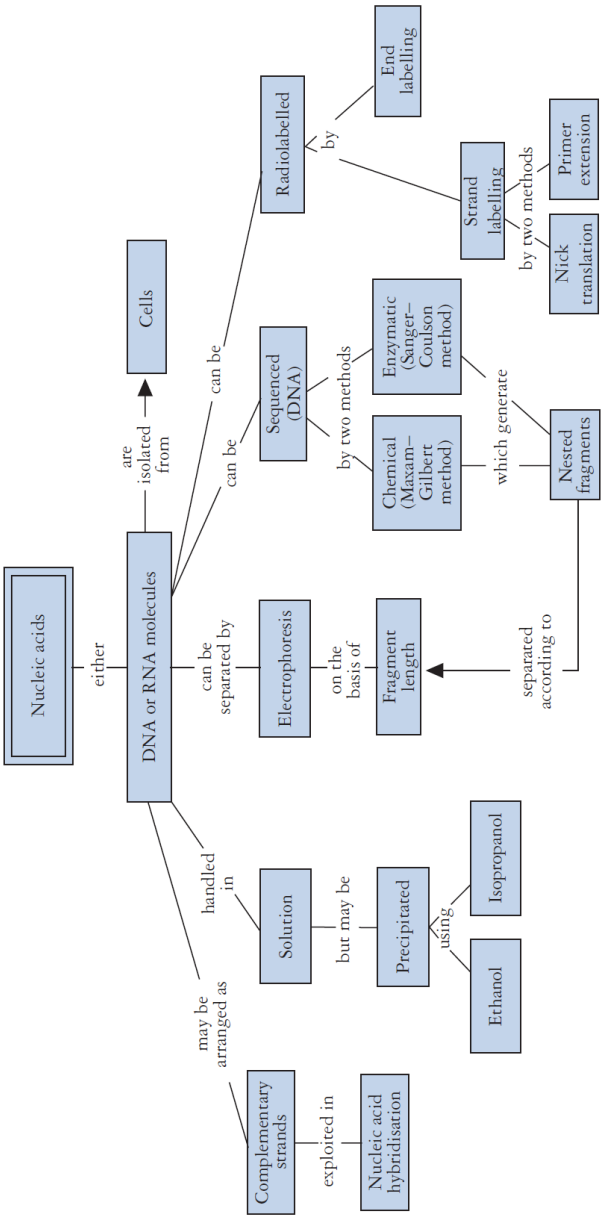
بعد از اینکه بارگذاری ژل در میدان الکتریکی به اتمام رسید، آن را از دستگاه خارج کرده و جهت راحتی کار با آن، می توان آنرا روی چند برگه کاغذ خشک کرد. سپس ژل در معرض فیلم اشعه-X قرار می‌گیرد. تابش‌های حاصل از نوکلئوتید های نشاندار سبب تحریک ذرات نقره شده که در نهایت بشکل لکه های سیاه، پس از عمل‌آوری و تثبیت فیلم دیده می شوند نتیجه به‌عنوان یک اتورادیوگراف شناخته می‌شود (شکل ۳-۱۰ a). خواندن اتورادیوگراف سرراست است. توالی از کوچک‌ترین قطعه به سمت بالا خوانده می‌شود، همان طور که در شکل ۳-۱۰ b نشان داده شده است. با استفاده از این روش ممکن است بتوان توالی‌هایی شامل بیش از چندین صد باز را از روی یک ژل ساده خواند. سپس اطلاعات توالی‌ها جمع آوری شده و با استفاده از کامپیوتر بررسی می‌شوند؛ بگونه‌ای که می‌توان از آن‌ها در ترجمه به توالی‌های آمینواسیدی، شناسایی مکان‌های برش‌های رستریکتازی یا محدود شونده، مناطق دارای همولوژی توالی و سایر ساختارهای موتیف مانند پروموترها و نواحی کنترلی استفاده کرد.

۳-۷-۶) انجام اتوماتیک توالی‌یابی DNA

یکی از پیشرفت‌های قابل‌توجه که فناوری توالی‌یابی را از سیستم‌های بر پایه تک ژل نشاندارشده به سمت "خط تولید" سیستم‌های توالی‌یابی با مقیاس بزرگ ~~ژ~~ فراهم نمود اتوماتیک شدن بسیاری از قسمت‌های آن است درحالی که یک دانشمند و یا یک تکنیسین خوب آزمایشگاه شاید فقط بتواند کمتر از صد باز را در یک روز توالی‌یابی کند، اما واضح است که نمی‌توان از این طریق، به حل مشکل تعیین توالی کل ژنوم در مقابل تعیین توالی یک ژن پرداخت. از این رو بهبود تکنولوژی برای تقاضاهای بزرگ در زمینه توالی‌یابی مورد نیاز بود. این امر با استفاده از بهبود روش‌های آماده سازی و کار کردن با نمونه‌ها، و با بهره گیری از روبوت انجام گرفت که قادر بر تحلیل انبوهی از داده‌هاست. در روشی مشابه خودکار شدن پروسه تهیه مخلوط واکنش‌های توالی‌یابی و همینطور تکنیک‌های الکتروفورز موئینه خطی مداوم، موجب افزایش انبوهی تولیدات پروسه‌های تعیین توالی‌یابی شدند.

فناوری توالی‌یابی می بایست برای انجام تقاضای بزرگ بهبود می‌یافت تا بتواند در محدوده زمانی منطقی پروژهای توالی‌یابی ژنوم را به انجام برساند.

علاوه بر چالش‌های مطرح شده در زمینه تعیین توالی، چالش دیگر با بهبود برنامه‌های کامپیوتری قوی جهت آنالیز مقادیر زیادی از اطلاعات بود که با تکنولوزی‌های جدید به‌کار گرفته شده در توالی یابی ژنومی، ایجاد می شود. در واقع، می توان استدلال کرد که حیاتی‌ترین قسمت فرایند توالی‌یابی، بخش آنالیز دادهاست. در واقع بدون داشتن قابلیت تحلیل داده‌ها، توالی‌ها بدست آمده هم عملاً مسکوت خواهند ماند! این جنبه‌ها با جزئیات بیشتر هنگامی‌که به بحث در مورد بیوانفورماتیک در فصل ۹ و توالی‌یابی ژنوم در فصل ۱۰ می‌پردازیم، ذکر خواهند شد.



نقشهٔ مفهومی فصل سوم

فصل چهارم: ابزارها و روش‌های کار

اهداف:

*مختصری درباره آنزیم‌هایی که در زمینه دست‌ورزی ژن مور استفاده قرار می‌گیرند؛
* تشریح نحوه فعالیت آنزیم‌های برشی نوع دوم؛
*توصیف نحوه فعالیت و کاربرد آنزیم‌های تغییر دهنده DNA؛
*تشریح نحوه فعالیت و استفاده از آنزیم DNA لیگاز.

خلاصه فصل / نتایج یادگیری

بعد از خواندن این فصل به اطلاعات زیر دست خواهید یافت:
* گروه های مختلف آنزیم‌های مورد استفاده در دست‌ورزی ژن؛
*اندونوکلئازهای برشی نوع دوم؛
* مکان یابی مبتنی بر آنزیم‌های برشی؛
*اندو نوکلئازها، اگزو نوکلئازها، پلیمرازها و آنزیم‌های تغییر دهنده انتهای DNA؛
*ترانس کریپتاز معکوس؛
* DNA لیگاز.

کلید واژه ها:

آنزیم، آنزیم برشی محدودشونده، سیستم برش محدودشوندهتغییردهنده، متیلاسیون، توالی شناسائی، نوکلئاز، اندونوکلئازها، باکتری *Escherichiacoli*،*Bacillus amyloliquefaciens*، انتهای تراز (صاف)، انتهای چسبنده، تعیین نقشه کار با آنزیم های محدودشونده ، آنزیم‌های تغییر دهنده DNA، اگزو نوکلئازها، Bal 31، اگزونوکلئازIII ، دی اکسی ریبو نوکلئازI ، نوکلئاز S_1، ریبونوکلئاز، DNA پلیمرازI ، قطعه کلنو، ترانس کریپتاز معکوس، DNA مکمل، الکالاین فسفاتاز، پلی نوکلئوتید کیناز، ترانسفراز انتهایی، DNA لیگاز، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

علاوه بر در اختیار داشتن امکانات اساسی چون یک آزمایشگاه خوب و آماده که حاوی مواد و وسایل متنوع مورد نیاز باشد، یک مهندس ژنتیک باید بتواند DNA را از منابع مختلف برش داده و به یکدیگر متصل نماید. انجام این کار مبنای تولید DNA نوترکیب در آزمایشگاه می‌باشد. به علاوه تولید، همسانه‌سازی و شناسایی مولکول DNA نوترکیب در مراحل مختلف، ممکن است به اعمال تغییرات مشخص در DNA نیاز داشته باشد. ابزارهائی که دست‌ورزی DNA را امکان پذیر می‌سازند، آنزیم‌ها هستند که از طیف وسیعی از ارگانیسم‌ها بدست و از شرکت‌های مختلفی قابل خریداری هستند. در این فصل ما نگاهی به بعضی از گروه‌های مهم آنزیم‌ها خواهیم داشت که ابزار کار مهندس ژنتیک محسوب می‌شوند.

۴-۱) آنزیم‌های برشی محدودالاثر – برش DNA[1]

آنزیم‌های برشی محدودالاثر که مولکول DNA را از مکان‌های معین برش می‌دهند یکی از مهمترین گروه‌های آنزیمی برای دستکاری DNA محسوب می‌شوند. این آنزیم‌ها در سلول‌های باکتریایی وجود دارند که به عنوان قسمتی از مکانیزم دفاعی میزبان عمل کرده و به نام **برش دهنده-تغییردهنده**[2] نامیده می‌شود. در این سیستم، آنزیم برش دهنده محدودالاثر موجب هیدرولیز هر نوع DNA خارجی در سلول می‌شود. به منظور جلوگیری از عمل این آنزیم روی DNA سلول میزبان، آنزیم تغییردهنده سیستم (نوعی متیلاز) با **متیله کردن** نوکلئوتیدهای خاص در **توالی تشخیصی** آنزیم برش دهنده، موجب تغییر در DNA سلول میزبان شده و از عمل این آنزیم روی DNA و برش آن ممانعت به عمل می‌آورد.

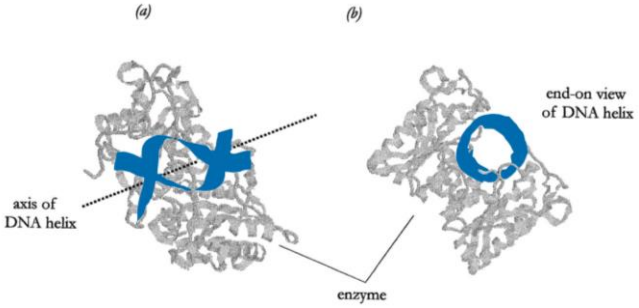
آنزیم‌های برشی محدودالاثر به عنوان یک سیستم حافظتی برای سلول باکتری عمل می‌کنند به طوری که موجب هیدرولیز DNA های خارجی که متیله نشده اند، می‌گردند.

آنزیم‌های برشی محدودالاثر سه نوع هستند (اول، دوم یا سوم). اغلب آنزیم‌های برشی که امروزه استفاده می‌شوند از گروه آنزیم‌های برشی نوع دوم هستند که ساده‌ترین نحوه اثر را در بین آنزیم‌های برشی محدودالاثر دارند. این آنزیم‌ها از نوع **نوکلئاز**[3] هستند (به بخش ۴-۲-۱ مراجعه کنید) و از آنجایی که این آنزیم‌ها DNA را از بخش میانی برش می‌دهند به **اندونوکلئاز**[4] شناخته می‌شوند (بر عکس آنزیم‌هایی که DNA را از یک انتها برش می‌دهند). بنابراین نام صحیح این

---

1. Restriction enzyme
2. Restriction modification system
3. Nuclease
4. Endonuclease

قبیل آنزیم‌ها، اندونوکلئازهای محدودالاثر نوع دوم گر چه این آنزیم‌ها، معمولاً فقط بنام آنـزیم‌هـای محدودالاثر شناخته می‌شوند. این آنزیم‌ها، در واقع به عنوان قیچی‌های مولکولی[1] عمل می‌کنند.



شکل ۴-۱) اتصال آنزیم محدودالاثر *Bam*HI به مارپیچ DNA. این شکل چگونگی پیچیدن آنـزیم برشـی اطراف مارپیچ DNA به منظور تسهیل هیدرولیز باندهای فسفو دی استری را نشان می‌دهد. (a و b) نماهای مختلف در ارتباط با محور مارپیچ. این شکل ارتباط بسیار نزدیک بین ساختار و عملکرد در بیولوژی را نشان می‌دهد. این شکل با استفاده از نرم افزار نمونه سازی مولکولی ***RasMol*** ترسیم شده است (Roger Sayle, Public Domain). بر گرفته از مقاله (Nicholl (2000), *Cell & Molecular Biology*, Advanced Higher Monograph Series, Learning and Teaching Scotland).

۴-۱-۱) اندونوکلئازهای برشی محدودالاثر نوع دوم

رده‌بندی آنزیم‌های برشی بر اساس دسته‌ای از قواعد صورت گرفته است. نام عمومی و اختصاصی موجودی که آنزیم در آن پیدا شده است به عنوان اولین بخش نام آنزیم استفاده می‌شود که شامل اولین حرف عمومی و دو حرف اول نام اختصاصی می‌باشد. از این رو سه حرف اول نام آنزیمی که از سویه ***Escherichia coli*** به دست می‌آید *Eco* و آنزیمی که از ***Bacillus amyloliquefaciens*** به دست می‌آید *Bam* خواهد شد و به همین قسم. بسته به سویه باکتری و وجود یا عدم وجود عناصر خارج کروموزومی، ممکن است مشخصات دیگری به نام آنزیم اضافه گردد. دو آنزیمی که از باکتری‌های مذکور جدا شده و به مقدار زیادی استفاده می‌شوند آنزیم‌های *Eco*RI و *Bam*HI نام دارند. محل اتصال آنزیم *Bam*HI و توالی تشخیصی آن در شکل ۴-۱ نشان داده شده است.

آنزیم‌های برشی، بر اساس باکتری که از آن بدست آمده اند، نامگذاری می‌شوند.

---

[1]. Molecular scissors

ارزش اندونوکلئازهای برشی محدودالاثر در اختصاصی بودن آن‌هاست به این معنی که هر آنزیم محدودالاثر، تنها توالی خاصی از بازهای DNA را شناسایی می‌کند. عمومی‌ترین توالی‌های تشخیصی توسط این آنزیم‌ها، توالی‌های چهار، پنج و شش جفت بازی در طول DNA دو رشته‌ای می‌باشند. با توجه به اینکه در مولکول DNA چهار باز آلی وجود دارند، و با این فرض که میزان وفور هر باز در مولکول DNA تصادفی باشد، فراوانی مورد انتظار هر توالی شناسائی خاص می‌تواند بر اساس فرمول 4^n تعیین گردد که در آن n، طول توالی تشخیصی آنزیم است. بر اساس فرمول فوق، وجود مکان های تشخیص احتمالی برای آنزیم‌های محدودالاثر چهار نوکلئوتیدی در هر ۲۵۶ جفت باز، برای آنزیم‌های محدودالاثر پنج نوکلئوتیدی در هر ۱۰۲۴ جفت باز و برای آنزیم‌های محدودالاثر شش نوکلئوتیدی در هر ۴۰۹۶ جفت باز پیش بینی می‌شود. البته همانطورکه قابل حدث زدن است تغییرات قابل ذکری در رابطه با اعداد مورد محاسبه فوق ممکن است دیده شوند- اما معمولاً طول قطعات بریده شده، نزدیک به اعداد مورد محاسبه‌اند. بنابراین آنزیمی که توالی چهار نوکلئوتیدی را شناسایی می‌کند (و گاهی چهاربرشی[1] نامیده می‌شود نسبت به آنزیمی که دارای جایگاه تشخیص شش نوکلئوتیدی[2] است، قطعات DNA کوتاه‌تری ایجاد خواهد کرد. تعدادی از متداول‌ترین آنزیم‌های برشی محدودالاثر مورد استفاده، به همراه توالی‌های تشخیص و مکان‌های برش آن‌ها در جدول ۴-۱ نشان داده شده اند.

آنزیم‌های برشی مختلف موجب ایجاد قطعات DNA با طول‌های متفاوتی می‌شوند. طول قطعات ایجاد شده با فراوانی تکرار توالی‌های تشخیص آنزیم برشی محدودالاثر در مولکول DNA، مرتبط می‌باشد.

۴-۱-۲) کاربرد اندونوکلئازهای برشی محدودالاثر

استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر بسیار آسان است. مقدار مناسبی از آنزیم را به بافر حاوی DNA هدف اضافه کرده و واکنش در حرارت مناسب (معمولاً ۳۷ درجه سلسیوس) به مدت معین انجام می‌شود. فعالیت آنزیم به شکل واحد[3] تعریف می‌گردد و یک واحد آنزیم، مقدار آنزیمی است که یک میکروگرم از DNA را در مدت زمان یک ساعت در حرارت ۳۷ درجه سلسیوس برش می‌دهد. اگر چه در اغلب آزمایش‌ها هضم کامل DNA هدف مورد نظر است، اما در بعضی موارد برای دستیابی به هضم جزئی مولکول DNA، از ترکیبی از غلظت‌های مختلف آنزیم و مدت زمان متغیر انکوباسیون استفاده می‌شود (مراجعه به بخش ۶-۳-۲).

---

[1] Four-cutter
[2]. Six-cutter, no hexa cutter exists
[3] Unit

جدول ۴-۱) توالی‌های شناسایی و مکان‌های برش تعدادی از اندونوکلئازهای محدودالاثر

Enzyme	Recognition sequence	Cutting sites	Ends
*Bam*HI	5′-GGATCC-3′	G↓GATCC CCTAG↑G	5′
*Eco*RI	5′-GAATTC-3′	G↓AATTC CTTAA↑G	5′
*Hae*III	5′-GGCC-3′	GG↓CC CC↑GG	Blunt
*Hpa*I	5′-GTTAAC-3′	GTT↓AAC CAA↑TTG	Blunt
*Pst*I	5′-CTGCAG-3′	CTGCA↓G G↑ACGTC	3′
*Sau*3A	5′-GATC-3′	↓GATC CTAG↑	5′
*Sma*I	5′-CCCGGG-3′	CCC↓GGG GGG↑CCC	Blunt
*Sst*I	5′-GAGCTC-3′	GAGCT↓C C↑TCGAG	3′
*Xma*I	5′-CCCGGG-3′	C↓CCGGG GGGCC↑C	5′

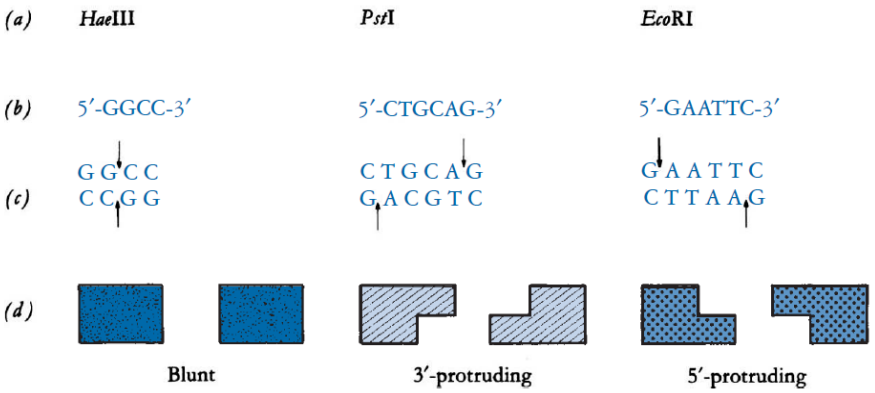
توجه: توالی‌های شناسایی به صورت تک رشته‌ای و در جهت 5'→3' نشان داده شده اند. برای نشان دادن نوع انتهای رشته ایجاد شده توسط آنزیم محدودالاثر خاص، جایگاه‌های برش آن به صورت دو رشته‌ای نشان داده شده است. 5' و 3' به ترتیب به انتهای 5' و 3' بیرون زده مرتبط است. ناحیه برش باندهای فسفو دی استری بر روی هر رشته DNA و برای هر یک از جایگاههای شناسائی به وسیله پیکان نشان داده شده‌اند.

یکی از ویژگی‌های مفید آنزیم‌های محدودالاثر، توانایی آن‌ها در ایجاد انتهاهای مکمل و "چسبنده[1]" در مولکول‌های DNA می‌باشد که این قابلیت می‌تواند در اتصال مولکول‌های مختلف DNA به یکدیگر جهت ایجاد مولکول‌های DNA نوترکیب به کار گرفته شود.

نوع قطعه DNA حاصل از یک آنزیم برشی محدودالاثر خاص، به توالی شناسایی آن آنزیم و جایگاه برش در آن توالی شناسایی بستگی دارد. همان گونه که مشاهده شد، طول قطعه ایجاد شده به فراوانی وقوع توالی شناسایی آنزیم برشی درون DNA هدف بستگی دارد. جایگاه واقعی برش

[1] Cohesive

آنـزیم، انتهـای DNA بـرش یافتـه را تعیـین مـی‌کنـد و ایـن انتهـای ایجـاد شـده در ارتبـاط بـا دست‌ورزی‌های بعدی DNA اهمیت دارد. با استفاده از آنزیم برشی سه نـوع قطعـه DNA ایجـاد می‌شود. ۱- **انتهای تراز**[1] (یا هموار)، ۲- قطعاتی بـا ناحیـه انتهـای '3 آزاد، ۳- قطعـاتی بـا ناحیـه انتهای '5 آزاد. نمونه‌ای از هر نوع انتهـا در مولکـول DNA پـس از اسـتفاده از آنـزیم محـدودالاثر مربوطه در شکل ۴-۲ نشان داده شده است.

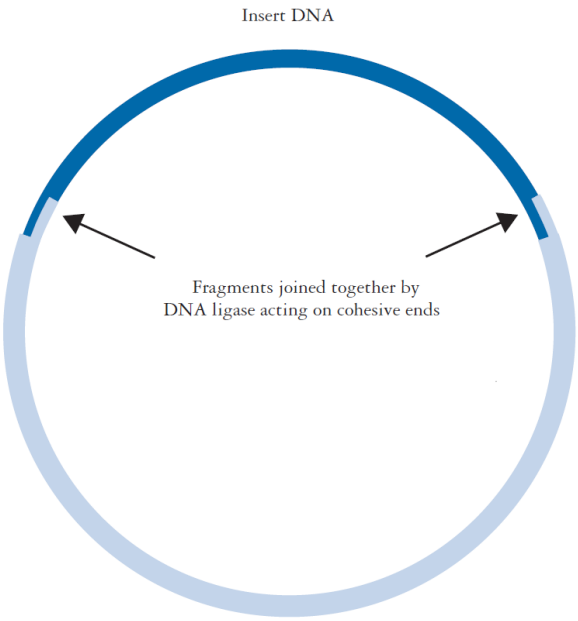


شکل ۴-۲) انواع انتهای ایجاد شده با آنزیم‌های برشی م حدودالاثر مختلف. a. فهرست آنزیم‌ها، b. توالی‌های شناسایی آنزیم‌های محدودالاثر، c. جایگاهای برش آن‌ها و d. نمای کلی انتهاهـای ایجـاد شـده نشـان داده شده است.

آنزیم‌هایی مانند *Pst*I و *Eco*RI قطعات DNA با **انتهای** مکمل یا **چسـبنده**[2] ایجـاد مـی‌کننـد به‌طوری که توالی‌های ایجاد شده از برش می‌توانند با توالی‌های مکمل ایجاد شده بـا همـان آنـزیم جفت شوند. بنابراین با برش دو نمونه DNA مختلف توسط همـان آنـزیم و مخلـوط کـردن آن‌هـا باهم می‌توان به‌گونه‌ای که در شکل ۴-۳ نشـان داده شـده DNA نوترکیـب ایجـاد کـرد. سـاخت DNA نوترکیب یکی از پرکاربردترین مصارف آنزیم‌های برشی محدودالاثر و بخـش حیـاتی اغلـب دست‌کاری‌ها در مهندسی ژنتیک می‌باشد.

---

[1]. Blunt ends
[2]. Sticky end



شکل ۴-۳) ایجاد DNA نوترکیب. قطعات DNA از منابع مختلف، که توسط خیلی از آنزیم‌های برشی ایجاد می‌شوند را می‌توان به شرط دارا بودن انتهای چسبنده مکمل به هم متصل کرد. در محل اتصال نواحی مکمل، اسکلت فسفو دی استر توسط DNA لیگاز بسته می‌شود شکل می‌گیرد).

۴-۱-۳ تهیه نقشه بر مبنای مکان‌های برشی آنزیم‌های محدودالاثر

بیشتر DNA های شناخته شده دارای جایگاه‌های تشخیص برای آنزیم‌های برشی محدودالاثر مختلف هستند و آگاهی از مکان‌های نسبی این جایگاهای برشی در DNA اغلب سودمند است. تکنیکی که برای دست‌یابی به این اطلاعات مورد استفاده قرار می‌گیرد تحت‌عنوان نقشه یابی بر مبنای مکان های برشی[1] نام دارد. این روش نیاز به برش یک قطعه DNA توسط آنزیم‌های برشی انتخابی به‌صورت انفرادی و در وضعیت‌های مختلف دارد. قطعات ایجاد شده در ژل آگاروز الکتروفورز شده و طول قطعات ایجاد شده تعیین می‌گردد. از روی اطلاعات به‌دست آمده، می‌توان مکان‌های تقریبی جایگاه‌های برش را تحلیل کرده مشخص نمود. یک نمونه نسبتاً ساده برای نشان دادن این تکنیک در ادامه آورده شده است.

---

[1]. Restriction mapping

یک نقشه فیزیکی از یک قطعه از DNA می‌تواند بر مبنای تعیین نسبی محل قرار گرفتن توالی‌های تشخیصی آنزیم های محدودالاثر در ارتباط با یکدیگر تعیین شود؛ که روش، به نقشه‌یابی بر مبنای مکان‌های برشی آنزیم‌های محدودالاثر معروف است.

اجازه دهید که نقشه مکان‌های برش آنزیمی قطعه DNA ای به طول ۱۵ کیلو جفت بازی توسط آنزیم‌های برشی محدودالاثر *Bam*HI، *Eco*RI و *Pst*I را تعیین کنیم؛ که در آن هضم‌های آنزیمی مختلفی انجام گرفته، و قطعات ایجاد شده آنالیز گردیده و طول آن‌ها تعیین شده اند. نتایج به دست آمده در جدول ۴-۲ نشان داده شده اند. از آنجائیکه هر آنزیم برشی استفاده شده تنها دو قطعه DNA ایجاد کرده است نتیجه می‌گیریم که DNA هدف، تنها دارای یک جایگاه برش برای هر یک از آنزیم‌های استفاده شده می‌باشد. هضم DNA توسط دو آنزیم، امکان تهیه نقشه جایگاه برش را فراهم می‌سازد و هضم DNA توسط سه آنزیم آن را تائید می‌کند. تهیه این نقشه در شکل ۴-۴ نشان داده شده است.

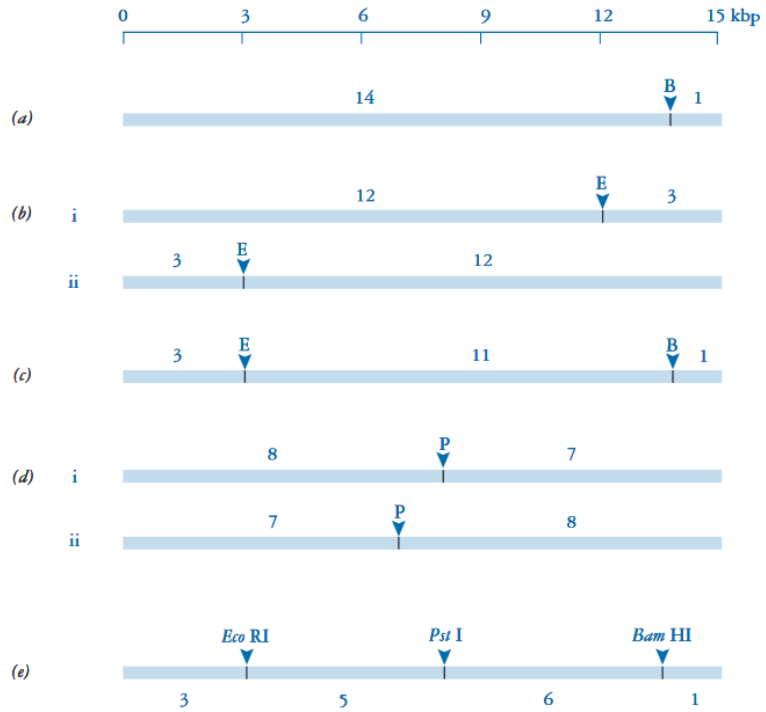
جدول ۴-۲. هضم قطعه DNA ۱۵ کیلو جفت بازی توسط سه آنزیم برشی محدودالاثر

*Bam*HI	*Eco*RI	*Pst*I	*Bam*HI + *Eco*RI	*Bam*HI + *Pst*I	*Eco*RI + *Pst*I	*Bam*HI + *Eco*RI + *Pst*I
14	12	8	11	8	7	6
1	3	7	3	6	5	5
			1	1	3	3
						1

توجه: در این جدول طول قطعات ایجاد شده (به کیلو جفت باز) نشان داده شده‌اند که ناشی از هضم آنزیمی قطعه DNA ۱۵ کیلو جفت بازی توسط آنزیم‌های *Bam*HI، *Eco*RI و *Pst*I هستند. هضم‌های آنزیمی DNA توسط یک، دو و یا سه آنزیم برشی محدود شونده مشخص شده و قطعات ایجاد شده ناشی از هر هضم نیز بر اساس طول شان لیست شده‌اند.

۴-۲) آنزیم‌های تغییردهنده DNA

آنزیم‌های برشی محدودالاثر (قبلاً شرح داده شده) و DNA لیگاز (بخش ۴-۳) با نقش‌های برش واتصال، برای ایجاد مولکول DNA نوترکیب ضروری هستند. سایر آنزیم‌های مورد استفاده در مهندسی ژنتیک کمتر به‌عنوان آنزیم‌های **تغییر دهنده DNA** که به معنی تخریب، سنتز و ایجاد تغییر در DNA است، به حساب می‌آیند. شرح تعدادی از آنزیم‌هایی که به طور معمول استفاده می‌شوند در ادامه خواهد آمد.

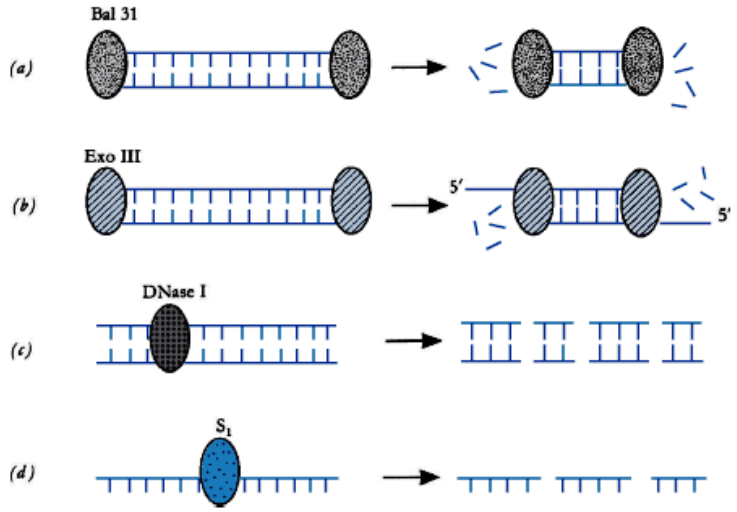


شکل۴-۴) نقشه‌یابی بر مبنای مکان‌های برشی محدودالاثری. a. هضم قطعه ۱۵ کیلو بازی DNA موجب ایجاد دو قطعه ۱۴ و یک کیلو بازی توسط آنزیم *Bam*HI. b. همانطورکه در شکل(b) I و ii(b) نشان داده شده، قطعات ۱۲ و ۳ کیلو بازی با هضم آنزیمی توسط *Eco*RI می‌توانند در دو جهت، با توجه به جایگاه برش *Bam*HI در نظر گرفته شود. هضم آنزیمی توسط دو آنزیم *Bam*HI و *Eco*RI سه قطعه ۱۱، ۳ و یک کیلو بازی ایجاد می‌کند؛ و بنابراین جایگاه‌های برش *Bam*HI و *Eco*RI به صورت شکل c خواهد بود. با استدلال مشابه، جهت قطعات ایجاد شده ۸ و ۷ کیلو بازی ناشی از هضم آنزیمی توسط *Pst*I (شکل d) نقشه نهایی را ارائه خواهد داد (شکل e).

۴-۲-۱) نوکلئازها

آنزیم‌های نوکلئازی با شکستن پیوند فسفودی‌استری که موجب اتصال نوکلئوتیدها به یکدیگر می‌شود، زمینه تخریب مولکول‌های اسید نوکلئیک را فراهم می‌کنند. آنزیم‌های برشی محدودالاثری نمونه‌های خوبی از اندونوکلئازهائی هستند که موجب برش DNA در قسمت‌های داخلی می‌شوند. گروه دوم نوکلئازها که موجب تخریب مولکول DNA از ناحیه انتهایی می‌شوند، **اگزونوکلئازها** می‌باشند.

علاوه بر اندونوکلئازهای محدودالاثری، انواع مختلفی از تیپ‌های آنزیم‌های نوکلئازی وجود دارند که در دستورزی‌های DNA دارای اهمیت هستند.



شکل ۴-۵) نحوه اثر نوکلئازهای مختلف. a. نوکلئاز Bal 3 I آنزیمی پیچیده است. نقش اولیه این آنزیم فعالیت سریع اگزونوکلئازی در ناحیه '3 بوده که و با فعالیت کند همراه است. هنگامیکه نوکلئاز Bal 3 I در غلظت بالا در محیط وجود داشته باشد مولکول‌های DNA را به طور موثری از هر دو انتها کوتاه می‌نماید. b. اگزونوکلئاز III یک اگزو نوکلئاز ناحیه '3 بوده که مولکول‌هایی با انتهاهای '5 آزاد ایجاد می‌کند. c. آنزیم DNase I عموما موجب ایجاد برش های تصادفی در مولکول‌های DNA تک یا دو رشته‌ای می‌شود. d. نوکلئاز S_1 به طور اختصاصی روی RNA یا DNA تک رشته‌ای عمل می‌کند. (بر گرفته از کتاب Brown (1990), *Gene Cloning*, Chapman and Hall; and Williams and Patient (1988), *Genetic Engineering*, IRL Press.).

جدای از آنزیم‌های برشی محدودالاثر، چهار نوکلئاز مهم دیگر هم معمولاً در مهندسی ژنتیک کاربرد دارند. این آنزیم‌ها عبارتند از Bal 31 و اگزونوکلئاز III (اگزونوکلئازها)، و داکسی ریبونوکلئاز I[1] (DNase I) و **نوکلئاز** S_1 (اندونوکلئازها). این آنزیم‌ها در نحوه اثر دقیقشان متفاوت هستند و به مهندس ژنتیک اجازه می‌دهند که از راهبردهای متنوعی برای دستکاری‌های مولکول DNA استفاده نماید. ویژگی‌های چهار نوکلئاز مذکور در شکل ۴-۵ خلاصه شده اند.

[1]. DNase I

علاوه بر نوکلئازهای اختصاصی مولکول DNA، **ریبونوکلئازهایی**[1] (RNase) هم وجود دارند که بر مولکول RNA موثر هستند. این نوع نوکلئازها ممکن است در بسیاری از موارد برای تهیه و آنالیز مولکول DNA نوترکیب مورد استفاده قرار گیرند و معمولاً جهت حذف RNA غیر ضروری به کار می‌روند. هر چند ریبونوکلئازها (RNase) کاربردهای مفیدی دارند، اما این آنزیم‌ها می‌توانند مشکلات نا خواسته‌ای را هم بوجود بیاورند. غیر فعال نمودن ریبونوکلئازها بسیار مشکل است: چون این آنزیم ها در عرق بدن هم ترشح می شوند و بنابراین آلودگی با ریبونوکلئازها، خصوصا هنگام تهیه DNA مکمل[2] از mRNA می‌تواند به عنوان یک مشکل در تهیه DNA نوترکیب تلقی شود. در این مورد ضروری است در هنگام کار، با استفاده از دستکش و اطمینان از این که تمام شیشه‌آلات و لوازم پلاستیکی سترون هستند، از آلودگی ناشی از ریبونوکلئازها جلوگیری کرد.

همه نوکلئازها مفید نیستند! ریبونوکلئازها در هنگام کار باRNA خالص می‌توانند مشکل ایجاد نمایند و برای حذف یا غیر فعال نمودن فعالیت RNase باید با دقت و حساسیت کامل عمل کرد.

۴-۲-۲) پلیمرازها

آنزیم‌های پلیمراز موجب ساخت نسخه‌هایی از مولکول‌های اسید نوکلئیک می‌شوند و در بسیاری از فرآیندهای مهندسی ژنتیک استفاده می‌شوند. هنگام توصیف یک آنزیم پلی مراز، جهت نشان دادن نوع اسید نوکلئیک مورد استفاده آنزیم، ممکن است از اصطلاحهای وابسته به DNA[3] یا وابسته به RNA[4] استفاده شود. بنابراین آنزیم DNA پلیمراز وابسته به DNA، از روی مولکول DNA نسخه‌های DNA تولید می‌کند و آنزیم DNA پلیمراز وابسته به RNA، موجب ساخت DNA از روی RNA الگو می‌شود، و آنزیم RNA پلیمراز وابسته به DNA از روی مولکول DNA نسخه‌های RNA تولید می‌کند. این پلیمرازها با اتصال نوکلئوتیدها به یکدیگر که بازهای آن‌ها مکمل بازهای رشته الگو هستند موجب ساخت اسید نوکلئیک می‌شوند. ساخت رشته نوکلئیک اسید در جهت 5'→3' صورت می‌گیرد به‌طوری که هر نوکلئوتید برای اضافه شدن به یک گروه هیدروکسیل آزاد 3' (3'-OH) به منظور تشکیل پیوند فسفو دی استر نیاز دارد. البته جمله فوق به این معنی است که یک ناحیه دو رشته‌ای با یک گروه هیدروکسیل آزاد در ناحیه 3' (به‌عنوان آغازگر) برای شروع ساخت رشته جدید ضروری است.

---

1. RNases
2. cDNA
3. DNA-dependent
4. RNA-dependent

پلیمرازها آنزیم‌های کپی کننده در سلول محسوب می‌شوند و از ابزارهای ضروری مهندسی ژنتیک بحساب می‌آیند. این پلیمرازها وابسته به رشته الگو هستند و براساس نوع رشته الگو میتوانند برای تکثیر قطعات DNA یا RNA مورد استفاده قرار گیرند.

آنزیم DNA پلیمرازI علاوه بر نقش پلیمرازی، دارای فعالیت اگزونوکلئازی در هر دو جهت 3'→5' و 5'→3' نیز می‌باشد. این آنزیم با نقش اگزونوکلئازی[1] در جهت 3'→5' موجب حذف نوکلئوتیدهای اشتباه رشته در حال ساخت شده و با جایگزینی بازهای مناسب، ساخت رشته جدید را کامل می‌نماید. مصرف عمده این آنزیم در روش ترجمه مبتنی بر برش[2] برای نشان‌دار کردن DNA می‌باشد (در بخش ۳-۴-۳ شرح داده شده است).

خاصیت اگزونوکلئازی 3'→5' آنزیم DNA پلیمراز I را می‌توان با برش این آنزیم به قطعه‌ای بنام قطعه کلنو[3] از بین برد. این کار موجب خواهد شد که نقش پلیمرازی 3'→5' و اگزونوکلئازی در جهت 5'→3' در قطعه کلنو باقی بماند. وقتی که هدف، تکثیر مولکول DNA تک رشته‌ای باشد از قطعه کلنو استفاده می‌شود، زیرا در قطعه کلنو نقش اگزونوکلئازی در جهت 3'→5' وجود ندارد و لذا این آنزیم نمی‌تواند رشته غیر الگو DNA دو رشته‌ای (dsDNA) را هنگام ساخت DNA جدید تخریب نماید. معمولا فعالیت اگزونوکلئازی 5'→3' آنزیم کلنو در شرایط معمولی واکنش، سرکوب می‌شود. کاربرد عمده قطعه کلنو علاوه بر تکثیر DNA تک رشته‌ای در فرآیند ایجاد DNA نوترکیب، رادیونشاندار کردن DNA با ادامه ساخت رشته پرایمر و توالی‌یابی DNA با روش دای دی اکسی (dideoxy) می‌باشد (مراجعه به بخش‌های ۴-۴-۳ و ۴-۷-۳).

یکی از اشکال تغییر یافته DNA پلیمراز I، قطعه کلنو نام دارد که نوعی پلیمراز مفید با کاربردی گسترده در مهندسی ژنتیک است.

آنزیم رونوشت بردار معکوس (RTase)[4] نوعی DNA پلیمراز وابسته به RNA است و بنابراین از روی RNA الگو (mRNA)، رشته DNA را می‌سازد. این آنزیم فاقد فعالیت اگزونوکلئازی است و اگرچه نسبتاً می‌تواند از DNA هم بعنوان الگو استفاده کند اما عمدتا برای تهیه **DNA مکمل** (cDNA یا DNA کپی) از روی مولکول‌های RNA پیک (mRNA) در فرآیند همسانه‌سازی به‌کار می‌رود (مراجعه به بخش ۶-۲-۱).

---

1. Exonuclease
2. Nick translation
3. Klenow fragment
4. Reverse transcriptase

آنزیم رونوشت بردار معکوس، آنزیم کلیدی در ساخت DNA مکمل می‌باشد. این آنزیم یک DNA پلیمراز وابسته به RNA محسوب می‌شود که از یک مولکول RNA پیک، یک نسخه DNA تولید می‌کند.

۴-۲-۳) آنزیم‌های تغییر دهنده انتهای مولکول‌های DNA

آنزیم‌های **الکالین فسفاتاز**[1]، **پلی نوکلئوتید کیناز**[2] و **ترمینال ترانسفراز**[3] روی انتهای مولکول‌های DNA عمل کرده و با نقش‌های مهمی که دارند، به صور متنوعی استفاده می گردند. آنزیم‌های فسفاتاز و کایناز، همان گونه که از نامشان معلوم است در حذف یا افزودن گروهای فسفات نقش دارند. الکالین فسفاتاز باکتریایی (آنزیم مشابهی به نام الکالین فسفاتاز روده گوساله نیز وجود دارد) با حذف گروهای فسفات از انتهای ناحیه '5 مولکول DNA موجب ایجاد گروه OH آزاد (5'-OH) در انتهای ناحیه '5 مولکول DNA می‌شوند. این آنزیم به منظور جلوگیری از اتصال ناخواسته مولکول‌های DNA که می‌تواند در فرایندهای همسانه‌سازی مشکل ایجاد نماید، می‌شود. همچنین قبل از افزودن فسفات رادیواکتیو به انتهای ناحیه '5 مولکول‌های DNA به کمک آنزیم پلی نوکلئوتید کیناز، از آنزیم الکالاین فسفاتاز استفاده می‌شود (مراجعه به بخش ۲-۴-۳).

در بسیاری از کارهای مهندسی ژنتیک، استفاده از آنزیم‌هایی مانند فسفاتاز، کیناز و ترانسفراز برای ایجاد تغییر در انتهای مولکول‌های DNA ضروری است.

آنزیم ترمینال ترانسفراز (ترانسفراز دی اکسی نوکلئوتیدیل انتهایی) موجب افزودن مکرر نوکلئوتیدها به تمام انتهاهای در دسترس در ناحیه '3 می‌شود. اگر چه آنزیم ترمینال ترانسفراز روی DNA با انتهای '3 آزاد برآمده بهترین اثر را دارد اما می‌توان با تغییر شرایط آزمایش موجب اثرگذاری آن بر روی مولکول‌های DNA تراز یا مولکول‌های با '3 فرو رفته نیز شد. این آنزیم عمدتاً برای اضافه کردن دنباله‌های پلیمری مشابه (هوموپلیمرها) به مولکول‌های DNA برای ساخت مولکول‌های نوترکیب کاربرد دارد (مراجعه به بخش ۲-۲-۶).

---

1. Alkaline phosphatase
2. PNK
3. Terminal transferase

۴-۳) DNA لیگاز– متصل کننده مولکول‌های DNA

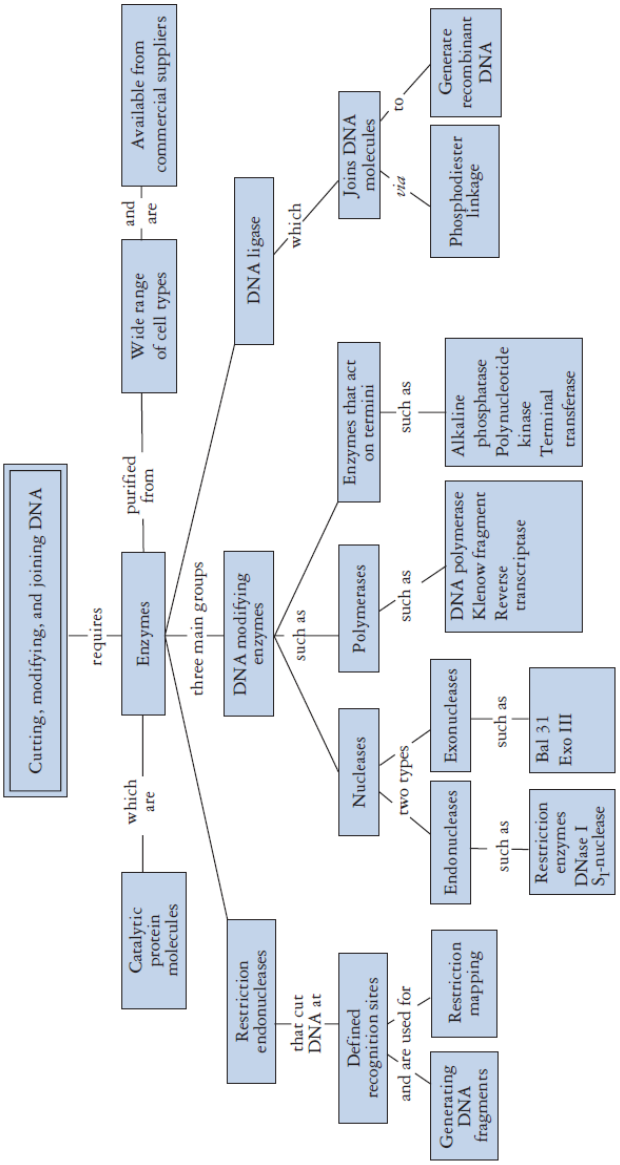
DNA لیگاز[1]، آنزیم مهمی است و نقش آن تعمیر پیوندهای فسفو دی استر آسیب دیده می‌باشد که ممکن است به صورت تصادفی و یا در نتیجه تکثیر یا نوترکیبی DNA در سلول به‌وجود آمده باشند. در مهندسی ژنتیک، این آنزیم برای جوش دادن انفصال موجود در زنجیرهای قند-فسفات به کار می‌رود و بنابراین با اتصال مولکول‌های DNA منابع مختلف، DNA نوترکیب ساخته می‌شود. در واقع این آنزیم نوعی چسب مولکولی محسوب می‌گردد که به منظور چسباندن قطعات DNA به یکدیگر استفاده می‌شود. این نقش آنزیم لیگاز، در دستیابی به موفقیت در بسیاری از آزمایشات ضروری است و به همین دلیل، DNA لیگاز یک آنزیم کلیدی در مهندسی ژنتیک محسوب می‌شود.

DNA لیگاز اساساً چسب مولکولی است که به همراه آنزیم‌های برشی ابزارهای اساسی برش و اتصال مولکول‌های DNA هستند.

آنزیمی که معمولاً برای این منظور استفاده می‌شود آنزیم T4 DNA لیگاز است که از سلول‌های باکتری *E. coli* آلوده به باکتریوفاژ T4 استخراج می‌شود. هر چند این آنزیم برای اتصال شکاف موجود در مولکول‌های DNA که دارای انتهای چسبنده هستند خیلی موثر است، در شرایط مناسب می‌تواند مولکول‌های DNA با انتهای تراز را نیز به هم متصل نماید. حرارت بهینه برای فعالیت این آنزیم دمای ۳۷ درجه سلسیوس است اما برای جلوگیری از واسرشته شدن نواحی دو رشته‌ای کوتاه انتهاهای DNA که سبب اتصال زنجیره‌های مولکول DNA به یکدیگر می‌گردند، اغلب از این آنزیم در دماهای خیلی پائین‌تر (۴-۱۵ درجه سلسیوس) استفاده میگردد. قابلیت برش، ایجاد تغییر و اتصال مولکول‌های DNA توسط آنزیم‌های مختلف، به مهندسین ژنتیک اجازه می‌دهد که مولکول‌های DNA نوترکیب ایجاد کنند. فناوری DNA نوترکیب یک فناوری آزمایشگاهی درون شیشه‌ای محسوب می‌شود و نیازی به سیستم زنده ندارد. اگر چه وقتی که قطعه DNA نوترکیب در آزمایشگاه *in vitro* ساخته شد معمولاً برای دستورزی و آنالیز بعدی باید تکثیر گردد. برای تکثیر DNA نوترکیب به یک سیستم زنده نیاز است، مگر این که از **واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)** استفاده شود (برای جزئیات بیشتر به فصل ۷ مراجعه شود). بنابراین ما باید انواع سیستم‌های زنده مورد استفاده برای تکثیر مولکول‌های DNA نوترکیب را مطالعه کنیم. این سیستم‌های تکثیر در بخش بعدی شرح داده شده‌اند.

---

[1]. DNA ligase



نقشهٔ مفهومی فصل چهارم

بخش دوم: روش شناسی دست ورزی ژنی

فصل ۵ سلول های میزبان و ناقلین

فصل ۶ روش های کلون سازی

فصل ۷ واکنش زنجیره ای پلیمراز

فصل ۸ انتخاب، غربالگری و بررسی نوترکیب ها

فصل ۹ بیوانفورماتیک

فصل پنجم: سلول‌های میزبان و ناقل‌ها

اهداف:

* تشریح انواع سلول‌های میزبان مورد استفاده در دست‌ورزی ژن؛
* توصیف ویژگی‌های ناقلین پلاسمیدی و باکتریوفاژی؛
* توصیف ناقلین مورد استفاده در میزبان‌های یوکاریوتی؛
* تشریح روش‌های انتقال DNA نوترکیب به درون سلول‌های میزبان.

خلاصه فصل/نتایج آموزنده

بعد از خواندن این فصل به اطلاعات زیر دست خواهید یافت:

* میزبان و ناقلین مورد نیاز برای همسانه‌سازی ژن؛
* ناقلین پلاسمیدی مورد استفاده در میزبان‌های پروکاریوتی؛
* ناقلین مبتنی بر باکتریوفاژها؛
* ناقلین مورد استفاده در سلول‌های میزبان یوکاریوتی؛
* کروموزومهای مصنوعی؛
* انتقال ژن (ترانسفورمیشن) و آلوده سازی (ترانسفکشن)؛
* بسته‌بندی DNA در شرایط *in vitro*؛
* روش‌های ریزتزریقی و بیولستیکی انتقال DNA.

لغات کلیدی

DNA نوترکیب، همسانه‌سازی ژن، ترانس ژنیک، ناقل، میزبان، میزبان اولیه، پروکاریوتی، نوکلئید، ناقلین شاتل، هسته، ارگانل، مبدأ شروع همانندسازی، مارکرهای گزینش گر، پلاسمید، هم یوغ یا Conjugative، غیر هم یوغ Non-conjugative، تعداد نسخه، شرایط سخت یا کنترل شده stringent، شرایط آرامش یا relaxed، حذف منتج یا derivative، آمپی سیلین، تتراسایکلین، غیرفعال‌سازی ناشی از ورود یک قطعه، پلی لینکر (polylinker)، مکان های همسانه‌سازی چندگانه یا Multiple Cloning (MCS) Sites، کتابخانه ژنومی، باکتریوفاژ، کپسید، بیماریزا، متعادل، لیتیک، لیزوژنیک، مکان *cos*، جذب، آلودگی چندگانه، پروفاژ، بسته بندی شده، چمن (توده یا mass) باکتریایی، پلاگ، واحد تشکیل دهنده پلاگ، فرم همانندساز، ناقل ورود کننده ناقل جانشین، ناقل قابل جایگزینی، قطعه پر کننده یا stuffer قطعات پر کننده یا Ploystuffer، بسته بندی در شرایط *in vitro*، کاسمید، فاژمید، پلاسمید اپی زومال مخمر، پلاسمید داخل شونده مخمر، پلاسمید همانندساز مخمر، پلاسمید سانترومری مخمر، کروموزوم مصنوعی، YACs، BACs، ترانسفورمیشن یا ایجاد دگرگونی، ترانسفکشن یا آلوده سازی، کامپتنت یا پذیرنده، تغییریافته یا ترانسفورمانت، کانکاتامر یا نوالی تکرار شونده یک قطعه DNA، بسته استخراجی، پروتوپلاست، الکتروپوریشن، ریز تزریقی، بیولستیک، بمباران ریزذرات، بمباران درشت ذرات.

در فصل چهارم به بررسی روش‌های مورد نیاز برای تهیه DNA نوترکیب پرداختیم. این فرایند در لوله آزمایش انجام می‌شود و محصولات نوترکیب تولید می‌کند که باید فرایندهای بیشتری روی آن ها انجام شود تا توالی مورد نظر را بتوان انتخاب کرد. در برخی از آزمایشات صدها هزار قطعه DNA مختلف ممکن است تولید شود و جداسازی توالی‌های خاص یک امر تقریباً غیر ممکن می باشد. این اتفاق تا حدودی مشابه جست و جوی سوزن در انبار کاه است. خوشبختانه روش‌های در دسترس یک راه ساده را برای جداسازی توالی‌های یک ژن خاص مهیا می‌کنند. برای رسیدن به این هدف فقط نباید به طور خاص از سیستم‌های تحت شرایط *in vitro* استفاده کرد بلکه در این خصوص می‌توان از ویژگی‌ها و خصوصیات سیستم‌های زنده نیز استفاده نمود. برای جداسازی ژن مورد نظر در بین مجموعه‌ای از توالی‌های DNA نوترکیب سه نکته حائز اهمیت است:

۱. مولکول‌های نوترکیب باید از لحاظ فیزیکی از هم جدا باشند.

۲. به منظور فراهم کردن مقدار کافی از ماده اولیه جهت آنالیزهای بیشتر، باید توالی‌های نوترکیب تکثیر شوند.

۳. قطعات خاص مورد نظر باید توسط برخی روش‌های وابسته به توالی انتخاب شوند.

در این فصل ابتدا دو مورد اول را بررسی می‌کنیم که برای همسانه‌سازی ژن ضروری هستند. این بخش یک قسمت ضروری در بیشتر برنامه‌های دستکاری ژنتیکی است. حتی اگر نتیجه دلخواه ایجاد یک ارگانیسم تراریخت باشد، ژن مورد استفاده باید در ابتدا جدا و ویژگی‌های آن شناسایی شود، بنابراین در این خصوص به سیستم‌های همسانه‌سازی نیاز است. برخی از روش‌های مورد استفاده برای انتخاب توالی‌های خاص در فصل ۸ بررسی خواهند شد.

همسانه‌سازی ژن برای تکثیر مولکول‌های DNA نوترکیب از ویژگی‌های سلول‌های زنده استفاده می‌کند، این رویکردمی‌تواند به عنوان نوعی از کشاورزی مولکولی به کار رود.

بیولوژی همسانه‌سازی ژن به انتخاب و استفاده از یک حامل میکروبی مناسب (ناقل) و یک سیستم زنده (میزبان که ناقل در آن قادر به تکثیر باشد)، بستگی دارد. در این فصل ابتدا انواع مختلف میزبان بیان می‌شود و در ادامه ناقلین مختلف و روش‌های انتقال DNA به درون سلول‌ها ذکر شده است.

همسانه‌سازی ژن با استفاده از یک ناقل برای تکثیر توالی مورد نظر در یک سلول میزبان انجام می‌شود. انتخاب یک ترکیب میزبان/ناقل مناسب یکی از مراحل حیاتی در همسانه‌سازی است.

جدول ۵-۱) انواع میزبان‌های مورد استفاده در مهندسی ژنتیک

Major group	Prokaryotic/eukaryotic	Type	Examples
Bacteria	Prokaryotic	Gram – Gram +	*Escherichia coli* *Bacillus subtilis* *Streptomyces* spp.
Fungi	Eukaryotic	Microbial Filamentous	*Saccharomyces cerevisiae* *Aspergillus nidulans*
Plants	Eukaryotic	Protoplasts Intact cells Whole organism	Various types Various types Various types
Animals	Eukaryotic	Insect cells Mammalian cells Oocytes Whole organism	*Drosophila melanogaster* Various types Various types Various types

توجه: باکتری‌ها و قارچ‌ها به‌طور کلی می توانند با استفاده از مواد ساده در محیط کشت مایع و یا در پلیت‌های جامد حاوی آگار کشت و رشد کنند. سلول‌های گیاهی و حیوانی ممکن است در سیستم کشت بافت و یا به‌عنوان یک سلول در موجود کامل مورد دستکاری قرار گیرند.

۵-۱) انواع سلول‌های میزبان

نوع سلول میزبان مورد استفاده برای یک کاربرد خاص به میزان زیادی به هدف برنامه همسانه‌سازی بستگی دارد. اگر هدف جداسازی یک ژن برای آنالیز ساختاری آن باشد، تجهیزات مورد استفاده ممکن است ساده باشند. اگر هدف بیان اطلاعات ژنتیکی در یک موجود یوکاریوت مانند گیاه باشد، سیستم اختصاصی‌تری مورد نیاز است. این دو هدف ضرورتاً مستقل از هم نیستند. اغلب یک میزبان اولیه ساده برای جداسازی یک توالی که قرار است در یک سیستم پیچیده بیان شود مورد استفاده قرار می‌گیرد. انواع مهم سلول‌های میزبان در جدول ۵-۱ آمده و در ادامه نیز مورد بررسی قرار گرفته است.

۵-۱-۱) میزبان‌های پروکاریوتی

یک سلول میزبان ایده‌آل بهتر است به گونه‌ای باشد که کار کردن با آن آسان و به راحتی نیز تکثیر بوده، و همچنین به‌عنوان یک نژاد با تنوع ژنتیکی گسترده شناخته شده و طیفی از ناقل‌ها را بپذیرد. باکتری *E.coli* این شرایط را داشته و در بسیاری از پروژه‌های همسانه‌سازی نیز مورد استفاده قرار می گیرد. باکتری *E.coli* به خوبی شناخته شده است و سویه‌های مختلف بسیاری

نیز توسط متخصصین ژنتیک میکروبی در حین بررسی مکانیزم های ژنتیکی این میکروارگانیسم از آن جدا شده است.

باکتری *E.coli* یک باکتری گرم منفی که حاوی یک کروموزوم منفرد بوده که در ساختاری شناخته شده به نام نوکلوئید فشرده شده است. اندازه ژنوم آن $۴/۶\times۱۰^{۶}$ جفت باز می‌باشد و امروزه توالی کامل آن شناخته شده است. فرایند بیان ژن (رونویسی و ترجمه) در آن به هم پیوسته است یعنی به‌طور هم‌زمان و با هم انجام می‌شود به طوری که mRNA تازه سنتز شده سریعاً برای ترجمه آماده می‌شود. تغییرات پس از ترجمه‌ای در رونوشت اولیه مانند آنچه در سلول‌های یوکاریوتی اتفاق می‌افتد، در این باکتری رخ نمی‌دهد. لذا *E.coli* به عنوان یکی از ساده‌ترین سلول های میزبان مورد بررسی قرار می‌گیرد. اکثر پروژه‌های همسانه‌سازی ژن که به صورت روزمره در آزمایشگاه‌ها انجام می‌شوند از *E.coli* به عنوان میزبان استفاده می‌کنند و بسیاری از سویه‌های دستکاری شده ژنتیکی از این باکتری نیز، برای کاربردهای مختلف در دسترس هستند.

باکتری *Escherichia coli* به طور رایج به عنوان یک سلول میزبان پروکاریوتی استفاده می‌شود. این باکتری دارای سویه‌های مختلف قابل دسترس برای کاربردهای مختلف است.

علاوه بر *E.coli*، باکتری‌های دیگری نیز ممکن است به‌عنوان میزبان در آزمایشات همسانه‌سازی ژن به کار برده شوند، مانند گونه‌های *Bacillus, Pseudomonas* و *Streptomyces*. اما اشکالات خاصی در کار با بیشتر این باکتری‌ها وجود دارد. اغلب تعداد محدودی از ناقل‌ها برای استفاده در چنین سلول‌هایی در مقایسه با *E.coli* وجود دارد، و نیز بعد از وارد کردن DNA نوترکیب به درون سلول‌های فوق ممکن است موجب ایجاد مشکلاتی شود. این امر زمانی که آزمایشات همسانه‌سازی مقدماتی مانند انتقال مستقیم DNA نوترکیب به درون سلول میزبان انجام می‌شود بوجود می آید. در این نوع از کاربرد، شیوه‌های مؤثر و قابل اطمینانی برای افزایش تعداد قطعات کلون شده مورد نیاز است. لذا برای جداسازی توالی مورد نظر و سپس انتقال DNA خالص شده به یک میزبان هدف، انجام یک مجموعه همسانه‌سازی اولیه در *E.coli* امری ضروری و عاقلانه است. با استفاده از این رویکرد می‌توان بر بسیاری از مشکلات غلبه کرد، خصوصاً زمانی که ناقل های مورد استفاده بتوانند در میزبان هدف و *E.coli* (وکتورهای چند میزبانه[1]) فعالیت کنند. در این کتاب در خصوص استفاده از سایر باکتری‌ها بحث نشده است. برای اطلاعات بیشتر در این زمینه می‌توانید به منابع معرفی شده در قسمت اطلاعات بیشتر مراجعه کنید.

[1]. Shuttle vectors

۵-۱-۲) میزبان‌های یوکاریوتی

مشکل استفاده از ارگانیسم‌هایی مانند *E.coli* به عنوان میزبان برای همسانه‌سازی این است که آن ها موجودات پروکاریوتی بوده و لذا فاقد هسته و سایر اندامک‌ها می‌باشند. این بدان معنی است که برخی از ژن‌های یوکاریوتی ممکن است در *E.coli* مشابه همان عملکردی که در محیط طبیعی خود دارند را نداشته باشد. این امر می‌تواند مانع جداسازی این ژن‌ها بر اساس مکانیسم‌های مبتنی بر بیان ژن شود. همچنین، اگر تولید یک پروتئین یوکاریوتی به عنوان هدف مورد نظر در آزمایش همسانه‌سازی باشد، اطمینان از این موضوع که یک میزبان پروکاریوتی بتواند یک پروتئین کاملاً فعال را تولید نماید کار آسانی نیست.

هنگامی که همسانه‌سازی و بیان ژن‌های یوکاریوتی هدف پژوهشگر باشد، سلول‌های میزبان پروکاریوتی در این خصوص دارای محدودیت‌هایی خواهند بود.

سلول‌های یوکاریوتی از میکروب‌هایی مانند مخمر و جلبک، تا سلول‌های ارگانیسم‌های چند سلولی پیچیده مانند انسان را شامل می‌شوند. سلول‌های میکروبی دارای بسیاری از خصوصیات باکتری‌ها از قبیل رشد آسان و در دسترس بودن موتانت‌ها هستند. یوکاریوت‌های عالی‌تر انواع متفاوتی از مشکلات را برای مهندس ژنتیک فراهم می کنند که برای هر کدام از این مشکلات باید راه حل ویژه‌ای به کار گرفته شود. اغلب هدف یک آزمایش دستکاری ژن در یک حیوان یا گیاه عالی، به جای اینکه هدف خالص سازی یک ژن، آنالیز و بررسی‌های بیشتر و یا تولید مقادیر فراوانی از یک پروتئین خاص باشد، هدف تغییر ژنوتیپی موجود مورد نظر به صورت ایجاد یک موجود ترانس ژنیک است. مبحث تراریخت سازی در فصل ۱۳ آمده است.

مخمر *Saccharomyces cerevisiae* یکی از رایج‌ترین میکروب‌های یوکاریوتی مورد استفاده در مهندسی ژنتیک است. این مخمر برای قرن ها در زمینه تولید نان و آبجو بطور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته. این ارگانیسم در بررسی‌های ژنتیک کلاسیک قابل استفاده بوده و انواعی از سلول‌های موتانت و جهش‌دار از آن موجود است. از نظر پیچیدگی ژنوم، DNA در *Saccharomyces cerevisiae* ۳,۵ برابر بیشتر از DNA موجود در *E.coli* است. توالی کامل ژنوم *Saccharomyces cerevisiae* شناخته شده است. قارچ‌های دیگری که ممکن است در آزمایشات همسانه‌سازی ژن استفاده شوند شامل *Neurospora crassa* و *Aspergillus nidulans* می‌باشند.

میکروب‌ها (مانند مخمر) و لاین‌های سلولی پستانداران دو مثال از سلول‌های میزبان یوکاریوتی هستند که در دست‌ورزی ژن به صورت رایج استفاده می‌شوند.

سلول‌های گیاهی و حیوانی نیز ممکن است به عنوان میزبان برای آزمایشات دستکاری ژن به کار برده شوند. جلبک تک سلولی *Chlamydomonas reinhardtii* تمام مزیت‌های

میکروارگانیسم‌ها را دارد و علاوه بر این از لحاظ ساختمانی و عملکردی سازماندهی سلول‌های گیاهی را داشته و استفاده از آن در آزمایشات دستکاری ژنتیکی با انجام مطالعات بیشتر افزایش خواهد یافت. سایر سلول‌های گیاهی (و حیوانی) معمولاً بعنوان کشت‌های سلولی رشد داده می شوند، به طوری که دستکاری آن‌ها نسبت به دستکاری سلول‌ها دریک موجود کامل بسیار آسان‌تر است. لاین های سلولی پستانداران منابع بسیار مهم سلولی برای پروسه‌های دستکاری ژن هستند. برخی از جنبه‌های مهندسی ژنتیک در سلول‌های گیاهی و حیوانی در بخش آخر این کتاب بحث خواهند شد.

۵-۲) ناقلین پلاسمیدی برای استفاده در *E. coli*

ناقل‌ها باید دارای یکسری ویژگی‌های ضروری باشند. به‌طور ایده آل آن‌ها باید دارای مولکول‌های تقریباً کوچک DNA باشند تا جداسازی و کار با آن‌ها ساده باشد. یک ناحیه شروع همانندسازی باید وجود داشته باشد تا DNA آنها بتواند نسخه برداری کند، بنابراین وقتی که سلول میزبان رشد و تقسیم میشود در جمعیت سلولی حاصله مستقر و پایدار شود. داشتن برخی از انواع مارکرهای انتخابی مطلوب است، این مارکرها ناقل‌ها را قادر می‌سازند تا شناسایی شود. همچنین ناقل باید حداقل یک مکان شناسایی برش اندونوکلئازی داشته تا امکان وارد کردن DNA در آن را فراهم نماید. پلاسمیدها این خصوصیات را دارند و به طور گسترده‌ای به عنوان ناقل مورد استفاده قرار می گیرند. برخی از ویژگی‌های ناقلین پلاسمیدی در ادامه گفته شده است.

۵-۲-۱) پلاسمیدها چه هستند؟

بسیاری از انواع پلاسمیدها به‌طور طبیعی در باکتری‌ها و برخی از مخمرها یافت می‌شوند. آن‌ها مولکول‌های DNA حلقوی بوده و در مقایسه با کروموزوم سلول میزبان نسبتاً کوچک هستند. اگرچه پلاسمیدها غیر ضروری‌اند (برای رشد سلول و تقسیم سلولی مورد نیاز نیستند)، اما موجب ایجاد یکسری خصوصیات در ارگانیسم میزبان می‌شوند (مانند مقاومت به آنتی بیوتیک)، که این خصوصیات در شرایط خاص می‌تواند یک مزیت برای انتخاب باشد. ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک که توسط DNA پلاسمید (pDNA) کد می‌شوند،اغلب در ساخت ناقل‌ها در مهندسی ژنتیک استفاده می‌شوند، به طوری که آن‌ها یک وسیله مناسب برای انتخاب سلول‌های حامل پلاسمید را فراهم می کنند. وقتی آنتی بیوتیک به محیط رشد اضافه شود، فقط سلول‌های حاوی پلاسمید می توانند زنده بمانند. این یک روش انتخابی بسیار ساده و قدرتمند است.

پلاسمیدها جزء عناصر ژنتیکی خارج کروموزومی هستند که برای زنده ماندن باکتری ضروری نیستند، اما خصوصیات مفیدی از جمله مقاومت به آنتی بیوتیک را به سلول میزبان خود منتقل می کنند.

جدول ۵-۲) خصوصیات برخی پلاسمیدهای طبیعی

Plasmid	Size (kb)	Conjugative?	Copy number	Selectable markers
ColE1	7.0	No	10–15	$E1^{imm}$
RSF1030	9.3	No	20–40	Ap^r
CloDF13	10.0	No	10	$DF13^{imm}$
pSC101	9.7	No	1–2	Tc^r
RK6	42	Yes	10–40	Ap^r, Sm^r
F	103	Yes	1–2	–
R1	108	Yes	1–2	Ap^r, Cm^r, Sm^r, Sn^r, Km^r
RK2	56.4	Yes	3–5	Ap^r, Km^r, Tc^r

توجه: مخفف اسم آنتی بیوتیک‌ها به صورت: Ap آمپی سیلین، Cm کلرامفنیکل، Km کانامایسین، Sm استرپتومایسین، Sn سولفونامايد، Tc تتراسایکلین، E1imm و DF13imm بیانگر ایمنی همولوگی بوده اما نسبت به هترولوگ‌های کولیسین ایمنی ندارند. لذا پلاسمید ColE1 مقاوم به کولیسین (E1) بوده، اما نسبت به DF13 مقاوم نیست. تعداد نسخه بیانگر تعداد پلاسمید در هر اکیوالانت از کروموزوم است.

پلاسمیدها می‌توانند به دو گروه پلاسمیدهای کانجوگیتیو[۱] و غیر کانجوگیتیو[۲] دسته‌بندی شوند. پلاسمیدهای کانجوگیتیو می‌توانند انتقال خودشان را بین باکتری‌ها به وسیلهٔ پدیدهٔ کانجوگیشن[۳] تنظیم کنند، که این پدیده به نواحی *tra* (انتقال) و *mob* (در حال جابجایی) نیاز دارد که این دو ناحیه بر روی پلاسمید قرار گرفته‌اند. پلاسمیدهای غیر کانجوگیتیو به خودی خود انتقال نمی‌یابند، ولی می‌توانند توسط پلاسمیدهای مخصوص کانجوگیتیوکه ناحیه *mob* شان فعال است انتقال پیدا کنند. یک رده‌بندی دیگر بر اساس تعداد نسخه پلاسمید یافت شده در سلول میزبان باشد، که بعنوان تعداد کپی شناخته می‌شود. پلاسمیدهای با تعداد نسخه کم تمایل دارند که کنترل دقیقی روی همانندسازی DNA اعمال نموده، که در آن همانندسازی pDNA با همانندسازی DNA کروموزومی همبستگی زیادی دارد. پلاسمیدهای با تعداد نسخه زیاد پلاسمیدهای relaxed نام دارند و تکثیر DNA آن‌ها وابسته به تکثیر DNA کروموزومی سلول میزبان نیست. به طور کلی، پلاسمیدهای کانجوگیتیو بزرگ هستند، کنترل دقیقی روی همانندسازی DNA ارائه می‌دهند و در تعداد نسخه کم وجود دارند، در حالی که پلاسمیدهای غیر کانجوگیتیو کوچک هستند، دارای

---

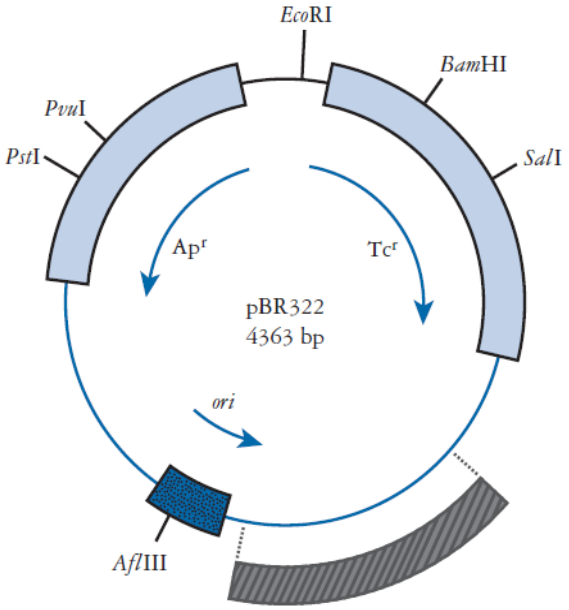
[1]. Conjugative
[2]. Non-conjugative
[3]. Conjugation

همانندسازی DNA آزاد بوده و در تعداد نسخه زیاد وجود دارند. مثال‌هایی از انواع پلاسمیدها در جدول ۵-۲ آورده شده است.

۵-۲-۲) پلاسمیدهای پایه همسانه‌سازی

در مهندسی ژنتیک، پلاسمیدهای طبیعی به میزان قابل توجهی تغییر داده شده‌اند تا ناقل‌هایی با خصوصیات مورد نظر تولید شوند. در نام‌گذاری پلاسمیدها، علامت p برای مشخص کردن پلاسمید استفاده می‌شود و معمولاً با اول اسم افرادی که پلاسمید را جداسازی یا ساخته دنبال می شود. برای دسته بندی پلاسمیدها از یکسری اعداد استفاده می‌شود. یک پلاسمید مهم در بحث دستکاری ژنتیکی pBR322 است که توسط فرانسیسکو بولیوار[1] و همکارانش ساخته شد. ساخت پلاسمید pBR322 شامل یک سری از دستکاری‌ها به منظور تهیه قطعات DNA درست در کنار یکدیگر است، که در واقع نتیجه نهایی حاوی DNA از سه منبع می‌باشد. این پلاسمید تمام خصوصیات یک ناقل خوب مانند وزن مولکولی پایین، ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک، یک مکان شروع همانندسازی و چندین مکان شناسایی اندونوکلئاز محدود الاثر در یک جایگاه برش را دارد. نقشه ژنتیکی پلاسمید pBR322 در شکل ۵-۱ نشان داده شده است.

[1] Francisco Bolivar



شکل ۵-۱) نقشه پلاسمید pBR322. نقاط مهم نشان داده شده شامل ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین و تتراسایکلین (Ap^r و Tc^r) و منطقه شروع همانندسازی (ori) هستند. برخی از مکان‌های برشی منحصر به فرد اضافه شده اند. مناطق حاشور خورده نشان دهنده ۲ قسمت است که از pBR322 برداشته و در ساخت پلاسمید pAT153 استفاده شده است.

pBR322 پلاسمید بسیار معروفی است و تمام بخش‌های مهم برای یک ناقل همسانه‌سازی را دارد- اندازهٔ نسبتاً کوچک، مکان‌های مورد استفاده آنزیم‌های برشی، مکان شروع همانندسازی و ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک.

در اینجا طرح دو جنبه مهم در توسعه ناقل پلاسمیدی اهمیت دارد، همچنان‌که در مورد pBR322 بررسی شد. اول، تعداد زیادی پلاسمید به‌عنوان سری pBR وجود دارد که هر کدام تفاوت‌های اندکی با هم دارند. دوم، مجموعه pBR اساس توسعه تعداد زیادی از ناقلین پلاسمیدی است، به این صورت که قسمت‌هایی از ناقل کلون می‌شود و با توالی‌های DNA دیگر، احتمالا از ناقلین دیگر، متصل می‌شود. این جنبه‌ها می‌تواند در مورد دیگر خانواده‌های ناقلین پلاسمیدی نیز مورد توجه قرار گیرد. در مراحل اولیه توسعه ناقل‌های پلاسمیدی، دانشمندان تمایل به اشتراک گذاشتن آزادانه ناقل‌هایشان داشتند. باوجود این‌که این امر هنوز هم در برنامه‌های کاربردی انجام می‌شود، اما گاهی عواملی مانند حقوق مالکیت فکری و علائم تجاری مربوط به شرکت‌های تجاری توسعه دهنده پلاسمید و فروش تجاری آن بر این مورد تأثیرگذار هستند.

ناقلین پلاسمیدی جدید می‌توانند با بازآرایی قسمت‌های مختلف پلاسمید ساخته شوند. این موضوع می‌تواند با حذف و یا اضافه کردن DNA برای تغییر ویژگی‌های پلاسمید انجام شود. با این روش امکان تولید ناقل‌های زیادی به آسانی وجود دارد.

اینکه چگونه یک تغییر ساده می‌تواند بر روی خصوصیات پلاسمید اثر بگذارد و می‌تواند برخی از خصوصیات پلاسمید اصلی آن را بهبود بخشد با یک گونه از پلاسمید pBR322 نشان داده شده است. پلاسمید pAT153 مزیت‌هایی نسبت به پلاسمید اولیه خود دارد. ناقل pAT153 یک نسخه مشتق حذفی از pBR322 است (شکل ۵-۱ را ببینید). این پلاسمید توسط حذف دو قطعهDNA از pBR322 با استفاده از آنزیم *Hae*II جداسازی شد. مقدار DNA حذف شده کوچک بود (۷۰۵ جفت باز)، اما اثر این حذف موجب افزایش تعداد نسخه به اندازه ۳ برابر و حذف توالی‌های مربوط به جابجایی بود. بنابراین، pAT153 از برخی جهات از ناقل pBR322 بهتر بود، زیرا در هر سلول تعداد بیشتری نسخه دارد و به‌دلیل عدم جابه‌جایی از درجه مهار شدگی بیولوژیکی بالاتری برخوردار است.

در ناقل‌هایی مانند pAT153 و pBR322 حضور دو ژن مقاومت به آنتی بیوتیک (Ap^rوTc^r) انتخاب سلول‌هایی که حاوی پلاسمید هستند را امکان‌پذیر می‌کند. زیرا سلول‌های حاوی هر دو ژن فوق به آمپی‌سیلین و تتراسایکلین مقاوم هستند. یک مزیت اضافه شده این است که مکان‌های محدود الاثر منحصر به فردی در درون ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک وجود دارد که اجازه انتخاب DNA کلون شده را با فرآیندی تحت عنوان غیر فعال‌سازی درونی فراهم می‌کند. در این نوع غیر فعالسازی، DNA وارد شده توالی کد کننده ژن مقاومت را قطع می‌کند، لذا فنوتیپ سلول نوترکیب را تغییر می‌دهد. این موضوع در بخش ۸-۱-۲ مورد بحث قرار می‌گیرد.

۵-۲-۳) ناقلین پلاسمیدی اندکی عجیب‌تر

اگرچه هنوز از پلاسمیدهای pBR322 و pAT153 در همسانه‌سازی ژن استفاده می‌شود، اما شرایطی وجود دارد که استفاده از سایر ناقلین پلاسمیدی ممکن است مناسب‌تر باشد. معمولاً این گونه پلاسمیدها ساخته می‌شوند و بنابراین دارای خصوصیاتی هستند که در ناقلین ساده‌تر یافت نمی‌شود. این ناقلین تغییر یافته ممکن است پروموترهای اختصاصی برای بیان ژن‌های وارد شده را داشته باشند و یا ممکن است دارای ویژگی انتخاب مستقیم نوترکیب‌ها باشند. علی رغم این مزیت ها، ناقل‌هایی مانند pAT153 و pBR322 اغلب در موارد ساده‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرند.

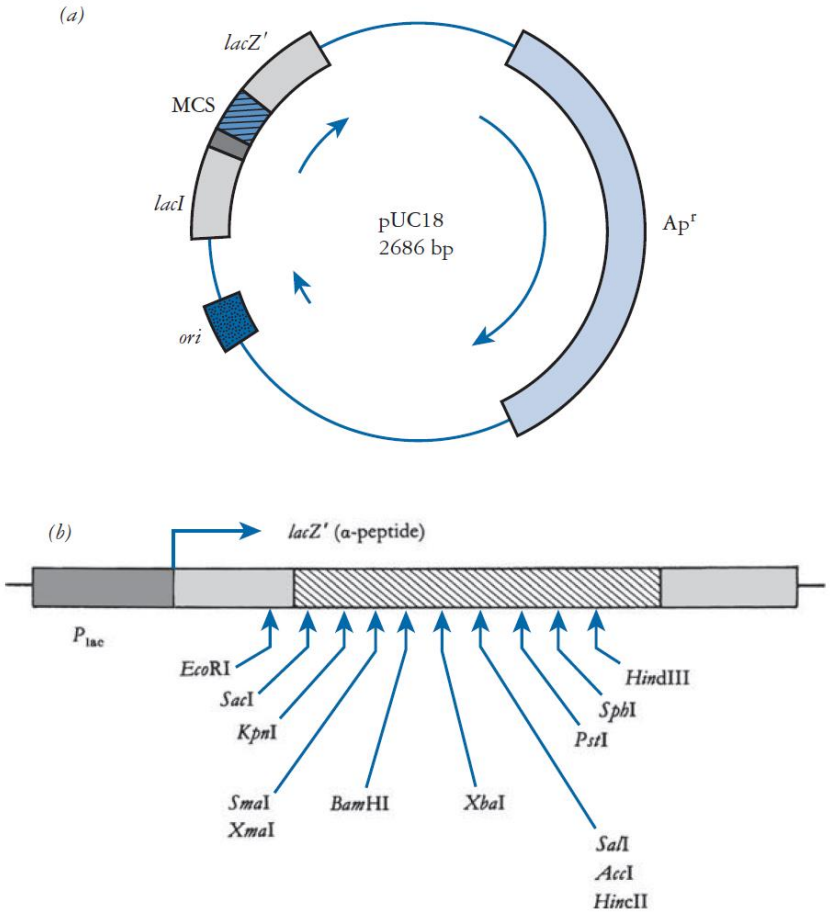
مکان همسانه‌سازی چندگانه (پلی لینکر) انعطاف‌پذیری ناقل‌ها را با ایجاد طیفی از مکان‌های برشی در مکان همسانه‌سازی افزایش می‌دهد.

یک مجموعه از ناقلین پلاسمیدی پراستفاده، خانواده pUC می‌باشند. این پلاسمیدها دارای ناحیه‌ای شامل چندین مکان اندونوکلئاز محدودالاثر منحصر به فرد در قسمت کوتاهی از DNA می‌باشند. این ناحیه به‌عنوان یک مکان پلی لینکر و یا مکان همسانه‌سازی چندتایی شناخته شده و به‌دلیل امکان انتخاب مکان قابل دسترس برای قرار دادن قطعات DNA در حین تولید DNA نوترکیب مفید می‌باشد. نقشه یکی از ناقل های pUC با مکان‌های برشی محدود کننده در مکان پلی لینکر آن در شکل ۵-۲ نشان داده شده است. علاوه بر وجود چندین مکان همسانه‌سازی در ناحیه پلی لینکر، پلاسمیدهای pUC یک ژن بتا گالاکتوزیداز دارند که یک آلفا پپتید را کد می کند. این توالی ناحیه پلی لینکر را در بر می‌گیرد و وارد شدن قطعه DNA به داخل یکی از مکان های همسانه‌سازی موجب می‌شود که پروتئین آلفا غیر فعال شود. این روش مقدمه‌ای بر روش غربال گری مستقیم نوترکیب‌ها با استفاده از سوبسترای X-gal است که در بخش ۸-۱-۱ و ۸-۱-۲ آمده است.

در طی چند سال گذشته بسیاری از انواع ناقلین پلاسمیدی از پلاسمیدهای اصلی مشتق شدند. امروزه انواع پلاسمیدهای مختلف برای اهداف خاصی اغلب به صورت تجاری در دسترس هستند. این ناقل‌ها گاهی به‌عنوان بخشی از یک کیت همسانه‌سازی بوده که چنین کیت‌هایی حاوی تمام مواد ضروری برای انجام یک آزمایش همسانه‌سازی هستند. این تکنولوژی در دسترس تعداد زیادی از دانشمندان است هرچند که ممکن است بدون خطا نیز نباشد! برخی از پلاسمیدهای تجاری قابل دسترس در جدول ۵-۳ آمده است.

ناقلین پلاسمیدی توانایی حمل قطعات بزرگ DNA را ندارند، این امر موجب محدودیت استفاده از آن‌ها در همسانه‌سازی شده است. برای حمل چنین قطعات بزرگی نیاز به ناقلین دیگری است.

اگرچه ناقلین پلاسمیدی خصوصیات بسیار مفیدی دارند و برای دستکاری‌های ژنتیکی ضروری هستند، اما این پلاسمیدها عیوبی نیز دارند. یکی از بزرگ‌ترین عیوب ناقلین پلاسمیدی اندازه قطعه DNAی است که می‌تواند در پلاسمید وارد شود. قبل از طرح موضوع کارایی همسانه‌سازی یا پایداری قطعه الحاقی به پلاسمید، بیش‌ترین اندازه قطعه الحاقی برای بسیاری از پلاسمیدها در حدود ۵ کیلوباز است.



شکل ۵-۲) نقشه پلاسمید pUC18 . (*a*) نقشه فیزیکی، با مکان‌های شروع همانندسازی (*ori*) و ژن مقاومت به آمپی‌سیلین (Ap^r). ژن *lacI* (سرکوب کننده lac)، مکان همسانه‌سازی چندگانه (MCS) یا پلی لینکر و ژن *lacZ*´(قطعه پپتید آلفا از ژن بتا گالاکتوزیداز) نیز نشان داده شده‌اند . (*b*) منطقه پلی لینکر. این منطقه دارای چندین مکان برشی محدود الاثر درست در پایین دست پروموتور lac است (P_{lac}). پلاسمید pUC19 مشابه با پلاسمید pUC18 است با این تفاوت که منطقه اتصالات چندگانه آن معکوس شده است.

در بیشتر موارد این امر یک مشکل نیست، ولی در برخی کاربردها، افزایش اندازه قطعات کلون شونده مهم است، که از آن جمله می‌توان به تهیه کتابخانه ژنومی اشاره کرد که در آن تمام توالی های موجود در ژنوم یک ارگانیسم باید حضور داشته باشند. برای این نوع از آزمایشات ناقل‌هایی که می‌توانند قطعات بزرگ‌تری از DNA را بپذیرند مورد نیاز است. ناقلین مناسب در این زمینه و

برای چنین آزمایشاتی بر پایه باکتریوفاژ لامبدا (λ) است کـه در بخـش بعـدی توضـیح داده شـده است.

۵-۳) ناقلین باکتریوفاژ برای استفاده در *E.coli*

اگرچه ناقلین باکتریوفاژی در بیشتر موارد از ناقلین پلاسمیدی تخصص یافته‌تر هسـتند، امـا اساسـاً دارای عملکرد مشابه با آن‌ها هستند (به عبارت بهتر آن‌ها مولکول‌های حامل بـرای انتقـال قطعـات DNA هستند).

جدول ۵-۳) ویژگی‌های برخی از ناقلین پلاسمیدی که به صورت تجاری در دسترس هستند.

Vector	Features	Applications	Supplier
pBR322	Ap^r Tc^r Single cloning sites	General cloning and subcloning in *E. coli*	Various
pAT153	Ap^r Tc^r Single cloning sites	General cloning and subcloning in *E. coli*	Various
pGEM®-3Z	Ap^r MCS SP6/T7 promoters *lacZ* α-peptide	General cloning and *in vitro* transcription in *E. coli* and single-stranded DNA production	Promega
pCI®	Ap^r MCS T7 promoter CMV enhancer/promoter	Expression of genes in mammalian cells	Promega
pET-3	Ap^r MCS T7 promoter	Expression of genes in bacterial cells	Stratagene
pCMV-Script®	Neo^r Large MCS CMV enhancer/promoter	High level expression of genes in mammalian cells and cloning of PCR products	Stratagene

توجه: صدها نوع از این ناقل‌ها توسط شرکت‌های مختلـف تولیـد شـده و در دسـترس هسـتند. یـک منبـع اطلاعاتی مناسب در این زمینه مطالعه و بررسی بروشورها و وب سایت‌های این شرکت‌ها است. Ap^r مقاومت به آمپیسیلین، Tc^r مقاومت به تتراسایکلین، Neo^r مقاومت به نئومایسین (انتخاب با استفاده از کانامایسین در باکتری و G418 در سلول‌های پستانداران انجام مـی‌شـود). MCS مکـان همسـانه‌سـازی چنـد گانـه، SP6/T7 دو پروموتـور بـه منظـور رونویسـی تحـت شـرایط *in vitro*، *lacZ* ژن بتاگالاکتوزیـداز، CMV سیتومگاویروس انسانی است. علامت ® نشان‌دهنده علامت تجاری شرکت تولید کننده آن است.

دو نوع باکتریوفاژ (λ و M13) به‌طور قابل توجهی برای اهداف همسانه‌سازی توسعه و مورد استفاده قرار می‌گیرند. قسمت‌های مختلف این باکتریوفاژ ها و ناقلین مشتق شـده از آن‌هـا تشـریح خواهـد شد..

۵-۳-۱) باکتریوفاژها چه هستند؟

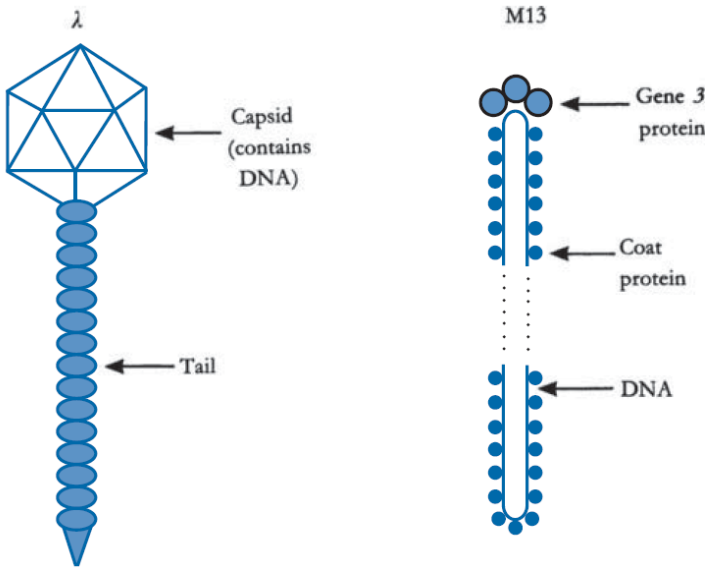
در سال ۱۹۴۰ ماکس دلبوک[1] و گروه فاژی که او پایه‌گذاری کرد، مبانی بیولوژی مولکولی مدرن را با مطالعه در زمینه باکتریوفاژها[2] بنیان نهادند. فاژها در واقع خورندگان باکتریها هستند (ویروس هایی که تکثیرشان به باکتری بستگی دارد). اصطلاح باکتریوفاژ اغلب به صورت فاژ خلاصه می‌شود و می‌تواند برای توصیف یک یا تعداد زیادی از ذرات یک فاژ استفاده شود. لذا ممکن است بگوییم که یک لوله آزمایش حاوی یک فاژ λ یا 2×10^6از عناصر فاژ λ است. اسم جمع فاژها[3] هنگامی استفاده می‌شود که انواع فاژها مانند فاژ T4، M13 و λ مورد بحث باشد.

باکتریوفاژها اساساً ویروس‌های باکتریایی بوده و معمولاً حاوی یک DNA ژنومی هستند که در یک سر پروتئینی (کپسید) قرار گرفته است. مانند سایر ویروس‌ها، آنها برای تکثیر خود وابسته به سلول میزبان هستند و به عنوان موجودات آزادزی عمل نمی‌کنند.

از لحاظ ساختاری، باکتریوفاژها به سه گروه اصلی تقسیم می‌شوند: (۱) بدون دم[4] (۲) با سر و دم و (۳) میله ای[5]. مادهٔ ژنتیکی فاژ ممکن است DNA یا RNA تک رشته‌ای و یا دو رشته‌ای باشد، که البته DNA دو رشته‌ای (ds DNA) بیشتر رایج است. ژنوم در فاژهای بدون دم و دم دار در درون پوشش پروتئینی به نام کپسید[6] قرار می‌گیرد (که در برخی مواقع به عنوان سر یا پوشش فاژ شناخته می‌شود). در یک فاژ ds DNA ژنوم ۵۰٪ از وزن ذره فاژ را تشکیل می‌دهد. لذا فاژها در مقایسه با باکتری‌ها معرف یک سیستم ساده هستند و به همین دلیل برای مطالعات بیان ژن به‌عنوان مدل به‌کار گرفته می‌شوند. ساختمان فاژ λ و M13 در شکل ۵-۳ نشان داده شده است.

---

[1] Max Delbruck
[2] Bacteriophages
[3] Phages
[4] Tailless
[5] Filamentous
[6] Capsid



شکل ۵-۳) ساختمان باکتریوفاژ λ و M13. فاژ λ یک کپسید یا سر دارد که ژنوم DNA دو رشته‌ای آن را پوشش می‌دهد. برای جذب سطحی و ورود به سلول میزبان به دم نیاز دارد. فاژ M13 ساختار ساده‌تری دارد که ژنوم آن به صورت یک DNA تک رشته‌ای محفوظ در پوشش پروتئینی است. محصول ژن شماره سه هم برای ورود و هم برای خروج از سلول میزبان ضروری است. فاژ M13 به صورت آنچه در شکل رسم شده نیست و در واقع یک ساختار نازک و طویل دارد.

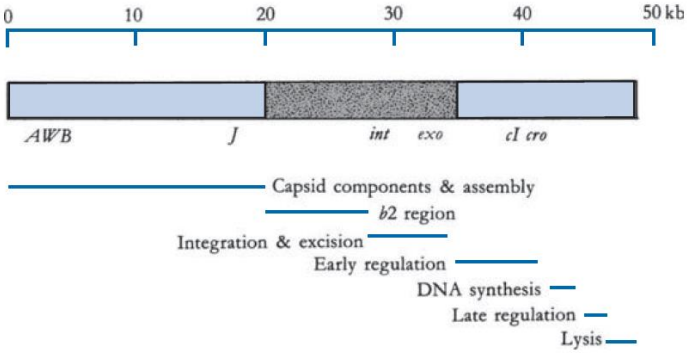
فاژها بر اساس چرخه سلولی خود به بیماریزا[۱] و معتدل[۲] دسته بندی می‌شوند. هنگامی که فاژ به داخل سلول باکتری وارد شود، می‌تواند فاژهای بیشتری را تولید کند و باکتری را از بین ببرد (این مرحله چرخه رشد لیتیک[۳] نامیده می‌شود) یا می‌تواند وارد کروموزوم باکتری شده و بدون اینکه سلول را از بین ببرد خاموش باقی بماند (این مرحله چرخه رشد لایزوژنیک[۴] نامیده می‌شود). فاژهای بیماریزا آن‌هایی هستند که فقط چرخه لایتیک را نشان می‌دهند و فاژهای معتدل چرخه زندگی لایزوژنیک را نشان می‌دهند، اما اغلب آن‌ها در شرایط مناسب وارد مرحله لایتیک می‌شوند. فاژ لامبدا یکی از موارد کاملاً شناخته شده از توع فاژ معتدل است که موضوع تحقیقاتی جدی محسوب شده و در حال حاضر ویژگی‌های ساختاری و نحوه فعالیت آن بطور کم و بیش شناخته شده است.

---

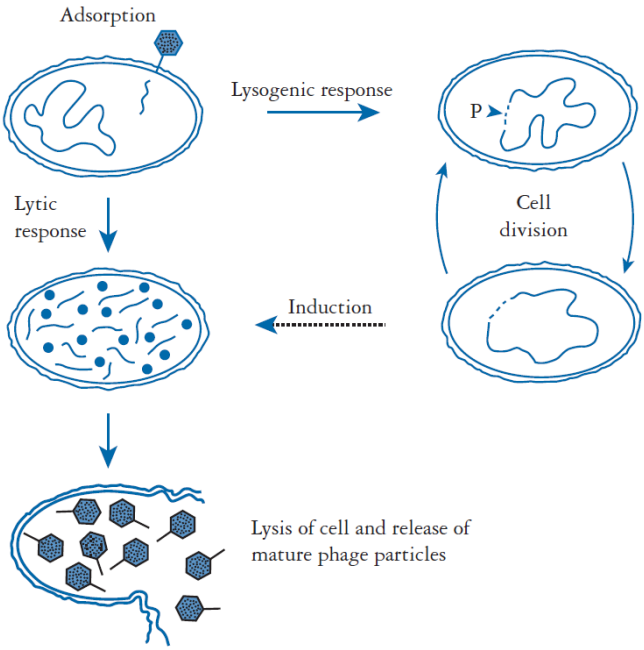
[1] Virulent
[2] Temperate
[3] Lytic
[4] Lysogenic

باکتریوفاژ لامبدا نقش مهمی را در توسعه ژنتیک و زیست شناسی مولکولی باکتریایی ایفا نموده. علاوه بر جنبه‌های مهم آن در تنظیم ژن، باکتریوفاژ لامبدا به عنوان مبنای اصلی و اساسی برای طیف وسیعی از ناقلین همسانه‌سازی عمل می‌کند.

ژنوم فاژ لامبدا ۴۸/۵ کیلوباز طول دارد و ۴۶ ژن را کد می‌کند (شکل ۵-۴). کل ژنوم توالی‌یابی شده است (این توالی‌یابی اولین پروژه توالی‌یابی بزرگ بود که توالی‌یابی آن کامل شد و نشان دهنده یکی از مراحل مهم در ژنتیک مولکولی است) و تمام مکان‌های تنظیمی آن شناخته شده است. در هر دو انتهای ژنوم خطی نواحی تک رشته‌ای کوتاه ۱۲ جفت بازی وجود دارد که مکمل هم هستند و به عنوان انتهای چسبنده عمل می‌کنند که ژنوم فاژ را به دنبال آلودگی سلول میزبان به‌صورت مدور می‌کنند. ناحیه‌ای از ژنوم که رابط انتهای چسبنده است به عنوان مکان COS شناخته می‌شوند.



شکل ۵-۴) تصویری از نقشه ژنوم فاژ λ. برخی از ژن‌ها نشان داده شده‌اند. در زیر مناطق مهم یک خط افقی همراه با توضیح اضافه آمده است. مناطق غیر ضروری که ممکن است در ساختمان ناقل مورد دستکاری قرار گیرند به صورت سایه زده نشان داده شده‌اند.

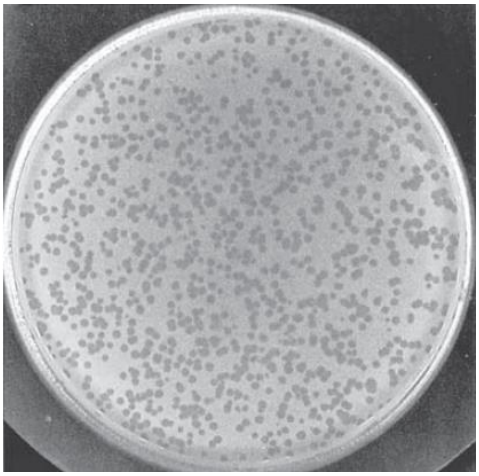


شکل ۵-۵) چرخه زندگی باکتریوفاژ λ. آلودگی هنگامی رخ می‌دهد که ذرات فاژ جذب سلول میزبان شده و DNA آن‌ها به درون سلول میزبان تزریق شود. در چرخه لیتیک، فاژ مکانیسم همانندسازی سلول میزبان را بدست گرفته و نسخه‌هایی از ژنوم فاژ و پروتئین ساختاری خود را تولید می‌کند. ذرات فاژ بعد از بالغ شدن بسته بندی شده و بعد از هضم و تجزیه سلول میزبان از آن رها می‌شوند. در چرخه لایزوژنیک، DNA فاژ در درون ژنوم میزبان وارد شده و به پروفاژ تبدیل می‌شوند (P) که در حین تقسیم سلولی نیز این حالت حفظ می‌شود. در باکتری‌های لایزوژنیک در پاسخ به محرک‌هایی مانند نور فرابنفش چرخه لایتیک ایجاد می‌شود.

آلودگی فاژ با چسبیدن آغاز می‌شود که شامل چسبیدن ذره فاژ به گیرنده سطح سلول باکتری می‌باشد (شکل ۵-۵). هنگامی که فاژ به سلول میزبان می‌چسبد، DNA آن به داخل سلول تزریق می‌شود و چرخه سلولی می‌تواند آغاز شود. ژنوم به صورت حلقوی شده و فاژ چرخه لیتیک و لایزوژنیک را بر اساس فاکتورهای مختلف که شامل شرایط غذایی و متابولیکی سلول میزبان و تعدد عفونت[1] (MOI به معنی نسبت تعداد فاژ به باکتری در طول جریان جذب می‌باشد) است آغاز می کند. اگر چرخه لایزوژنیک آغاز شود، ژنوم فاژ به داخل کروموزوم میزبان وارد می‌شود و به عنوان

[1] Multiplicity of infection

پروفاژ[1] باقی می‌ماند و سپس با DNA کروموزومی همانندسازی شده و به سلول دختری وارد می شود و به‌صورت پایدار می‌ماند. اگر چرخه لیتیک آغاز شود، مجموعه‌ای از حوادث رونویسی، فاژ را قادر می‌سازند تا سلول میزبان را در اختیار بگیرد و چندین نسخه از ژنوم و پروتئین‌های ساختاری تولید کند. سپس این ترکیبات برای سرهم بندی فاژ بالغ به کار گرفته می‌شوند که پس از لیز و هضم سلول میزبان از آن آزاد می‌شوند.



شکل ۵-۶) پلاک‌های باکتریوفاژ. ذرات فاژ λ با سویه‌ای از باکتری *E.coli* مخلوط شده و روی محیط کشت حاوی آگار کشت می‌شوند. بعد از کشت شبانه، باکتری‌ها رشد کرده و به صورت چمن باکتریایی روی محیط کشت دیده می‌شوند و مناطق آلوده شده با فاژ به صورت شفاف به نام پلاک دیده می‌شوند. یک پلاک ناحیه ای است که سلول باکتری در آن مکان لیز و هضم شده است. عکس از دکتر استروناک.

به‌منظور تعیین تعداد باکتریوفاژهای موجود در یک سوسپانسیون، سری محلول‌های رقیق شده با یک باکتری نشانگر (MOI بسیار کم) شده و روی محیط آگار کشت می‌شود. باکتری در انکوباتور رشد می‌کند تا چمن باکتری[2] تشکیل شود. فاژی که در این چمن رشد می‌کند منجر به لیز شدن سلول‌هایی می‌شود که توسط فاژ آلوده شده‌اند و همان‌طور که این رشد گسترش می‌یابد، یک ناحیه شفاف تحت‌عنوان پلاک[3] را تشکیل می‌دهد (شکل ۵-۶). برای تعیین تعداد واحدهای تشکیل دهنده پلاک در سوسپانسیون استوک، پلاک‌ها شمارش می‌شوند. فاژ ممکن است در محیط کشت مایع و توسط آلوده نمودن محیط کشت سلول‌های میزبان در حال رشد تکثیر و تا لیز

[1] Prophage
[2] Bacterial lawn
[3] Plaque

نمودن کامل سلول‌ها نگهداری شوند. میزان عملکرد ذرات فاژی به MOI و مرحله رشدی باکتری که آلوده شده دارد.

فاژ میله ای M13 هم از لحاظ ساختمانی (شکل ۵-۳) و هم از نظر چرخه سلولی از فاژ λ متفاوت است. ژنوم M13 یک مولکول DNA تک رشته‌ای حلقوی با طول ۶۴۰۷ جفت باز می‌باشد. فاژ M13 فقط باکتری *E.coli* که دارای F-pili (یک پروتئین نخ مانند که در سطح سلول‌های مناسب برای فرایند کانجوگیت یافت می‌شود) را آلوده می‌کند. هنگامی که DNA وارد سلول می شود، به مولکول دو رشته‌ای تبدیل می‌شود که به آن فرم همانندساز[1] (RF) گفته می‌شود، که تا زمانی به حدود ۱۰۰ نسخه در سلول برسد به فعالیت همانند سازی ادامه می‌دهد. در این شرایط همانندسازی DNA نامتقارن شده و نسخه‌های تک رشته‌ای از ژنوم تولید و بعنوان قطعات فاژ M13 تخلیه می‌شوند. باکتری لیز نمی‌شود و در طول این پروسه زنده می‌ماند، درحالی‌که رشد و تقسیم سلولی نسبت به سلول‌های غیر آلوده آهسته‌تر انجام می‌شود.

۵-۳-۲) ناقلین بر مبنای باکتریوفاژ لامبدا

استفاده از فاژ لامبدا به‌عنوان یک ناقل همسانه‌سازی مبتنی بر این واقعیت است که تمام ژنوم فاژ لامبدا برای عملکرد فاژ لازم نیست. لذا برای الحاق DNA خارجی شرایطی وجود دارد، اگر چه برخی از نیازهای ضروری در موقع تهیه ناقلین همسانه‌سازی بر پایه فاژ λ باید فراهم شود. اول اینکه، ترتیب ژن‌ها روی ژنوم λ تعیین می‌کند که کدام قسمت‌ها به منظور ورود DNA خارجی می‌توانند حذف یا اینکه کدام قسمت‌ها می‌توانند جایگزین شوند. خوشبختانه ناحیه مرکزی ژنوم λ (بین موقعیت‌های ۲۰ تا ۳۵ روی نقشه نشان داده شده در شکل ۵-۴) به میزان زیادی غیر ضروری است، لذا بازآرایی پیچیده‌ای از ژنوم تحت شرایط *in vitro* نیاز نیست. ناحیه مرکزی به میزان زیادی خصوصیات لیزوژنیک فاژ را کنترل می‌کند و عمدتااین ناحیه بدون زیان رساندن به عملکردهای مورد نیاز برای چرخه لایتیک می‌تواند حذف شود. دوم اینکه، فاژ λ نوع وحشی، چندین مکان شناسایی برای آنزیم‌های محدودالاثر دارد. این مسأله می‌تواند یک مشکل جدی باشد، چون این آنزیم‌ها انتخاب مکان‌ها برای الحاقDNA را محدود می‌کنند. در عمل، انتخاب فاژهایی که تعداد سایت آنزیم‌های محدود الاثر آن‌ها کاهش یافته نسبتاً آسان است و تکنیک جهش‌زایی در لوله آزمایش برای تغییر دادن مکان‌های باقیمانده‌ای که لازم نیستند، مورد استفاده قرار می‌گیرد. لذا امکان ساخت فاژی که دارای ترکیبی از مکان‌های شناسایی برای آنزیم‌های محدود الاثر باشد، امکان پذیر است.

---

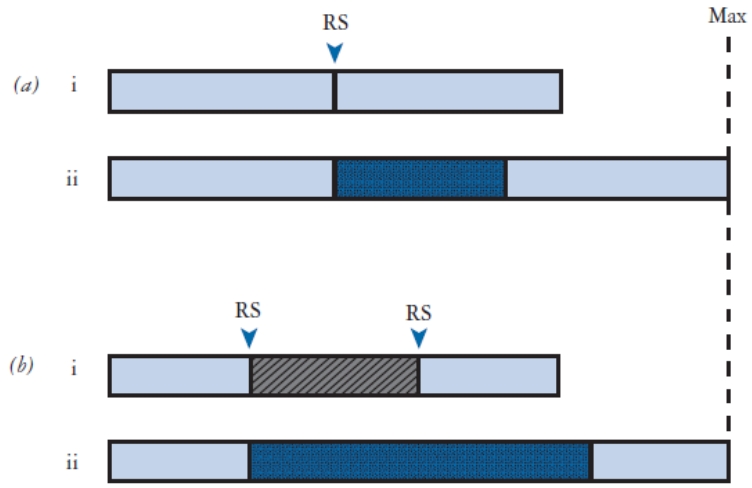
[1] Replicativeform

برای تولید یک ناقل همسانه‌سازی با ویژگی‌های مناسب، ژنوم λ تغییر و بازآرایی شده است.

یکی از اصلی‌ترین عیوب ناقلین λ این است که کپسید یک مانع فیزیکی برای مقدار DNA ای که می‌تواند در زمان سرهم بندی فاژ در آن وارد شود محسوب می شود. این مسئله در واقع اندازه قطعه DNA خارجی که می‌تواند کلون شود را محدود می‌کند. در زمان بسته بندی، قطعات سالم و مناسب فاژ می‌توانند از DNA ای که دارای با طول بین ۵۱-۳۸کیلوباز است تولید شوند. لذا، یک ژنوم فاژ والدینی فقط می‌تواند ۲/۵ کیلوباز DNA کلون شده را در خود جای دهد. این محدودیت با ساخت ناقل‌هایی که قابلیت پذیرش قطعاتی از DNA که اندازه شان از نظر تئوری با ماکزیمم اندازه سامانه مورد نظر نزدیک باشد به حداقل رسیده است. این چنین ناقل‌هایی به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند: (۱) ناقلین وارد شونده[1] و (۲) ناقلین جای‌گزینی[2] یا جانشینی[3]. تفاوت بین این دو گروه در شکل ۵-۷ نشان داده شده است.

همچون پلاسمیدها، در حال حاضر طیف متنوعی از ناقلین λ با اندکی تفاوت برای استفاده در آزمایشات همسانه‌سازی در دسترس می باشد. انتخاب ناقل باید با دقت و بر اساس ویژگی‌هایی مانند اندازه قطعات DNA برای کلون کردن و روش غربالگری صورت گیرد. برای نشان دادن ویژگی‌های ساختمانی فاژ λ دو ناقل وارد شونده و دو ناقل جایگزین شونده به صورت خلاصه شرح داده می‌شوند. این موضوع در واقع برخی از جنبه‌های مهم در طراحی ناقل‌ها را توصیف می‌کند. جنبه‌های اصلی برخی از ناقلهای λ در فصل ۸ وقتی در مورد روش‌های غربلگری و انتخاب صحبت می شود تشریح شده است.

[1] Insertion vectors
[2] Replacement vectors
[3] Substitution vectors



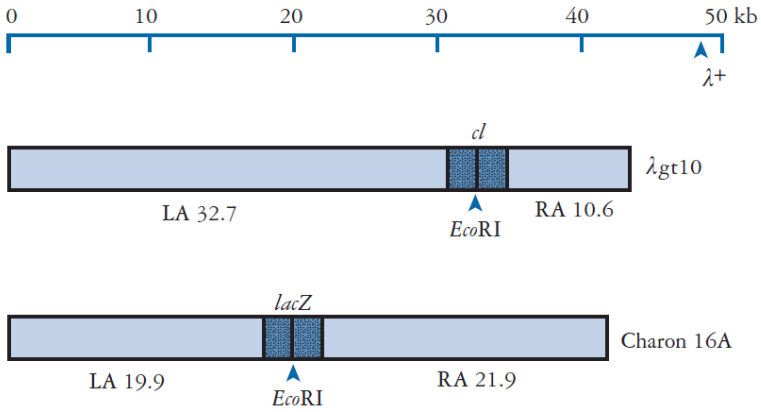
شکل ۵-۷) ناقلین فاژی وارد شونده و جایگزین شونده. (a) ناقل وارد شونده در قسمت i نشان داده شده است. چنین ناقل‌هایی یک مکان برشی (RS) برای همسانه‌سازی دارند. برای ایجاد یک ملکول نوترکیب، DNA هدف وارد این مکان می‌شود. اندازه قطعه قابل کلون بر اساس تفاوت بین اندازه ناقل و حداکثر اندازه قطعه قابل بسته بندی تعیین می‌شود. DNA وارد شونده به صورت سایه خورده در قسمت ii نشان داده شده است. (b) یک ناقل فاژی جایگزین شونده در قسمت i نشان داده شده است. این ناقل‌ها دارای دو مکان برشی (RS) هستند که در دو طرف قطعه‌ای به نام قطعه جایگزین شونده قرار دارند. لذا، همان طور که در قسمت ii نشان داده شده است، یک قسمت از ژنوم فاژ در طی همسانه‌سازی در این قسمت جای‌گزین می شود. با این روش قطعات بزرگ‌تری نسبت به ناقلین وارد شونده کلون می‌شوند.

ناقلین وارد شونده، همان طور که از نامشان مشخص است، به گونه‌ای هستند که قطعه DNA بدون حذف بخشی از ناقل، وارد آن می‌شود.

ناقلین وارد شونده دارای یک مکان شناخته شده برای یک یا تعدادی آنزیم محدودالاثر است که قطعات DNA را قادر می‌سازند در داخل ژنوم لامبدا قرار گیرد. مثالی از ناقل‌های وارد شونده ناقل λgt10 و چارون 16A[1]. چارون 16A یکی از مجموعه ناقل‌هایی است که بعد از اسطوره یونان کسی که ارواح مرده را در سراسر رودخانه Styx انتقال داد نامگذاری شد. این دو ناقل در شکل ۵-۸ نشان داده شده‌اند. این ناقل‌ها یک مکان برشی *Eco*RI دارند که DNA در آن قرار می‌گیرد. در λgt10 (۴۳/۳ کیلو باز) این سایت بازوهای راست و چپ را ایجاد می‌کند که به ترتیب ۳۲/۷ و ۱۰/۶ کیلوباز هستند که از نظر تئوری این دو بازو می‌توانند قطعات تا حدود ۷/۶ کیلوباز را بپذیرند.

[1] Charon 16A

سایت *Eco*RI درون ژن *cI* (سرکوب کننده[1] لامبدا) قرار دارد و این امر اساس روش انتخاب/غربالگری را بر اساس تشکیل و مورفولوژی پلاک تشکیل می‌دهد (بخش ۸-۱-۲ را ببینید). در چارون 16A (۴۱/۸ کیلو باز)، بازوهای ایجاد شده توسط *Eco*RI ۱۹/۹ کیلوباز (بازوی چپ) و ۲۱/۹ کیلوباز (بازوی راست) هستند و قطعات تا حدود ۹ کیلوباز ممکن است کلون شوند. سایت *Eco*RI در چارون 16A درون ژن بتا گالاکتوزیداز (*Z lac*) قرار دارد که امکان شناسایی نوترکیب‌ها را با استفاده از X-gal می‌دهد (بخش ۸-۱-۲).



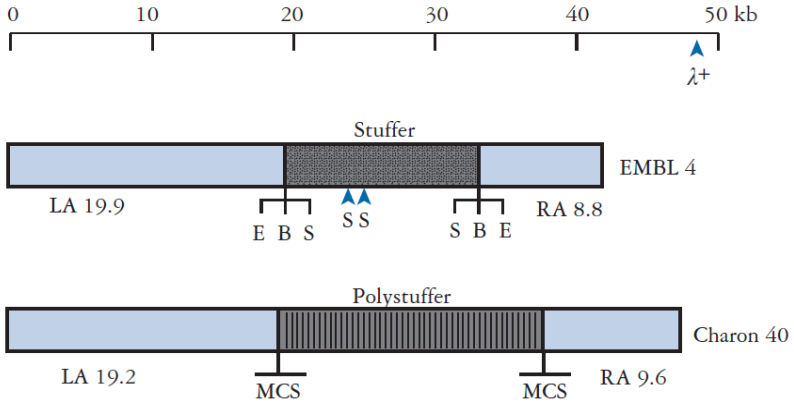
شکل۵-۸) ناقلین وارد شونده باکتریوفاژ λ از نوع λgt10 و چارون 16A. ژن‌های *cI* و *lacZ* در λgt10 و چارون 16A به ترتیب به صورت سایه دار نشان داده شده‌اند. درون این ژن‌ها یک ناحیه برشی برای آنزیم *Eco*RI به منظور همسانه‌سازی وجود دارد. طول بازوهای سمت چپ و راست (LA و RA به صورت کیلوباز) نیز داده شده است. اندازه ژنوم فاژ λ تیپ وحشی به صورت λ^+ نشان داده شده است. از Winnacker (۱۹۸۷) کتاب ژن‌ها برای کلون سازی.

ناقلین جای‌گزین شونده دارای مکان‌های برشی در مجاورت یک نا حیه DNA غیر ضروری است که می‌توان آن را حذف و توالی DNA هدف را برای همسانه‌سازی جای‌گزین آن کرد. این امر موجب افزایش اندازهٔ قطعه پذیرنده در ناقلین مبتنی بر فاژ می‌شود.

ناقلین وارد شونده دارای محدودیت‌هایی برای کلون کردن قطعات بزرگ DNA هستند; لذا، ناقلین جای‌گزینی بر اساس این موضوع ارتقاء و بهبود یافته‌اند، به‌طوری که یک قطعه مرکزی حذف و و با DNA مورد نظر جای‌گزین می شود. دو نوع از ناقلین جای‌گزین شونده لامبدا، ناقل EMBL4 و چارون 40 می باشد (شکل ۵-۹). ناقل EMBL4 (۴۱/۹ کیلو باز) حاوی یک =قطعه

[1]. repressor

مرکزی جایگزین شونده[1] به طول ۱۳/۲ کیلوباز دارد که در مجاورت توالی پلی لینکر معکوس که حاوی مکان‌های برای آنزیم‌های محدود کننده *Eco*RI و *Bam*HI و *Sal*I است، قرار می گیرد. دو سایت *Sal*I نیز در قطعه جایگزین شونده (استافر) قرار دارد. DNA ممکن است به هر یک از این سایت‌های همسانه‌سازی وارد شود، انتخاب هر یک از این سایت ها به نحوه تهیه قطعات بستگی دارد. اغلب یک هضم جزئی توسط *Sau*3A و یا *Mbo*1 برای تهیه کتابخانه ژنومی (بخش ۳-۳-۲ را ببینید) مورد استفاده قرار می‌گیرد که الحاق قطعه DNA را در سایت *Bam*HI امکان‌پذیر می‌سازد.



شکل ۵-۹) دو نوع از ناقلین جایگزین لامبدا بنام ناقلEMBL4 و چارون 40 نمایش داده شده‌اند. قطعه جایگزین شونده (استافر) در EMBL4 دارای طول ۱۳/۲ کیلوباز است و در مجاورت پلی لینکرهای معکوس که حاوی مکان‌های برشی برای آنزیم‌های *Eco*RI (E)، *Bam*HI است قرار گرفته اند (B) و *Sal*I (S) است. در ناقل چارون 40 قطعه پلی استافر از نواحی کوتاه و تکراری تشکیل می شود که توسط *Nae*I برش می‌خورد. مکان همسانه‌سازی چندگانه (MCS) در چارون 40 نسبت به ناقل EMBL4 حاوی طیف گسترده ای از سایت های برشی است.

چنین قطعات الحاق شده‌ای ممکن است به وسیله هضم توسط *Eco*RI از نوترکیب جدا شوند. در طی تهیه ناقل برای کلون سازی، هضم به‌وسیله *Bam*HI (که برای پذیرش DNA وارد شده انتهای چسبنده ایجاد می‌کند) اغلب با هضم به‌وسیله *Sal*I دنبال می‌شود. این قطعه استافر را در دو سایت *Sal*I داخلی برش می‌دهد و نیز موجب آزاد شدن قطعات کوتاه *Bam*HI/ *Sal*Iاز ناحیه

[1]. stuffer fragment

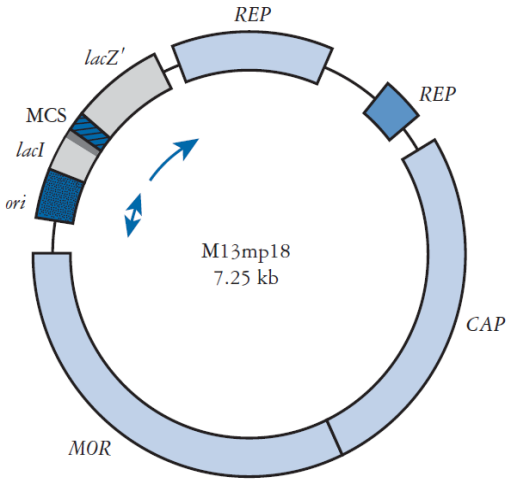
پلی لینکر می‌شود. این رخداد می‌تواند مفید باشد، چون از اینکه قطعه استافر با بازوهای راست و چپ خود دوباره جوش بخورد و تولید یک فاژ زنده غیر نوترکیب را بدهد جلوگیری می‌کند.
قطعات DNA با اندازه حدوداً بین ۹ و ۲۲ کیلوباز می‌توانند در EMBL4 کلون شوند، کمترین اندازه نشان‌دهنده حداقل اندازه مورد نیاز برای ایجاد قطعات فاژ زنده (بازوی چپ + DNA وارد شده + بازوی راست که باید مجموعاً بزرگتر از ۳۸ کیلوباز باشند) و بیشترین اندازه قابل بسته بندی در حدود ۵۱ کیلوباز می‌باشد. این اندازه‌ها محدودیت دارند و می‌توانند به عنوان یک روش اولیه انتخاب مفید برای نوترکیب‌ها به کار برده شوند، اگرچه یک مکانیسم انتخاب ژنتیکی اضافی با EMBL4 نیز می‌تواند به کار برده شود.
چارون 40 یک ناقل جای‌گزین است که قطعه استافر آن از چندین قطعه کوتاه تکراری DNA تشکیل شده است که به عنوان پلی استافر[1] شناخته می‌شود و مزیتش این است که آنزیم محدود کننده *Na*eI ، پلی استافر را به قسمت‌های جزئی برش می‌دهد. این موضوع موجب حذف کامل پلی استافر در زمان تهیه ناقل می‌شود و در این صورت اغلب فاژهای زنده نوترکیب خواهند بود. پلی استافر در مجاورت با پلی لینکر که دارای تعداد بیشتری سایت محدود الاثر در مقایسه با آنچه در ناقل EMBL4 وجود داشت قرار می‌گیرد که این امر سبب افزایش امکان استفاده از آنزیم‌های محدود کننده برای آماده سازی DNA خارجی می‌شود. طیف اندازه قطعاتی که ممکن است در ناقل چارون 16A کلون شود مشابه ناقل EMBL4 می‌باشد.

۵-۳-۳) ناقل‌هایی بر اساس باکتریوفاژ M13

دو جنبه از باکتریوفاژ M13 در مهندسی ژنتیک با ارزش است. اول اینکه اصولا RF مشابه یک پلاسمید است و می‌تواند با استفاده از روش‌های مشابه جداسازی و دست‌ورزی شود. دومین مزیت این است که DNA تک رشته تولید شده در زمان عفونت‌زایی می‌تواند در تکنیک‌هایی مانند توالی‌یابی DNA با استفاده از روش دای‌دزوکسی[2] مورد استفاده قرار بگیرد (بخش ۳-۷-۴ را ببینید). این جنبه به تنهایی M13 را به‌عنوان یک ناقل جذاب نموده است.
برخلاف فاژ λ، فاژ M13 هیچ ژن غیر ضروری ندارد. ژنوم آن ۶۴۰۷ کیلو باز دارد و تنها قسمت در دسترس برای دستکاری ناحیه بین ژنی ۵۰۷ بازی است. با استفاده از وارد کردن توالی پلی لینکر/آلفا پپتید *lacZ* به داخل این ناحیه می‌توان مجموعه‌ای از ناقلین M13 را ساخت (شکل ۵-۱۰). این امر سیستم غربالگری X-gal را قادر می‌سازد که برای شناسایی نوترکیب‌ها استفاده می‌شود همانند آنچه در پلاسمیدهای pUC عمل می‌شود. هنگامی‌که M13 روی چمن باکتریایی

[1]. Polystuffer
[2]. Dideoxy method

رشد می‌کند، پلاک‌ها ظاهر می‌شوند که به‌دلیل کاهش رشد سلول‌های میزبان بوده (سلول‌های میزبان هضم نمی‌شوند) و از این پلاک‌ها برای بررسی‌های بیشتر استفاده می‌شود.



شکل ۵-۱۰) نقشه فاژ رشته‌ای M13mp18. شکل دو رشته‌ای همانندسازی شونده نشان داده شده است. منطقه پلی لینکر (MCS) مشابه پلاسمید pUC18 (شکل ۵-۲) است. ژن‌های موجود در منطقه REP پروتئین‌هایی را رمز می‌کنند که برای همانندسازی DNA مهم هستند. مناطق CAP و MOR شامل ژن هایی هستند که به ترتیب برای تشکیل کپسید و ریخت شناسی فاژ ضروری هستند. ناقل M13mp19 نیز مشابه است البته به جز موقعیت منطقه پلی لینکر.

دومین ایراد ناقلین M13 این واقعیت است که زمانی قطعات بزرگ DNA به داخل ناقل وارد شوند، به‌طور مؤثر فعالیت نمی‌کنند. اگرچه از لحاظ تئوری هیچ محدودیتی برای اندازه قطعات قابل کلون وجود ندارد، همچنانکه ساختار کپسید به‌وسیله اندازهٔ ژنوم تعیین می‌شود (بر خلاف فاژ λ)، البته استفاده از قطعات بزرگتر از ۱/۵ کیلو باز منجر به کاهش کارایی همسانه‌سازی می‌شود. در عمل این امر مسأله مهمی نیست، چون استفاده اصلی ناقلین M13 اولیه برای توالی‌یابی قطعات کوچک DNA کلون شده بوده است. استفاده قرار می‌گرفتند. در این روش، تولید DNA تک رشته‌ای در ترکیب با سهولت خالص‌سازی DNA از کشت سلولی، هر گونه محدودیتی دراندازه قطعات را جبران می کند. هرچند که این امر با ساخت ناقلین هیبریدی پلاسمیدی/ M13 کاهش می‌یابد (بخش ۵-۴-۱ را ببینید).

۵-۴) سایر ناقل‌ها

تا به حال در مورد پلاسمیدهای اصلی و ناقلین باکتریوفاژ به‌منظور استفاده در میزبان *E.coli* صحبت شد. اگرچه این ناقل‌ها هنوز هم نماینده بخش مهمی از تکنولوژی دستکاری ژن هستند، همچنان تلاش‌ها برای بهبود ناقلین باکتریایی و همچنین معرفی ناقل‌هایی برای سایر ارگانیسم‌ها ادامه دارد. یک دلیل مهم برای یافتن ناقلین دیگر این است که نیاز به کلون کردن و آنالیز قطعات بزرگ‌تر DNA بوده است، همچنان‌که بررسی کل ژنوم به جای استخراج و بررسی ساده یک ژن در زیست شناسی مولکولی بیشتر مورد تاکید قرار می گیرد. علاوه بر آن، توسعه تجاری روش‌های ترکیبی در زمینه روش‌های همسانه‌سازی به ناقلین جدید نیاز دارد. چنین محصولات مبتنی بر کیت‌ها اغلب به‌عنوان تکنولوژی‌های همسانه‌سازی به بازار ارائه می‌شوند. کیت‌های همسانه‌سازی در زمینه دست‌ورزی ژن موفقیت آمیز بوده‌اند و اغلب منجر به کاهش زمان آزمایش شده‌اند. در این بخش به ویژگی‌های برخی از ناقلین باکتریایی و برخی ناقلین مورد استفاده در سایر ارگانیسم‌ها می پردازیم.

با پیشرفت و بهبود روش‌های همسانه‌سازی ژن، محدودیت‌های مربوط به ناقلین پلاسمیدی و ویروسی مشکلاتی را بوجود آورد، بنابراین نیاز برای ناقلین با ظرفیت حمل قطعات بزرگ DNA در حال افزایش است.

۵-۴-۱) ناقلین هیبریدی پلاسمید/فاژ

یک خصوصیت ناقلین فاژ این است که صرف‌نظر از این‌که این روش به سایت‌های cos (۳۸-۵۱ کیلو باز) نیاز دارد، تکنیک بسته‌بندی در شرایط آزمایشگاهی[1] (بخش ۵-۵-۲ را ببینید) مستقل از توالی است. از این پدیده در ساخت ناقل‌هایی که از توالی‌های پلاسمیدی در اتصال با سایت‌های cos فاژ لامبدا تشکیل شده استفاده می‌شود. این چنین ناقل‌هایی به عنوان کاسمید[2] شناخته می شوند. این ناقل‌ها کوچک هستند (۴-۶ کیلو باز) و می‌توانند قطعات DNA تا طول ۴۷ کیلو باز را کلون کنند و چون فاقد ژن‌های فاژ هستند زمانی که به وسیله مکانیسم‌های بسته بندی/عفونت λ وارد باکتری *E.coli* می‌شوند، به شکل پلاسمید عمل می‌کنند. بنابراین ظاهراً ناقلین کاسمیدی یک سیستم ایده آل را برای وارد کردن DNA نوترکیب به داخل سلول میزبان ارائه می‌دهند و ظرفیت همسانه‌سازی آن ها به میزان دو برابر بیشتر از بهترین ناقلین جایگزینی λ است. اما این ناقل‌ها نیز بدون نقص نیستند و اغلب نقص آنها توسط سهولت استفاده و پردازش بیشتر توالی‌های کلون شده جبران می‌شود.

---

[2] Cosmids

کاسمیدها و فاژمیدها دارای برخی ویژگی‌های مربوط به پلاسمیدها و ناقلین مبتنی بر فاژ هستند.
ناقلین هیبرید پلاسمید/ فاژ که در آنها به نحوی عملکرد فاژ بیان و مورد استفاده قرار می‌گیرد، فاژمید[1] نامیده می‌شوند. یکی از چنین ناقل‌هایی خانواده ZAPλ است که توسط شرکت استراتاژن[2] تولید می‌شود. خصوصیت این چنین ناقل‌هایی شامل امکان جدا شدن قطعات DNA کلون شده به‌عنوان قسمتی از پلاسمید در شرایط طبیعی است. جدا شدن خودبخودی فوق نیاز به کلون نمودن اولیه قطعات از λ به ناقلین پلاسمیدی به منظور دستکاری‌های بیشتر را از بین می برد.
ناقلین هیبرید پلاسمید/فاژ برای غلبه بر محدودیت اندازه سیستم همسانه‌سازی فاژ M13 ایجاد شده‌اند و امروزه در موارد بسیاری مانند توالی‌یابی DNA و تولید کاوشگر[3] به‌منظور مطالعات هیبریداسیون استفاده می‌شود. این ناقل‌ها، پلاسمیدهای ضروری هستند که دارای ناحیه شروع همانندسازی فاژ M13 (f1) می باشند. هنگامی‌که سلول‌های حاوی پلاسمید با فاژ آلوده شوند، نسخه‌های تک رشته‌ای از DNA پلاسمید تولید شده و به شکل ذرات شبیه فاژ M13 به داخل محیط کشت ترشح می‌شوند. ناقل‌هایی مانند pEMBL9 و یا pBIuescript می‌توانند قطعات DNA تا اندازه ۱۰ کیلوباز را بپذیرند. برخی ناقلین تجاری در دسترس بر پایه باکتریوفاژها در جدول ۵-۴ آمده‌اند.

۵-۴-۲) ناقلین مورد استفاده در سلول‌های یوکاریوتی

هنگامی‌که سلول‌های میزبان یوکاریوتی مورد توجه هستند، به تولید ناقلین پیچیده‌تری نسبت به ناقلین پروکاریوتی نیاز است. باکتری‌ها در اصطلاح ژنتیکی نسبتاً ساده هستند، در حالی که سلول‌های یوکاریوتی درای چندین دسته کروموزوم هستند که درون هسته قرار دارند. به‌دلیل وجود انواع بسیاری از موجودات یوکاریوتی، عجیب نیست که انواع ناقلین اختصاصی و با اهداف خاص طراحی شده باشند.

---
1. Phagemids
2. Stratagene
3. Probes

جدول ۵-۴) برخی ناقلین قابل دسترس تجاری مبتنی بر باکتریوفاژ.

Vector	Features	Applications	Supplier
λGT11	λ insertion vector Insert capacity 7.2 kbp *lacZ* gene	cDNA library construction Expression of inserts	Various
λEMBL3/4	λ replacement vectors Insert capacity 9–23 kbp	Genomic library construction	Various
λZAP Express®	λ-based insertion vector Capacity of 12 kbp *In vivo* excision of inserts Expression of inserts	cDNA library construction Also genomic/PCR cloning	Stratagene
λFIX®II	λ-based replacement vector, capacity 9–23 kbp Spi^+/P2 selection system to reduce non-recombinant background	Genomic library construction	Stratagene
pBluescript®II	Phagemid vector Produces single-stranded DNA	*In vitro* transcription DNA sequencing	Stratagene
SuperCos 1	Cosmid vector with Ap^r and Neo^r markers, plus T3 and T7 promoters Capacity 30–42 kbp	Generation of cosmid-based genomic DNA libraries T3/7 promoters allow end-specific transcripts to be generated for chromosome walking techniques	Stratagene

توجه: همچنانکه در مورد ناقلهای پلاسمیدی ملاحظه شد، انواع مختلفی از ناقلین پلاسمیدی توسط منابع ارائه کننده مختلفی در دسترس هستند. یک منبع اطلاعاتی خوب در این مورد، مطالعه بروشورها و یا وب سایت ارائه کنندگان است. Ap^r مقاومت به آمپی سیلین، Neo^r مقاومت به نئومایسین (انتخاب با استفاده از کانامایسین در باکتری و G418 در سلول‌های پستانداران انجام می‌شود)، T3/7 پروموترهای مربوط به رونویسی تحت شرایط *in vitro*، *lacZ*ژن بتاگالاکتوزیداز، SV40 پروموتر مربوط به بیان ژن در سلول‌های یوکاریوتی. علامت ® نشاندهندهٔ علامت تجاری شرکت تولید کننده آن است.

طیفی از ناقلین مبتنی بر پلاسمید برای مخمر *Saccharomyces cerevisiae* ازپلاسمید 2µmطبیعی مخمر توسعه یافته‌اند.

مخمر تک سلولی *S.cerevisiae* نقش مهمی در تکنولوژی دستکاری ژن‌های یوکاریوتی دارد. طیفی از ناقل‌ها برای استفاده در سلول‌های مخمر توسعه یافته‌اند، پلاسمیدهای اپیزومال[۱] مخمر (YEps) بر اساس پلاسمید ۲ میکرومتری طبیعی مخمر تولید شده‌اند و ممکن است به‌طور خود به خود همانندسازی کنند و یا اینکه به داخل کروموزوم وارد شوند. پلاسمیدهای وارد شونده[۲] مخمر برای وارد شدن به داخل کروموزوم مشابه با پلاسمیدهای YEps طراحی شده‌اند و

[1]. Yeast episomal plasmids
[2].Yeastintegrative plasmids

پلاسمیدهای تکثیر شونده مخمر[1] به شکل پلاسمیدهای مستقل باقی می‌مانند و وارد کروموزوم نمی‌شوند. پلاسمیدهایی که شامل توالی‌های اطراف ناحیه سانترومری کروموزوم هستند به‌عنوان پلاسمیدهای سانترومری مخمر[2] شناخته می‌شوند و مانند کروموزوم‌های کوچک رفتار می‌کنند.

جدول ۵-۵) برخی ناقلین مورد استفاده برای سلول‌های گیاهی و حیوانی.

Cell type	Vector type	Genome	Examples
Plant cells	Plasmid	DNA	Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* – these are well-established vector systems
	Viral	DNA	Cauliflower mosaic viruses, geminiviruses – these are not highly developed
Animal cells	Plasmid	DNA	Many vectors available commercially, often using sequences/promoters/origins of replication from Simian virus 40 (SV40) and/or cytomegalovirus (CMV)
	Viral	DNA	Baculoviruses for insect cells Papilloma viruses Adenovirus SV40 Vaccinia virus
	Viral	RNA	Retroviruses
	Transposon	DNA	P elements in *Drosophila melanogaster*

توجه: جنبه‌های معینی از مبحث"ناقل شناسی" نسبت به دیگر مباحث گسترش یافته‌اند. اغلب نوع خاصی از یک سیستم به عنوان ناقل توسعه می یابد و بطور گسترده‌ای تغییر یافته و انواع مختلف ناقل از آن تولید شده‌اند. در مواردی که تکنولوژی تولید ناقل‌ها به خوبی توسعه نیافته است، گاهی اوقات تکنیک‌هایی مانند PCR می‌توانند برای غلبه بر محدودیت‌های سیستم‌های موجود به کار روند.

وقتی با یوکاریوت‌های عالی‌تر که پر سلولی هستند، مانند گیاهان و حیوانات، کار می‌کنیم، مشکلات وارد کردن DNA نوترکیب به داخل ارگانیسم از کار کردن با یوکاریوت‌های میکروبی مانند مخمر متفاوت است. اهداف مهندسی ژنتیک در یوکاریوت‌های عالی می‌تواند در دو گروه مطرح باشد:

[1].Yeast replicative plasmids
[2]. Yeast centromere plasmids

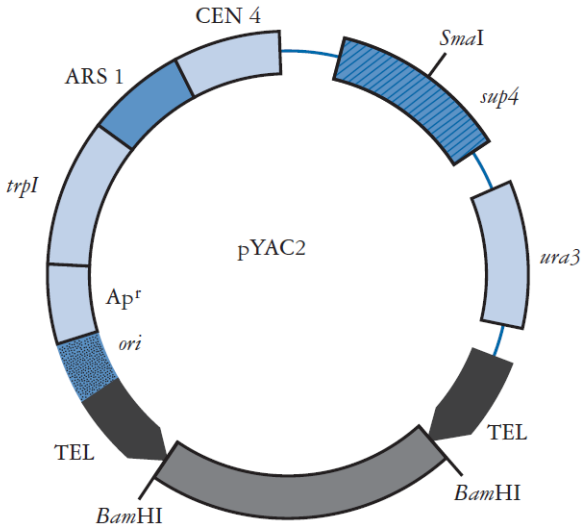
۱. بمنظور بیان ژن‌های کلون شده در سلول‌های گیاهان و حیوانات در کشت بافت، به منظور مطالعات پایه بر روی بیان ژن یا به منظور تولید پروتئین‌های مفید.
۲. برای تغییر آرایش ژنتیکی ارگانیسم و تولید یک موجود تراریخته که تمام سلول‌های آن حاوی این تغییر ژنتیکی باشند.

ناقلین مورد استفاده در سلول‌های گیاهی و حیوانی ویژگی‌هایی دارند که می‌توانند بر مبنای آن‌ها در این سلول‌ها فعالیت کنند و در مقایسه با ناقلین همسانه‌سازی اولیه مانند λ، به‌صورت تخصصی تر عمل می‌کنند.

از آنجائی‌که DNA نوترکیب باید در مراحل اولیه رشد این موجودات وارد شود و یا در مورد گروه خاصی از ناقلین که موجب پخش شدن توالی نوترکیب در تمام قسمت‌های ارگانیسم می‌شوند، هدف بعدی به‌طور ویژه طرح مشکلات تکنیکی در این خصوص است.

ناقلین مورد استفاده در سلول‌های گیاهی و حیوانی ممکن است به‌طور مستقیم و به وسیله تکنیک هایی که در بخش ۵-۵-۳ توضیح داده شد وارد موجود شوند، یا ممکن است بر مبنای یک مکانیسم بیولوژیکی ورود بر اساس ویروس‌ها یا دیگر عوامل عفونت زا مانند آگروباکتریوم[1] وارد سلول شوند. مثال‌هایی در مورد ناقلین توسعه یافته برای کاربرد در گیاهان و حیوانات در جدول ۵-۵ آمده است. استفاده از ناقلین خاص همراه با کاربردهای تکنولوژی دست‌ورزی ژن در یوکاریوت‌ها در قسمت سوم این کتاب آمده است.

[1]. *Agrobacteria*



شکل ۵-۱۱) نقشه ناقل کروموزومی مصنوعی مخمرpYAC2، این ناقل حاوی مکان شروع همانندسازی (ori که به صورت سایه‌دار نشان داده شده است) و ژن مقاومت به آمپی سیلین (Ap^r) از پلاسمید pBR322 و توالی مربوط به همانندسازی در مخمر (ARSI) و ساختار کروموزوم (سانترومر به صورت CEN4 و تلومرها به صورت TEL) می باشد. توالی‌های تلومری با استفاده از یک قطعه که بوسیله دو مکان برشی *Bam*HI احاطه شده است، از هم جدا شده‌اند. ژن‌های *trp*I و *ura*3 ممکن است به عنوان مارکرهای گزینش گر در مخمر استفاده شوند. مکان همسانه‌سازی *Sma*I درون ژن *sup*4 قرار دارد (آبی هاشور دار). از Kingsman و Kingsman (۱۹۸۸). مهندسی ژنتیک Blackwell. بازنوشت با کسب اجازه.

۵-۴-۳) کروموزوم‌های مصنوعی

برای اجرایی شدن پروژه‌های توالی‌یابی ژنوم‌های بزرگ، توسعه و ارتقاء ناقل‌هایی برای همسانه‌سازی قطعات بزرگ DNA ضروری است. اگرچه کتابخانه ژنومی ژنوم‌هایی مانند *S. cerevisiae* به طور عمده به وسیله ناقلین کاسمید ساخته می‌شود، اما اندازه‌های DNA ۴۰-۵۰ کیلو بازی برای پروژه‌هایی مانند پروژه ژنوم انسانی بسیار کوچک هستند (برای جزییات بیشتر به فصل ۱۰ مراجعه کنید). توسعه کروموزوم‌های مصنوعی مخمر[1] (YACs شکل ۵-۱۱) امکان کلون کردن قطعات DNA در گستره مگابازی را ممکن می‌سازند، با این وجود برخی مشکلات در مورد ناپایداری DNA وارد شده در این خصوص وجود دارد. YACs از پیچیده‌ترین ناقلین مخمری هستند و تا

[1] Yeast Artificial Chromosomes

به امروز بزرگ‌ترین ظرفیت ناقلین در دسترس محسوب می‌شوند. آن‌ها دارای نواحی سانترومری و تلومری هستند و DNA نوترکیب ضرورتاً به‌عنوان یک کروموزوم مخمری عمل می‌کنند.

کروموزوم‌های مصنوعی ناقل‌های ساده ای هستند که ساختار طبیعی DNA کروموزومی را تقلید می کنند. به طوری که دارای تلومرها، یک سانترومر و یک مبدأ شروع همانندسازی و نیز دارای مارکرهای انتخابی هستند.

توسعه بیشتر تکنولوژی کروموزوم مصنوعی با ساخت کروموزوم‌های مصنوعی باکتریایی[1] (BACs) شکل گرفت. این ناقل‌ها بر اساس پلاسمید F ساخته شده‌اند که بسیار بزرگ‌تر از ناقلین پلاسمیدی استاندارد بوده و بنابراین می‌توانند قطعات بزرگ‌تر DNA را همسانه کنند. ناقلین BACs قطعات تا حدود ۳۰۰ کیلو باز را پذیرفته و بسیاری از مشکلات عدم پایداری ناقلین YACs با استفاده از آن‌ها برطرف شده است. اکثر توالی‌یابی ژنوم انسانی با استفاده از کتابخانه‌هایی از نوترکیب‌های BACs انجام شده است. ناقلین بر اساس فاژ P1 نیز توسعه یافتند. ناقلین فاژی و ناقلین بر اساس فاژ P1 جزءکروموزوم‌های مصنوعی هستند.

۵-۵) ورود DNA به داخل سلول‌ها

دستکاری ناقل و DNA های الحاقی برای تولید مولکول‌های نوترکیب در درون لوله آزمایش انجام می‌شود. در مرحله بعد باید DNA نوترکیب به داخل سلول میزبان وارد و تکثیر شود. کارایی این مرحله اغلب به‌عنوان یک فاکتور حیاتی در تعیین موفقیت آزمایش همسانه‌سازی محسوب می‌شود، مخصوصاً زمانی که تعداد زیادی نوترکیب مورد نیاز باشد. در جایی که توالی مورد نظر به احتمال زیاد همسانه سازی شده، بررسی کارایی همسانه‌سازی اولیه موضوع مهمی نیست، (یا شاید با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تولید شده، بخش ۷ را ببینید). لذا توالی هدف به مقدار نسبتا زیاد در دسترس خواهد بود و در نتیجه کارایی روش همسانه‌سازی اغلب و البته در این خصوص موضوع نگران کننده ای نیست. روش‌های در دسترس برای وارد کردن DNA نوترکیب به داخل سلول‌ها به نوع سیستم میزبان/ ناقل و نیز نوع روش‌ها از ساده تا پیچیده بستگی دارد. در این بخش به برخی از این روش‌ها می‌پردازیم.

۵-۵-۱) ترانسفورماسیون و ترانسفکشن

تکنیک‌های ترانسفورماسیون[2] و ترانسفکشن[1] ساده‌ترین روش‌ها را در زمینه وارد کردن DNA نوترکیب به داخل سلول ارائه می‌کنند. در مورد همسانه‌سازی سلول‌های *E.coli*، ترانسفورماسیون

---

[1]. Bacterial Artificial Chromosomes
[2] .Transformation

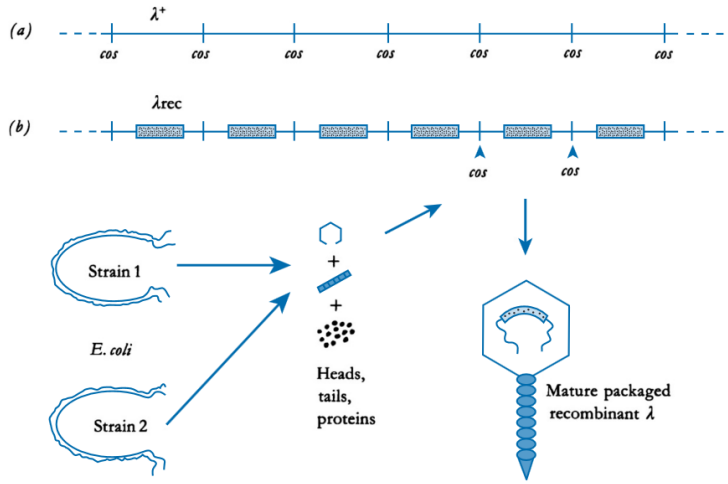
به مفهوم جذب DNA پلاسمید و ترانسفکشن به مفهوم جذب DNA فاژ اشاره می‌کند. ترانسفورماسیون همچنین به جذب هر DNA از هر سلولی گفته می‌شود و همچنین می‌تواند در مورد مفاهیم مختلف مانند رشد ترانسفورمانت‌ها مثلاً در مورد سلول‌های سرطانی نیز به کار رود.

ترانسفورماسیون سلول‌های *E.coli* با یک پلاسمید DNA نوترکیب، یکی از تکنیک‌های کلاسیک در دست‌ورزی ژن است.

ترانسفورماسیون اولین بار در باکتری‌ها و در سال ۱۹۲۸ توسط فردریک گریفیت[۲] در آزمایش معروف او تحت عنوان اصول ترانسفورماسیون کشف شد. وی در این آزمایش متوجه شد که ژن‌ها از DNA ساخته شده‌اند. اگرچه پدیده ترانسفورماسیون اولین بار در باکتری‌ها شناسایی شد، اما همه باکتری‌ها به سادگی نمی‌توانند این پدیده را نشان دهند و در سال ۱۹۷۰ بود که ترانسفورماسیون *E.coli* انجام شد. این امر نقطه عطف تکنولوژی دست‌ورزی ژن بود. برای ترانسفورماسیون *E.coli* باید سلول‌ها در حالت پذیرنده[۳] قرار گیرند. این کار توسط قرار دادن سلول‌ها در محلول یخی کلسیم کلراید که شایستگی پذیرش را به نحوی القاء می‌کند که بطورکامل شناخته شده نیست. ترانسفورماسیون سلول‌های پذیرنده با مخلوط کردن DNA پلاسمید با سلول‌ها و قرار دادن آن‌ها روی یخ به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه و سپس یک شوک گرمایی مختصر (۲ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد) انجام می‌شود و این شرایط DNA را قادر می‌سازد تا وارد سلول شود. سلول‌های ترانسفورم شده معمولاً در محیط کشت مایع در دمای ۳۷ درجه و به مدت ۹۰-۶۰ دقیقه نگهداری می‌شوند تا پلاسمیدها بتوانند تثبیت شوند و بیان فنوتیپی خصوصیاتشان را نشان دهند. سپس سلول‌ها بر روی محیط کشت‌های انتخابی کشت می‌شوند تا سلول‌های حاوی پلاسمید رشد کنند.

---

[1]. Transfection
[2] .FrederickGriffith
[3]. Competent



شکل ۵-۱۲) بسته بندی DNA باکتریوفاژ. (a) مولکول DNA کانکاتمر از DNA فاژ تیپ وحشی (λ+) تشکیل می‌شود. هر یک از ژنوم‌ها در مکان *cos* به همدیگر متصل می‌شوند. (b) ژنوم‌های نوترکیب (λrec) تحت شرایط *in vitro* بسته بندی می‌شوند. مخلوطی از دو سویه از باکتری هضم شده، سر و دم و پروتئین های مورد نیاز به منظور تشکیل ذرات λ بالغ را فراهم می کنند. با اضافه کردن مخلوط فوق به کانکاتامر، DNA در مکان‌های *cos* برش خورده و به صورت ذرات فاژ انفرادی و مجزا در داخل فاژ، بسته بندی می شوند، به طوری که هر یک حاوی ژنوم نوترکیب هستند.

کارایی ترانسفورماسیون عموماً یک عامل محدود کننده در استفاده از این تکنیک است، و اگر هدف آزمایش آماده سازی یک بانک کلونی باشد این امر بسیار مهم خواهد بود.

ترانسفورماسیون یک پروسه ناکارآمد است که در آن درصد بسیار کمی از سلول‌های پذیرنده ترانسفورم می‌شوند. لذا در مواردی که تعداد زیادی نوترکیب مورد نیاز است و یا هنگامی که در میزان مواد شروع کننده آزمایش محدودیت وجود دارد، می‌تواند مرحله مهمی در آزمایش همسانه‌سازی باشد. علی رغم این معایب، ترانسفورماسیون یک تکنیک اساسی است و می‌تواند تا $۱۰^{۹}$سلول تغییر یافته را در ازای هر میکروگرم DNA ورودی ترنسفورم کند، هرچند که در عمل فراوانی ترانسفورماسیون در حدود $۱۰^{۶}$ یا $۱۰^{۷}$ سلول تغییر یافته در هر میکروگرم است. بسیاری از شرکت‌های تولید کننده مواد بیولوژیکی انواع مختلفی از سلول‌های پذیرنده را به مشتریان ارایه می دهند که به منظور افزایش کارایی ترانسفورماسیون روی آنها پیش تیمارهایی انجام شده است. از آنجایی که هزینه خرید این سلول‌های پذیرنده نسبت به تولید آن‌ها در آزمایشگاه بسیار گران‌تر تمام می‌شود از آنجایی که این استفاده از این سلولها زمان تهیه را کاهش می‌دهد، لذا این سلولهای آماده محبوبیت بیشتری برای استفاده پیدا کرده اند. ترانسفکشن یک فرایند مشابه با

ترانسفورماسیون است اما تفاوتشان این است که از DNA فاژ به جای DNA پلاسمید استفاده می‌شود. این روش نیز به نحوی ناکارآمد است، زیرا عملاً با بسته بندی مقادیر زیادی در شرایط *in vitro* همراه بوده و بدنبال آن وارد شدن DNA فاژ به درون سلول‌های باکتری *E.coli* را نیاز دارد.

۵-۵-۲) بسته بندی DNA فاژ تحت شرایط *in vitro*

در زمان چرخه لایتیک فاژ λ، DNA فاژ همانندسازی کرده و کانکاتامر[1] را تشکیل می‌دهد. این یک مولکول بسیار بلند از DNA است که از نسخه‌های زیادی از ژنوم لامبدا که به وسیله مکان های cos به هم متصل هستند (شکل ۵-۱۲ قسمت a) تشکیل شده است. زمانی که ذرات فاژ سرهم بندی می‌شوند، DNA به داخل کپسید بسته بندی می‌شود که این کار شامل بریدن DNA در مکان‌های *cos* با استفاده از اندونوکلئاز کد شده توسط خود فاژ می‌باشد. لذا ذرات فاژ بالغ تولید و آماده آزاد شدن از طریق لیز و هضم سلول هستند و توانایی آلوده سازی سایر سلول‌ها را دارند. این پروسه به‌طور عادی تحت شرایط *in vivo* اتفاق می‌افتد و عملکردهای ویژه آن توسط ژن‌های فاژ کد می‌شود. به هر حال این فرایند درون لوله آزمایش نیز می‌تواند انجام شود که DNA نوترکیب را قادر می‌سازد تا به‌صورت کانکاتامر به داخل ذرات فاژ بسته بندی شود.

بسته‌بندی DNA باکتریوفاژ نوترکیب در شرایط *in vitro* مشابه با فرایند طبیعی آن است، به طوری که این امر در حین بلوغ فاژ رخ می‌دهد و یک روش بسیار مفید در ساخت کتابخانه‌های ژنومی است.

برای انجام بسته بندی تحت شرایط *in vitro*، کپسید لامبدا و اندونوکلئاز باید در دسترس باشند. در عمل دو سویه از باکتری‌ها برای تجزیه سلولی استفاده می‌شوند که به عصاره بسته بندی معروف است. هر سویه در یکی از فعالیت های ریخت زایی فاژ دارای جهش است. بنابراین عصاره بسته بندی به تنهایی برای استخراج عمل نخواهد کرد. هنگامی که این دو سویه باکتری با DNA نوترکیب کانکاتمر تحت شرایط مناسب مخلوط شوند، تمام ترکیبات در دسترس خواهند بود و ذرات فاژ تولید می‌شوند. سپس این ذرات می‌توانند برای آلوده کردن سلول‌های *E.coli* استفاده شوند و پلاک‌ها روی محیط کشت تشکیل شوند. روش بسته‌بندی تحت شرایط *in vitro* در شکل ۵-۱۲ (b) آمده است.

[1] Concatemer

۵-۵-۳) دیگر روش‌های انتقال DNA

روش‌های در دسترس برای وارد کردن DNA به داخل سلول‌های باکتری، برای انتقال DNA به دیگر انواع سلول‌ها آسان نیستند. سیستم بسته‌بندی اختصاصی فاژ برای سایر انواع سیستم‌ها کارایی ندارد، و ترانسفورماسیون با استفاده از روش‌های عادی ممکن است امکان پذیر نباشد و یا بسیار ناکارامد باشند. به هرحال روش‌های جایگزین برای وارد کردن DNA به داخل سلول‌ها به وجود آمده است. اغلب این روش‌ها به تکنیک‌های زیادی نیاز داشته و نسبت به روش‌های باکتریایی کمتر کارا هستند، اما نتایج قابل اطمینانی در بسیاری از موقعیت‌هایی که در آنها امیدی به ورود مولکول DNA نوترکیب به درون سلول مورد نظر نبوده، بدست آمده است.

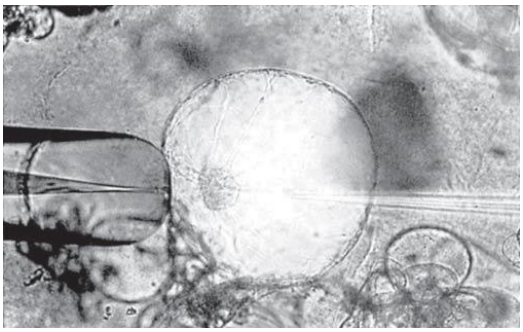
برای انتقال DNA نوترکیب به درون سلول‌های یوکاریوتی از روش‌های بیولوژیکی و یا یکی از روش‌های الکتروپوریشن، ریزتزریقی و یا بیولیستیک استفاده می‌شود.

اغلب مشکلات مربوط به وارد کردن DNA به داخل سلول‌های غیر باکتریایی مربوط به سلول‌های گیاهی است. سلول‌های حیوانی به‌نسبت سست هستند و به آسانی می‌توانند ترانسفورم شوند. به هر حال، سلول‌های گیاهی با مشکلی به نام دیواره سلولی سخت مواجه هستند که سدی در مقابل جذب DNA است. این مشکل با تولید پروتوپلاست که در آن دیواره سلولی به وسیله هضم آنزیمی حذف شده، کمتر می‌شود. سپس پروتوپلاست می‌تواند با استفاده از روشی به نام الکتروپوریشن[1] ترانسفورم شود. در این روش از جریان الکتریکی برای ایجاد منافذی ناپایدار در غشاء سلولی استفاده می‌شود و مولکول DNA از طریق این منافذ عبور کرده و وارد سلول می‌شود. سپس پروتوپلاست‌ها می‌توانند احیاء شوند. علاوه بر این کاربرد، پروتوپلاست‌ها نقش مهمی در تولید سلول‌های هیبرید گیاهی از طریق الحاق پروتوپلاست‌ها ایفا می‌کنند.

یکی از روش‌های جای‌گزین برای وارد کردن DNA به داخل سلول‌ها، استفاده از روش‌های فیزیکی است. یکی از این روش‌ها، استفاده از یک سوزن بسیار ریز و تزریق DNA به‌طور مستقیم به داخل هسته است. این روش ریزتزریقی[2] نامیده می‌شود (شکل ۵-۱۳) و به طور موفقیت آمیزی هم در سلول‌های گیاهی و حیوانی انجام شده است. در این روش سلول با استفاده از یک مکش ملایم روی یک تیوب شیشه‌ای نگه داشته می‌شود و برای سوراخ کردن غشاء از یک سوزن استفاده می‌شود. این تکنیک به میکرومنیپولاتور مکانیکی، میکروسکوپ و میزان زیادی تمرین نیاز دارد. یک نقص آشکار در این روش، پر زحمت بودن آن است و نیزدر روش‌های همسانه‌سازی اولیه که به تعداد زیادی نوترکیب نیاز است، مناسب نیست. به هر حال در موارد اختصاصی روش خوبی برای تحویل DNA هدف محسوب می‌شود.

---

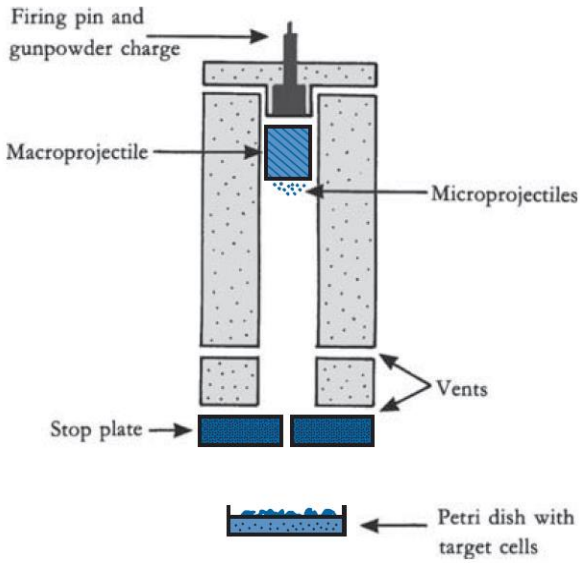
[1] Electroporation
[2] Microinjection



شکل ۵-۱۳) ریزتزریقی پروتوپلاست سلول سیب زمینی. سلول با استفاده از یک مکش ملایم روی یک شیشه موئینه (سمت چپ تصویر) نگه داشته می‌شود. سوزن ریزتزریقی با استفاده از کشیدن آن بر روی یک شیشه موئینه گرمادیده ساخته می‌شود. با استفاده از یک میکرومینیپولایتور (یک ابزار مکانیکی برای کنترل میزان موئینگی) سوزن وارد سلول (سمت راست تصویر) می‌شود، به گونه‌ای که نوک سوزن به هسته برسد. تصویر از K. Ward.

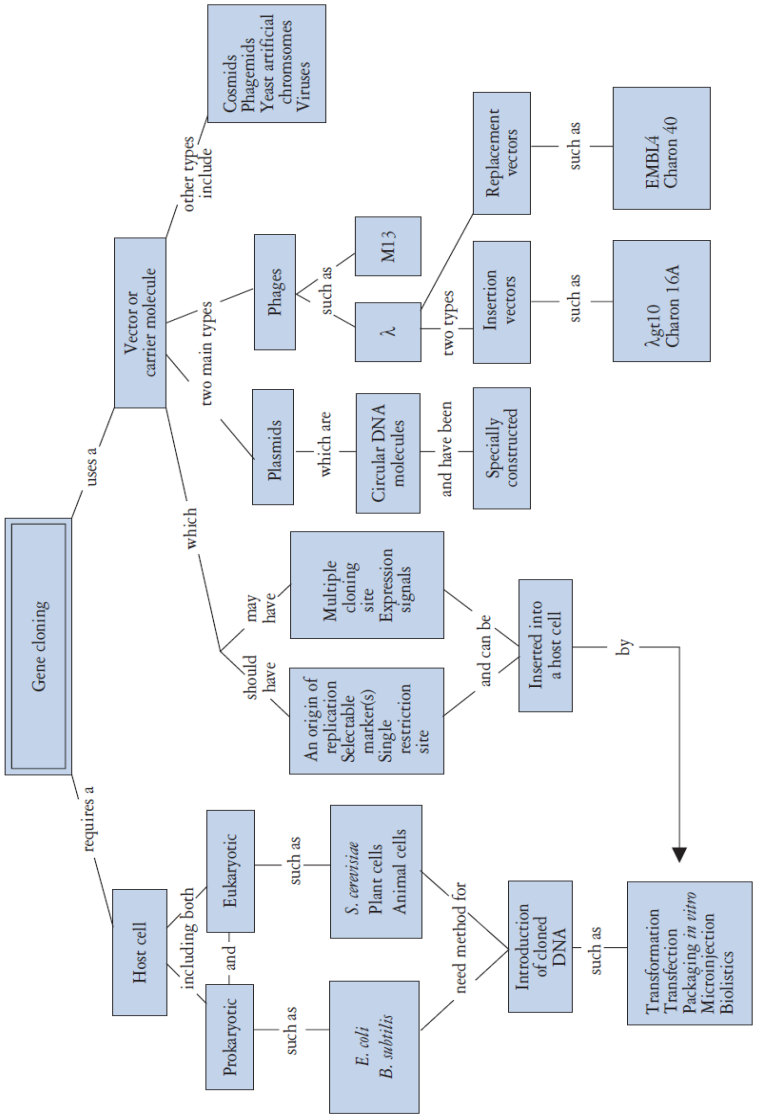
در ترانسفورماسیون سلول‌های گیاهی یک روش مبتکرانه و تا حدودی عجیب که به میزان زیادی هم مفید است به‌وجود آمده است. این روش که بیولستیک[1] نامیده می‌شود و به‌طور تحت‌اللفظی شامل پرتاب مولکول DNA به داخل سلول است (شکل ۵-۱۴). مولکول DNA برای پوشاندن ذرات تنگستن میکروسکوپی بنام ریزپرتابه[2] استفاده می‌شود که سپس روی یک درشت پرتابه[3] به وسیله شلیک یا با استفاده از گاز فشرده شتابدار می‌شود.

[1] Biolistic
[2] Microprojectiles
[3] Macroprojectile



شکل ۵-۱۴) روش بیولستیک. مولکول DNA ریزپرتابه‌ها را پوشش می‌دهد که خود توسط درشت پرتابه‌ها روی تفنگ شتابدار شده‌اند. در صفحه نگهدارنده، درشت پرتابه درون حفره باقی مانده، اما ریزپرتابه به سمت بافت هدف پرتاب می‌شود. انواع دیگر این دستگاه با استفاده از فشرده کردن یک نوع گاز منجر به پرتاب ذرات به سمت بافت هدف می‌شود.

یک درشت پرتابه با قدرت یک تفنگ یا به‌وسیله گاز فشرده، ریز پرتابه‌ها را پرتاب می‌کند. در یک انتهای تفنگ یک روزنه کوچک وجود دارد که درشت پرتابه را متوقف ولی اجازه می‌دهد که ریزپرتابه‌ها از آن عبور کنند. این ریزپرتابه‌ها زمانی که به سمت سلول هدایت می‌شوند، DNA را به داخل سلول حمل می‌کنند و در برخی مواقع ترانسفورماسیون پایدار اتفاق خواهد افتاد.



نقشهٔ مفهومی فصل پنجم

فصل ششم: راهبردهای همسانه‌سازی

اهداف:

* ارائه خلاصه اجمالی از مجموعه راهبردهایی که می‌توانند در همسانه‌سازی توالی DNA به کار روند؛
* تشریح منطق و روش شناسی همسانه‌سازی DNA مکمل از روی RNA پیک؛
* توصیف منطقی و روش شناسی که در همسانه‌سازی DNA ژنومی به کار می‌رود؛
* تشریح برخی جنبه‌های همسانه‌سازی پیشرفته؛
* توصیف استفاده از کروموزوم‌های مصنوعی برای همسانه‌سازی قطعات بزرگ DNA.

خلاصه فصل/نتایج آموزنده

بعد از خواندن این فصل به اطلاعات زیر دست خواهید یافت:

* مسیرهای احتمالی همسانه‌سازی cDNA و DNA ژنومی؛
* روش‌های مورد استفاده در تهیه DNA مکمل؛
* همسانه‌سازیDNA مکمل درون وکتورهایی مانند پلاسمید و باکتریوفاژ؛
* کاربرد لینکرها، آداپتورها و هموپلیمرها؛
* تهیه قطعات DNA ژنومی به منظور همسانه‌سازی؛
* ساخت و تکثیر کتابخانه ژنومی؛
* بیان DNA همسانه‌سازی شده؛
* استفاده از کروموزوم‌های مصنوعی به منظور همسانه‌سازی قطعات بزرگ DNA.

لغات کلیدی:

ساخت، اتصال، تکثیر، انتخاب، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، mRNA، DNA ژنومی، ترانس‌کریپتوم، ژن‌های بومی یا خانه‌دار، اختصاصی بودن بیان ژن بر اساس بافت، پروتئوم، ژنوم، تنوع ژنتیکی RNA پیک، فراوانی مولکول‌های RNA پیک، DNA مکمل، نسخه DNA، cDNA، اتصال انتهای تراز، مولکول لینکر، اضافه هموپلیمر، concatemer، نوترکیبی مولکول زنده، آداپتور، متصل شدن، الحاق، ژن، بانک کلون، کتابخانه کلون، کتابخانه ژنومی، شکستگی مکانیکی ژنوم، قطعه قطعه شدن تصادفی، هضم آنزیمی جزئی، کتابخانه اولیه، تکثیر، انحراف، پرایمینگ، پیشبر، پیشبر قوی، پیشبر ضعیف، توالی ویژه، جعبه Pribnow، جعبه TATA، جعبه Hogness، جعبه CAAT، القاگر، سرکوبگر، کروموزوم‌های مصنوعی باکتریایی، کروموزوم‌های مصنوعی مخمر، کروموزوم‌های ساختگی.

در دو فصل قبل در مورد دو مؤلفهٔ ضروری در مهندسی ژنتیک بحث شد

۱- قابلیت برش، تغییر و اتصال مولکول‌های DNA در آزمایشگاه.

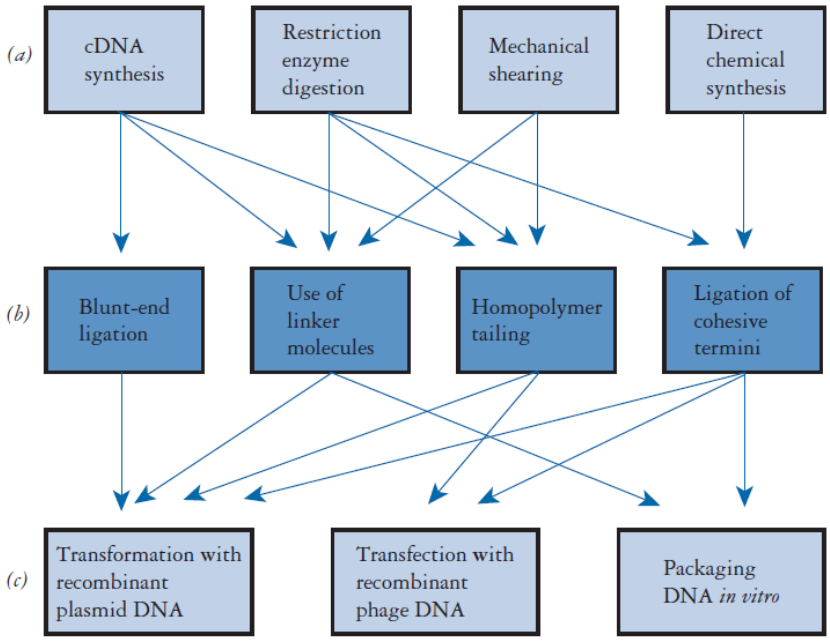
۲- سیستم‌های میزبان/وکتور که موجب تکثیر مولکول‌های DNA نوترکیب را فراهم می‌کنند.

با توجه به مواد و لوازم در دسترس، یک مهندس ژنتیک باید راهبردی را برای همسانه‌سازی اتخاذ نماید که وی را قادر سازد تا با استفاده موثر از فناوری، به اهداف مورد نظر دست یابد. همان طور که در فصل اول دیدیم، در همسانه‌سازی چهار مرحله وجود دارد (شکل ۱-۱). این مراحل عبارت‌اند از ایجاد قطعات DNA، اتصال قطعات به یک وکتور مناسب جهت تولید DNA نوترکیب، تکثیر نوترکیب‌ها در سلول میزبان و (نهایتاً) شناسایی و گزینش توالی مورد نیاز. در این فصل به برخی از راهبردهای در دسترس جهت تکمیل سه مرحلهٔ اول با استفاده از روش‌های سنتی همسانه‌سازی ژن، خصوصاً در زمینهٔ همسانه‌سازی DNA یوکاریوتی در *E.coli* خواهیم پرداخت. کاربرد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر و همسانه‌سازی DNA در فصل ۷ بحث شده است، این روش در حال حاضر به طور گسترده توسط محققین استفاده می‌شود و در بعضی موارد این تکنیک به عنوان روشی استاندارد برای همسانه‌سازی محسوب می‌شود. توالی همسانه‌سازی شده در فصل ۸ شرح داده شده است، هر چند هنگام انتخاب میزبان/ وکتور برای همسانه‌سازی، نوع روش انتخاب همسانه که به‌کار گرفته می‌شود باید مورد توجه قرار گیرد.

جهت انجام چهار مرحله کلیدی همسانه‌سازی و رسیدن به نتیجه مفید، اتخاذ یک راهبرد مشخص در ابتدای کار ضروری است.

۶-۱) بهترین روش کدام است؟

پیچیدگی همسانه‌سازی عمدتاً به دو عامل بستگی دارد، ۱- اهداف کلی روش و ۲- منبعی که اسید نوکلئیک از آن برای همسانه‌سازی استخراج می‌شود. بنابراین راهبردی که برای جداسازی و توالی‌یابی یک قطعه کوچک DNA باکتریایی به کار می‌رود (و احتمالاً شامل مراحل کوتاهی است) با راهبردی که جهت تولید یک پروتئین نوترکیب در یک موجود یوکاریوتیک تراریخته به کار گرفته می‌شود متفاوت خواهد بود. تنها یک روش برای همسانه‌سازی وجود ندارد که بتواند همه نیازها را بر طرف سازد. بنابراین هر پروژه‌ای منحصر به فرد بوده و مشکلات خاص خودش را خواهد داشت و باید با انتخاب روش مناسب از میان روش‌های متعدد، انجام پروژه مدیریت شود (شکل ۶-۱).



شکل ۶-۱) مسیرهای قابل دسترس برای همسانه‌سازی که در حال حاضر تحت عنوان روش سنتی خوانده می‌شوند. روش‌های ممکن موجود برای سه مرحله اساسی همسانه‌سازی عبارتند از: a. تولید قطعات DNA، b. قرار دادن قطعه DNA در یک وکتور مناسب، و c. انتقال DNA نوترکیب به سلول میزبان. مسیرهای معمول برای همسانه‌سازی به وسیله پیکان مشخص شده است. هر چند فناوری همسانه‌سازی در سال‌های اخیر خیلی پیچیده شده است، اما در اصول بنیادی آن تغییری ایجاد نشده و مسیرهایی مانند آن چه در شکل نشان داده شده است هنوز هم در بسیاری از موارد استفاده می‌شوند (بازنویسی از Old و Primrose (۱۹۸۹)، اصول دستکاری ژن، Blackwell).

خوشبختانه بیشتر خطاها با طراحی دقیق روش‌های آزمایشگاهی قابل حذف هستند. امروزه با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی که توسط شرکت‌ها در دسترس محققین قرار گرفته، مشکلات همسانه‌سازی را بر طرف کرده است. استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی به این دلیل است که محتویات این کیت‌ها بهینه‌سازی شده و این اطمینان وجود دارد که خوب عمل می‌کنند. علی رغم مطالب مذکور، همسانه‌سازی مشکلات خاص خودش را داشته و این فناوری تاکنون بدون اشکال نبوده و دقت، بردباری و توجه به جزئیات برای دستیابی به نتیجه موفق، ضروری می‌باشد.

هر روش همسانه‌سازی منحصر به فرد است و دارای چالش‌هایی می‌باشد که این چالش‌ها با انتخاب روش‌های مناسب قابل بر طرف کردن می‌باشند. با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی که توسط شرکت‌ها در اختیار قرار می‌گیرند همسانه‌سازی تسهیل شده است.

در هنگام کار با موجودات یوکاریوت، اولین تصمیم مهم، شروع کار با mRNA یا DNA ژنومی می‌باشد. اگر چه DNA، نشانگر ژنوم کامل موجود است، اما DNA می‌تواند حاوی توالی‌های غیر کد کننده از قبیل اینترون، نواحی کنترل کننده و توالی‌های تکراری نیز باشد. توالی‌های غیر کد کننده DNA گاهی می‌توانند مشکل ایجاد کنند، خصوصاً هنگامی که ژنوم موجود بزرگ بوده و هدف، جداسازی یک ژن باشد. هر چند اگر هدف اولیه کنترل بیان ژن باشد، ضروری است که توالی های کنترل کننده ژن جداسازی شوند، بنابراین برای دستیابی به این هدف، استفاده از DNA ژنومی تنها راه است.

مرحله بسیار مهم در همسانه‌سازی، انتخاب مواد و لوازم شروع کار می‌باشد که روی اهداف کلی روش تأثیر می‌گذارد.

mRNA نسبت به DNA ژنومی به‌عنوان ماده ژنتیکی دارای دو مزیت می‌باشد. اولین مزیت این است که mRNA نماینده ترانس‌کریپتوم محسوب می‌شود (یعنی اطلاعات ژنتیکی بیان شده توسط یک سلول خاص که نمونه هدف ما از آن تهیه شده است). ترانس‌کریپتوم می‌تواند یک مکانیزم انتخاب خیلی قوی باشد، چون تمام DNA ژنومی در جمعیت mRNA وجود ندارد. همچنین اگر ژن مورد نظر به میزان بالایی بیان شده باشد، می‌تواند نشانگر فراوانی mRNA آن ژن باشد و در نتیجه جداسازی آن ژن راحت‌تر است. مزیت دیگر mRNA این است که mRNA بیانگر توالی کدکننده ژن می‌باشد، زیرا در فرایند پردازش RNA، توالی‌های غیر کد کننده اینترون حذف می‌شوند. اگر یک همسانه از mRNA در دسترس باشد تولید پروتئین نوترکیب بسیار آسان خواهد بود.

اگرچه DNA ژنومی و mRNA دو منبع عمده مولکول‌های اسید نوکلئیک برای همسانه‌سازی محسوب می‌شوند، اما در صورت آگاهی از توالی اسید آمینه پروتئین، امکان ساخت DNA در آزمایشگاه وجود دارد. در حالی که این راهبرد برای همسانه‌سازی قطعات بلند DNA کار مشکلی است، اما در بعضی موارد در صورتی که قبل از همسانه‌سازی تنها ساخت بخش کوتاهی از ژن برای تکمیل توالی مد نظر باشد روش مفیدی است. از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (مراجعه به فصل ۷) نیز می‌توان برای سنتز قطعات DNA استفاده کرد که شاید این قطعات برای مطالعات بعدی در یک وکتور مناسب همسانه‌سازی شوند.

اگر چه DNA ژنومی و mRNA دو منبع عمده اسید نوکلئیک برای همسانه‌سازی محسوب می‌شوند، روشی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) گاهی برای تهیه قطعات اسید نوکلئیک برای همسانه‌سازی استفاده می‌شود.

بعد از تصمیم‌گیری در خصوص مواد اولیه مورد نیاز برای همسانه‌سازی، مرحله بعدی انتخاب نوع سیستم میزبان/ وکتور می‌باشد. حتی برای همسانه‌سازی در سلول *E. coli*، دامنه وسیعی از

سویه‌های باکتری *E. coli* وجود دارد و باید دقت کرد که ترکیب میزبان و وکتور مناسبی انتخاب شود. روش اتصال قطعات DNA روی وکتور و راه‌های دستیابی به مولکول‌های نوترکیب درون سلول میزبان، دو دغدغه عمده در هنگام انتخاب وکتور محسوب می‌شود. در عمل سیستم‌های میزبان/ وکتور در *E. coli*، به خوبی تبیین شده‌اند، بنابراین انتخاب بهترین ترکیب بین سیستم میزبان/ وکتور کار نسبتاً ساده‌ای می‌باشد. هر چند وکتورها، سلول‌های میزبان و کیت‌های همسانه‌سازی متنوع موجود در بازار در نگاه اول می‌تواند برای محقق گیج کننده باشد اما معمولاً توصیه یک همکار با تجربه، بهترین راه برای انتخاب یک سیستم می‌باشد. معمولاً در هر آزمایشگاهی روش‌های مناسب و مفیدی وجود دارند که به نحو مطلوبی عمل می‌کنند.

در انتخاب روش همسانه‌سازی، همه نکات مذکور باید مورد توجه قرار گیرد. معمولاً راه حل ایده‌آلی برای رفع یک مشکل خاص وجود ندارد و این مشکلات را باید پذیرفت. با در نظر گرفتن هدف کلی آزمایشات در ذهن، محقق می‌تواند اثرات چنین مشکلاتی را کاهش داده و مؤثرترین مسیر همسانه‌سازی را انتخاب نماید.

۶-۲) همسانه‌سازی mRNA

هر نوع سلول در موجودات زنده چند سلولی، طیفی از مولکول‌های mRNA را تولید می‌کند. علاوه بر بیان ژن‌های بومی یا خانه‌دار[1] که برای متابولیسم سلول ضروری است، سلول‌ها بسته به نوع بافت نیز دارای بیان اختصاصی ژن‌ها هستند. بنابراین هر یک از سلول‌های کبد، کلیه، پوست و مانند آن، طیف وسیعی از پروتئین‌های مختص به خود (پروتئوم) را می‌سازند. این موضوع به بیان یک سری از ژن‌های خاص در ژنوم نیاز دارد که در واقع با ساخت گروهی از mRNAهای مختلف (ترانس‌کریپتوم) حاصل می‌شود. علاوه بر تنوع mRNA تولید شده در هر سلول، انواع مختلفی از mRNA می‌توانند در هر سلول وجود داشته باشند. این موضوع برای همسانه‌سازی از روی mRNA نتایج مهمی به دنبال دارد و اگر mRNA به مقدار زیاد در سلول وجود داشته باشد، جداسازی توالی همسانه‌سازی شده آسان‌تر خواهد بود. نمونه‌هایی از کلاس‌های متعدد mRNA در جدول ۶-۱ نشان داده شده است.

اگرچه mRNA نماینده بخش بیان شونده ژنوم می‌باشد، اگر هدف همسانه‌سازی توالی کد کننده یک ژن باشد، منطقی است که از mRNA برای شروع کار استفاده شود.

[1]. Housekeeping genes

جدول ۶-۱) کلاس‌های متعدد RNA پیک

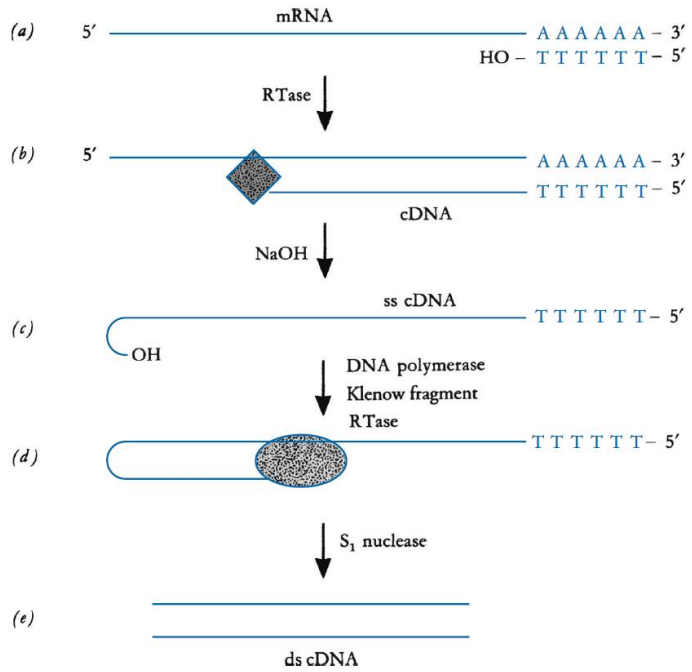
Source	Number of different mRNAs	Abundance (molecules/cell)
Mouse liver cytoplasmic poly(A)$^+$ RNA	9	12000
	700	300
	11500	15
Chick oviduct polysomal poly(A)$^+$ RNA	1	100000
	7	4000
	12500	5

توجه: تنوع mRNA به وسیله تعداد مولکول‌های mRNA مختلف نشان داده شده است. در سلول‌های رحم جوجه یک نوع mRNA به میزان بالا (۱۰۰،۰۰۰ مولکول در هر سلول) وجود دارد. این mRNA در ساخت بخش عمده پروتئین سفیده تخم مرغ به نام اوالبومین نقش دارد. منبع: از Old و Primrose (۱۹۸۹)، اصول دست‌ورزی ژن، نشر چهارم، Blackwell. اطلاعات مربوط به موش از Young و همکاران (۱۹۷۶) بیوشیمی ۱۵، ۲۸۲۸-۲۸۲۳، کپی رایت (۱۹۷۶)، انجمن شیمی آمریکا. اطلاعات مربوط به مرغ از Axel و همکاران (۱۹۷۶)، سلول ۱۱، ۲۵۴-۲۴۷، کپی رایت (۱۹۷۶) مجلهٔ سلول.

۶-۲-۱) ساخت DNA مکمل (cDNA)

همسانه‌سازیmRNA به‌طور مستقیم امکان پذیر نیست، لذا قبل از این‌که به وکتور منتقل شود، باید به DNA تبدیل شود. ساخت DNA مکمل از روی mRNA به وسیله آنزیم رونوشت بردار معکوس صورت می‌گیرد (مراجعه به بخش ۴-۲-۲). روش کلاسیک ساخت DNA مکمل به این صورت است که دنباله چند آدنینی ناحیه '3 مولکول mRNA با پرایمر چند نوکلئوتیدی تیمین (dT) که گروه هیدروکسیل آزاد را در ناحیه '3 برای آنزیم رونوشت بردار معکوس فراهم می کند، اتصال می یابد (شکل ۶-۲). آنزیم رونوشت بردار معکوس در حضور چهار نوکلئوتید و شرایط مناسب از روی mRNA به عنوان الگو، یک هیبرید DNA مکمل mRNA می‌سازد. مولکول mRNA به وسیله هیدرولیز قلیایی حذف شده و DNA مکمل تک رشته‌ای با استفاده از DNA پلیمراز به DNA دو رشته‌ای تبدیل می‌شود. پس از ساخت رشته دوم، به منظور ایجاد مولکول DNA با انتهای تراز، DNA دو رشته‌ای تولید شده به وسیله آنزیم نوکلئاز S1 تیمار می‌شود تا بتوان آن را در یک وکتور مناسب همسانه‌سازی کرد.

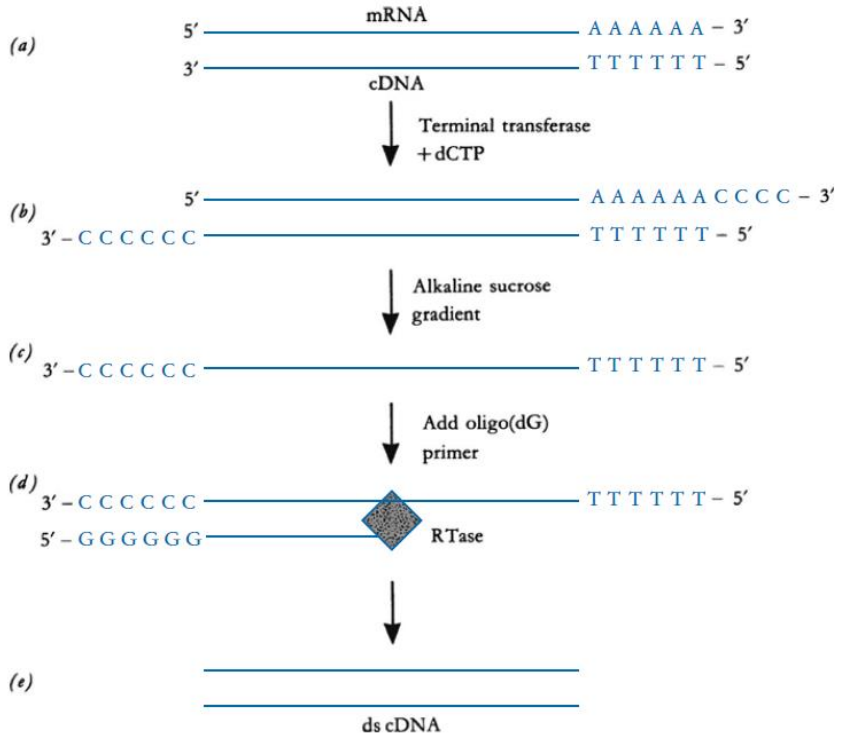
اولین مرحلهٔ همسانه‌سازی mRNA، تبدیل آن به یک DNA مکمل دو رشته‌ای (cDNA) با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس و DNA پلیمراز است.



شکل ۶-۲) ساخت cDNA. از مولکول mRNA به عنوان شروع کننده واکنش استفاده می‌شود (a) یک آغازگر الیگو (dT) به دم چند آدنینی mRNA متصل می‌شود، به طوری که یک گروه ۳´-OH را برای فعالیت آنزیم ترانس کریپتاز معکوس برای نسخه برداری از mRNA فراهم می‌کند (b). مولکول mRNA با استفاده از مواد قلیایی حذف می‌شود و یک مولکول ss cDNA ایجاد می‌شود (c). این مولکول یک ساختار کوچک دو رشته‌ای سنجاق سری ایجاد می‌کند که انتهای ۳´-OH را برای (d) سنتز رشتهٔ دوم با استفاده از آنزیم DNA پلیمراز فراهم می‌کند (T4 DNA پلیمراز، قطعه کلنو یا RTase). (e) مولکول دو رشته‌ای cDNA با استفاده از آنزیم نوکلئاز S1 برای ایجاد cDNA دو رشته‌ای با انتهای صاف برش داده می‌شود. روش جایگزین برای مرحله هیدرولیز قلیایی، استفاده از آنزیم RNase H است. این آنزیم در رشتهٔ mRNA در هیبرید cDNA -mRNA ایجاد شکاف می‌کند. با استفاده از این آنزیم و در ترکیب با DNA پلیمراز I، با انجام Nick translation ساخت رشتهٔ دوم cDNA انجام می‌شود.

مشکلات متعددی در هنگام ساخت cDNA با استفاده از روش مذکور به‌وجود می‌آید. اولین مشکل، ممکن است ساخت کامل cDNA مفید نباشد، به خصوص هنگامی که اندازه mRNA نسبتاً طولانی باشد. این موضوع هنگامی که بیان cDNA مورد توجه باشد یک مشکل جدی محسوب می‌شود. زیرا cDNA ساخته شده ممکن است حاوی تمام توالی کد کننده ژن نباشد. ساخت چنین cDNA نامناسبی همچنین به این معنی است که نواحی 3'mRNA در جمعیت

DNA مکمل بیشتر ظهور پیدا می‌کند. ثانیاً مشکل دیگر می‌تواند ناشی از استفاده از آنزیم نوکلئاز S1 باشد، این آنزیم ممکن است در هنگام پیرایش cDNA دو رشته‌ای، بعضی از توالی‌های ناحیه 5' را حذف کند.



شکل ۶-۳) سنتز رشته دوم cDNA با استفاده از آغازگر الیگو (dG). (a) سنتز رشتهٔ نخست در شکل ۶-۲ نشان داده شده است، که طی آن یک مولکول هیبرید mRNA- cDNA ایجاد می‌شود. (b) یک توالی پلی C با استفاده از آنزیم ترمینال ترانسفراز (ترانسفراز انتهایی) به انتهای مولکول هیبرید حاصل اضافه می‌شود. (c) جداسازی با استفاده از شیب ساکاروز قلیایی موجب تجزیه mRNA شده و لذا مولکول های کامل cDNA ریکاور و احیاء شدن می‌شوند. (d) یک آغازگر الیگو (dG) به انتهای C متصل می‌شود و آنزیم ترانسکریپتاز معکوس رشتهٔ دوم cDNA را سنتز می‌کند. (e) اکنون یک مولکول دو رشته‌ای cDNA با طول کامل ایجاد شده است. از Old و Primrose (۱۹۸۹)، اصول دستورزی ژن، Blackwell.

روش‌های جدید ساخت cDNA تا حد زیادی مشکلات مذکور را مرتفع ساخته است و در حال حاضر روش اولیه کمتر استفاده می‌شود. یکی از ساده‌ترین روش‌ها استفاده از دنباله چند

نوکلئوتیدی سیتوزین می‌باشد که موجب ساخت توالی حاوی چند نوکلئوتید گوانین در رشته دوم cDNA می‌شود (شکل ۶-۳). با استفاده از آنزیم ترانسفراز انتهایی[1] چند سیتوزین به انتهای ناحیه '3 اضافه می‌شود. اضافه شدن سیتوزین موجب می‌شود که ناحیه انتهایی '3 به طور مؤثرتری قابل دسترس باشد، بنابراین اضافه شدن سیتوزین در واکنش موجب تشکیل cDNA با طول کامل می‌شود. همچنین این روش نیاز به نوکلئاز S1 را مرتفع می‌کند و بنابراین ساخت طول کامل cDNA آسان‌تر می‌شود.

همان طوری که به دفعات اشاره شد خیلی از شرکت‌ها کیت‌هایی را به‌منظور ساخت cDNA و همسانه‌سازی تولید می‌کنند. این کیت‌ها اغلب برای اهداف مشخص بهینه سازی شده‌اند و معمولاً مراحل انجام کار را به حداقل می‌رسانند. روش‌های متعددی برای ساخت cDNA قبلاً وجود داشته است، اما امروزه روش‌های بهتری برای تهیه cDNA با طول کامل تجارت رو به جلوتری رو در دسترس پقرار داده. کلید موفقیت برای ساخت cDNA، تهیه mRNA با کیفیت خوب می‌باشد. به خصوص، در انجام کار باید از آلودگی با نوکلئازها اجتناب کرد.

اگر چه دنباله آدنینی mRNA یوکاریوت‌ها به منظور شروع ساخت cDNA استفاده می‌شود، در بعضی موارد ممکن است این دنباله آدنینی مناسب نباشد. وقتی که mRNA دارای دنباله آدنینی نباشد، ممکن است از آغازگر تصادفی برای شروع ساخت cDNA استفاده شود. یا این‌که اگر تمام یا بخشی از توالی اسید نوکلئیک یک پروتئین خاص مشخص باشد، با طراحی آغازگر اختصاصی، می‌توان cDNA مورد نظر را ساخت. از مزایای بزرگ روش فوق این است که mRNA اختصاصی ممکن است به cDNA تبدیل شود که غربالگری همسانه‌ها را تسهیل می‌کند. دیگر کاربرد محتمل این دستاورد، استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر اختصاصی توالی مورد نظر می‌باشد. بعد از تولید قطعات cDNA، مراحل همسانه‌سازی ادامه می‌یابد. انتخاب سیستم وکتور مناسب (پلاسمید، فاژ، فاژمید و یا کاسمید) و آماده‌سازی یک کیت همسانه‌سازی برای این کار ضروری است. مثال‌هایی بر مبنای راهکارهای همسانه‌سازی ژن با استفاده از وکتورهای پلاسمیدی و فاژی در ادامه ذکر شده است.

در صورت تهیه mRNA با کیفیت خوب و عاری از آلودگی به نوکلئازها، امروزه سنتز cDNA در بسیاری از آزمایشگاه‌ها یک کار عادی محسوب می‌شود.

[1]. Terminal transferase

۶-۲-۲) همسانه‌سازی cDNA در وکتورهای پلاسمیدی

اگر چه خیلی از محققین ترجیح می‌دهند که از وکتور باکتریوفاژ برای همسانه‌سازی cDNA استفاده کنند، اما هنوز پلاسمیدها برای همسانه‌سازی استفاده می‌شوند، به خصوص هنگامی که جداسازی توالی cDNA به غربالگری تعداد نسبتاً کمی از همسانه‌ها وابسته باشد. اتصال قطعات cDNA به پلاسمید معمولاً با یکی از سه روش اتصال با انتهای صاف، استفاده از مولکول‌های اتصال دهنده و استفاده از دنباله هموپلیمرکه در شکل ۶-۱ شرح داده شده است، امکان پذیر است. هر چند این روش‌ها برای همسانه‌سازی cDNA مناسب هستند، اما از روش‌های مذکور می‌توان برای همسانه‌سازی DNA ژنومی نیز استفاده کرد. (مراجعه به بخش ۶-۳). هر کدام از سه روش مذکور به‌طور خلاصه شرح داده خواهد شدند.

قرار دادن cDNA دریک وکتور معین با روش‌های متعددی صورت می‌گیرد. هدف از این کار معمولاً تولید مولکول های نوترکیب برای همسانه‌سازی است.

اتصال با انتهای صاف (Blunt-end ligation) در واقع به اتصال مولکول‌های DNA با انتهاهای صاف با استفاده از DNA لیگاز گفته می‌شود (بخش ۴-۳). در همسانه‌سازی cDNA، ایجاد انتهای صاف ممکن است در نتیجه استفاده از آنزیم نوکلئاز S1 و یا پر کردن انتهای چسبنده توسط آنزیم DNA پلیمراز باشد. مهمترین اشکال اتصال انتهای صاف این است که فرایند کارایی نیست، زیرا هیچ ارتباط بین مولکولی خاصی برای نگه‌داشتن رشته‌های DNA کنار هم وجود ندارد، در حالیکه DNA لیگاز پیوند فسفودی استر مورد نیاز برای ایجاد DNA نوترکیب را فراهم می‌کند. بنابراین استفاده از غلظت‌های بالای مولکول‌های DNA مورد نظر باید مورد توجه باشد، به طوری که احتمال قرارگیری دو انتها در کنار هم افزایش یابد. غلظت مؤثر مولکول‌های DNA در همسانه‌سازی معمولاً بر اساس غلظت دو انتهای صاف آن‌ها بیان می‌شود. بنابراین از عبارت «مقدار پیکومول انتها» استفاده می‌شود که به‌نسبت واژه عجیبی به نظر می‌رسد.

اتصال انتهای دو مولکول باید با دقت انتخاب شود. از لحاظ نظری هنگامی که وکتور DNA و cDNA ترکیب می شوند، چندین نتیجه به دست خواهد آمد. نتیجهٔ مطلوب این است که یک مولکول cDNA به یک وکتور مناسب متصل شود و براساس آن یک مولکول نوترکیب ایجاد شود. بنابراین اگر غلظت‌ها به صورت بهینه نباشد، ممکن است که قطعهٔ DNA مورد نظر یا وکتور به خودش متصل شده و ایجاد مولکول‌های حلقوی کرده و یا DNA های وکتور و قطعهٔ مورد نظر ممکن است به جای ایجاد نوترکیب‌های دو مولکولی، تشکیل یک مولکول کانکاتامر را دهند. در عمل جهت جلوگیری از اتصال قطعات به خودشان، اغلب مولکول وکتور با آنزیم فسفاتاز تیمار می‌شود (فسفاتاز باکتریایی یا فسفاتاز رودهٔ گوساله)؛ (بخش ۴-۲-۳ را ببینید) غلظت وکتور و DNA مورد نظر برای تولید مولکول نوترکیب باید مناسب باشد.

واکنش اتصال بر مبنای غلظت دو انتهای مولکول‌های DNA که باید به هم متصل شوند شکل می‌گیرد. این موضوع به تعداد انتهای مولکول‌هایی که قرار است بهم متصل شوند، ارتباط دارد.

یکی از معایب اتصال دو انتهای صاف این است که در این روش ممکن است توالی شناسایی آنزیم برشی در مکان همسانه‌سازی ایجاد نشود، بنابراین مانع جداسازی قطعه الحاقی از مولکول نوترکیب می‌شود. این امر معمولاً یک مشکل بزرگ نیست، زیرا امروزه بیشتر وکتورها دارای مکان‌های برشی برای آنزیم‌های محدودالاثر در اطراف مکان همسانه‌سازی هستند. بنابراین بعد از الحاق قطعه DNA با انتهای صاف، توسط یکی از مکان های برشی قابل جداسازی خواهد بود. رویکرد دیگر در این خصوص استفاده از مولکول‌های لینکر یا اتصال دهنده است، این مولکول‌ها به صورت توالی‌های الیگومری خود تکمیلی هستند و دارای توالی مشخص برای عمل آنزیم برشی خاص هستند. مانند توالی ´5-CCGAATTCGG-´3 که در صورت دو رشته‌ای بودن دارای توالی برشی برای آنزیم برشی *Eco*RI می باشد (GAATTC). لینکرها به صورت شیمیایی سنتز می‌شوند و توانایی اتصال به مولکول cDNA با انتهای صاف را دارند (شکل ۶-۴). هنگامی که به توالی مورد نظر اضافه شوند، توالی cDNA / لینکر با استفاده از آنزیم برشی ویژه لینکر برش داده می‌شود، بنابراین قبل از انجام همسانه‌سازی، انتهای چسبنده تولید می‌شود. اگر توالی cDNA دارای مکان‌های برشی مشابه با مکان برشی لینکر باشد می‌تواند در انجام همسانه‌سازی مشکل ایجاد کند. برای غلبه بر این مشکل می‌توان از آنزیم متیلاز برای حفاظت از مکان‌های برشی مشابه درون ناحیه cDNA استفاده کرد.

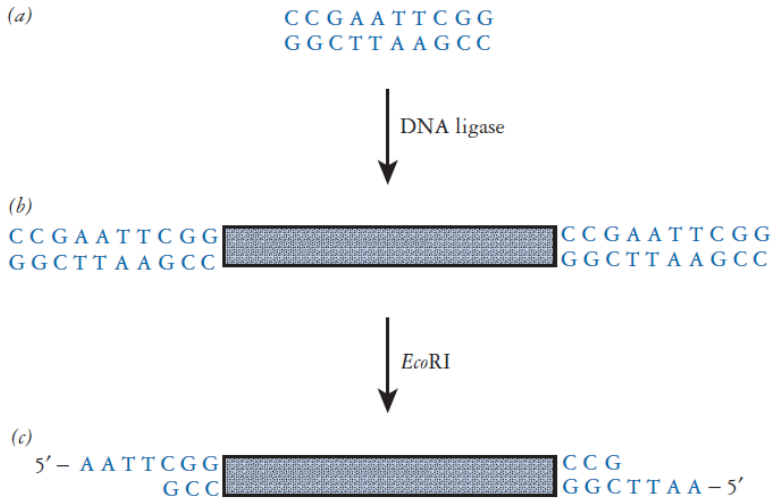
بهتر است هنگامی که cDNA در وکتور الحاق می‌شود، تلاش برای حصول اطمینان از وجود جایگاه‌های شناسایی اندونوکلئاز برشی که امکان جداسازی قطعه همسانه‌سازی شده را فراهم کنند ضروری است..

روش دوم برای همسانه‌سازی با استفاده از اضافه نمودن توالی‌های خاص به انتهای مولکول DNA، استفاده از مولکول‌های آداپتور است (شکل ۶-۵). توالی‌های الیگومر تک رشته‌ای غیر مکملی وجود دارد که امکان اتصال آنها با لینکرها وجود دارد. هنگامی که این ملکولها به هم متصل می شوند، مولکول آداپتور/ لینگر با یک انتهای صاف و یک انتهای چسبنده تولید می‌شود. مولکول آداپتور/ لینگر می‌تواند به انتهای cDNA افزود و بدون اینکه نیازی به هضم آنزیمی لینکر باشد، انتهای چسبنده تولید نمود.

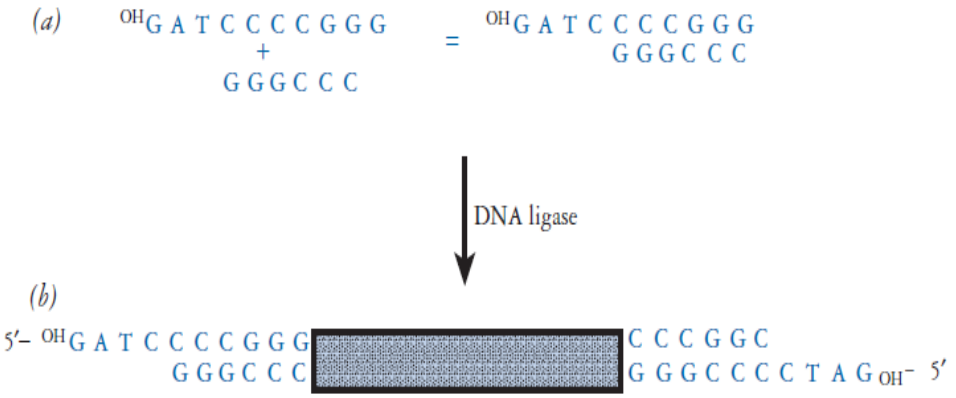
استفاده از روش دنباله هوموپلیمری رایج‌تر بوده و ابزاری مؤثر برای همسانه‌سازی cDNA است. در این روش، آنزیم ترمینال ترانسفراز انتهایی[1] (بخش ۴-۳-۲ را ببینید) برای اضافه کردن

[1] Terminaltransferase

هوموپلیمرهای dA، dT، dG و dC به مولکول DNA استفاده می‌شود. آزمون‌های اولیه برای ایجاد نوترکیبی، از دم‌های dA روی یک مولکول و دم‌های dT روی مولکول دیگر استفاده می‌شود. اگرچه این روش امروزه بیشتر برای همسانه‌سازی cDNA در مکان *Pst*I از یک وکتور پلاسمیدی حامل دم dC.dG استفاده می‌شود. هوموپلیمرها برای اتصال مولکول‌های DNA از منابع مختلف به هم، دارای دو مزیت نسبت به سایر روش‌ها هستند. نخست اینکه هوموپلیمرها نواحی بلندتری را برای اتصال مولکول‌های DNA در مقایسه با، برای مثال، انتهای چسبنده تولید شده با هضم آنزیمی فراهم می‌کنند. به این معنی که ضرورتی به انجام الحاق در شرایط *in vitro* نیست، چون هیبرید وکتور و cDNA از پایداری کافی برای زنده ماندن در سلول میزبان یعنی جایی که فرآیند الحاق شرایط *in vivo* انجام می شود، برخوردار است. مزیت دوم مربوط به اختصاصی بودن آن است. از آن‌جائی که پلاسمید وکتور و cDNA دارای دنباله‌های متفاوت اما مکمل یکدیگر هستند، شانس کمی برای اتصال مجدد به خود را داشته و ساخت یک بیومولکول نوترکیب در دامنه وسیعی از غلظت‌های موثر همرا با الحاق صورت می‌گیرد.



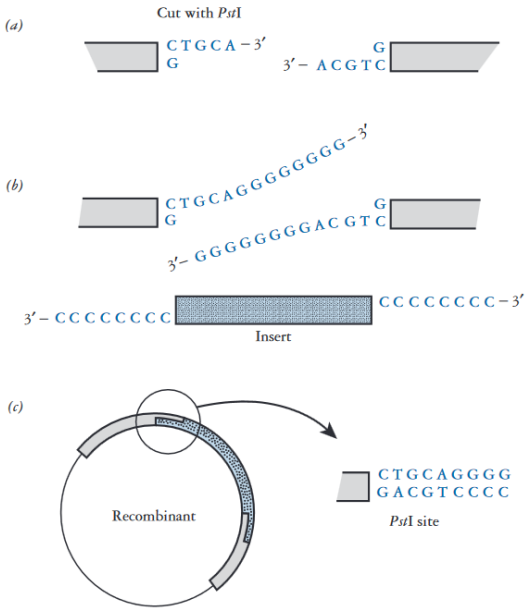
شکل ۶-۴) استفاده از مولکول‌های لینکر. (a) یک رشتهٔ ۱۰- نوکلئوتیدی ′5-CCGAATTCGG-3′ دارای مکان برش برای آنزیم *Eco*RI سنتز می‌شود. (b) این لینکر با استفاده از آنزیم DNA لیگاز به مولکول DNA با انتهای صاف متصل می‌شود. (c) سپس قطعهٔ ساخته شده با استفاده از آنزیم *Eco*RIهضم می‌شود به عبارت دیگر مولکول لینکر را برای ایجاد انتهای ′۵ برآمده برش می‌دهد. Redrawn از Winnacker (۱۹۸۷)، از ژن تا کلون، VCH.



شکل ۶-۵) استفاده از آداپتورها. در این مثال آداپتور (5′-GATCCCCGGG-3′)*Bam*HI به یک مولکول تک رشته‌ای از لینکر (3′-GGGCCC-5′) *Hpa*II متصل شده است و تولید یک مولکول دو رشته‌ای با انتهای چسبان می‌کند، همان طور که در قسمت (a) نشان داده شده است. مولکول حاصل به انتهای صاف یک مولکول DNA با استفاده از آنزیم DNA لیگاز متصل می‌شود. بنابراین مولکول DNA دارای انتهای برآمدهٔ ′۵ نیاز به هضم آنزیمی ندارد، همان طور که در قسمت (b) نشان داده شده است. انتهای ′۵ آداپتور می‌تواند برای جلوگیری از اتصال به خودش دفسفریله شود. Redrawn از Winnacker (۱۹۸۷)، از کتاب ژن تا کلون، VCH.

فرایند هموپلیمر دنباله‌دار مثال بارزی از توسعه یک روش هدف دار است که با هدف دستیابی به نتیجه خاص می‌باشد در حالی که خطر نتایج ناخواسته به حداقل رسیده است.

نمونه‌ای از استفاده از دنباله هموپلیمر در شکل ۶-۶ نشان داده شده است. وکتور با آنزیم *Pst*I برش داده شده و با استفاده از آنزیم ترانسفراز انتهایی در حضور نوکلئوتید گوانین دنباله‌دار می‌شود. این عمل موجب ایجاد دنباله حاوی چند گوانین خواهد شد. دنباله حاوی چند سیتوزین در روشی مشابه به DNA الحاق اضافه می‌شود و سپس ۲ بخش مذکور به راحتی به هم متصل می‌شوند. این کار موجب ایجاد مجدد جایگاه آنزیم *Pst*I خواهد شد که امکان جداسازی DNA الحاق شده از مولکول نوترکیب را با استفاده از آنزیم برشی *Pst*I فراهم خواهد کرد. پلاسمید نوترکیب حاوی cDNA الحاق شده با روش ترانسفورمیشن به درون باکتری مناسب *E. coli* منتقل می‌شود (مراجعه به بخش ۵-۵-۱) و همسانه‌های نوترکیب با روش‌های مختلفی قابل تفکیک و غربالگری هستند. معمولا پلاسمید نوترکیب منتقل شده به درون باکتری و اندازه DNA الحاق شده در ارتباط با کارآیی همسانه‌سازی بسیار مهم هستند و در همسانه‌سازی باید نوع وکتور - میزبان و اندازه cDNA الحاقی مورد توجه قرار گیرد.

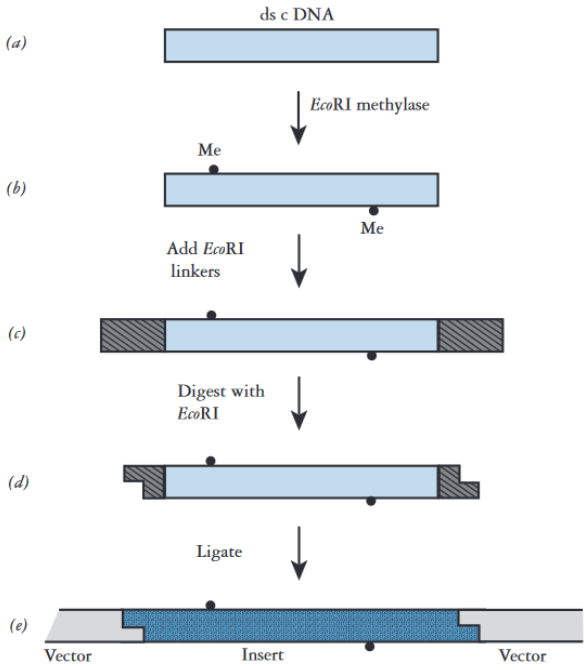


شکل ۶-۶) روش هموپلیمر دنباله دار. (a) وکتور با آنزیم *PstI* بریده می‌شود، به طوری که انتهای 3′- OH ایجاد کند. (b) سپس آنزیم ترانسفراز انتهایی یک دنباله گوانینی را به وکتور متصل می‌کند. قطعهٔ DNA مورد نظر با استفاده از روشی مشابه دارای یک دم سیتوزینی می‌شود. (c) دنباله گوانینیو سیتوزینی مکمل هم هستند و در نتیجه قطعه مورد نظر به وکتور متصل شده و تولید یک مولکول نوترکیب می‌کند. همان طور که نشان داده شده است مکان‌های برشی آنزیم *PstI* مجدداً در انتهای قطعهٔ DNA مورد نظر تولید می‌شوند.

۶-۲-۳) همسانه‌سازی cDNA در باکتریوفاژها

اگرچه وکتورهای پلاسمیدی به‌طور وسیعی برای همسانه‌سازی cDNA استفاده شده‌اند، اما در بعضی موارد برای همسانه‌سازی مناسب نیستند. اگر تعداد زیادی DNA نوترکیب مورد نیاز باشد به خصوص موقعی که همسانه‌سازی یک mRNA با فراوانی پایین مد نظر باشد، شاید وکتورهای از نوع باکتریوفاژ برای این منظور مناسب‌تر باشند. مزیت عمده استفاده از باکتریوفاژ این است که بسته بندی در شرایط *in* vitro ممکن است برای ساخت یک فاژ نوترکیب استفاده شودکه موجب افزایش کارآیی فرایند همسانه‌سازی می‌شود. به علاوه نگهداری و کار با مقادیر زیاد همسانه‌های فاژی بسیار آسان‌تر از کلنی‌های باکتریایی حاوی پلاسمید می‌باشد. مسلم است جداسازی یک همسانه cDNA که از یک mRNA نادر ساخته شده، ممکن است نیاز به غربالگری صدها هزار همسانه مجزا داشته باشد، لذا انتخاب روش آسان خیلی مهم می‌باشد.

وکتورهای باکتریوفاژی دارای مزایایی نسبت به وکتورهای پلاسمیدی برای همسانه‌سازی cDNA هستند. هر چند برای بعضی از کارها، به خصوص موقعی که بیان cDNA مورد نظر باشد هنوز پلاسمیدها به عنوان وکتور استفاده می‌شوند. هرچند همسانه‌سازی cDNA در باکتریوفاژ لامبدا با همسانه‌سازی هر قطعه دیگری از DNA در پلاسمیدها تفاوتی ندارد. به هر حال، ابزارهای مورد نیاز برای همسانه‌سازی cDNA با همسانه‌سازی DNA ژنومی در باکتریوفاژ لامبدا کمی تفاوت دارند، لذا انتخاب وکتور باید با دقت صورت گیرد (مراجعه به بخش ۶-۳). معمولاً طول cDNA از قطعات DNA ژنومی بسیار کوتاه‌تر می‌باشد، بنابر این وکتور باید دارای ظرفیت مناسبی برای همسانه‌سازی داشته باشد. به عنوان مثال وکتورهایی مانند gt10 و Charon 16A به ترتیب دارای ظرفیت همسانه‌سازی حدود ۷/۶ و ۹ کیلو باز می‌باشند (مراجعه به بخش ۵-۳-۲). cDNAها قبل از همسانه‌سازی بر اساس طول تفکیک شده و cDNAهای کوتاه‌تر که نماینده طول کامل mRNA نیستند حذف می‌شوند. در وکتورهایی مانند gt10، همان گونه که در شکل ۶-۷ نشان داده شده است، cDNA با استفاده از لینکرها معمولاً در جایگاه *Eco*RI قرار داده می‌شود. مولکول DNA نوترکیب در شرایط *in* vitro بسته‌بندی شده و برای انتخاب و غربالگری درون یک میزبان مناسب قرار داده می‌شود.



شکل ۶-۷) همسانه‌سازی cDNA در فاژ لامبدا (λ) با استفاده از لینکرها. a. تیمار DNA دو رشته‌ای با آنزیم متیلاز *Eco*RI، که b. تمام توالی‌های شناسایی آنزیم *Eco*RI را متیله می‌کند. c. پس از اضافه شدن لینکرها به دو انتهای cDNA متیله شده، هضم آنزیمی لینکرها با آنزیم *Eco*RI صورت می‌گیرد. d. متیله شدن cDNA از هضم آنزیمی آن در جایگاه‌های داخلی جلوگیری می‌کند، در نتیجه یک cDNA با دو انتهای چسبنده در اختیار قرار می‌گیرد. e. این cDNA با دو انتهای چسبنده می‌تواند درون جایگاه فاژ لامبدا مانند λgt10 الحاق شود.

۶-۳) همسانه‌سازی DNA ژنومی

هر چند همسانه‌سازی cDNA شاخه بسیار مهمی از فناوری دست‌ورزی ژن محسوب می‌شود، اما مواردی وجود دارد که cDNA پاسخگوی پرسش‌های پیش آمده نخواهد بود. برای مثال اگر در مورد ساختار کلی یک ژن مشخص تحقیق می‌شود (به طوری که مطابق رونوشت RNA خودش نباشد)، محقق ممکن است بخواهد اینترون‌های درون ژن را تعیین کند یا این که بخواهد توالی‌های کنترل کننده مسئول تنظیم بیان ژن را تعیین کند. این توالی‌ها در ملکول mRNA که بصورت cDNA تهیه شده وجود ندارند. در این‌گونه موارد همسانه‌های تهیه شده از DNA ژنومی باید جدا سازی شوند. این کار نسبت به همسانه‌سازی cDNA مشکلات بیشتری دارد، بنابراین به راهبرد همسانه‌سازی متفاوتی نیاز دارد.

اگر قرار باشد در مورد توالی‌های کنترل کننده یا اینترون‌ها تحقیق شود یا اگر توالی‌یابی ژنوم هدف باشد، از mRNA نمی‌توان برای این منظور (همسانه‌سازیcDNA) استفاده کرد. بنابراین برای این منظور باید DNA ژنومی استخراج گردد.

۶-۳-۱) کتابخانه ژنومی

همسانه‌سازی DNA با هر روشی، جمعیتی از مولکول‌های DNA نوترکیب را در پلاسمید یا فاژ ایجاد و در درون سلول‌های باکتریایی یا پیکره‌های فاژ استقرار می‌یابند. مجموعه‌ای از همسانه‌های مستقل، بانک همسانه یا کتابخانه همسانه نام دارد. واژه کتابخانه ژنومی معمولاً برای توصیف یک سری از همسانه‌ها که نماینده کل ژنوم یک موجود هستند استفاده می‌شود و تهیه کتابخانه ژنومی معمولاً اولین مرحله در استخراج توالی DNA از ژنوم یک موجود محسوب می‌شود.

مشخصات یک کتابخانه ژنومی خوب چیست؟ از نظر تئوری، کتابخانه ژنومی باید نماینده کل ژنوم یک موجود، به صورت یک سری از قطعات همسانه‌سازی شده همپوشان باشد که در نتیجه، جداسازی هر قسمت از توالی ژنوم را امکان پذیر سازد. قطعاتی که برای همسانه‌سازی استفاده می‌شوند بهتر است با روشتوالی مستقل تهیه شده که به صورت تصادفی تولید شده پو نباید هیچ نظر خاصی روی توالی مشخصی از ژنوم وجود داشته باشد. نهایتاً قطعات همسانه‌سازی شده باید به صورت پایدار و بدون هر گونه تغییر توالی ناشی از نوترکیبی یا تکثیر افتراقی قطعات DNA همسانه‌سازی شده در طی تکثیر نوترکیب ها تولید شوند. در حالی که ممکن است معیارهای تهیه کتابخانه ژنومی به‌نسبت سخت به نظر برسند، اما روش‌های موجود برای تولید کتابخانه ژنومی قادرند نیازها را به طور نسبتاً کاملی برطرف نمایند.

از آن‌جایی که کتابخانه ژنومی نماینده کل ژنوم یک موجود بوده و (حداقل در تئوری) باید دارای همه ژن‌ها و توالی‌های کنترل کننده باشد، منبع غنی برای محقق محسوب می‌شود.

اولین دغدغه در تهیه کتابخانه ژنومی، تعداد همسانه‌های مورد نیاز می‌باشد. این کار به عوامل متعددی بستگی دارد و اندازه ژنوم از مهمترین عوامل آن است. بنابراین جهت تهیه کتابخانه ژنومی کوچکی مانند ژنوم *E. coli*، به همسانه‌های کمتری نسبت به ژنوم پیچیده انسان نیاز خواهد بود. نوع وکتور مورد استفاده که اندازه قطعات همسانه‌سازی را تعیین می‌کند نیز مهم می‌باشد. در واقع طول کتابخانه ژنومی را می‌توان بر اساس احتمال حضور توالی خاص موجود در کتابخانه محاسبه نمود. فرمولی وجود دارد که همه عوامل را محاسبه کرده و ارزشی را برای "تعداد همسانه‌ها" تعیین می‌کند. این فرمول عبارت است از:

$$N = \ln (1 - P) / \ln (1 - a/b)$$

N= تعداد همسانه‌های مورد نیاز، P= احتمال وجود توالی خاص در ژنوم (به طور خاص در سطح ۰/۹۵یا ۰/۹۹)، a= میانگین اندازه قطعات DNA مورد همسانه‌سازی، و b= اندازه ژنوم که واحد آن مشابه واحد a در نظر گرفته می‌شود.

جدول ۶-۲) اندازه کتابخانه ژنی برای موجودات مختلف

		No. clones N, $P = 0.95$	
Organism	Genome size (kb)	20 kb inserts	45 kb inserts
Escherichia coli (bacterium)	4.0×10^3	6.0×10^2	2.7×10^2
Saccharomyces cerevisiae (yeast)	1.4×10^4	2.1×10^3	9.3×10^2
Arabidopsis thaliana (simple higher plant)	7.0×10^4	1.1×10^4	4.7×10^3
Drosophila melanogaster (fruit fly)	1.7×10^5	2.5×10^4	1.1×10^4
Stronglyocentrotus purpuratus (sea urchin)	8.6×10^5	1.3×10^5	5.7×10^4
Homo sapiens (human)	3.0×10^6	4.5×10^5	2.0×10^5
Triticum aestivum (hexaploid wheat)	1.7×10^7	2.5×10^6	1.1×10^6

توجه: تعداد کلون مورد نیاز (N) با یک احتمال ۹۵٪ (P) برای حضور ژن مورد نظر در کتابخانهٔ ژنومی برای تعدادی از موجودات در جدول بالا آمده است. اندازهٔ ژنوم موجودات به صورت تقریبی داده شده است. دو عدد برای N ذکر شده است، برای قطعات وارد شده با اندازهٔ ۲۰Kb (با استفاده از وکتور قابل جایگزینی λ) و در دیگری ۴۵ Kb (با استفاده از وکتور کاسمید). اعداد به دست آمده باید به عنوان حداقل معیار بررسی شوند. برای محاسبهٔ آن به یکسری مفروضات نیاز است: (۱) اندازهٔ ژنوم شناخته شده باشد، (۲) مولکول DNA برای انجام همسانه‌سازی به صورت کاملاً تصادفی قطعه قطعه شده باشد (۳) هر مولکول DNA نوترکیب وارد یک همسانه منفرد شود (۴) کارایی همسانه‌سازی برای تمام قطعات مشابه باشد و (۵) موجودات دیپلوئید برای کلیهٔ مکان‌هایشان هموزیگوت باشند. برای یک آزمایش معین تمام این فرضیات قابل انجام نیست.

با استفاده از این فرمول می‌توان حجم کار و در نتیجه راهبرد همسانه‌سازی را تعیین کرد. اندازه ژنوم و کتابخانه ژنومی تعدادی از موجودات در جدول ۶-۲ نشان داده شده است. اندازه کتابخانه باید با مقادیر حداقل در نظر گرفته شود به طوری که قطعات همسانه‌سازی شده نباید به طور تصادفی انتخاب شده بلکه نماینده مجموعه‌ای از همسانه‌ها در کتابخانه ژنومی باشد. بنابراین برای

کتابخانه ژنومی انسان، ما در مورد حدود $۱۰^۶$ همسانه یا بیشتر در مورد توالی تک نسخه ژن صحبت می‌کنیم.

با بررسی ارتباط بین اندازه ژنوم و احتمال جداسازی یک ژن دلخواه، اندازه کتابخانه ژنومی مورد نظر قابل محاسبه می‌باشد. هر چند این عمل تنها باید به‌عنوان راهنما مورد استفاده قرار گیرد، به طوری که همیشه این امکان وجود دارد که یک توالی مورد نظر شاید در کتابخانه ژنومی اولیه وجود نداشته باشد.

از آن‌جایی که ظرفیت و کارایی همسانه‌سازی وکتورهایی مانند فاژ یا کاسمید از پلاسمیدها خیلی بیشتر است، معمولاً استفاده از وکتورهایی مانند فاژ یا کاسمید برای تهیه کتابخانه ژنومی ضروری است. هر چند کاسمیدها با ظرفیت همسانه‌سازی قطعاتی به اندازه ۴۷ کیلو دالتون انتخاب بهتری برای تهیه کتابخانه ژنومی به نظر می‌رسند اما معمولاً از فاژ لامبدا برای تهیه کتابخانه ژنومی استفاده می‌شود زیرا کار با لامبدا از کاسمیدها آسان‌تر است و نقص ظرفیت همسانه‌سازی پایین فاژ لامبدا در برابر کاسمید را پوشش می‌دهد. به علاوه امروزه روش‌های غربال‌گری کتابخانه‌های فاژی به خوبی بهینه‌سازی شده و در دسترس عموم قرار دارد. این دغدغه، به‌ویژه زمانی اهمیت دارد که محققین تمایل دارند از دست‌ورزی ژن در تحقیقات‌شان استفاده کنند. وکتورهایی بر اساس کروموزم‌های ساختگی مانند کروموزم‌های مصنوعی باکتریایی یا کروموزم‌های مصنوعی مخمری می‌توانند به‌عنوان جای‌گزین برای همسانه‌سازی قطعات بزرگ DNA مورد استفاده قرار گیرند.

تعداد زیادی از وکتورها برای همسانه‌سازی DNA ژنومی استفاده می‌شوند، هر چند در عمل انتخاب وکتور بر اساس نیازهای روش و اندازه قطعات مورد نظر برای همسانه‌سازی تعیین می‌شود.

۶-۳-۲) تهیه قطعات DNA برای همسانه‌سازی

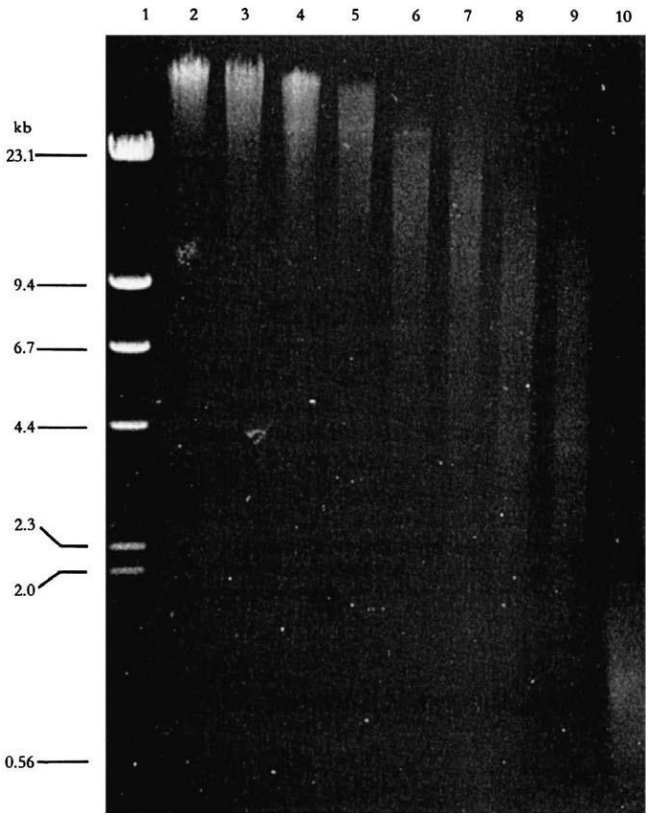
یکی از مهم‌ترین جنبه‌های تولید کتابخانه ژنومی، ایجاد قطعات DNA ژنومی برای همسانه‌سازی است. اگر از یک وکتور لامبدا مانند EMBL4 استفاده شود، حداکثر ظرفیت همسانه‌سازی حدود ۲۳ کیلو دالتون خواهد بود. بنابراین قطعاتی به همین اندازه برای تولید نوترکیب‌ها باید در دسترس قرار گیرند. در عمل برای وکتورهایی مانند EMBL4، از قطعاتی با طول‌های متفاوت و معمولاً بین ۱۷ و ۲۳ کیلو دالتون استفاده می‌شود. در این مرحله نباید از قطعات کوچکتر در همسانه‌سازی استفاده شود، از آن‌جایی‌که امکان تولید قطعات الحاقی چند تایی وجود دارد، لذا در این موارد دو یا چند قطعه کوچک با توالی غیر کانیگ در همسانه‌سازی می شود. این کار قطعا مطلوب و مورد نظر نیست، زیرا هر یک از این همسانه‌ها میتوانند جداسازی شده و اطلاعات اشتباهی درباره مکان‌های نسبی توالی‌های خاص در اختیار گذارند.

در هنگام تهیه قطعات DNA برای همسانه‌سازی دو موضوع مهم وجود دارد: ۱- وزن مولکولی قطعه DNA بعد از استخراج و ۲- روش استفاده شده برای قطعه قطعه کردن DNA. برای تهیه یک کتابخانه ژنومی کاملاً تصادفی، باید برای شروع از DNA با وزن مولکولی بالا استفاده گردد و DNA باید با روش کاملاً تصادفی قطعه قطعه شود. جداسازی DNA در اندازه بیشتر از kb ۱۰۰مطلوب می‌باشد و این کار به خودی خود در جایی که نوع بافت اجازه تخریب ملایم سلول را ندهد می‌تواند مشکلات تکنیکی به وجود بیاورد. به علاوه مخلوط کردن محلول حاوی DNA با وزن مولکولی بالا با سمپلر می‌تواند موجب شکستن مولکول‌ها گردد، لذا در هنگام کار با مولکول DNA با وزن مولکولی بالا باید مراقب بود. مشکل طول DNA هنگام همسانه‌سازی درون وکتورهایی مانند BAC یا YAC بیشتر است، زیرا ممکن است به قطعاتی حدود kb ۳۰۰ نیاز باشد. بنابراین در صورتی که طیفی از قطعات الگو باید تولید شود، به قطعاتی از DNA با میانگین طول بیش از kb ۳۰۰ نیاز می‌باشد. در این مرحله مغایرتی ملاحظه می‌شود زیرا از طرفی به DNA با وزن مولکولی بالا نیاز است و از طرف دیگر در هنگام کار، در صورت بی دقتی این مولکول DNA به قطعات کوچکتر برش داده می‌شوند. نکته کلیدی این است که این روش که بهترین گروه از قطعات را به صورت تصادفی ایجاد می کند. البته احتمال همسانه‌سازی DNA با میانگین وزن مولکولی پایین نیز وجود دارد، اما در این صورت شانس بوجود آمدن توالی‌های اشتباه بیشتر می‌شود، مگر این که قطعه قطعه شدن DNA کاملاً تصادفی باشد (مانند برش مکانیکی مولکول‌های DNA در فرایند استخراج DNA).

DNA ژنومی برای همسانه‌سازی باید تا حد امکان سالم باشد تا ایجاد قطعات مناسب برای همسانه‌سازی قابل کنترل باشد.

با فرض این که مقدار کافی از DNA به طول حدود kb ۱۰۰ موجود باشد، می‌توان قطعاتی با طول‌های متفاوت از مولکول DNA میتواند ایجاد شود. این فرآیند بوسیله پروسه انتخاب برای جداسازی قطعات در محدوده اندازه مورد نظر دنبال می‌شود. قطعه قطعه کردن DNA با روش‌های مکانیکی و هضم جزئی آنزیمی با آنزیم‌های برشی محدودالاثرمیتواند انجام شود. اگر چه شکستن مکانیکی (برش DNA با استفاده از سوزن سرنگ یا امواج صوتی) موجب تولید قطعات DNA به طول متفاوت خواهد شد، اما این روش قطعه DNA با انتهای چسبنده ایجاد نخواهد کرد. بنابراین قبل از اتصال DNA به وکتور معمولا برای دست ورزی‌های بعدی از قبیل حذف یا افزایش انتهای مولکول‌های DNA از دنباله‌هایی مانند لینکرها، آداپتورها و هموپلی‌لینکرها استفاده می‌شود (شکل ۶-۱). در عمل انجام این مراحل اضافی مطلوب نیست و قطعه قطعه DNA با استفاده از هضم آنزیمی توسط آنزیم برشی در آزمایشگاه انجام می‌گیرد. هر چند این روش فرایندی مستقل از توالی DNA نیست، زیرا وقوع جایگاه‌های تشخیص آنزیم برشی مشخصا باتوالی در ارتباط است.

بنابراین هضم جزئی دارای مشکلاتی است، اما طراحی و اجرای دقیق روش می‌تواند بر اغلب معایب آن غلبه کند. بنابراین چگونه می‌توان با روش هضم جزئی به هدف همسانه‌سازی دست یافت؟



شکل ۶-۸) هضم جزئی و قطعه قطعه کردن DNA ژنومی. DNA با وزن مولکولی زیاد با استفاده از غلظت‌های مختلف آنزیم محدودالاثر *Sau*3A هضم شده است. نمونه‌های هر هضم روی ژل آگارز ۰/۷٪ جداسازی و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند. خط ۱ مربوط به مارکر λ *Hind*III است که اندازه باندها را نشان می‌دهد. خطوط ۱۰-۲ نشان‌دهندهٔ اثر افزایش غلظت‌های آنزیم برشی برای هضم قطعات اولیه است. همان طور که مشخص است با افزایش غلظت آنزیم، اندازهٔ قطعات DNA تولیدی کوچک‌تر می‌شوند. با استفاده از این اطلاعات، غلظت بهینهٔ آنزیم برشی برای تولید قطعات با اندازهٔ معین تعیین خواهد شد. در مرحلهٔ بعد می‌توان این قطعات را روی ژل برد و قبل از همسانه‌سازی استخراج کرد. عکس از دکتر N. Urwin.

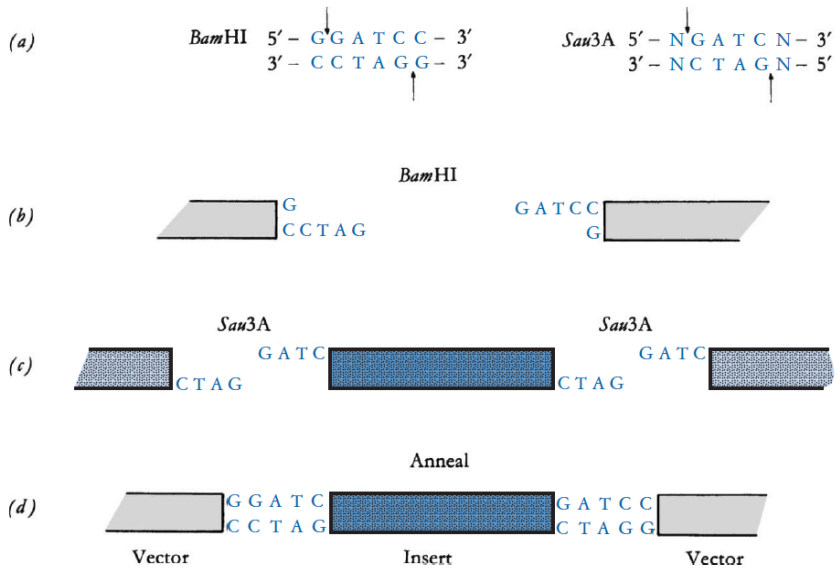
اگر یک آنزیم برشی برای هضم کامل DNA مورد استفاده قرار گیرد، الگوی قطعات ایجاد شده به جایگاه دقیق توالی‌های شناسایی آنزیم برشی بستگی دارد. بنابراین روش فوق دارای دو اشکال

می‌باشد. اولین عیب این است که آنزیم برشی مانند *Eco*RI که توالی شش نوکلئوتید خاصی را به طور تقریبی در هر ۴۰۹۶ kb برش می‌دهد، قطعاتی ایجاد می‌کند که برای همسانه‌سازی در فاژ لامبدا بسیار کوتاه است. دومین عیب، هر توالی خاصمثلا به شکل توالی‌های تکراری ممکن است موجب انحراف در توزیع جایگاه‌های شناسایی یک آنزیم خاص شود. بنابراین ژنوم در برخی نواحی ممکن است دارای جایگاه‌های برش کم، در حالی که نواحی دیگر ژن دارای جایگاه‌های برش بیشتری باشند. این مسئله به این معنی است که یک هضم کامل برای تولید یک کتابخانه ژنی الگو مطلوب نیست. اگر، به هر حال، یک هضم جزیی با یک آنزیم برشی که با فراوانی بالا برش می دهد (به عنوان مثال، آنزیم *Sau*3A مولکول DNA را با توالی چهار نوکلئوتیدی و به طور تقریبی در هر ۲۵۶ kb برش می‌دهد)، نتیجه این روش تولید مجموعه‌ای از قطعات بصورت تصادفی خواهد بود. برای دستیابی به هدف می‌توان از غلظت‌های متفاوت آنزیم و یا تغییر در زمان هضم آنزیمی استفاده و همان گونه که در شکل ۶-۸ نشان داده شده است با انجام الکتروفورز، قطعات ایجاد شده با اندازه‌های متفاوت روی ژل را مشاهده کرد.

هضم آنزیمی جزئی توسط آنزیمی با قدرت برشی بالا، اگر چه با توالی بی ارتباط نیست، می‌تواند قطعاتی به طول متفاوت ایجاد کند که عمدتاً به طور تصادفی تولید شده‌اند.

۶-۳-۳) الحاق، بسته بندی و تکثیر کتابخانه‌ها

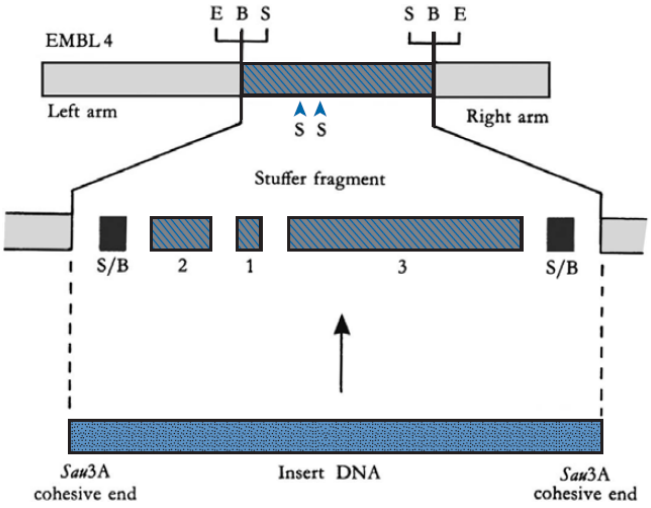
بعد از بهینه‌سازی شرایط هضم جزئی، یک نمونه از DNA برای همسانه‌سازی می‌تواند تهیه شود. بعد از هضم، قطعاتمختلف نمونه می‌تواند با روش‌هایی مانند سانتریفیوژ یا الکتروفورز از یکدیگر جدا شود. سپس می‌توان قطعات DNA به طول بین kb ۱۷-۲۳ را برای همسانه‌سازی انتخاب کرد. اگر آنزیم *Sau*3A (یا آنزیم *Mbo*I که دارای توالی شناسایی برش یکسانی می‌باشند) به عنوان آنزیم برشی استفاده شده باشد، باتوجه به این‌که دو انتهای ایجاد شده با آنزیم‌های *Sau*3A و *Mbo*I مکمل یکدیگر هستند، قطعات ایجاد شده را می‌توان در داخل جایگاه برش آنزیم *Bam*HI وکتوری مانند EMBL4 قرار داد (شکل ۶-۹). به‌منظور جلوگیری از چسبیدن دو انتهای مولکول DNA به خود یا تشکیل قطعات کانکاتمر (پی در پی)، قطعه DNA مورد نظر را می‌توان با آنزیم فسفاتاز تیمار نمود و برای تولید دو انتهای چسبنده برای همسانه‌سازی، وکتور را می‌توان با آنزیم‌هایی مانند *Bam*HI یا *Sal*I برش داد تا قطعه مورد نظر انتخاب و از اتصال مجدد آن در زمان اتصال (ligation) جلوگیری شود. بعد از همسانه‌سازی می‌توان جایگاه شناسایی آنزیم *Eco*RI را برای جداسازی قطعه الحاقی استفاده نمود. اتصال DNA به EMBL4 در شکل ۶-۱۰به‌طور خلاصه نشان داده شده است.



شکل ۶-۹) همسانه‌سازی قطعات *Sau*3A در داخل یک مکان *Bam*HI. (a) مکان‌های شناسایی و برشی برای دو آنزیم *Sau*3A و *Bam*HI نشان داده شده‌اند. در مکان *Sau*3A، کلمه N هر نوع نوکلئوتیدی می‌تواند باشد. (b) وکتور DNA با آنزیم *Bam*HI بریده شده و تولید برآمدگی ′۵ همراه با چهار نوکلئوتید ′۵-GATC-′۳ می‌کند. (c) مولکول DNA الحاقی نیز با آنزیم *Sau*3A بریده شده و تولید چهار نوکلئوتید مشابه می‌کند. (d) بنابراین مولکول DNA بریده شده با آنزیم *Sau*3A می‌تواند به انتهای چسبان *Bam*HI متصل شود و تولید یک مولکول DNA نوترکیب کند.

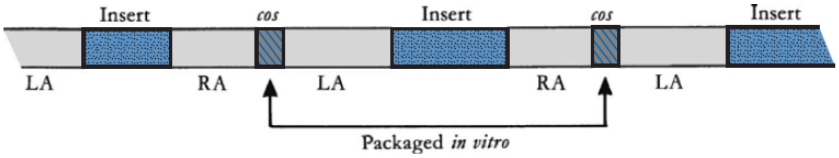
بعد از الحاق قطعه DNA به وکتور، مولکول DNA نوترکیب کانکاتمریک ایجاد می‌شود که در واقع قطعات مناسبی برای بسته‌بندی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشند، همان‌گونه که در شکل ۶-۱۱ نشان داده شده است. این فرایند که با نام کتابخانه اولیه خوانده شده و در برگیرنده بخش‌های منفرد فاژ نوترکیب می‌باشد. در حالی‌که از نظر تئوری، این فاژ نوترکیب برای جداسازی یک توالی خاص، مفیدترین نوع کتابخانه می‌باشد، اما یک منبع محدود محسوب می‌شود. بنابراین کتابخانه اولیه تولید و غربالگری شده و سپس دور ریخته می‌شود. اگر توالی مورد نظر جداسازی نشده باشد، مولکول‌های DNA نوترکیب بیشتری باید ساخته و درون فاژ بسته‌بندی شوند. در حالی‌که این موضوع یک مشکل جدی تلقی نمی‌شود، مواقعی پیش می‌آید که برای ساخت کتابخانه ژنی ممکن است ژن‌های مختلفی غربال شوند یا این‌که برای تکمیل کتابخانه ژنی از محققین مختلف که در آزمایشگاه‌های متفاوت کار می‌کنند استفاده شود (این نوع کار، همسانه‌سازی با تلفن نامیده

می‌شود!). در این‌گونه موارد تکثیر کتابخانه ضروری است. برای این منظور فاژ نوترکیب درون یک سویهٔ مناسب *E.coli* کشت می‌شود و در نهایت برای دستیابی مجدد به پلاک‌ها، شست و شوی آرام پلیت با کمک بافرهای خاص انجام می‌شود. فاژهای حاصله را می‌توان ذخیره کرد و از آن‌ها می‌توان به‌عنوان مواد اولیه برای غربالگری و خالص سازی استفاده کرد.



شکل ۶-۱۰) اتصال DNA بریده شده با آنزیم *Sau*3A به وکتور جایگزینی λ (EMBL4). مکان‌های برشی روی وکتور به ترتیب (E) مربوط به *E.co*RI، (B) مربوط به *Bam*HI و (S) مربوط به *Sal*I است. وکتور با دو آنزیم *Bam*HI و *Sal*I برش می‌خورد به طوری که قطعهٔ استافر به پنج قسمت تقسیم می‌شود (قطعه هاشور خورده در بالا). با حذف قطعات خیلی کوچک *Sal*I/*Bam*HI که با کادر پر شده مشخص شده است، از اتصال مجدد قطعه استافر جلوگیری می‌شود. علاوه بر این، دو مکان درونی *Sal*I قطعه استافر را برش می‌دهند و ایجاد سه قطعهٔ (۱ تا ۳) *Sal*I/*Sal*I می‌کنند. اگر قطعات تولید شده مطلوب باشند، می‌توان با استفاده از ایزوپروپانول قطعات کوچک را حذف کرد که در این صورت قطعات کوچک در قسمت رونشین قرار می‌گیرند. با حذف قطعه استافر، مولکول DNA هضم شده با آنزیم *Sal*Iمی‌تواند به وکتور با مکان *Bam*HI متصل شود (شکل ۶-۹ را ببینید).

تکثیر کتابخانه‌های ژنومی اغلب برای تولید نسخه‌هایی از همسانه‌های اولیه انجام می‌شود. سپس می‌توان از کتابخانه جهت مصارف مختلف استفاده کرد و یا حتی برای مطالعات بیشتر آن را در اختیار محققین سایر آزمایشگاه‌ها قرار داد.



شکل ۶-۱۱) ساختار کانکاتامری DNA نوترکیب. بعد از اتصال قطعه مورد نظر به وکتوری مانند EMBL4 ساختار کانکاتامر شکل می‌گیرد. این ساختار دارای یک بازوی چپ (LA) ، قطعه DNA الحاقی و یک بازوی راست (RA) است. این قسمت‌ها با هم یک واحد را تشکیل و چندین مرتبه تکرار شده و به وسیلهٔ انتهای چسبان قسمت‌های *cos* به هم متصل می‌شوند. با انجام بسته بندی در شرایط *in vitro*، ژنوم نوترکیب در مکان‌های *cos* بریده شده و درون ناحیه سر فاژ بسته بندی می‌شود.

اگرچه تکثیر یک مرحلهٔ مفید در تولید کتابخانه‌های پایدار است، اما موجب وقوع برخی اشتباهات در کتابخانه می‌شود. در نتیجه ممکن است برخی از فاژهای نوترکیب حذف شوند. البته دلیل آن ممکن است وجود توالی‌های تکراری درون قطعهٔ مورد نظر باشد که موجب ناپایداری کتابخانه می‌شوند. این مشکل را می‌توان با کشت در یک سویه Recombination-deficient host به حداقل رساند. برخی فاژها نیز ممکن است ویژگی‌های رشدی متفاوتی نشان دهند به طوری که ممکن است فاژهای خاصی به تعداد کمتر و یا بیشتر درون کتابخانه حضور داشته باشند و این امر بدین معنی است که برای جداسازی توالی مورد نظر باید پلاک‌های بیشتری را غربال کرد. البته این امر عموماً یک مشکل بزرگ نیست.

۶-۴) روش‌های پیشرفته همسانه‌سازی

در بخش ۶-۲ و ۶-۳ ما روش‌های همسانه‌سازی cDNA و DNA ژنومی را با استفاده از وکتورهایی مانند فاژ و پلاسمید در درون باکتری *E. coli* مورد توجه قرار دادیم. این دستاوردها اثبات کرد که هر دو روش قابل‌اطمینان و در طیف گسترده‌ای کاربرد دارند و هنوز این روش‌ها بخش عمده‌ای از فناوری دست‌ورزی ژن را به خود اختصاص می‌دهند. هر چند، پیشرفت‌های صورت گرفته در سال‌های اخیر، قلمرو و پیچیدگی روش‌های همسانه‌سازی را افزایش داده است. استفاده از وکتورهای پیچیده‌تر برای *E. coli* و میزبان‌های دیگر، افزایش استفاده از وکتورهای بیان ژن و دستاوردهای جدید، شامل استفاده وسیع از فناوری واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از جمله پیشرفت‌ها محسوب می‌شوند. تعدادی از نمونه‌های پیشرفته‌تر راهبردهای همسانه‌سازی بعدا بحث خواهد شد.

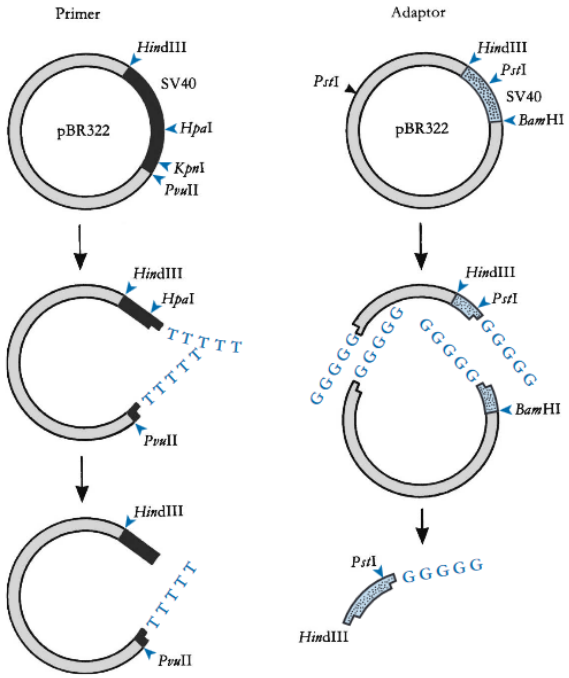
۶-۴-۱) ساخت و همسانه‌سازی cDNA

یک طرح جالب جهت تولید همسانه‌های cDNA به وسیله هیروتو اُکایاما[1] و پائول برگ[2] در سال ۱۹۸۲ طراحی شد. این طرح نشان می‌دهد که چگونه طراحی دقیق یک سیستم می‌تواند از برخی مشکلات ایجاد شده توسط روش‌های جدید و پیشرفته بکاهد. در این روش‌ها وکتور پلاسمیدی خودش به عنوان مولکول اولیه استفاده می‌شود و مولکول mRNA برای سنتز cDNA به این پلاسمید متصل می‌شود. برای تکمیل این فرایند نیاز به یک مولکول آداپتور ثانویه است. مولکول آداپتور و آغازگر هر دو بر مبنای پلاسمید pBR322 می‌باشند که دارای توالی‌های اضافه از ویروس SV40 هستند. آماده سازی وکتور و مولکول‌های آداپتور شامل هضم آن‌ها با استفاده از آنزیم‌های برشی، اضافه کردن توالی‌های الیگو (dT) و الیگو (dG) و در نهایت خالص سازی قطعات است که در شکل ۶-۱۲ نشان داده شده است.

در مرحلهٔ بعد mRNA به پلاسمید متصل و اولین رشتهٔ cDNA سنتز و یک دنباله الیگو dC به آن اضافه می‌شود. قطعه انتهای وکتور (که همچنین در این فرآیند دنباله دار شده) حذف و به‌منظور حلقوی شدن، و قبل از سنتز رشتهٔ دوم cDNA، آداپتور به وکتور متصل می‌شود. سنتز رشتهٔ دوم شامل استفاده از RNase H، DNA پلیمراز I و DNA لیگاز در یک محلول واکنش استاندارد است به‌طوری که هیبرید mRNA-cDNA را به cDNA دو رشته‌ای تبدیل و اتصال cDNA به وکتور را کامل می‌کند. نتیجهٔ نهایی این است که مولکول‌های نوترکیب حاصله دارای طول کامل cDNA خواهند بود. خلاصه روش اُکایاما و برگ در شکل ۶-۱۳ نشان داده شده است.

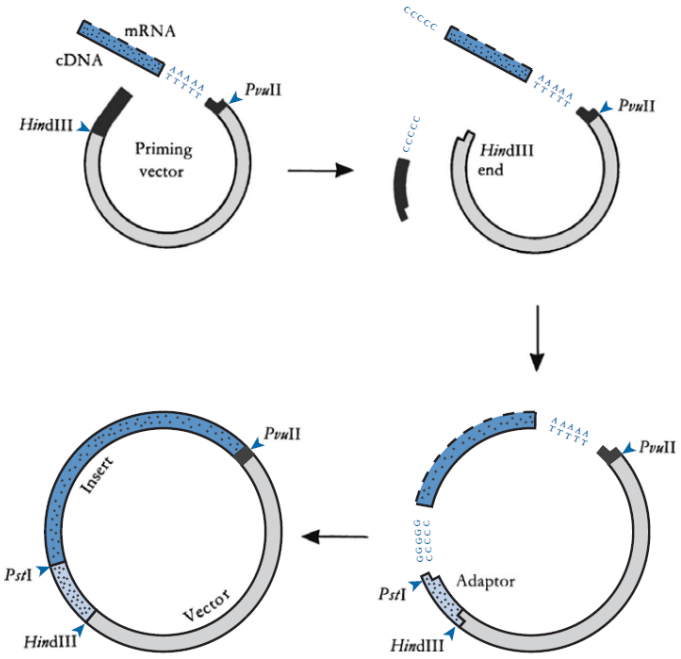
---

[1]. Hiroto Okayama
[2]. Paul Berg



شکل ۶-۱۲) آماده سازی وکتور و مولکول‌های آداپتور برای فرآیند همسانه‌سازی cDNA بر مبنای روش Okayama و Berg. در ابتدا وکتور بر مبنای پلاسمید pBR322 همراه با قسمت‌های اضافه از ژنوم ویروس SV40 ساخته شده است (به صورت سیاه رنگ و سایه‌دار نشان داده شده است). برای ساخت آغازگر، هضم وکتور با استفاده از آنزیم *Kpn*I انجامو یک دنباله الیگو dT به آن اضافه می‌شود. در مرحلهٔ بعد با استفاده از آنزیم *Hpa*I، یک وکتور که در یک انتهایش دارای دنباله است ایجاد می‌شود. مولکول آداپتور را نیز می‌توان با استفاده از برش پلاسمید آداپتور به کمک آنزیم *Pst*I انجام داد. با این کار دو قطعه ایجاد می‌شود. توالی‌های الیگو dG به این دو قطعه اضافه می‌شوند و سپس برای تولید مولکول آداپتور با استفاده از آنزیم *Hin*dIII هضم می‌شوند که با این کار علاوه بر دنباله الیگو dG انتهای چسبنده *Hin*dIII نیز ایجاد می‌شوند. برای انجام ادامه کار باید این قطعه جداسازی شود (شکل ۶-۱۳ را ببینید). از Old و Primrose (۱۹۸۹)، اصول دستورزی ژن، Blackwell.

همچون بسیاری از جنبه‌های زندگی، افزایش فعالیت‌های توسعه‌ای منجر به تولید محصول پیچیده‌تر می‌شود. بیشتر روش‌های همسانه‌سازی همین امر را تائید می‌کنند، به‌طوری که تغییر ایجاد شده در این روش‌ها بر مبنای اصول اساسی بوده و جهت دستیابی به اهداف اغلب محققین توسعه یافته‌اند.



شکل ۶-۱۳) پروتکل همسانه‌سازی cDNA با روش Okayama و Berg. قسمت پلی A از mRNA به ناحیهٔ پلی T وکتور متصل و نخستین رشتهٔ cDNA با استفاده از آنزیم ترانسکریپتاز معکوس سنتز می‌شود. سپس یک دنباله پلی C به cDNA اضافه می‌شود و با استفاده از آنزیم *Hin*dIII ناحیه دنباله dC در انتهای وکتور ایجادحذف می‌شود. cDNA به مولکول آداپتور حاوی یک دنباله dG متصل می‌شود که موجب اتصال آن به وکتور با استفاده از انتهای چسبان *Hin*dIII می‌شود. در نهایت mRNA با استفاده از آنزیم RNase H حذف و رشتهٔ دوم cDNA با استفاده از آنزیم DNA پلیمراز I سنتز و یک مولکول نوترکیب وکتور / قطعه مورد نظر تولید می‌شود. از Old و Primrose (۱۹۸۹)، اصول دستورزی ژن، Blackwell.

۶-۴-۲) بیان مولکول‌های همسانه‌سازی شده DNA

بسیاری از دستورزی‌های رایج در همسانه‌سازی ژن‌ها، نیازی به بیان DNA همسانه‌سازی شده ندارد. هر چند مواردی وجود دارد که در آن‌ها به بیان ژن در مقادیر معینی نیاز می‌باشد. یک رونوشت از توالی همسانه‌سازی شده ممکن است برای استفاده به‌عنوان کاوشگر مورد نیاز است، یا این‌که برای شناسایی ژن همسانه‌سازی شده، محصول پروتئین (بعد از رونویسی و ترجمه) به عنوان بخشی از روند غربالگری مورد استفاده قرار گیرد. دیگر کاربرد رایج بیوتکنولوژی، تولید پروتئین با ارزش تجاری از DNA نوترکیب است. شاید بعد از همسانه‌سازی توالی‌های DNA یوکاریوتی،

انجام تغییرات بعد از رونویسی و بعد از ترجمه نیاز باشد. همچنین نوع سیستم وکتور / میزبان استفاده شده در تعیین این که آیا توالی خاص DNA همسانه‌سازی شده به طور موثری بیان خواهد گردید بسیار مهم است. شاید مشکل پردازش RNA در موجودات میزبان پروکاریوتی با همسانه‌سازی توالی‌های cDNA بر طرف گردد که این روش، از عمومی‌ترین روش ها برای بیان توالی های یوکاریوتی مورد نظر محسوب می شود. ما در این بخش به بعضی از جنبه‌های همسانه‌سازی cDNA برای بیان ژن توجه خواهیم کرد و عمدتاً روی ویژگی‌های وکتور - قطعه الحاقی و در نهایت روی بیان قطعه الحاق شده تمرکز خواهیم کرد. بحث بعدی در باره این موضوع در فصل ۹ و ۱۰ ارائه خواهد شد.

با استفاده از cDNA همسانه‌سازی شده و بیان آن‌ها در یک میزبان مناسب میتوان سنتز پروتئین را انجام داد. در این خصوص وکتورهای بیان ژن متعددی به صورت تجاری در دسترس هستند.

با فرض اینکه یک توالی cDNA با عملکرد خاص در دسترس باشد. باید یک سامانهٔ وکتور / میزبان مناسب را انتخاب کرد. نوع سلول میزبان معمولاً بر اساس آسانی استفاده از آن، خصوصیات تخمیر و یا توانایی ترشح پروتئین تولید شده، انتخاب می‌شود. با این حال، در یک سلول میزبان ممکن است چندین وکتور بیان وجود داشته باشد که شامل پلاسمید و وکتور بر مبنای فاژ است (در باکتری‌ها). یک وکتور بیان علاوه بر عوامل کلیدی مانند مکان‌های مخصوص برای فعالیت آنزیم‌های برشی و مکانیسم انتخاب ژنتیکی، جهت بیان ژن همسانه‌سازی شده به صورت مناسب به یک پروموتر نیاز دارد. هدف از استفاده از یک پروموتر، اغلب افزایش بیان ژن همسانه‌سازی شده است، بنابراین وکتوری که دارای یک پروموتر با کارایی بالا است انتخاب می‌شود. چنین پروموترهایی اغلب با عنوان پروموترهای قوی شناخته می‌شوند. با این حال، اگر محصول ژن همسانه‌سازی شده برای سلول سمی باشد، برای جلوگیری از مرگ سلول به‌دلیل فرابیان[1] محصول سمی، باید از یک پروموتر ضعیف استفاده کرد.

پروموترها نواحی با توالی‌های خاص هستند که موجب اتصال RNA پلیمراز می‌شوند. با بررسی توالی‌های ′۵ از نواحی بالادست ژن‌های مختلف، این نوع توالی‌ها شناسایی شده‌اند. اگرچه انواع زیادی پروموتر موجود است اما همگی دارای شباهت‌هایی هستند. بهترین توالی شناخته شده برای پروموترها توالی‌های محافظت شده نامیده می‌شود. در پروکاریوت‌ها دو منطقه اصلی در این خصوص وجود دارد که دارای اهمیت بسیار هستند. یکی از آن‌ها مربوط به ناحیهٔ kb ۱۰ در بالادست از ناحیهٔ شروع رونویسی (ناحیهٔ ۱۰، مکان شروع رونوشت برداری Tc ۱+ نامیده می‌شود) است که باعنوان جعبه پریبنو شناخته می‌شود و توالی مربوط به آن ′5-TATAAT-′3 است.

---

1. Overexpression

ناحیهٔ مهم دیگر در مکان ۳۵- واقع است و توالی محافظت شده آن 5′-TTGACA-3′ است. این دو ناحیه ساختار اصلی پروموتر در سلول‌های پروکاریوتی هستند و توالی‌های موجود در بین این دو ناحیه قدرت پروموتر را نشان می‌دهند.

استفاده از یک پروموتر مناسب، عامل مهم در دستیابی به بیان ژن ناحیه cDNA همسانه‌سازی شده می‌باشد.

توالی‌های مهم برای شروع رونویسی در یوکاریوت‌ها با روشی مشابه با پروکاریوت‌ها شناخته شده‌اند. ساختار پروموتر یوکاریوت‌ها در مقایسه با پروکاریوت‌ها بسیار پیچیده‌تر است. یوکاریوت‌ها برای کنترل شروع رونویسی نیاز به توالی‌هایی دارند که ممکن است صدها و یا هزاران جفت نوکلئوتید بالاتر از مکان شروع رونویسی باشند. با این حال توالی‌هایی نزدیک‌تر به مکان شروع رونویسی در یوکاریوت‌ها وجود دارد. این مکان‌ها در اطراف ناحیهٔ ۲۵- قرار دارند و توالی محافظت شده آن‌ها 5′-TATAAAT-3′ (جعبهٔ TATA یا جعبهٔ هاگنس نام دارد) است. همچنین توالی دیگر در این خصوص در ناحیهٔ ۷۵- و با توالی محافظت شده 5′-GG(T/C)CAATCT-3′ است که جعبهٔ CAAT نامیده می‌شود.

جدول ۶-۳) برخی از پروموترهایی که ممکن است در وکتور بیان ژن استفاده شوند.

Organism	Gene promoter	Induction by
E. coli	lac operon	IPTG
	trp operon	β-indolylacetic acid
	λP_L	λ cI protein
A. nidulans	Glucoamylase	Starch
S. cerevisiae	Acid phosphatase	Phosphate depletion
	Alcohol dehydrogenase	Glucose depletion
	Galactose utilisation	Galactose
	Metallothionein	Heavy metals
T. reesei	Cellobiohydrolase	Cellulose
Mouse	Metallothionein	Heavy metals
Human	Heat-shock protein	Temperature >40°C

توجه: در جدول بالا نام چند پروموتر که در وکتور بیان استفاده می‌شوند همراه با نام موجودی که پروموتر از آن گرفته شده، ذکر شده است. همچنین شرایط مناسب برای بیان هر ژن ذکر شده است. منبع: همسانه‌سازی ژن، Brown (۱۹۹۰). Chapman و Hall، Old و Primrose (۱۹۸۹)، اصول دستورزی ژن، Blackwell.

علاوه بر استفاده از توالی پروموتر، ممکن است گاهی ضروری باشد که بیان cDNA همسانه‌سازی شده را با استفاده از تنظیم همسانه‌سازی، افزایش و یا کاهش دهیم. بنابراین نیاز به کنترل فعالیت پروموتر است. هنگامی که به محصول cDNA نیاز باشد، با استفاده از یک متابولیت مناسب می‌توان سیستم را تحت‌تأثیر قرار داد و رونویسی را شروع کرد. برخی از پروموترهای مناسب در ساخت وکتور بیان در جدول ۶-۳ آمده است.

کنترل تنظیم بیان ژن‌های همسانه‌سازی شده با استفاده از انتخاب یک سامانهٔ وکتور / میزبان مناسب بدست می‌آید. بنابراین اگر سلول در شرایط القاء شده قرار گیرد، یک سامانهٔ القاء کننده می‌تواند موجب شروع رونویسی شود.

از لحاظ نظری، ساخت یک وکتور بیان باید همراه با یک پروموتر مناسب باشد. در عمل، انجام این کار پیچیده است و برای دست‌یابی به یک وکتور مناسب همراه با کارایی لازم نیاز به دستکاری‌های زیادی است. یک وکتور مناسب باید مکان مربوط به شروع رونویسی را داشته باشد تا رونویسی ژن همسانه‌سازی در سلول میزبان صورت گیرد. همچنین باید دارای ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک و یاسایر ژن‌های انتخاب‌گر باشد و نیز باید دارای توالی‌های لازم برای عمل آنزیم‌های برشی بلافاصله در پایین دست پروموتر باشد که این امر بسیار حیاتی است. توضیحات مربوط به این قسمت از وکتور را هنگام بررسی کاربرد فناوری DNA نوترکیب در قسمت III این کتاب با عنوان کاربردهای فناوری DNA نوترکیب آورده شده است.

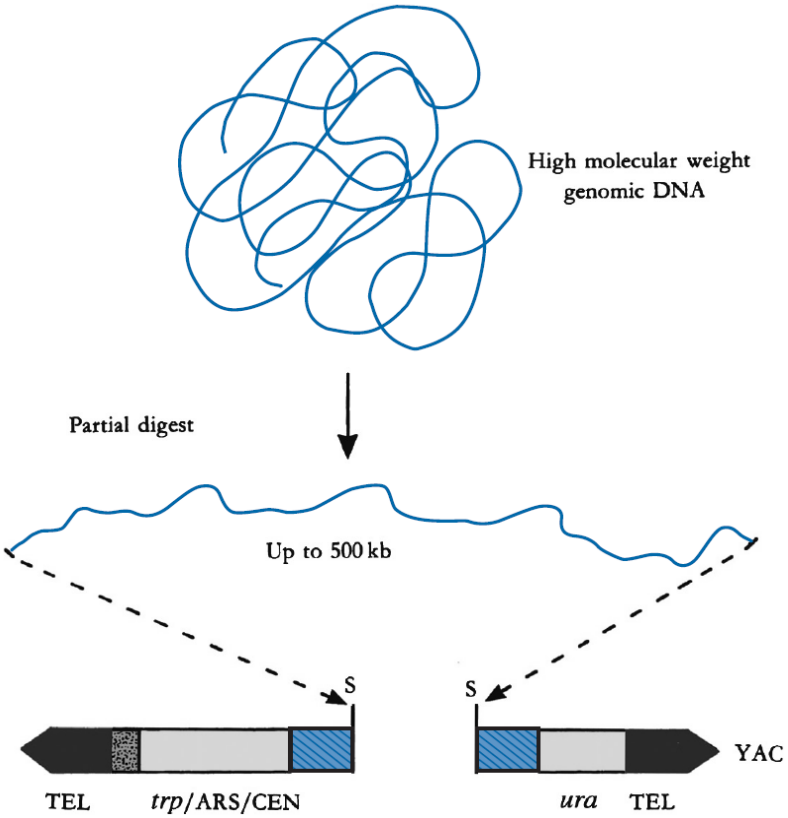
۶-۴-۳) همسانه‌سازی قطعات بزرگ DNA در وکتورهای YAC و BAC

وکتورهای YAC و BAC (شکل ۵-۱۱) می‌توانند برای همسانه‌سازی قطعات بسیار بزرگ DNA استفاده شوند. وکتورهای YAC و BAC می‌توانند تعداد کلون‌های مورد نیاز برای تولید کتابخانهٔ ژنومی از یک موجود خاص را کاهش دهند که این امر همان نتیجهٔ دلخواه است. نتیجهٔ همسانه‌سازی قطعات بزرگ DNA این است که نقشهٔ فیزیکی ژنوم به آسانی ساخته می‌شود. برای پروژه‌های توالی‌یابی DNA با کارایی بالا نیز از همسانه‌سازی برمبنای وکتورهای YAC و BAC استفاده می‌شود (مانند توالی‌یابی با روش شات گان، شکل ۳-۷).

مزیت دیگر همسانه‌سازی قطعات بزرگ DNA این است که ژن‌های بسیاری از یوکاریوت‌ها به طول kb ۴۷ و یا بیشتر هستند، بنابراین می‌توان آن‌ها را با استفاده از وکتورهای کاسمیدی در *E. coli* همسانه‌سازی کرد. بنابراین با استفاده از وکتورهایی مانند پلاسمید، فاژمید و کاسمید ممکن است نتوان تمام توالی یک ژن را جداسازی و همسانه‌سازی کرد. این امر تعیین ساختار ژن را بدون استفاده از همسانه‌های مختلف دشوار می‌کند به طوری که دیگر یک روش ایده آل نخواهد بود. با

استفاده از وکتورهای YAC و BAC می‌توان این مشکل را رفع کرد و نیز می‌توان ساختار ژن‌های بزرگ را فقط با تهیهٔ یک قطعه از DNA تعیین کرد.

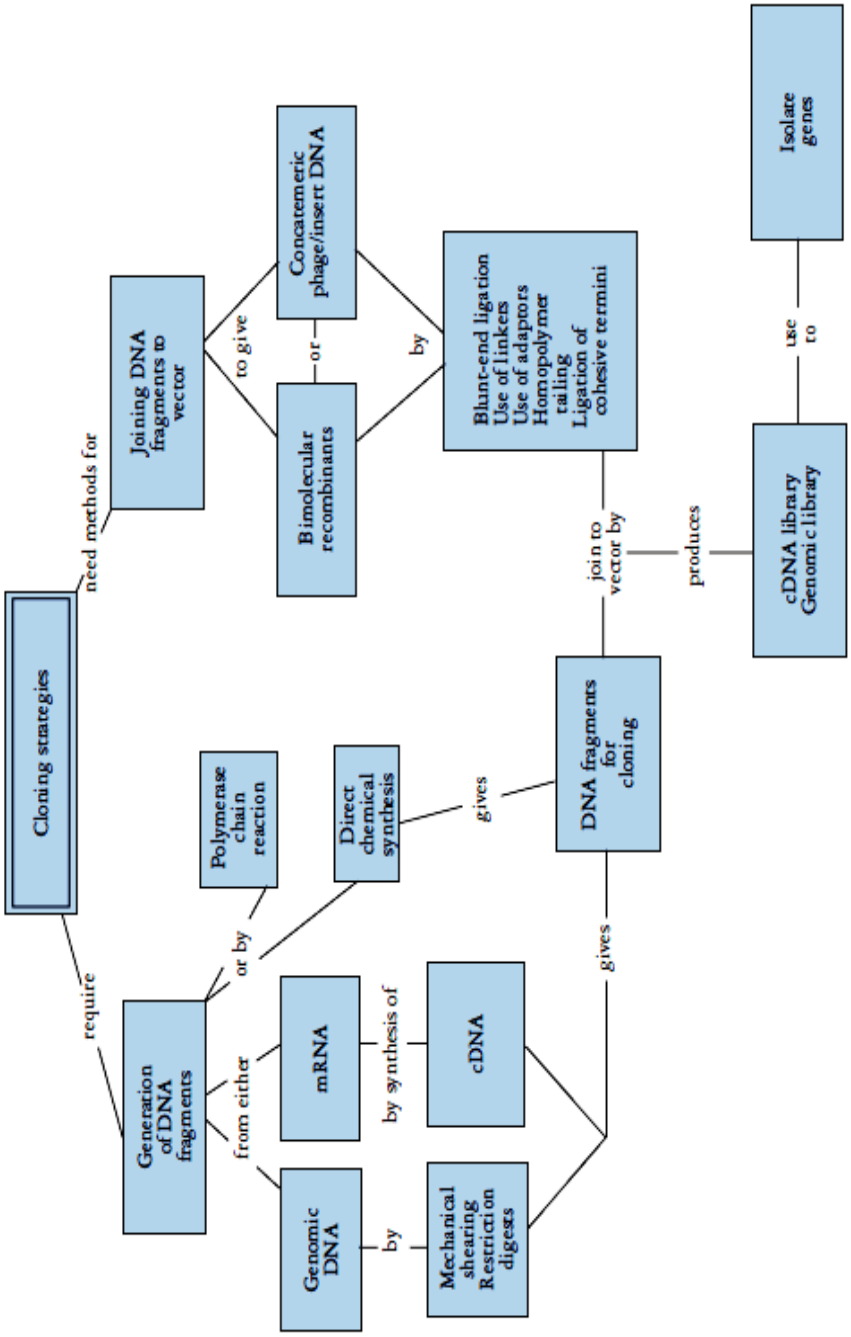
اجازه دهید همسانه‌سازی قطعات DNA با استفاده از وکتور YAC مطرح شود. در عمل، همسانه‌سازی در وکتور YAC با سایر پروتکل‌ها مشابه است (شکل ۶-۱۴). وکتور با استفاده از دو آنزیم هضم می‌شود به طوری که ناحیهٔ بین دو تلومر هضم شده و نیز مکان همسانه‌سازی وکتور نیز باز می‌شود. بنابراین دو بازو تولید می‌شود مانند موردی که در وکتور فاژ است. مولکول DNA مورد نظر به صورت قطعات خیلی بزرگ (هضم جزئی با استفاده از یک آنزیم برش دهنده شش نوکلئوتیدی) آماده و سپس این قطعات برای تولید کروموزوم مصنوعی به مکان همسانه‌سازی وکتور متصل می‌شوند. با استفاده از مارکرهای انتخابی روی هر دو بازو، می‌توان اطمینان یافت که فقط کروموزوم‌هایی که به طرز صحیح ساخته شده‌اند.



شکل ۶-۱۴) همسانه‌سازی در وکتور YAC. قطعات بسیار بزرگ DNA (تا ۵۰۰ kb) از DNA با وزن مولکولی بالا تولید می‌شوند. سپس قطعات به وکتور YAC متصل (شکل ۵-۱۱ را ببینید)

می‌شوند البته این قطعات با استفاده از دو آنـزیم *Bam*HI و *Sma*I ایجـاد شـده‌انـد (S). سـاختار حاصله شامل DNA همسانه‌سازی شده و فاکتورهای ضروری برای کروموزوم مخمـر اسـت یعنـی: تلومرها (TEL)، یک توالی همانندسازی (ARS) و یک سانترومر (CEN). برای اینکـه کرومـوزوم مصنوعی به‌صورت کامل به دست بیاید، از ژن‌های *trp* و *ura* به عنوان مارکرهای انتخابی اسـتفاده می‌شود. از Kingsman و Kingsman (۱۹۸۸)، مهندسی ژنتیک، Blackwell.

کروموزوم‌های مصنوعی مانند YAC یا BAC می‌توانند برای همسانه‌سازی قطعات بـزرگ DNA (بیشتر از چند صد kb) استفاده شوند. با این روش می‌توان خالص سازی ژن‌های بزرگ را به آسانی انجام داد و نیز می‌توان از آن در پروژه‌های توالی‌یابی DNA با مقیاس بزرگ استفاده کرد.



نقشهٔ مفهومی فصل ششم

فصل هفتم: واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

اهداف:

* نمای کلی از اصول PCR؛
* تشریح روش شناسی فرایند PCR؛
* تشریح انواع PCR؛
* نمای کلی کاربرد PCR.

خلاصه فصل/ نتایج آموزنده

بعد از خواندن این فصل به اطلاعات زیر دست خواهید یافت:

* تاریخچه PCR و اهمیت آن؛
* اصول اصلی برای انجام PCR؛
* طراحی آغازگرهای مربوط به واکنش PCR؛
* آنزیم‌های DNA پلی‌مراز مربوط به PCR؛
* اصول انجام یک پروتکل استاندارد جهت تکثیر DNA با روش PCR؛
* انجام PCR با استفاده از یک الگوی mRNA؛
* PCR آشیانه‌ای، معکوس، RAPD و سایر انواع آن؛
* کارهای بعدی روی محصولات PCR؛

لغات کلیدی:

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)، الیگونوکلئوتید، الگوی DNA، DNA پلی‌مراز، DNA دورشته‌ای، واسرشت سازی دو رشته DNA، آغازگر، مقاوم به حرارت، *Thermus aquaticus*، پلی‌مراز Taq، تک رشته‌ای شدن، اتصال، دستگاه حرارت دهندهٔ چرخه‌ای، آلاینده، روش کنترل کیفی، کاربردهای پزشکی، کاربردهای پزشکی قانونی، طراحی آغازگر، توالی، چند حالتی بودن کدهای ژنتیکی، مکان وابل (لرزان، متغیر)، اینوزین، طول آغازگر، دمای ذوب (T_m)، توالی واحد، بی ثبات در برابر حرات، Taq پلی‌مراز نوترکیب، عمل آوری، صحت، سرعت سنتز، نیمه عمر، PCR معکوس (RT-PCR)، PCR آشیانه‌ای، آغازگرهای خارجی، آغازگرهای داخلی (آشیانه‌ای)، PCR معکوس، تکثیر تصادفی چندشکلی‌های DNA با استفاده از PCR (RAPD-PCR)، تکثیر آگاهانه با استفاده از PCR، آمپلیکون.

تنها یک کشف علمی ممکن است مسیر پیشرفت یک موضوع را دگرگون کند. در زمینهٔ زیست‌شناسی مولکولی می‌توان نقاط عطف مهم و متعددی را شناسایی کرد؛ ظهور ژنتیک باکتریایی، کشف مکانیسم تکثیر DNA، مارپیچ دوتایی و کد ژنتیکی، آنزیم‌های محدود کننده و در نهایت تکنیک‌هایی که در تولید و آنالیز DNA نوترکیب مشارکت دارند. بسیاری از این کشفیات جایزه نوبل شیمی، پزشکی و فیزیولوژی را دریافت کرده‌اند. برخی از کشفیات کلیدی در این زمینه در جدول ۷-۱ لیست شده است.

موضوع این فصل واکنش زنجیره‌ای پلی مراز است[1] که توسط کری مولیس[2] کشف شد. وی برای این کشف، جایزه نوبل شیمی را در سال ۱۹۹۳ دریافت کرد. تکنیک PCR قطعات مشابه یک DNA را تکثیر می‌کند (تکثیر انتخابی قطعات DNA) و به بخش مهمی از جعبه ابزار مهندسی ژنتیک تبدیل شده است که در موقعیت‌های بسیاری، اساساً جای‌گزین روش‌های قدیمی شده است. در این فصل به برخی از تکنیک‌ها و کاربردهای تکنولوژی PCR می‌پردازیم.

۷-۱) تاریخچه PCR

علاوه بر نیاز به حضور یک فرد برای ایجاد یک نگرش جدید، عمده پیشرفت‌های علمی در دانش موجود، تکنیک‌های در دسترس و گاهی کمی شانس بستگی دارد. در زمینه ژنتیک و زیست‌شناسی مولکولی دانشمندان متعددی وجود دارند که در یک مکان معین با یک "تفکر" مناسب، مسأله مهمی را بررسی و به یک کشف اساسی دست یافتند.

گرگور مندل[3]، جیمز واتسون[4] و فرانسیس کریک[5] سه فرد هستند که به واسطهٔ کشفشان نام آنها همیشه در ذهن باقی می‌ماند؛ شایسته است کری مولیس را نیز به این لیست اضافه کنیم. او در سال ۱۹۷۹ به شرکت Cetus مستقر در Emeryville کالیفرنیا پیوست. در این زمان پیش نیازهای مهم توسعه PCR فراهم شده بود. مولیس روی سنتز الیگونوکلئوتیدها[6] کار می‌کرد که در اوایل دهه ۱۹۸۰ این امر یک فرایند خودکار اما تا حدودی خسته کننده بود. از این رو ذهن وی متمایل به بررسی راه‌های دیگر شد. به گفته خود او، وی خود را در کار با الیگونوکلئوتیدها یافت و

[1] Polymerase chain reaction (PCR)
[2] Kary Mullis
[3] Gregor Mendel
[4] James Watson
[5] Francis Crick
[6] Oligonucleotides

محور اصلی کار او تلاش برای تغییر روش توالی‌یابی دای دئوکسی[1] بود. افکار او ناشی از سر و کار داشتن با الیگونوکلئوتیدها، DNA های الگو[2] و DNA پلی مراز[3] بود.

یافته‌های علمی بزرگ به مجموعه‌ای از عوامل مرتبط به هم در زمان مناسب نیاز دارند و کشف واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز یک نمونه مناسب در این خصوص است.

[1] The dideoxy sequencing procedure
[2] DNA templates
[3] DNA polymerase

جدول ۷-۱) برخی از دانشمندانی که در زمینه زیست شناسی سلولی و مولکولی توانستند جایزه نوبل دریافت کنند.

Year	Prize	Recipient(s)	Awarded for studies on
1958	C	Frederick Sanger	Primary structure of proteins
	P/M	Joshua Lederberg	Genetic recombination in bacteria
		George W. Beadle	Gene action
		Edward L. Tatum	
1959	P/M	Arthur Kornberg	Synthesis of DNA and RNA
		Severo Ochoa	
1962	C	John C. Kendrew	3D structure of globular proteins
		Max F. Perutz	
	P/M	Francis H. C. Crick	3D structure of DNA (the double helix)
		James D. Watson	
		Maurice H. F. Wilkins	
1965	P/M	Francois Jacob	Operon theory for bacterial gene expression
		Andre M. Lwoff	
		Jacques L. Monod	
1968	P/M	H. Gobind Khorana	Elucidation of the genetic code and its role in protein synthesis
		Marshall W. Nirenberg	
		Robert W. Holley	
1969	P/M	Max Delbrück	Structure and replication of viruses
		Alfred D. Hershey	
		Salvador E. Luria	
1975	P/M	David Baltimore	Reverse transcriptase and tumour viruses
		Renato Dulbecco	
		Howard M. Temin	
1978	P/M	Werner Arber	Restriction endonucleases
		Daniel Nathans	
		Hamilton O. Smith	
1980	C	Paul Berg	Recombinant DNA technology
		Walter Gilbert	DNA sequencing
		Frederick Sanger	
1982	C	Aaron Klug	Structure of nucleic acid/protein complexes
1984	P/M	George Kohler	Monoclonal antibodies
		César Milstein	
		Niels K. Jerne	Antibody formation
1989	C	Thomas R. Cech	Catalytic RNA
		Sidney Altman	
	P/M	J. Michael Bishop	Genes involved in malignancy
		Harold Varmus	
1993	C	Kary B. Mullis	Polymerase chain reaction
		Michael Smith	Site-directed mutagenesis
	P/M	Richard J. Roberts	Split genes and RNA processing
		Phillip A. Sharp	
1995	P/M	Edward B. Lewis	Genetic control of early embryonic development
		Christiane Nusslein-Volhard	
		Eric F. Wieschaus	

ادامه جدول ۷-۱.

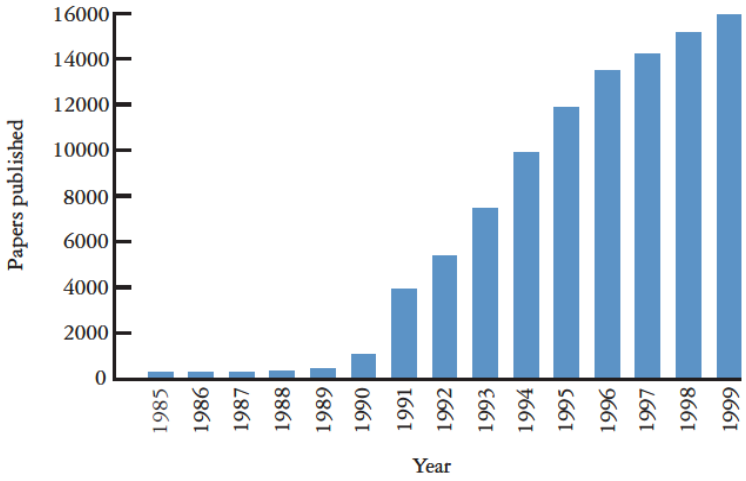
Year	Prize	Recipient(s)	Awarded for studies on
1997	C	Paul D. Boyer John E. Walker	Synthesis of ATP
		Jens C. Skou	Sodium/potassium ATPase
2001	P/M	Leland H. Hartwell R. Timothy Hunt Sir Paul M. Nurse	Key regulators of the cell cycle
2002	P/M	Sydney Brenner H. Robert Horvitz John E. Sulston	Genetic regulation of organ development and programmed cell death
2003	C	Peter Agre Roderick MacKinnon	Channels in cell membranes
2004	C	Aaron Ciechanover Avram Hershko Irwin Rose	Ubiquitin-mediated protein degradation
		Roger D. Kornberg	Molecular basis of eukaryotic transcription
2006	P/M	Andrew Z. Fire Criag C. Mello	RNA interference

نکته: "C" و "P/M" به ترتیب به معنی جایزه نوبل در شیمی و فیزیولوژی یا پزشکی است. همچنین باید توجه داشت که Frederick Sanger جزو برگزیدگان ویژه جایزه نوبل است؛ دو جایزه نوبل به او اهدا شده: یکی برای کار در زمینه پروتئین‌ها (۱۹۵۸) و دیگری جهت توالی یابی DNA (۱۹۹۹). اطلاعات مربوط به برگزیدگان اخیر و سابق جایزه نوبل بر روی پایگاه www.nobelprize.org قابل دسترس است.

آغازگرهای اصلی برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بسیار ساده هستند. در این خصوص از دو آغازگر استفاده می‌شود به طوری‌که هر رشته از DNA به عنوان الگو به‌کار می‌رود. بنابراین تعداد رشته‌های DNA در هر چرخه از PCR دو برابر می‌شوند.

نیمه شب جمعه در ماه آوریل سال ۱۹۸۳، مولیس در حال رانندگی همراه با دوست خود بود و در مورد آزمایشات تغییر روش توالی‌یابی خود فکر می‌کرد. او در واقع در تلاش برای بررسی این موضوع بود که آیا از امتداد آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی توسط DNA پلی مراز می‌توان جهت "حذف" dNTPهای ناخواسته در محلول که در آزمایش دای دئوکسی او اختلال ایجاد می‌کردند، استفاده کرد. وی ناگهان متوجه شد که اگر از دو آغازگر استفاده شود و از آن‌ها برای ایجاد قطعاتی از DNA الگو استفاده کند، توالی مورد نظر به خوبی تکثیر خواهد شد. خوشبختانه او با برنامه‌های کامپیوتری که از توالی‌های تکراری استفاده می‌کنند، آشنا بود و متوجه شد که از تکرار پی در پی واکنش فوق می‌توان نسخه‌های بسیاری از رشتهٔ DNA تولید کرد (هرچند که ارتباطی با آزمایش

خود نداشت!). بررسی سریع این مقادیر نشان داد که افزایش تعداد قطعات به صورت نمایی است (در واقع بصورت 2^n، که در آن n تعداد چرخه است). اکنون PCR کشف شده بود. آزمایشات بعدی نشان داد که این تئوری برای انواع DNA های الگو قابل استفاده است. مولیس کار خود را در نشست علمی سالانه Cetus در بهار ۱۹۸۴ ارائه داد. در مورد کشف PCR وی همانند جوشوا لدلبر نتایج خود را ارائه کرد چرا که به نظر وی او از روشی استفاده کرده بود که برایش آشناتر بود -چرا من به آن فکر نکردم- پذیرش یک کشف که در عین سادگی، درخشان است.



شکل ۷-۱) تعداد مقالات منتشر شده از سال ۱۹۸۵ تا ۱۹۹۹ که از واکنش زنجیره ای پلی مراز استفاده کرده‌اند. این نمودار گسترش سریع استفاده از واکنش PCR را در کارهای تحقیقاتی نشان می‌دهد. از ام. سی.فرسون و مولر (۲۰۰۰)، PCR، Bios.

در طی ۲۰ سال گذشته تکنیک PCR همانند تکنولوژی DNA نوترکیب مورد پذیرش دانشمدان قرار گرفته است. با نگاه به تعداد مقالات منتشر شده علمی که در آن از یک روش خاص استفاده شده می‌توان میزان پذیرش و استفاده از آن روش را بهتر نشان داد. در مورد واکنش PCR این کار در شکل ۷-۱ نشان داده شده است. این افزایش چشمگیر در استفاده از PCR اهمیت آن را تأیید می‌کند که امروزه به‌عنوان یکی از تکنیک‌های مهم برای دست ورزی و تجزیه و تحلیل ژن‌ها محسوب می‌شود.

۷-۲) روش شناسی PCR

همان‌طور که اشاره شد واکنش PCR از منظر تئوری بسیار ساده است. هنگامی‌که به یک DNA دو رشته‌ای حرارت داده شود، رشته‌ها از هم جدا یا اصطلاحاً "ذوب می‌شوند". توالی‌های تک رشته می‌توانند توسط DNA پلی مراز کپی شوند و توالی اصلی DNA به طور مؤثری تکثیر یابد. اگر این فرایند بارها تکرار شود افزایش نمایی در تعداد نسخه از توالی اولیه خواهیم داشت. طول قطعه توسط انتهای '۵ آغازگرها تعیین می‌شود که این اطمینان را به محقق می‌دهد که جمعیت همگنی از مولکول‌های DNA تولید خواهد شد. پس از چرخه‌های نسبتاً کوتاهی، توالی مورد نظر به وفور تکثیر و برای شناسایی و انجام مراحل بعدی وجود خواهد داشت.

۷-۲-۱) ویژگی‌های مهم واکنش PCR

علاوه بر رشته DNA، دو ماده دیگر برای انجام PCR مورد نیاز است. ماده اول، آغازگر مناسب است که در عمل، دو آغازگر هر کدام برای یکی از رشته‌های DNA دو رشته‌ای مورد نیاز هستند. آغازگرها باید در مکان مناسب توالی مورد نظر قرار گیرند، لذا برخی از اطلاعات در مورد توالی رشته برای تکثیر انتخابی مورد نیاز است. آغازگرها به‌صورت الیگونوکلئوتید ساخته شده و به مقدار زیادی به واکنش اضافه می‌شوند به طوری که همیشه پیش از مرحله دناتوراسیون[1] (باز شدن دو رشته) در دسترس هستند. ماده مورد نیاز دوم شکل مناسبی از آنزیم DNA پلی مراز است. اگر چه می‌توان از آنزیم DNA پلی‌مراز معمولی استفاده کرد (همان طور که اوایل برای PCR استفاده می‌شد) اما این آنزیم در مرحله دناتوراسیون توسط حرارت غیر فعال شده و به همین دلیل باید بعد از هر چرخه از فرایند، آنزیم تازه اضافه شود. در دسترس بودن نوع با ثبات آنزیم DNA پلی مراز کار را برای محقق بسیار آسان‌تر می‌کند. این نوع DNA پلی مراز از باکتری گرما دوست *Thermus aquaticus* که در چشمه‌های آب گرم یافت می‌شود، استخراج شده است (پلی‌مراز Taq). استفاده از پلی‌مراز Taq بدان معنی است که روش PCR را می‌توان به صورت خودکار انجام داد. به عنوان مثال هیچ نیازی برای اضافه کردن آنزیم پلی مراز تازه پس از هر مرحله از دناتوراسیون وجود ندارد. علاوه بر DNA، آغازگرها و آنزیم پلی‌مراز، بافر مناسب و در دسترس بودن چهار dNTPs برای اطمینان از تکثیر رشته DNA مورد نیاز است.

موارد مورد نیاز برای PCR شامل DNA الگو، یک جفت آغازگر الیگونوکلئوتیدی مناسب و آنزیم DNA پلی‌مراز هستند.

---

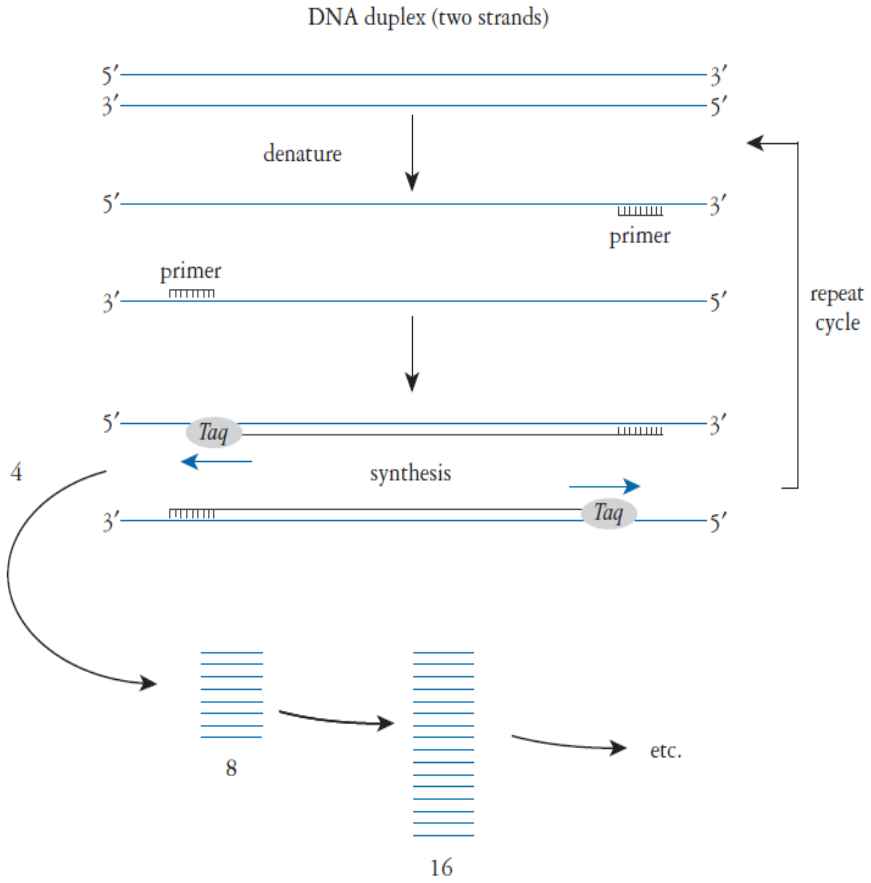
[1] Denaturation

در عمل، PCR فرایندی رو به جلو است. DNA هدف و ترکیبات واکنش معمولاً در ابتدای فرایند با هم مخلوط می‌شوند و تیوپ در حدود ۹۰ درجه حرارت می بیند تا رشته‌های DNA از هم جدا شوند. با کاهش دما آغازگرها به توالی هدف خود روی DNA تک رشته‌ای متصل می‌شوند و پلی-مراز Taq شروع به نسخه‌برداری از رشته‌های الگو می‌کند. این چرخه با یک مرحله دناتوراسیون دیگر تمام می‌شود (و چرخه بعدی آغاز می‌شود). مراحل فرایند فوق در شکل ۷-۲ نشان داده شده است.

چرخه‌های PCR با استفاده از یک سیستم گرم کننده قابل برنامه‌ریزی که بنام حرارت دهنده چرخه‌ای[1] (ترموسایکلر) شناخته می‌شود، به‌صورت خودکار کار می‌کند. این فرایند در تیوب‌های کوچک میکروسانتریفیوژ (پلیت‌های ۹۶ چاهکی یا شیشه‌های موئینه) حاوی مواد واکنش انجام می‌شود. تیوب‌های با دیواره نازک نسبت به تیوب‌ها یا پلیت‌های معمولی امکان تغییرات دمایی سریع‌تری را فراهم می‌کنند. الگوهای متفاوتی از چرخه‌های دمایی مطابق با شرایط خاص آزمایش را می‌توان تنظیم کرد اما به طور کلی چرخه واکنش‌ها که در شکل ۷-۲ نشان داده شده پایه اصلی مرحله تکثیر در فرایند PCR را تشکیل می‌دهد. اگر چه حرارت دهندگان چرخه‌ای وسایل ساده‌ای هستند اما باید کنترل دقیق دما و میزان مشابه از گرمایش و سرمایش تیوب‌ها را در مکان‌های مختلف بلوک حرارتی آن فراهم کرد. دستگاه‌های پیچیده‌تر، دامنه گسترده‌تری از الگوهای کنترلی را فراهم می‌کنند از قبیل نواحی متفاوت گرمایش و سرمایش و سرپوش‌های حرارتی که لوله‌ها را در یک محیط بسته محصور می‌کنند. اگر سرپوش حرارتی مورد استفاده قرار نگیرد، احتمال تبخیر مایع در طی واکنش PCR وجود دارد. اگرچه کاربرد لایه‌ای از مواد معدنی یا روغن سیلیکون روی مواد واکنش می‌تواند از این عمل جلوگیری کند اما گاهی اوقات آلوده بودن محتویات لوله به روغن، خود مشکل ساز است.

واکنش PCR می‌تواند به‌صورت خودکار انجام شود، زیرا یک سری از مراحل تعریف شدهٔ ساده است که چندین مرتبه تکرار شده است.

[1] Thermal cycler



شکل ۷-۲) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR). DNA دو رشته ای توسط حرارت از هم بـاز و دو رشـته از هم جدا می‌شوند. سپس دو آغازگر به توالی مکمل خود روی DNA هدف متصل می‌شوند. آنزیم پلـی‌مـراز Taq (مقاوم به حرارت) برای سنتز رشته مکمل از رشته‌های الگو و آغازگرها استفاده می‌کند. سپس با یـک مرحله دناتوراسیون دیگر، چرخه تکرار می‌شود و این چرخه را می‌توان بارها تکرار کرد. یک پروفایـل دمـایی مناسب بدین صورت است: دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، اتصال آغازگرهـا (annealing) در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و سنتز DNA توسط آنزیم پلی مراز Taq در دمـای ۷۲ درجـه سـانتی گـراد. تعداد رشته‌های سنتز شده بستگی به تعداد رشته‌های الگوی اولیه دارد. اگر در ابتدای واکنش فقط دو رشته الگو داشته باشیم، بعد از چرخه اول ۴ رشته و بعد از دومین چرخه ۸ رشـته و در انتهـای چرخـه سـوم ۱۶ رشته خواهیم داشت و به همین ترتیب تعداد رشته‌ها به صورت نمایی افزایش می‌یابند. در تئوری بعد از ۳۰ چرخه $۵/۴\times۱۰^{۹}$ رشته خواهیم داشت. از این رو می‌توان رشته‌های DNA را به سرعت تکثیر کرد.

نکته نهایی در اجرای PCR شرایط کلی کار با نمونه‌ها است. از آنجایی که این تکنیک برای مقادیر اندک DNA طراحی شده، حتی آلودگی‌های بسیار ناچیز (شاید از یک تیوب در باز در محیط آزمایشگاه و یا از انگشتان در حالتی که از دستکش استفاده نشود) گاهی اوقات سبب مختل شدن آزمایش می‌شود. از این رو محقق هنگام انجام PCR باید در مورد رعایت نظافت سخت‌گیر باشد. همچنین حتی ذرات معلق در هوا که ناشی از پیپت کردن است نیز می‌توانند باعث آلودگی شوند. لذا روش درست انجام کار از اهمیت بالایی برخوردار است. اگر از یک هود استریل یا محفظه جریان دار[1] برای کار با مواد واکنش و از فضای مجزا برای فرایندهای پس از واکنش استفاده شود، بسیار مناسب خواهد بود. همچنین برچسب زدن تیوب‌ها (آغازگرها، DNA های هدف، مخلوط نوکلئوتیدها و غیره) باید با دقت انجام شود و روش‌های کنترل کیفیت خصوصاً در مورد تجزیه و تحلیل‌های پزشکی یا پزشکی قانونی اهمیت زیادی دارند.

از آنجایی که PCR در سنتز نسخه‌های متعدد از توالی DNA بسیار کارآمد است، برای جلوگیری از آلودگی‌های بسیار جزئی نوکلئیک اسید باید دقت بسیار نمود، زیرا امکان تکثیر آن‌ها در طول انجام این واکنش برای تکثیر توالی هدف وجود دارد.

۷-۲-۲) طراحی آغازگرها برای PCR

آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی از شرکت‌های تجاری متعددی در دسترس هستند و در عرض چند روز آماده می‌شوند. در طراحی آغازگر، جنبه‌های متعددی وجود دارند که باید مورد توجه قرار گیرند. شاید واضح‌ترین آن‌ها توالی آغازگر باشد. اطلاعات توالی از کجا حاصل می‌شود؟ ممکن است از اطلاعات توالی آمینواسیدها بدست آید که در این صورت این نکته باید مورد توجه قرار گیرد که ممکن است هر آمینواسید چند کد ژنتیکی داشته باشد، همان طور که در شکل ۷-۳ نشان داده شده است. در اینجا دو دیدگاه مطرح می‌شود. در دیدگاه اول با مخلوطی از نوکلئوتیدها در موقعیت وابل[2] (نوکلئوتید سوم در یک کدون) ترکیبی از یک آغازگر[3] ایجاد می‌شود که توالی صحیح را به عنوان یک بخش کوچک از ترکیب در نظر می‌گیرد. در دیدگاه دوم از نوکلئوتید اینوزین که با تمام نوکلئوتیدهای دیگر به خوبی جفت می‌شود به عنوان نوکلئوتید سوم در کدون‌ها (کدون‌هایی که یک آمینواسید را کد می‌کنند و تفاوت آنها در نوکلئوتید سوم است) استفاده می‌شود.

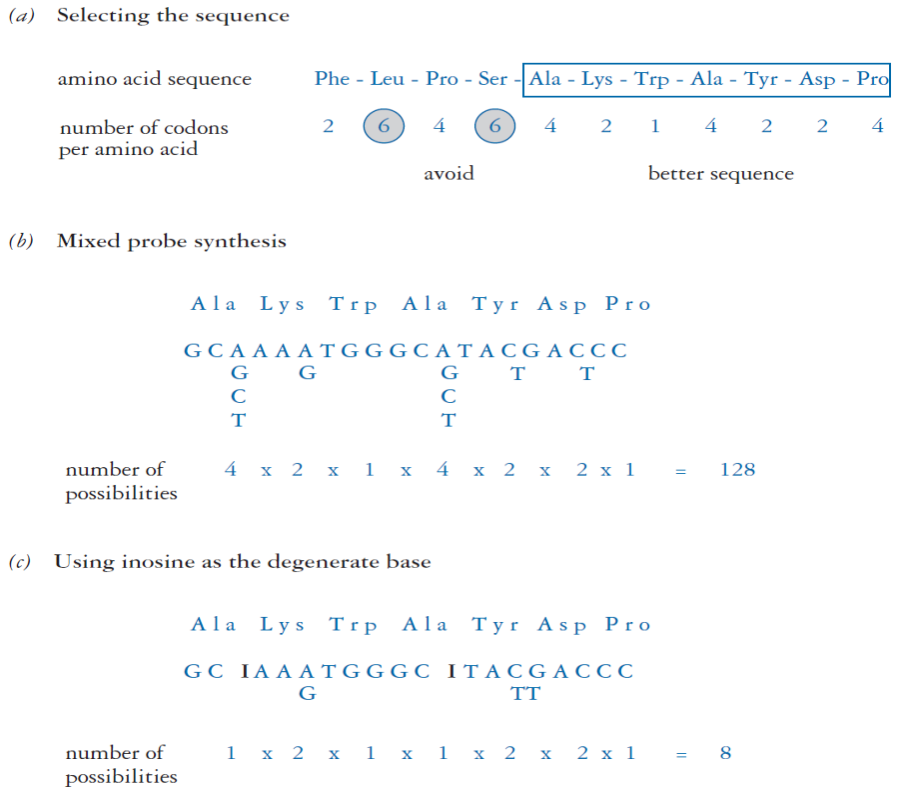
اگر توالی آغازگر از یک DNA که قبلا توالی آن مشخص شده گرفته شود، ممکن است از همان ژن که در موجودات دیگر وجود دارد و یا از DNA همسانه‌سازی شده که در آزمایشات قبلی توالی

[1] Flow cabinet
[2] Wobble
[3] Mixed primer

یابی شده باشد. صرف‌نظر از منبع اطلاعاتی برای توالی آغازگر، یک سری نکات کلیدی وجود دارند که باید مورد توجه قرار گیرند. در این خصوص طول آغازگر از اهمیت زیادی برخوردار است؛ این طول باید به اندازه کافی بلند باشد تا در دمای مورد نیاز با توالی هدف پیوند مستحکمی برقرار کند. اگر چه از محاسبه دمای ذوب[1] می‌توان جهت به‌دست آوردن اطلاعاتی در مورد دماهای اتصال استفاده کرد، اما در اغلب موارد این کار به‌صورت تجربی بهتر انجام می‌شود. همچنین آغازگر باید به اندازه‌ای بلند باشد که مطمئن شویم فقط یک توالی واحد در ژنوم وجود دارد که آغازگر به آن متصل می‌شود. برای بیشتر کاربردها معمولاً آغازگرهایی با طول حدود ۳۰-۲۰ نوکلئوتید مناسب هستند. در توالی آغازگر باید از توالی‌های تکراری و همچنین از توالی‌های تک نوکلئوتیدی اجتناب کرد. مسلماً آغازگرها نباید دارای نواحی مکمل یا نواحی باشند که با توالی دیگر آغازگرها هم پوشانی دارند.

از آنجایی که سنتز DNA از انتهای'۳ آغازگر توسعه می‌یابد، لذا استحکام جفت شدن این ناحیه با توالی هدف بسیار مهم است. اما می‌توان تعدادی نوکلئوتید به انتهای'۵ آغازگر اضافه کرد که اتصال ضعیفی با توالی هدف دارند و از این عمل جهت انجام اعمال خاصی از قبیل افزودن مکان‌های برشی (برای آنزیم‌های محدود الاثر) به انتهای'۵ آغازگر استفاده می‌شود.

[1] Melting temperature



شکل ۷-۳) طراحی آغازگر. در (a) توالی اسیدهای آمینه و تعداد کدون‌ها برای هر اسید آمینه نشان داده شده است. بهتر است از اسیدهای آمینه ۶ کدونی (که با دایره مشخص شده‌اند) اجتناب شود. توالی هایی که با مستطیل مشخص شده است انتخاب می‌شود. در (b) یک کاوشگر که در برگیرنده ترکیب مناسبی از dNTPs های برای هر موقعیت لرزان استفاده شده است. باید توجه داشت که در این مثال از موقعیت لرزان انتهایی که مربوط به پرولین است استفاده نشده، که در این صورت یک الیگو نوکلئوتید با طول ۲۰ باز (یک ۲۰ مر) خواهیم داشت. در مجموع ۱۲۸ توالی محتمل در ترکیب خواهیم داشت. در (c) باز اینوزین (I) در موقعیت لرزان اسیدهای آمینه‌ای که دارای چهار کد هستند، قرار می‌گیرد که در این صورت هشت توالی خواهیم داشت.

در هنگام طراحی آغازگرها برای واکنش PCR به موارد متعددی بایدتوجه شود . اتصال محکم آغازگرها به رشته الگو می‌تواند تأثیر زیادی بر تعداد محصولات PCR در هر تکثیر بگذارد.

۷-۲-۳) DNA پلی مرازها جهت استفاده در PCR

از نظر تئوری هر DNA پلی‌مرازی می‌تواند برای استفاده در PCR مناسب باشد. در ابتدا از قطعه کلینو[1] (یک قطعه از DNA پلی مراز I) در این خصوص استفاده می‌شد اما به‌دلیل عدم پایداری آن در برابر حرارت، برای هر چرخه از فرایند نیاز به افزودن آنزیم تازه بود. این عمل ناکارآمد بود به طوری که محقق می‌بایست در خلال فرایند کنار ماشین حضور داشته باشد و نیز مقدار زیادی آنزیم مورد نیاز بود. همچنین از آنجایی که سنتز DNA در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام می‌شد، آغازگر ممکن بود به نواحی غیر هدف متصل شود و موجب ایجاد مقادیر زیادی از محصولات تکثیر شده غیر اختصاصی شود. با در دسترس قرار گرفتن پلی مراز Taq این مشکلات حل شد. امروزه گستره وسیعی از پلی مرازهای مقاوم به حرارت برای PCR در دسترس هستند که تحت مجوز Hoffman La Roche به فروش می‌رسند (شرکتی که حق قانونی برای استفاده از پلی‌مراز Taq در PCR را به نام خود ثبت کرده است). این‌ها شامل انواعی از پلی مرازهای Taq نوترکیب و به همین ترتیب آنزیم‌هایی از *Thermus flavus* (پلی‌مراز Tfl) و *Thermos thermophilus* (پلی‌مراز Tth) هستند. علاوه بر پلی مرازهای گفته شده، از *Thermus* یک DNA پلی مراز مقاوم به حرارت از *Pyrococcus furiosus* از شرکت Stratagene در دسترس است. این موجود به عنوان یک گرمادوست شدید[2] طبقه بندی می‌شود، که درجه حرارت ۱۰۰ درجه برای رشد آن مطلوب است و در گودال‌های عمیق دریایی یافت شده است.

آنزیم‌های DNA پلی‌مراز مقاوم به حرارت مانند *Taq* پلی‌مراز می‌توانند فرایند واکنش PCR را بدون نیاز به افزودن آنزیم پلی‌مراز تازه بعد از مرحلهٔ دناتوراسیون در هر چرخه، به صورت خودکار تبدیل کنند.

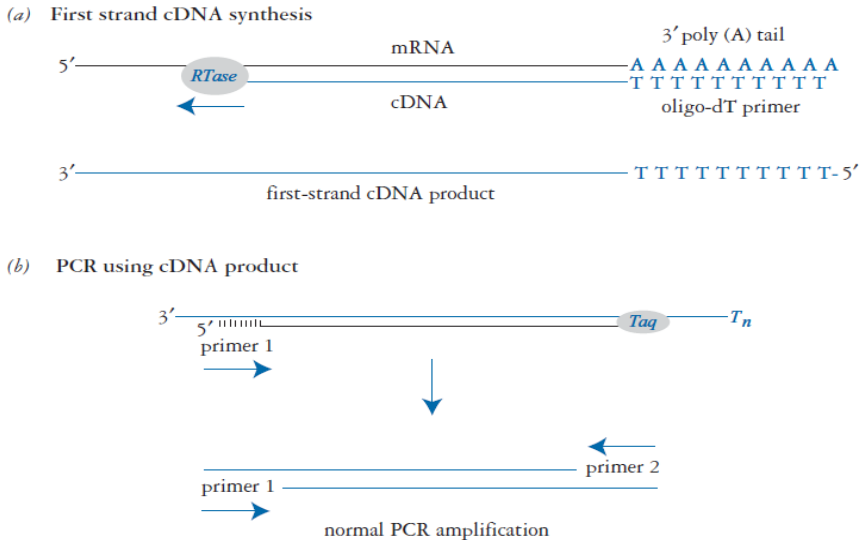
ویژگی‌های کلیدی مورد نیاز برای آنزیم DNA پلی‌مراز عبارتند از: پردازش آنزیم (میزان تمایل آنزیم برای اتصال به رشته الگو، که تعیین کننده تعداد نوکلئوتیدهایی است که قبل از جدا شدن آنزیم به رشته درحال ساخت اضافه شده‌اند)، صحت نوکلئوتیدهای ساخته شده، سرعت سنتز و نیمه عمر آنزیم در دماهای مختلف. از نظر تئوری تفاوت در نحوه عملکرد آنزیم‌های مختلف، انتخاب یک آنزیم پلی‌مراز را سخت می‌کند. در عمل یک منبع خاص انتخاب می‌شود و شرایط به طور تجربی برای بهبود فعالیت آنزیم تنظیم می‌شود.

از مواردی که اشاره شد، شاید مهمترین بخش، قرار دادن نوکلئوتیدها در موقعیت درست است. مسلماً یک آنزیم مستعد خطا، انواع جهش یافته‌ای از توالی هدف را ایجاد خواهد نمود که بیشتر از میزان پایه خطا است، که این مقدار خطا به دلیل ماهیت تکراری چرخه‌های واکنش ایجاد می‌شود.

---

[1] Klenow
[2] Hyperthermophile

از نظر تئوری میزان خطا یک در $۱۰^{۴}$ تکثیر در یک میلیون، موجب ایجاد جهش در حدود یک سوم از محصولات می‌شود. از این رو اغلب در مواردی که خلوص محصول از اهمیت زیادی برخوردار است، تشخیص و اجتناب از این چنین توالی‌های جهش یافته‌ای در مراحل واکنش مورد نیاز است.



شکل ۷-۴) RT-PCR . (a) آنزیم رونوشت بردار معکوس برای سنتز cDNA از mRNA استفاده می‌شود. در این مثال از آغازگر الیگو dT استفاده شده است. (b) cDNA تولید شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن مورد نظر تکثیر می‌شود. چرخه‌های اولیه PCR با نسخه برداری از cDNA، مولکول دو رشته‌ای ایجاد می‌کنند و سپس به طور معمول تکثیر می‌شوند. در کیت‌های فراوانی که برای انجام RT-PCR در دسترس هستند، کل فرایند را می‌توان در یک تیوب انجام داد.

هر اشتباهی که در طی نسخه‌برداری از رشته‌های DNA به‌وجود بیاید می‌تواند به صورت معنی‌دار در چرخه‌های PCR تکثیر شود.

۷-۳) تکنیک‌های پیچیده تر PCR

از زمان به‌وجود آمدن PCR، تغییراتی در روش پایه آن صورت گرفته است. این تغییرات هنوز هم در حال توسعه هستند. مرتباً نیز تکنیک‌ها و کاربردهای جدیدی از PCR گزارش می‌شوند. همان‌طور که در مورد تکنولوژی DNA نوترکیب دیدیم، برای PCR نیز پروتکول‌های بسیاری به

صورت کیت برای کاربردهای معمول و پیشرفته در دسترس هستند. در این بخش به برخی از تغییرات در فرایند پایه PCR می‌پردازیم.

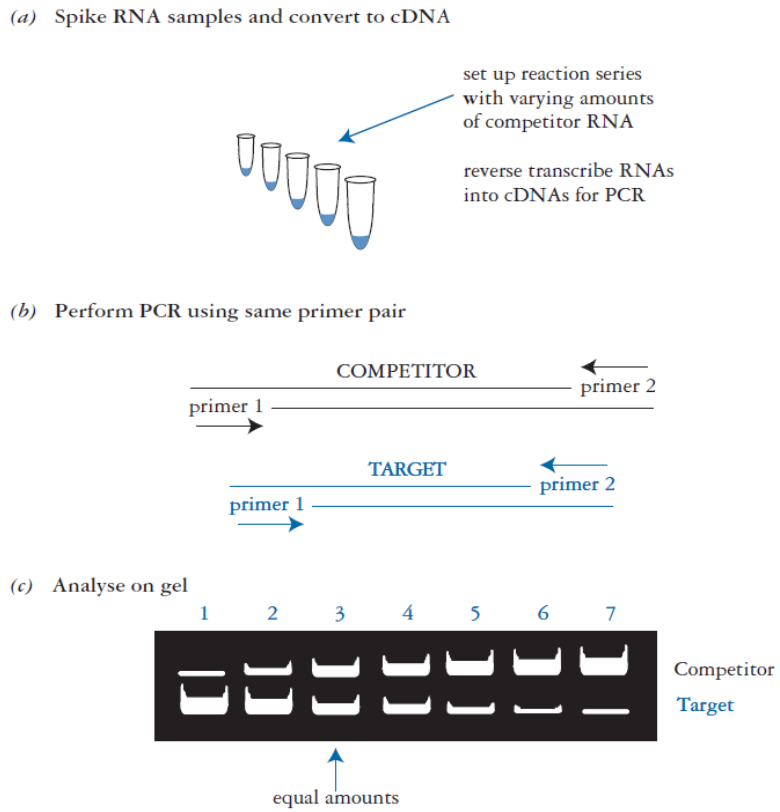
۷-۳-۱) PCR با استفاده از الگوهای mRNA

استفاده از mRNA به‌عنوان الگو یک نوع معمول از PCR است، که با نام PCR معکوس[1] (RT-PCR) شناخته می‌شود. این تکنیک در تشخیص سطوح پایین بیان ژن از طریق آنالیز محصولات PCR که در واقع cDNA حاصل از mRNA های رونویسی شده‌اند ، مفید است. از نظر تئوری یک مولکول mRNA تک رشته‌ای قابلیت تکثیر دارد، ولی در عمل این کار دور از انتظار است. این فرایند با نسخه برداری mRNA توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس و سنتز cDNA آغاز می‌شود. در اغلب موارد برای سنتز cDNA تک رشته‌ای از آغازگر الیگو dT استفاده می‌شود. اگرچه بعد از آن از آغازگرهای معمول PCR استفاده می‌شود اما چند چرخه اول متمایل به نسخه برداری از cDNA تک رشته‌ای هستند تا اینکه cDNA دو رشته‌ای کافی برای تکثیر نمایی به واسطه هر دو آغازگر حاصل شود. اما این امر هیچ اثر سوئی روی نتیجه فرایند ندارد. نمایی از مراحل RT-PCR در شکل ۷-۴ مشاهده می‌شود.

یکی از موارد کاربرد RT-PCR، تشخیص میزان mRNA در یک نمونه است (RT-PCR از نمونه شاهد استاندارد). یک میزان مشخص از RNA شاهد استاندارد به سری واکنش‌ها اضافه می‌شود و mRNA هدف و RNA شاهد استاندارد توسط آغازگرهای یکسانی تکثیر می‌شوند. اگر محصولات mRNA هدف و نمونه شاهد استاندارد اندازه متفاوتی داشته باشند، روی ژل از هم جدا شده و میزان mRNA هدف بر اساس نمونه استاندارد تخمین زده می‌شود، وقتی قطر باندهای تشکیل شده mRNA هدف و RNA استاندارد روی ژل یکسان باشند، تعداد توالی mRNA اصلی با تعداد توالی RNA نمونه استاندارد برابر خواهد بود. این فرایند در شکل ۷-۵ مشاهده می‌شود.

انواع پروتکل‌های PCR وجود دارند، یکی از مهم‌ترین آن‌ها روش RT-PCR برای تکثیر cDNA مشتق شده از mRNA است.

[1] Reverse Transcriptase PCR



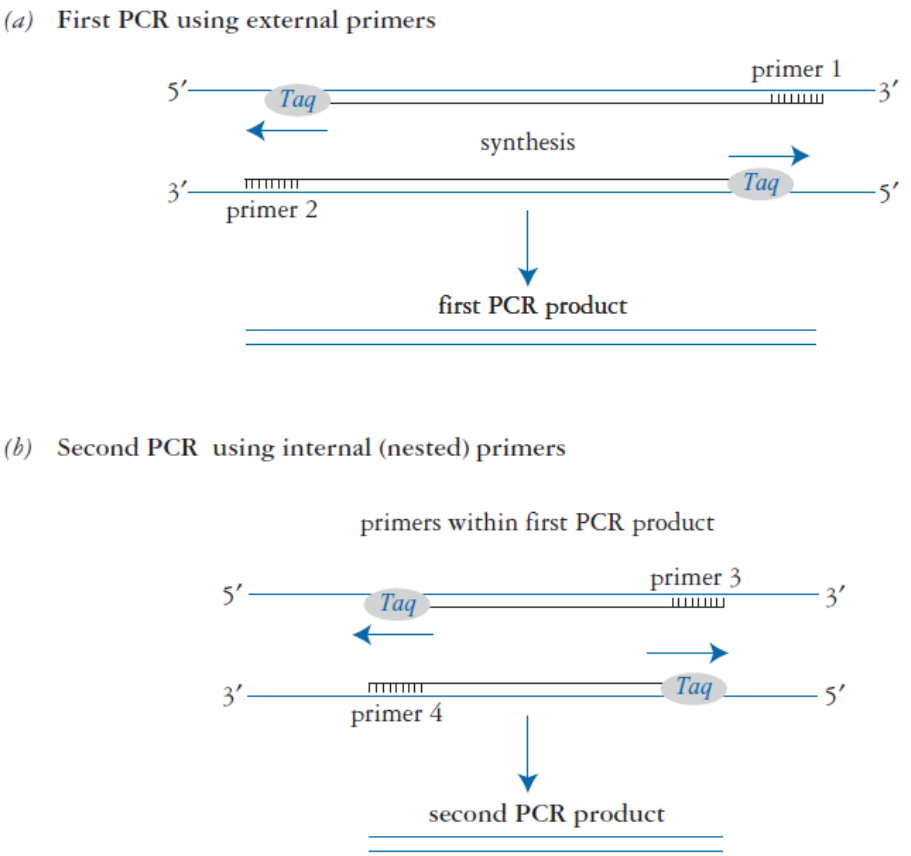
شکل ۷-۵) RT-PCR مقایسه‌ای. (a) یک سری از نمونه‌های mRNA هدف با مقادیر افزایشی از یک RNA استاندارد که محصول PCR با اندازه متفاوتی در مقایسه با mRNA هدف ایجاد می‌کند مخلوط می‌شوند. (b) RNA نمونه استاندارد و mRNA هدف برای استفاده از آغازگرها و دیگر عناصر موجود در واکنش PCR با یکدیگر رقابت می‌کنند. (c) بعد از آنالیز نمونه‌ها روی ژل الکتروفورز، محصولات حاصل از واکنش PCR را می‌توان بر اساس اندازه تفکیک نمود. در این مثال شدت مساوی باند در چاهک ردیف سوم مشاهده می‌شود که ما را قادر می‌سازد تا میزان mRNA مورد نظر در نمونه اولیه را تخمین بزنیم. در این مرحله مقدار RNA نمونه استاندارد و mRNA هدف در ابتدای واکنش PCR برابر بوده است.

۷-۳-۲) PCR تو در تو (آشیانه‌ای[1])

PCR آشیانه‌ای روشی مفید برای گریز از برخی مشکلات مربوط به تعداد زیاد چرخه‌های PCR که سنتز همراه با خطا را به دنبال دارند محسوب می‌شود. این تکنیک اساساً حساسیت ، دقت و

[1] Nested PCR

پایداری پروتکل پایه PCR را افزایش می‌دهد. در این روش از دو دسته آغازگر استفاده می‌شود. دسته اول (دسته خارجی) محصول معمول PCR را تولید می‌کنند. سپس آغازگرهایی که در ناحیهٔ درونی دسته اول هستند برای واکنش بعدی PCR مورد استفاده قرار می‌گیرند. این آغازگرهای درونی یا آشیانه‌ای همان‌طور که در شکل ۷-۶ مشاهده می‌شود، محصول کوچک‌تری را تولید می‌کنند.

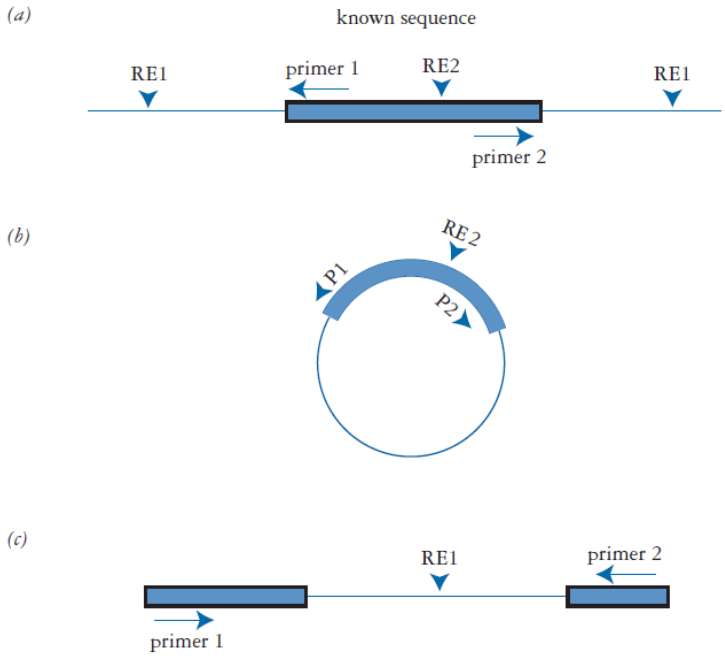


شکل ۷-۶) PCR آشیانه‌ای. (a) یک PCR معمولی برای تکثیر یک قطعه با استفاده از یک جفت آغازگر. (b) در PCR بعدی یک دسته آغازگر که از نظر توالی در قسمت داخلی آغازگرهای قبل قرار دارند، جهت تولید یک قطعه کوچک‌تر استفاده می‌شوند. از PCR آشیانه‌ای برای افزایش دقت و پایداری فرایند PCR استفاده می‌شود.

۷-۳-۳) PCR معکوس

اغلب محدوده‌ای از توالی DNA شناخته شده است، ولی توالی هدف در خارج از ناحیه شناخته شده قرار دارد. در چنین مواردی طراحی آغازگر مشکل می‌شود، چرا که ممکن است هیچ راهی جهت تعیین توالی یک آغازگر مناسب برای ناحیه نامشخص وجود داشته باشد. PCR معکوس[1] (IPCR) شامل جداسازی یک قطعه برشی که شامل توالی شناخته شده به همراه توالی‌های نواحی مرزی قسمت ناشناخته است می‌باشد. توسط حلقوی کردن این قطعه و سپس برش قسمت داخلی توالی شناخته شده، قطعه فوق به‌طور مفیدی وارونه می‌شود. سپس آغازگرها را می‌توان با استفاده از اطلاعات توالی‌های مشخص سنتز کرد و برای تکثیر قطعه مورد نظر به کار برد که محصول حاصله شامل نواحی کناری نیز خواهد بود. آغازگرهایی که در خلاف جهت یکدیگر هستند (با توجه به مسیر سنتز محصول) در توالی شناخته شده مورد نیاز هستند که در ساختار حلقوی در جهت صحیح قرار می‌گیرند. از این روش نیز همراه با آغازگرهای مربوطه می‌توان برای PCR آشیانه‌ای استفاده کرد. رمزگشایی از نتایج معمولاً به تعیین نواحیDNA مورد نظر نیاز دارد. توضیحی از IPCR در شکل ۷-۷ نشان داده شده است.

[1] Inverse PCR



شکل ۷-۷) PCR معکوس. (a) یک ناحیه از DNA که قسمتی از توالی آن شناخته شده است (حاشور زده). اگر توالی مورد نظر بیرون از توالی شناخته شده باشد می‌توان جهت تکثیر این قطعات کناری از PCR معکوس استفاده نمود. آغازگرهایی انتخاب شده به توالی شناخته شده در خلاف جهت یکدیگر متصل می‌شوند. مکان‌های برشی با RE1 و RE2 نشان داده شده‌اند. اگر از RE1 برای برش DNA استفاده شود، قطعه حاصله می‌تواند بصورت حلقوی همان طور که در (b) مشاهده می‌شود. اگر این ساختار توسط RE2 برش داده شود، قطعه حاصله به صورت خطی بوده و دارای توالی ناشناخته در وسط دو توالی شناخته شده در دو طرف خود خواهد بود. باید توجه داشت که ناحیه ناشناخته پیوسته نیست و از دو ناحیه کناری که در RE1 به هم متصل شده‌اند تشکیل شده است. لذا محصول PCR شامل این دو ناحیه به همراه توالی شناخته شده خواهد بود.

۷-۳-۴) RAPD و چند کلمهٔ اختصاری دیگر

به‌طور طبیعی هدف از PCR تولید قطعات معین توسط آغازگرهای کاملاً اختصاصی است. با وجود این روش‌هایی نیز بر مبنای اتصال ضعیف آغازگرها وجود دارند. عمومی‌ترین آنها روش RAPD-PCR است. این اسم از اصطلاح PCR برای ایجاد چند شکلی حاصل از تکثیر تصادفی DNA[1]

[1] Random Amplified Polymorphic DNA PCR

گرفته شده است. این روش همچنین با نام PCR با شروع دلخواهانه[1] (AP-PCR) نیز شناخته می‌شود. این تکنیک یک روش مفید برای تشخیص پروفایل ژنوم است، در آن از یک آغازگر با اتصالات ضعیف استفاده می‌شود. این آغازگر به مکان‌های زیادی در ژنوم متصل می‌شود و قطعات از این محل‌ها تکثیر می‌شوند. قدرت اتصال آغازگر بعد از چند چرخه افزایش می‌یابد، به این معنی که فقط "بهترین اشتباهات" به طور کامل تکثیر می‌شوند. با طراحی دقیق پروتکل فوق می‌توان الگوهای باندی مختص به ژنوم ایجاد کرد که برای تجزیه و تحلیل‌های مقایسه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگرچه مشکلاتی در ارتباط با تکرار پذیری این روش وجود دارد، به طور مثال به دست آوردن سطوح مشابه از باندها در آزمایشات مختلف دشوار است. این مشکلات کاملاً به اتصال ناجور آغازگرها بستگی دارد که پایه این روش محسوب می‌شوند.

پروتکل‌های زیاد و متنوعی از PCR وجود دارند که با نام‌های اختصاری مختلف نشان داده می‌شوند. بعضی از آنها در جدول ۷-۲ فهرست شده‌اند. در کتاب حاضر این روش‌ها بحث نمی‌شوند. خواننده جهت اطلاعات بیشتر در مورد روش‌ها و کاربردهای جدید و پیچیدهٔ PCR به نوشته‌های مربوطه ارجاع داده می‌شود.

اگرچه صحت بالای نسخه‌برداری معمولاً نتیجهٔ مورد انتظار از یک واکنش PCR است، اما روش‌هایی مانند RAPD وجود دارند که دقت پایین اتصال آغازگرها می‌توانند یک پروفایل (ایجاد قطعات تکثیر شده متعدد) تولید کنند.

[1] Arbitrarily Primed PCR

جدول ۷-۲) برخی از انواع روش‌های PCR

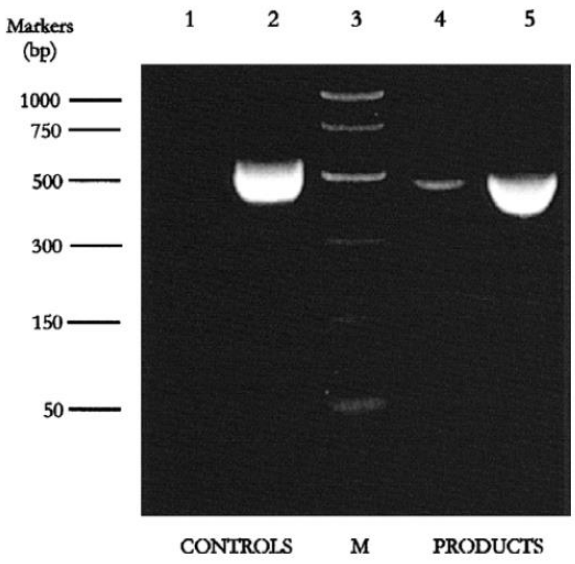
Acronym	Technique name	Application
RT-PCR	Reverse transcriptase PCR	PCR from mRNA templates
IPCR	Inverse PCR	PCR of sequences lying outside primer binding sites
RAPD-PCR	Random amplified polymorphic DNA PCR	Genomic fingerprinting under low-stringency conditions
AP-PCR	Arbitrarily primed PCR	As RAPD-PCR
TAIL-PCR	Thermal asymmetric interlaced PCR	PCR using alternating high/low primer binding stringency with arbitrary and sequence-specific primers
mrPCR	Multiplex restriction site PCR	PCR using primers with restriction site recognition sequences at their 3′ ends
AFLP	Amplified fragment length polymorphism	Genome analysis by PCR of restriction digests of genomic DNA
CAPS	Cleaved amplified polymorphic sequence analysis	Genome analysis for single nucleotide polymorphisms (SNPs) by PCR and restriction enzyme digestion
GAWTS	Gene amplification with transcript sequencing	PCR coupled with transcript synthesis and sequencing using reverse transcriptase
RAWTS	RNA amplification with transcript sequencing	Variant of GAWTS using mRNA templates
RACE	Rapid amplification of cDNA ends	Isolation of cDNAs from low-abundance mRNAs

اگر محصولات تکثیر یک PCR باید همسانه‌سازی شوند، وکتورها و فرایندهای ویژه‌ای در دسترس هستند که اطمینان می‌دهند کارایی بالای همسانه‌سازی به دست بیاید.

۷-۴) پردازش محصولات PCR

به محض اتمام فرایند PCR می‌توان قطعات تکثیر شده DNA را (که اغلب آمپلیکون نامیده می‌شوند) بررسی کرد. ژل الکتروفورز محصولات PCR معمولاً اولین مرحله در بسیاری از فرایندها است. با این روش می‌توان اندازه قطعه را تعیین کرد و نیز برخی اطلاعات را در مورد خلوص و همگنی آن به دست آورد. نتیجه یک PCR معمولی در شکل ۷-۸ مشاهده می‌شود. سرنوشت محصولات PCR به آزمایش بستگی دارد. اغلب ظهور ساده محصول روی یک ژل الکتروفورز، با تأیید طول توالی آن کافی است. ممکن است علاوه بر آن از تکنیک‌های لکه گذاری (بلاتینگ)[1] و هیبریداسیون[2] برای تشخیص توالی‌های خاص استفاده کرد. شاید لازم باشد محصول PCR در یک وکتور بیانی همسانه‌سازی شود که در این صورت می‌توان از وکتورهای خاصی استفاده کرد. در یک نوع، برای وارد کردن یک رشته تکثیر شده به وکتور باید یک نوکلئوتید به انتهای رشته مورد نظر اضافه کرد. در دیگر وکتورهای همسانه کننده، از انتهای صاف برای تسهیل کردن همسانه‌سازی، استفاده می کنند. در این مورد معمولاً جهت اطمینان از عملکرد بالای روش، دو انتهای آمپلیکون-ها پر شده یا پیرایش می‌شوند. اغلب برای اطمینان از اینکه توالی مورد نظر به طور دقیق همسانه‌سازی شده است، توالی یابی DNA برای محصولات PCR انجام می‌شود. این کار به‌ویژه زمانی اهمیت دارد که میزان خطای بالقوه بالا باشد (به بخش ۷-۲-۳ مراجعه شود).

[1] Blotting
[2] Hybridisation



شکل ۷-۸) مشاهده محصولات PCR برای آنزیم ارنیتین دکربوکسیلاز روی یک ژل آگارز. خط ۱، شاهد منفی (بدون DNA)؛ خط ۲، شاهد مثبت (قطعه همسانه‌سازی شده ارنیتین دکربوکسیلاز، bp ۴۶۰)؛ خط ۳، مارکر؛ خط ۴ و ۵ محصول PCR برای DNA جگر موش با استفاده از آغازگرهای مربوط به ارنیتین دکربوکسیلاز. خط ۴ محصول PCR بعد از ۱۵ چرخه و خط ۵ بعد از ۳۰ چرخه را نشان می دهد. عکس از Drs F. McKenzie و E. Kelso .

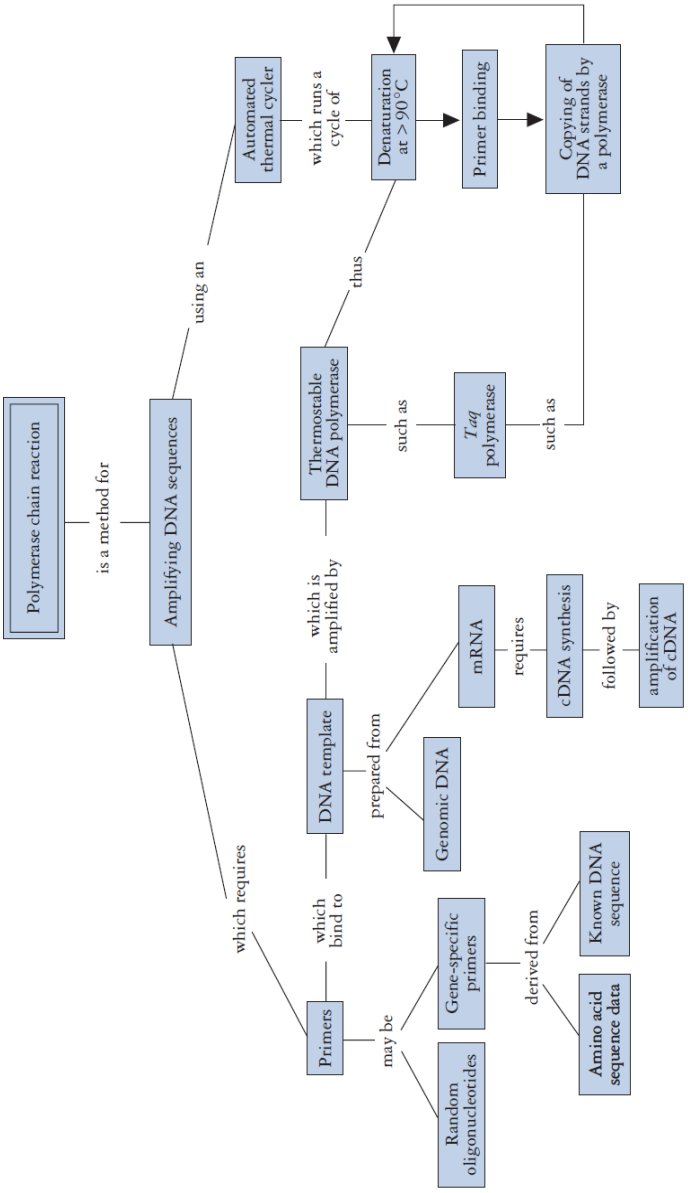
۷-۵) کاربردهای PCR

این فصل با جمله نسبتاً صریح «تنها یک کشف علمی ممکن است مسیر پیشرفت یک موضوع را کاملاً دگرگون کند» آغاز شد. مسلماً این جمله در مورد PCR و پیچیدگی‌های آن صدق می‌کند. کاربردهای تکنولوژی PCR متعدد و گوناگون هستند و مرتباً نیز روش‌های جدیدی در این زمینه ایجاد می‌شوند. گاهی اوقات این روش‌ها شامل ایجاد انواع پیچیده‌تر تکنولوژی PCR هستند که کاربردهای زیادی دارند. در موارد دیگر ممکن است یک روش موجود در یک راه جدید یا در مورد یک موجود که جزئیات آن مطالعه نشده به کار برده شود.

برنامه‌های مختلفی برای انجام روش PCR وجود دارند که از نظر کلی تأثیر زیادی در زیست شناسی مولکولی به ویژه در فناوری DNA نوترکیب دارند.

همان طور که می‌توان برای تولید مواد کافی جهت دست ورزی‌های بعدی، از PCR استفاده کرد، می‌توان برای همسانه‌سازی کردن توالی‌های خاص نیز از آن استفاده کرد (اگرچه در بسیاری از موارد در واقع لزومی برای انجام این کار توسط PCR وجود ندارد). همچنین از PCR می‌توان

جهت همسانه‌سازی نمودن ژن‌های یک موجود با استفاده از آغازگرهایی بر مبنای تـوالی همـان ژن در موجودات دیگر استفاده کرد. استفاده دیگر از فرایند PCR در کاربردهای قانونی و تشخیصی، از قبیل آزمایش Body fluid stains، یا تشخیص اختلالات ژنتیکی قبل از تولد اسـت. ایـن مـوارد مخصوصاً در مفهوم گسترده‌تر کاربردهای تکنولوژی ژن اهمیت دارند و در قسمت ۳ بحث خواهنـد شد.



نقشهٔ مفهومی فصل هفتم

فصل هشتم: گزینش، غربال و آنالیز نوترکیب‌ها

خلاصهٔ فصل

اهداف

* تعریف اصطلاحات انتخاب و غربالگری بر مبنای آنالیز همسانه؛
* توصیف مجموعه‌ای از روش‌های انتخاب و غربالگری؛
* نحوهٔ استفاده از کاوشگرهای نوکلئیک اسیدی برای غربالگری از بانک‌های همسانه؛
* بررسی روش‌های مورد استفاده برای آنالیز قطعات DNA همسانه‌سازی شده.

خلاصهٔ فصل/ نتایج آموزنده

بعد از خواندن این فصل به اطلاعات زیر دست خواهید یافت:

* تعریف اصطلاحات انتخاب و غربالگری؛
* روش‌های انتخاب همسانه‌های حامل DNA مورد نظر؛
* روش‌های قابل دسترس برای غربالگری همسانه‌ها؛
* استفاده از سوبستراهای رنگ زا در روش‌های غربالگری؛
* غربالگری با استفاده از هیبریداسیون اسیدهای نوکلئیک؛
* استفاده از PCR در روش‌های غربالگری؛
* غربالگری ایمونولوژیکی برای ژن‌های بیان شده؛
* بررسی قطعات DNA همسانه‌سازی شده با استفاده از روش‌های هیبریداسیون mRNA؛
* روش‌های نقطه گذاری ساترن، نورترن و وسترن؛
* توالی‌یابی DNA برای بررسی همسانه‌ها.

لغات کلیدی

انتخاب، غربالگری، پلیت میکروتیتر، آنتی‌بیوتیک، pBR322، آمپی‌سیلین، تتراسایکلین، سوبستراهای رنگ‌زا، X-gal، بتا-گالاکتوزیداز، IPTG، ژن *lacZ*، آلفا پپتید، غیر فعال‌سازی ناشی از الحاق یک ژن، مورفولوژی پلاک، ژن cI λ، رسپتور cI، مکمل‌سازی، مواد جهش‌زا، آکسوتروف، هیبریداسیون، کاوشگر، هموژی، هموگ، هترولوگ، غربالگری با روش plus/minus، گام کروموزومی، پرش کروموزومی، *in silico*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، غربالگری ایمونولوژیکی، آنتی ژن، آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال، آنتی‌بادی‌های منوکلونال، ترجمه به صورت hybrid-arrest، ترجمه به صورت hybrid-release، ترجمه به صورت hybrid-select، الکترفورز ژل پلی آکریل آمید SDS، نقشه بر اساس آنزیم‌های برشی، ساترن بلات، نورترن بلات، دات بلات، اسلات بلات، وسترن بلات، توالی‌یابی DNA.

موفقیت در هر آزمایش کلون سازی، به توانایی ما در شناسایی توالی ژن مطلوب از بین تعداد زیاد نوترکیب‌های مختلف، بستگی دارد. با فرض اینکه یک کتابخانهٔ ژنی بزرگ ممکن است شامل بیش از یک میلیون توالی کلون شده باشد، که با روش‌های سادهٔ آنالیزی به راحتی قابل تشخیص از یکدیگر نیستند، پرواضح است که شناسایی ژن هدف به طور بالقوه دشوارترین بخش از فرایند همسانه‌سازی است. خوشبختانه چندین روش گزینش / شناسایی وجود دارد که جهت غلبه بر مشکلات مورد استفاده قرار می‌گیرند.

در این فصل تکنیک‌های متفاوتی برای شناسایی ژن‌های همسانه‌سازی شده شرح داده خواهند شد. با استفاده از چند مثال، اصول شناسایی و ارزیابی ویژگی‌های یک ژن تشریح می‌شود. همان طور که در فصول قبلی گفته شد، روش‌هایی وجود دارند که در پیشرفت این فناوری نقش مهمی داشته‌اند، اما امروزه کاربرد چندانی ندارند.

پیش از ورود به مبحث اصلی نیاز به تعریف دو اصطلاح انتخاب[1] و غربالگری[2] است: انتخاب عبارت از اعمال بعضی تیمارها (به عنوان مثال حضور یک آنتی‌بیوتیک) که در طول دورهٔ رشد بر سلول های حامل DNA نوترکیب انجام می‌شود. سلول‌های دارای ویژگی‌های مطلوب، زنده می مانند و لذا گزینش می‌شوند. این رویکرد در پیچیدگی، از انتخاب ساده بر اساس حضور وکتور تا انتخاب مستقیم ژن‌های همسانه‌سازی شده با انجام آزمون تکمیلی جهش‌یافته‌های معین، متغیر است. غربالگری، روشی است که بر مبنای آن جمعیتی از سلول‌های زنده‌بر مبنای آنالیزهای متعدد، توالی‌های مورد نظر شناسایی می‌شوند. باتوجه به اینکه تنها تعداد محدودی از کلونی‌های باکتریایی یا پلاک‌های باکتریوفاژی که دارای توالی DNA مورد نظر هستند غربال می‌شوند، لذا انجام غربالگری مستلزم روش‌هایی است که از حساسیت بالایی برخوردار بوده و اختصاصی می باشند. اگر روش کار با دقت طراحی شود عملا هر دو روش انتخاب و غربالگری می‌تواند به‌صورت هم‌زمان برای دقت کار در آزمایش مورد استفاده قرار گیرند.

شناسایی یک همسانه شامل انجام یک سری از مکانیسم‌های انتخاب (به عنوان مثال استفاده از آنتی‌بیوتیک و یا بتا-گالاکتوزیداز) و یا غربالگری همسانه‌ها با استفاده از یک کاوشگر خاص (مانند یک cDNA یا یک الیگونوکلئوتید رادیونشاندار) است.

در سال‌های اخیر اتوماسیون روش‌های مختلف دست‌ورزی ژن به‌ویژه در گروه‌های بزرگ تحقیقاتی و شرکت‌های بیوتکنولوژی، گسترش یافته است. با توجه به اینکه در آزمایشگاه‌های کوچک تعداد محدودی از پروژه‌های تحقیقاتی در مراحل مختلف اجرا هستند، ممکن است نیازی به تجهیزات

---

1. Selection
2. Screening

آزمایشگاهی پیشرفته به اندازه کمپانی‌های بزرگ تجاری نداشته باشند. سیستم های هوش مصنوعی می‌تواند جهت انجام بسیاری از وظایف عادی و روتین، مثلاً در پلیت‌های میکروتیتر حاوی ۹۶ چاهک[1] مورد استفاده قرار گیرد. در بعضی موارد پیشرفت‌های تکنولوژیکی در تهیهٔ نمونه، پردازش و دست‌ورزی نشان می‌دهند که با تعداد زیادی همسانه می‌توان بسیار ساده‌تر از چند سال قبل کار کرد و آنها را دستکاری نمود. امروزه تعداد زیادی پروتکل ایجاد شده‌اند که به طور اختصاصی بر پایهٔ روش‌های اتوماتیک گسترش یافته‌اند.

۸-۱) روش‌های گزینش و غربالگری ژنتیکی

روش‌های گزینش و غربالگری ژنتیکی بر مبنای بیان (یا عدم بیان) صفات خاصی استوار است. اگر یک روش غربالگری مستقیم استفاده شود، معمولاً این صفات توسط وکتور یا احتمالا توسط توالی همسانه‌سازی شده کد می‌شوند.

یکی از ساده‌ترین روش‌های گزینش ژنتیکی، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها جهت تشخیص حضور مولکول‌های وکتور است. به‌عنوان مثال پلاسمید pBR322 حاوی ژن‌های مقاومت به آمپی‌سیلین (Ap^r) و تتراسایکلین (Tc^r) است. لذا حضور این پلاسمید در سلول، با کشت ترانسفورمانت‌ها روی محیط کشت آگاری که حاوی هیچکدام یا هر دوی این آنتی‌بیوتیک‌ها است، قابل تشخیص می باشد. فقط سلول‌هایی که پلاسمید را جذب کرده‌اند مقاوم بوده و لذا فقط این سلول‌ها در حضور آنتی‌بیوتیک‌ها رشد می‌کنند. این تکنیک می‌تواند در تشخیص سلول‌هایی از پستانداران که حاوی وکتورهایی با مارکرهای گزینشی‌اند، مورد استفاده قرار گیرد.

ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک به عنوان ابزاری ساده و قابل اطمینان برای انتخاب سلول‌های حاوی وکتور مورد استفاده قرار می‌گیرند.

روش‌های انتخاب ژنتیکی بسته به خصوصیات ترکیب قطعه وارد شده یا وکتور و نوع سلول میزبان ممکن است ساده و یا پیچیده باشند. این قبیل روش‌ها بسیار کارآمد بوده و جهت اهداف متنوع، تکنیک‌های گزینش و غربال ژنتیکی مختلفی وجود دارند. بعضی از آن‌ها در ادامه توضیح داده شده‌اند.

۸-۱-۱) استفاده از سوبستراهای رنگ‌زا[2]

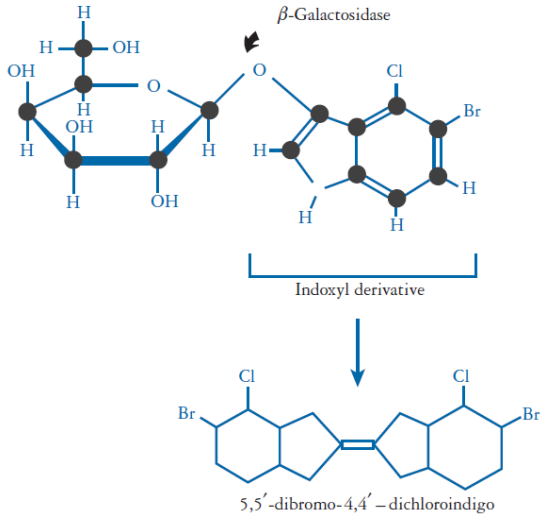
استفاده از سوبستراهای رنگ‌زا در روش‌های گزینش ژنتیکی یکی از جنبه‌های مهم در پیشرفت این فناوری بوده است. رایج‌ترین سیستمی که در این خصوص کاربرد دارد، ترکیب X-gal

[1] 96-well microtitre plates
[2] Chromogenic

(۵-برومو-۴-کلرو-۳-ایندول-بتا-دی-گالاکتوپیرانوزاید[1]) است که یک سوبسترای بی رنگ برای آنزیم بتا گالاکتوزیداز[2] می‌باشد. این آنزیم به‌صورت نرمال زمانی که لاکتوز در دسترس است، در باکتری *E.coli* سنتز می‌شود. یک آنالوگ لاکتوز مثل IPTG (*iso*-propyl-thiogalactoside) نیز موجب القاء بیان این آنزیم می‌شود. این امر یک مزیت است، که این ماده بدون اینکه سوبسترای آنزیم بتا گالاکتوزیداز باشد، موجب القاء آن می‌شود. در اثر شکستن ترکیب X-gal بوسیلهٔ آنزیم بتا گالاکتوزیداز یک ترکیب آبی رنگ تولید می‌شود، لذا بیان ژن *lacZ* (بتا گالاکتوزیداز) به راحتی قابل تشخیص است (شکل ۸-۱). این روش را می‌توان هم به عنوان یک روش غربالگری جهت تشخیص سلول‌ها و پلاک‌ها و هم به عنوان یک سیستم جهت ردیابی بیان ژن همسانه‌سازی شده در بافت‌های اختصاصی ترانسژن مورد استفاده قرار داد. سیستم شناسایی X-gal در هر سیستم (وکتور/میزبان) که ژن فعال بتا گالاکتوزیداز را دارا باشد، به دو روش قابل استفاده است.

غربالگری با استفاده از بتا-گالاکتوزیداز/X-gal یک روش رایج در شناسایی قطعات DNA همسانه‌سازی شده بر مبنای ایجاد دو رنگ آبی/سفید است.

1. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
2. β-galactosidase



شکل ۸-۱) ساختمان X-gal و شکست آن توسط بتا گالاکتوزیداز. ترکیب بی رنگ X-gal (5- bromo-4-chloro-3-indolyl-β-Dgalactopyranoside) توسط بتا گالاکتوزیداز به گالاکتوز و یک مشتق ایندوکسیل شکسته می‌شود. این ترکیب در هوا اکسید شده و تولید دی برومو-دی کلرو آبی رنگ را می‌کند.

نخست، یک ژن بتا گالاکتوزیداز ممکن است در وکتور موجود باشد، همچنان که در مورد وکتور λ Charon 16A (شکل ۵-۸ را ببینید) دیده می‌شود. سلول‌های میزبان که فاقد ژن *lacZ* (Lac$^-$) هستند برای تکثیر فاژ مورد استفاده قرار می‌گیرند، لذا فنوتیپ Lac$^+$ فقط زمانی ظاهر خواهد شد که وکتور وجود داشته باشد. روش دوم، به کارگیری سیستم α-complementation است که در آن فقط بخشی از ژن *lacZ* بوسیلهٔ وکتور حمل می‌شود (کدگذاری یک پپتید به نام پپتید آلفا). بخش باقیمانده از توالی ژن توسط سلول میزبان حمل می‌شود. ناحیهٔ کد کنندهٔ زیر واحد کوچک پپتید آلفا *lacZ*′ نامیده می‌شود. بنابراین سلول‌های میزبان *lacZ*′$^-$ نامیده می‌شوند. کلونی‌ها و پلاک‌های آبی رنگ فقط زمانی تولید می‌شوند که محصول قطعات میزبان و وکتور برای تولید بتا گالاکتوزیداز فعال با هم ترکیب شوند.

آلفا پپتید مربوط به ژن بتا-گالاکتوزیداز می‌تواند در شکل پیچیده تری به منظور انجام آزمون تکمیلی در یک وکتور با سیستم رنگی آبی/ سفید استفاده شود.

۸-۱-۲) غیرفعال‌سازی ناشی از ورود قطعه الحاق شده

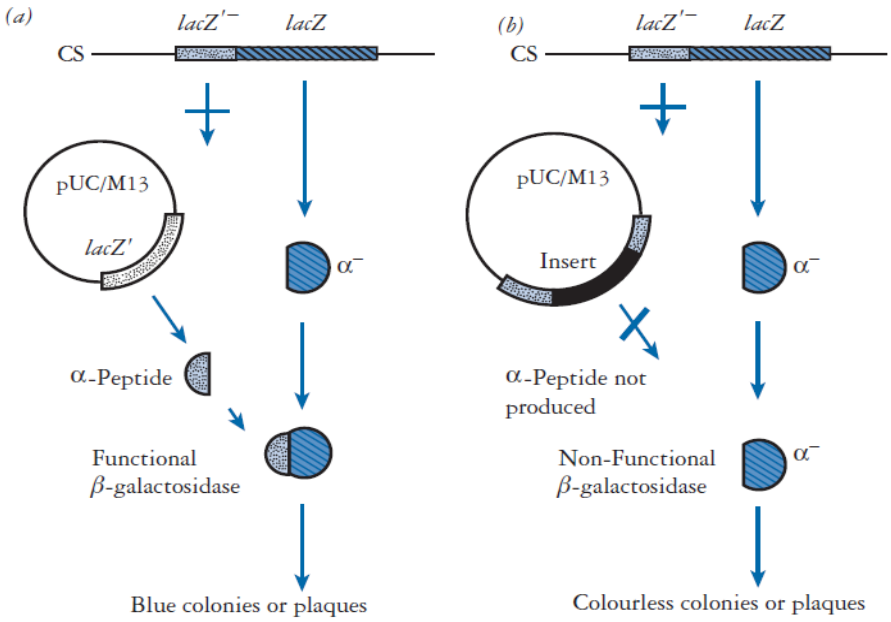
حضور قطعات DNA کلون شده در صورتی نمایان می‌شود که درج شدن آن قطعه در وکتور، توالی کد کنندهٔ ژن را گسیخته و غیر فعال کند. این روش به نام غیرفعال سازی ناشی از ورود قطعه وارد شده[1] شناخته می‌شود و می‌تواند با هر سیستم ژنتیکی مناسبی مورد استفاده قرار گیرد. سه سیستم جهت توضیح و روشن ساختن استفاده از این تکنیک باید شرح داده شود.

ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک می‌توانند برای شناسایی وکتور حامل ژن مورد نظر استفاده شوند. اگر قطعه مورد نظر در توالی کد کنندهٔ ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک همسانه‌سازی شود، این ژن غیر فعال شده و سلول به آنتی‌بیوتیک مورد نظر حساس خواهد شد. این یک روش بسیار خوب برای انتخاب سلول‌ها است.

در صورتی که قطعات DNA داخل جایگاه برشی یک ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک همسانه‌سازی شوند، مقاومت به آنتی‌بیوتیک می‌تواند به عنوان یک سیستم غیر فعال سازی ناشی از ورود قطعه وارد شده مورد استفاده قرار گیرد. به عنوان مثال، همسانه‌سازی DNA در داخل جایگاه *Pst*I از پلاسمید pBR322 (که داخل ژن Ap^r قرار گرفته است) توالی کد کنندهٔ ژن را گسیخته و آن را غیر فعال می‌کند. بنابراین سلول‌هایی که پلاسمید نوترکیب را دارند به صورت Ap^sTc^r خواهند بود. از این روش می‌توان جهت شناسایی نوترکیب‌ها استفاده کرد. به این صورت که اگر ترانسفورمانت‌ها ابتدا در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین قرار گیرند، همهٔ سلول‌هایی که دارای پلاسمید فوق هستند زنده می‌مانند و تشکیل کلونی می‌دهند.

---

1. Insertional inactivation



شکل ۸-۲) غیرفعال شدن ناشی از ورود قطعه وارد شده در سیستم تکمیلی آلفا. a) کروموزوم (CS) یک ژن *lacZ* ناقص دارد که نمی‌تواند پایانه N از آلفا پپتید بتاگالاکتوزیداز را کد کند (به صورت قطعهٔ ژن *lacZ*′ مشخص شده). لذا محصول ناحیهٔ کروموزومی *lacZ* ، آنزیمی است که فاقد آلفا پپتید است. اگر یک پلاسمید pUC غیر نوترکیب یا فاژ M13 غیر نوترکیب در سلول موجود باشد، قطعه ژن *lacZ*′، آلفا پپتید را کد خواهد نمود که قادر است بتا گالاکتوزیداز فعال را تولید کند. در حضور X-gal کلنی‌ها یا پلاک‌های آبی رنگ ظاهر می‌شوند. اگر یک قطعه DNA در داخل وکتور کلون شود (همان طور که در قسمت b نشان داده شده) ژن *lacZ*′ غیرفعال شده و مکمل‌سازی اتفاق نمی‌افتد. لذا کلونی‌ها یا پلاک‌ها آبی رنگ نمی‌شوند.

اگر یک کپی از این پلیت به محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین انتقال داده شود، نوترکیب‌های Ap^s Tc^r رشد نمی‌کنند، ولی هر کدام از ترانسفورمانت‌های غیر نوترکیب (Ap^r Tc^r) رشد خواهند کرد. بنابراین نوترکیب‌ها به وسیلهٔ غیبت شان در پلیت دوم شناسایی می‌شوند و می‌توان آن‌ها را از پلیت اصلی برداشت و جهت انجام بررسی‌های بعدی مورد استفاده قرار داد.

سیستم X-gal همچنین می‌تواند به‌عنوان یک عامل غربالگری جهت توالی‌های کلون شده مورد استفاده قرار گیرد. اگر یک قطعه DNA در داخل یک ژن بتاگالاکوزیداز فعال قرار گیرد (به‌عنوان مثال در مکان برشی *Eco*RI از ژن Charon 16A) هر نوترکیبی از لحاظ ژنوتیپی به صورت *lacZ*⁻خواهد بود و بنابراین بتا-گالاکتوزیداز را در حضور IPTG و X-gal، تولید نخواهد کرد. لذا

پلاک‌های حاوی چنین فاژی، بی‌رنگ باقی می‌مانند. فاژهای غیر نوترکیب، ژن فعال *lacZ* را به‌صورت فعال دارند و موجب ایجاد پلاک‌های آبی رنگ می‌شوند. این روش همچنین می‌تواند با سیستم مکمل‌سازی آلفا[1] مورد استفاده قرار گیرد. در این مورد، ورود DNA موجب غیرفعال شدن ناحیهٔ *lacZ´* در وکتورهایی مانند فاژ M13 و پلاسمیدهای گروه pUC می‌شود. بنابراین مکمل سازی در نوترکیب‌ها صورت نمی‌گیرد، در نتیجه فنوتیپ حاصل به صورت *lacZ*⁻ خواهد بود و موجب تشکیل کلونی‌ها و پلاک‌های بی رنگ می‌شود (شکل ۸-۲).

علاوه بر این، شکل پلاک نیز می‌تواند به‌عنوان یک عامل غربالگری در وکتورین λ، مانند λgt10که دارای ژن *cI* هستند مورد استفاده قرار گیرد. این ژن رپرسور *cI* را کد می‌کند که مسئول ساخت لیزوژن‌ها است. سلول‌های زنده به صورت لیزوژن‌اند، لذا پلاک‌های به وجود آمده از این سلول‌ها (سلول‌های حاوی وکتورین cI^+)، کمی تیره‌تر به نظر می‌رسند. اگر ژن *cI* با قرار دادن یک قطعه در داخل جایگاه برشی آن غیرفعال شود، پلاک‌ها به صورت روشن در می‌آیند و از غیر نوترکیب‌های تیره رنگ متمایز می‌شوند. این سیستم همچنین می‌تواند به عنوان یک روش گزینش مورد استفاده قرار گیرد (بخش ۸-۱-۴ را مشاهده کنید).

۸-۱-۳) غربالگری با استفاده از موتانت های معین

در بعضی از موارد گزینش مستقیم توالی‌های کلون شده امکان‌پذیر می‌باشد. به‌عنوان مثال در جایی که ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک کلون شده باشند، وجود توالی‌های کلون شده، به وسیله کشت سلول‌ها روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک مورد نظر قابل تشخیص است (با این فرض که سویه‌های میزبان درحالت عادی به آنتی‌بیوتیک حساس هستند). این روش همچنین در مواقعی که سلول‌های جهش یافته خاص در اختیار باشند نیز مورد استفاده قرار گرفته و به عنوان روش تکمیلی در مواردی که DNA همسانه سازی شده دارای عملکردی است که نمونه جهش یافته فاقد آنست استفاده می شود. سه شرط جهت موفقیت در این روش لازم است. نخست: یک سویهٔ جهش یافته که فاقد ژن خاصی که در جستجوی آن هستیم در دسترس باشد. دوم: یک محیط کشت انتخابی مناسب برای گزینش نوترکیب‌های خاص و شرط آخر که بخش حیاتی این روش است و می‌تواند محدود کننده باشد، آن است که توالی ژن بایستی در سلول‌های میزبان بیان شود و محصول فعال تولید کند که تکمیل‌کنندهٔ نقص ژن جهش یافته باشد. اگر به‌عنوان مثال یک سویهٔ *E.coli* که برای انتخاب ژن‌های کلون شده *E.coli* مورد استفاده قرار گیرد، از آنجایی که ژن‌ها در سلول‌های میزبان به نحو مطلوبی بیان و فعالیت می‌کنند مشکلی ایجاد نمی‌کند. این روش اغلب

---

[1] α-complementation

جهت گزینش ژن‌هایی که در بخش نیازهای غذایی موثرند مانند، آنزیم‌های مسیرهای گوناگون بیوسنتتیک[1]، مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابرین ژن‌های اپران تریپتوفان را می‌توان با کشت نوترکیب‌ها روی سلول‌های جهش یافته‌ای که فاقد فعالیتی خاص در این چرخه یا مسیر هستند، گزینش کرد (این‌ها به‌عنوان موتانت‌های آکسوتروفیک[2] یا آکسوتروف شناخته می‌شوند). در بعضی موارد سیستم مکمل سازی را می‌توان در *E.coli* جهت گزینش ژن‌های سایر ارگانیسم‌ها مثل مخمر نیز استفاده کرد، در صورتیکه که آنزیم‌های مورد نظر در زمینه عملکرد به نحو مشابهی عمل کنند و در سلول میزبان بیان شوند. مکمل سازی همچنین در صورتی که موتانت‌ها برای سایر میزبان‌ها در دسترس باشند، مانند موردی که در مخمر و سایر قارچ‌ها وجود دارد، مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مکمل سازی مستقیم یک جهش معین در صورتی امکان پذیر است که که سیستم ژنی به خوبی شناخته شده و یک جهش مناسب در دسترس باشد. در این مورد کارکرد ضعیف ژن با استفاده از توالی کلون شده تکمیل می‌شود.

مراحل گزینش همچنین برای سلول‌های یوکاریوتی عالی نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. ژن دی هیدروفولات ردوکتاز موش خانگی[3]، در *E.coli* کلون شده و سلول‌های حاوی ژن فوق به محیط کشت انتخابی حاوی تریمدوپریم[4] انتقال داده شدند. سلول‌هایی که ژن *DHFR* موش را دارا بودند، به آن ماده مقاوم بوده و بر این اساس گزینش شدند.

در روش انتخاب مستقیم مشکلاتی وجود دارد که غلبه بر برخی از آن‌ها نسبت به دیگر روش‌ها دشوار است.

۸-۱-۴) سایر روش‌های گزینش ژنتیکی

به جز روش‌های ذکر شده جهت انتخاب ژنتیکی و غربال نوترکیب‌ها، تکنیک‌های دیگری نیز در این خصوص وجود دارند. این روش‌ها اغلب به استفاده از ترکیب یک وکتور/میزبان خاص بستگی دارند که امکان استخراج خصوصیات ژنتیکی سیستم را فراهم می‌کنند. برای توضیح این روش به ذکر دو مثال می پردازیم. روش‌های دیگری که ممکن است در سایر متون یافت شوند در بخش مطالعات بیشتر ذکر شده است.

---

[1] Biosynthetic
[2] Auxotrophic
[3] Dihydrofolate reductase (DHFR)
[4] Trimethoprim

استفاده از سیستم رپرسور cIی λgt10 می‌تواند یک سیستم گزینش قوی را به‌وجود آورد. اگر وکتور به سویه‌های جهش یافتهٔ *E.coli* وارد شود، لیزوژن‌ها را در فراوانی بالا تولید می‌کند. یک چنین سویه‌هایی (فراوانی‌های بالایی از لیزوژن) *hfl* نامیده می‌شوند و هر فاژی که یک رپرسور cI فعال را کد، لیزوژن‌ها را روی آن میزبان تشکیل خواهد داد. این لیزوژن‌ها در مقابل سایر آلودگی های فاژ مقاوم خواهند بود. قطعات DNA در وکتور λgt10 در داخل جایگاه برشی ژن *cI* وارد می‌شوند. این عمل ژن را غیر فعال کرده و لذا فقط نوترکیب‌ها (ژنوتیپ *cI*⁻) تشکیل پلاک می دهند.

برخی روش‌های انتخاب/ غربالگری بسیار پیچیده هستند و از جنبه‌های کلیدی تعامل وکتور/میزبان استفاده می‌کنند.

دومین مثال از گزینش ژنتیکی که بر اساس خصوصیات فاژ میزبان شکل گرفته است، سیستم گزینش Spi است که می‌تواند با وکتورهایی از قبیل EMBL4 مورد استفاده قرار گیرد. گونه وحشی λ در مرحله لیزوژنیک روی سلول‌هایی که حاوی یک فاژ مانند فاژ P_2 هستند رشد نمی کند. لذا فاژ λ، Spi^+ نامیده می‌شود (یعنی حساس به بازدارندهٔ P_2). فنوتیپ Spi^+ به ژن‌های *red* و *gam* مربوط به λ بستگی دارد. این ژن‌ها طوری به نحوی مرتب می‌شوند که روی قطعات EMBL4 قرار گیرند. بنابراین نوترکیب‌هایی که فاقد این قطعات هستند، به صورت red^- و gam^- بوده و لذا از نظر فنوتیپی به صورت Spi^- خواهند بود. این قبیل نوترکیب‌ها پلاک‌هایی را روی لیزوژن‌های P_2 تشکیل می‌دهند، در حالی که فاژهای غیر نوترکیب که به‌صورت red^+gam^+ هستند از لحاظ فنوتیپی به صورت Spi^+ باقی می‌مانند و پلاک تشکیل نخواهند داد.

۸-۲) غربالگری با استفاده از هیبریداسیون اسید نوکلئیک‌ها

جنبه‌های کلی هیبریداسیون اسید نوکلئیک‌ها در بخش ۳-۵ شرح داده شده است. این روش، روشی کارآمد در گزینش بانک‌های کلون است و نیز یکی از کلیدی‌ترین تکنیک‌های دست‌ورزی ژن محسوب می‌شود. تولید یک کتابخانهٔ cDNA یا DNA ژنومی اغلب روش shotgun نامیده می شود، زیرا طی انجام آن تعداد زیادی نوترکیب‌های تصادفی مهم ایجاد می‌شوند. با استفاده از یک کاوشگر[1] اسید نوکلئیک شناخته شده، چنین کتابخانه‌هایی غربال شده و کلون‌های مورد نظر شناسایی می‌شوند. شرایط انجام هیبریداسیون به خوبی بهینه‌سازی شده و تنها محدودیت آن دسترسی به کاوشگر مناسب است.

---

1. Probe

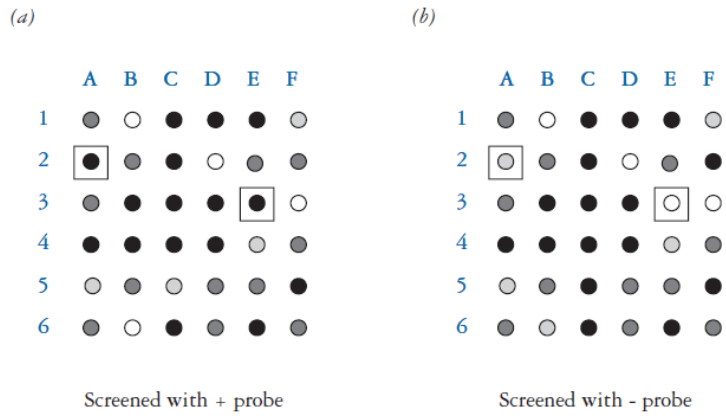
ویژگی طبیعی مکمل بودن رشته‌های DNA بدین معنی است که یک کاوشگر با توالی خاص یک ابزار غربالگری بسیار قوی است، زیرا می‌تواند کلون‌های حامل توالی هدف را از بین هزاران و یا صدها هزار نوترکیب شناسایی کند.

۸-۲-۱ کاوشگرهای اسید نوکلئیک

قدرت روش هیبریداسیون اسید نوکلئیک در پیداکردن و باند شدن به توالی‌های مکمل با یکدیگر است که با درجه بالائی از دقت صورت می‌گیرد. این کار به میزان همولوژی بین توالی‌های قابل هیبرید بستگی دارد و معمولاً برای دستیابی به این هدف، کاوشگر مورد نظر از همان منبع مربوط به DNA هدف مشتق شده است. گرچه تحت شرایط خاص، توالی‌هایی که همولوژی آنها ۱۰۰٪ نیست نیز می‌توانند جهت یافتن یک ژن خاص مورد استفاده قرار می گیرند، به‌طوری که امکان استفاده از کاوشگر یک موجود برای پیدا کردن کلون‌های DNA موجود دیگر مورد استفاده قرار می گیرد. این کاوشگرهای غیر مشابه در شناسایی ژن‌های گونه‌های مختلف بسیار مفید هستند.

امکان استفاده از کاوشگرهای همولوگ و یا هترولوگ در غربالگری در شرایطی وجود دارد که توالی ژن‌ها به قدر کافی مشابه بوده، به طوری که بتوانند هیبریدهای پایداری را در شرایط هیبریداسیون ایجاد کنند.

سه نوع اصلی از کاوشگرهای DNA وجود دارند: ۱) cDNA، ۲) DNA ژنومی، ۳) الیگونوکلئوتیدها. البته اگر کاوشگرهای RNA مناسب در دسترسی باشند نیز می‌توانند استفاده قرار شوند. دسترسی به یک کاوشگر خاص به میزان شناخت ما از توالی ژن هدف بستگی دارد. اگر یک کلون cDNA شناسایی شده در اختیار باشد، می‌توان از آن برای غربالگری کتابخانه DNA ژنومی و جداسازی ژن مورد نظر استفاده کرد. همچنین cDNA ممکن است از جمعیت‌های mRNA و بدون نیاز به همسانه‌سازی cDNAها تهیه و استفاده شود. این روش اغلب به عنوان غربالگری مثبت - منفی شناخته می‌شود. اگر کلون مورد نظر حاوی توالی مشخصی باشد که فقط تحت شرایط خاصی بیان شود، کاوشگرها بایستی از جمعیتی از mRNA مربوط به سلول‌هایی که ژن مورد نظر در آن‌ها بیان شده (کاوشگر مثبت) و نیز از سلول‌هایی که ژن مورد نظر را بیان نکرده‌اند (کاوشگر منفی) تهیه شوند.



شکل۸-۳) غربالگری با روش مثبت/منفی. در این روش کلون‌ها به ۲ فیلترهای با ردیف‌های ۶× ۶ منتقل می شوند a) یک کپی از فیلتر با یک کاوشگر cDNA رادیواکتیو از سلول‌هایی که ژن وارد شده را بیان کرده‌اند، هیبرید شده است (کاوشگر +). (b) کپی دیگر از فیلتر با یک کاوشگر از سلول‌هایی که ژن را بیان نکرده‌اند هیبرید شده است (کاوشگر -). بعضی کلون‌ها هیبرید ضعیفی با هر دو کاوشگر تشکیل داده‌اند (مانند B1). بعضی‌ها با هر دو با قدرت بسیار هیبرید شده‌اند (مانند C1). بعضی‌ها یک سیگنال قوی با کاوشگر- و یک سیگنال ضعیف‌تر با کاوشگر+ تشکیل داده‌اند (مانند C5). کلون‌های A_2 وE_3 یک سیگنال قوی با کاوشگر+ و یک سیگنال ضعیف‌تر با کاوشگر- تشکیل می‌دهند که این کلون‌ها باید جهت آنالیزهای بعدی انتخاب شوند.

با استفاده از هیبریداسیون مضاعف می‌توان بر اساس الگوهای متفاوت هیبریداسیون بوسیله کاوشگرهای مثبت و منفی کلون‌ها را از هم تشخیص داد. اگر چه با این روش نمی‌توان شناسایی قطعی و کاملی از توالی مورد نظر بدست آورد، اما با این روش تعداد کلون‌های مورد نظر جهت غربالگری کاهش می‌یابد. قاعده کلی روش مثبت منفی در شکل ۸-۳ نشان داده شده است.

کاوشگرهای DNA ژنومی معمولاً قطعاتی از توالی‌های کلون شده هستند که هم به عنوان کاوشگرهای غیر متجانس[1] استفاده می شوند و هم جهت شناسایی کلون‌های دیگر که حاوی بخش‌های اضافی از ژن مورد بررسی هستند، مورد استفاده قرار می‌گیرند. این یک بخش مهم از تکنیک‌های شناخته شده‌ایی مانند گام زنی کروموزومی[2] و پرش کروموزومی[3] است که روش‌های فوق قادر به شناسایی توالی‌های همپوشان با هم هستند که اگر این توالی‌ها در کنار همدیگر قرار

[1]. Heterologous
[2]. Chromosome walking
[3]. Chromosome jumping

گیرند، امکان بررسی خصوصیات قطعات بلندی از DNA را فراهم می‌کند. جزئیات بیشتر در مورد دو روش گام‌زنی کروموزومی و پرش کروموزومی را در فصل ۱۲ هنگامی‌که کاربردهای پزشکی دستکاری ژن را بررسی می‌کنیم، ذکر خواهیم نمود.

کاربرد کاوشگرهای الیگونوکلئوتیدی هنگامی امکان‌پذیر است که برخی اطلاعات مربوط به توالی های آمینواسیدی برای پروتئین کد شده توسط ژن هدف در دسترس باشد. با استفاده از کد ژنتیکی می‌توان توالی ژن را بدست آورد و یک الیگونوکلئوتید سنتز کرد. طبیعت دژنره[1] کد ژنتیکی به این معنی است که نمی‌توان توالی مورد نظر را با دقت کامل پیش‌بینی کرد، اما اگر از حداقل توالی‌های دژنره استفاده کنیم، این موضوع معمولاً مشکل بزرگی نیست. همان طور که در هنگام طراحی آغازگر برای PCR دیدیم (بخش ۷-۲-۲)، یک کاوشگر به گونه‌ای قابل سنتز است که کلیهٔ توالی‌های ممکن را بوسیله تفاوت در جایگاه چند حالتی وابل[2]، پوشش دهد. بطور جایگزین اینوزین می‌تواند در بخش‌هایی که میزان تغییر در توالی‌ها بالا است مورد استفاده قرار گیرد. مزیت اصلی کاوشگر الیگونوکلئوتیدی این است که تنها یک توالی نوکلئوتیدی کوتاه برای تهیه کاوشگر مورد نیاز است، لذا ژن‌هایی از هر کلون که پیش از این در دسترس نبودند، می‌توانند توسط توالی یابی قطعات پپتیدی شناسایی و بر اساس آن کاوشگرها با دقت تهیه شوند.

پیشرفت‌های عمده‌ای در روش‌های شناسایی کلون بوسیله پروژه‌های توالی‌یابی ژنوم پدید آمده‌اند. با این فرض که توالی ژنوم ارگانیسم هدف در دسترس باشد، می‌توان جهت پیدا کردن و جست و جوی هر توالی خاص از ژنوم، از یک کامپیوتر استفاده کرد. این نوع آزمایش به عنوان یک روش خیلی قوی شناخته شده است و گاهی تحت عنوان آزمایش‌های *in silico* نیز شناخته می‌شود (زیرا یک تراشه سیلیکون[3] در کامپیوتر سریع‌تر از شرایط *in vivo* یا *in vitro* عمل می‌کند). در بعضی موارد این فرآیند حتی ممکن است نیاز برای انجام همسانه‌سازی را برطرف کند، زیرا اطلاعات فوق ممکن است برای آماده کردن آغازگرهای PCR استفاده شود، لذا قطعه هدف مورد نظر میتواند به طور خاص تکثیر شود. برای بیشتر روش‌های سنتی و متداول، داده‌های توالی مورد نظر می‌توانند جهت آماده سازی یک کاوشگر الیگونوکلئوتیدی به منظور ایزوله کردن قطعات کلون شده از یک کتابخانه cDNA یا DNA ژنومی استفاده شوند.

اگر الیگونوکلئوتیدها به صورت دقیق طراحی شوند، می‌توانند به عنوان کاوشگر استفاده شوند. در دسترس بودن توالی‌های ژنی بدین معنی است که برای یافتن یک ژن خاص می‌توان از ابزارهای جست و جوی کامپیوتری در این خصوص استفاده کرد.

---

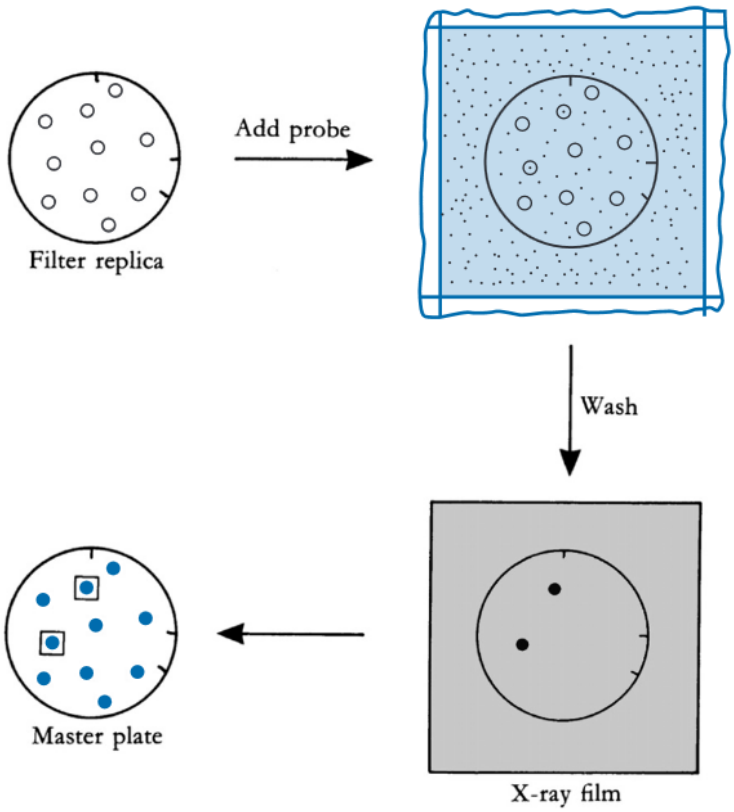
[1] Degenerate
[2] Wobble
[3] Silicon

وقتی که یک کاوشگر مناسب به‌دست آمد، این کاوشگر می‌تواند به‌وسیله یک ایزوتروپ رادیواکتیو مانند p^{32}، نشاندار شود (همان طوری که در بخش ۳-۴ توضیح داده شده است). این امر موجب تولید یک قطعه رادیونشاندار با فعالیت اختصاصی بالا می‌شود که می‌تواند به عنوان یک غربالگر بسیار حساس برای ژن‌ها مورد استفاده قرار گیرد. متناوباً روش‌هایی که بر مبنای برچسب‌گذاری غیر رادیواکتیو هستند مثل برچسب‌های فلورسنت، در صورت نیاز می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند.

۸-۲-۲) غربالگری بانک های کلون

باتوجه به اینکه کلونی‌ها یا پلاک‌ها برای غربالگری مستقیم مناسب نیستند، لذا یک کپی از آن‌ها روی غشای نیتروسلولزی یا فیلترهای نایلونی قرار می گیرد. این فرآیند یا به صورت رشد مستقیم سلول‌ها بر روی فیلتر که روی پلیت آگار (کلونی‌ها) قرار داده شده انجام می شود و یا اینکه یک کپی از پلیت (کلونی‌ها یا پلاک‌ها) به غشای نیتروسلولزی منتقل می‌شود. برای این کار، نوترکیب‌ها بر روی آگار رشد داده شده و سپس یک فیلتر بر روی آن قرار می‌گیرد. تعدادی از سلول‌ها به فیلتر می‌چسبند، لذا تصویر آینه‌ای از الگوهای نوترکیب از روی پلیت، بر روی فیلتر تشکیل می‌شود (شکل ۸-۴). فلش‌های موجود در شکل جهت صحیح انجام واکنش را نشان می‌دهند. سپس یک پروسه جهت دناتوره کردن DNA در روی این فیلترها انجام شده و به دنبال آن DNA دناتوره شده به فیلتر چسبیده و بقایای سلول از آن زدوده می‌شود.

بانک‌های کلون می‌تواند با تهیه یک کپی از کلونی‌ها (یا پلاک‌ها) روی فیلتر نایلونی یا غشای نیتروسلولوزی مورد غربالگری قرار گیرد. سپس شناسایی توالی‌های کلون شده مورد نظر می‌تواند با استفاده از یک کاوشگر اسید نوکلئیکی خاص انجام شود.



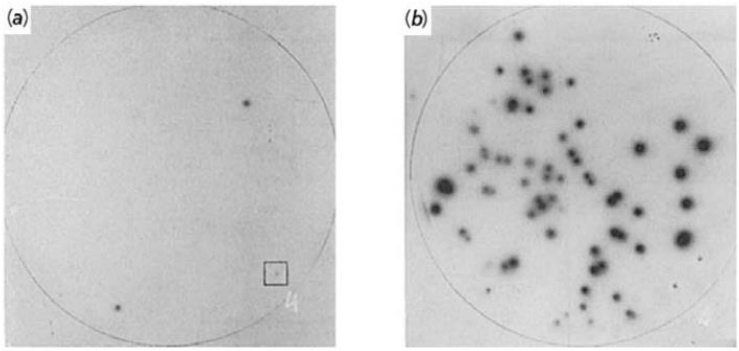
شکل۸-۴) غربالگری بانک های کلون با استفاده از روش هیبریداسیون اسید نوکلئیک‌ها. یک نسخه از فیلتر نیتروسلولزی یا نایلونی از پتری دیش اصلی حاوی کلنی‌ها یا پلاک‌های تهیه می‌شود. علائم رفرنس روی فیلتر و پلیت برای کمک به جهت یابی صحیح است. فیلتر با یک کاوشگر نشاندار اینکوبه شده، به طوری که با توالی هدف هیبرید می‌شود. اتصالات غیراختصاصی کاوشگر شسته شده و فیلتر جهت تولید یک اتورادیوگراف، در معرض اشعه X قرار می‌گیرد. کلونی‌های مثبت شناسایی شده و می‌توان آن‌ها را از پلیت های اصلی برداشت کرد.

اگر شرایط هیبریداسیون نوکلئیک اسید به دقت کنترل شده باشد، نتایجی مطلوب به دست خواهد آمد. از جمله نکات کلیدی در این خصوص غلظت نمک و دما است.

عموماً کاوشگر به‌وسیلهٔ گرما دناتوره می‌شود، فیلتر غشایی در یک کیسه پلاستیکی کاملاً بسته قرار گرفته و سپس کاوشگر به آن اضافه می‌شود و در یک دمای مناسب نگهداری شده تا هیبریداسیون شکل گیرد. قدرت هیبریداسیون مهم است و به شرایطی از قبیل غلظت نمک و دما بستگی دارد. برای کاوشگرهای همولوگ تحت شرایط استاندارد، نگهداری معمولاً در دمای حدود ۶۸-۶۵ درجه

سانتی گراد انجام می‌شود. مدت زمان این فرایند ممکن است در بعضی موارد بالای ۴۸ ساعت باشد که به سرعت هیبریداسیون بستگی دارد. بعد از هیبریداسیون، فیلترها شسته شده و اجازه داده می شود تا خشک شوند (شدت شست و شو مهم است) و سپس در معرض اشعه X قرار گرفته و یک اتورادیوگراف از آن تهیه می‌شود و بر اساس آن می‌توان کلونی‌های مورد نظر را در پلیت‌های اصلی تشخیص داد تا نوترکیب‌های مطلوب شناسایی شوند.

فاکتور مهم در غربالگری کتابخانه‌های ژنومی بوسیله هیبریداسیون نوکلئیک اسید، تعداد پلاک‌هایی که می‌توانند روی فیلتر غربال شوند می‌باشد. اغلب یک غربال اولیه بسیار قوی انجام و پلاک‌ها از روی پلیت برداشته می شوند. به‌علت وجود تعداد زیاد پلاک، اغلب با آلودگی توسط پلاک‌های جانبی همراه است، لذا ترکیب فوق مورد با تعداد کمی از پلاک‌ها مورد غربالگری مجدد قرار می گیرد که امکان جداسازی نوترکیب‌ها را به صورت جداگانه فراهم می‌کند (شکل ۸-۵). با توجه به اینکه در این روش تعداد فیلترهای کمی مورد نیاز است، لذا اگر تعداد زیادی پلاک مورد بررسی باشد، این روش کارآیی خوبی خواهد داشت (بنابراین تعداد کاوشگر رادیواکتیو کمتری مورد نیاز است).



شکل ۸-۵) غربالگری پلاک‌ها در غلظت‌های کم و زیاد. یک کاوشگر رادیو نشاندار برای غربال یک کتابخانه ژنومی در وکتور لامبدا EMBL3 مورد استفاده قرار گرفت. (a) غربال اولیه بر روی غلظت بالایی از پلاک‌ها انجام شد، که دو پلاک مثبت بر روی این پلیت نمایان شدند (ناحیه مشخص شده با مربع یک علامت مثبت کاذب است). (b) پلاک‌هایی از منطقه مثبت برداشته شده و به منظور جداسازی پلاک‌های انفرادی در غلظت پایین‌تری مجدداً غربال شدند. با این کار کلونی‌های مثبت بیشتری بدست آمدند زیرا سهم بالایی از پلاک‌های هدف در نمونهٔ دوباره غربال شده وجود دارد. عکس‌ها از Dr M. Stronach

۸-۳) استفاده از PCR در پروتکل‌های غربالگری

همان طور که پیشتر در بخش ۷ دیدیم، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) تأثیر مهمی بر دستکاری ژن و زیست شناسی ملکولی داشته است. واکنش PCR می‌تواند به‌عنوان یکی از روش های غربالگری بانک‌های کلونی محسوب شود. گرچه موارد بسیاری نیز وجود دارد که نشان‌دهندهٔ کارآمد بودن روش‌های سنتی‌تر جهت انجام غربالگری است. اگرچه انجام PCRها آسان است، اما اگر بخواهیم چند صد یا هزار کلون را غربال کنیم، این امر کار بزرگی است. گرچه راه حل‌هایی برای رفع این مشکل وجود دارد و چون PCR خیلی اختصاصی است، می‌تواند به عنوان یک روش مفید در شناسایی کلون‌ها به کار گرفته شود.

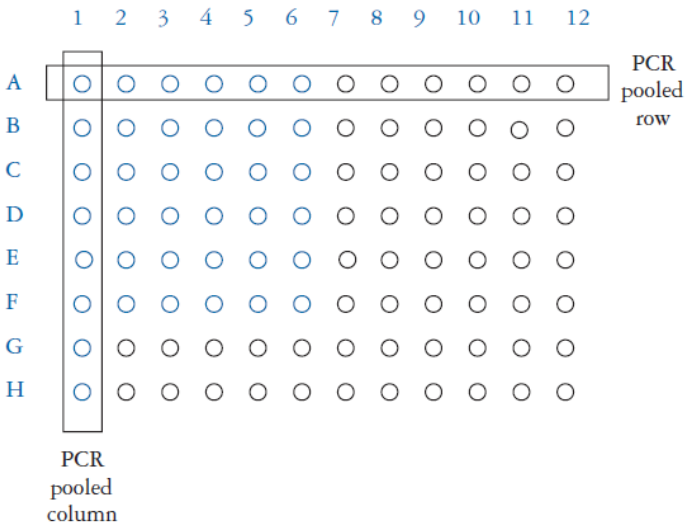
برای غربالگری کتابخانه های کلونی می‌توان از PCR استفاده کرد. برای این کار اغلب کلون‌های مربوط به ردیف‌ها و ستون‌های پلیت های میکروتیتر ترکیب می‌شوند و واکنش PCR روی نمونهٔ به دست آمده انجام می‌شود.

یکی از راه‌های کاهش تعداد PCRهای مستقل که باید انجام شود، انجام واکنش PCR با نمونه های ترکیبی از کلون‌ها است. این روش به عنوان غربال ترکیبی[1] شناخته می‌شود. ذر ابتدا ایده فوق قدری عجیب بنظر می رسد- چرا کلونهای ترکیبی اگر هدف جداسازی یک کلون است؟ اساس این تکنیک در شکل ۸-۶ نشان داده شده است که کلون‌هایی را مورد توجه قرار دادیم که در یک سینی ۹۶ چاهکی رشد داده شده‌اند. از آنجایی که یک کتابخانه ژنی معمولاً خیلی بزرگ‌تر از ۹۶ کلون است، این روش می‌تواند با چندین سینی و با استفاده از یک بعد عمودی که به بعد افقی اضافه شده که نتیجتا ردیف‌ها و ستون‌ها در یک سینی تجمیع شده اند، انجام گیرد. کلون‌های موجود در هر یک از ستون‌ها و ردیف‌های پلیت با هم مخلوط شده و روی نمونه مخلوط یک PCR انجام می‌شود. اگر یک کلون در یکی از ردیف‌های ترکیبی حضور داشته باشد، آن کلون بایستی در یکی از ۱۲ ردیف موجود باشد. به همین نحو اگر در یک ستونی ترکیبی حضور داشته باشد ، کلون بایستی در بایستی در یکی از ۱۲ ستون موجود باشد. اگر یک نمونه مثبت ملاحظه شود، کلون مورد نظر در محل تقاطع PCRهای ردیف و ستون شناسایی شده . اگر بیشتر از یک نمونه مثبت ملاحظه شود، ضروری است PCRهای اضافی انجام تا کلون مورد نظر بدون ابهام شناسایی شود.

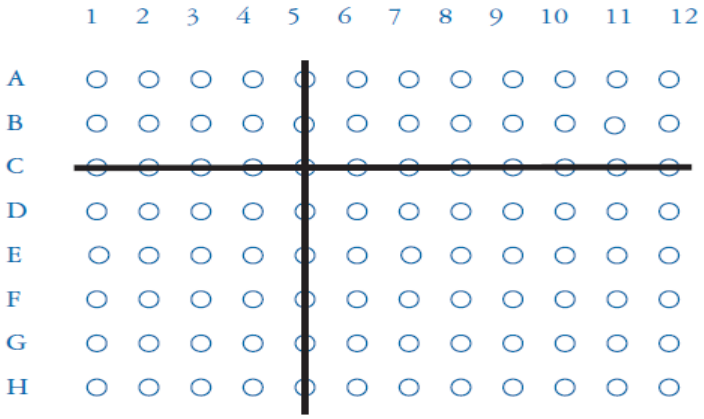
---

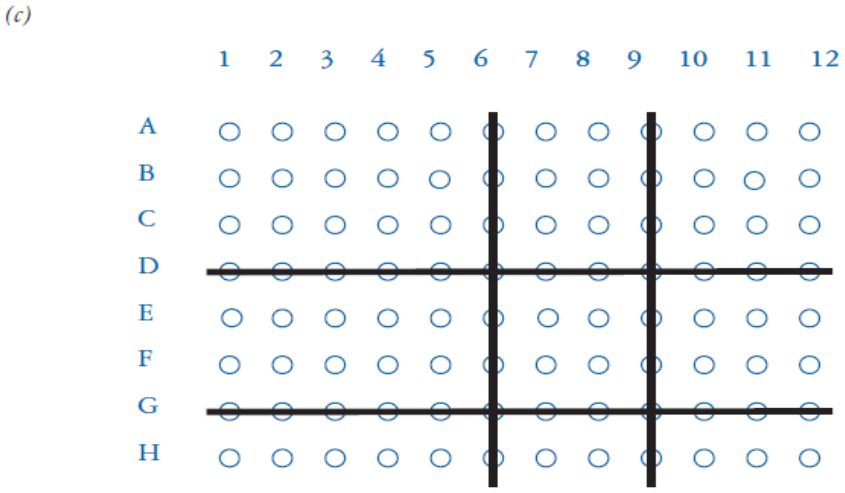
1. Combinatorial screening

(a)


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A
B
C
D
E
F
G
H
PCR pooled row
PCR pooled column

(b)


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A
B
C
D
E
F
G
H



شکل ۸-۶) اصول غربالگری ترکیبی با استفاده از PCR در یک پلیت ۹۶ چاهکی. a) ادغام کلون‌های ردیفی و ستونی. کلون‌های ردیف A (A_1 تا A_{12}) با هم ادغام شده و یک PCR روی آن انجام شد. این کار برای کلون‌های ستون ۱ (A1–H1) نیز انجام شد. یک واکنش PCR برای مخلوط هر ردیف و ستون انجام شد؛ لذا برای یک پلیت ۹۶ چاهکی، ۲۰ واکنش PCR مورد نیاز است (۸ ردیف و ۱۲ستون). b) نتایج PCR های ستون ۵ و ردیف C یک نتیجه مثبت نشان داده شدند. بنابراین یک کلون مثبت باید در چاهک شماره C۵ وجود داشته باشد c) یک نتیجه متفاوت دیگر با مثبت بودن در ردیف‌های D و G و ستون‌های ۹ و۶ نشان داده شده است. در این مورد ۴ کلون (D5, D9, G5 G9) باید مجدداً تست شوند تا مشخص شود کدامیک مثبت هستند. این تکنیک می‌تواند به صورت عمودی با اضافه کردن پلیت‌هایی با آرایش ستونی و خطوط در سه بعد (ردیف، ستون و عمودی) انجام گیرد. هدف کلی این کار دستیابی به یک شناسایی اختصاصی و کاهش تعداد واکنش‌های PCR است.

۸-۴) غربالگری ایمنولوژیکی برای ژن‌های بیان شده

یک روش جایگزین برای غربالگری با کاوشگرهای نوکلئیک اسید، شناسایی محصول پروتئینی حاصل از ژن کلون شده بوسیله غربالگری ایمنولوژیکی[1] است. این تکنیک نیازمند بیان پروتئین در نوترکیب‌ها است و در بیشتر مواقع جهت غربال کتابخانه‌های cDNA که در وکتورهایی مثل λgt11 ایجاد شده‌اند، کاربرد دارد. در این روش به جای استفاده از یک کاوشگر اسید نوکلئیک، یک آنتی‌بادی خاص مورد استفاده قرار می‌گیرد.

[1]. Immunological screening

غربالگری با استفاده از آنتی‌بادی‌ها موجب شناسایی پروتئین‌های خاص می‌شود، البته این پروتئین ها از کتابخانه‌های بیانی سنتز شده‌اند. این روش هنگامی استفاده می‌شود که یک آنتی‌بادی خاص در دسترس باشد.

آنتی‌بادی‌ها بر ضد آنتی‌ژن[1] (که به صورت عادی یک پروتئین خالص است) و توسط حیوانات ساخته می‌شوند. دو گونهٔ مهم آنتی‌بادی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد، معمول‌ترین آن‌ها آنتی بادی‌های پلی‌کلونال[2] هستند، که معمولاً با تزریق آنتی‌ژن در خرگوش و برداشتن نمونهٔ خون بعد از واکنش ایمنی، تولید می‌شوند. ایمونوگلوبولین از سرم جدا شده و تصفیه می‌شود و سپس به عنوان آنتی‌بادی مورد استفاده قرار می‌گیرد (آنتی‌سرم). آنتی‌سرم پلی‌کلونال شامل آنتی‌بادی‌هایی است که همهٔ عوامل تعیین کنندهٔ آنتی‌ژنیک مربوط به آنتی ژن را تشخیص می‌دهد. یک آنتی‌بادی اختصاصی‌تر با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال[3] بدست می‌آید، که عوامل تعیین کننده آنتی‌ژنتیک اختصاصی را شناسایی می‌کند. به هر حال، این امر می‌تواند در بعضی موارد مضر باشد. به علاوه تولید آنتی‌بادی مونوکلونال یک تکنیک پیچیده در نوع خودش است و آنتی‌سرم‌های پلی‌کلونال با کیفیت خوب اغلب جهت پروسه غربالگری کافی می‌باشند.

روش‌های گوناگونی برای انجام غربالگری ایمنولوژیکی وجود دارد، اما تکنیکی که به کار می‌رود اغلب شبیه روش غربالگری پلاگ با استفاده از کاوشگرهای اسید نوکلئیک است (شکل ۸-۷). در صورتیکه توالی در موقعیت مکانی و خوانش درست خودش قرار گرفته باشد، کلون‌های نوترکیب λgt11 با cDNA، توالی کلون شده را به عنوان پروتئین‌های کمکی بتاگالاکتوزیداز بیان می‌کنند. پروتئین‌ها را می‌توان به فیلترهای نیتروسلولزی منتقل و با آنتی‌بادی کاوش کرد. ردیابی می‌تواند با روش‌های گوناگونی انجام شود، در بیشتر موارد از یک مولکول غیراختصاصی مثل پروتئین Aباکتری‌ها و یا یک آنتی‌بادی ثانویه که به آنتی‌بادی‌های اولیه به طور اختصاصی اتصال می‌یابد، استفاده می‌شود. آشکارسازی بوسیله برچسب‌های رادیواکتیو (پروتئین A ی نشاندار شده با I^{125} یا آنتی‌بادی ثانویه) یا به وسیله روش‌های غیر رادیواکتیوی که محصولی رنگی تولید می‌کنند، انجام می‌گیرد.

۸-۵) بررسی ژن‌های کلون شده

هنگامی‌که کلون‌ها توسط تکنیک‌هایی مانند هیبریداسیون یا غربالگری ایمنولوژیکی شناسایی می‌شوند، ویژگی‌های دقیقتری از DNA مشخص می‌شود. روش‌های مختلفی در این زمینه وجود

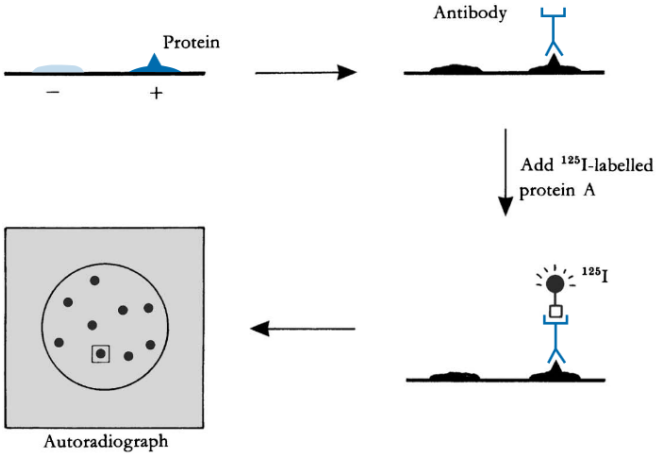
---

1. Antigen
2. Polyclonal antibodies
3. Monoclonal antibodies

دارد و انتخاب روش به شناخت ما از ژن مورد نظر و همچنین بـه اهـداف نهـایی آزمـایش بسـتگی خواهد داشت.

۸-۵-۱) توصیف صفات براساس ترجمه mRNA در شرایط *in vitro*

در بعضی موارد ممکن است شناسایی یک کلون خاص نیازمند تأیید باشد. این امر به‌ویژه زمانی‌کـه روش غربالگری مثبت/منفی به‌کار گرفته می‌شود ضروری است، زیرا نتایج معمـولاً تـا حـدی مـبهم بوده و شناسایی قطعی نمی‌تواند صورت گیرد.



شکل ۸-۷) غربالگری ایمنولوژیکی برای ژن‌های بیان شده. یک فیلتر از روی پتری دیش حاوی نوترکیب‌هـا تهیه می شود (عموماً ساختارهای cDNA/λ). پروتئین و بقایای سلولی به فیلتر متصل مـی‌شـوند. در ایـن مرحله پلاک‌های بیان کننده پروتئین هدف (+) از سایر پلاک‌ها (-) قابل تشخیص نیسـتند. فیلتـر بـه یـک آنتی‌بادی اولیه که خاص پروتئین هدف است متصل می‌شود. سـپس پـروتئین A رادیـو نشـاندار شـده، بـه ترکیب فوق اضافه شده و یک اتورادیوگراف آماده می‌شود. مانند غربالگری اسید های نوکلئیـک، پـلاک‌هـای مثبت را می‌توان شناسایی و از پلیت اصلی جدا کرد. روش‌های شناسایی رنگ آمیزی/ آنزیمـی نیـز ممکـن است با چنین سیستمی قابل استفاده باشند.

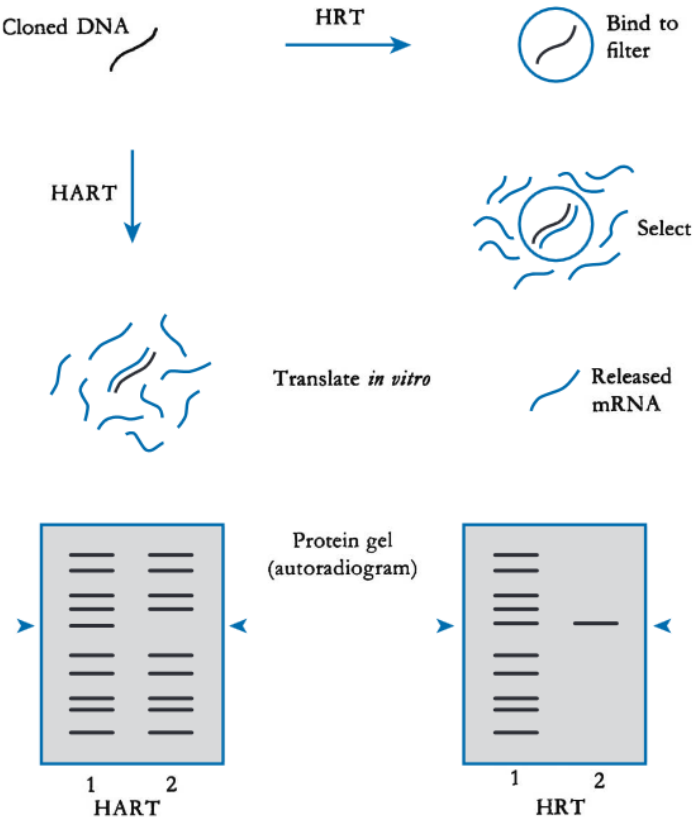
برای شناسایی کلون، گاهی مقایسه توالی کلون شده با پروتئینی که توسط آن کد می‌شود می‌توانـد مفید باشد. دو روش کلاسیک در این خصوص ترجمه با اتصال به هیبرید و ترجمه بـا آزاد شـدن از هیبرید نام دارند.

اگر توالی مطلوب یک پروتئین را کد می‌کند، شناسایی محصول پروتئین بر اساس ترجمهٔ mRNA در شرایط *in vitro* با کمک دو روش امکان پذیر خواهد بود. این دو روش به‌عنوان ترجمه با اتصال به هیبرید (HART)[1] و ترجمه با آزاد شدن از هیبرید[2] (HRT که گاهی ترجمهٔ هیبرید-انتخاب[3] نیز نامیده می‌شود) شناخته می‌شوند. اگرچه این روش‌ها دیگر استفادهٔ گسترده‌ای در آنالیز ژن‌ها ندارند، اما این روش‌ها نشان می دهند که چگونه می توان بر یک مشکل خاص با استفاده از دو روش متفاوت با یک تم مشابه غلبه کرد (یک جز مهم از روش‌های علمی پیشرفته). مقایسه دو روش HART وHRT در شکل ۸-۹ نشان داده شده است.

هر دو روش HART و HRT مبتنی بر هیبریداسیون قطعات DNA کلون شده به mRNAهای تهیه شده از سلول یا بافت‌هایی که از کلون‌ها مشتق شده‌اند هستند. در روش ترجمه با اتصال به هیبرید، توالی کلون شده، mRNA را بلوکه کرده و زمانی که در سیستمی که شامل همه مؤلفه‌های ساختار ترجمه است قرار گیرد، از ترجمه mRNA جلوگیری می‌کند. در ترجمه با آزاد شدن از هیبرید، توالی کلون شده تثبیت شده و برای گزینش mRNAهای خاص کلون شده از میان مجموعه mRNAهای کل مورد استفاده قرار می‌گیرد. سپس از هیبرید جدا شده و درحالت *in vitro* ترجمه می‌شود. اگر یک آمینواسید رادیو نشاندار (معمولاً متیونین ^{35}S) در داخل مخلوط ترجمه جا داده شود پروتئین‌های سنتز شده از mRNAها، نشاندار می‌شوند و می‌توانند به وسیله اتورادیوگرافی یا فلوروگرافی بعد از SDS – الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید[4] آشکار شوند. در ترجمه با اتصال به هیبرید، باید یک باند پروتئینی غایب باشد، در حالیکه در ترجمه با آزاد شدن از هیبرید باید یک باند دیده شود. بنابراین ترجمه با آزاد شدن از هیبرید نتایج دقیق‌تری نسبت به ترجمه با اتصال به هیبرید به پژوهش‌گر می‌دهد و روش مرجع و مقدم‌تری است.

---

1. Hybrid-arrest translation (HART)
2. Hybrid-release translation (HRT)
3. Hybrid-select translation
4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis



شکل ۸-۸) ترجمه بر مبنای اتصال به هیبرید و ترجمه با آزاد کردن از هیبرید جهت شناسایی پروتئین‌های تولید شده توسط قطعات کلون شده. در روش HART، قطعه کلون شده، با کل mRNAهای تهیه شده مخلوط می‌شود. هیبرید تشکیل شده به طور موثری از ترجمه mRNA هایی که مکمل DNAی کلون شده هستند جلوگیری می‌کند. بعد از ترجمه در شرایط *in vitro*، پروتئین حاصل از ترجمه، روی ژل پلی‌آکریل آمید تفکیک می‌شود. الگوهای شاهد (خط یک از ژلHART) و الگوهای تست شده (خط دو از ژل HART) از نظر یک باند با هم متفاوت‌اند و آن هم به دلیل عدم حضور پروتئین کد شده توسط mRNAیی است که با DNA هیبرید تشکیل داده است. در روش HRT، DNA کلون شده در داخل یک فیلتر محصور شده و برای مکمل شدن با mRNA از بین کل mRNAها مورد استفاده قرار می‌گیرد. بعد از شستن mRNA های باند نشده به فیلتر و آزاد کردن mRNAیی که به فیلتر متصل شده، ترجمه در شرایط *in vitro* تنها موجب تشکیل یک باند می‌شود (خط دو از ژل HRT) که در مقابل باندهای مختلف مربوط به شاهد قرار می‌گیرد (خط یک از ژل HRT). در هر دو روش فوق شناسایی پروتئین می‌تواند با بررسی پروتئین‌های روی ژل تعیین شود. باند پروتئینی مورد نظر با فلش نشان داده شده است.

۸-۵-۲) نقشه‌یابی با آنزیم‌های محدودگر

پیش از اقدام به دست‌ورزی ژن تهیه نقشه مکان‌های برشی آنزیم‌های محدودگر[1] برای توالی‌های کلون شده امری ضروری است. تهیه این نقشه در صورتی که از یک فاژ یا کاسمید به عنوان وکتور استفاده شود مهم است. اگر نقشه مکان‌های برشی آنزیم‌های محدودگر در دسترس باشد، قطعات کوچکتری را می‌توان جداسازی و در روش‌های مختلف مانند همسانه‌سازی در وکتورهای دیگر، تهیه کاوشگرها برای گام کروموزومی و توالی‌یابی DNA استفاده کرد. اگر یک پروتکل همسانه‌سازی شامل استفاده از وکتورهای کروموزوم مصنوعی باکتری یا مخمر حاوی قطعات الحاق شده به طول حدود ۵۰۰ – ۳۰۰ کیلو باز باشد شاید در ابتدا تهیه یک نقشه جامع مکان‌های برشی آنزیم‌های محدودگر نیاز باشد.

معمولاً یکی از اولین کارها در بررسی یک کلون، تولید یک نقشه با استفاده از آنزیم‌های برشی از یک قطعه DNA کلون شده است.

قاعدهٔ کلی روش تهیه نقشه برمبنای مکان برشی آنزیم‌های محدودگر در بخش ۴-۱-۳ به طور مختصر بیان شده است. در عمل DNA کلون شده معمولاً با انواع مختلفی از آنزیم‌های برشی، بریده می‌شود. این عمل جهت تعیین تعداد قطعات تولید شده توسط هر آنزیم انجام می‌شود. اگر آنزیمی در فواصل مکرر قطعه را برش دهد، رمزگشایی و تهیه نقشه برمبنای مکان برش آنزیم‌های محدودگر مشکل خواهد بود. بنابراین بهتر است از آنزیم‌هایی که جایگاه‌های برشی چندگانه دارند استفاده نشود. آنزیم‌هایی که DNA را به ۲ یا ۴ قطعه می‌برند معمولاً برای آزمایش‌های اولیه مورد استفاده قرار می‌گیرند. به وسیله ایجاد سری‌هایی از برش واحد یا چندتایی با استفاده از تعدادی از آنزیم‌ها، نقشه کامل برش می‌تواند ایجاد شده و در کنار یکدیگر قرار گیرد. این روش اطلاعات ضروری مورد نیاز برای جزئیات بیشتر ویژگی‌های قطعه کلون شده را فراهم می‌آورد.

۸-۵-۳) تکنیک‌های لکه گذاری (بلاتینگ[2])

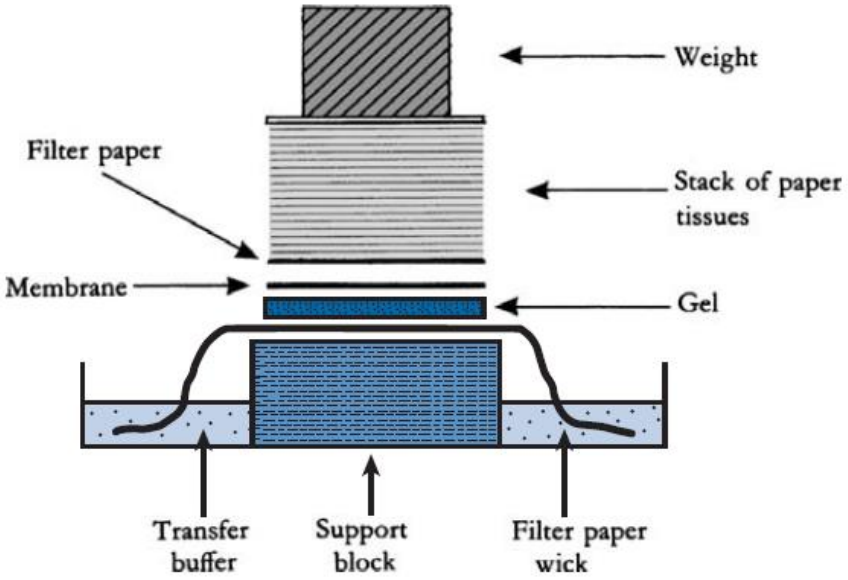
اگرچه یک کلون ممکن است شناسایی و نقشه آن بر مبنای مکان‌های برشی آنزیم‌های محدودگر نیز تعیین شده باشد، اما این اطلاعات به خودی خود نمی‌تواند اطلاعات زیادی از ساختار قطعه کلون شده و ژن مربوط به آن را فراهم سازد. در نهایت ممکن است هدف محقق بدست آوردن توالی ژن باشد (بخش ۸-۵-۴ را ببینید)، اما ممکن است که شروع فوری توالی‌یابی جالب نباشد. به‌عنوان مثال، اگر یک قطعه kb ۲۰ از DNAی ژنومی در وکتور جای‌گزین λ کلون شده باشد و ناحیه مورد نظر فقط kb ۲ طول داشته باشد، بنابراین تلاش زیادی برای توالی‌یابی کل کلون مورد

---

1. Restriction map
2. Blotting

نظر به‌منظور اطلاع از ناحیه ۲ kb تلف خواهد شد. در بعضی از آزمایشات تعیین اینکه کدام بخش از کلون اصلی شامل ناحیه مورد نظر است، ضروری می‌باشد. این کار می‌تواند با استفاده از روش های گوناگونی که بر اساس بلاتینگ ملکول‌های اسیدنوکلئیک روی غشاء و هیبریداسیون توسط کاوشگرهای خاص است، انجام گیرد. اولین تکنیک بلاتینگ توسط ساترن[1] ایجاد شد، که به اسم ساترن بلات[2] شناخته می‌شود. در این روش قطعات DNA توسط هضم برشی ایجاد می‌شوند و سپس در معرض الکتروفورز ژل آگارز قرار می‌گیرند.

روش‌های لکه‌گذاری در صورت استفاده از هضم با آنزیم‌های برشی و الکتروفورز می‌توان برای شناسایی یک منطقه خاص از ژن در یک قطعه DNA کلون شده استفاده کرد.



شکل ۸-۹) سیستم بلاتینگ. ژل روی یک کاغذ فیلتر قرار می‌گیرد و یک فیلتر نایلونی یا نیتروسلولزی روی آن قرار داده می‌شود. قرار دادن یک سری ورقه‌های کاغذی این فرآیند را کامل می‌کند. بافر انتقال بوسیله نیروی موئینه از طریق ژل به سمت بالا کشیده می‌شود و به واسطه آن قطعات اسید نوکلئیک از ژل عبور کرده و به غشای نیتروسلولزی منتقل می‌شوند.

قطعات جدا شده با روش بلاتینگ به یک غشاء نایلونی یا نیتروسلولوزی منتقل می‌شوند. روش اصلی استفاده شده، لکه‌گذاری موئین است که در شکل ۸-۹ نشان داده شده است. اگرچه روش

[1]. Ed Southern
[2]. Shouthern blotling

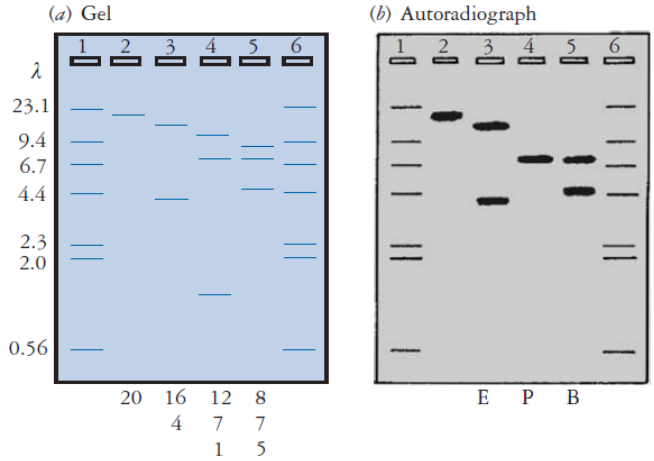
های دیگری مثل لکه‌گذاری خلاء[1] یا الکتروبلاتینگ[2] نیز اختراع شده‌اند، اما هنوز روش اصلی به خاطر ساده و ارزان بودن کاربرد فراوانی دارد. اغلب بلات‌ها با آنچه که در دسترس هستند آماده‌سازی می‌شوند. نمونه‌هایی از این دستگاه در بیشتر آزمایشگاه‌ها دیده می‌شوند.

زمانی که قطعات از ژل منتقل شدند و به فیلتر چسبیدند، یک کپی از ژل روی فیلتر ایجاد می‌شود. سپس فیلتر می‌تواند با یک کاوشگر رادیواکتیو مناسب با روشی مشابه فیلترهای کلونی و پلاک، هیبرید شود. بعد از هیبریداسیون و شستشو، فیلتر در معرض اشعهٔ x قرار می‌گیرد و یک اتورادیوگراف آماده می‌شود که اطلاعات مربوط به ساختمان کلون را تهیه و فراهم می‌آورد. یک مثال در زمینهٔ استفاده از روش ساترن بلات جهت توصیف کلون در شکل ۸-۱۰ نشان داده شده است.

اگرچه ساترن بلات یک تکنیک بسیار آسان است، اما کاربردهای فراوانی دارد و یک روش بسیار با ارزش در آنالیز ژن محسوب می‌شود. همین تکنیک می‌تواند با همین روش برای RNA مورد استفاده قرار گیرد که به نام نورتن بلات[3] شناخته می‌شود. این روش بیش از همه در تعیین الگوهای هیبریداسیون در نمونه‌های mRNA مفید است و می‌تواند جهت تعیین نواحی خاصی از DNAی کلون شده که با یک mRNA خاص هیبرید تشکیل داده مورد استفاده قرار گیرد. به هر حال این تکنیک اغلب به عنوان روشی برای سنجش سطوح رونویسی در فرایند بیان یک ژن خاص مورد استفاده قرار می‌گیرد.

---

1. Vacuum blotting
2. Electroblotting
3. Northern blotting



شکل ۸-۱۰) روش ساترن بلات. یک قطعهٔ kb ۲۰ فرضی از یک کلون ژنومی مورد بررسی قرار گرفته است. یک کپی cDNA از mRNA جهت استفاده به عنوان یک کاوشگر در دسترس است. a)یک نمونه از ژل مربوط به قطعات تولید شده بوسیله هضم با آنزیم‌های برشی گوناگون. b) نتایج اتورادیوگراف از هیبریداسیون. خطوط ۱ و۶ حاوی مارکر λ *Hin*dIII هستند که اندازه باندها را نشان می‌دهند و بر روی اتورادیوگراف مشخص شده‌اند. قطعه سالم (خط دوم) فقط یک باند نشان می‌دهد که با کاوشگر هیبرید شده است. خطوط ۳، ۴ و ۵ بوسیله *Eco*RI (E) ، *Pst*I (P) و *Bam*HI (B) برش داده شده‌اند. اندازه قطعات زیر هر خط در ژل a مشخص شده‌اند. نتایج اتورادیوگرافی نشان می‌دهد که کاوشگر با دو باند برش داده شده توسط *Eco*RI و*Bam*HI هیبرید شده است. بنابراین کلون بایستی جایگاه‌های داخلی برای این آنزیم ها داشته باشد. برش با آنزیم *Pst*I فقط یک قطعهٔ kb 7 را نشان می‌دهد. این کلون ممکن است یک گزینه مناسب جهت انجام ساب‌کلون یا همسانه‌سازی مجدد باشد، زیرا احتمالاً ژن مورد نظر به‌طور کامل درون این قطعه قرار گرفته است.

تکنیک بلاتینگ بدون نیاز به جداسازی توالی‌ها می‌تواند روشی مفید برای تعیین میزان یک توالی خاص در یک نمونه باشد. اغلب این روش برای اندازه گیری سطوح رونویسی در مطالعات بیان ژن استفاده می‌شود.

در زمینهٔ انجام روش بلاتینگ، گوناگونی بسیاری وجود دارد. اگر نمونه‌های اسید نوکلئیک الکتروفورز نشده، اما روی فیلتر نیتروسلولز لکه‌گذاری شوند، می‌توان برای هیبریداسیون نمونه‌ها، لکه‌گذاری نورتون و ساترن انجام داد. این تکنیک به عنوان لکه گذاری نقطه‌ای[1] نیز شناخته می شود و به‌طور اختصاصی جهت دستیابی به داده‌های کمی در مطالعات ژنی مفید است. در بعضی از

[1]. Dot blotting

دستگاه‌ها اسید نوکلئیک به جای اینکه به‌صورت نقطه‌ای لکه‌گذاری شود درون یک شیار یا شکاف کوچک قرار داده می‌شود. تعجب نکنید این روش لکه‌گذاری شیاری[1] نامیده می‌شود! آخرین تکنیک شناخته شده لکه‌گذاری وسترن[2] نام دارد که عبارت است از انتقال ملکول‌های پروتئین جدا شده توسط الکتروفورز به یک غشاء نایلونی. تفکیک ملکول‌های پروتئین در این روش اغلب با SDS- PAGE (الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید تحت شرایط دناتوره شده) انجام می‌شود. در صورت وجود آنتی‌بادی مناسب، وسترن بلات می‌تواند پروتئین را به صورت اختصاصی شناسایی کند.

غشای نیتروسلولزی حاوی پروتئین‌های تثبیت شده توسط آنتی‌بادی اختصاصی به منظور ردیابی پروتیئن مورد نظر، با روشی مشابه غربالگری ایمونولوژیکی پلاک‌ها در کتابخانه‌های بیانی کاوش می‌شوند. گاهی وسترن بلات می‌تواند جهت سنجش مقدار یک پروتئین خاص در سلول در هر زمان مورد استفاده قرار گیرد. با مقایسه داده‌های دیگر (مانند مقدار mRNA و یا فعالیت آنزیمی) این امکان به وجود می‌آید که تصویری از چگونگی بیان و کنترل متابولیکی پروتئین بدست آید.

۸-۵-۴) توالی‌یابی DNA

پیشرفت روش‌های سریع توالی‌یابی DNA در بخش ۳-۷ به طور اختصار توضیح داده شد. به طور کلی این کار به یک روش روزمره و معمول در آزمایشگاه‌هایی که همسانه‌سازی در آن‌ها صورت می‌گیرد، تبدیل شده است. توالی‌یابی یک ژن، اطلاعات مفید فراوانی را درباره توالی‌های کد شونده، نواحی کنترلی و ویژگی‌های دیگر مثل توالی‌های همپوشان را فراهم می‌آورد. بنابراین برای تعیین خصوصیات یک ژن، ضرورتاً نیازمند توالی‌یابی DNA است. لذا به منظور دستیابی به کارایی بیشتر، اتخاذ یک استراتژی مناسب ضروری است. پیچیدگی استراتژی توالی‌یابی به عوامل متعددی بستگی دارد که مهمترین آن‌ها طول قطعه‌ای است که باید توالی‌یابی شود. بیشتر روش‌های توالی‌یابی دستی قادر بودند که قطعات ۴۰۰-۳۰۰ نوکلئوتیدی را از ژل بخوانند. اگر طول DNA تنها چند صد جفت نوکلئوتید باشد شاید در یک مرحله قابل توالی‌یابی باشد. اما اگر DNA چند هزار جفت نوکلئوتید طول داشته باشد توالی‌یابی آن دشوارتر خواهد بود.

اساساً از دو روش در پروژه‌های توالی‌یابی بزرگ استفاده می‌شود که در شکل ۷-۳ به اختصار بیان شده است. در روش اول توالی‌یابی تصادفی و یا شاتگان[3] و در روش دوم یک استراتژی منظم که در آن مکان هر قطعه قبل از توالی‌یابی مشخص است استفاده می شود. در روش توالی‌یابی شاتگان

---

1. Slot blotting
2. Western blot
3. Shotgun

ابتدا قطعات تصادفی تولید و سپس توالی‌یابی می‌شوند. ساخت توالی کامل بستگی به این دارد که همپوشانی کافی بین قطعات توالی‌یابی شده وجود داشته باشد. این امر کامپیوتر را قادر می‌سازد که توالی‌یابی مربوط رابا داده‌های خام را تطبیق دهد.

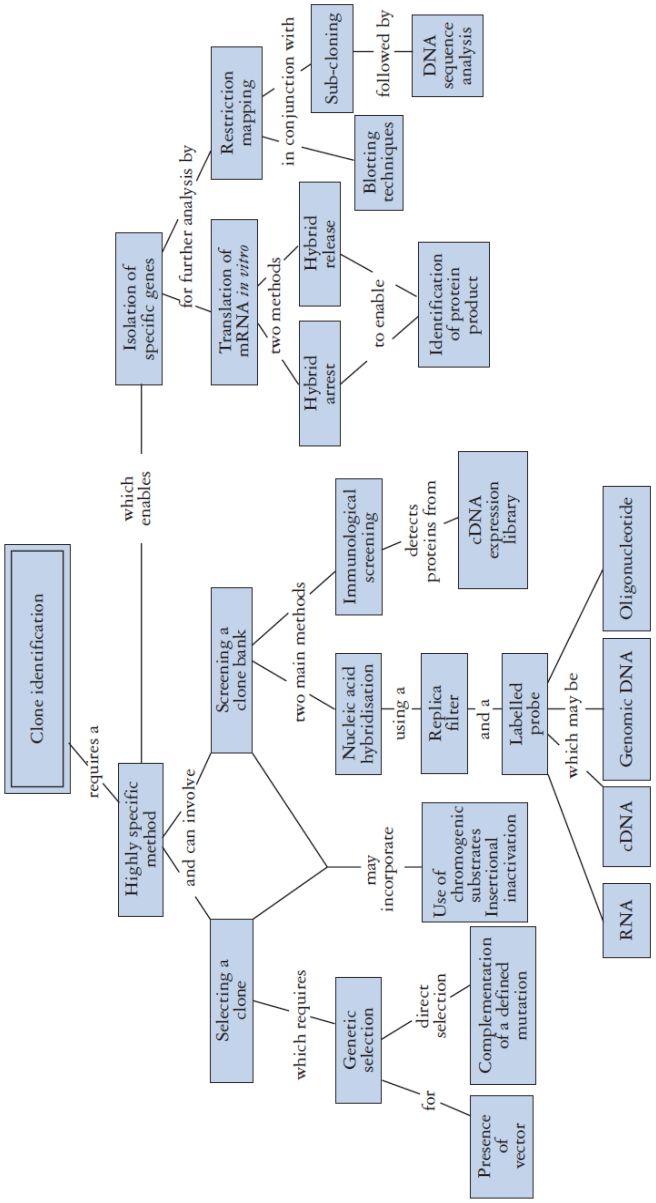
اگر هدف مطالعه ساختار ژن باشد معمولاً تعیین توالی یک قطعه کلون شده ضروری است. توالی‌یابی می‌تواند از پروژه‌های توالی‌یابی با مقیاس کوچک شامل یک ژن تا توالی‌یابی کل ژنوم باشد.

استراتژی توالی‌یابی منظم معمولاً از روش توالی‌یابی قطعات تصادفی کارآمدتر است. راه‌های محتمل متعددی برای ایجاد قطعات مشخص DNA به منظور توالی‌یابی وجود دارند. نمونه‌هایی شامل ۱- جداسازی و کلون کردن قطعات برشی معین و ۲- تولید مجموعه‌ای از کلون‌ها که توالی هدف به وسیلهٔ نوکلئازها حذف شده است، از جمله موارد فوق می‌باشند. اولین ضرورت برای ایجاد یک نقشه برش آنزیمی دقیق کلون اصلی، استفاده از قطعات برش داده شدهٔ مشخص است. با استفاده از این روش، قطعاتی که اندازه مناسبی دارند شناسایی شده و در وکتورهای تعیین توالی مانند M13 یا pBluescribt مجدداً کلون می‌شوند. هر کلون با روش دای دئوکسی[1] توالی‌یابی می‌شود (بخش ۳-۷-۴ را ببینید). هر دو رشته DNA باید به صورت مستقل توالی‌یابی شوند، به طوری که بتوان هر توالی غیر عادی را کشف و تشخیص داد و در صورت لزوم، مجدداً توالی‌یابی کرد. در نهایت توالی کامل با استفاده از یک برنامه کامپیوتری مناسب مونتاژ می‌شود. اگر قطعات همپوشان برای همسانه‌سازی مجدد جداسازی شوند این کار ساده‌تر می‌شود زیرا نواحی همپوشان باعث شناسایی راحت‌تر توالی‌های مجاور می‌شوند.

با استفاده از روش‌های مناسب و دقت در جزئیات، امکان دستیابی به اطلاعات دقیق در مورد توالی های اکثر قطعات کلون شده فراهم شده است. تعیین توالی یک قطعه DNA بلند خیلی آسان نیست، اما در حال حاضر یک بخش جدایی ناپذیر از فناوری دست‌ورزی ژن است که اکثر پروژه‌های همسانه‌سازی ژن، شامل انجام توالی‌یابی می‌باشند. فناوری تا جایی پیشرفت کرده است که می‌توان کل ژنوم را نیز توالی‌یابی کرد، در واقع این امر یک عصر جدید از ژنتیک مولکولی محسوب می‌شود. این جنبه از تعیین توالی در فصل ۱۰ بیشتر مورد بحث قرار می‌گیرد.

---

1. Dideoxy



نقشهٔ مفهومی فصل هشتم

فصل نهم: بیوانفورماتیک

اهداف:

* تعریف و قلمرو بیوانفورماتیک؛
* کاربرد کامپیوتر در بیوانفورماتیک؛
* تولید و استفاده از داده‌های بیولوژیک؛
* تأثیر بیوانفورماتیک بر علم بیولوژی.

خلاصه فصل / نتایج یادگیری

بعد از خواندن این فصل به اطلاعات زیر دست خواهید یافت:

* تعریف واژه بیوانفورماتیک؛
* گرایش‌های بیوانفورماتیک و قلمرو این موضوع؛
* کاربرد کامپیوتر در آنالیز داده‌های بیولوژیکی؛
* تولید و کاربرد داده‌های بیولوژیکی؛
* پایگاهای اسید نوکلئیک؛
* پایگاهای اطلاعاتی پروتئین؛
* بکارگیری دانش بیوانفورماتیک به عنوان ابزاری برای تحقیق.

لغات کلیدی:

بیوانفورماتیک، علم کامپیوتر، زیست شناسی مولکولی، شبکه گسترده جهانی، uniform resource locator، فناوری اطلاعات، مجموعه داده‌های بیولوژیکی، کشت درون موجود زنده، کشت روی محیط غیر زنده، *in silico*، اطلاعات توالی برای اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها، مخزن داده‌ها، استخراج داده‌ها، استخراج موضوع، سخت افزار کامپیوتر، نرم افزار، مدیریت پایگاه داده‌ای هماهنگ، سازمان‌دهی، تلفیق، تفسیر کردن، پایگاه داده‌ای اولیه، پایگاه داده‌ای ثانویه، باکتریوفاژ phi-X174، باکتریوفاژ لامبدا، آزمایشگاه زیست شناسی مولکولی اروپا، بانک ژن، بانک داده‌ای DNA ژاپن، همکاری پایگاه داده‌ای توالی نوکلئوتیدی بین‌المللی، بانک EMBL، موسسه بیوانفورماتیک اروپا، مرکز ملی برای اطلاعات بیوتکنولوژی، موسسه ملی ژنتیک، مگابیس، گیگابیس، Edman degradation، اسپکترومتری توده، UniProt، منبع اطلاعات پروتئین، SwissProt، Uniprot K، GIGO effect، single-pass sequence data، داده‌های توالی خاتمه یافته ، پروتکل انتقال فایل (FTP) ، Ensembl، Vega، Entrez Mapview.

در بخش پایانی قسمت دوم کتاب، نگاهی به مبحث بیوانفورماتیک[1] می‌اندازیم که این موضوع به عنوان یک رشته اصلی در حال گسترش می‌باشد و تلفیقی از علوم کامپیوتر و زیست شناسی مولکولی است. در هنگام نوشتن مقدمه درباره بیوانفورماتیک، دو مشکل وجود داشت. مشکل اول (همان طور که اغلب اتفاق می‌افتد) اتخاذ تصمیم در مورد این که چه مقدار جزئیات برای حصول یک دید مناسب درباره موضوع کافی است. دومین مشکل اندکی متفاوت است و احتمالاً میتواند تفسیر از چگونگی توسعه بیوانفورماتیک را نشان دهد. به دلیل طبیعت این سیستم، بیشتر اطلاعات درباره بیوانفورماتیک در شبکه گسترده جهانی[2] یافت می‌شود. این شبکه نه تنها در زمینه حمایت از اطلاعات نقش دارد بلکه داده‌های محوری حقیقی را که بیوانفورماتیک بر اساس آن پایه‌ریزی شده را مورد استفاده قرار می‌دهد. بنابراین چگونه می‌توانیم بدون آن‌که لیست ساده‌ای از آدرس پایگاه‌های داده‌ای (که URL[3] نامیده می‌شود) را مرتب کنیم به این مهم دست یابیم؟

بیوانفورماتیک شامل استفاده از علم کامپیوتر برای ذخیره‌سازی، سازماندهی و تفسیر اطلاعات بیولوژیکی به شکل داده‌های توالی می‌باشد. شبکه گسترده جهانی به طور گسترده برای نشر و اشتراک گذاری اطلاعات در جامعه علمی جهانی استفاده می‌شود.

در تلاش برای پاسخ به این پرسش ، تلاش کرده‌ام تا به‌جای پرداختن به جزئیات کامل بعضی از موضوع‌ها، تنها برخی از مهم‌ترین مفاهیم و روش‌های اصلی راذکر کنم . متون و پایگاه‌های اطلاعاتی عالی متعددی وجود دارند که اطلاعات دقیقی درباره بیوانفورماتیک ارائه می‌دهند و اطلاعات موجود در این پایگاه‌ها می‌تواند هنگامی‌که اطلاعات مقدماتی از یک موضوع به دست آمده باشد، بسیار مفید واقع شود. به طور حتم لیست‌هایی از URL وجود دارد اما تلاش کرده‌ام تا این‌ها را به برخی سایت‌های کلیدی ارجاع دهم که خواننده علاقمند را قادر به شروع کار نماید (برای مثال جدول ۹-۱ را ببینید). بهترین راه برای یادگیری بیشتر در مورد موضوع بیوانفورماتیک، تفحص در این است که چطور گسترش این علم بر مبنای استفاده از داده‌ها و مدیریت روش‌ها، موجب تغییر پایگاه‌های داده‌ای بیولوژیکی از نظر سطح پیچیدگی و سهولت استفاده از آن شده است. در این فصل نگاهی به بیوانفورماتیک می‌اندازیم و در بخش ۳، هنگامی‌که برخی از کاربردهای فناوری دست‌ورزی ژن را بررسی می‌کنیم، خواهیم دید که چگونه بیوانفورماتیک اثر مهمی روی بخش‌های متعدد علوم زیستی می‌گذارد.

---

1. Bioinformatics
2. World Wide Web, WWW
3. Uniform resource locators

۹-۱) بیوانفورماتیک چیست؟

بیوانفورماتیک را می‌توان به‌طور ساده، استفاده از تکنولوژی اطلاعات[1] برای تجزیه و تحلیل مجموعه داده‌های بیولوژیکی تعریف کرد؛ بیوانفورماتیک رشته‌های علوم زیستی و علوم کامپیوتر را به هم متصل می‌کند، اگر چه تعیین محدوده بیوانفورماتیک مشکل می‌باشد. توسعه گرایش‌های بین رشته‌ای امری عادی است به طوری که این گرایش‌ها نوظهور بوده و همان طور که مشخص است تاریخچه طولانی نداشته و معمولاً مرزهای تحقیق را به سمت حوزه بیوانفورماتیک سوق می‌دهند. زمانی که دو موضوع مانند رشته‌های علوم زیستی و کامپیوتر به سرعت در حال توسعه هستند، سنجش همزمان آن‌ها می‌تواند هیجان انگیز و در عین حال گیج‌کننده باشد.

استفاده از فناوری اطلاعات به‌منظور ذخیره‌سازی و سامان‌دهی توالی‌ها به وسیله یک شبکه بین‌المللی از مراکز پیشرفته با بیوانفورماتیک در ارتباط است به طوری که هر کدام از این مراکز دارای نقش ویژه در نگه‌داری و توسعه اطلاعات هستند.

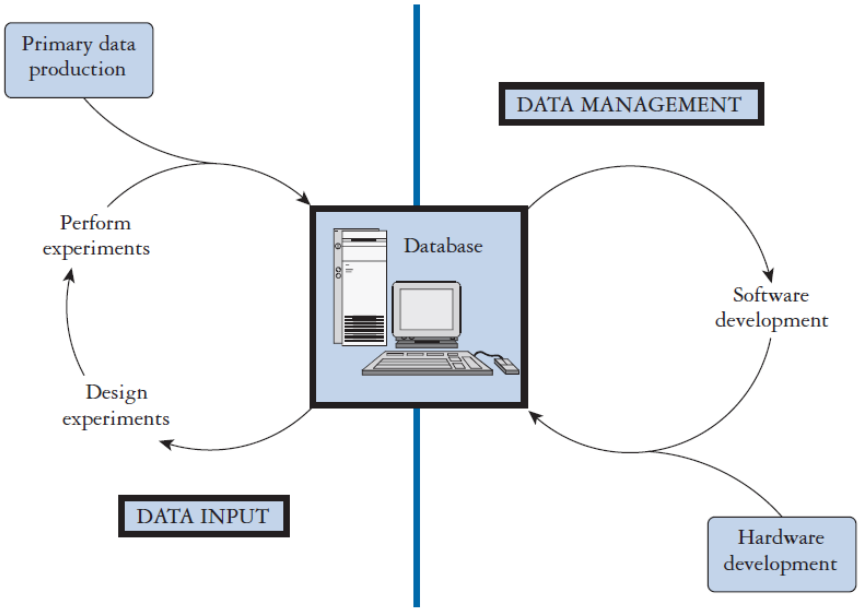
جدول ۹-۱) پایگاه‌های اطلاعاتی مهم در حوزه بیوانفورماتیک

Site/page	URL
European Bioinformatics Institute (EBI)	http://www.ebi.ac.uk/
EBI education site	http://www.ebi.ac.uk/2can/
The Wellcome Trust Sanger Institute	http://www.sanger.ac.uk/
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NCBI education site	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/
Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)	http://www.isb-sib.ch/
The proteomics server (Expert Protein Analysis System) of SIB	http://www.expasy.org/
The Bioinformatics Organisation	http://www.bioinformatics.org/
Bios Scientific Publishers Ltd.	http://www.bios.co.uk/inbioinformatics/

توجه. برای آن‌هایی که می‌خواهند با بیوانفورماتیک آشنا شوند پایگاه‌های آموزشی EMBL و NCBI برای شروع مناسب هستند. سازمان بیوانفورماتیک یک پایگاه مشترک برای استفاده عموم است و اطلاعات مقدماتی مفیدی را ارائه می‌دهد. پایگاه اطلاعاتی Bios حاوی فهرست مفیدی از لینک‌ها در خصوص طیف وسیعی از منابع اطلاعاتی می‌باشد. همه پایگاه‌های اطلاعاتی، پیوندهای متعددی را به پایگاه‌های وابسته دیگر فراهم می‌کنند.

[1]. Iinformation technology

اگرچه تعریف آنچه که بیوانفورماتیک چیست سخت است، اما در واقع تعریف آنچه که بیوانفورماتیک نیست، به‌نسبت آسان‌تر است. بیوانفورماتیک به مفهوم استفاده آسان از کامپیوتر جهت بررسی توالی داده‌ها است. قطعاً استفاده از فناوری اطلاعات برای توسعه بیوانفورماتیک حیاتی می‌باشد، اما در حقیقت بیوانفورماتیک به سرعت به شاخه مهمی از علوم زیستی مدرن با ابزارهای پیچیده برای تجزیه و تحلیل ژن‌ها و پروتئین‌ها در روش‌های *in vivo*، *in vitro* و *in silico* تبدیل شده است. حوزه بیوانفورماتیک طی چند سال گذشته به طور قابل ملاحظه‌ای توسعه یافته است و با کاربردهای تعاملی و پیشگویانه جدید، نقش اصلی را در ذخیره و آنالیز داده‌ها ایفا کرده است. من تلاش کرده‌ام تا عناصر کلیدی بیوانفورماتیک را در شکل ۹-۱ خلاصه کنم.



شکل ۹-۱) مرکز اصلی بیوانفورماتیک، پایگاه داده‌ها است.

دو شاخه اصلی حمایت کننده در این علم، اطلاعات ورودی و اولیه (که در سمت چپ خط عمودی نشان داده شده است) و مدیریت اطلاعات (که در سمت راست خط عمودی نشان داده شده است) است. مدیریت داده‌ها وابسته به توسعه سخت افزار و نرم افزاری سیستم دارد. جهت ورود داده‌ها نیاز به تولید داده است که این کار با روش‌های تجربی از جمله توالی‌یابی DNA انجام می‌شود.

۹-۲) نقش کامپیوتر

کامپیوترها برای آنالیز مجموعه‌های پیچیده داده‌ها از قبیل توالی اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها مناسب هستند. این کار اغلب نیاز به مجموعه‌ای از فعالیت‌های محاسبه‌ای دارد که هرکدام از آن‌ها به تنهایی ممکن است ساده باشد، با وجود این محاسبه فوق ممکن است به هزاران و یا میلیون‌ها بار تکرار نیاز داشته باشد. در نتیجه در این‌جا سرعت و دقت حائز اهمیت است. حتی تجزیه و تحلیل یک توالی کوتاه بدون استفاده از رایانه سخت بوده و همیشه احتمال اشتباه به دلیل بد خواندن توالی و یا عدم تمرکز وجود دارد. رایانه‌ها خسته نمی‌شوند و اگر به درستی برنامه‌ریزی شوند معمولاً اشتباه نمی‌کنند و به شکل دیجیتال می‌توانند اطلاعات زیادی را ذخیره کنند. پیدایش توالی‌یابی ژنوم به‌عنوان یک راهکار واقع بینانه موجب توسعه هم‌زمان سیستم‌های فناوری اطلاعات در جهت همراهی با خروجی پروژه‌های توالی‌یابی در مقیاس وسیع شد و بنابراین، علم بیوانفورماتیک به نوبه خود به طور کامل به‌عنوان یک رشته پایه گذاری شد. اصطلاحات جدید مانند مخزن اطلاعات[1] و معدن داده‌ها[2] (پایگاه‌های اطلاعاتی متنوع) به منظور توصیف جنبه‌های بیوانفورماتیک ابداع شد و به همراه معدن منابع[3] نقش حمایت کنندگی مهمی ایفا می‌کنند.

طی ۱۵-۱۰ سال گذشته، پیشرفت‌های حیرت انگیزی در زمینه سخت افزارهای کامپیوتر مبتنی بر سرور و کامپیوترهای خانگی رخ داده است. به این مفهوم که بیوانفورماتیک یک امکان ویژه برای کسانی خواهد بود که به امکانات زیاد کامپیوتری دسترسی ندارند. حتی یک دستگاه کامپیوتر نسبتاً ارزان نیز جهت دسترسی به پایگاه‌های داده‌ای مختلف حاوی اطلاعات، به اندازه کافی قوی خواهد بود و دیگر الزامات یک سرور داخلی از نظر هزینه‌های خریداری و نگه‌داری یک محدودیت تلقی نخواهد شد. بنابراین دیگر ضرورتاً هیچ محدودیتی در زمینه دسترسی و استفاده از اطلاعات از نقطه نظر یک سخت افزار نخواهد بود. نرم افزار، همچنان که انتظار می‌رود، در جهت افزایش قدرت محاسبه و نیازهای مرتبط با ماهیت داده‌هایی که تولید می‌شوند، رشد و توسعه یافته است. بیشتر نرم افزارهایی که برای دستکاری و بررسی داده‌ها مورد نیاز است در حال حاضر توسط سازمان‌های مختلف که شبکه بیوانفورماتیک را به پیش می‌برند به طور مجانی در دسترس عموم قرار گرفته است. اگرچه برخی از بسته‌های نرم افزاری توسط شرکت‌های مختلف به طور تجاری به فروش می‌رسند.

سخت افزار رایانه تا جایی توسعه یافت که رایانه‌های معمولی به قدر کافی قدرتمند شدند که به-عنوان واسط بین محقق و پایگاه‌هایی مختلف داده‌های توالی و برنامه‌های مورد بررسی نقش ایفا

---

[1]. Data warehouse
[2]. Data mining
[3]. Text mining

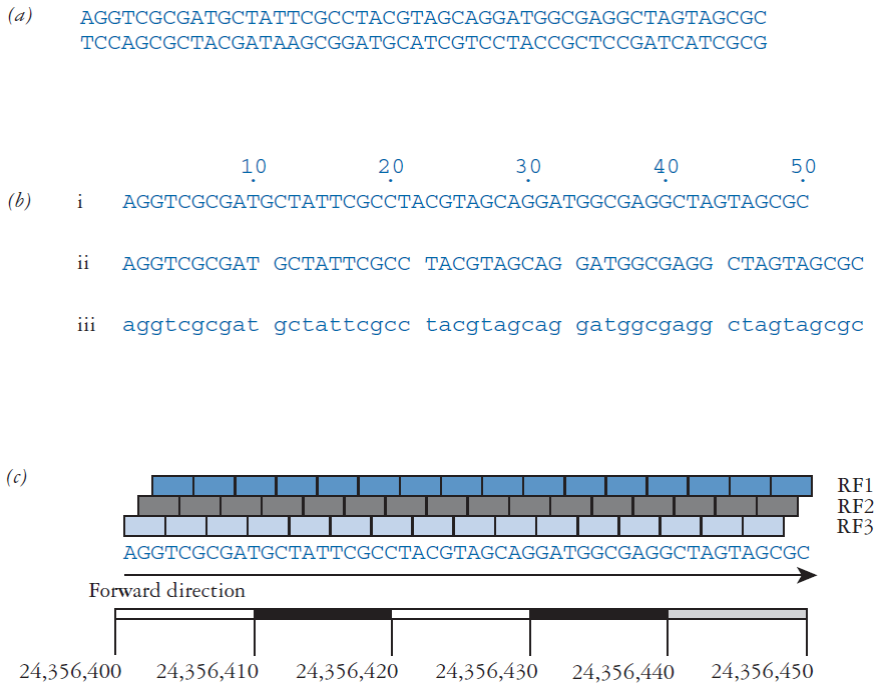
نماید. معمولاً نرم افزارها و داده‌های نوکلئوتیدی به‌صورت رایگـان در دسـترس جامعـه علمـی قـرار دارند.

۹-۳) مجموعه داده‌ای بیولوژیکی

می‌توان استدلال کرد که بیوانفورماتیک با ظهور روش‌های سریع توالی‌یابی DNA در اواخر دهـه ۱۹۷۰ شروع به پیشرفت کرد (بخش ۳-۷ را ببینید). تا آن زمان میـزان کسـب اطلاعـات از تـوالی بیولوژیکی محدود بود، بنابراین فشار نسبتاً اندکی روی توسعه روش‌هـای ذخیـره‌سـازی و تجزیـه و تحلیل مشترک جهت بررسی (کاهش محـدودیت‌هـا) ایـن اطلاعـات وجـود داشـت. همچنـان کـه روش‌های توالی‌یابی به وجود آمد و به طور گسترده‌تر استفاده شـد، سـرعت تولیـد داده‌هـا نیـز بـه وضوح افزایش یافت و بنابراین نیاز به مدیریت پایگاه‌های داده‌ای هماهنگ بیشـتر شـد. ایـن نیـاز را می‌توان با نگاه کردن به یک مثال ساده با استفاده از برخی داده‌های توالی DNA نشان داد (شـکل ۹-۲). این شکل یک توالی ۵۰ نوکلئوتیدی را نشان می‌دهد که به اشکال مختلـف ردیـف شـده‌انـد. حتی اگر طول توالی همین اندازه باشد و اگر پردازش اطلاعات مد نظر باشد واضح است که در ایـن خصوص نیازهای متعددی وجود خواهد داشت که عبارتند از:

* نیاز به تولید و کسب اطلاعات دقیق؛
* ارائه منطقی و شفاف توالی در فرمت قابل مشاهده؛
* تفسیر توالی نوکلئوتیدی به منظور فراهم نمودن جهت و شناسایی ویژگی‌های توالی؛
* استفاده پایدار از تفسیر توالی به وسیله کاربرها یا تولید کنندگان مختلف.

به دلیل این که پایگاه‌های داده‌ای در حال حاضر به جای صدها نوکلئوتید بـا بیلیـون‌هـا نوکلئوتیـد سروکار دارند، واضح است که سازماندهی، تلفیق و تفسیر این اطلاعات کار بزرگی محسوب می‌شود. در حقیقت این توالی به نوبه خود یکی از ساده‌ترین اجزا از نظر پیچیدگی سازمانی می‌باشد.



شکل ۹-۲) a- یک توالی کوتاه DNA دو رشته‌ای نشان داده شده است. b- سه روش مختلف نوشتن توالی (i، ii و iii) نشان داده شده است. طبق قرار داد تنها یک رشته DNA نوشته شده است. در روش اول (i) در بالای هر ده نوکلئوتید شماره نوشته می‌شود. در روش دوم (ii) هر ده نوکلئوتید با یک فاصله از هم جدا می‌شوند و در روش سوم (iii) نیز هر ده نوکلئوتید با یک فاصله از هم جدا می‌شوند. در روش سوم از بروز هر گونه اشتباه بین G و C جلوگیری می‌کند، چون g و c به راحتی از یکدیگر قابل تمایز هستند. c- نسخه کامل از توالی نوکلئوتیدی با سه قاب خواندنی که به صورت RF1، RF2 و RF3 مشخص شده است. شماره‌ها نشانگر تعداد نوکلئوتید از ابتدای کروموزوم می‌باشد. بنابراین ناحیه مشخص شده در این تصور حدود ۲۴ میلیون جفت باز از ابتدای کروموزوم را نشان می‌دهد.

مدیریت پایگاه داده‌ای به سطح بالایی از هماهنگی به‌منظور ایجاد روش‌های مشترک برای نگهداری، سامان‌دهی و تفسیر اطلاعات نیاز دارد. وضعیت کنونی توسعه شبکه بیوانفورماتیک نشان‌گر یک موفقیت عظیم است که از نظر اهمیت، نظیر پروژه ژنوم انسان می‌باشد.

واضح است که راه‌های متعددی برای تلفیق و ذخیره اطلاعات مربوط به توالی موجود است، لذا پایگاه‌های اطلاعاتی متعددی نیز وجود دارد. دسته‌بندی پایگاه‌های اطلاعاتی به دو طبقه اصلی مفید خواهد بود. اطلاعات توالی بدست آمده آزمایشگاهی، اغلب پایگاه‌های داده‌ای اولیه نامیده

می‌شوند. امروزه پایگاه‌های داده‌ای اصلی و اولیه، پایگاه‌های داده‌ای مربوط به توالی نوکلئیک اسید می‌باشند، هر چند به یاد داشتن این نکته جالب است که توالی‌های پروتئین در اوایل دهه ۱۹۶۰ تلفیق شدند و بنابراین پایگاه‌های داده‌ای پروتئین در واقع پایگاه‌های داده‌ای قبل از نوکلئیک اسید در مقیاس وسیع هستند. پایگاه‌های داده‌ای ثانویه پایگاه‌های متفاوتی هستند که به طریقی از پایگاه‌های اطلاعاتی اولیه مشتق شده‌اند. این پایگاه‌ها ممکن است نشان دهنده مجموعه‌ای از توالی‌های مرتب شده یک موجود یا گروه فیلوژنتیک بوده و یا ممکن است بر پایه پروژه‌های ژنوم بنا نهاده شده باشند. از طرفی دیگر، توالی‌های پروتئین به‌دست آمده، داده‌های مربوط به بیان ژن یا داده‌های محدود به گروه ویژه‌ای از اسیدهای نوکلئیک (برای مثال توالی RNA ریبوزومی) را می‌توان به‌عنوان مبنایی برای ایجاد پایگاه‌های اطلاعاتی ثانویه در نظر گرفت.

پایگاه‌های داده‌ای را می‌توان به پایگاه‌های داده‌ای اولیه و ثانویه طبقه‌بندی نمود. هر چند اهمیت تفکیک بین این گروه‌ها کم شده است به‌طوری که با پیشرفت فناوری پایگاه داده، تفسیر داده‌ها خیلی پیچیده‌تر شده است.

۹-۳-۱) تولید و سازماندهی اطلاعات

تولید اطلاعات یک بخش محوری در هر روش علمی محسوب شده و هسته اصلی بیوانفورماتیک را نیز تشکیل می‌دهد. همان طور که قبلاً دیده‌ایم، توالی‌یابی DNA بطور اساسی به‌عنوان اولین بخش برای آغاز تولید داده‌ها در مقیاس گسترده نیاز جدی پایگاه‌های بیولوژیکی است. نقاط عطف مهم با توالی‌یابی ژنوم‌های باکتریوفاژهای phi-x174 (۵۳۸۶ جفت باز، ۱۹۷۷) و lambda(۴۸۵۰۲ جفت باز، ۱۹۸۲) حاصل شد. طی این دوره کسانی که در زمینه تعیین توالی فعالیت می‌کردند فهمیدند که اگر حصول حداکثری سودمندی از داده‌های توالی‌های تعیین شده مورد نظر باشد، استفاده از روشی برای مدیریت هم‌زمان پایگاه‌های داده‌ای ضروری است. ما می‌توانیم توسعه پایگاه‌های داده‌ای را با نگاه مختصری به دو نوع عمده از آنها نشان دهیم. پایگاه‌های که با داده‌های توالی نوکلئیک اسید یا پروتئین سروکار دارند.

ضرورت مدیریت پایگاه داده‌ای هماهنگ بعد از ابداع روش‌های توالی‌یابی سریع DNA و شروع تولید مقادیر قابل‌توجهی از داده‌های مربوط به توالی بدیهی بود.

۹-۳-۲) پایگاه‌های داده‌ای اسیدنوکلئیک

ایجاد اولین پایگاه‌های داده‌ای اسید نوکلئیکی بر اساس "آزمایشگاه زیست‌شناسی مولکولی اروپا (EMBL) " در سال ۱۹۸۰ بنا نهاده شد. بزودی پس از آن در آمریکا "بانک ژن[1]" به‌وجود آمد و

[1]. GenBank

در سال ۱۹۸۰ "بانک داده‌ای DNA ژاپن (DDBJ) " شروع به تلفیق اطلاعات نمود. در حال حاضر این سه ایجاد کننده پایگاه داده‌ای با همکاری پایگاه بین المللی توالی نوکلئوتید (INSDC)، نقش اصلی درهمکاری بین المللی را به وجود آورده‌اند. پایگاه‌های داده‌ای EMBL به عنوان پایگاه توالی نوکلئوتیدی EMBL (یا به طور ساده‌تر EMBL-Bank) شناخته می‌شود و به وسیله موسسه بیوانفورماتیک اروپا (EBI)[1] حفظ و اداره می‌شود. در آمریکا مرکز ملی برای اطلاعات بیوتکنولوژی(NCBI) [2] بانک ژن را اداره کرده و بانک داده‌ای DNA ژاپن(DDBJ) [3] توسط مؤسسه ملی ژنتیک ژاپن اداره می‌شود. اطلاعات بیشتر درباره این پایگاه داده‌ای را می‌توان در وب سایت‌های فهرست شده در جدول ۹-۲ کسب کرد.

همکاری بین‌المللی پایگاه‌های داده‌ای توالی نوکلئیک اسید (INSDC) [4] برای نظارت بر فعالیت‌های سه پایگاه داده‌ای توالی عمده اولیه همکاری می کند.

---

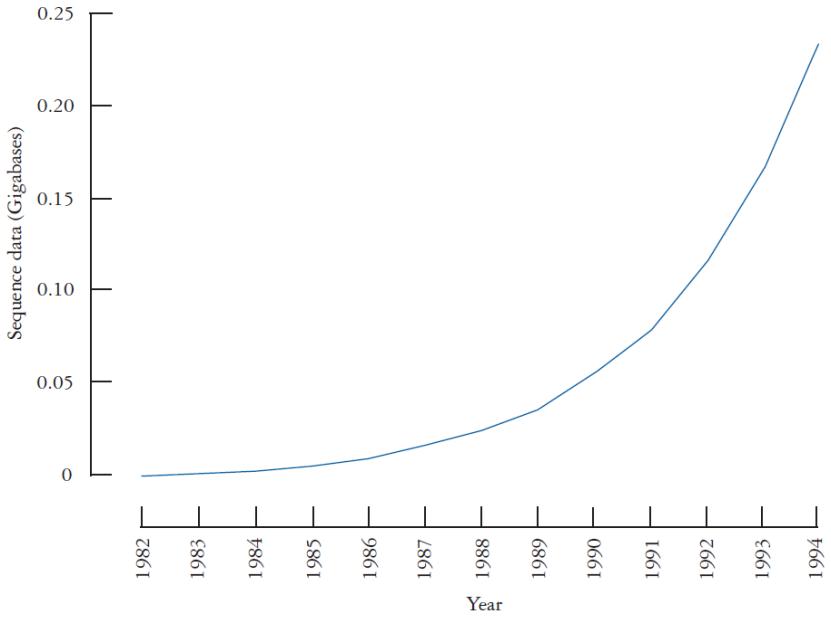
1. European Bioinformatics Institute, EBI
2. National Center for Biotechnology Information
3. .DNA Data Bank of Japan
4. International Nucleotide Sequence Database Collaboration, INSDC

جدول ۹-۲) وب سایت‌های پایگاه داده‌ای توالی نوکلئیک اسید

Site/page	URL
Nucleic acid sequence database sites	
International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC)	http://www.insdc.org/
EMBL Nucleotide Sequence Database (EMBL-Bank)	http://www.ebi.ac.uk/embl/
GenBank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/
DNA Data Bank of Japan	http://www.ddbj.nig.ac.jp/
Genome sequencing and other database sites	
The Wellcome Trust Sanger Institute	http://www.sanger.ac.uk/
Databases at the European Bioinformatics Institute (EBI)	http://www.ebi.ac.uk/Databases/
Databases at the National Center for Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Databases/

یکی از برجسته‌ترین ویژگی‌های پایگاه‌های داده‌ای نوکلئیک اسید، افزایش تعداد توالی از زمانی است که اولین توالی‌ها به طور دستی در اوایل دهه ۱۹۸۰ وارد شد. رشد اولیه داده‌های ارایه شده در پایگاه‌های جهانی داده‌های توالی نوکلئیک اسید در شکل ۹-۳۳ نشان داده شده است. یک نرخ رشد جالب توجه نشان داده شده که مجموع توالی‌های ارایه شده در اواسط دهه ۱۹۹۰ به حدود ۲۵۰ میلیون باز (مگا باز) می‌رسد. در این زمان توالی‌یابی DNA از پروژه‌های با مقیاس کوچک به سمت پروژه‌های با مقیاس خیلی بزرگتر حرکت کرد و بنابراین سرعت دستیابی به داده‌ها نیز بیشتر شد. رشد اخیر در داده‌های توالی نوکلئوتیدی ارائه شده (یعنی طی ۱۰ سال گذشته) در تصاویر ۹-۴ و ۹-۵ نشان داده شده است. شکل ۹-۴ داده‌های ثبت شده توسط بانک ژن را نشان می‌دهد. علاوه بر داده‌های مربوط به توالی نوکلئوتیدی، این شکل نحوه افزایش استفاده از این داده‌ها و نیز تحقیق‌هایی که روزانه روی آنها انجام می‌شود را نشان می‌دهد و (همچنان که انتظار می‌رود) این میزان استفاده از پایگاه‌های داده‌ای به خوبی رشد پایگاه‌های داده‌ای را نیز نشان می‌دهد. شکل نهایی (شکل ۹-۵) رشد پایگاه‌های داده‌ای نوکلئیک اسید را نشان می‌دهد که داده‌های مربوطه به

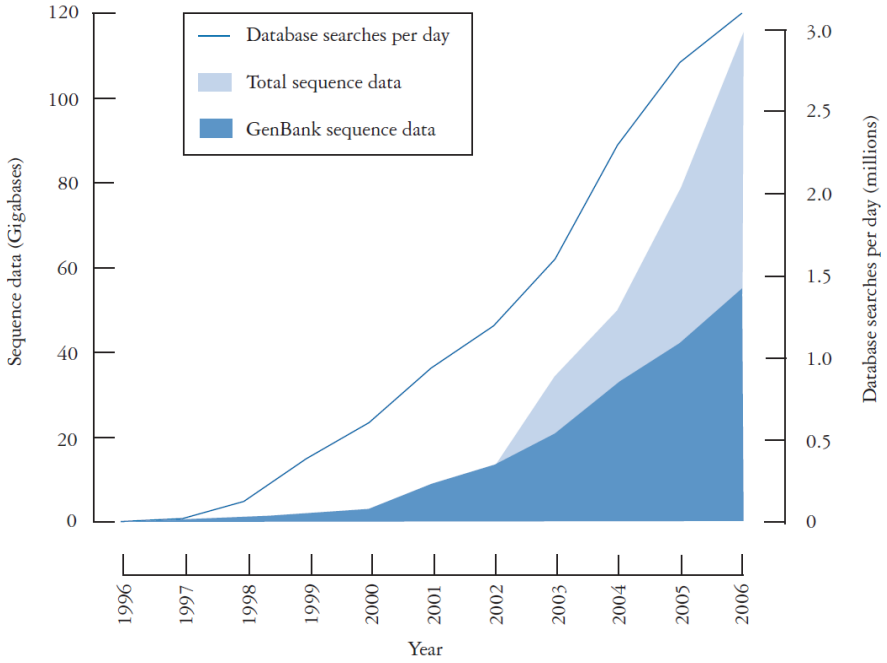
وسیله EMBL ثبت شده‌اند. این شکل کل توالی‌های موجود در پایگاه‌های داده‌ای مختلف را نشان می‌دهد که به وسیله توالی‌های ارایه شده به یکی از سه پایگاه داده‌ای عمده (DDBl, EMBL, GenBank) ایجاد شده است. تبادل روزانه داده‌ها بین این سه بانک داده‌ای به این معنی است که یک نسخه به روز شده از کل پایگاه داده‌ای، در هر لحظه زمانی در دسترس است. پایگاه داده‌ای از نقطه ۱۰۰ ملیلیارد نوکلئوتید (گیگابیس[1]) در سپتامبر ۲۰۰۵ فراتر رفت. یک موفقیت عجیب با همکاری بین‌المللی گسترده که در یک دوره زمانی ۲۵ ساله حاصل شد. در ماه اکتبر ۲۰۰۶، پایگاه داده‌ای بیش از ۱۴۸ میلیارد نوکلئوتید را تقریباً در ۸۱ میلیون ورودی از حدود ۲۷۳۰۰۰ موجود زنده را در خود جای داد. شما ممکن است مایل باشید آمارهای حال حاضر را که در این متن آمده، چک کنید!



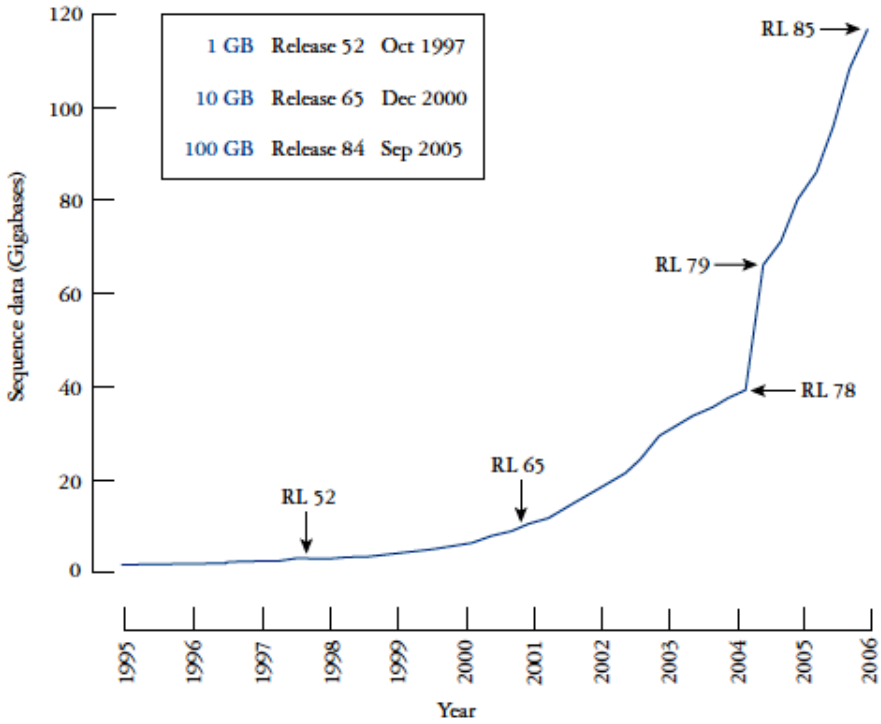
شکل ۹-۳) رشد اولیه ورود توالی اسیدنوکلئیک در پایگاه اطلاعاتی دنیا. ورود اطلاعات به صورت تجمع توالی داده‌ها به میلیون نوکلئوتید در دوره زمانی بین ۱۹۸۲-۱۹۹۴ ارائه شده است.

رشد پایگاه داده‌ای توالی اسیدنوکلئیک گردآوری شده تا مرز ۱۰۰ میلیارد نوکلئوتید، در سپتامبر ۲۰۰۵ شگفت‌آور است.

[1] Gigabase



شکل ۹-۴) میزان رشد بانک ژن از سال ۱۹۹۵. مجموعه اطلاعات و داده‌های نوکلئوتیدی دریافت شده توسط بانک ژن نشان داده شده است. میزان استفاده از اطلاعات درخواست شده توسط تعداد جستجوها از پایگاه داده‌ها در روز نشان داده شده است. با کسب اجازه تغییراتی در داده‌های ارائه شده توسط NCBI داده شده است (www.ncbi.nih.gov/GenBank).



شکل ۹-۵) رشد پایگاه داده‌ای توالی اسید نوکلئیک EMBL (EMBL-Bank) از سال ۱۹۹۵. نسخه آزاد شده پایگاه داده‌ای با حروف اختصاری RL مشخص شده و نسخه‌های کلیدی ۵۲، ۶۵، ۷۸، ۷۹ و ۸۵ نشان داده شده‌اند. نقاط عطف این نسخه‌ها ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلیون نوکلئوتید (آزاد سازی شماره‌های ۵۲، ۶۵ و ۸۵) و یک دوره رشد استثنایی پایگاه داده‌ای (آزاد سازی داده‌ها بین شماره‌های ۷۸ و ۷۹) نیز نشان داده شده است. این شکل با استفاده از اطلاعات ارائه شده توسط موسسه بیوانفورماتیک اروپا و آزمایشگاه زیست شناسی مولکولی اروپا (EMBL-EBI) رسم شده است. با کسب اجازه از (www.ebi.ac.uk) Hinxton, UK.

۹-۳-۳) پایگاه‌های داده‌ای پروتئین

در بررسی پایگاه‌های داده‌ای توالی پروتئین، تشخیص بین اطلاعاتی که به‌طور مستقیم در پایگاه داده‌ای وارد شده‌اند و توالی‌های پروتئینی به‌دست آمده از اطلاعات پایگاه داده‌ای نوکلئیک اسید که با ترجمه توالی mRNA پیش بینی شده، حائز اهمیت است. روش مستقیم همانند توالی‌یابی اسید نوکلئیک است که در آن داده‌های اولیه از پروتئین مشتق شده و اغلب، تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی و فیزیکی روی آن انجام می‌شود. بنابراین تعیین ویژگی کامل و منطقی پروتئین به همراه تعیین فعالیت بیولوژیکی پروتئین، هدف اصلی کار می‌باشد. با توالی‌های به‌دست آمده نمی‌توان به تغییرات

ایجاد شده در اسیدهای آمینه پی برد و نیز ممکن است توالی به‌دست آمده یک پروتئین عمل کننده در سلول نباشد. یکی از چالش‌های کلیدی برای توسعه دهندگان پایگاه داده‌ای، حصول اطمینان از این واقعیت است که پایگاه‌های داده‌ای بتوانند با همدیگر ارتباط داشته و تا آنجا که ممکن باشد از تبدیل داده‌های پیچیده جلوگیری نمایند.

توالی‌یابی مستقیم پروتئین‌ها اولین بار در سال ۱۹۵۰ به وسیله روش سنتی بنام Edman degredation انجام شد. با این حال، سرعت رشد پایگاه‌های داده‌ای اولیه پروتئین تا حدی کمتر از نوکلئیک اسید بوده است. این امر عمدتاً به دلیل وجود مشکل در تعیین توالی اسید آمینه یک پروتئین است. زیرا توالی‌های اسید آمینه را نمی‌توان مثل ژن‌ها کلون کرد و پروتئین‌ها دارای ساختارهای سه بعدی پیچیده با فعالیت‌های بیولوژیکی وابسته به جنبه‌های ساختاری فراتر از توالی اولیه پروتئین هستند. اگر چه پیشرفت‌های اخیر در شیوه‌های توالی‌یابی پروتئین (برای مثال روش خودکار ادمان، کاربرد طیف سنجی توده) وضعیت را خیلی بهتر کرده است، اما توالی‌یابی DNA کلون شده همیشه داده‌ها را خیلی سریع‌تر از توالی‌یابی واحدهای آمینو اسیدی در یک قطعه پپتید فراهم می‌کند.

اگر چه داده‌های اولیه تولید شده در زمینه تعیین توالی پروتئین از سرعت مشابهی با داده‌های تعیین توالی DNA برخوردار نبود، اما اطلاعات ارزشمندی در زمینه شکل و عملکرد پروتئین در پایگاه‌های داده‌ای مختلف پروتئین در دسترس است.

باوجود محدودیت‌های موجود در به‌دست آوردن توالی پروتئین، پایگاه‌های داده‌ای که در حال حاضر در دسترس هستند، منبع فوق‌العاده با ارزشی برای جامعه زیست‌شناسی محسوب می‌شوند. منبع کلیدی، UniProt است که حاصل همکاری مشترک بین منابع عمده توالی پروتئین در اروپا و آمریکا است. یونی‌پورت در سال ۲۰۰۲ دایر شده که سه شریک اصلی، آن را به‌وجود آورده‌اند. منبع اطلاعات پروتئین (PIR)[1] به میزبانی دانشگاه جرج تاون در آمریکا، به پایگاه داده‌ای سوئیس پورت[2] پیوست و توسعه یافت و توسط موسسه بیوانفورماتیک سوئیس و موسسه بیوانفورماتیک اروپا نگهداری می‌شود. هسته مرکزی یونی‌پورت عبارت از پایگاه داده‌ای UniPark و Uniprot Knowledgebase است که سطح خیلی بالایی از ثبات، دقت و تفسیر توالی‌های ارائه شده را نگهداری می‌کند.

با وجود کاهش اندکی در میزان ورود داده‌ها به پایگاه‌های داده‌ای اسیدنوکلئیک، هنوز هم میزان داده‌های توالی پروتئین موجود قابل ملاحظه است. در زمان نوشتن این مطالب، آخرین میزان توالی

---

1. Protein Information Resource, PIR
2. SwissProt

پروتئین موجود در یونی‌پارک[1] تقریبا ۷/۷ میلیون و در UniProt KB معادل ۳/۵ میلیون توالی می‌باشد. جزئیات بیشتر در مورد یونی‌پورت[2] و اجزا مرتبط با آن را می‌توان در وب سایت‌های فهرست شده در جدول ۹-۳ یافت.

جدول ۹-۳) وب سایت‌های پایگاه داده‌ای توالی پروتئین

Site/page	URL
Database sites	
UniProt – the key gateway site for protein database information	http://www.expasy.uniprot.org/
SwissProt (the SIB protein resource and part of UniProt)	http://www.expasy.org/sprot/
The Protein Information Resource (PIR, hosted by Georgetown University, and part of UniProt)	http://pir.georgetown.edu/pirwww/
Analysis and proteomics sites	
The proteomics server (Expert Protein Analysis System) of SIB	http://www.expasy.org/
The bioinformatics toolbox of the EBI	http://www.ebi.ac.uk/Tools

۹-۴) استفاده از بیوانفورماتیک به عنوان یک ابزار

حوزه بیوانفورماتیک با نگاهی به ساختار پایه‌ای در پایگاه‌های داده‌ای پروتئین و اسیدنوکلئیک مشخص شده است، پرسش واضحی که پیش می‌آید این است که از این اطلاعات چه استفاده‌ای می‌توان کرد؟ در این خصوص مسائل کمی پیچیده‌تر می‌شود! این فقط بخشی از یک فصل است و ارائه یک آنالیز منطقی از طیف وسیعی از فعالیت‌ها که با استفاده از اطلاعات بیوانفورماتیک در چند مرحله مشتق شده، تقریباًغیر ممکن است.

به علاوه با توسعه بیوانفورماتیک، تقریباً هر هفته کاربردها و پیشرفت‌های جدیدی از آن نمایان می‌شود. خواننده علاقه‌مند به راحتی می‌تواند وارد سایت‌ها شده و مانند محققینی که تحقیقات پیشرفته در حوزه بیوانفورماتیک انجام می‌دهند، به تسهیلات مشابهی دسترسی داشته باشد، اگر چه دسترسی به این اطلاعات می‌تواند کمی برای اعضاء جدید گیج کننده باشد. دسترسی آزاد به

[1] Unipark
[2] Uniport

این سایت‌ها یکی از قابلیت‌های مهم شبکه بیوانفورماتیک می‌باشد و یک عامل تعیین کننده عمده در موقعیت کلی این رشته در حوزه کشف‌ها و بینش‌های جدید است.

کاربردهای جدید بیوانفورماتیک به طور کامل توسعه یافته و به صورت آزاد در دسترس جامعه علمی قرار گرفته است.

۹-۴-۱) اثر اینترنت و شبکه گسترده جهانی

به‌طور تقریبی می‌توان گفت که تاریخچه کامپیوتر با فناوری‌های تجزیه و تحلیل و توالی‌یابی DNA هم راستا بوده است. همچنان که در اوایل دهه ۱۹۵۰ بر روی ساختار DNA کار می‌شد، ترانزیستورها نیز توسعه یافتند. اولین ارتباط‌های اینترنتی در سال ۱۹۶۹ برقرار شد که در آن زمان ابزارهای تولید DNA نوترکیب نیز ساخته شد. در اواخر دهه ۱۹۷۰ اولین رایانهٔ شخصی ساخته شد و تکنیک‌های سریع توالی‌یابی DNA نیز اختراع شد. در اوایل دهه ۱۹۹۰، شبکه گسترده جهانی به عنوان یک واقعیت عینی ظهور یافت و در همان زمان توالی‌یابی ژنوم نیز صورت گرفت. بنابراین قلمرو زیست‌شناسی مولکولی از پیشرفت‌های علوم کامپیوتر به خوبی بهره برده است و امروزه جنبه‌های محاسبه‌گری بیوانفورماتیک بخشی از علوم کامپیوتر محسوب می‌شود. در واقع پیشرفت‌های محاسبه‌گری در حال حاضر به جای جنبه‌های بیولوژیکی و تکنیکی موضوع، اغلب به‌عنوان محرک‌های پیشرفت در بیوانفورماتیک مطرح هستند.

علاوه بر پیشرفت‌ها در زمینه سخت‌افزار کامپیوتر، استفاده از اینترنت و شبکه گسترده جهانی برای توسعه سریع بیوانفورماتیک ضروری بوده است. من به یاد دارم که اولین پایگاه داده‌ای منتشر شده بر روی ۴۴ فلاپی دیسک بزرگ بود که هر کدام از این فلاپی‌ها باید جداگانه لود می‌شدند تا بتوان به اطلاعات آن‌ها دسترسی پیدا کرد. امروزه شبکه گسترده جهانی امکان دسترسی به موقع به پایگاه‌های داده‌ای عمده را که به طور مداوم و سریع به روز می‌شوند، فراهم کرده است. ذخیره اطلاعات در سرورهای میزبان به این معنی است که نگه‌داری پایگاه‌های داده‌ای بزرگ در یک سطح محلی مورد نیاز نیست. در دسترس بودن ابزار مقایسه یا جستجو اغلب به صورت یک سرویس مجانی یا یک نرم افزار قابل دانلود مجانی به این معنی است که محققان می‌توانند به اطلاعات و ابزارهای مورد نیاز برای تحقیق دسترسی آنی داشته باشند. این ویژگی دسترسی مجانی یکی از توانمندی‌های مهم شبکه بیوانفورماتیکی مبتنی بر اینترنت است.

اینترنت و شبکه گسترده جهانی از بخش‌های ضروری شبکه بیوانفورماتیک محسوب می‌شوند به طوری‌که پایگاه‌های داده‌ای عمده در سرورهای مهم نگهداری شده و برای رایزنی افراد از طریق اینترنت در دسترس قرار می‌گیرند.

۹-۴-۲) جلوگیری از اثر "GIGO"– آزمون‌های واقعی

ابداع واژه "Garbage in-Garbage out (GIGO)" به‌عنوان یک عبارت کاملاً شناخته شده در رشته کامپیوتر بر اهمیت ورودی داده‌های معتبر و قابل اعتماد در هنگام برنامه‌ریزی و یا ورود اطلاعات تأکید می‌کند. عبارت GIGO را می‌توان برای هر موقعیتی که احتمال تولید داده‌ها و یا خطاهای ورودی داده‌ها وجود دارد به کار برد، به ویژه هنگامی که بحث بیوانفورماتیک مطرح باشد. اگر چه جنبه‌های متعددی از بیوانفورماتیک می‌تواند خطای داده‌ها را افزایش دهد اما تولید، ورود و پردازش داده‌ها سه موضوع عمده بیوانفورماتیک محسوب می‌شوند.

به وضوح ایجاد داده‌های اولیه به یک روش آزمایشی با قابلیت دسترسی، معتبر و قابل تکرار بستگی دارد. به عنوان نمونه، در حال حاضر شیوه‌های توالی‌یابی DNA به خوبی توسعه یافته‌اند و عموماً درجه اعتبار و اطمینان آن‌ها بسیار بالا است. اتوماسیون باعث شده که میزان خطای انسانی کاهش یابد و با خوانش چند مرتبه‌ای دو رشته DNA، دقت داده‌های بدست آمده به ۱۰۰ درصد نزدیک شود. برخی از مداخله‌های انسانی برای رفع مشکلات موجود در قطعه‌ای از توالی DNA ممکن است مورد نیاز باشد، اما این کار نه تنها از دقت و درستی آن کم نمی‌کند بلکه باعث افزایش صحت آن نیز خواهد شد.

اگر چه اطلاعات اصلی بیوانفورماتیک بر اساس داده‌های منابع مختلف می‌باشد، اما به‌منظور جلوگیری از افزایش خطا، ضروری است که اطلاعات موجود در این منابع توسط آزمایش‌های دقیق تعیین شوند. بنابراین توالی موجود در این پایگاه‌های داده‌ای با دقت بالا کنترل، بررسی و تائید شده‌اند.

پس از تعیین توالی، در مرحله بعدی انتقال اطلاعات از نرم افزار توالی‌یاب به پایگاه دادها است، در این مرحله در هنگام انتقال داده‌ها می‌تواند مشکلاتی ایجاد شود. اگرچه دوره ورود داده‌های توالی اولیه با صفحه کلید به اتمام رسیده، احتمال وجود مشکلاتی به علت تداخل بین سیستم‌های مختلف شبکه کامپیوتر وجود دارد. با این حال این مشکلات اغلب ماهیت تکنیکی داشته و اگر بر طرف شوند روی مرحله بعدی جمع آوری داده‌ها اثری نخواهند داشت.

پردازش داده‌ها مرحله‌ای است که در آن خطر بروز اشتباه مجدد وجود دارد. احتمال وجود اطلاعات غلط، به صورت تجربی در هنگام تولید و ورود داده‌ها وجود دارد. بنابراین با انجام محاسباتی اغلب می‌توان با همسان سازی اطلاعات نادرست و تصحیح آن در پایگاه داده‌ای، مشکل را بر طرف نمود. یک مشکل اساسی پیرامون این جمله که "هر عبارت تایپ شده باید حتماً درست باشد" وجود دارد و بر این اساس بسیاری باور دارند هر داده‌ای بخشی از اطلاعات رسمی است. بنابراین توالی مورد نظر می‌تواند اشتباه باشد، اما داده‌های غلط می‌تواند کاملاً باورکردنی بوده و تشخیص آن از داده‌های صحیح خیلی مشکل باشد. هر گونه اطلاعات نادرستی را می‌توان برای تولید مجموعه

داده‌های به دست آمده یا اهداف دیگر استفاده نمود، لذا مشکل بدتر می‌شود. بهترین کنترل کیفیت برای توالی‌های تعیین شده شامل طراحی دقیق تکنیک‌ها، روش‌ها و همچنین عملکرد دقیق دست ورزی‌های مختلف و بررسی متقابل بسیار دقیق داده‌ها می‌باشد. معمولاً یک تمایزی بین داده‌های یک بار بررسی شده، که ممکن است در مواقعی ناصحیح باشد و داده‌هایی که بررسی آن‌ها تکمیل شده و خاتمه یافته وجود دارد که تناقض‌ها به وسیله چندین مرحله توالی‌یابی و تایید و اعتبار سنجی بین توالی‌ها از بین می‌رود.

۹-۴-۳) خودداری از آزمایش- آزمون‌های محاسباتی

یکی از پیشرفت‌های اخیر در زمینه علوم زیستی ایجاد طیف وسیعی از تکنیک‌های مبتنی بر کامپیوتر می‌باشد که امکان انجام کارهایی را فراهم کرده که بیست سال پیش غیر ممکن بوده است. فرض کنید که اثر GIGO می‌تواند به یک سطح قابل‌قبول کاهش یابد، بررسی پایگاه‌های داده‌ای می‌تواند باعث ایجاد بینش‌های جدیدی شود. آزمایشات *in silico* نمی‌تواند جایگزین تحقیقات کاربردی واقعی گردد، اما می‌تواند مسیر خیلی سریعی برای تأیید قطعی و دقیق آزمایشات فراهم کند. این چرخه از تولید داده‌های تحقیقی، همان گونه که در شکل ۹-۱ نیز نشان داده شده، یکی از ارکان اصلی بیوانفورماتیک است. یک نمونه واضح از این دستاورد، ترجمه توالی DNA به توالی احتمالی پروتئین می‌باشد. با این وجود شناسایی یک ORF[1] به وسیله آنالیز کامپیوتری، ضرورتاً به این معنی نیست که پروتئین مربوطه در درون سلول تولید خواهد شد. برای تأیید وجود چنین پروتئینی، باید شناسایی و آنالیز پروتئین با کمک طیفی از تکنیک‌های آزمایشگاهی صورت گرفته تا فعالیت بیولوژیکی و عملکرد پروتئین تعیین شود.

استفاده از تجزیه و تحلیل‌های کامپیوتری و پیش‌بینی برای انجام آزمایشات *in silico*، محققین را قادر خواهد ساخت تا به راحتی توالی‌های پروتئین و یا ژن را بررسی، تشخیص و یا تغییر دهند. سپس می‌توان نتایج را در شرایط آزمایشگاهی یا در شرایط طبیعی به منظور تعیین اهمیت بیولوژیکی آن آزمود.

۹-۴-۴) ارائه اطلاعات پایگاه داده‌ای

موضوع نهایی ما در این فصل پیرامون ارائه داده‌ها است که استفاده از هر پایگاه داده‌ای بدون در نظر گرفتن این موضوع بسیار محدود خواهد بود. به ویژه، قابلیت دسترسی به اطلاعات فوق که به مهارت‌های برنامه‌ریزی کامپیوتری نیاز ندارند در واقع تضمین کننده قابلیت دسترسی گسترده به پایگاه‌های داده‌ای بزرگ نوکلئیک اسید و پروتئین است. اطلاعات مربوط به توالی‌ها را می‌توان به

[1] Open Reading Frame

آسانی به‌عنوان فایل‌های داده ذخیره کرد که می‌توان به آسانی با استفاده از فایل FTP[1] منتقل شود. اغلب یک شماره ثبت[2] و برخی تفسیرهای پایه‌ای، اطلاعات کافی را جهت استخراج و دستکاری داده‌ها فراهم می‌کنند. هرچند یک تفسیر و ارائه کارآتر غالباً مفید بوده و معمولاً زمانی این تفسیر ضروری است که داده‌های پیچیده ارائه شوند (برای مثال اطلاعات توالی ژنوم). همچنین ایجاد پایگاه‌های داده‌ای ثانویه یا پایگاه‌هایی برای اهداف خاص، نیاز به برنامه‌ریزی دقیق در مرحله ایجاد و راه‌اندازی دارد به شرطی که قوانین روشن برای تفسیر و ارائه داده‌ها تبیین و به وسیله همکاران و مدیران پایگاه داده‌ای توافق شود. هدف نهایی این خواهد بود که کاربران بتوانند به وسیله ارتباط کاربری مشخص از داده‌ها به آسانی استفاده نمایند. همان گونه که انتظار می‌رود تعداد زیادی از انواع مختلف این ارتباطات وجود دارد. برخی ممکن است همانند ابزارهای جستجو برای شناسایی مکان‌های آنزیم برشی محدود کننده یا پروتکل‌هایی برای ترجمه داده‌های توالی نوکلئیک اسید به پروتئین، عملکردهای مخصوصی داشته باشند. برای تشریح نوع ارائه که شاید با استفاده از وب سایت باشد ما به چند نمونه که برای ارائه داده‌ها از پایگاه‌های توالی اسید نوکلئیک استفاده شده است نگاهی می‌اندازیم.

اگر چه شاید فایل داده‌های اولیه مفید باشد، اما مجموعه داده‌های پیچیده با کاربرد، تفسیر و ارائه مشخص قابل دسترس‌تر هستند. این جنبه از مدیریت پایگاه داده، بخش عمده‌ای از بیوانفورماتیک و شاید مرحله حیاتی آن می‌باشد که موضوع را به یک منبع جهانی قابل دسترس تبدیل می‌کند.

ژنوم انسان شاید جالب‌ترین توالی برای نمونه باشد (بیشتر به دلیل محتوایی که ارائه می‌دهد تا این که دلیل بیوانفورماتیکی داشته باشد). همچنان که ما ابزارهای ارائه مبتنی بر وب را مورد توجه قرار می‌دهیم، بهترین راه برای خواندن این بخش از کتاب، استفاده از رایانهٔ خودتان است، به گونه‌ای که بتوانید به وب سایت‌ها دسترسی پیدا کرده و ببینید که چگونه ویژگی‌های مختلف آن عمل می‌کنند. برخی از وب سایت‌های مناسب در جدول ۹-۴ فهرست شده‌اند. این وب سایت‌ها برخی اطلاعات پایه‌ای مناسب را فراهم کرده و همچنین امکان دسترسی به داده‌ها را فراهم می‌کنند. سه ابزار مهم ارائه پایگاه داده‌ها عبارتند از: Ensemble، Vega و Mapview Entrez. سایت Ensembl به وسیله پایگاه داده‌ای EMBL و مؤسسه Wellcome Trust Sanger توسعه داده شده و یک سیستم تفسیر خودکار است که هدف آن تفسیر دقیق و به روز مداوم مجموعه‌ای از پایگاه‌های داده‌ای ژنوم است. پایگاه داده‌ای Vega ابزار مشابهی است اما با پایگاه داده‌ای Ensembl از دو جهت متفاوت است، این پایگاه داده، ژنوم‌های کمی را پوشش می‌دهد و

---

[1]. File Transfer Protocol
[2]. Accession number

معمولا به جای این که خودکار باشد به صورت دستی عمل می‌کند. نسخه تفسیر ژنوم NCBI ابزار Mapview می‌باشد.

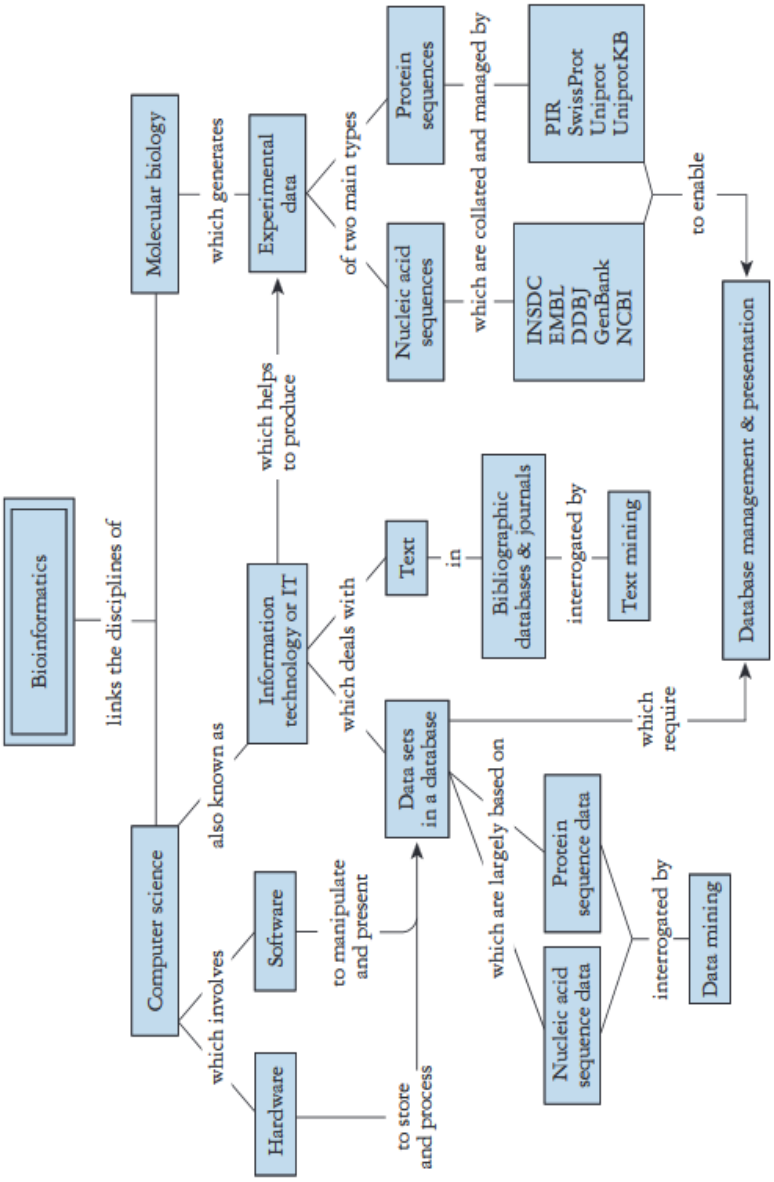
بیایید به بررسی ارائه ژنوم انسان با استفاده از پایگاه داده Ensemble بپردازیم. زمانی‌که شما به پایگاه داده Ensemble متصل می‌شوید (جدول ۹-۴ را ببینید)، لیستی از ژنوم‌های پستانداران نمایش داده شده است. با انتخاب دکمه *Homo sapiens*، گرافیک کروموزوم‌ها (کاریوتایپ) به همراه برخی اطلاعات اضافی ظاهر می‌شود. با کلیک کردن روی یک کروموزوم، اطلاعات دقیق‌تری در مورد آن کروموزوم نمایان می‌شود و کلیک روی یک ناحیه از کروموزوم مورد نظر، اطلاعات جزئی‌تری از آن ناحیه در اختیار قرار می‌گیرد. سطوح متعددی از جزئیات تا حد توالی حقیقی کروموزوم وجود دارد. اکنون، تمام این کلیک کردن‌ها و دسترسی فوری به اطلاعات آن آسان به نظر می‌رسد، اما باید کمی درباره آنچه که در واقع ارائه می‌شود فکر کنیم تا به نوعی چشم‌انداز در این خصوص دست یابیم. بیایید کروموزوم شماره ۱ را در نظر بگیریم. بازکردن کروموزوم شماره ۱ از نمای کاریوتایپ، اطلاعاتی درباره این کروموزوم به ما می‌دهد. این کروموزوم تقریباً ۲۵۰ میلیون جفت باز، تقریباً ۲۰۰۰ ژن و ۸۰۰۰۰۰ پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNPs، که این‌ها مکان‌هایی در ژنوم هستند که بین اعضای غیر مرتبط یک گونه تنها در یک نوکلئوتید با یکدیگر اختلاف دارند و این نواحی در مطالعات نقشه برداری ژنوم مفید هستند) دارد.

اگر ما به نمای جفت باز توجه و آن را در حالت بیشترین بزرگنمایی مشاهده کنیم، ۲۵ جفت باز را به عرض ۱۵۰ میلی‌متر در صفحه کامپیوتر می‌بینیم به عبارتی عرض هر جفت باز ۶ میلی‌متر است. حالا می‌توانیم محاسبات هیجان انگیز را انجام دهیم. اگر صفحه کامپیوتر را به عنوان پنجره‌ای برای یک بخش از کروموزوم شماره ۱ فرض کنیم به یک صفحه با عرض تقریبی ۱۵۰۰ کیلومتر نیاز داریم تا بتوانیم تمام جفت بازها را پشت سر هم نمایش دهیم! اگر بخواهیم این توالی‌ها را در برگه A_4 پرینت کنیم به گونه‌ای که در هر سطر ۲۵ جفت باز و در هر صفحه بیست سطر وجود داشته باشد، در این صورت به نیم میلیون برگه برای نمایش توالی‌های این کروموزوم نیاز داریم و البته به یاد داشته باشیم که ۲۲ کروموزوم دیگر نیز باید به این مجموعه اضافه شود.

فکر می‌کنم این محاسبات نشان می‌دهد که اگر کامپیوتر، پایگاه‌های داده و ابزارهای ارائه داده‌ها را در اختیار نداشتیم ارائه قابل‌فهم اطلاعات توالی ژنوم امکان‌پذیر نبود. به‌دلیل این‌که امروزه اطلاعات ژنوم به‌راحتی قابل دستیابی و در مسیر پیشرفت است، زمانی‌که ابزارهای ارائه دهنده مانند Ensembl را مشاهده می‌کنیم حس خوب و رضایت بخشی پیدا می‌کنیم. تصور ۱۵۰۰ کیلومتر از توالی کروموزوم شماره ۱ ژنوم انسان و بازتاب آن روی پیشرفت‌ها در حوزه فناوری توالی‌یابی و محاسبه کامپیوتری، موجب شده که یک منبع غنی قابل دسترس در اختیار همه قرار گیرد.

جدول ۹-۴) معرفی پایگاه‌های داده‌ای توالی

Site/page	URL
The National Center for Biotechnology Information (NCBI) site that describes the Entrez database presentation system and lists a series of databases using this method	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
The NCBI Mapview site with direct entry to graphical presentation of database information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/
The Wellcome Trust Sanger Institute automated annotation tool (Ensembl) for genome database presentation	http://www.ensembl.org/
The Sanger Institute site for Vega, a manually annotated genome database presentation tool	http://vega.sanger.ac.uk/
The European Bioinformatics Institute gateway site for TREMBL (translated EMBL)	http://www.ebi.ac.uk/trembl/



نقشهٔ مفهومی فصل نهم

بخش سوم: مهندسی ژنتیک در عمل

فصل ۱۰ شناسایی ژن، ژنوم و otheromes

فصل ۱۱ مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی

فصل ۱۲ کاربردهای پزشکی و پزشکی قانونی مهندسی ژنتیک

فصل ۱۳ گیاهان و حیوانات تراریخت

فصل ۱۴ سایر کاربردهای همسانه‌سازی ژن

فصل آخر ایجاد دنیایی جدید یا کابوس ژنتیکی؟

فصل دهم: شناسایی ژن، ژنوم و Otheromes

اهداف:

* توصیف روش‌های بررسی ساختار و عملکرد ژن؛
* بررسی مراحل حرکت از سمت ژن به ژنوم؛
* بررسی پروژه‌های توالی‌یابی ژنوم و ساختار ژنوم در انسان؛
* توصیف مفهوم «otheromes»؛
* نگاهی به سمت پیشرفت های آینده در تحقیقات ژنومیکس.

خلاصه فصل/نتایج یادگیری:

بعد از خواندن این فصل به اطلاعات زیر دست خواهید یافت:

* روش‌های مورد استفاده برای بررسی ساختار و عمل ژن؛
* توسعه و استفاده از تکنیک ریزآرایه؛
* توالی‌یابی و تعیین نقشهٔ کل ژنوم؛
* پروژهٔ ژنوم انسان؛
* استفاده از browsers ها مانند Ensembl؛
* ترانسکریپتوم، پروتئوم، متابولوم و اینتراکتوم.

لغات کلیدی:

ژنوم، ساختار ژن، عملکرد ژن، مکان اتصالی پروتئین/DNA، تأخیر در حرکت ژل، انگشت نگاری DNA، حفاظت DNAse، آزمون ChIP، بسط پرایمر، نقشه یابی به صورت S_1، آنالیز حذف، نورترن بلات، دات بلات، ژنومیکس، DNA میکروآرری، چیپ های DNA، اثر فوق کرومیک، گروه های فراوانی، توالی DNA، نقشه‌یابی ژنتیکی، نقشه‌یابی فیزیکی، فراوانی نوترکیبی، نقشه‌های پیوستگی، مارکرهای ژنتیکی، مارکرهای فیزیکی، توالی‌های برچسب خورده (STS)، برچسب های فلورسنت، *Escherichia coli*، *Saccharomyces cerevisiae*، *Caenorhabditis elegans*، *Drosophila melanogaster*، *Arabidopsis thaliana*، *Mus musculus* بررسی مقایسه‌ای ژنوم، *Homo sapiens*، پروژهٔ ژنوم انسان (HGP)، توالی غیر کامل، توالی کامل، چندشکلی، Ensembl، مرکز CEPH، منوژنیک، آنلاین توارث مندلی در انسان، بررسی شجره نامه ای، چندشکلی مولکولی بی طرف، RFLP، مینی ساتلایت ها، میکروساتلایت‌ها، VNTR، انگشت نگاری ژنتیکی، بررسی پروفایلینگ DNA، توالی‌یابی با روش شات گان، روش مستقیم جهت انجام شات گان، روش کلون کانتیگ، روش شات گان برای کل ژنوم، p53، متوقف کنندهٔ تومور، biome، پروتئوم، ترانسکریپتوم، expressome، ماشین مولکولی، متابولوم، interactome، موسسه بیوانفورماتیک اروپا، Reactome، SNP، CNVs، حقوقی، قانونی، ELSI.

در قسمت یک و دو این کتاب، برخی از روش‌ها و تکنیک‌های پایه جهت دست‌ورزی ژنبررسی شد. این تکنیک‌ها و بسیاری از روش‌های دیگر، ابزاری هستند که دانشمندان را قادر به استخراج ژن‌ها و بررسی آنها می‌کنند. در این بخش، به برخی از موارد کاربرد دست‌ورزی ژن پرداخته می‌شود. در این خصوص به صورت وسیعی به برخی مشکلات اخلاقی که ممکن است در دست‌ورزی ژن و نیز در همسانه‌سازی موجودات پیش آید، می‌پردازیم.

طی چند سال گذشته مهندسی ژنتیک در بسیاری از روش‌ها دچار تغییر رویکرد شده، جدای از یکسری مشکلات تکنیکی که باید قبل از اینکه به‌صورت گسترده مورد استفاده قرار گیرد، باید برطرف شوند و به آسانی قابلیت استفاده باشند. امروزه دست‌ورزی ژن بصورت یک ابزار کلیدی برای بررسی بسیاری از مشکلات مختلف زیست شناسی که قبلاً قابل بررسی نبودند، و کاربردهایی که برای سالیان دراز فقط در تصورات دانشمندانی که از این تکنولوژی در تحقیقات پایه، پزشکی، بیوتکنولوژی و سایر رشته‌ها استفاده می‌کنند مطرح بود. در این فصل به برخی روش‌های بررسی ساختار و عملکرد ژن می‌پردازیم. همچنین به بررسی اینکه چگونه تکنولوژی مدرن دست‌ورزی ژن دنیای ژنوم را بصورتی گشودکه چند سال پیش فکر میکردند وقوعش امکان پذیر نیست و موجب توسعه روش‌های مبتنی بر بیوانفورماتیک جهت آنالیز ژنوم و بیان شد.

امروزه دست‌ورزی ژن به حد کمال و توسعه خود رسیده است و موجب ایجاد یک انقلاب عظیم در علوم و کاربردهای آن شده است.

۱۰-۱) آنالیز ساختار و عملکرد ژن

در اصطلاح علوم پایه، عمده مطالعه در مورد دستکاری ژن به مطالعه ساختار و عملکرد ژن می‌پرداخت. سازماندهی ژن‌ها در ژنوم یک مبحث بسرعت در حال پیشرفت است که در واقع و بصورت قابل توجهی ناشی از بسط روش‌ها و کارهای اولیه روی ساختار ژن می باشد. اگرچه آنالیزهای ژنتیک کلاسیک هم در این خصوص نباید نادیده گرفته شوند، بیشتر جزئیات در خصوص ساختار ژن و بیان مربوط به آن ها تا قبل از شناسایی روش‌های همسانه‌سازی ژن ناشناخته بودند.

همان طور که در بخش ۸-۵ ذکر شد، بسیاری از تکنیک‌هایی که برای بررسی خصوصیات توالی های DNA کلون شده، اطلاعاتی را در مورد ساختمان ژن با تکیه بر شناخت توالی ژن مورد نظر در اختیار می‌گذارد. با این حال حتی زمانی که توالی ژن در دسترس باشد، باز هم کارهای زیادی به منظور تفسیر ویژگی‌های ساختاری مختلف توالی ژن در ارتباط با عملکرد آن در شرایط *in vivo* باید انجام شود. درحالی‌که ظهور روش‌های بیوانفورماتیکی قدرتمند موجب حرکت مطالعات

آنالیز ژن به سطح متفاوتی شده، اماهنوز بررسی اولیه ژن کلون شده برای تعیین توالی دقیق ضروری است.

۱۰-۱-۱) یک نگاه دقیق‌تر به توالی‌ها

هنگامی‌که توالی ژن تعیین شد، با استفاده از اطلاعات به‌دست آمده می‌توان مجموعه‌ای از کارها را می‌توان انجام داد. تحقیقات می تواند برای ناحیه مورد نظر چون پروموتور، افزایش دهنده‌ها و نیز توالی‌های کد کنندهٔ یک پروتئین انجام شود. نواحی کد کننده می‌توانند به توالی اسید آمینه‌ای پروتئین ترجمه شوند. نقشه های مبتنی بر آنزیم‌های برشی می‌توانند به آسانی ترسیم و در شکل‌های مختلف تهیه شوند. این توالی‌ها را می‌توان با توالی‌های سایر موجودات مقایسه و میزان همولوژی بین آن ها را تعیین کرد که این امر در مطالعه فیلوژنی ارتباطات بین موجودات مختلف نقش بسزایی دارد.

اگرچه بررسی‌های کامپیوتری یک توالی ابزاری بسیار سودمندی است، اما معمولا برای تعیین ساختار و عملکرد آن به تأیید روش‌های آزمایشگاهی نیاز است. به عنوان مثال، اگر خصوصیات یک ژن ناشناخته بررسی می شود، انجام آزمایش‌هایی جهت تعیین مکان‌های مهم این ژن ضروری است. معمولاً داده‌های به‌دست آمده از توالی فوق، عملکرد آن را تعیین می کنند، هرچند گاهی آزمایشات، یافته‌های جدیدی را در این مورد تولید می‌کنند که ممکن است پیش بینی شده نباشد. لذا مهم است که در خصوص آنالیز یک توالی هر دو جنبهٔ آزمایشی و کامپیوتری کار به صورت صحیح اجرا شود.

مهم است که آنالیزهای کامپیوتری مربوط به یک توالی با اطلاعات آزمایشگاهی به‌دست آمده مقایسه شوند. خصوصاً در جایی که جنبه‌های کاربردی ژن و پروتئین‌ها مورد نظر باشد.

۱۰-۱-۲) یافتن مناطق مهم ژن‌ها

یکی از موارد کلیدی در کنترل بیان ژن بررسی اثر متقابل DNA و پروتئین است. لذا یافتن مناطقی از توالی که به آن‌ها چندین پروتئین تنظیمی می‌توانند متصل شوند، بسیار مهم است. روش نسبتاً ساده برای انجام این کار آماده سازی یک نقشه بر مبنای آنزیم های محدود کننده از DNA همسان‌سازی شده و سنتز یک مجموعه از قطعات برشی است. پروتئین مورد بررسی (شاید RNA پلیمراز، پروتئین بازدارنده و یا سایر مولکول‌های تنظیم کننده) اضافه می شود و به آن فرصت داده می‌شود تا به مکان‌های اتصالی خود متصل شوند. حال اگر این قطعات الکتروفورز شوند، هیبریدهای DNA/پروتئین در مقایسه با قطعات کنترل بدون پروتئین در ژل به آرامی حرکت کرده و بواسطهٔ این حرکت قابل شناسایی خواهند بود. این روش حرکت تأخیری در ژل

(Gel retardation) نام دارد و اطلاعاتی را در خصوص مکان‌های اتصال مولکول DNA مشخص می‌کند.

روش‌های مبتنی بر ژل الکتروفورز می‌توانند جهت تعیین گروه‌های ژنی که در تماس با پروتئین-های تنظیمی هستند، مفید باشند.

اگرچه روش حرکت تأخیری در ژل یک تکنیک مفید است، اما وسعت کاربرد آن محدود می‌باشد. این امر به میزان زیادی به‌دلیل میزان دقت نقشه های برشی و اندازهٔ قطعات تولید شده است. یک روش دقیق‌تر جهت شناسایی مکان‌های اتصال پروتئین به توالی DNA روش فوت پرینت[1] نام دارد که گاهی اوقات تحت‌عنوان روش حفاظتی DNase نامیده می‌شود. این روش از نظر ظرافت، بسیار ساده است و متکی بر این حقیقت است که مناطقی از DNA که به پروتئین متصل می‌شوند، در معرض حملهٔ آنزیم DNase I قرار نمی‌گیرند (شکل ۱۰-۱). قطعه DNA مورد بررسی رادیونشاندار شده و با پروتئین تنظیمی مورد نظر مخلوط می‌شود. در مرحلهٔ بعد به این مخلوط آنزیم DNaseI اضافه می‌شود و هضم محدود رخ می‌دهد. به‌صورت میانگین، یک DNase I یک مولکول را برش می‌دهد. بنابراین یک مجموعه از قطعات تودرتو ایجاد می‌شود و در مرحلهٔ آخر این قطعات روی ژل توالی یاب قرار می گیرند. منطقه ای که توسط هضم با آنزیم DNaseI حفاظت شده است یک فوت پرینت از مکان اتصال درون مولکول ارائه می دهد.

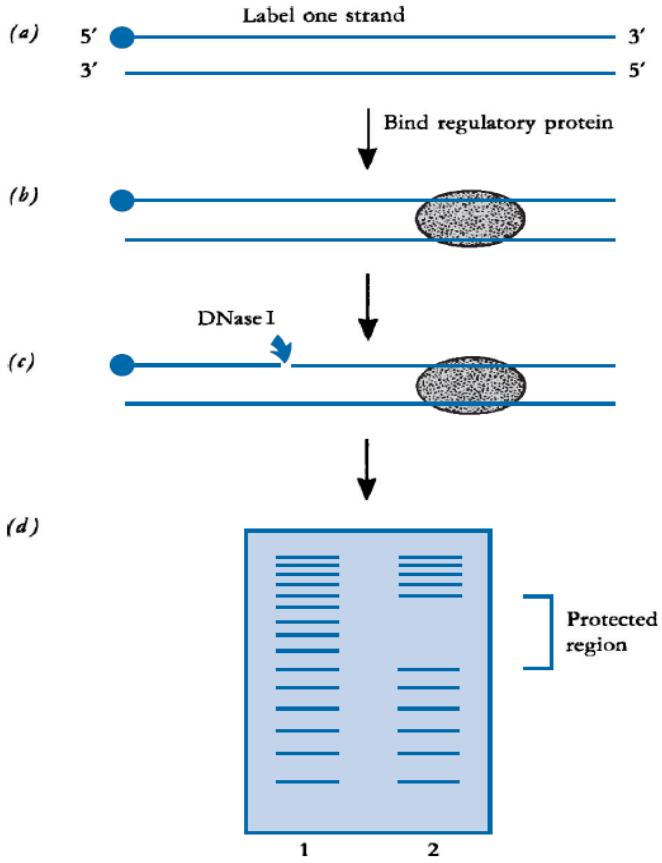
یک روش جدید دیگر، سنجش رسوب کروماتین[2] (ChIP) نام دارد که جهت بررسی مکان‌های اتصال پروتئین استفاده می‌شود. در این روش، پروتئین و DNA با استفاده از فرمآلدئید به هم متصل و DNA به قطعاتی بریده می‌شود. پروتئین‌های خاص را می‌توان با استفاده از آنتی بادی جدا کرد و در مرحلهٔ نهایی توالی DNA تعیین می‌شود.

مکان شروع رونویسی را می‌توان با استفاده از روش های بسط پرایمری و نقشه یابی S_1 شناسایی کرد.

اغلب لازم است که مکان شروع رونویسی برای یک ژن خاص تعیین شود که این امر را نمی‌توان تنها با استفاده از اطلاعات مربوط به توالی ژن شناخت. دو روشی که برای شناسایی مکان شروع رونویسی (T_C) استفاده می‌شوند شامل بسط پرایمر و نقشه یابی S_1 هستند. در روش بسط پرایمر از یک پرایمری که به انتهای ´۵ مولکول mRNA متصل شده است، یک cDNA ساخته می‌شود. بواسطهٔ اندازهٔ قطعات تولید شده، انتهاهای ´۵ mRNA را می‌توان به راحتی شناسایی کرد. اگر یک واکنش توالی‌یابی مشابه با استفاده از همسان‌سازی ژنومی انجام شود مکان شروع رونویسی را می‌توان تعیین کرد. در روش نقشه‌یابی S_1 قطعات ژنومی که مکان شروع رونویسی را دربر گرفته‌اند

[1] DNA footprinting
[2] Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

نشاندار شده و به عنوان کاوشگر استفاده می‌شوند. این قطعات بـا mRNA متصـل شـده و سـپس هیبرید حاصله را با استفاده از آنزیم نوکلئاز S_1 مخصوص تک‌رشته‌ای برش می‌دهند. طول قطعـات حفاظت شده نشاندهندهٔ مکان شروع رونویسی Tc در قیاس با انتهای قطعات برشی محدود شـونده است.



شکل ۱۰-۱) DNA Footprinting. (a) یک مولکول DNA در یک انتهایش با استفاده از فسفر ۳۲ نشـاندار شده است. (b) سپس پروتئین تنظیمی مورد نظر به آن اضافه می‌شود و فرصت اتصال به مکان مناسب خـود بـه آن داده می‌شود. یک واکنش کنترل یا شاهد بدون حضور پروتئین در قسمت c نشان داده شده است. جهت برش رشتهٔ DNA از آنزیم DNaseI استفاده شد. شرایط طوری تعیین شد که به طور میانگین فقط یـک شـکاف در مولکول ایجاد شود. مناطقی که بواسطهٔ اتصال پروتئین از عمل آنزیم حفاظت شده‌اند، برش نمـی‌خورنـد. اکنـون تعداد زیادی مولکول ایجاد می‌شود که شامل یک مجموعه از قطعات تودرتو یا آشیانه‌ای است. (d) سپس واکنش ها را وارد ژل توالی یاب می کنند. هنگامی که با واکنش شاهد یعنی خط ۱ مقایسه شود، واکـنش مـورد آزمـون یعنی خط ۲ نشان‌دهندهٔ مکان پروتئین روی DNA به واسطهٔ یک فوت پرینت خواهد بود.

۱۰-۱-۳) بررسی بیان ژن

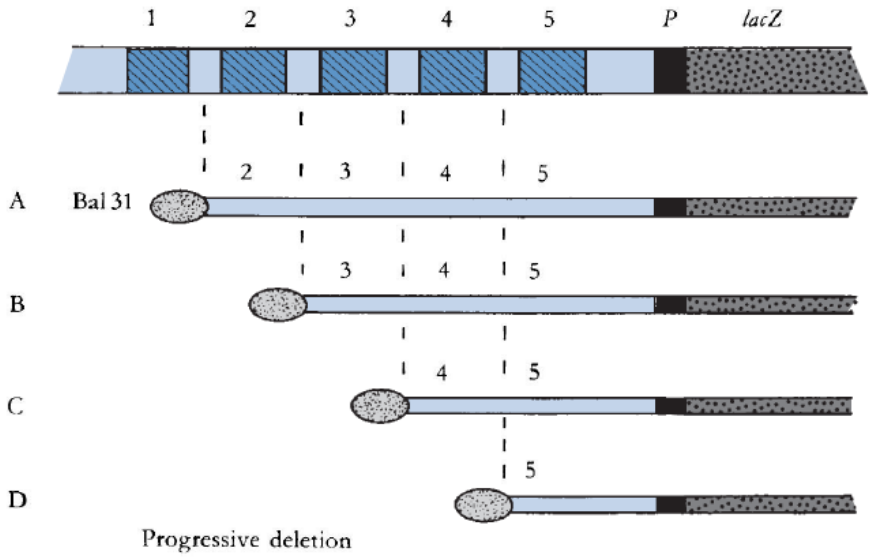
تکنولوژی DNA نوترکیب می‌تواند برای مطالعهٔ بیان ژن در دو روش کلی استفاده شود. اول، ژن هایی که جداسازی و ویژگی‌های آن‌ها مشخص شده است را می‌توان تغییر داد و اثرات این تغییرات را بررسی کرد. دوم، کاوش‌گرهایی که از توالی‌های همسانه‌سازی شده به‌دست می‌آیند، می‌توانند برای تعیین میزان mRNA مربوط به یک پروتئین خاص در شرایط مختلف استفاده شوند. این دو روش و بسط آن‌ها اطلاعات مفیدی در خصوص چگونگی بیان ژن در طیف وسیعی از سلول‌ها ارائه می‌دهند.

یکی از روش ایجاد تغییردر ژن‌ها برای شناسایی مناطقی مهم کنترل بیان ژن ، روش آنالیز حذف است که حذف توالی‌های بالادست از مکان شروع رونویسی (T_C) را شامل می‌شود. اگر این کار با کمک آنزیم‌های نوکلئازی مانند اگزونوکلئازIII یا Bal 31 (بخش ۴-۲-۱) انجام شود، یکسری حذفیات ایجاد می‌شود (شکل ۱۰-۲). اثرات حذفیات مختلف را می‌توان به کمک سطوح بیان ژن اصلی و یا یک ژن گزارشگر مانند ژن *lacZ* بررسی کرد. در این روش، مناطقی که در آنها میزان رونویسی زیاد یا کم شده باشد تعیین می‌شود.

روش آنالیز حذف می‌تواند برای تعیین مناطق کنترلی بالادست که در تعیین بیان ژن مهم هستند استفاده شود.

اندازه‌گیری سطوح mRNA یک جنبهٔ بسیار مهم در مطالعهٔ بیان ژن است و اغلب در آن از کاوشگرهای cDNA استفاده می‌شود که از قبل همسان‌سازی و تعیین خصوصیت شده‌اند. احتمالاً نمونه‌های mRNA برای تهیه کاوشگر از بافت‌های مختلف و یا از سلول‌های تحت شرایط فیزیولوژیکی مختلف تهیه شوند و یا اگر القا یک پروتئین خاص مورد توجه است، ممکن است منعکس کننده یک دوره زمانی معین باشند. اگر بتوان نمونه‌ها را با استفاده از نورترن بلات آماده کرد، می‌توان اطلاعاتی در خصوص اندازهٔ رونوشت‌ها و میزان آن‌ها در اختیار محقق قرار دهد.

مقدار یک mRNA خاص را می‌توان با استفاده از کاوشگرهای cDNA و نوردرن و یا دات بلات اندازه گیری کرد.



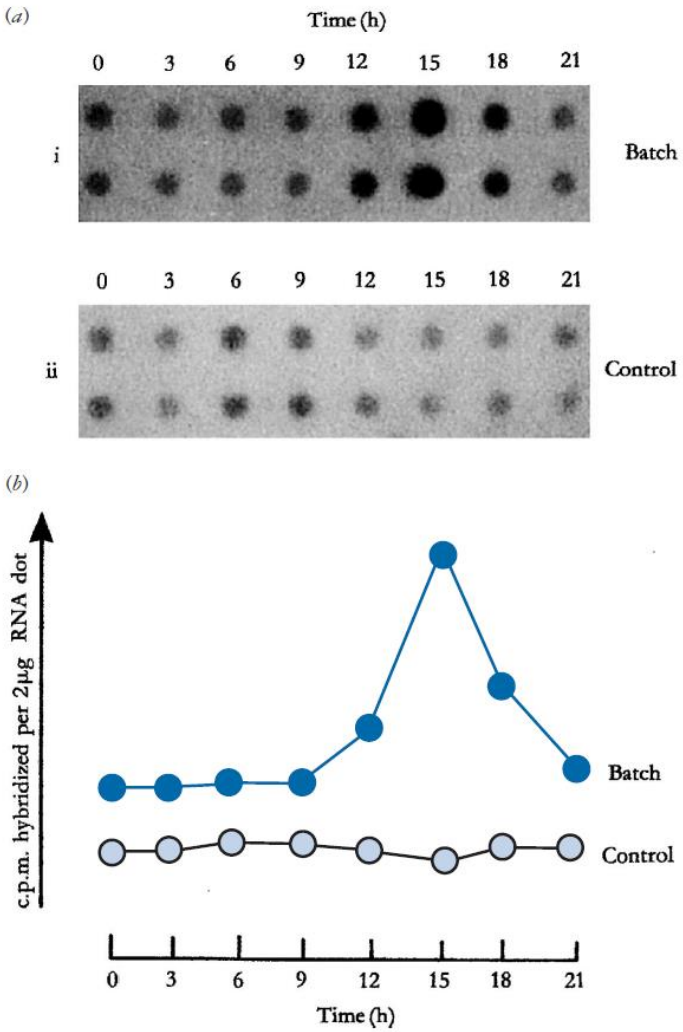
شکل ۱۰ -۲) روش آنالیز حذف برای مطالعه بیان ژن. در این مثال فرضی، یک ژن با پنج ناحیهٔ تنظیمی در بالادست آن نشان داده شده است (با ۱ تا ۵ نشان داده شده است). پروموتر با P نشان داده شده است. عموماً از ژن گزارشگر *lacZ* برای بررسی بیان ژن با استفاده از ترکیب X-gal استفاده می‌شود. با استفاده از آنزیمی مانند نوکلئاز *Bal* 31 حذف ها ایجاد می‌شود. در این مثال چهار ساختار برای ایجاد حذف استفاده شد (قسمت‌های A تا D). در قسمت A، منطقه ۱ حذف شد و در ادامه توالی‌های بالادست در هر ساختار حذف شد، به طوری که در ساختار D قسمت‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ حذف و فقط قسمت ۵ باقی ماند. تأثیرات این حذف‌ها را می‌توان با کمک فعالیت آنزیم بتا-گالاکتوزیداز بررسی کرد و بنابراین مکان‌های کنترلی بالادست به آسانی تعیین می‌شوند. به عنوان روش جایگزین می‌توان با استفاده از آنزیم Bal 31، قطعات برش داده شده را از نواحی کنترلی حذف کرد.

روش dot blot نیز تهیه و می‌تواند اطلاعات کمی را در خصوص سطوح رونویسی به واسطهٔ تعیین مقدار رادیواکتیویته در هر نقطه در اختیار محقق قرار دهد. با این روش می‌توان مقدار mRNA خاص را در هر نمونه تعیین کرد (شکل ۱۰-۳). روش‌های نورترن و دات بلات اطلاعات مفید بسیاری را در خصوص سطوح رونوشت سلول‌ها و در شرایط خاص فراهم می‌کنند. با کمک روش وسترن بلات و نیز بررسی‌های آنزیمی تصویر کاملی از بیان ژن ایجاد خواهد شد.

۱۰-۲) از ژن تا ژنوم

اگرچه بیشترین تأکید بر روی آنالیز ژن‌های منفرد است، اما پیشرفت‌های به‌دست آمده در تکنولوژی دست‌ورزی ژن موجب گشودن اسرار بیشتری در خصوص مطالعه ژن‌ها شده است. آنچه که به‌طور ساده ژنومیکس نامیده می‌شود، بر اساس رویکرد کلی در مورد نحوهٔ عملکرد ژنوم است. بنابراین ما امروزه تمرکزمان بیشتر بر نقش یک ژن در مجموعه ژنوم است، که در واقع در جهتی متفاوت با بررسی ساختار و بیان ژن می‌باشد. توسعه و استفاده از تکنیک ریزآرایه DNA (گاهی به آن DNA Chip می‌گویند) به بررسی ساختار و بیان ژن پرداخته و یک مثال جالب و خوب از اینکه چگونه یک تکنیک جدید می‌تواند یک موضوع علمی را به‌طور قابل‌توجهی پیشرفت دهد. اجازه دهید با بررسی این جنبه به تشریح نکته مورد نظر بپردازیم.

در سال‌های اخیر تأکید بیشتر بر آنالیز ژنوم است نه ژن، که این کار با استفاده از روش‌های پیشرفته جهت بررسی بیان ژن در کل محتوای ژنوم انجام می‌شود.



شکل ۱۰-۳) تجزیه دات بلات سطوح mRNA. نمونه‌هایی از RNA کل در کشت همزمان *Chlamydomonas reinhardtii* در دو شرایط تیمار و شاهد استخراج و نقاطی از آنها روی غشاء فیلتر نمایان شد. فیلتر با استفاده از cDNA رادیونشاندار مربوط به یک mRNA خاص که در شرایط بیان تاژک قرار گرفته بود، کاوش شد. (a) تصویری از یک اتورادیگراف بعد از هیبریداسیون. شرایط تیمار (i) نشاندهندهٔ افزایش دوره‌ای در سطوح رونوشت با یک پیک در ۱۵ ساعت. نمونهٔ کنترل (ii) سطوح ثابت را نشان می دهد. اطلاعات نشان داده شده در قسمت b با اندازه گیری مقادیر رادیواکتیویتی در هر نقطه بدست آمده است. این اطلاعات می‌تواند جهت تعیین اثر شرایط کشت بر میزان بیان پروتئین فلاژلار استفاده شود. عکس از دکتر J. Schloss از Nicholl و همکاران (۱۹۸۸) مجلهٔ علوم سلول ۸۹: ۳۹۷-,۴۰۳

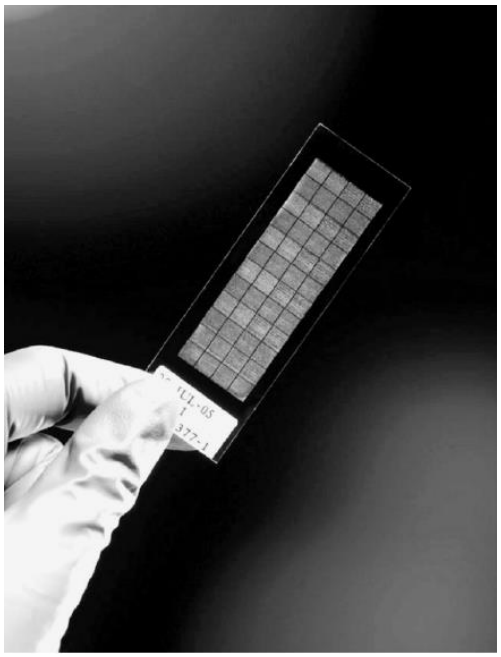
۱۰-۲-۱) بیان ژن در یک زمینه ژنومی

در مطالعات اولیه بررسی بیان ژن، به‌جای تمرکز روی یک یا دو ژن، بررسی چند یا چندین ژن در یک سلول خاص و یا یک بافت خاص مورد توجه است. احتمالاً یک کاوشگر cDNA جهت تسهیل اندازه‌گیری سطوح رونوشت در دسترس بوده یا یک سیستم القایی با قابلیت تشخیص تفاوت بیان ژن آزمایش می شده است. در چنان کاربردهایی، ویژگیهای پروتئین و ژن در برخی زمینه‌ها تعیین می‌شوند، بنابراین محقق می‌تواند از اندازه‌گیری آن‌ها اطمینان حاصل کند. با این حال با کمک این روش فقط تعداد کمی ژن بررسی می‌شوند. بنابراین با بسط مطالعات می‌توان به بررسی بیان ژن در سطح ژنوم (به جای مطالعهٔ تک ژن) پرداخت. این کار نیز نیاز به تکنولوژی‌های خاصی دارد که با کمک توسعهٔ روش میکرواری DNA به حقیقت پیوسته است.

توسعهٔ روش ریزآرایه و چیپ‌های DNA از جمله روش‌های مهمی هستند که می‌توان با استفاده از آن‌ها به آنالیز ساختار و بیان ژن پرداخت.

ماجرایی که در پس پرده این موضوع قرار دارد واقعا یکی از تکنولوژی‌های توسعه یافته برای کشف بخش‌های جفت شونده توالی‌های مکمل نوکلئیک اسیدی می‌شود. ماهیت این روش نیاز به تثبیت تعداد زیادی توالی‌های مختلف روی یک مادهٔ نگهدارندهمانند اسلایدهای شیشه‌ای میکروسکوپی دارد (شکل ۱۰-۴). این کار را می‌توان به روش‌های مختلف انجام داد مثلاً می‌توان برای قرار دادن دقیق نقاط میکروسکوپی روی اسلایدها از یک روبات استفاده و مستقیماً توالی‌های DNA یا cDNA را روی اسلایدها قرار داد . روش دیگر سنتز توالی‌های الیگونوکلئوتیدی مستقیماً روی شیشه با استفاده از فناوری مبتنی بر با روش‌های ساخت چیپ‌های کامپیوتری است. هنگامی که چیپ آماده شد، الگوی توالی‌های روی چیپ را می‌توان برای هیبریداسیون با توالی یک نمونه (اغلب cDNA نشاندار شده با برچسب‌های فلورسنت) استفاده کرد.

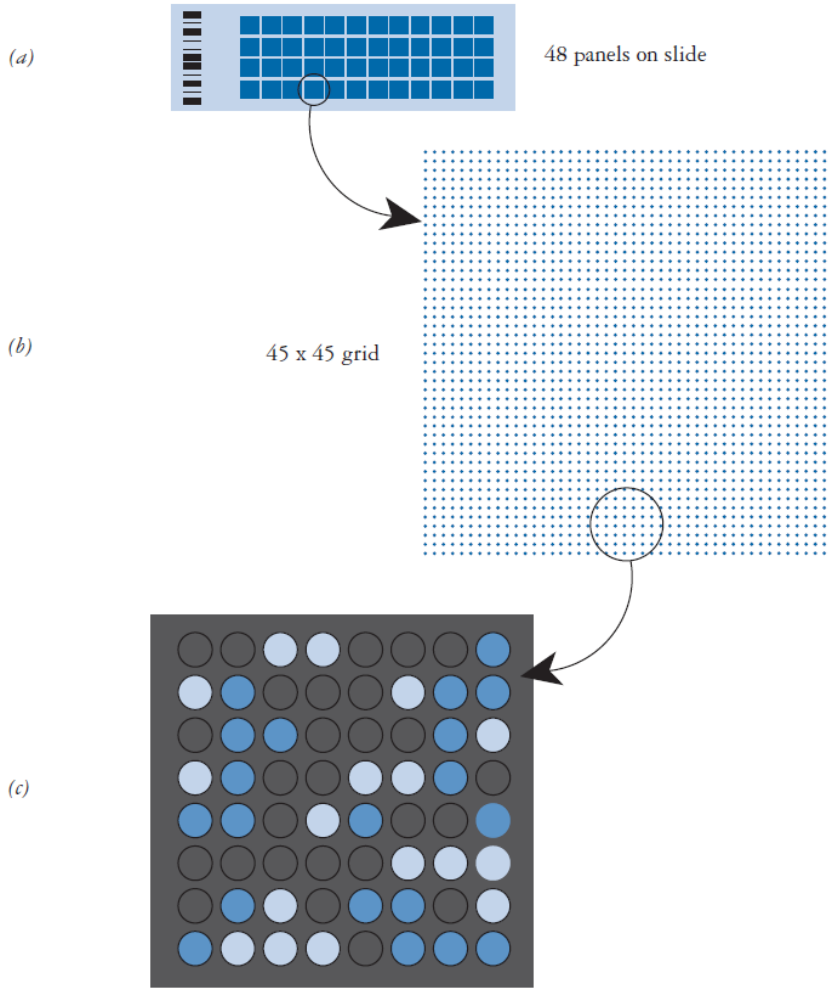
اتصال توالی‌های مکمل را می‌توان آنالیز کرده و اطلاعات مربوط به الگوهای بیان ژن را با سطح سیگنال ردیابی شده برچسب‌های فلورسنت توسط اسکن لیزری استنتاج و با رایانه آنها را ثبت کرد (شکل ۱۰-۵). روش‌های مختلفی برای انجام ریزآرایه DNA وجود دارد. دو مورد از مهم‌ترین آنها آنالیز بیان ژن و بررسی جهش‌ها یا پلی مورفیسم است. در قسمت ۱۰-۵-۱ به بررسی نحوهٔ عمل ریزآرایه برای رونوشت یک سلول پرداخته می‌شود.



شکل ۱۰-۴) یک ریزآرایه DNA روی اسلاید شیشه‌ای. یک نقطه روی اسلاید با یک توالی مشخص DNA یک فیلد نامیده می‌شوند. هر کدام از ۴۸ مربع کوچک حاوی آرایه ۴۸×۴۸ از توالی‌های DNA است که در مجموع شامل ۹۷۲۰۰ فیلد می‌شود. تصویر فوق برگرفته از کتابخانهٔ Wellcome Trust Photographic Medical است.

۱۰-۲-۲) آنالیز ژنوم

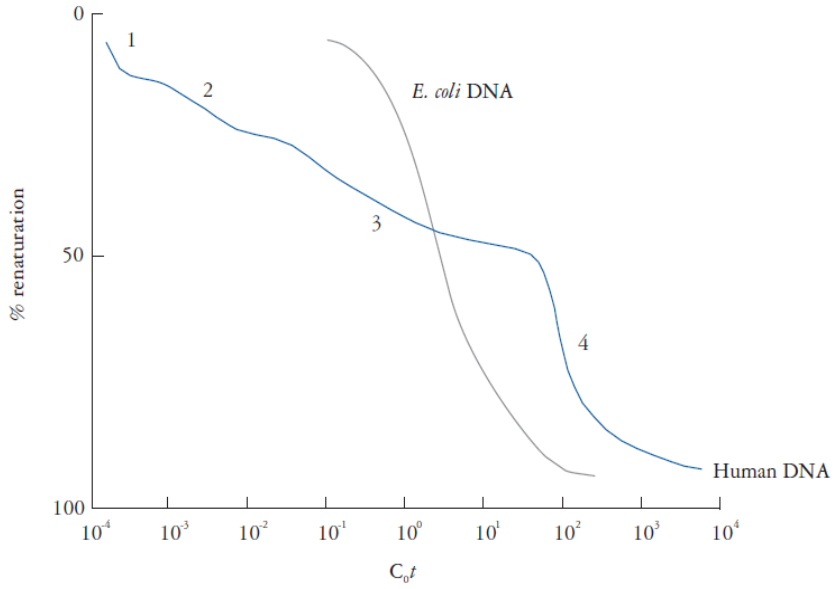
پر واضح است که آنالیز ژنوم در مقایسه با آنالیز توالی ژن پیچیده‌تر بوده و روش‌های مختلفی را شامل می‌شود. ویژگی‌های ساختاری مانند عناصر تکرار شونده و نواحی بین ژنی موجب دشواری کار در مقایسه با توالی‌های ساده می‌شوند. بر همین اساس مطالعه ویژگی‌های ساختاری ژنوم فاکتور مهمی برای انتخاب یک روش برای مطالعهٔ ژنوم است. برخی از اندازه‌های مقایسه‌ای ژنوم در جدول ۲-۳ آمده است. این اطلاعات نشاندهندهٔ این امر است که ژنوم یوکاریوتی در مقایسه با ژنوم باکتریایی شاید چندین برابر بزرگتر باشد.



شکل ۱۰-۵) تکنولوژی ریزآرایه DNA. یک چیپ با ۹۷۲۰۰ آرایه (a) دارای ۴۸ بلوک بـه صـورت ۴۵×۴۵ فیلد (b). نمونه‌های مورد بررسی (اغلب از روی mRNA، cDNA ساخته می‌شود و سـپس بـا اسـتفاده از رنگ‌های فلورسنت نشاندار می‌شود) روی آرایه قرار گرفته و هیبریداسیون روی آنها انجام می‌شود. در مرحلهٔ بعد مواد اضافی شسته شده و ارایـه بـا اسـتفاده از یـک دسـتگاه اسـکن لیـزری خـوانش مـی‌شـود. الگـوی هیبریداسیون با کمک کامپیوتر مشخص می‌شود (c). سطوح مختلف سیگنال در هر فیلد نشاندهندهٔ سـطح بیان ژن بوده که در ارتباط با ژن‌های مورد بررسی در ریزآرایه است.

برخی از اولین دستاوردهای پیچیدگی ژنوم با استفاده از تکنیک کینتیک رینیچریشن[1] به‌دست آمده است. در این روش نمونه DNA را جهت جدا شدن دو رشته از هم، گرما می‌دهند. در مرحلهٔ بعد ترکیب فوق را سرد کرده تا رشته‌ها به هم بچسبند و میزان جذب اشعهٔ فرابنفش (A260) بررسی می شود. تک رشته‌های DNA در مقایسه با دو رشته‌ای‌ها دارای جذب بیشتری هستند که به آن اثر هایپرکرومیک[2] گویند. بنابراین میزان اتصال مجدد رشته‌ها به هم به آسانی قابل بررسی خواهد بود. با کمک این بررسی‌ها DNA یوکاریوتی در چندین گروه فراوانی قرار می‌گیرد که در شکل ۱۰-۶ نشان داده شده است. در مورد DNA انسان حدود ۴۰٪ از کل آن شامل توالی‌های تکراری است که می‌تواند موجب ایجاد مشکلاتی در همسانه‌سازی و آنالیز ژن شود. ۶۰٪ باقیمانده شامل توالی‌های واحد و عناصر با تعداد کپی کم هستند و فقط حدود ۳٪ از آن به‌صورت توالی کد شونده عمل می‌کند. این امر موجب بروز مشکلاتی در بررسی ژنوم انسان شده است. شاید بتوان از حدود ۹۷٪ کل ژنوم انسان صرف‌نظر کرد، اگر بتوان ۳٪ توالی کد شونده ژن‌ها را برای مطالعه بیشتر شناسایی کرد.

[1] Renaturation kinetics
[2] Hyperchromic effect



شکل ۱۰-۶) فراوانی گروه‌های یافت شده در نمونه‌های DNA ژنومی مختلف. بعد از دناتوره سازی نمونه های DNA را سرد کرده و درصد اتصال مجدد اندازه‌گیری می‌شود. نمودار بالا مربوط با $\log C_0t$ است (این عدد عملا یکنوع اندازگیری زمان است و با اضافه کردن مقادیر DNA انجام می‌شود.) خط نقطه‌چین نشاندهندهٔ DNA مربوط به *E.coli* است. DNA انسان (خط معمولی) نشاندهندهٔ الگوهای پیچیده برای چهار کلاس مختلف است: ۱) DNA foldback ۲) توالی‌های به شدت تکراری ۳) توالی‌های با تکرار متوسط ۴) توالی‌های تک نسخه‌ای.

روش کینتیک رینیچریشن تعیین کنندهٔ پیچیدگی ژنوم یوکاریوتی و حضور توالی‌های تکراری در ژنوم است.

اگرچه با استفاده از روش آنالیز کینتیک و شناسایی تک ژن‌ها می‌توان به اطلاعات مفیدی در خصوص ژنوم دست، اما این روش اطلاعات جزئی و محدودی در اختیار محقق قرار می‌دهد. هدف نهایی بررسی ژنوم، تعیین توالی DNA است که کار بسیار سختی می‌باشد. با این حال در سال های اخیر پیشرفت‌هایی در زمینهٔ تکنیک‌های توالی‌یابی DNA ایجاد شده است و امروزه برای بسیاری از موجودات از روش‌های با کارایی بالا برای توالی‌یابی استفاده می‌شود. در بخش ۱۰-۳ بعد از ارائهٔ روش‌های نقشه یابی و توالی یابی ژنوم به جزئیات بیشتری در خصوص ژنوم انسان می پردازیم.

۱۰-۲-۳) تهیه نقشه ژنوم

همان‌طور که در بخش ۳-۷ مشخص است، توالی‌یابی DNA در مقیاس بزرگ را می‌توان با کمک تکنیک توالی‌یابی به روش شات گان[1] انجام داد. این روش بر اساس کنار هم قرار دادن نواحی همپوشان ایجاد می‌شود. باتوجه به سادگی و محدودیت‌های کم آن، این روش می‌تواند در توالی‌یابی با مقیاس وسیع مانند پروژهٔ توالی‌یابی ژنوم انسان استفاده شود. روش دیگر جهت توالی‌یابی ژنوم‌های بزرگ نقشه‌یابی ژنتیکی و فیزیکی است. این روش به بانک‌های بزرگ همسان‌سازی نیاز دارد که در این خصوص از کروموزوم مصنوعی مخمر[2] (YAC) و کروموزوم مصنوعی باکتری[3] (BAC) استفاده می‌شود. شاید یک مقایسه بین روش‌های مذکور به کل فرآیند در متن کمک کند.

نقشهٔ ژنتیکی از بسیاری جوانب مشابه نقشه‌های جغرافیایی است و دو ویژگی مهم آن مقیاس و سطح جزئیات نقشه می‌باشد. برای مفید بودن یک نقشه باید سطح جزئیات آن برای نقشه مناسب در نظر گرفته شود تا نقشه عملکرد خود را داشته باشد.

نقشه ژنتیکی مانند نقشهٔ جاده است. فرض کنید می‌خواهید از یک شهر به شهر دیگر سفر کنید. احتمالاً از گلاسکو به لندن یا از نیویورک به دنور. برای این سفر باید نقشهٔ کلیهٔ جاده‌های مربوط به شهرهایی را که در بین مسیر شروع تا پایان وجود دارند را بدانید. با این همه این فقط یک مسیر است و البته این احتمال وجود دارد که وارد مسیر اشتباه نیز بشوید. بهترین روش استفاده از نقشه ای است که کل مسیر سفر را نشان می‌دهد. در نقشهٔ اولیه از مسیر سفر، شما ممکن است در مورد مسیر صحیح چندان نگران نباشید، اما میل هستید بدانید کدام جاده رو انتخاب کنید. سپس می توانید سفر را به مراحل مختلف تقسیم کنید به طوری که جزئیات محلی آن بسیار مهم باشد. به عنوان مثال مسافت لازم برای رسیدن به پمپ بنزین بعدی نیز مهم است. آدرس هتل‌ها و توقفگاه ها نیز مهم است. در آنالیز ژنوم، تکنیک‌های ژنتیکی و نقشه‌یابی فیزیکی، نقشه‌هایی با مقیاس بزرگ و کوچک برای حرکت را فراهم می‌کنند. تعیین توالی به خودی خود می تواند مکان دقیق قطعات ژنی از جمله ژن‌ها و مکان‌های تنظیمی را در ژنوم مشخص کند.

نقشه‌یابی ژنتیکی اطلاعات زیادی در خصوص مکان ژن‌ها روی کروموزوم یک موجود فراهم می‌کند که می‌تواند در تلاقی‌های ژنتیکی تجربی استفاده شود. این روش بر مبنای بررسی میزان نوترکیبی در حین تقسیم میوز است و معمولا نقشه‌یابی لینکاژی نامیده می‌شود. این روش بر مبتنی بر مارکرهای ژنتیکی قابل ردیابی است. الل‌های یک مارکر باید هتروزیگوت باشند به طوری که

---

[1] Shotgun
[2] Yeast artificial chromosome
[3] Bacterial artificial chromosome

نوترکیبی میوزی را بتوان شناسایی نمود. اگر دو ژن روی دو کروموزوم مختلف باشند این دو ژن غیرپیوسته هستند، پس در حین تقسیم میوز به شکل مستقل به ارث می‌رسند. اما ژن‌های واقع بر روی یک کروموزوم از نظر فیزیکی به هم پیوسته بوده و ایجاد کراسینگ اور بین آنها در حین پروفاز میوز، ژنوتیپ‌های غیروالدینی را ایجاد می‌کند. احتمال این رخ داد وابسته به فاصلهٔ دو ژن دارد. اگر این دو ژن بسیار به هم نزدیک باشند، شانس ایجاد کراسینگ اور بین آنها کم خواهد بود. اگر فاصلهٔ آنها بسیار زیاد باشد نیز مانند ژن‌های غیر پیوسته عمل می‌کنند. با محاسبهٔ فراوانی نوترکیبی امکان تولید نقشه‌های مربوط به مارکرهای ژنتیکی وجود خواهد داشت.

روش کلاسیک جهت تهیه نقشهٔ ژنتیکی استفاده از بررسی فراوانی نوترکیبی است که هنوز هم به‌عنوان یک روش مفید اما با وضوح کم برای مکان یابی ژن استفاده می‌شود.

نقشه‌های فیزیکی ژنوم از روی نقشه‌های ژنتیکی ساخته می‌شوند و جزئیاتی بیشتری به آن‌ها اضافه می‌کنند. مانند نقشه‌های ژنتیکی، ساخت نقشه‌های فیزیکی نیاز به مارکرهایی دارد که بتوانند یک مکان خاص روی DNA را مشخص کنند. هدف یک نقشهٔ فیزیکی کاور نمودن ژنوم با این مارکرهای فیزیکی قابل شناسایی است که با فاصله‌های مناسب قرار گرفته‌اند. اگر مارکرها از هم فاصلهٔ زیادی داشته باشند، این نقشه نمی‌تواند اطلاعات مفیدی در اختیار محقق قرار دهد. اگر مارکرها در بین ژنوم پخش نشده باشند، احتمالاً بخش‌هایی را خواهیم داشت که دارای تعداد مارکرهای محدودی هستند در حالی‌که سایر قسمت‌ها دارای مارکرهای زیادی هستند که بیش از میزان لازم برای این مرحله از نقشه‌یابی خواهند بود.

نقشه یابی فیزیکی ژنوم کار آسانی نیست و تا اوایل سال ۱۹۸۰ تصور بر این بود که احتمال ایجاد نقشهٔ فیزیکی ژنوم انسان کاری غیر قابل انجام است. با این حال، اثبات شد که این تصور اشتباه بوده و روش‌های ایجاد نقشه‌های فیزیکی ژنوم به سرعت پیشرفت کرده‌اند. نقشه‌های فیزیکی ژنوم را می‌توان با چند روش تهیه کرد. هدف همهٔ آنها ایجاد نقشه ای است که در آن فاصلهٔ بین مارکرها مشخص شده باشد. روش‌های مختلف تهیهٔ نقشه‌های فیزیکی در جدول ۱۰-۱ آمده است. تهیه نقشه با استفاده از مکان‌های برچسب دار(STS)[1] یک روش بسیار مفید در این خصوص است، که می‌توان آن را در مورد هر نوع توالی به‌کار برد، زیرا این نواحی در ژنوم به صورت واحد هستند و اطلاعات مفیدی در خصوص توالی DNA در اختیار محقق قرار می‌دهند. یکی از مزایای این نوع نقشه‌ها این است که می‌توانند اطلاعات نقشه‌های فیزیکی را که با روش‌های دیگر تهیه شده‌اند را به یکدیگر مرتبط کنند. تکنیک استفاده شده عمدتاً بر مبنای روش‌های هیبریداسیون و یا به نوعی ساده‌تر از آن روش تکتیر توالی‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR است. در مورد ژنوم

[1] Sequence-tagged site

انسان نقشه‌های STS (با سایر روش‌ها) باعث ایجاد نقشه‌های فیزیکی و ژنتیکی از ژنوم انسان در اواخر سال ۱۹۹۰ شد.

توسعهٔ تکنیک‌های تهیه نقشه فیزیکی مناسب و قابل اعتماد یک بخش مهم از پروژهٔ توالی‌یابی ژنوم انسان بود.

آخرین بخش از جزئیات مربوط به تهیه نقشه ژنوم به وسیله نوعی از نقشه‌های ایجاد شده توسط آنزیم‌های محدود کننده فراهم می‌شود (برای مطالعهٔ نقشه‌های ایجاد شده توسط آنزیم‌های محدود کننده بخش ۴-۱-۳ را ببینید). نقشه های فراگیری که با استفاده از آنزیم‌های برشی نادر ایجاد می شوند به عنوان یک روش مفید و قابل استفاده در زمینه تهیه نقشه فیزیکی است. ولی در صورتی که قطعات همسان‌سازی شده قبل از توالی‌یابی مورد آنالیز قرار می‌گیرند جزئیات بیشتری در مورد نقشه‌های محدود شونده مورد نیاز است (جدول ۱۰-۱). یک ارتباط کلی بین نقشه‌های ژنتیکی، فیزیکی و همسان‌سازی در شکل ۱۰-۷ نشان داده شده است.

نقشه‌های محدود شونده جزئیات بیشتری را در سطح فیزیکی ژنوم ارائه می‌دهند. نقشه‌های ژنتیکی، فیزیکی و محدود شونده همگی تصویری دقیق از مکان ژن‌ها مشخص می‌کنند.

۱۰-۳) توالی‌یابی ژنوم

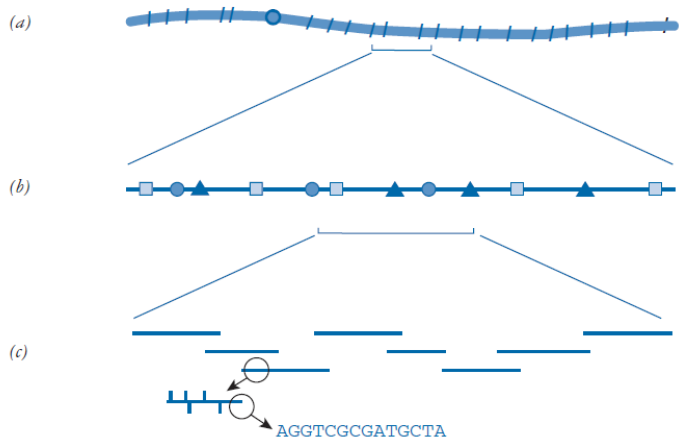
مرحلهٔ نهایی در تمامی پروژه‌های توالی‌یابی، تعیین و سرهم کردن توالی‌های اصلی DNA است. چندین شرط مهم در این مورد وجود دارد. فناوری توالی‌یابی DNA باید دقیق بوده و سرعت بالایی داشته باشد. برای انجام توالی‌یابی نیاز به ایجاد یک کتابخانه از قطعات همسانه‌سازی شده است. این دو شرط در پروژه‌های توالی‌یابی مختلف از نظر مقیاس متفاوت هستند.

جدول ۱۰-۱) برخی روش‌ها جهت ایجاد نقشه‌های فیزیکی ژنوم

Technique name	Application
Clone mapping	Define the order of cloned DNA fragments by matching up overlapping areas in different clones. This generates a set of contiguous clones known as contigs. Clone mapping may be used with large or small cloned fragments as appropriate.
Radiation hybrid mapping	Fragment the genome into large pieces and locate markers on the same piece of DNA. The technique requires rodent cell lines to construct hybrid genomes as part of the process.
Fluorescent in situ hybridisation (FISH)	Locate DNA fragments by hybridisation, plotting the chromosomal position of the sequence by analysing the fluorescent markers used.
Long-range restriction mapping	Method is similar to any other restriction mapping procedure, but enzymes that cut infrequently in the DNA are used to enable long-range maps to be constructed.
Sequence-tagged site (STS) mapping	The most powerful technique, which can complement the other techniques of genetic and physical mapping. Can be applied to any part of the DNA sequence, as long as some sequence information is available. An STS is simply a unique identifiable region in the genome.
Expressed sequence tag (EST) mapping	A variant of STS mapping in which expressed sequences (*i.e.* gene sequences) are mapped. More limited than STS mapping, but useful in that genes are located by this method.

۱۰-۳-۱) فناوری توالی‌یابی

هنگام تعیین توالی پرواضح است که استفاده از روش‌های کتابخانه‌ای سنتی نمی‌تواند میزان پیشرفتی را که برای تکمیل هدف مورد نظر در توالی‌یابی لازم است را در یک زمان معقول فراهم نماید. بنابراین روش‌های توالی‌یابی خودکار توسعه یافتند بطوری که به‌جای استفاده از روش‌های رادیونشان‌دار از روش توالی‌یابی ختم زنجیرهٔ استاندارد حاوی برچسب‌های فلورسنت استفاده می‌شود. در یک روش، می‌توان ddNTPs را با استفاده از برچسب‌های مختلف نشاندار کرد و در یک واکنش می‌توان هر چهار نوکلئوتید ddNTPs را با هم استفاده کرد. محصولات حاصل توسط ژل الکتروفورز جدا می‌شوند و توسط برچسب‌های فلورسانت قابل شناسایی خواهند بود. با این کار می‌توان مستقیماً توالی‌ها را خواند. این روش در مقایسه با روش توالی‌یابی معمولی، سریع‌تر است و در مدت زمان کوتاهی اطلاعات زیادی به محقق می‌دهد. این مراحل به‌صورت خلاصه در شکل ۱۰-۸ آمده است.

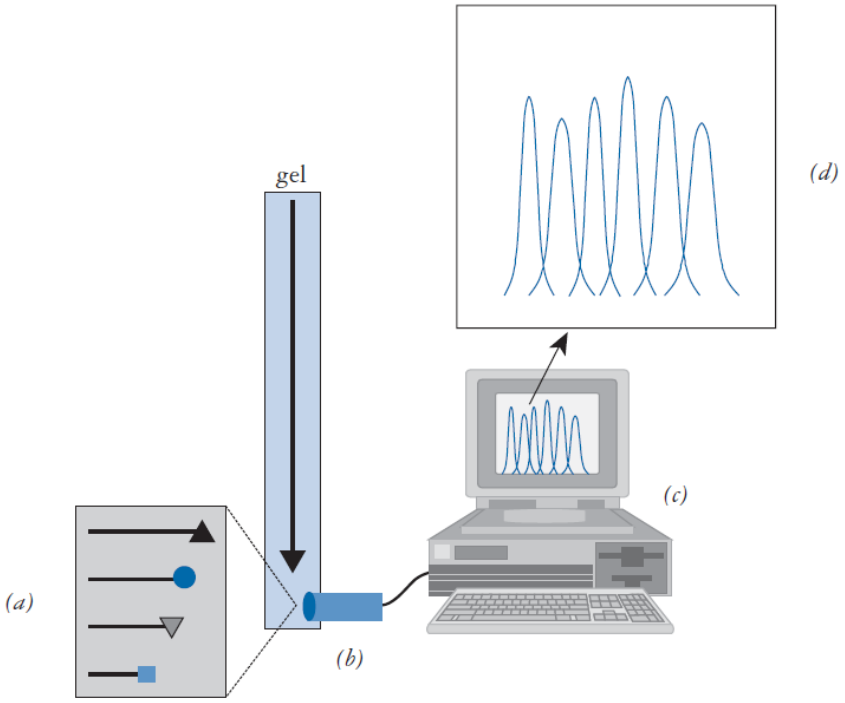


شکل ۱۰-۷) نقشه‌یابی ژنوم. در قسمت a یک نقشهٔ ژنتیکی نشان داده شده است، به طوری که موقعیت مارکرهای ژنتیکی روی کروموزوم مشخص شده است. (b) بخشی از کروموزوم با نقشهٔ فیزیکی این مناطق نشان داده شده است. انواع مختلف مارکرهای فیزیکی در شکل‌های مختلف وجود دارند. برای منتصب کردن مارکرهای فیزیکی روی مکان‌های کروموزومی از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود از جمله STS، FISH و غیره که در جدول ۱۰-۱ آمده است. (c) نقشهٔ همسانه‌سازی از یک قسمت از نقشهٔ فیزیکی که در آن قطعات زیادی از DNA با هم همپوشانی دارند نشان داده شده است. با این کار جزئیات نقشه‌های برشی و توالی DNA مشخص می‌شود. تصویر از: Nicholl (2000), *Cell & Molecular Biology*, Teaching Scotland. Advanced Higher Monograph Series, Learning and.

برای پروژه‌های توالی‌یابی بزرگ مانند ژنوم انسان نیاز به یک راهبرد جامع است. در مراکز بزرگ احتمالاً صدها نوع ماشین توالی یاب خودکار وجود دارند که احتمالاً بدون وقفه کار می‌کنند. برای بررسی این حجم زیاد اطلاعات، نیاز به یک راه کار مناسب برای بررسی‌های بیوانفورماتیکی می باشد، این راه‌کارها در فصل ۹ ذکر شده‌اند. اطلاعات مربوط به توالی را می‌توان مستقیماً در شبکه های اینترنتی جهانی به اشتراک گذاشت به‌طوری که این شبکه‌ها منابع اطلاعاتی مفید برای محققین در سرتاسر جهان خواهند بود.

۱۰-۳-۲) پروژه‌های ژنومی

تکنولوژی توالی‌یابی DNA در مقیاس وسیع جهت توالی‌یابی و دست یابی به اطلاعات وسیع از ژنوم به محققین کمک می‌کند. تاریخچهٔ توالی‌یابی ژنوم به اوایل سال ۱۹۸۰ باز می‌گردد و نتیجهٔ آن انتشار توالی باکتریوفاژ لامبدا در سال ۱۹۸۲ بود. این کار اولین توالی‌یابی کامل از ژنوم بود که شامل ۴۸۵۰۲ جفت نوکلئوتید می‌شد. بعد از آن تلاش‌های زیادی جهت نقشه‌یابی و توالی‌یابی ژنوم انجام شد. در قسمت بعد به پروژهٔ توالی‌یابی ژنوم انسان می‌پردازیم. اما پروژه‌های توالی‌یابی دیگری نیز هستند که در حال انجام بوده و یا تکمیل شده‌اند. در واقع تعداد مختلف پروژه‌ها و تلاش‌های زیاد جهت انجام آن‌ها نشان‌دهندهٔ این امر است که چگونه توالی‌یابی از ژن به سمت ژنوم منتقل شد.



شکل ۱۰-۸) توالی یاب اتوماتیک DNA با استفاده از رنگ‌های فلورسنت. هر مولکول ddNTP با یک رنگ متفاوت برچسب گذاری می‌شود. با این کار یک مجموعه از قطعات تو در تو حاوی انواع رنگ‌ها ایجاد می‌شود (a). در مرحلهٔ بعد قطعات DNA را توسط یک ژل توالی یاب جدا کرده و سپس وارد دستگاه دتکتور (شناساگر) می‌کنیم (b) و رنگ‌های فلورسنت نمایان می‌شوند. (c) کامپیوتر اطلاعات را ثبت و توالی ها را به صورت مجموعه قله‌هائی نشان می‌دهد (d). از Nicholl (۲۰۰۰) زیست شناسی سلولی و مولکولی.

چگونه موجودات مختلف برای توالی‌یابی انتخاب می‌شوند؟ در بیشتر موارد تحقیقات زیادی در این خصوص انجام شده است. دانشمندان و محققین اکثراً روی جانداران مدل تحقیق می‌کنند. این تحقیقات شامل جنبه‌های مختلف زیست شناسی مولکولی، بیوشیمی، فیزیولوژی و اکولوژی می شود. این موجودات شامل باکتری‌ها، مخمرها، نماتد، مگس میوه، گیاهان و پستانداران می‌شود. چند مثال مهم در باکتری‌ها *E.coli*، در مخمرها *Saccharomyces cerevisiae*، در نماتدها *Caenorhabditis elegans*، در مگس میوه *Drosophila melanogaster*، در گیاهان *Arabidopsis thaliana* و در موش *Mus musculus* را می‌توان نام برد.

اولین پروژهٔ توالی‌یابی ژنوم روی موجودات مدل انجام شد که به خوبی ویژگی‌های آن‌ها مشخص شده بود. توالی‌یابی ژنوم اولین مرحلهٔ منطقی در بررسی این موجودات است.

در حالت طبیعی زیست‌شناسان مولکولی که با این موجودات کار می‌کنند نیاز به دانستن توالی ژن موجود هدف دارند. جهت دانستن اطلاعات بیشتر در مورد ژن‌ها باید به بررسی این موجودات پرداخت. برخی از پروژه‌های توالی‌یابی غیر انسانی، در جدول ۱۰-۲ فهرست شده است.

جدول ۱۰-۲) پروژه‌های توالی‌یابی ژنوم.

Organism (type)	Sequence completed	Information	Relevant website(s)
Escherichia coli (bacterium)	1997	Genome size 4.64 Mb, which encodes 4405 genes.	http://www.genome.wisc.edu/
Bacillus subtilis (bacterium)	1997	First gram-positive bacterial genome to be sequenced.	http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/
Saccharomyces cerevisiae (yeast)	1996	First eukaryotic genome sequenced. Genome size 12 Mb with around 6 680 genes.	http://www.ensembl.org/
Caenorhabditis elegans (nematode worm)	1998	First multicellular organism's genome to be sequenced. Genome size 100 Mb.	http://www.wormbase.org/ http://www.ensembl.org/
Drosophila melanogaster (fruit fly)	2000	Shotgun approach used for this complex genome. Some 14700 genes located to the genome in about 133 Mb.	http://flybase.bio.indiana.edu/ http://www.ensembl.org/
Arabidopsis thaliana (plant)	2000	Genome size 117 Mb, the first plant genome sequence to be determined.	http://www.arabidopsis.org/
Mus musculus (mouse)	2002	2.7 Gb with some 22000 genes	http://www.informatics.jax.org/ http://www.ensembl.org/
Homo sapiens	2003	3.1 Gb with some 22000 genes	http://www.ensembl.org/

در عین پیشرفت‌های به عمل آمده در خصوص پروژه‌های توالی‌یابی، شاید غیر واقعی به‌نظر برسد که بگوییم یک پروژه تمام شده است. در واقع می‌توان گفت که توالی‌یابی کامل ژنوم تازه شروع شده و دانستن نحوهٔ عملکرد ژنوم کاری است که دانشمندان را طی چند سال به خود مشغول کرده است. مرحلهٔ مهم در پروژه‌های توالی‌یابی تعیین نقشه‌های فیزیکی و ژنتیکی، تعیین توالی و تأیید

آن است. این امر عموماً شامل توالی‌یابی هر قسمت از ژنوم طی چند مرحله و به‌دست آوردن و تعیین فواصل بین هر دو قطعه توالی‌یابی شده می‌شود.

علاوه بر رمزگشایی ژنتیک موجودات خاص، توالی‌یابی ژنوم موجب ایجاد مبحث ژنوم مقایسه‌ای شده است که به درک اطلاعات ژنوم و تعیین تعداد ژن‌های مشابه در موجودات می‌پردازد. بنابراین انسان‌ها توالی‌های ژنومی دارند که در بین افراد مختلف حدود ۰/۱ ٪ متفاوت است، ۲٪ نیز در بین شانپانزه‌ها متفاوت بوده و شامل ژن‌های مشابهی در باکتری‌ها می‌شود. برای دانستن نحوهٔ عملکرد سلول‌ها و موجودات می‌توان از اطلاعات بیوانفورماتیکی، ژنومی و پروتئومیکس استفاده کرد.

۱۰-۴) پروژهٔ ژنوم انسان

توالی‌یابی کرم‌ها، علف‌های هرز و مگس‌های میوه به آسانی قابل انجام است، اما توجه عموم بر توالی‌یابی ژنوم *Homo sapiens* است. بعد از گذشت ۱۵ سال بسیاری از مشکلات مربوط به توالی‌یابی و نقشه‌یابی ژنوم انسان رفع شده و امروزه پروژهٔ ژنوم انسان کامل شده است. با این حال همان‌طور که گفته شد، دستیابی به توالی کامل ژنوم فقط یک جنبه از توالی‌یابی ژنوم است و اطلاعات به‌دست آمده از آن یک جنبهٔ دیگر در پروژهٔ توالی‌یابی ژنوم انسان است که بسیار مهم می باشد.

تقریباً ۱۳ سال از شروع این پروژه گذشته و در حال حاضر ژنوم انسان توالی‌یابی شده است، با انجام این پروژه به سوالات بسیاری از زیست شناسان پاسخ داده شده است.

در ۲۶ ژوئن سال ۲۰۰۰ یکی از مهم‌ترین وقایع در خصوص توالی‌یابی انجام شد، به طوری که در این تاریخ توالی‌یابی ژنوم انسان منتشر شد. اگرچه این امر به مقدار زیادی وابسته به اطلاعات نمادین بود اما این امر بخشی از تحقیقات مربوط به مارپیچ آلفا در سال ۱۹۵۳ بود که یکی از هیجان انگیزترین رخدادها بود. این دو رخداد تاریخی با تمرکز بر DNA به توضیح این مورد می پردازد که چگونه یک تکنولوژی می‌تواند علم را تغییر دهد. واتسون و کریک افرادی بودند که در سال ۱۹۵۰ در خصوص DNA اطلاعاتی را منتشر کردند. مدل آنها شانپانزه بود و آزمایشگاه آنها در کمبریج قرار داشت. در مقابل توالی‌یابی ژنوم نیاز به همکاری‌های بین المللی دارد که حدوداً ۲۰ مرکز آزمایشگاهی و هزاران بیولوژیست مولکولی، تکنیسین و مهندس کامپیوتر چه مستقیماً و چه به صورت غیر مستقیم در این خصوص فعالیت می‌کنند. همچنین این نوع پروژه‌های توالی‌یابی موجب ایجاد مناقشاتی خصوصاً در مورد این امر که این پروژه ها چگونه انجام می‌شوند شده است. اگرچه اولین پیش نویس توالی‌یابی در سال ۲۰۰۰ منتشر شد، اما اطلاعاتی که در ۱۴ آوریل ۲۰۰۳

منتشر شد بسیار مهم‌تر بود. در این زمان بود که توالی‌یابی gold standard تعریف شد بنـابراین پیش نویس توالی‌یابی تکمیل شد.

جدول ۱۰-۳) حقایقی در خصوص ژنوم انسان

این اطلاعات دویست دفترچه تلفن ۵۰۰ صفحه‌ای را پر خواهد کرد.
بین انسان‌ها، تفاوت DNA به واسطه تفاوت ۲/ ۰درصد است یا به عبارتی یکی به ازای هر ۵۰۰ جفت باز (کلمات). با توجه به این نکته که سلول‌های انسان از ژنوم دو نسخه دارند.
اگر ما بخواهیم ژنوم را با سرعت یک حرف در هر ثانیه در طول ۲۴ ساعت از روز بخوانیم، برای خواندن کتاب زندگی یک قرن زمان نیاز است.
اگر دو فرد متفاوت شروع به خواندن کتاب زندگی خود به صورت یک حرف در ثانیه کنند، تقریباً نزدیک به ۸/۵ دقیقه یعنی ۵۰۰ ثانیه طول می‌کشد تا به یک تفاوت در آنها برسند.
اگر یک تایپیست در هر دقیقه ۶۰ کلمه تایپ کند (تقریباً ۳۶۰ حرف). به صورت ۸ ساعت در یک روز، تقریباً ۵۰ سال برای تایپ کتاب زندگی زمان لازم است.
DNA ما تقریباً ۹۸٪ با DNA شامپانزه مشابه است.
تقریباً برای ۹۷٪ از ژنوم انسان هیچ عملکردی شناخته نشده است.
اولین کروموزومی که به طور کامل رمز گشایی شد کروموزوم ۲۲ در مرکز پژوهشی سنگر واقع در در کمبریجشایر در دسامبر ۱۹۹۹ بود.
در هر سلول ما ۶ فوت DNA بسته بندی شده است که ساختار آن تقریباً معادل ۰,۰۰۰۴ اینچ است.
۳ میلیارد (۳۰۰۰۰۰۰۰۰۰) حرف در کد DNA در هر یک از سلول‌های بدن وجود دارد.
اگر تمام DNA بدن انسان را از انتها تا انتها کنار هم قرار دهیم، می‌توان از زمین ۶۰۰ بار بصورت رفت و برگشت به خورشید رسید (۱۰۰ ترلیون × ۶ فوت تقسیم بر ۹۳ میلیون مایل که می‌شود ۱۲۰۰).

ایده‌ای که ژنوم انسان را می‌توان توالی‌یابی کرد در اواسط ۱۹۸۰ جدی شد و در انتهای این دهه ضرورت انجام این پروژه به طور چشمگیری مورد توجه قرار گرفت. انگیزهٔ اولیه در این خصوص از آمریکا شروع شد و تشکیل موسسهٔ مربوط به ژنوم انسان (HUGO) در سال ۱۹۸۸ تولد این پروژه در مقیاس بین المللی محسوب می‌شود. وظیفهٔ این موسسه هماهنگ کردن تلاش‌های سایر مؤسسات در کشورهای مختلف بود. پروژهٔ توالی‌یابی ژنوم انسان در اکتبر ۱۹۹۰ شروع شد. در این خصوص گروه‌های کوچکی از آزمایشگاه‌ها مربوط به رشته زیست‌شناسی مولکولی وارد عمل شدند به‌طوری که بیشتر کشفیات کلیدی در این مسیر را آن‌ها انجام دادند. توالی‌یابی ۳×۱۰^{۹} جفت نوکلئوتید از ژنوم انسان اتفاق مهم دیگری بود که انجام شد. موارد موجود در جدول ۱۰-۳ می‌تواند به یادگیری موارد ذکر شده در متن کمک کند.

پروژهٔ توالی‌یابی ژنوم انسان در چهارچوب‌های زمانی خاصی انجام شد: ۱۰۰ سال از ژنتیک مندلی تا نوشتن پیش نویس توالی‌یابی یعنی ۲۰۰۰-۱۹۰۰ و ۵۰ سال از اثبات دو رشته‌ای بودن رشته DNA تا پایان توالی‌یابی یعنی ۲۰۰۳-۱۹۵۳. این ۵۰ سال تأثیر بسیار زیادی بر تاریخچه توالی‌یابی انسان گذاشت.

۱۰-۴-۱) ژنوم چه کسی استفاده می‌شود و چه تعداد ژن در آن قرار می گیرد؟

پرسشی که اغلب در این خصوص پرسیده می‌شود این است که "ژنوم چه کسی برای توالی‌یابی استفاده و چگونه این ژنوم با سایر ۶ بیلیون ژنوم‌های موجود مرتبط می‌شود؟". همان‌طور که پیش-بینی شده است هیچ پاسخ ساده‌ای برای پاسخ به این سوال وجود ندارد. جنبهٔ مثبت این سوال این است که می‌توان از آن چشم‌پوشی کرد. این موضوع که ژنوم چه کسی توالی‌یابی می‌شود زیاد مهم نیست، به طوری که تفاوت‌های فنوتیپی بین افراد از تغییرات بسیار کوچک در توالی ژنوم ایجاد می شود (حدود ۰/۱ ٪ یعنی حدود ۳ میلیون جفت نوکلئوتید در بین افراد متفاوت است). این تفاوت‌ها یا همان پلی مورفیسم، در واقع هنگام تعیین و بررسی عملکرد ژنوم بسیار مهم هستند. بنابراین یک مکان خاص ممکن است چندین بار به دلایل مختلف توالی‌یابی شود. به عبارت بهتر کل ژنوم برای نقشه‌یابی و مطالعات مربوط به توالی‌یابی استفاده می‌شود.

سؤال دیگری که موضوع بسیاری از مباحثات است مربوط به تعداد ژن‌های درون ژنوم می‌شود. این تعداد در اولین روزهای تحقیقات به ۱۰۰،۰۰۰ عدد می‌رسید. بررسی‌ها نشان داد که در اوایل ۱۹۹۰ حدود ۵۰،۰۰۰ ژن وجود داشت اما طی انجام توالی‌یابی‌ها مشخص شد که تعداد ژن‌ها باید بیشتر باشد. برخی از مردم عدد ۱۵۰،۰۰۰ را در این خصوص در نظر می‌گیرند. به صورت خلاصه، هنگامی که دانشمندان پروژهٔ توالی‌یابی ژن را آغاز کردند، در مورد تعداد دقیق ژن‌های موجود در ژنوم آگاه نبودند. با انجام توالی‌یابی ژنوم اطلاعات زیادی به محققین داده شده که بر اساس این

اطلاعات می‌توان تعداد ژن‌های ژنوم انسان را تخمین زد. این تخمین در ابتدا ۴۰،۰۰۰، بعد ۳۵،۰۰۰-۳۰،۰۰۰ و سپس بین ۲۰،۰۰۰ تا ۲۵،۰۰۰ رسید.

تخمین تعداد ژن‌های ژنوم انسان با انجام هر مرحله و پیشرفت در پروژه‌های توالی‌یابی کاهش یافت. یعنی از ۱۰۰،۰۰۰ به ۲۲،۰۰۰ رسید که بر اساس آخرین اطلاعات توالی‌یابی منتشر شده است.

۱۰-۴-۲) نقشه‌های فیزیکی و ژنتیکی ژنوم انسان

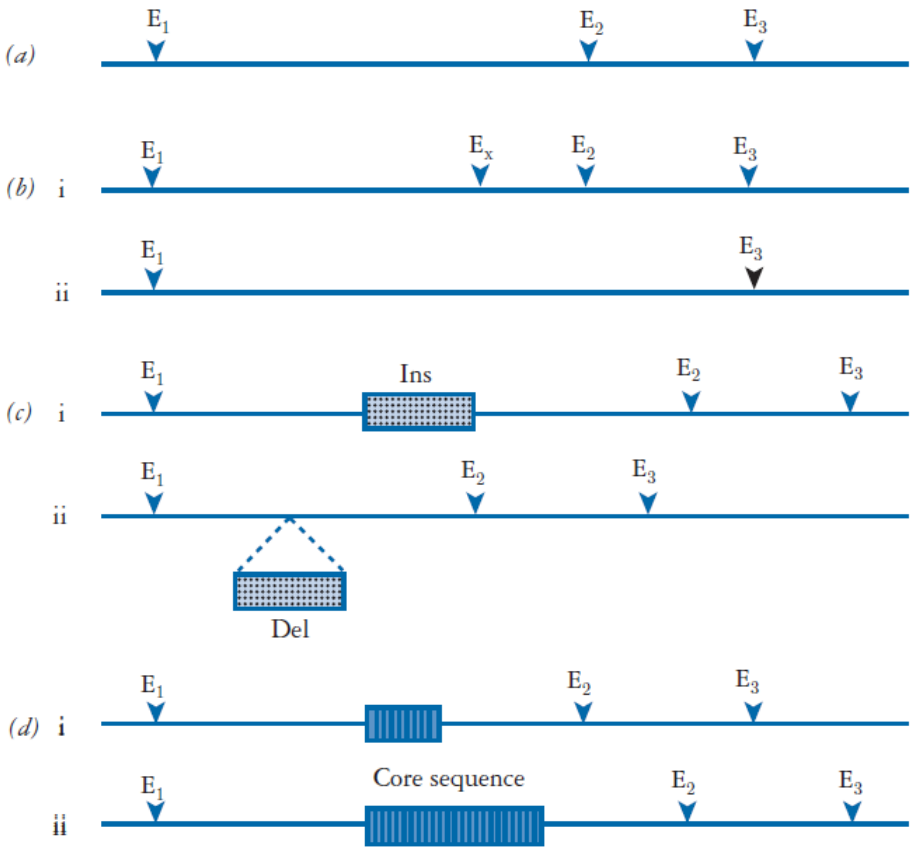
در بسیاری از روش‌ها، مرحلهٔ مهم در پروژه ژنوم صرفا توالی‌یابی نیست، اما تهیه نقشه‌های فیزیکی و ژنتیکی به توالی یابی کامل برعلیه یک نقشه رفرنس نیاز دارد. نقشه‌های ژنتیکی بر مبنای این حقیقت که تلاقی آزمایشی را نمی‌توان روی انسان انجام داد از رشد محدود برخوردار است. در بیشتر موارد ترسیم الگوهای توارثی با استفاده از مارکرهای ژنتیکی وابسته به یک بیماری می‌تواند اطلاعات بسیار مفیدی در اختیار محقق قرار دهد. مرکز CEPH (Centre d'Etude Polymorphism Humain) در پاریس از مجموعه‌ای از سلول‌ها نگهداری می‌کند که بیش از سه نسل را شامل می‌شود (خانواده‌ای متشکل از ۴ پدربزرگ و مادربزرگ، دو والد و حداقل شش فرزند). این اطلاعات برای مطالعات نقشه‌یابی بسیار مفید است.

هزاران بیماری با منشأ ژنتیکی شناسایی شده‌اند که در آن نقص به‌عنوان یک اختلال مونوژنیک (تک ژن) قابل ردیابی است. اخیراً ۱۷،۰۰۰ ورودی (از انواع مختلف) در بانک اطلاعاتی توارث مندلی در انسان که یک سایتمهم در این خصوص محسوب می‌شود ثبت شده است. این سایت در URL قرار دارد [http://www. ncbi.nlm.nih.gov/Omim/]. بسیاری از این بیماری‌ها بر مبنای بررسی‌های شجره نامه با استفاده از روش رتروسپکتیو (retrospective technique) مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. با این حال برای ایجاد اطلاعات مفید در خصوص نقشه های ژنتیکی واجب نیست که حتماً ژن‌های مسئول یک اثر فنوتیپیکی را شناسایی کرد. در این خصوص اگر بتوان یک مارکر پلی مورف را شناسایی کرد که تقریباً همیشه با یک ژن خاص لینکاژ داشته باشد، این مارکر می‌تواند بسیار مفید باشد. به این امر چند شکلی مولکولی خنثی[1] گفته می‌شود. در اوایل ۱۹۸۰ یکی از مارکرهای این گروه که چند شکلی طولی قطعات محدود شونده یا همان RFLP نامیده می‌شد جهت مکان یابی ژن‌ها استفاده شد. هنگامی که DNA را با یک آنزیم برشی خاص برش دهیم RFLP ها با طول متفاوت ایجاد خواهد شد (شکل ۱۰-۹). این قطعات زمانی ایجاد می‌شوند که در مولکول DNA تفاوت وجود داشته باشد که این تغییر یا موجب تفاوت در توالی

[1] Neutral molecular polymorphisms

تشخیصی آنزیم و یا تغییر در مکان سایت برشی آنـزیم مـی شـود. بنـابراین یـک جهـش نقطـه‌ای می‌تواند یک مکان آنزیم برشی را حذف کند و یا یک مکان جدید ایجاد کند، در حالی‌که الحـاق یـا حذف، موقعیت نسبی سایت‌های آنزیم برشی را تغییـر مـی‌دهـد. اگـر یـک RFLP در داخـل (یـا نزدیک) یک ژن که موجب ایجاد بیماری می‌شود قرار گیرد، معمولاً احتمال ردیـابی ژن معیـوب بـا جستجوی RFLP، با استفاده از روش ساترن بلات به همراه یک کاوشگر که به ناحیه مکمل مـورد نظر خود متصل شود امکان‌پذیر است. در این روش از یک کاوشـگر بـرای اتصـال بـه مکـان هـدف استفاده می‌شود. این روش بسیار قوی است و توسط آن می‌توان بسـیاری از ژن‌هـا را از روی مکـان کروموزومیشان نقشه‌یابی کرد البته این روش قبل از ایجاد روش نقشـه‌یـابی ژنتیکـی و فیزیکـی بـا وضوح بالا استفاده می‌شده است. در این خصوص می‌توان مثال‌هـای مربـوط بـه ژن عامـل بیمـاری هانتینگتون[1] (کروموزوم چهار)، فیبـروز سیسـتیک[2] (کرومـوزوم هفـت)، کـم‌خـونی داسـی شـکل[3] (کروموزوم ۱۱)، رتینوبلاستوما[4] (کروموزوم ۱۳) و آلزایمر[5] (کروموزوم ۲۱) را نام برد.

[1] Huntington
[2] Cystic fibrosis
[3] Sickle-cell anaemia
[4] Retinoblastoma
[5] Alzheimer



شکل ۱۰-۹) روش‌های محتمل ایجاد RFLP. (a) یک قطعه DNA با سه مکان برای آنزیم *Eco*RI نشان داده شده است (E1، E2 و E3). یکی از قطعات تولید شده ناشی از هضم توسط آنزیم *Eco*RI، قطعه E1→ E2 می باشد. اگر موقعیت‌های نسبی این دو مکان برش به هر دلیلی تغییر کنند می‌توان یک نقشهٔ RFLP تهیه کرد. (b) جهش‌های نقطه‌ای نشان داده شده است. اگر یک جهش نقطه‌ای رخ دهد و به واسطهٔ آن یک مکان جدید برای آنزیم برشی *Eco*RI ایجاد شود ((*b*)i) نشاندار شده بصورت Ex)، قطعات E1→ E2 بوسیله دو قطعهٔ کوچکتر جایگزین می‌شود: Ex →E2 و E1→ Ex. اگر یک موتاسیون نقطه ای مکان E2 ((b) ii) را حذف کند، قطعه به صورت E1 →E3 شده که از قطعات اصلی بزرگ‌تر هستند. (c) اثر حذف و اضافه. اگر یک قطعه DNA بین E1 و E2وارد شود، مانند Ins در قسمت c، قطعه E1 →E2 بزرگتر خواهد شد. این اضافه کردن ممکن است موجب اضافه شدن مکان‌های برشی برای آنزیم *Eco*RI شود که بر طول قطعات تولیدی موثر هستند. اگر DNA حذف شود مانند del در ii از قسمت c، قطعات کوتاه تر خواهند شد. (d) اثر تعداد متفاوتی از نواحی با موتیف‌های تکراری. این نواحی می توانند در RFLP قابل توجه باشند. به طوری که می‌توان از آنها در پروفایل ژنتیکی افراد استفاده کرد. (d) ۱۰ کپی از عناصر توالی‌های تکراری در قسمت i نشان داده شده است، لذا قطعه E1 →E2 کوتاه‌تر از

قطعات قسمت d و ii خواهد شد به طوری که در این قسمت ۲۴ نسخه وجود خواهد داشت. تفاوت بین طول قطعات را می‌توان با روشی مانند ساترن بلات و استفاده از یک کاوشگر مناسب شناسایی کرد.

سایت تبادلات مندلی در انسان (MIM) توسط ویکتور ماکسیک (پدر ژنتیک پزشکی) ایجاد شد. MIM یک منبع اطلاعاتی بزرگ برای تطبیق و توزیع اطلاعات در خصوص بیماری‌های ژنتیکی است. سایت این مرکز امروزه به‌صورت آنلاین به اسم OMIM در دسترس است.

با استفاده از RFLP به‌عنوان یک مارکر، نقشهٔ ژنتیکی ژنوم انسان در سال ۱۹۸۷ در دسترس قرار گرفت. با این حال این نقشه از نظر درجه پلی مورفیسم (وجود و یا عدم وجود یک مکان مربوط به آنزیم برشی) و نیز میزان وضوح آن دارای محدودیت‌هایی بود. با استفاده از مینی ماهواره‌ها و میکروماهواره‌ها میتواند اطلاعات بیشتری در خصوص تهیه نقشه‌های ژنتیکی در اختیار قرار می دهد. مینی ماهواره‌ها توالی‌های تکراری کوتاه تصادفی با طول ۱۰۰-۱۰جفت نوکلئوتید هستند. تعداد عناصر موجود در منطقهٔ مینی ماهواره‌ها متغیر است، به همین دلیل به آن‌ها توالی‌های با تعداد تکرارهای متغیر (VNTR)[1] نیز می‌گویند (شکل ۱۰-۱۰). از اینها می‌توان در مطالعات مربوط به نقشه‌یابی استفاده کرد و نیز می‌تواند مبنایی برای انگشت نگار ژنتیکی[2] باشد. البته امروزه بیشتر به آن تعیین پروفایل DNA[3] گویند که در فصل ۱۲ در مورد آن بحث شده است. یکی از مشکلات مربوط به مارکرهای VNTR این است که آنها به طور یکنواخت در کل ژنوم پخش نشده‌اند و معمولاً در انتهای کروموزوم قرار دارند. برای غلبه بر این مشکل از میکروماهواره‌ها استفاده می‌شود. این مارکرها دارای توالی‌های بسیار کوتاه‌تری هستند و عموماً از میکروماهواره با تکرار دو نوکلئوتید CA جهت مطالعات نقشه یابی استفاده می‌شود. این نواحی تکراری CA را می‌توان با کمک واکنش PCR تکثیر کرد. پرایمرها عموماً مربوط به نواحی دو طرف توالی‌های تکراری هستند. از آنجا که این پرایمرها از توالی‌های واحد منشأ گرفته‌اند به آنها یک نوع توالی‌های برچسب خورده (STS) نیز می‌گویند (جدول ۱۰-۱ را ببینید) و از این رو می‌توان از آنها برای ارتباط نقشه‌های ژنتیکی و فیزیکی استفاده کرد.

نقشه‌یابی ژنتیکی ژنوم انسان یک کار بسیار مهم از بخش آماده‌سازی کار بود که سرانجام بهتکمیل پروژهٔ توالی‌یابی ژنوم انسان ختم شد.

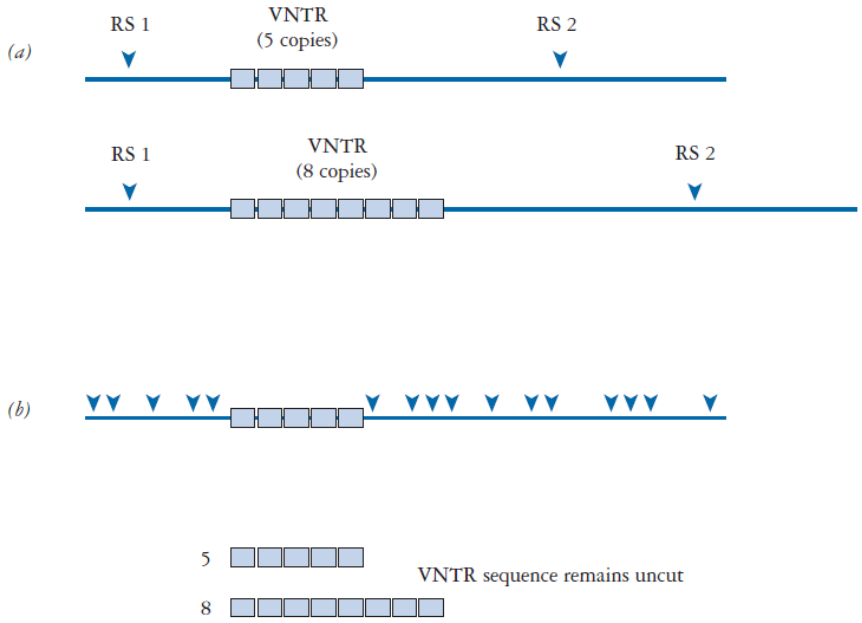
پیشرفت در روش‌های نقشه‌یابی فیزیکی و نقشه‌های ژنتیکی در اواخر نیمهٔ ۱۹۹۰ اطلاعات زیادی در مورد ژنوم فراهم کرد. یک نقشهٔ فیزیکی با بیش از ۱۵،۰۰۰ مارکر STS در سال ۱۹۹۵ منتشر

[1] Variable number tandem repeats
[2] Genetic fingerprinting
[3] DNA profiling

شد، تا سال ۱۹۹۸ تعداد این مارکرها در این گونه نقشه ها بـه بـیش از ۳۰،۰۰۰ رسـید. همـراه بـا افزایش تعداد مارکرها و وضوح نقشه‌ها نرم افزارهای مختلفی نیز برای بررسی و تجزیه و تحلیل این نقشه ها ارائه شد. نتیجهٔ کلی این‌گونه نقشه‌یـابی بـه طـور خلاصـه ایـن اسـت کـه شـهامت انجـام توالی‌یابی‌های ژنوم روز به روز رو به افزایش است.

۱۰-۴-۳) به‌دست آوردن و سرهم کردن توالی‌ها

شاید تعیین توالی کوچک‌ترین مشکل در آنالیز ژنوم مدرن باشد، به‌ویژه اینکه امروزه توالی‌یـابی بـه صورت اتوماتیک یک کار عادی تلقی می‌شود. با این حال استفاده از سه بیلیون نوکلئوتید As، Gs، Ts و Cs در ژنوم انسان ناچیز نیست. مانند نقشه‌های فیزیکی در این زمینـه نیـز علـم بـه سـرعت پیشرفت کرد و در نیمهٔ ۱۹۹۰ مقدار زیادی از اطلاعات توالی ایجاد و منتشر شد.



شکل ۱۰-۱۰) تعداد متفاوت تـوالی‌هـای تکـرار ی متغییـر نوکلئوتیـدی (VNTR) (a) مـی‌تواننـد آنچـه سایت‌های RFLP گفته می‌شود را ایجاد کند، همچنانکه در شکل ۱۰-۹ و در ایـن شـکل (a) نشـان داده شده است. در این شکل مکان برشـی ۱ و ۲ (RS1 و RS2) بـا اسـتفاده از تعـداد ۵ و ۸ نسـخه از عناصـر تکراری از هم جدا شده‌اند. اگر در ناحیهٔ RS1 و RS2 برش ایجاد شود قطعات تولیدی از نظر طول متفاوت خواهند بود. (b) یک روش جایگزین برای آنالیز VNTR است. اگر از یک آنزیم برشـی اسـتفاده شـود کـه توالی DNA را در نواحی مجاور توالی‌های تکراری با فراوانی زیاد برش دهد (بـا علامـت پیکـان نشـان داده

شده است) اما توالی‌های درون ناحیه VNTR را برش ندهد، بنا بر این توالی VNTR جداسازی و برش داده شده را می‌توان بعنوان یک مارکر در انگشت نگاری DNA استفاده نمود.

توالی‌یابی ژنوم با کمک روش‌های مختلف انجام می‌شود، هرچند که تمام آن‌ها یک هدف مشترک دارند. یک جنبهٔ کلیدی ازتوالی‌یابی ژنوم تولید آنچه همسانه‌های آماده توالی‌یابی نامیده می‌شود. از نظر تئوری، توالی‌یابی ژنوم انسان با روش توالی‌یابی شات گان[1] امکان پذیر است. با این حال، مرحلهٔ محدود کننده در این روش قرار دادن توالی‌ها در کنار هم است که بسیار دشوار می‌باشد، به‌ویژه در مورد ژنوم انسان، که دارای توالی‌های تکراری بسیار است. در روش مستقیم شات گان، تلاش‌هایی برای کنار هم قرار دادن توالی‌های شات گان و داده‌های نقشه برای دستیابی به نتایج بهتر صورت می‌گیرد، اما باز هم برخی نتایج ناخواسته ایجاد می‌شود.
روش دیگر برای توالی‌یابی ژنوم با طول زیاد روش کانتیگ همسانه[2] نام دارد. در این روش، از توالی های یک همسانه برای شناسایی توالی‌های مشابه در کانتیگ مربوط به همسانه‌های دیگر استفاده می‌شود. این کار یا با هیبریداسیون و یا با کمک تکثیر به روش PCR انجام می‌شود. همسانه‌های با حداقل میزان همپوشانی می توانند برای مطالعات بیشتر انتخاب شوند. با استفاده از این روش می‌توان به توالی دقیق یک ژنوم دست یافت به طوری که توالی‌ها به هم متصل شده و لذا به آسانی می‌توان با انجام توالی‌یابی چندگانه از همسانه‌های مختلف به توالی هدف رسید. استفاده از وکتورهای مصنوعی باکتریایی (BAC) یک روش کارا در ایجاد قطعات DNA است؛ تعداد همسانه برای کل ژنوم انسان از نظر تئوری باید تقریباً ۳۰۰،۰۰۰ عدد باشد. با کمک تعیین توالی انتهاهای هر همسانه و سپس سرهم کردن توالی هر همسانه با روش شات‌گان به‌صورت دقیق و کنترل شده می‌توان به اطلاعات مربوط به توالی هدف دست یافت.

۱۰-۴-۴) ارائه و طرح مسائل مربوط به توالی

در فصل ۹ به بررسی این امر پرداختیم که چگونه بیولوژیست‌ها از روش‌های بیوانفورماتیکی برای ساماندهی مجدد اطلاعات استفاده می‌کنند. خصوصاً در قسمت ۹-۴-۴ مثالی از HGP برای نشان دادن اصول استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی آورده شده. در این بخش به نحوهٔ چگونگی استفاده از اطلاعات در مورد ژن می پردازیم.
بیایید در مورد یکی از مکان‌هایی که به بررسی اطلاعات ژنوم می‌پردازد سخن بگوییم، یعنی مؤسسه سنگر در دانشگاه کمبریج. بهترین راه استفاده از سایت این مؤسسه .http://www]

[1] Shotgun sequencing
[2] Clone contig method

sanger.ac.uk] است. بعد از ورود به سایت شما به مجموعه‌ای از منابع دسترسی دارید که دستیابی به آن‌ها تا چند سال پیش غیرقابل تصور بود و تنها با چند کلیک ساده می‌توانید اطلاعات ژنومی زیادی به‌دست آورید. اکنون با یک مثال نحوهٔ استفاده از اطلاعات ژن شرح داده خواهد شد.
پروتئین P53 (گاهی به آن TP53 نیز گویند) مسئول سرکوب تومور است. این ژن دارای یک نقش کلیدی در کنترل تقسیم سلول است. این امر برای سلول‌ها بسیار مهم است زیرا با ایجاد جهش در این ژن ممکن است کنترل تقسیم سلولی انجام نشده و از این رو سرطانی شدن ایجاد شود. از صفحهٔ اصلی سایت موسسهٔ سنگر از قسمت پایگاه‌های اطلاعاتی کلمه Ensembl را از منوی بالای صفحه کلیک کنید. با این کار فهرستی از ژنوم‌هایی که در دسترس اند به کاربر داده می‌شود. برای گرفتن توالی ژنوم انسان روی *Homo sapiens* کلیک کنید. صفحه مربوط به ژنوم انسان باز می‌شود. در این صفحه موارد و اطلاعات مفید از ژنوم انسان موجود است. در قسمت بالا، سمت راست، یک موتور جست و جو وجود دارد کلمهٔ TP53 را در آن نوشته و سرچ کنید. در عرض چند ثانیه یک فهرست از ژن‌های مختلف باز می‌شود عبارت ENSG00000141510 را انتخاب کنید. با این کار به اطلاعات این ژن دست می‌یابید. ما اکنون با مثال به بررسی سه قسمت اصلی از این صفحه می پردازیم.
در قسمت مکان‌یابی ژنتیکی روی لینک کروموزوم ۱۷ کلیک کنید، شکل‌های مربوط به جفت نوکلئوتید شامل 642 531 7-464 512 7 است. این عمل شما را به صفحه‌ای که حاوی اطلاعاتی در خصوص ژن p53 که در روی بازوی کوچک کروموزوم ۱۷ در باند p13.1 قرار دارد می برد. در قسمت مشاهده جزئیات و بخش جفت نوکلئوتید، مکان ژن و رونوشت های بیانی آن را با بزرگنمائی‌های مختلف می‌توانید ببینید. بعد از اینکه این مشاهده را داشتید، به بخش گزارش ژن برگشته و در بخش توصیفی بر روی لینک Uniprot/SWISSPROT کلیک نمایید. این کار اطلاعاتی در مورد p53 را در Uniport Knowledgebase می‌دهد. بررسی قسمت فوق ایده هایی در خصوص انواع اطلاعات در دسترس می‌دهد که این اطلاعات در بخش انتهای بصورت لیست توالی آمینو اسیدی آن دیده می‌شود. به قسمت گزارش ژن باز گردید، حال می خواهیم به بررسی بخش تشابهات بپردازیم. لینک ها نشان دهندهٔ سایر پایگاه های اطلاعاتی است (توجه داشته باشید که در این قسمت با کلیک بر روی لینک UniProt/Swiss-Prot به یونی پورت p53 دسترسی خواهید یافت.) با این حال این قسمت را جست و جو کنید تا به MIM (توارث مندلی در انسان[1]) دست یابید. دو نوع لینک در اینجا قابل دسترسی است، لینک‌های مرتبط با بیماری‌های MIM که شما را به نسخه‌های آنلاین MIM وصل می کنند که بیماری‌های مرتبط با

[1] Mendelian Inheritance in Man

ژن را بیان می‌کنند در حالی‌که قسمت MIM ژن (۱۹۱۱۷۰) در خصوص خود MIM اطلاع می-دهد.

تحقیقات خلاصه شده فوق فقط به بررسی پیچیدگی و حوزه اطلاعاتی ژنوم انسان پرداخت. با اضافه نمودن تعدادی لینک دیگر می‌توان به مکان کروموزوم، توالی ژن، اطلاعاتی در خصوص توالی پروتئین و اسیدآمینه و اطلاعاتی در خصوص نقش پروتئین در بیماری‌ها دست یافت. اگر سایر بخش‌های موجود در قسمت p53 را ملاحظه کنید، فکر کنم که موافق با استفاده از ابزارهای کامپیوتری جهت دستیابی به اطلاعات مفید به شکل ساده و مؤثری باشید.

otheromes (۵-۱۰

علم زیست‌شناسی مولکولی در قالب و چتر "امیک[1]" مسئول ارائه سیستم‌های جدیدی در حیطه این علم می‌باشد. با این حال باید به یاد بیاوریم که اصطلاح اکولوژیکی بیوم که در واقع مدت زمان طولانی مورد استفاده قرار گرفته است، اولین بار در سال ۱۹۱۶ به کار برده شد. اخیرا، طرح این موضوع اجتناب ناپذیر بود که زمانی‌که ژنوم و ژنومیکس به‌عنوان مفاهیم مفیدی مطرح شده بودند، این واژه‌ها برای موارد دیگر نیز به‌کار برده می‌شدند؛ دو اصطلاح علمی دیگر رایج در این حوزه، پروتئوم[2] و ترانسکریپتوم[3] است که اخیراً به این فهرست افزوده شده اند. این اصطلاحات به نمایندگی از کل پروتئین های موجود در یک سلول خاص (پروتئوم) و یک مجموعه از رونوشت های تولید شده در هر مکان و هر زمان (ترانسکرپیتوم) اشاره دارد. به هر حال، امروزه بیشتر omes ها که نه تنها اصطلاحاتی برای توصیف جنبه‌های خاص عملکرد سلولی است، بلکه یک حوزهٔ تحقیقاتی فعال در زیست شناسی سلولی و مولکولی جدید می‌باشد. اخیراً لیستی بالغ بر ۱۰۰ مورد "Ome" و "Omics" به این فهرست اضافه شده است (http://www.genomicglossaries.com/content/omes.asp). در مجله نیچر یک قسمت تحت‌عنوان "دروازه Omics" موجود است (http://www.nature.com/omics/index.html). به برخی از جنبه‌های امیکس در انتهای این فصل می‌پردازیم.

در سال‌های گذشته دو واژهٔ "Ome" و "Omics" گسترش قابل توجهی داشتند که هر دو از کلمه "بیوم" منشأ گرفته اند. این اصطلاح اکنون برای توصیف مجموعه‌ای از مفاهیم و کاربردها استفاده می‌شود.

---

[1] Omics
[2] Proteome
[3] Transcriptome

۱۰-۵-۱) ترانسکریپتومیکس[1]

ژنوم به‌عنوان نماینده مجموعه کامل ژن‌ها، مناطق تنظیمی، توالی‌های تکراری و نواحی داخل ژنی است. با این همه در هر سلول خاص فقط یک مجموعه از ژن‌ها در ژنوم فعال بوده و در یک زمان خاص بیان می‌شوند. در بخش ۲-۵-۳ دیدیم که برخی ژن‌ها خانه دار[2] هستند و نقش تنظیمی ندارند، در حالی‌که سایرین بر اساس نوع سلول و شرایط محیطی می‌توانند تنظیم شوند. ترانسکریپتوم به معنای یک مجموعه از رونوشت‌های تولید شده از ژن‌ها در یک سلول می باشد. بررسی و آنالیز ترانس کریپتوم یک قسمت کلیدی در زمینه بررسی بیان ژن محسوب می‌شود. یکی از راه‌های حصول این هدف استفاده در فناوری میکروواری DNA است.

فناوری میکروواری DNA روش و نحوه بررسی و آنالیز ترانسکریپتوم را متحول کرد.

روش‌های مختلفی که در آنها تکنولوژی میکروواری می‌تواند جهت بررسی ترانسکریپتوم استفاده شود، وجود دارد. یکی از کاربردهای معمول آن بررسی الگوی رونوشت‌های تولید شده توسط دو نمونه سلولی مختلف مانند شکل ۱۰-۱۱ است. نمونه ها می‌توانند در شرایط مختلف رشد کنند و یا اینکه سلول‌ها می‌توانند از بافت های مختلف باشند. یک میکروواری را می‌توان هم با cDNA و هم با الیگونوکلئوتیدها ساخت و جهت بررسی الگوی رونوشت در هر یک از سلول‌ها استفاده کرد. در این روش امکان شناسایی توالی ژن‌هایی که فقط در یکی از سلول‌ها بیان می‌شوند وجود دارد.

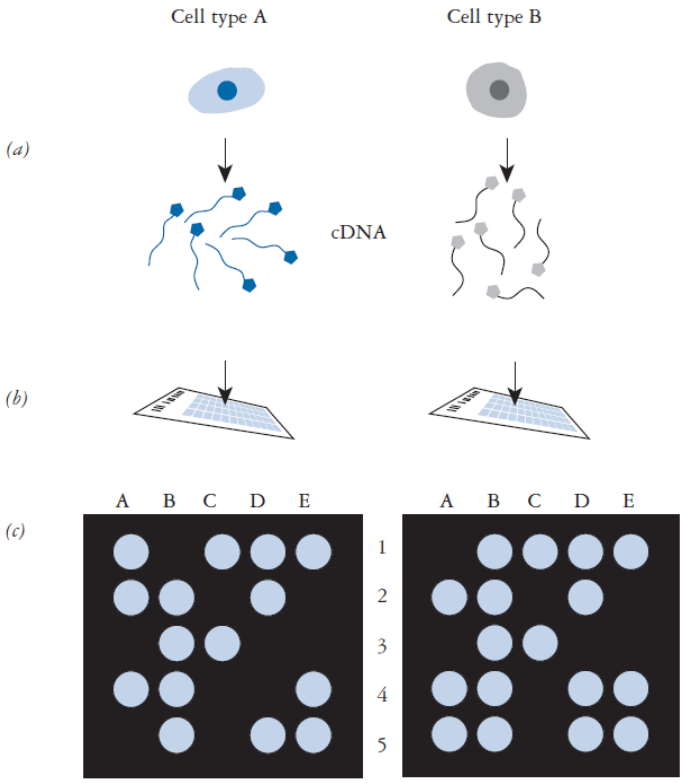
رویکرد و روش دوم جهت بررسی رونوشت که اغلب در مورد بررسی و آنالیز سلول های عادی و بیمار (مانند سلول های سرطانی) به کار می‌رود، در شکل ۱۰-۱۲ نشان داده شده. در این مورد میکروواری و یا چیپ DNA در رقابت با مخلوطی از cDNA های تولید شده از نمونه‌های mRNA بدست آمده از سلول های سالم و بیمار قرار می‌گیرند. mRNA های هر سلول برای تولید برچسب‌های فلورسنت cDNA مورد استفاده قرار می‌گیرند، بر این اساس که نمونه‌های سالم و بیمار با رنگ‌های مختلف برچسب گذاری می شوند. نمونه ها مخلوط می‌شوند و به همراه میکروواری در انکوباتور قرار داده می‌شوند. cDNA ها به توالی‌های مکمل خود روی میکروواری متصل می‌شوند و الگوی تولید شده می‌تواند جهت شناسایی ژن‌هایی که در سلول های عادی و سرطانی بیان می‌شوند مورد استفاده قرار گیرد.

در حالی‌که ترانسکریپتوم نماینده مجموعه‌ای از رونوشت‌ها است که در هر نقطه مورد بررسی وجود دارد، اصطلاح "اکسپرسوم[3]" گاهی اوقات جهت نمایش مجموعه کاملی از محصولات بیان ژن شامل

---

[1] Transcriptome
[2] Housekeeping
[3] Expressome

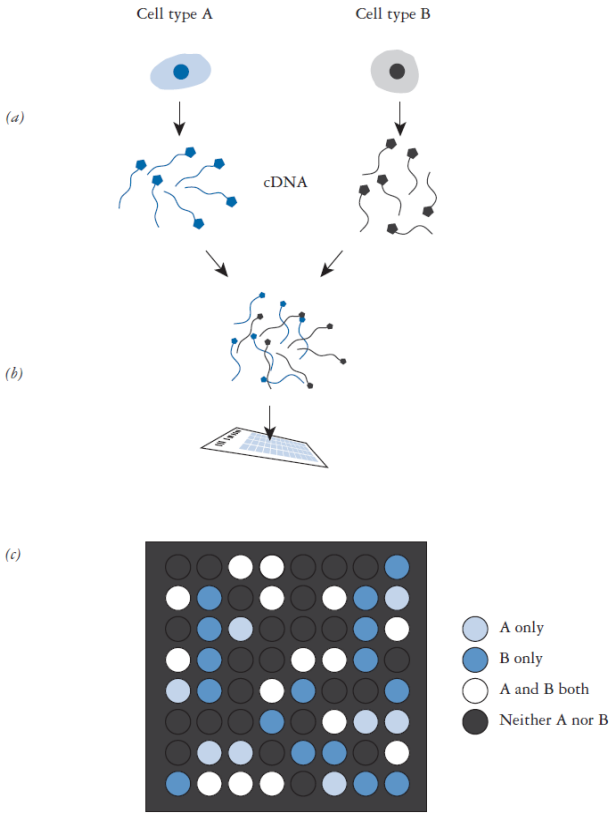
رونوشت‌ها، پروتئین‌ها و سایر محصولات سلولی استفاده می شود. این اصطلاح همچنین گاهی اوقات در خصوص بافت‌ها، موجودات و گونه‌ها کاربرد دارد.



شکل ۱۰-۱۱) بررسی و آنالیز دو سلول مختلف با استفاده از میکروآری. یک آرایه بر مبنای توالی‌های مورد نظر متصل به ماتریکس یا صفحه محافظ ساخته می شود. نمونه های DNA از دو نوع سلول مختلف تهیه می‌شوند. این کار با سنتز cDNA انجام می شود که با رنگ فلورسنت برچسب گذاری شده اند. A) نمونه های cDNA به طور جداگانه به میکروآری جفت / متصل (hybridized) می شوند و b) سیگنال های حاصله آنالیز و بررسی نتایج در قسمت c نشان داده شده است. یک نقطه سیاه نشان دهنده عدم بیان ژن است. در این مثال یک نتیجه مثبت با دوایر آبی رنگ نشان داده شده است. مقایسه نتایج نشان دهنده این است که ژن‌ها در چه مکان هایی دارای بیان مختلفی هستند. لذا ژنی که در مکان Al در سلول A بیان شده ولی در سلول B بیان نشده است. در حالیکه، Bl بطور برعکس در سلول B بیان ولی در سلول A بیان نشده. برخی ژن‌ها (مانند C2) در هیچ یک از سلول ها بیان نمی‌شوند و بعضی ژنها مثل E5 در هر دو بیان می‌شود.

۱۰-۵-۲) پروتئوم

البته خود ژن‌ها، تنها نقطهٔ شروع برای مطالعه این موضوع محسوب می شود که چگونه ژنتیک، سلول‌ها را قادر می‌سازد که همه عملکردهای مختلف مورد نیازشان را برآورده سازند. موضوع تکمیلی چگونگی عملکرد پروتئین‌ها در حال حاضر باتوجه به دانش و اطلاعات به‌دست امده در مورد ژنوم در حال بررسی مجدد است. اصطلاح پروتئوم جهت توصیف یک مجموعه از پروتئین‌هایی که توسط اطلاعات ژنتیکی در سلول‌ها کد می‌شوند به‌کار می‌رود. مفهوم سلول به‌عنوان یک ماشین مولکولی، مفهمومی است که به توصیف اهمیت زیست شناسی مولکولی مدرن می‌پردازد، به طوری در آن ژن‌ها فقط بعنوان بخشی از تصویر کلی به شمار می روند. همکنش‌های بیوشیمیایی بین پروتئین‌های مختلف سلولی به اندازه اطلاعات خود ژنها حائز اهمیت است و هدف نهایی زیست شناسی سلولی ومولکولی بدست آوردن درک کاملی از سلول‌ها در سطح مولکولی آن است. این هدف مهم و ارزشمند بیولوژیست‌ها است مشابه این هدف در تحقیقات مربوط به رشته فیزیک ملاحظه می‌شود که در آن تئوری واحدی برای ارتباط گرایش‌های مختلف این علم استفاده می‌شود.



شکل ۱۰-۱۲) آنالیز ترانسکریپتوم با استفاده از cDNA های بالک شده جهت بررسی بیان ژنی افتراقی. در این مثال، a) از دو سلول مختلف mRNA بدست می آید و cDNA از آنها ساخته می شود و با دو رنگ فلورسانت مختلف برچسب گذاری می شود. b) cDNA ها با هم مخلوط شده و به آرایه متصل می‌شوند. الگوی سیگنال آن در قسمت c نشان داده شده است. رنگ‌های مختلف نشان دهنده سطح بیان در هر سلول است. این امر نشاندهنده بیان متفاوت ژن‌ها با استفاده از تکنیک میکروواری است.

برخی از خصوصیات پیچیده پروتئوم مربوط به یک سلول را می‌توان با تکنیک‌های پایه‌ای چون الکتروفورز ژل آکریل آمید (PAGE) بررسی کرد. اگرچه ژل استاندارد یک بعدی مفید است، اما در آن تعداد پروتئین‌های مورد بررسی کم است. ژل الکتروفورز دو بعدی (2D PAGE) وضوح بالاتری دارد. در این روش ابتدا پروتئین‌ها بر مبنای یک بعد از هم جدا می شوند. سپس پروتئین ها در بعد دیگر با استفاده از یک سیستم ژلی متفاوت از هم جدا می‌شوند. یک تکنیک رایج در این زمینه استفاده از ایزوالکتریک فوکوسینگ در بعد اول و SDS PAGE در بعد دوم است. با این روش می‌توان به شناسایی چند صد پروتئین پرداخت. اگر چه این سیستم به واسطهٔ حساسیت تکنیک شناسایی دارای محدودیت هائی است. روش های دیگر از جمله اسپکترومتری جرمی،

کریستالوگرافی اشعه X و رزونانس مغناطیسی هسته ای نیز روش‌های مفیدی هستند که اطلاعات زیادی در خصوص ساختمان پروتئین به محقق می‌دهند.

ظهور میکروواری DNA این توانائی را در اختیار محقق قرار داد که بتواند با استفاده از انواع مولکول‌های مختلف آرایه های مختلف را بسازد که استفاده از این فناوری مطالعات پروتئوم را تسهیل می‌کند. یکی از روش‌های انجام این کار تثبیت آنتی بادی‌ها روی یک صفحه ماتریکس و استفاده از آن جهت بررسی اتصالات پروتئینی به آنتی بادی‌ها است. همچنین از این فناوری می‌توان برای سایر کاربردها در بررسی‌های پروتئومیکی نیز استفاده نمود. این روش امروزه به صورت روتین استفاده می‌شود. یکی از این موارد بررسی پروتئوم انسان است. این روش در سال ۲۰۰۱ جهت مطالعه پروتئوم توسعه یافت. جهت کسب اطلاعات بیشتر به سایت http://www.hupo.org/ مراجعه نمایید.

جهت بررسی و حصول فهم کاملی از ساختار و عملکرد بسیاری از پروتئین‌ها که تشکیل دهنده پروتئوم‌اند، از تکنیک‌های مختلف بسیاری می‌توان استفاده نمود.

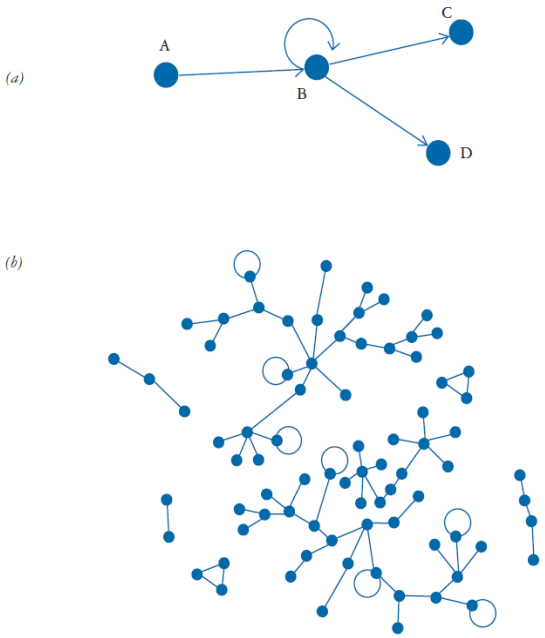
۱۰-۵-۳) متابولوم و اینتراکتوم

گسترش ایده "Ome" به دیگر محتوای سلولی می‌تواند مفید باشد. اگر هدف بیولوژی سلولی مدرن تلاش برای فهم نحوه فعالیت سلول است، در این صورت باید تمام کنش‌ها و واکنش‌های سلولی بررسی شوند. دو اصطلاح متابولوم[1] و اینتراکتوم[2] در این خصوص کاربرد دارند. منظور از متابولوم، مولکول های کوچکی است که در سلول یافت می شوند و شامل انواع مختلف متابولیت‌هایی می‌شوند که جهت فعالیت سلول ضروری هستند. لذا با کمک ژنوم، ترانسکریپتوم، پروتئوم و متابولوم می‌توانیم به بررسی محتوای سلولی بپردازیم. گام بعدی جهت فهم بهتر عملکرد سلولی این است که چگونه این محتویات با هم تعامل دارند. فهم این تعامل اینتراکتوم نامیده می شود. بررسی اینتراکتوم را می‌توان به کمک ترسیم نقشه تعاملات پروتئین- پروتئین انجام داد، زیرا این کار در واقع نحوه عملکرد سلول را مشخص می کند. اصول مکان‌یابی تعاملات بین پروتئین‌های سلولی در شکل ۱۰-۱۳ نشان داده شده است. همانند تحقیقات پروتئوم و ترانسکریپتوم، آنالیز همکنش‌های سلولی نیز توسط طیف گسترده‌ای از منابع آنلاین شامل همکاری بین موسسه بیوانفورماتیک اروپا[3]، Cold Spring Harbour Laboratory و Gene Ontology

[1] Metabolome
[2] Interactome
[3] European Bioinformatics Institute

Consortium حمایت می‌شود. موارد فوق را می‌توان در سایت ریاکتوم[1] (http://www.reactome.org/) جستجو نمود. هدف این مجموعه جمع آوری تحقیقات و پروژه های دانشمندان مختلف و به اشتراک گذاری آنها جهت استفاده سایر محققین است. در تاریخ ۱۸ آگوست ۲۰۱۶ اطلاعات ژنتیکی مربوط به ۲۳ ارگانیسم و ۲۶ موضوع جالب در این خصوص به نمایش گذاشته شد. در خصوص انسان ۱۴۵۲ پروتئین و ۱۳۳۸ کمپلکس که در برگیرنده ۱۷۸۴ واکنش و ۶۸۶ مورد از مسیرهای متابولیکی در سایت وجود دارد. شاید در مجموع از نظر عددی بیش از ۳ بیلیون جفت نوکلئوتید در ژنوم وجود نداشته باشد، اما این جنبه از تحقیق در زمینه فهم نحوه عملکرد سلول بخش بسیار مهمی محسوب می شود.

جمع‌آوری داده‌ها برای کلیه برهمکنش‌های مختلفی که در سلول رخ می دهد سطح جدیدی از فهم را در زمینه چگونگی فعالیت سلول را در اختیار دانشمندان قرار می‌دهد.



شکل ۱۰-۱۳) نقشه یابی تعاملات بین پروتئین ها. (a) چهار پروتئین نشان داده شده‌اند. پروتئین A در تعامل با پروتئین B است که خود آن نیز با C و D تعامل دارد. پروتئین B با خودش نیز تعامل دارد (با دایره نشان داده شده است). با استفاده از این نوع آنالیزها تصویری از تعاملات پروتئینی بدست می‌آید (b). در این تصویر جهت فلش‌ها برای وضوح بیشتر حذف شده است. نرم افزارهای کامپیوتری مختلفی جهت ترسیم نقشه‌های اینتراکتوم موجود هستند.

[1] Reactome

۱۰-۶) زندگی در وراء ژنوم

امروزه در تحقیقات ژنومیک تأکید بر این امر نیست که توالی چیست؟ بلکه این که توالی چه می‌کند، یا به طور واضح تر بگویم چه کاری انجام می‌دهد اهمیت دارد. در طول چند سال گذشته، تفسیر توالی ژنوم موجب شد تا دو علم ژنومیکس و پروتئومیکس با هم ادغام شوند و موجب توسعه و ظهور دیگر "امیک"ها شوند که در این خصوص بحث شد. ما در آغاز راه درک چگونگی عملکرد سلول‌ها و بافت‌ها در سطح مولکولی هستیم، اگر چه این امر مدتی به طول خواهد انجامید. پرسشی که در اینجا پرسیده می‌شود این است که این موضوع در سال‌های آتی چقدر اهمیت پیدا میکند؟

بدون شک در این خصوص توجه ویژه‌ای به پیشرفت‌های پزشکی که مستقیماً از بررسی‌های ژنومی حاصل می شوند خواهد شد. اطلاعات موجود در خصوص بیماری‌های ژنتیکی (سایت توارث مندلی در انسان را ببینید) در سطح مولکولی و با جزییات بیشتری بررسی و تکمیل خواهد شد و در واقع موجبات تسهیل درمان های جدید در حوزه هایی چون طراحی دارو و ژن درمانی مهیا خواهد شد (با جزییات بیشتر در فصل ۱۲ مورد بررسی قرار گرفته است.).

یک پیشرفت قابل توجه در زمینه مکان‌یابی با شناسایی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی[1] (SNP) که می‌تواند اطلاعات و جزئیات بیشتری را به نقشه های فیزیکی و ژنتیکی اضافه کند بوجود آمد. همانطور که از نامشان هویدا است، اینها مناطقی هستند که در آنها یک جفت نوکلئوتید بین افراد متفاوت است و در واقع اینها نماینده بخش عظیمی از تنوع در توالی‌های ژنومی را شامل می شوند. لذا ممکن است یک توالی در یک فرد به صورت AGTT**C**GATGCG اما در فرد دیگر به صورت AGTT**A**GATGCG باشد که نوکلئوتید C در موقعیت ۵ به باز A تغییر کرده است. از نظر تعریف SNP ها (بر مبنای تعریف) بسیار کوچک هستند و می‌توان گفت که این توالی‌ها تحت فشار تکامل قرار نگرفته اند، بطوریکه که این تغییرات کوچک تأثیری بر فرآیند تولید نسل نداشته است. لذا این توالی‌ها در طول ژنوم پراکنده هستند و تقریباً هر صد جفت نوکلئوتید یکی از این چند شکلی‌ها وجود دارد. اگر چه بسیاری از اینها موجب ایجاد یک بیماری خاص نمی‌شوند، بلکه اینها نشانگرهای خوب و مفیدی می‌باشند که موجب افزایش اطلاعات دقیق‌تر در حوزه تشخیص برمبنای ژنوم می‌شود.

علاوه بر اطلاعات توالی و SNPها، اخیراً بررسی ژنوم انسان جنبه‌هایی را مطرح کرد که بسیار غیر منتظره بود که به کمک آن‌ها می‌توان به بررسی بیماری‌های ژنتیکی پرداخت. در نوامبر ۲۰۰۶ یک گروه بین‌المللی تحقیقاتی به بررسی نتایج پژوهشی از ۲۷۰ ژنوم از افراد مختلف متعلق به گروه‌های متفاوت پرداختند. بجای بررسی تفاوت‌های محدود و کوچک چون SNPها، این پژوهش

[1] Single nucleotide polymorphisms

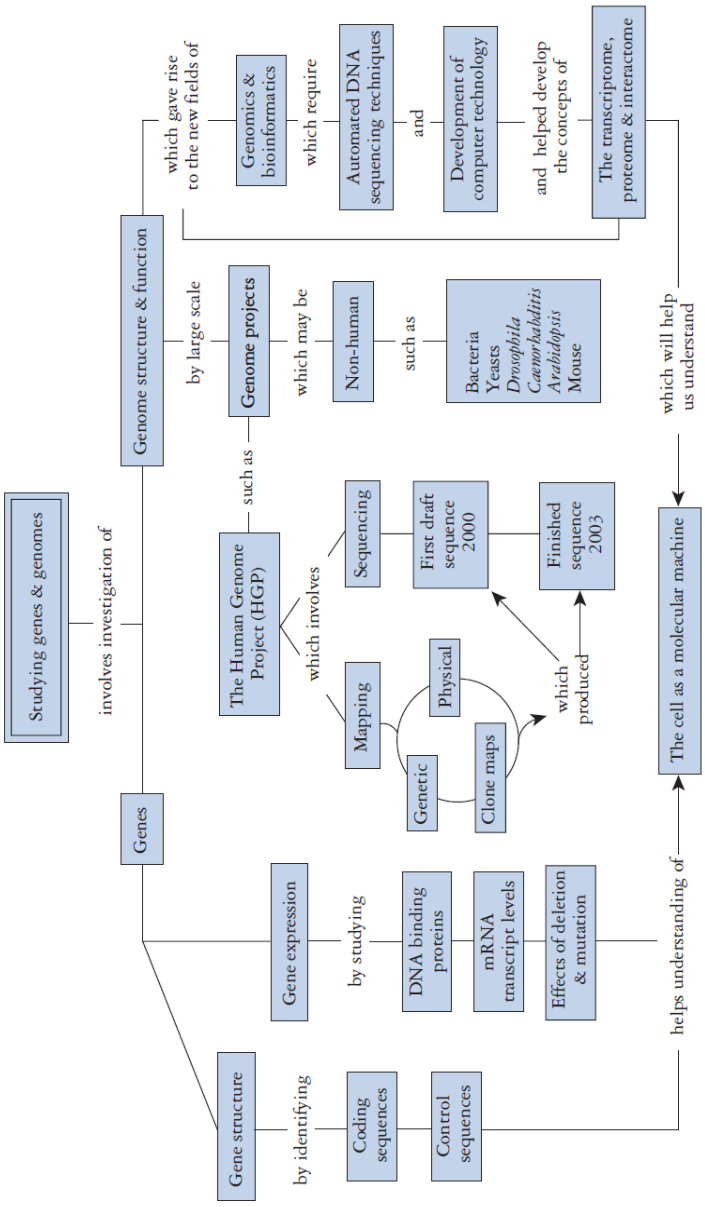
به بررسی تنوع در تعداد نسخه ژن‌ها و توالی‌های DNA پرداخت. بر خلاف آنچه که اول تصور می‌شد، یافته قابل توجه در این بررسی آن بود که تفاوت‌های بسیار زیادی بین ژنوم افراد وجود دارد، که این تفاوت‌ها تحت‌عنوان تنوع بر مبنای تعداد نسخه شناخته می‌شود[1] (CNV). یکی از جنبه‌های هیجان انگیز این کار همبستگی بین بعضی CNVهای یافت شده و وقوع صفات بیماری است که در فهرست پایگاه داده‌ای توارث مندلی انسان وجود دارد. این یافته نشان می‌دهد که چگونه تحقیقات ژنومی در مقایسه با آنالیز توالی (به تنهایی) می‌تواند تأثیر عمده‌ای در ابعاد گسترده‌تری ایجاد نماید.

یکی از جنبه‌های هیجان‌انگیز در زمینه بررسی SNPها و توالی‌های DNA، کشف تعداد متنوع نسخه (CNV) در ژنوم است. این امر از اهمیت زیادی برخوردار بوده و کمک قابل‌توجهی به فهم معمای حساسیت متفاوت به بیماری‌های مختلف ارائه میدهد.

استفاده از تکنیک میکرواری و چیپ‌های DNA اثرات قابل توجهی بر بررسی ساختار ژنوم و بیان ژن‌ها داشته است، و توسعه کاربردهای جدید در این حیطه از علم بر مبنای توسعه تکنولوژی قابل دسترس خواهد بود. این امر به واسطه توالی‌یابی DNA اتفاق افتاد، که طی یک دوره چند ساله اخیر از آزمایشگاه‌های کوچک به مراکز پیشرفته ای که در آنها توالی‌یابی به طور خودکار انجام می‌شد تغییر یافت. همچنین در حوزه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی به پیشرفت‌های زیادی در خصوص پروتئومیکس و بررسی تعاملات سلولی دست یافته‌ایم.

باوجود تمام این پیشرفت‌ها، نگرانی‌ها در خصوص سوء استفاده از اطلاعات ژنوم تا زمانی‌که پروژه در حال انجام است مطرح می‌باشد. همچنین نگرانی‌های اخلاقی زیادی نیز وجود داد. این نگرانی‌ها از این مشکل که آیا باید کسی را از وضعیت ژنتیکی مبهم در زندگی آینده خبر داد و یا با استفاده از اطلاعات ژنوم به منظور تبعیض علیه فردی در حوزه‌هایی مانند سلامت یا مسیر شغلی خبر داد. البته برخی شرایط وقانونی نیز در این خصوص وجود دارد. ثبت اطلاعات مربوط به توالی به یک موضوع نگران کننده تبدیل شد. به هر حال، این‌گونه نگرانی‌ها مختص به پروژه ژنوم نیست و این‌گونه نگرانی‌ها در دیگر موضوعات علمی و تکنولوژیکی نیز اتفاق می‌افتند. بر مبنای یک حس عمومی و باتوجه به فعالیت‌های جدی در حال، بسیاری از این نگرانی‌ها بر طرف خواهند شد. مجموعه جنبه‌های اخلاقی مربوط به بررسی ژنوم و دست‌ورزی ژن به طور کلی گاهی اوقات تحت‌عنوان ELSI (مفاهیم اخلاقی، قانونی و اجتماعی) خوانده می‌شوند و در فصل پانزده به بررسی آنها پرداخته شده است.

[1] Copy number variations



نقشهٔ مفهومی فصل دهم

فصل یازدهم: مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی

اهداف:

* طرح کلیاتی در مورد طیف موضوعی بیوتکنولوژی؛
* شرح تاثیر فناوری DNA نوترکیب (rDNA) بر کاربردهای بیوتکنولوژی؛
* توصیف چگونگی استفاده از DNA نوترکیب برای تولید پروتئین‌ها؛
* طرح کلی موضوعات پیرامونی مشکل ساز در ارتباط با ظرفیت تولید تجاری؛
* توصیف طیفی از کاربردهای بیوتکنولوژی مبتنی بر DNA نوترکیب.

خلاصه فصل / نتایج یادگیری:

بعد از خواندن این فصل به اطلاعات زیر دست خواهید یافت:

* بررسی تاثیر دستکاری ژن بر بیوتکنولوژی؛
* تولید پروتئین با استفاده از فناوری DNA نوترکیب؛
* اهداف و روش‌های مورد استفاده برای مهندسی پروتئین؛
* سرمایه گذاری و توسعه یک شرکت بیوتکنولوژی؛
* موضوعات دخیل در توسعه، از آزمایشگاه تا کارخانه تولید؛
* تولید و کاربرد طیفی از محصولات ساخته شده بر مبنای DNA نوترکیب.

لغات کلیدی:

بیوتکنولوژی، تغییرات بعد از ترجمه، مهندسی فرآیند، پروتئین‌های اصلی، پروتئین‌های متصل شده، چارچوب خوانش باز، *Saccharomyces cerevisiae*، *Schizosaccharomyces pombe*، *Pichia pastoris*، *Hansela polymorpha*، *Kluyveromyces lactis*، *Yarrowia lipolytica*، الکل اکسیداز، باکیلوویروس، چند وجهی، پلی‌هدرین، ناقل انتقال، پردازش فرودست، مهندسی پروتئین، میوتئین‌ها، طرح منطقی، تکامل هدایت شده، جهش در شرایط آزمایشگاه، ایجاد جهش در الیگو نوکلئوتید، ایجاد جهش نقطه‌ای، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مستعد خطا، شافلینگ DNA ، enterprise کوچک تا متوسط (SME)، سرمایه‌گذاری مرکزی، مرکز ریسک، اقتصاد فرآیند، تفکیک، تمرکز، خالص سازی، فرموله کردن، پالایش، سانتریفیوژ کردن، رسوب، ته نشینی، تبخیر، جذب، کروماتوگرافی، کریستاله شدن، انجماد خشک، پنیرمایه، شیموزین، *Rhizomucor miehei*، *Endothia parasitica*، *Rhizomucor pusillus*، *Aspergillus niger*، موجود تغییر یافته ژنتیکی، پروتئازها، لیپازها، لیپولئاز™، سوماتوتروپین گاوی نوترکیب، انتقال تکنولوژی، هورمون رشد گاوی، سازمان غذا و دارو، Posilac™، فاکتور رشد شبه انسولین، تشخیص‌های پزشکی، جایگزینی، الحاق، درمان بیماری خاص، واکسن‌های نوترکیب، دیابت قندی، انسولین، دیابت نوع I، دیابت وابسته به انسولین، دیابت نوع II، دیابت غیر وابسته به انسولین، تزریق، استنشاق، زنجیر A، زنجیر B، زنجیر C، پیش انسولین، هُمولین™، فعال کننده پلاسمینوژن بافت، پلاسمینوژن، پلاسمین، فیبرین، اکتیواز™، واکسن، هپاتیت B، گیاهان تراژن.

بیوتکنولوژی از جمله واژه‌های دشواری است که برای افراد مختلف معنی متفاوتی دارد. در مفهوم گسترده، استفاده از یک سیستم یا فرآیند بیولوژیکی جهت پیشرفت انسان‌ها ضرورت دارد. به طور اختصاصی‌تر، بیوتکنولوژی می‌تواند شامل استفاده از یک سلول یا موجود زنده (شاید یک سلول پستاندار یا یک میکروارگانیسم) یا ماده بیولوژیکی (معمولاً یک آنزیم) در یک فرایند تولید یا تبدیل باشد. بیوتکنولوژی دارای یک تاریخچه بسیار طولانی است و در یک مفهوم اجتماعی، خیلی قبل‌تر از آن که اصول توسعه علمی در این زمینه پایه گذاری شود کاربرد داشته است. بنابراین فرآیند تخمیر و ساخت شراب، تولید نان و پنیر برای قرن‌ها استفاده می‌شدند. روش‌های تولید و تهیه غذاهای بسیار پیشرفته به سال‌های اخیر مربوط می‌شوند و بلوغ علمی بیوتکنولوژی به زمانی بر می‌گردد که فهم جنبه‌های بیولوژیکی و بیوشیمیایی این علم هر چه بیشتر درک گردید. درک جنبه‌های بیوتکنولوژی (علاوه بر ادامه تولید غذا و نوشیدنی) منجر به ایجاد طیف متنوعی از کاربردهای پیشرفته از قبیل تولید مواد شیمیایی و بیوشیمیایی خاص، محصولات دارویی و درمانی و نیز کاربردهای محیطی مانند رفع مشکل فاضلاب و آلاینده‌های محیطی گردید.

بیوتکنولوژی تاریخچهٔ بسیار طولانی دارد و وابسته به فناوری دست‌ورزی ژن ندارد. اگر چه ظهور روش‌های DNA نوترکیب به توسعه علم بیوتکنولوژی کمک کرده است، به طوری که بدون استفاده از روش‌های مبتنی بر DNA نوترکیب، دست‌یابی به توسعه امکان پذیر نبوده است.

در بسیاری از کاربردهای بیوتکنولوژیکی، یک موجود یا آنزیم معمولاً به شکل طبیعی خود استفاده می‌شود و تغییری در آن ایجاد نمی‌شود، جدای از این که این آنزیم ممکن است در متدهای انتخاب برای شناخت بهترین سویه یا نوع آنزیم برای کاربردهای خاص مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین، در حالی‌که نیازی به مهندسی ژنتیک در این زمینه نیست، بیوتکنولوژی مدرن معمولاً با استفاده از سیستم‌های تغییر یافته ژنتیکی مرتبط می‌شود. در این فصل ضمن اشاره به اهمیت فناوری دست‌ورزی ژن روی برخی کاربردهای بیوتکنولوژیکی، بر تولید پروتئین‌های مفید با استفاده از این روش تاکید خواهد شد.

تولیدات فرآیندهای بیوتکنولوژی برای استفاده در موارد متعددی از قبیل پزشکی، کشاورزی و تحقیقات کاربرد دارند. احتمالا یک تفاوت اساسی برای تفکیک یک پروتئین مهندسی شده از کاربرد کلینیکی آن پروتئین وجود دارد، به طوری که هر دو جنبه میتوانند در توسعه یافته ترین نگاه به‌عنوان بیوتکنولوژی محسوب شوند. به طور مشابه، بخش در حال توسعه گیاهان و حیوانات تراژن نیز قسمتی از بیوتکنولوژی محسوب می‌شوند، و اطلاعاتی که به وسیله توالی‌یابی ژنوم فراهم می‌شود، می‌تواند کاربردهای بسیار متفاوت‌تری از بیوتکنولوژی را ایجاد کند. اهمیت دست‌ورزی ژن در پزشکی و موجودات تراژن در فصول ۱۲ و ۱۳ با جزئیات بیشتری بحث خواهد شد.

هم‌اکنون تولید پروتئین‌های نوترکیب یکی از بخش‌های توسعه یافته تحقیق و توسعه محسوب می‌شود و ترکیب‌های متنوعی از ناقل/ میزبان در این زمینه وجود دارد. در حالی‌که شاید هنوز بسیاری از محققین می‌خواهند ناقلین خودشان را با ویژگی‌های خاص بسازند، در حال حاضر امکان خرید انواع متعدد ناقل / میزبان که برای کاربردهای عمومی مناسب هستند وجود دارد. بر اساس ناقلین مختلف همسانه‌سازی، فرصت‌های تجاری توسط بسیاری از مصرف کنندگان با افزایش تقاضا برای سیستم‌های پیچیده بیان ژن ایجاد شده است و مشاهده کاتالوگ‌ها یا وب سایت‌های مربوطه راه خوبی برای نشان دادن یک نمای کلی از وضعیت کنونی این فناوری است.

تولید پروتئین با استفاده از فناوری DNA نوترکیب، یکی از اولین کاربردهای دست‌ورزی ژن در صنعت بیوتکنولوژی بود.

۱۱-۱) ساخت پروتئین

ساخت و خالص‌سازی پروتئین‌ها از ژن‌های همسانه‌سازی شده، به‌ویژه هنگامی‌که پروتئین‌های دارویی معتبر مد نظر باشد، یکی از مهم‌ترین جنبه‌های دست‌ورزی ژن محسوب می‌شود. بسیاری از این پروتئین‌ها با فناوری DNA نوترکیب[1] قبلاً تولید شده‌اند و پیش از این در سطح جهانی استفاده شده‌اند، ما در بخش‌های بعدی این فصل نمونه‌هایی از این موارد را مورد توجه قرار خواهیم داد. در بسیاری از موارد، سلول باکتری می‌تواند برای بیان ژن‌های همسانه‌سازی شده استفاده شود، اما معمولاً برای اهداف خاص به یک میزبان یوکاریوت نیاز است. پروتئین‌های یوکاریوتی اغلب در معرض تغییرات بعد از ترجمه[2] در شرایط *in vivo* قرار می گیرند.

در تولید پروتئین دو جنبه مطرح است که به بهینه‌سازی نیاز دارند: ۱- زیست‌شناسی سیستم و ۲- فرایند تولید. اگر هدف تولید انبوه و بازاریابی پروتئین باشد، طراحی دقیق هر دو جنبه برای فرآیند تجاری سازی ضروری است. بنابراین اگر کاربردهای بیوتکنولوژیکی برای موفقیت به هر دو جنبه ورودی بیولوزیکی و مهندسی فرایند نیاز دارند. یکی از چالش‌های مهم در استقرار یک کاربرد ویژه، بهبود وضعیت از آزمایشگاه تا کارخانه تولید محصول می‌باشد. ما در این مورد در فصل ۱۱-۳ به تفصیل بحث خواهیم کرد.

در بیوتکنولوژی، اگر موفقیت در زمینه تجاری سازی یک کاربرد ضروری است، باید جنبه‌های بیولوژیکی این کاربرد با توسعه مطلوب فرآیندهای مهندسی تکمیل گردد.

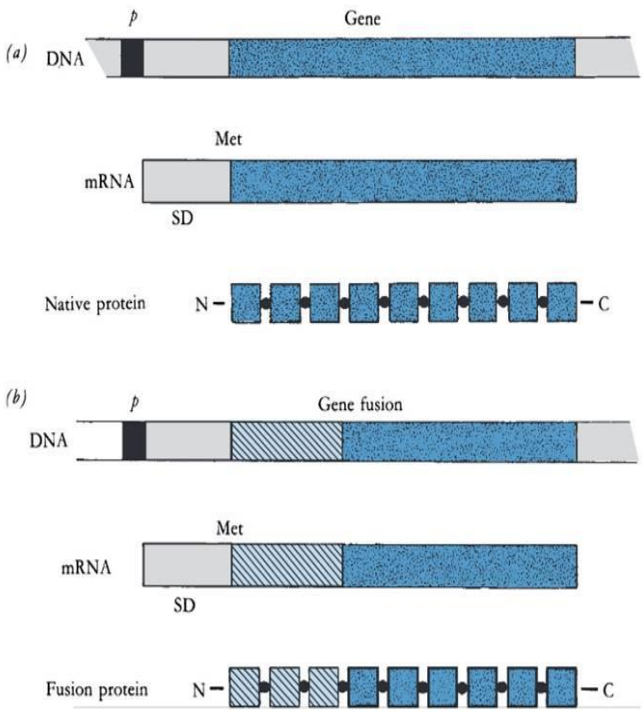
---

[1] Recombinant DNA (rDNA)

[2]. Post-translational modification

۱۱-۱-۱) پروتئین‌های اصلی و اتصالی

برای بیان مطلوب DNA همسانه‌سازی شده، باید ژن مورد نظر درون ناقلی که حاوی یک پروموتر مناسب است قرار داده شده (برای نمونه پروموترهای القاء شونده، به جدول ۶-۳ مراجعه شود) و نیز بتوان ناقل را درون یک میزبان مناسب مانند باکتری *E. coli* وارد نمود. هر چند این باکتری برای بیان ژن‌های یوکاریوتی مناسب نیست، اما بسیاری از مشکلات ناشی از کاربرد این باکتری می‌تواند با ساخت نوترکیب مورد نظر بر طرف شود، به طوری که پیام های بیان ژن به وسیله این باکتری تشخیص داده شود. این نشانه‌ها شامل پروموترهای و پایان دهنده‌ها برای رونویسی، و نیز جایگاه‌های اتصال ریبوزوم (توالی‌های شاین - دالگارنو) برای ترجمه می‌باشند. به‌عنوان یک موجود جای‌گزین، یک میزبان یوکاریوت از قبیل مخمر *S. cerevisiae* یا سلول‌های پستان‌داران در کشت بافت می‌تواند برای بیان پروتئین‌های خاص مناسب تر باشند.



شکل ۱۱-۱) پروتئین‌های اصلی و اتصالی. a- توالی کد کننده ژن همسانه‌سازی شده (ناحیه سایه‌دار) توسط توالی کد کننده باکتریایی دنبال نمی‌شود: بنابراین RNA پیک تنها اسید آمینه‌های اختصاصی برای همسانه‌سازی شده را کد می‌کند. این RNA پیک پروتئین اصلی را از ناحیه N ترمینال خود تولید می‌کند. b- ژن اتصالی شامل کدون‌های باکتریایی (ناحیه حاشور زده) می‌باشد. لذا این پروتئین حاوی قسمتی از پروتئین باکتریایی می‌باشد. در این مثال اولین سه اسید آمینه ناحیه N ترمینال از منشا باکتریایی (ناحیه حاشور زده) است. جایگاه اتصال ریبوزوم، یا توالی شاین – دالگارنو با عنوان SD مشخص شده است.

برای پروتئین‌های یوکاریوتی، توالی کد کننده معمولاً از یک کلون cDNA که از RNA پیک مشتق شده بدست می‌آید. در صورتی‌که ژن مورد نظر حاوی اینترون باشد این موضوع از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. چون این قسمت‌ها در پروکاریوت‌ها به‌عنوان بخش‌های غیر بیانی در فرایند شناخته نمی‌شوند. پس از ساخت cDNA باید یک ناقل مناسب انتخاب گردد. اگر چه ناقلین بیان

ژن بسیار متعددی وجود دارد، اما دو گروه عمده وجود دارند که یا پروتئین‌های اصلی و یا پروتئین‌های اتصالی را تولید می‌کنند (شکل ۱۱-۱).

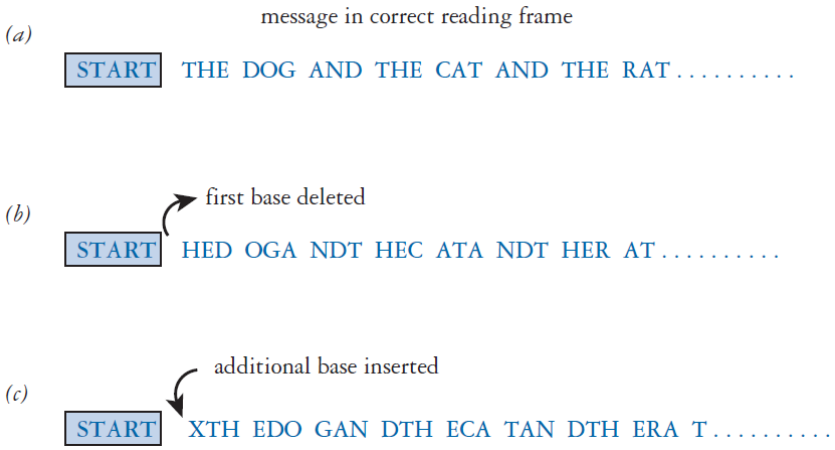
دو گروه عمده پروتئین‌هایی که می‌توان با استفاده از فناوری‌های DNA نوترکیب تولید کرد، پروتئین‌های اصلی و اتصالی هستند.

پروتئین‌های اصلی به‌طور مستقیم از ناحیه انتهائی N نسخه cDNA ساخته می‌شوند، در حالی‌که پروتئین‌های اتصالی حاوی بخش کوتاهی از توالی‌های اسید آمینه‌ای ناحیه انتهایی N که بوسیله ناقل کد می شوند می‌باشد. در بعضی موارد این توالی‌ها احتمالا برای پایداری یا ترشح پروتئین اهمیت دارد و بنابراین ضرورتاً یک مشکل محسوب نمی‌شوند. هر چند وقتی که پروتئین نوترکیب ساخته شد، این چنین توالی‌هایی قابل حذف شدن هستند، لذا پروتئین نوترکیب حاوی یک اسیدآمینه متیونین در محل اتصال است. از ماده شیمیایی سیانوژن بروماید[1] می‌توان برای برش پروتئین در محل متیونین استفاده نمود، بنابراین پروتئین مورد نظر آزاد می‌گردد. مشکل عمده این روش هنگامی رخ می‌دهد که پروتئین مورد نظر دارای یک یا بیش از یک متیونین داخلی باشد به طوری که استفاده از سیانوژن بروماید منجر به برش در مکان های غیر دلخواه خواهد شد.

هنگام تهیه نوترکیب برای ساخت یک پروتئین اتصالی، مهم این است که توالی cDNAدر مکانی در ناقل که در واقع مکان چارچوب خوانش صحیح است قرار داده شود. شاید افزودن یا حذف یک یا دو جفت باز در محل اتصال ناقل و قطعه الحاقی برای این منظور ممکن است ضروری باشد، اگر چه ناقلینی ساخته شده‌اند که هر سه چارچوب خوانش محتمل برای ترکیب خاصی از ناقل/ قطعه الحاقی در آن‌ها وجود دارد. بنابراین با استفاده از سه موقعیت مختلف در ناقل مذکور، ترکیب صحیح قرار گیری قطعه الحاق شده به دست می‌آید. اهمیت چارچوب خوانش باز در شکل ۱۱-۲ نشان داده شده است.

هنگام ساخت یک نوترکیب به منظور بیان پروتئین، ضروری است که چارچوب صحیح خوانش باقی بماند، در غیر این صورت ممکن است پروتئین به درستی ساخته نشود.

[1]. Cyanogen bromide, CNBr



شکل ۱۱-۲) اهمیت چارچوب خوانش. یک جمله ساده برای شکل استفاده شده است. a- ژن مورد نظر بعد از جایگاه شروع، همسانه‌سازی شد و توسط ریبوزوم قابل خواندن می‌باشد. b- حذف یک باز در جایگاه شروع برای از بین بردن معنی کامل ژن کافی است. c- همچنین افزودن یک باز همان گونه که در قسمت c نشان داده شده است نیز مشکلاتی ایجاد می‌کند.

۱۱-۱-۲) سیستم‌های بیانی مخمر

همان‌طور که در فصل ۵ گفته شد، مخمر *Saccharomyces cerevisiae*، یوکاریوت میکروبی مناسب برای توسعه فناوری DNA نوترکیب است. در حالی‌که مخمر *S. cerevisiae* هنوز برای مطالعات بیان ژن و تولید پروتئین مفید است، احتمالا مخمرهای دیگر در زمینه ویژگی‌های رشد، تولید پروتئین دگرسان (نامتجانس) و ویژگی‌های تخمیری در مقیاس بالا، دارای مزیت‌هایی باشند. گونه‌هایی که برای این منظور استفاده می‌شوند عبارتند از : *Schizosaccharomyces pombe*، *Pichia pastoris*، *Hansela polymorpha*، *Kluyveromyces lactis* و *Yarrowia lipolytica*. این موجودات یوکاریوت بسیاری از ویژگی‌های باکتری‌ها از جمله راحتی استفاده را از خود نشان می‌دهند، این موجودات روی محیط‌های کشت نسبتاً ارزان رشد سریعی داشته و طیفی از سویه‌های جهش یافته از این موجودات و ناقلین مختلف برای کاربردهای متعدد در دسترس هستند. در بعضی موارد، تخمیر در مقیاس بالا مشکلاتی را در مقایسه با استفاده از باکتری‌ها به‌وجود می‌آورد، اما این ایرادها معمولاً با طراحی دقیق و نظارت بر مراحل انجام کار می‌توانند بر طرف شوند. بازده پروتئین‌های دگرسان با استفاده از مخمر *P. pastoris* حدود ۱۲ گرم در لیتر بوده است (۱۰-۱۰۰ مرتبه بیشتر از مخمر *S. cerevisiae*) که می‌توان آن را روی محیط حاوی متانول به عنوان تنها منبع کربن، رشد داد. در این حالت، رشد مخمر به‌وسیله آنزیم

الکل اکسیداز که دارای فعالیت اختصاصی پائین بوده، تنظیم می‌شود و در نتیجه تولید پروتئین در سلول‌های این مخمر تا حدود ۳۰ درصد کل پروتئین محلول افزایش می‌یابد. با قرار دادن ژن‌های نامتجانس بعد از پرومتور الکل اکسیداز[1]، افزایش سطوح بیان ژن حاصل گردید.

مخمرهای متعددی وجود دارند که می‌توان از آن‌ها در فرایندهای فناوری زیستی استفاده نمود، هر یک از آن‌ها ویژگی‌های مخصوص به خود را داشته که ممکن است برای کاربردهای متنوعی متناسب باشند.

یکی از مزایای استفاده از مخمرها در مقایسه با میزبان‌های باکتریایی این است که پروتئین‌ها در معرض تغییرات بعد از ترجمه (PTMs) مانند گلیکوزیلیشن قرار می‌گیرند. به علاوه معمولاً درجه بالاتری از اعتبار در ارتباط با ترکیب سه بعدی و ویژگی‌های ایمیونوژنیکی پروتئین وجود دارد. بنابراین در شرایطی که ویژگی‌های بیولوژیکی پروتئین اهمیت دارد، شاید مخمرها نسبت به میزبان‌های پروکاریوتی فرآورده بهتری را فراهم نمایند.

۱۱-۱-۳) سیستم بیانی باکیولو ویروس

باکیولوویروس‌ها حشرات را آلوده می‌کنند و به نظر نمی‌رسد که سلول‌های پستان‌داران را آلوده کنند. بنابراین به‌دلیل خطر پایین برای آلودگی انسان، هر سیستم مبتنی بر این ویروس‌ها برای کار تحقیقاتی جالب است. در جریان آلودگی طبیعی سلول‌های حشرات، پیکره‌های ویروس درون ساختارهای چند وجهی بسته بندی می‌شوند که این ساختارها اینکلوژن بادی‌های هسته‌ای بوده و عمدتاً متشکل از پروتئین پلی‌هیدرین[2] هستند. این ساختارها در مراحل نهایی چرخه آلودگی ویروس ساخته می‌شوند و در صورتیکه به طور کامل بیان شوند می‌توانند تا ۵۰ درصد پروتئین سلول آلوده شده را شامل گردند. در حالی‌که پلی هدرین برای آلودگی خود حشرات مورد نیاز می‌باشند، این ساختارها برای بهبود عفونت سلول‌های کشت شده ضروری نیستند. بنابراین ژن پلی‌هدرین یک انتخاب مشخص برای ساخت ناقل بیان ژن می‌باشد، به طوری که این ژن یک پروتئین غیر ضروری را در مراحل نهایی و در مقادیر زیاد بیان می‌کند

سیستم بیانی باکیولوویروس یک جایگزین را برای سیستم‌های میکروبی ارائه می‌دهد و می‌تواند برای بیان انواع خاصی از پروتئین یوکاریوتی مفید باشد.

ژنوم باکیولوویروس از نوع مولکول DNA دو رشته‌ای حلقوی می‌باشد. اندازه ژنوم ویروس بر اساس انواع خاص ویروس بین ۸۸ تا ۲۰۰ کیلوباز است، بنابراین اندازه ژنوم ویروس برای دستکاری مستقیم بسیار بزرگ است. از این رو، الحاق DNA خارجی به درون ناقل باکیولوویروس باید با

---

[1]. Alcohol oxidase promoter, AOX1
[2] Polyhedrin

استفاده از یک ناقل حد واسط به نام ناقل انتقال[1] انجام گیرد. این ناقل حد واسط بر اساس پلاسمیدهای باکتری *E. coli* بوده و دارای پروموتور ژن پلی‌هدرین (یا ژن ویروسی دیگر) و کلیه فاکتورهای مورد نیاز برای بیان ژن می‌باشد. ژن کلون شده برای بیان به درون ناقل انتقال حد واسط الحاق می‌شود و ناقل نوترکیب به همراه DNA ویروسی غیر نوترکیب برای آلودگی هم‌زمان سلول‌های حشره استفاده می‌شود. نوترکیبی همولوگ بین DNA ویروس و ناقل انتقال حد واسط، منجر به ایجاد ژنوم‌های ویروسی نوترکیب می‌شود که می‌توان این ژنوم‌های نوترکیب را انتخاب و برای تولید پروتئین مورد نظر استفاده کرد. سیستم‌های مبتنی بر باکیولو ویروس‌ها از جمله سیستم‌های بیان ژن زودگذر هستند که در آن پروتئین مورد نظر، به عنوان قسمتی از چرخه عفونت سیستم مبتنی بر ناقل ویروسی تولید می‌شود. اخیراً سیستم‌های بیان ژن پایدار و با ثباتی مبتنی بر سلول‌های حشرات توسعه یافته که در این سیستم‌ها می‌توان از سلول‌های یک حشره برای بیان مداوم پروتئین استفاده نمود.

یکی از عیوب استفاده از سلول‌های حشرات در مقایسه با سلول باکتریایی یا مخمر این است که سلول‌های حشرات برای نگه‌داری و تکثیر به محیط‌های رشد بسیار پیچیده نیاز دارند. همچنین سلول‌های حشرات نسبت به سلول‌های میکروبی ضعیف‌تر بوده و بنابراین برای دستیابی به موفقیت به دقت بیشتری نیاز دارند. هر چند مزایایی از قبیل میزان بالاتر بیان پایدار ژن و تغییرات بعد از ترجمه (PTM) وجود دارد که به احتمال زیاد بازتابی از شرایط طبیعی سلول می‌باشند.

۱۱-۱-۴) لاین‌های سلولی پستان‌داران

وقتی که بیان پروتئین‌های نوترکیب انسانی مد نظر باشد، شاید بدیهی به نظر برسد که یک سلول میزبان پستاندار از باکتریها، میکروب‌های یوکاریوتی یا سلول‌های حشرات بهتر است. هر چند استفاده از این لاین‌های سلولی در تولید پروتئین مشکلاتی به همراه خواهد داشت. همچنانکه در لاین‌های سلولی حشرات، محیط‌های رشد مورد نیاز جهت رشد سلول‌های پستان‌داران پیچیده و گران هستند و در مقایسه با سلول‌های میکروبی، خصوصاً هنگامی که تخمیر در مقیاس بالا مورد نظر باشد، این سلول‌ها به‌نسبت آسیب پذیر می‌باشند. مشکلاتی نیز ممکن است در فرایند تولید وجود داشته باشد (معمولاً واژه پردازش فرودست[2] برای توصیف عملیات مورد نیاز جهت خالص-سازی پروتئین از فرایند تخمیر استفاده می‌شود). باوجود این مشکلات، در حال حاضر ناقلین متعددی برای بیان پروتئین در سلول‌های پستان‌داران در دسترس هستند. این ناقلین دارای ویژگی‌های هستند که با آن‌ها آشنا خواهید شد. این سیستم‌ها اغلب بر اساس سیستم‌های ویروسی

---

[1]. Transfer vector
[2]. Downstream processing (DSP)

طراحی شده‌اند، این ناقلین دارای نشانگرهای انتخابی (معمولاً دارای نشانگر مقاوم به آنتی بیوتیک) و پروموتورهایی هستند که قادر به بیان توالی ژن کلون شده می‌باشند. پروموتورهای عمومی مبتنی بر ویروس میمونی[۱] یا سیتومگالوویروس[۲] هستند. در جدول ۵-۳ نمونه‌هایی از پروموتورها نشان داده شده است.

سلول‌های حشرات و پستان‌داران به محیط‌های رشد پیچیده‌تری نیاز دارند و در مقایسه با سلول‌های میکروبی مانند باکتری‌ها و مخمرها معمولاً ضعیف‌تر هستند.

۱۱-۲) مهندسی پروتئین

مهندسی پروتئین یکی از هیجان‌انگیزترین کاربردهای دست‌ورزی ژن می‌باشد. انجام این کار به‌دلیل وجود روش‌های متعدد و همچنین درک عمیق‌تری از ویژگی‌های ساختمانی و عملکرد پروتئین‌ها، امکان تغییر ساختمان پروتئین‌ها با ایجاد تغییراتی در توالی ژن امکان پذیر شده است. مهندسی پروتئین محققین را قادر ساخت تا اسید آمینه‌های مهم در توالی پروتئین را مشخص کنند، بنابراین با تغییراتی در این نقاط، می‌توان تأثیر و نقش آن‌ها را مطالعه نمود. شاید هدف مورد نظر، تغییر فعالیت کاتالیتیکی یک آنزیم با ایجاد تغییر در توالی‌های اطراف مکان فعال آنزیم باشد و این تغییرات شاید بهبود در شرایط تغذیه‌ای یک پروتئین ذخیره‌ای، یا پیشرفتی در پایداری یک پروتئین مورد استفاده در صنعت یا پزشکی ایجاد نماید. پروتئین‌هایی که به وسیله تغییرات ناشی از جهش، مهندسی شده‌اند به نام میوتئین[۳] معروف هستند.

اصلاح ویژگی پروتئین‌ها با تغییر توالی‌های ژن، یکی از روش‌های قدرتمند و پر استفاده می‌باشد که می‌تواند موجب تسریع در شناسایی نقش انواع پروتئین‌های جدید شود.

برای مهندسی پروتئین می‌توان از دو روش استفاده کرد. گاهی این روش‌ها با عناوین «طرح منطقی[۴] و تکامل هدایت شده»[۵] نامیده می‌شوند. ما این مفاهیم را به‌صورت مجزا در نظر می‌گیریم، هر چند پیشرفت‌های اخیر استفاده از این دو روش به‌منظور استفاده مطلوب از ویژگی‌های آنها در کنار یکدیگر را در فرایندهای جدید آغاز کرده اند..

---

[1]. Simian virus, SV40
[2] Cytomegalovirus
[3]. Mutein
[4]. Rational design
[5]. Directed evolution

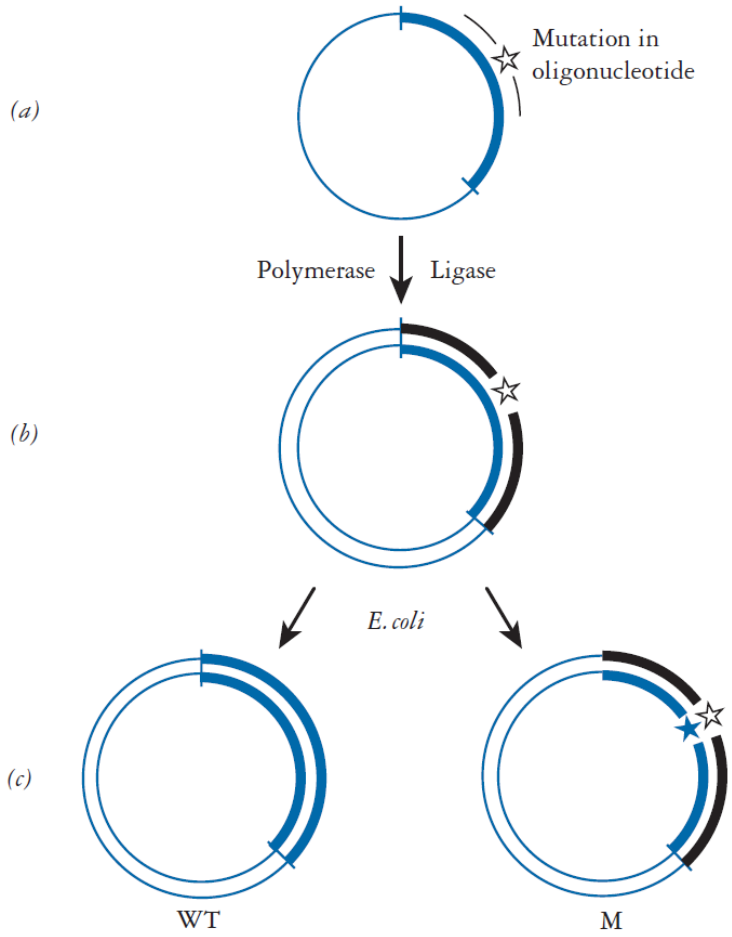
۱۱-۲-۱) طرح منطقی

استفاده از یک پروتکل طرح منطقی به میزان دسترسی به جزئیات اطلاعات جزیی دربارهٔ پروتئین مورد نظر بستگی دارد. به‌طور رایج ممکن است پروتئین مورد نظر از نظر بیوشیمیایی توصیف و ژن آن کلون و توالی‌یابی شده باشد. بنابراین توالی کد کننده mRNA، توالی واقعی اسیدآمینه یا توالی پیش‌بینی شده اسیدآمینه، ساختار سه بعدی پروتئین، ویژگی‌های پیچش پروتئین، و مانند آن ممکن است در دسترس باشد. این اطلاعات برای پیش بینی اینکه تغییر بخشی از پروتئین چه اثری خواهد داشت استفاده می‌شود؛ سپس تغییر می‌تواند انجام شود و پروتئین تغییر یافته برای بررسی وقوع تغییرات مورد نظر مورد آزمایش و بررسی قرار گیرد.. روشی به نام ایجاد جهش در شرایط آزمایشگاه می‌تواند جهش‌های اختصاصی را در توالی یک ژن ایجاد نماید. نوعی از این روش به نام جهش زایی نقطه ای در الیگو نوکلئوتید[1] یا ایجاد جهش در جایگاه مشخص[2] می‌باشد و مفهوم این روش در ایده بسیار ساده است (شکل ۱۱-۳). برای انجام این کار به یک DNA الگوی تک رشته‌ای حاوی ژنی که باید در آن تغییر ایجاد گردد و یک الیگو نوکلئوتید (معمولاً به طول ۱۵-۳۰ نوکلئوتید) که مکمل ناحیه مورد نظر برای ایجاد جهش می‌باشد نیاز است. این الیگونوکلئوتید با توجه به جهش مورد نظر ساخته می‌شود. اغلب، DNA الگوی تک رشته‌ای با استفاده از سیستم همسانه‌سازی M13، که DNA تک رشته‌ای تولید می‌کند ساخته می‌شود. DNA الگو و الیگونوکلئوتید به هم متصل می‌شوند (مکان جهش به مولکول الگو متصل نخواهد شد اما توالی‌های اطراف آن اتصال پایدار تولید می‌کنند) و با استفاده از آنزیم DNA پلیمراز، DNA الگو تکثیر می‌گردد. در نتیجه DNA دو رشته‌ای ایجاد خواهد شد. در اثر این تکثیر دو مولکول دختری تولید خواهد شد که یکی از آن‌ها حاوی جهش مورد نظر خواهد بود.

جهش‌زایی[3] در شرایط آزمایشگاه یکی از روش‌های بسیار خوب برای ایجاد جهش‌های معین در یک توالی DNA کلون شده می‌باشد که به منظور تغییر در توالی اسید آمینه پروتئین به کار می‌رود.

---

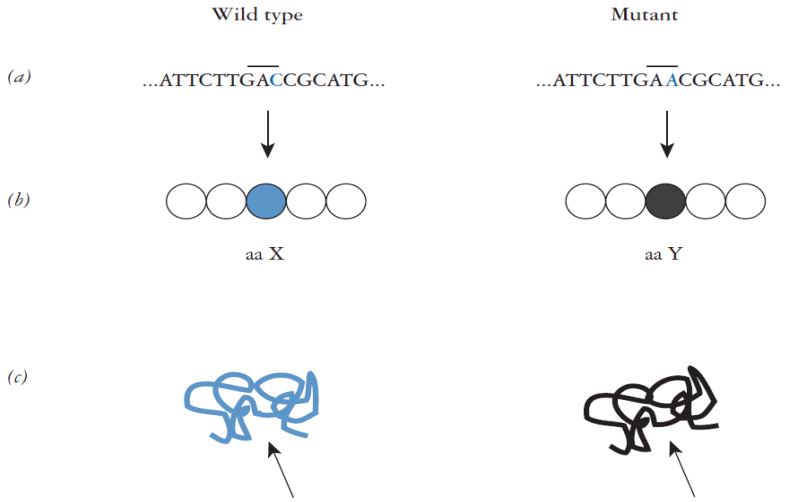
1. Oligonucleotide directed mutagenesis
2. Site directed mutagenesis
3. Mutagenesis



شکل ۱۱-۳) ایجاد جهش هدفدار در یک الیگونوکلئوتید. a. برای ایجاد جهش در شرایط آزمایشگاهی به یک DNA تک رشته‌ای الگو حاوی یک ژن کلون شده (خط کلفت) نیاز می‌باشد. الیگونوکلئوتید ساخته شده، مکمل قسمتی از ژن می‌باشد که باید در آن جهش ایجاد شود (اما جهش مورد نظر در الیگونوکلئوتید وجود دارد). رشته جدید DNA به رشته الگو متصل می‌شود (جهش به صورت یک ستاره خالی نشان داده شده است). b. در واکنشی با استفاده از DNA پلیمراز و لیگاز یک مولکول DNA دو رشته‌ای ساخته می‌شود، که این مولکول هیبرید ساخته شده متشکل از رشته الگو و رشته جهش یافته با یک ناحیه عدم اتصال در نقطه جهش می‌باشد. c. در هنگام وارد نمودن این DNA دو رشته‌ای به درون سلول *E. coli*، این مولکول تکثیر شده و بنابراین نسخه‌هایی از مولکول دو رشته‌ای جهش نیافته (WT) و جهش یافته (M) ساخته می‌شود. مولکول جهش یافته حاوی جهش اصلی و توالی مکمل آن می‌باشد (ستاره تو پر).

شناسایی DNA جهش یافته می‌تواند به‌وسیله هیبریداسیون با توالی الیگونوکلئوتید جهش یافته که به وسیله مواد رادیواکتیو نشان‌دار شده است انجام گیرد. مولکول DNA جهش نیافته بصورت متصل نشده باقی می‌ماند، در حالی که مولکول جهش یافته با رشته مکمل نشان‌دار شده (نشانگر) کاملاً جفت می‌شود. با شستشوی فیلترهای مشکوک به جهش در غلظت بالای نمک، مولکول‌های با اتصال ضعیف حذف و مولکول‌های جهش یافته با اتورادیوگرافی ردیابی می‌شوند . با استفاده از این روش، حتی تغییر تنها یک جفت باز قابل ردیابی خواهد بود. جهت تأیید صحت جهش ایجاد شده، می‌توان مولکول جهش یافته را توالی‌یابی کرد.

پروتئین یک ژن جهش یافته با استفاده از یک سیستم بیانی ژن تولید می‌شود. معمولاً از پروموتور *lac* در ناقل استفاده می‌شود و از این رو با افزودن IPTG انجام رونویسی کنترل می‌شود. به‌عنوان جای‌گزین، پروموتور لامبدا λP_L می‌تواند با یک ممانعت کننده حساس به حرارت λcI استفاده گردد، به طوری که از بیان ژن جهش یافته در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد جلوگیری شده، اما در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد بیان ژن جهش یافته صورت گیرد. آنالیز پروتئین جهش یافته در مقایسه با پروتئین طبیعی انجام می‌گیرد. با این روش، می‌توان پروتئین‌ها را با اعمال تغییر ساختاری دقیق که منجر به تغییر در ویژگی‌های عملکردی آن‌ها می‌شود مهندسی کرد. یک نمای کلی از مفهوم طرح منطقی در شکل ۱۱-۴ نشان داده شده است.



شکل ۱۱-۴) مهندسی پروتئین با روش طرح منطقی. در این روش به اطلاعاتی در خصوص توالی ژن و پروتئین نیاز است. همان گونه که در بخش a مشخص است یک تغییر در ژن ایجاد شده است (a). در این مورد کدون GAC با تغییر سومین باز در توالی DNA به کدون GAA تغییر یافته است. این عمل موجب ایجاد تغییر در توالی اسید آمینه (قسمت b) از aaX به aaY شده است. انجام این عمل همان طوری که

در قسمت c نشان داده شده است، موجب ایجاد تغییر در پیچش پروتئین شده است. در این مثال جایگاه فعال (با علامت پیکان نشان داده شده) در مولکول تغییر یافته، تا حدودی بزرگتر شده است.

۱۱-۲-۲) تکامل هدایت شده

یکی از معایب اصلی روش طرح منطقی برای مهندسی پروتئین این است که طیف بسیار متنوعی از ساختارهای بالقوه میتواند توسط تغییر توالی پروتئین به شیوه های مختلف ایجاد شود. بنابراین بسیار دشوار است تا اطمینان حاصل شود که اعمال این تغییرات، اثر مورد نظر را داشته است و لذا روند انجام کار بسیار سخت می‌باشد. تکامل هدایت شده یکی از پیشرفت‌های اخیر می‌باشد که دامنه و قلمرو تولید انواع پروتئین‌های جدید را افزایش داده است. همان طور که از نام این روش پیدا است، این روش بیشتر شبیه یک روند تکاملی است تا این که تلفیق یک تغییر ویژه در بخش معینی از پروتئین باشد. افزایش در سود بالقوه از این واقعیت حاصل نمی شود که هر گونه تغییر ساختاری خاص در پروتئین می‌تواند ایجاد شود، بلکه ناشی از این واقعیت است که تغییرات مختلف ایجاد شده و نوع تغییر مورد نظر توسط فرآیندی انتخاب شود که از انتخاب طبیعی پیروی کند. بنابراین نیاز به تغییر ساختار پیش بینی شده بر طرف می‌شود، به‌طوری که خود سیستم قادر است تعداد زیادی از تغییرات را ایجاد و به طور مؤثری غربال نماید.

روش تکامل هدایت شده نیاز به تغییرات پیش بینی شده در توالی‌های DNA و پروتئین را بر طرف کرده و به‌طور بالقوه از روش‌های ایجاد جهش نقطه‌ای هدفدار قدرتمندتر می‌باشد.

این فرایند کتابخانه‌ای از سلول‌های نوترکیب را ایجاد می‌کند که پروتئین مورد نظر را رمزگذاری می‌کند که در آن جهش‌زایی تصادفی (اغلب بوسیله تکنیک‌هایی چون روش پی سی آر ایجاد کننده اشتباه[1]) جهت ایجاد تنوع استفاده می شود. بنابراین توالی‌های مختلف بسیار زیادی تولید می‌شوند که برخی از آن‌ها اثر مطلوب مورد نظر را روی پروتئین مورد نظر ایجاد می کند. این نوترکیب‌ها را می‌توان با بیان ژن و آنالیز پروتئین با استفاده از یک سیستم سنجش مناسب، انواع مورد نظر را انتخاب وگزینش کرد. در صورت لزوم می‌توان از دوره‌های اضافی جهش‌زایی و انتخاب در این خصوص استفاده نمود. روش توسعه یافته روش فوق بنام روش "به هم آمیختن DNA[2]" را می توان برای ترکیب قطعات DNA از نوترکیب‌هایی که ویژگی‌های مطلوب مورد نظر را نشان داده اند مورد استفاده قرار می‌گیرند. این روش اثر نوترکیب در شرایط طبیعی درون سلول را تقلید و می‌تواند راه مؤثری برای ردیابی سریع روش تکامل هدایت شده باشد.

---

[1] Error-prone PCR
[2]. DNA shuffling

۱۱-۳) از آزمایشگاه تا تولید

همان‌طور که در مقدمه این فصل گفته شد، بیوتکنولوژی طیف وسیعی از موضوعات را پوشش می‌دهد و تعریف ساده‌ای ندارد. در این بخش ما دیدگاه توسعه یافته ای را مد نظر قرار داده و و بیوتکنولوژی را به‌عنوان موضوعی تعریف می‌کنیم که هر سیستم بیولوژیکی، فراورده، یا هر فرآیندی که در سطحی از فناوری توسعه یافته و به صورت تجاری بهره‌برداری شده باشد را در بر می گیرد. تولید اسیدهای آمینه یا آنزیم‌ها به وسیله روش‌های فناوری سنتی تخمیر، کشف و تولید دارو، محصولات مورد استفاده در صنایع دیگر، افزودنی‌های مواد غذایی و محصولات بهداشتی می‌تواند نمونه‌هایی از کاربردهای بیوتکنولوژی باشد. بر مبنای این فرضیات، ما هر کاربردی را که جزء فناوری پیشرفته محسوب نشود را از قلمرو این علم مستثنی خواهیم کرد. بنابراین جمع آوری و فرآوری تجمیعی، حتی اگر دارای یک نشان تجاری قابل توجه باشد (مانند تولید و فرآوری مواد غذایی، پرورش ماهی قزل آلا، و دیگر کاربردهای کشاورزی) نمی‌تواند به‌عنوان یک فرایند بیوتکنولوژیکی تلقی شود.

قلمرو کاربردهای بیوتکنولوژی گسترده بوده و طیف وسیعی از انواع مختلف فرآوردها را در حوزه‌های مختلف از قبیل تولید و فراوری مواد غذایی، کشاورزی، بهداشت و درمان و تحقیقات علمی را شامل می‌شود.

در این بخش ما به چگونگی دستیابی به فرایند از آزمایشگاه به کارخانه تولید نگاهی خواهیم داشت. برای نیل به این هدف، آگاهی مختصری از این موضوع پیچیده ضرورت دارد، اما در عوض به ما اجازه خواهد داد که در صورت ایجاد یک شرکت فناوری سود آور باشد، از برخی از موانع و مشکلات آن اطلاع باشیم.

۱۱-۳-۱) تفکر بزرگ - صنعت بیوتکنولوژی

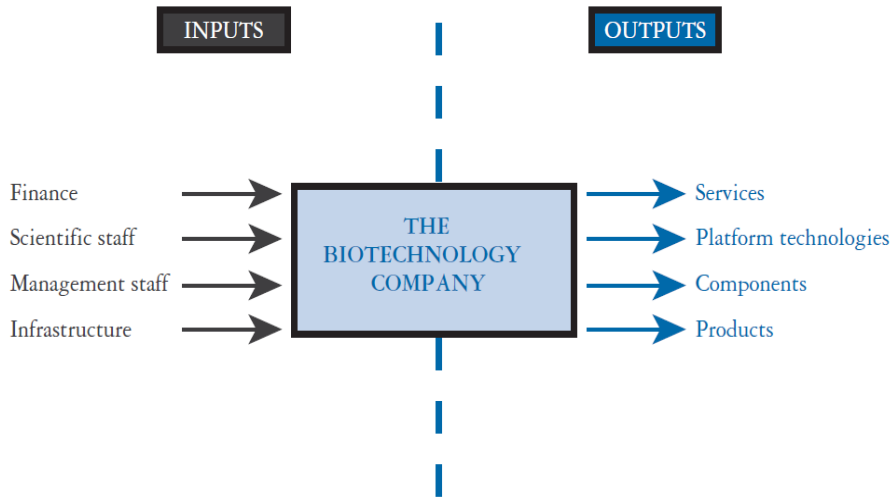
باوجود طیف وسیع کاربردها و رشته‌ها که در بخش بیوتکنولوژی وجود دارد، شباهت‌های زیادی بین این حوزه‌ها وجود دارد. در قلب هر فرایند بیوتکنولوژی، دانش بالایی باید وجود دارد، و کاربردهای متعددی به دنبال تحقیقات بنیادی انجام شده در دانشگاه‌ها و مؤسسات تحقیقاتی ارایه شده است. اغلب شرکت‌های "اسپین آف"[1] با نهاد دانشگاهی مرتبط هستند و از دانشمندانی که این ایده را توسعه داده‌اند استفاده می‌کنند. پارک‌های علم و فناوری بیش از ۲۰ سال با هدف حصول اطمینان از مکان مناسب، زیر ساخت‌ها، و دسترسی به تخصص موجود در شرکت‌هایی که در این حوزه قرار دارند توسعه یافته‌اند.

---

[1]. ‘Spin-off ’ companies

آناتومی یک شرکت بیوتکنولوژی می‌تواند به صورت مجموعه‌ای از نیازهـای پایـه‌ای یـا ورودی‌هـا و مجموعه بالقوه‌ای از خروجی‌ها خلاصه شود. این موضوع در شکل ۱۱-۵ نشان داده شـده اسـت. در ابتدای کار معمولاً یک شرکت خروجی خاصی در ذهن خواهد داشت، این خروجی ممکن است یک محصول با ارزش بالا، توسعه یک فناوری همسانه‌سازی و یا شاید ارائه برخـی خـدمات دیگـر باشـد. گاهی یک شرکت ممکن است قادر به ارائه بیش از یک فرآورده باشد، اما باید دقت شود که از منابع نباید بیش از حد نیاز استفاده شود.

اگر چه ممکن است شرکت‌های بیوتکنولوژی در آنچه که انجام می‌دهند با یکـدیگر خیلـی متفـاوت باشند، اما برخی عناصر کلیدی مشخص (ورودی‌ها و خروجی‌ها) وجود دارند که ویژگی‌های اساسـی و عملیاتی شان را معین می‌کنند.



شکل ۱۱-۵) آناتومی یک شرکت فناوری زیستی. مواد مورد نیاز به عنوان ورودی در سمت چپ نمودار نشان داده شده است و شامل امور مالی، کارکنان و زیرساخت‌ها می‌باشد. خروجی‌ها در سمت راست نمودار نشـان داده شده‌اند. خروجی ممکن است یک محصول واحد و یا یک نوع سرویس و یا طیفی از محصـولات مـرتبط باشد. جنبه مهمی که تعیین خواهد کرد چگونه یک شرکت جدید موفق خواهد بود البته همان چیزی است که در داخل جعبه اتفاق می‌افتد. یک محصول خوب، با مدیریت خوب کارکنان و فرآیندهای تولیدی مقرون به صرفه، ممکن است به تولید پایدار و در نهایت سود و بازگشت سرمایه به سرمایه گذاران آن منجر شود.

یکی از جنبه‌های بسیار مهم تبدیل یک ایده به محصول یـا خـدمات قابـل عرضـه در بـازار، تـأمین سرمایه کسب و کار می‌باشد. این امر به‌ویژه در مراحل اولیه توسعه بسیار مهم است، به طـوری کـه بسیاری از ایده‌های کسب و کار بالقوه مناسب به علت کسری بودجـه در مراحـل اولیـه بـا شکسـت مواجه شده‌اند . در این مرحله اگر شروع کار با یک شرکت کوچک (اغلب بـه عنـوان یـک انترپرایـز

[1]کوچک یا متوسط شناخته می‌شود) باشد، این شرکت در آسیب پذیرترین وضعیت خود قرار خواهد داشت. شرکت‌هایی که به شرکت‌های بزرگ چند ملیتی مادر ملحق می‌شوند اغلب می‌توانند این گونه تهدیدات را در مراحل اولیه کار، از خود دور کنند.

افزایش سرمایه برای یک اقدام بیوتکنولوژی جدید، فرایند ساده‌ای نیست و می‌تواند شامل چند مرحله باشد. معمولاً روی یک ایده، قبل از این که به مرحله کاربرد بیوتکنولوژیکی برسد، سرمایه‌گذاری قابل توجهی انجام شده است. سرمایه گذاری در علوم پایه معمولاً منجر به پیشنهاد برای ایجاد یک شرکت زیست فناور می‌شود. در بیشتر موارد کمیت سنجی در این سطح از سرمایه غیر ممکن است، زیرا دستیابی به موفقیت به تلاش سالیان متمادی بسیاری از محققین در دانشگاه‌ها یا موسسات پژوهشی مرتبط می‌باشد. هنگامی که یک ایده تا مرحله‌ای توسعه یابد که بتواند به بهره برداری برسد به منظور توسعه ایده اصلی باید سرمایه گذاری صورت گیرد. گاهی این مرحله به عنوان بودجه بذر ذرت[2] معروف است و ممکن است توسط سازمان‌های دولتی (مانند شرکت‌های سرمایه گذاری محلی)، وام دهندگان شرکتی و یا سرمایه گذاران خصوصی تأمین شود. seedcorn funding وجه نقد را فراهم می‌کند که برای دستیابی به یک شرکت فعال ضروری است، اما این بودجه معمولاً بیش از هزینه مورد نیاز برای تأسیس شرکت و توسعه اولیه ایده مورد نظر نمی‌باشد.

مرحله دوم بودجه اغلب توسط سرمایه‌گذاران خصوصی[3] تأمین می‌شود. اغلب در این مرحله از بودجه، انتقال ایده خوب به محصول می‌باشد و شامل مرحله تأیید عقیده و مفهوم کلی و بسط قابلیت تولید می‌باشد. معمولاً این مرحله حساس‌ترین مرحله برای سرمایه گذاری می‌باشد چون حاوی ریسک بالا (و پاداش بالقوه بالا) است.

اگر چه تولید یک محصول یا فرآورده سالم و از نظر تجاری با دوام، کاملاً ضروری است. اما مهم‌ترین عامل برای قادر ساختن یک شرکت برای دستیابی به موفقیت، ارائه مقادیری واقع‌بینانه از بودجه برای هر یک از مراحل توسعه آن است.

سرمایه‌گذارانی که بودجه اولیه را تأمین می‌کنند الزاماً انتظار برگشت کوتاه مدت سرمایه را نخواهند داشت، اما سرمایه‌گذار قبل از هر گونه حمایت، بررسی خود را پیرامون طرح کسب و کار و کارکنان آن شرکت انجام خواهند داد. در این مرحله کیفیت کارکنان بسیار مهم است، به‌طوری که شاید تعداد محدودی از کارکنان در این مرحله مشغول باشند و تعهد و سخت کوشی آن‌ها تفاوت بین موفقیت و شکست را تعیین می‌نماید. معمولاً در مراحل اولیه دانشمندانی که با این پروژه

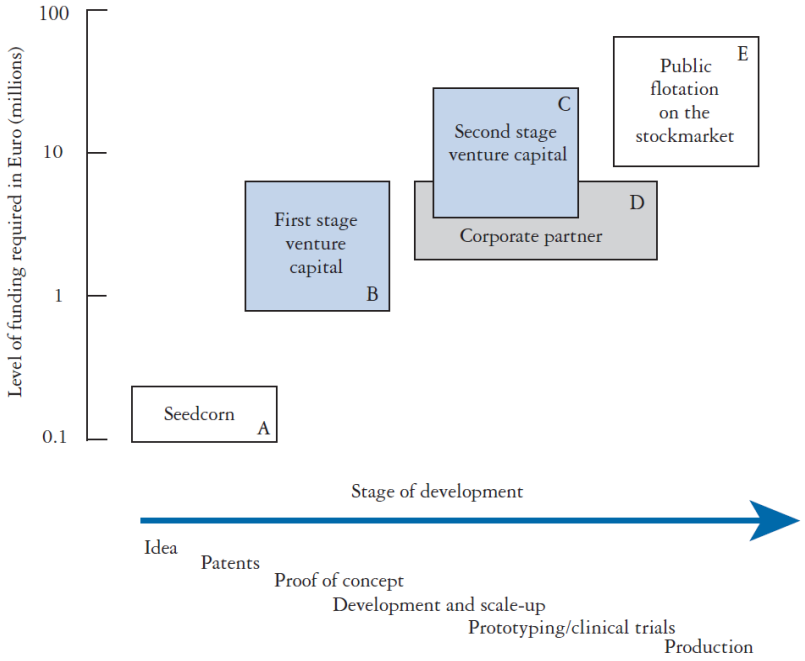
---

[1] Entreprise
[2]. Seedcorn funding
[3]. Venture capital

درگیر هستند عمدتاً از تیم مدیریت می‌باشند، اما این ترکیب ممکن است در مراحل بعد، هنگامی‌که شرکت شروع به رشد و توسعه کرد تغییر یافته و به مدیریت تخصصی و رسمی‌تر نیاز باشد.

پس از مرحله تأیید محصول، هنوز هیچ تضمینی وجود ندارد که فرآورده در بازار سودآور باشد. در این مرحله معمولاً به تزریق مجدد سرمایه بیشتر و شاید با تزریق بودجه مرحله دوم بخش خصوصی توسط یک شرکت بزرگ‌تر نیاز باشد. این دوره معمولاً به‌عنوان یکی از دشوارترین دوران در شکل گیری یک شرکت می‌باشد، به طوری که به آزمایشات کلینیکی یا مدیریت محصول از طریق روش‌های تنظیم بازار در کشورهای مورد عرضه نیاز می‌باشد. تنها زمانی همه جنبه‌های توسعه و تایید محصول بدست خواهد آمد که تولید تجاری و توزیع محصول را بتوان شروع کرد. نمونه‌ای از سطوح بودجه و زمان بندی برای یک شرکت بیوتکنولوژی در مراحل ابتدایی توسعه در شکل ۱۱-۶ نشان داده شده است.

همان‌گونه که یک شرکت رشد و توسعه می‌یابد، نقش کارکنان نیز تغییر خواهد کرد، به‌طوری که مسئولیت‌ها اختصاصی‌تر و دشوارتر می‌شوند.



شکل ۱۱-۶) بودجه برای مراحل اولیه یک شرکت فناوری زیستی. محور Y سطح سرمایه گذاری در اروپا را نشان می‌دهد (میلیون). محور X جدول زمانی مراحل مختلف توسعه را نشان می‌دهد. در مرحله شروع، کمک مالی seedcorn مورد نیاز است. سطوح و مدت زمان با جعبه A نشان داده شده است. این مرحله معمولاً با کمک اولین ورودی‌های عمده سرمایه گذاری (جعبه B) ادامه می‌یابد. هنگامی که شرکت در مرحله رشد است، شاید با یک محصول ثبت شده که به سمت آزمایش پیش می‌رود، تزریق بودجه‌های اضافی معمولاً لازم و این بودجه یا توسط مرحله دوم کمک‌های مالی سرمایه‌گذاری و یا شاید توسط یک شریک خصوصی فراهم می‌شود. مرحله نهایی ممکن است تغییر در بازار سرمایه و عملیات تولید باشد. با کسب اجازه و با اعمال تغییراتی از کتاب (Bains and Evans (2001), The business of biotechnology. In *Basic Biotechnology*, 2nd Edition, Eds. Ratledge and Kristiansen). Cambridge University Press, Cambridge.

۱۱-۳-۲) سیستم‌های تولید

علاوه بر تأمین پشتوانه مالی برای یک شرکت بیوتکنولوژی جدید، اگر هدف کسب موفقیت باشد جنبه‌های متعددی از علم باید مد نظر قرار گیرند. این واقعیت که یک ایده به مرحله بهره‌برداری تجاری بالقوه رسیده باشد معمولاً به این معنی است که اصول و علوم پایه آن آزمایش شده واحتمالا به‌عنوان یک اختراع ثبت شده است. در طول مراحل اولیه توسعه یک شرکت، معمولاً تأکید روی فعالیت چرخه فرایند تولید بهمراه اندکی توجه به راندمان یا قیمت مواد است. به هر حال، زمانی که

توسعه و تولید بیشتر (قیمت مناسب) مورد توجه است، این جنبه‌ها مهم می‌شوند به طوری که کنترل هزینه‌ها تأثیر عمده‌ای بر قیمت فروش و بنابراین بر سودآوری و سهم بالقوه بازار دارند.
یکی از اولین ملاحظات، سیستمی است که برای تولید مورد استفاده قرار می‌گیرد. معمولاً این موضوع نسبتاً روشن است و توسط خود فرایند تعیین می‌شود، این سیستم الزامات خاصی خواهد داشت که به نوبه خود به طیفی از امکانات عملیاتی نیاز خواهد داشت. تولید پروتئین نوترکیب به وسیله تخمیر کشت میکروبی نسبت به تولید آنتی‌بادی‌های چند همسانه‌ای به سیستم متفاوتی نیاز خواهد داشت. حتی سیستم‌های در حال کار و معتبر ممکن است برای یک کاربرد خاص به تنظیم نیاز داشته باشند.
علاوه بر ایمن کردن منابع مالی برای یک شرکت جدید، اعضای استارتاپ باید اطمینان حاصل نمایند که محصول یا فرآیند آن از ایده اولیه تا توانایی تولید تجاری در توسعه مورد توجه است.

۱۱-۳-۳) ارتقاء توجهات

پس از تعیین اینکه فرایند مورد نظر مناسب ترین فرایند است، مرحله بعدی ارزیابی و سنجش فرایند تولید تا سطحی است که تولید تجاری واقع گرایانه و مقرون به صرفه باشد. نکات متعددی باید در این مرحله در نظر گرفته شود. اول شرایط فیزیکی مورد نیاز برای تأسیس کارخانه تولید باید مهیا شود. این شرایط می‌تواند شامل نوع فرایند، طراحی بیوراکتور[1]، سیستم‌های کنترل و نظارت، زیر ساخت و دفع مواد زاید باشد. به موازات این موارد، جنبه‌های بیولوژیکی نیز باید مد نظر قرار گیرد- آیا فرآیند تولید با بیشترین کارآیی در ۱۰۰، ۱۰۰۰ یا ۱۰۰۰۰ لیتر کار می‌کند؟ آیا آلودگی وجود دارد که با استفاده از یک سیستم نسبتاً کوچک براحتی استریل شده و به بهترین وجه بر طرف شود، حتی اگر منجر به تولید بهینه نشود؟ در نهایت نکاتی از نظر اقتصاد فرآیند، وجود دارند که باید با آنالیز دقیق هزینه‌های ورودی و مدیریت فرآیند تولید به منظور کاهش ضایعات مد نظر قرار گیرند. در این محاسبات هزینه‌های سرمایه‌ای و عملیاتی مهم هستند.
این مرحله از ارتقاء فرایند، مرحله بسیار مهمی می‌باشد به این صورت که یک فرآیند کارآمد و مقرون به صرفه نسبت به فرایندی که در آن اتلاف منابع یا ناکارآمدی وجود دارد شانس تحقق سود بیشتری دارد. توجه به موضوعاتی که باید ارزیابی، طراحی، کنترل و در نظر گرفته شود، واضح است که سنجش و ارزیابی از پیچیده‌ترین جنبه‌های توسعه یک شرکت بیوتکنولوژی می‌باشد.

[1] Bioreactor

۱۱-۳-۴) فعالیت‌های پائین دستی

پس از رسیدن به مرحلهٔ واقعی تولید در یک کارخانه با بهره‌وری بهینه، مشکل بعدی چگونگی هدایت فرایند، بسته‌بندی، بازاریابی و توزیع محصول می‌باشد. معمولاً اولین مرحله از این مراحل، فرآیند پائین‌دستی[1] (DSP) نامیده می‌شود و شامل تفکیک محصول اصلی از هر محصول یا مواد زائد دیگر و انتقال آن به مرحله‌ای است که ساز و کار مناسب برای توزیع فراهم باشد. شاید بسته-بندی و توزیع در همان محل و یا محصول به‌صورت حجمی به محل بسته بندی و توزیع جداگانه‌ای دیگری منتقل گردد. معمولاً مقدار و ارزش یک محصول روی سرنوشت پس از تولید آن تأثیر مؤثر است، به‌طوری که محصولات با ارزش بالا و مقدار کم به آسانی در همان محل تولید یا مکانی نزدیک به آن بسته بندی می‌شوند.

هنگامی‌که یک فراورده ساخته شد، معمولاً انجام مراحل بعدی به‌منظور خالص سازی، تغلیظ، فرمولاسیون، بسته‌بندی و توزیع مواد ساخته شده ضروری است.

فعالیت پایین دستی شامل طیف وسیعی از روش‌ها می‌باشد که بسیاری از این روش‌ها به خوبی استقرار یافته و برای استفاده در صنعت مهندسی شیمی توسعه یافته‌اند. اغلب فراورده نهایی به-صورت معلق یا محلول دریک مایع خواهد بود، شاید فراورده نهایی یک فرآیند تخمیری باشد. شاید فراورده مورد نظر از سلول به درون محیط ترشح شود یا ممکن است درون سلول باقی بماند و شاید نیاز باشد که از سلول استخراج گردد. سلول‌ها ممکن است مانند سلول پستانداران شکننده و یا مانند سلول های مخمر یا باکتری محکم باشند. شاید محصول تولید شده به حرارت یا مواد شیمیایی حساس (مانند پروتئین) و یا به مواد شیمیایی متعدد مقاوم باشد. همه این موارد باید در هنگام طراحی فرآیند پائین دستی در نظر گرفته شود، اگر چه در اکثر موارد چهار مرحله اصلی به نام تفکیک، تغلیظ، خالص سازی و فرمولاسیون وجود دارد.

مرحله نهایی معمولاً شامل چهار مرحله اصلی می‌باشد، که هر یک از این مراحل قبل از این که یک محصول به بسته بندی و توزیع برسد به چند مرحله دیگر نیاز دارد.

تفکیک شامل فرایندهایی از قبیل فیلتراسیون، سانتریفیوژ و رسوب می‌باشد. معمولاً هدف از انجام روش‌های مذکور تصفیه محلول می‌باشد. فرآورده ممکن است در قسمت رونشین (فاز رویی) و یا اگر فرآورده درون سلولی باشد، در ناحیه رسوب قرار گیرد. اگر فرآورده در قسمت رونشین باشد غلظت، بالای آن ماده مورد نیاز است که با استفاده از روش‌هایی مانند رسوب، تبخیر یا جذب می‌توان ماده مورد نظر را تغلیظ نمود. در این مرحله فرآورده به مراحل پایانی آماده‌سازی رسیده

[1] Downstream processing

است و از روش‌های کروماتوگرافی، کریستاله کردن یا انجماد خشک می‌توان برای خالص‌سازی و فرمولاسیون نهایی محصول استفاده کرد.

همان‌گونه که هر سیستم تولید در سطح تجاری عمل می‌کند، در عقبه یک فرآورده نهایی بسته-بندی شده، طیف وسیعی از روش‌ها و تکنیک‌ها که با مجموعه‌ای از مواد خام اولیه و یک فرآیند شروع شده قرار دارد. یک تمرین جالب برای نشان دادن قلمرو بیوتکنولوژی، انتخاب یک نوع محصول، انتخاب یک نام تجاری و راه اندازی یک سایت جستجو در شبکه اینترنت برای درج اطلاعات نحوه تولید محصول می‌باشد. انجام این امور موجب ایجاد درک و بینش کلی نسبت به پیچیدگی فرآیند تولید یک محصول می‌شود. هنگامی که این اطلاعات برای پوشش تعدادی از محصولات بیوتکنولوژی قابل دسترس انجام گیرد، روشن می شود که بیوتکنولوژی به یک بخش قابل توجه بین المللی با تأثیر اقتصادی قابل توجه تبدیل شده است.

۱۱-۴) نمونه‌هایی از کاربردهای بیوتکنولوژیکی فناوری DNA نوترکیب

در بخش پایانی این فصل ما چند نمونه از انواع محصولاتی را که می‌توان با استفاده از فناوری DNA نوترکیب در فرآیندهای بیوتکنولوژی تولید نمود را مورد توجه قرار خواهیم داد. این حوزه برای بسیاری از شرکت‌های زیست فناوری با سرمایه گذاری در مقیاس بزرگ در هر دو بخش پژوهش بنیادی و توسعه وضعیت تولید به سرعت در حال پیشرفت است. این جنبه از فناوری دست‌کاری ژن، با بسیاری از محصولات متنوع در بازار به ویژه در حوزه پزشکی و بهداشت و درمان عمومی، به احتمال زیاد در آینده بسیار مهم خواهد بود.

۱۱-۴-۱) تولید آنزیم

در حال حاضر تولید و استفاده تجاری از آنزیم بخشی از صنعت بیوتکنولوژی محسوب می‌شود. تولید مواد غذایی، ساخت منسوجات، صنعت چرم، پودرهای لباسشویی، کاربردهای پزشکی و تحقیقات علمی بنیادی تنها نمونه‌هایی از کاربرد آنزیم‌ها در صنعت محسوب می‌شوند. در بسیاری از موارد، آنزیم‌ها از منابع طبیعی تهیه می‌شوند، اما در سال‌های اخیر امکان استفاده از آنزیم‌های تولید شده با روش‌های مبتنی بر روش‌های DNA نوترکیب فراهم شده است. علاوه بر مسائل علمی تولید یک آنزیم نوترکیب، محاسبه عوامل اقتصادی و در بسیاری از موارد آنالیز هزینه و سود موجب می‌شود که تولید آنزیم نوترکیب جذاب نباشد. به‌طور کلی، آنزیم‌ها یا با حجم زیاد و قیمت پائین برای استفاده در مقیاس صنعتی ساخته می‌شوند یا این که با حجم کم و قیمت بالا که ممکن است یک بازار بسیار خاص و نسبتاً محدود داشته باشد تولید می‌شوند.

تهیه آنزیم‌ها یک بخش اساسی در بیوتکنولوژی محسوب می‌شود و شامل طیفی از تکنیک‌ها برای تولید آنزیم در حجم زیاد با قیمت پائین برای کاربردهای عمومی تا تولید آنزیم‌های بسیار خاص برای استفاده در تشخیص و یا دیگر روش‌های زیست شناسی مولکولی می شود.

حرکت زیبایی در داستان دست‌کاری ژن وجود دارد به‌طوری که برخی از آنزیم‌های مورد استفاده در دست‌کاری ژن، امروزه با استفاده از روش‌های DNA نوترکیب تولید می‌شوند. فهرست انواع آنزیم‌های عمومی از جمله پلیمرازها (به ویژه برای PCR) و آنزیم‌های دیگر توسط بسیاری از شرکت‌های تجاری ارائه می‌شود. گاهی می‌توان آنزیم‌های نوترکیب را مهندسی نمود به‌طوری که ویژگی این آنزیم‌ها برای فرایند خاصی بهینه شده و با افزایش بهره‌وری فرایند، بهتر از حالت طبیعی آن عمل نماید.

در صنایع غذایی، یکی از حوزه‌هایی که از آنزیم نوترکیب استفاده می‌شود تولید پنیر است. در تولید پنیر، پنیر مایه (همچنین به‌عنوان رنین، کایمیز یا کیموزین شناخته می‌شود) به‌عنوان بخشی از فرایند تولید استفاده می‌شود. کیموزین آنزیم پروتئازی است که در انعقاد کازئین شیر توسط باکتری‌های اسید لاکتیک در جریان تخمیر دخالت دارد. این آنزیم به طور سنتی از حیوانات (گاو) و یا منابع قارچی به دست می‌آمد. در دهه ۱۹۶۰ سازمان غذا و کشاورزی سازمان ملل متحد پیش بینی کرد که کمبود پنیر مایه گوساله‌ای منجر به پرورش هر چه بیشتر گوساله‌ها خواهد شد تا تقاضای فزاینده برای گوشت و محصولات گوشتی را برآورده کند. امروزه چند منبع (گوشت گوساله، گاو و قارچ‌های *Rhizomucor miehei*، *Endothia parasitica* و Rhizomucor pusillus) برای کیموزین طبیعی وجود دارد. در حال حاضر کیموزین نیز به عنوان یک ماده نوترکیب که از باکتری ایشرشیا کولی، *Kluyveromyces lactis*، و آسپرژیلوس نیجر به دست می‌آید در دسترس همه قرار دارد. کیموزین نوترکیب برای اولین بار در سال ۱۹۸۱ ساخته شد، در سال ۱۹۸۸ به تصویب رسید و در حال حاضر برای تهیه حدود ۹۰٪ از پنیر انگلستان استفاده می‌شود.

اگر چه پذیرش عمومی در در حوزهٔ مواد غذایی از آنچه که پنیر تغییر یافته ژنتیکی نامیده می‌شود در مقایسه با سایر حوزه‌های دست‌کاری شده ژنتیکی، مشکلات زیادی ایجاد نکرده است، اما هنوز نگرانی‌هایی وجود دارند که باید در نظر گرفته شوند. در تولید پنیر، سه ایراد محتمل وجود دارد که می‌تواند توسط افرادی که نگران غذاهای تغییر یافته ژنتیکی هستند مطرح شود. اولین نگرانی این است که شیر می‌تواند از گاوی تهیه شود که با استفاده از هورمون رشد نوترکیب تولید شده باشد (به بخش ۱۱-۴-۲ مراجعه کنید). دوم این‌که گاو می‌تواند با خوراک‌های حیوانی حاوی سویا و یا ذرت تغیر یافته ژنتیکی تغذیه شده باشد. نگرانی سوم استفاده از کیموزین نوترکیب است. با وجود

این نگرانی‌ها، بسیاری از مصرف کنندگان معتقدند که خود پنیر یک موجود اصلاح شده ژنتیکی[1] نیست، اما فرآورده یک محصول اصلاح شده ژنتیکی است.

برخی از جنبه‌های بیوتکنولوژی مانند استفاده از موجودات اصلاح شده ژنتیکی در تهیه و اصلاح مواد غذایی ممکن است به نگرانی‌های عمومی در مورد اثر بالقوه آن بر سلامت منجر شود. سلامت یکی از جنبه‌های مهم می‌باشد که همه ما در آن نقش داریم.

یک مثال نهایی از پروتئین‌های نوترکیب در محصولات مصرفی، استفاده از آنزیم‌ها در پودر لباس‌شویی می‌باشد. معمولاً پروتئازها و لیپازهای موجود در پودر لباس‌شویی با تخریب پروتئین و لکه‌های چربی برای کمک به تمیز کردن لباس استفاده می‌شوند. یک لیپاز نوترکیب در سال ۱۹۸۸ توسط شرکت Novo Nordisk A/V ساخته شد (در حال حاضر به عنوان Novozymes شناخته می‌شود). این شرکت بزرگترین تأمین کننده آنزیم برای استفاده تجاری در کاربردهای پاک کننده است. لیپاز نوترکیب این شرکت با نام Lipolase^{TM} معرفی شد که اولین آنزیم تجاری بود که با استفاده از فناوری DNA نوترکیب تولید شد و اولین لیپاز مورد استفاده در مواد پاک کننده بود. رشد بیشتر در این حوزه شامل طراحی نوعی لیپولاز به نام فوق لیپولاز[2] است که موجب حذف هر چه بیشتر چربی در دمای پایین شستشو است.

۱۱-۴-۲) داستان سوماتوتروپین گاوی نوترکیب

همهٔ پروژه‌های بیوتکنولوژی DNA نوترکیب یک راه هموار از زمان شروع به کار تا کسب موفقیت تجاری نداشته اند. ما در بخش ۱۱-۳ برخی از نیازها برای توسعه یک فرآیند مبتنی بر بیوتکنولوژی را مد نظر قرار می‌دهیم. داستان سوماتوتروپین گاوی نوترکیب (rBST)[3] برخی از مشکلاتی را به تصویر می کشد که ممکن است هر کار علمی یک بار با آن مواجه شود. در هنگام ارائه یک محصول نوترکیب مانند سوماتوتروپین گاوی نوترکیب (و نمونه‌های مذکور) به بازار، نکات متعددی باید در نظر گرفته شوند. برای هر محصولی، پس از تائید مبانی علمی آن، انتقال فناوری به یک مرحله تجاری با ثبات مطرح است. ممکن است محصول تولید شده نیاز به تأیید نهادهای نظارتی داشته باشد و در نهایت (و بیشتر از نظر اهمیت تجاری) این محصول باید در بازار پذیرش داشته و پایه‌ای در سبد مصرف‌کننده ایجاد نماید. ما می‌توانیم تمام این نکات را در داستان سوماتوتروپین گاوی نوترکیب پیدا کنیم.

---

[1]. Genetically modified organism
[2]. Lipolase Ultra
[3]. Recombinant bovine somatotropin

سوماتوتروپین گاوی نوترکیب به‌عنوان هورمون رشد گاوی نیز شناخته می‌شود و پروتئینی است که به طور طبیعی در گاو تولید شده و به‌عنوان یک محرک رشد عمل می‌کند. تولید شیر را می‌توان با تجویز سوماتوتروپین گاوی نوترکیب افزایش داد و در نتیجه این هورمون رشد موضوع جذابی برای همسانه‌سازی و تولید به منظور استفاده در صنایع لبنی گردید. علوم پایه در ارتباط با سوماتوتروپین گاوی نوترکیب در دستور کار قرار داشت و دانشمندان در اوایل دهه ۱۹۸۰ روی این ژن کار می‌کردند. ژن سوماتوتروپین گاوی نوترکیب در واقع یکی از اولین ژن‌های پستانداران بود که با استفاده از سلول‌های باکتریایی برای تولید این پروتئین نوترکیب، کلون و بیان گردید. بنابراین، تولید سوماتوتروپین گاوی نوترکیب در سطح تجاری، شامل مرحله تایید مبانی علمی و مراحل انتقال فناوری بدون مشکل چندانی به‌دست آمد. خلاصه‌ای از روند تولید سوماتوتروپین گاوی نوترکیب در شکل ۱۱-۷ نشان داده شده است.

سوماتوتروپین گاوی نوترکیب یکی از موفقیت‌های اولیه بیوتکنولوژی بود که در نتیجه آن سوماتوتروپین گاوی نوترکیب با هدف تولید یک پروتئین مفید با بیان DNA کلون شده در یک سلول باکتریایی به دست آمد.

باتوجه به تصویب محصولات DNA نوترکیب جدید، هر کشور دارای سیستم خاص خود می‌باشد. هسته نظارت مرکزی در ایالات متحده آمریکا، سازمان غذا و دارو[1] می‌باشد، مجوز توزیع تجاری سوماتوتروپین گاوی نوترکیب در سال ۱۹۹۴ صادر شد و تحت نام تجاری Posilac^{TM} توسط شرکت مونسانتو به بازار عرضه شد. در آن زمان اتحادیه اروپا این محصول را تأیید نکرد، اما این موضوع بدلیل فناوری بکار رفته نبود، بلکه تا حدی به دلایل اجتماعی و اقتصادی بود (افزایش تولید شیر نیاز نبود. ارزیابی مدارک در آن زمان نشان می‌دهد که شیر تولید شده توسط گاوهای تیمار شده با سوماتوتروپین گاوی نوترکیب با گاوهای معمولی تیمار نشده یکسان بود، و بنابراین وقوع واکنش منفی در مصرف کنندگان محتمل نبود.

اثرات سوماتوتروپین گاوی نوترکیب باید در سه جنبه مختلف در نظر گرفته شود. اثر آن بر تولید شیر، اثرات آن بر روی خود حیوانات و اثرات احتمالی آن بر روی مصرف کننده. معمولاً تولید شیر در گاوهای تیمار شده حدود ۱۵-۱۰ درصد افزایش می‌یابد، اگر چه افزایش عملکرد بسیار بیشتر از این مقدار نیز گزارش شده است. بنابراین از نقطه نظر مدیریت شرکت‌های تولید لبنیات، استفاده از سوماتوتروپین گاوی نوترکیب به نظر سودمند خواهد بود. با این حال، همان گونه که معمولاً در مورد هر گونه پیشرفت جدید که هدف بهبود کیفیت محصولات خوراکی یا نوشیدنی می‌باشد، نگرانی عمومی غالباً همراه با توسعه فناوری، بیشتر می‌شود. نگرانی‌های در مورد سوخت هنوز هم

[1]. Food and Drug Administration, FDA

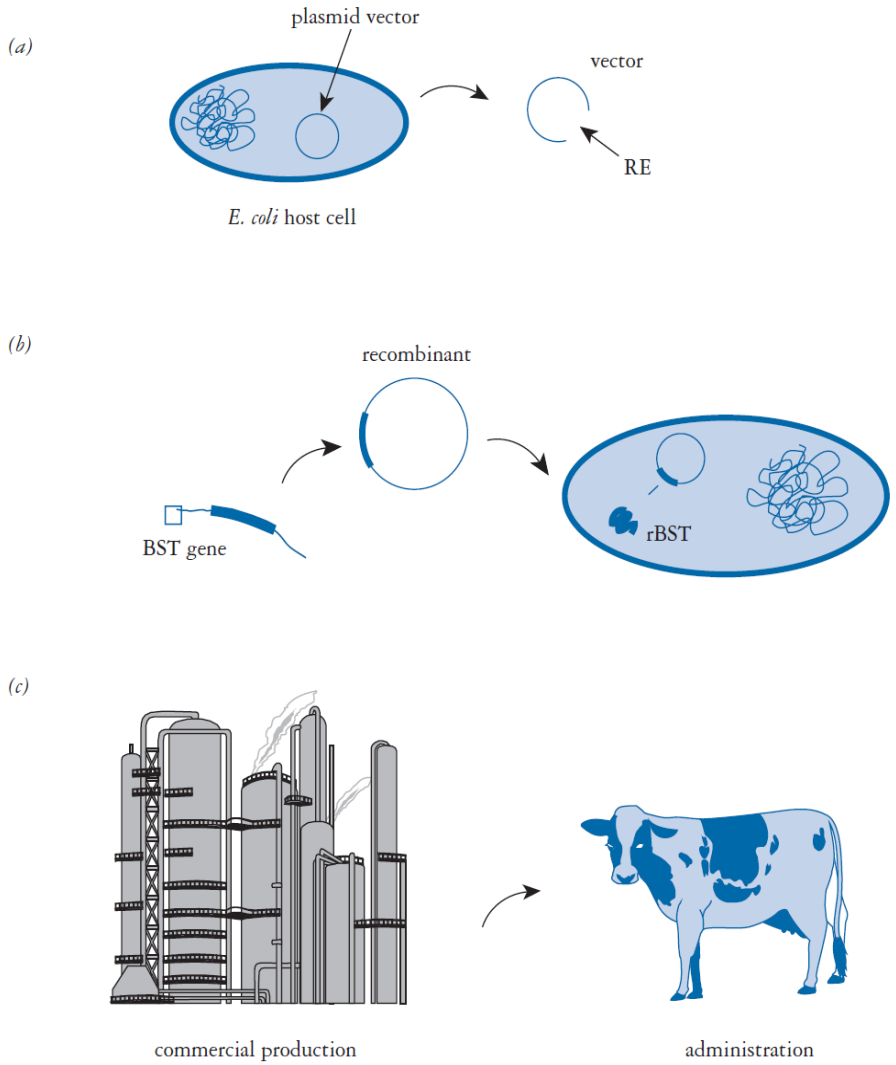
در حال انجام و در مراحل مهمی به سر می‌برد. موضوعی که به شدت مورد منازعه می‌باشد، اثر سوماتوتروپین گاوی نوترکیب روی خود گاوها است. تیمار سوماتوتروپین گاوی نوترکیب می‌تواند موجب تورم موضعی در محل تزریق شده و مشکلات عفونت‌های پا، ورم پستان و تولید مثل را تشدید نماید. استدلال مخالفین استفاده از این پروتئین نوترکیب این است که به هر حال این مشکلات حتی در گاوهایی که با سوماتوتروپین گاوی نوترکیب تیمار نشده‌اند نیز اتفاق می‌افتد. با این حال، شواهد موجود نشان می‌دهد وقتی که از سوماتوتروپین گاوی نوترکیب استفاده شده است سلامت حیوانات تا حدی به خطر می‌افتد.

نگرانی و چالش عمده دیگر، اثرات احتمالی استفاده از سوماتوتروپین گاوی نوترکیب روی سلامت انسان می‌باشد. هورمون‌های طبیعی (و بنابراین نسخه نوترکیب نیز) با افزایش سطوح فاکتور رشد شبه انسولین[1] روی تولید شیر تأثیر گذاشته و موجب افزایش تولید شیر می‌شوند. شرکت تولید فراورده rBST، مقادیر قابل‌توجهی از فاکتور رشد شبه انسولین را تولید نمود و شواهدی وجود دارد که IGF-1 می‌تواند موجب تحریک سلول‌های سرطانی شود. بنابراین، نگرانی این است که استفاده از پروتئین نوترکیب rBST می‌تواند خطری برای سلامتی محسوب شود. استدلال مخالف در این خصوص این است که سطوح IGF-1 در مراحل اولیه شیردهی در گاوهای طبیعی بالاتر از گاوهایی است که با پروتئین نوترکیب rBST تیمار شده و از شیردهی آن‌ها ۱۰۰ روز گذشته است. این امر مسلماً بدان معنی است که در صورت وجود نگرانی در مورد IGF-1، شیر گاوهایی که در اوایل دوره شیردهی هستند نباید نوشیده شود. کسانی که مخالف استفاده از پروتئن نوترکیب rBST هستند تأکید می‌کنند که بر خلاف پروتئین مورد استفاده در درمان که برای تعداد محدودی از بیماران مصرف می‌شود، شیر توسط بسیاری از مردم مصرف می‌شود و هر گونه خطر ذاتی، حتی خطر ناچیز، قابل قبول نیست. بر اساس این عدم اطمینان، بسیاری از کشورها استفاده از پروتئین نوترکیب rBST را ممنوع کرده‌اند و دو موضوع رفاه حیوانات و خطر بالقوه برای سلامت انسان‌ها را به‌عنوان دلایل مستند خود ذکر می‌کنند. استدلال‌ها نگاه دنباله‌داری به آینده به صورت تقابل منافع تجاری، رفاه حیوانات و سلامت انسان دارد. ادامه بحث، بیان جالبی از مشکلات پیرامون استفاده از فناوری ژن و ضرورت ارزیابی خطرات و اجتناب از قضاوت‌های احساسی را فراهم می‌کند.

نگرانی‌ها در مورد محصول یا فرآیند بیوتکنولوژی اغلب چند بعدی است و می‌تواند به بحث‌های احساسی منجر شود. گاهی تفکیک بین شواهد از حدس و گمان دشوار است.

---

[1]. Insulin-like growth factor, IGF-1



شکل ۱۱-۷) تولید هورمون رشد گاوی نوترکیب. a) یک حامل پلاسمیدی از باکتری ایشرشیا کولای تهیه و با یک آنزیم برشی برش داده می‌شود. b) به منظور تولید سامانه نوترکیب، توالی کد کننده ژن BST به پلاسمید الحاق و ترانسفورم می‌شوند تا پروتئین نوترکیب rBST در سلول میزبان تولید شود. ارزیابی تولید تجاری در قسمت (c) نشان داده شده است و با تأیید محصول، مراحل تولید محصول می‌تواند شروع شود. کل فرآیند از مطالعات علوم پایه تا بازار فروش محصول از آغاز تا پایان، با صرف سرمایه مالی فراوان، معمولاً چندین سال طول می‌کشد. با کسب اجازه برگرفته از (Nicholl (2000), *Cell & Molecular Biology*, Advanced Higher Monograph Series, Learning and Teaching Scotland).

۱۱-۴-۳) محصولات درمانی برای استفاده در بهداشت و درمان انسان

اگر چه تولید پروتئین‌های نوترکیب برای استفاده در برنامه‌های کاربردی پزشکی برخی نگرانی‌های اخلاقی را ایجاد می‌کند، انتقادات جدی محدودی در این قلمرو از بیوتکنولوژی وجود دارد. دلیلش این است که تا حد زیادی محصولات و راهبردهای درمانی به منظور کاهش درد و یا بهبود کیفیت زندگی برای کسانی که وضعیت پزشکی قابل درمانی دارند طراحی شده است. به علاوه، این محصولات تحت نظارت پزشکی استفاده می‌شوند و در اینجا یک آگاهی و تفکر وجود دارد که تلفیق منافع شرکت‌ها که می بایست در مباحث رژیم غذایی مهم جلوه داده شوند، از نقش کمتری در تشخیص و تیمار بیماری برخوردارند در واقع، رقابت و خطر سرمایه گذاری در ارتباط با محصولات پزشکی همچنانکه در کاربردهای کشاورزی دیده می‌شود وجود دارد. با این حال، به نظر می‌رسد که مباحث در این خصوص کمتر احساسی است، بنابراین استفاده در کاربردهای پزشکی، ظاهراً برای مردم قابل قبول‌تر است. علاوه بر درمان واقعی بیماری‌ها، حوزه تشخیص پزشکی یک بخش بزرگ و رو به رشد سریع در تجارت بیوتکنولوژی با استفاده از فناوری DNA نوترکیب در بسیاری از موضوعات محسوب می‌شود.

محصولات DNA نوترکیب برای استفاده در درمان‌های پزشکی را می‌توان به سه گروه عمده تقسیم کرد.

دستهٔ اول، ممکن است فراورده‌های پروتئین به‌عنوان جای‌گزین یا مکمل پروتئین‌های انسانی استفاده شوند که احتمالاً این پروتئین‌ها در بیماران مبتلا به یک بیماری خاص وجود نداشته یا غیر فعال باشند. دستهٔدوم، پروتئین‌هایی که در درمان بیماری‌های خاص برای کاهش شدت بیماری استفاده می‌شوند. دستهٔ سوم، حوزه‌ای که به سرعت در حال توسعه بوده و وعده بزرگی را نوید می‌دهد تولید واکسن‌های نوترکیب می‌باشد. برخی از نمونه‌های پروتئین‌های درمانی تولید شده با استفاده از فناوری DNA نوترکیب در جدول ۱۱-۱ ذکر شده است. ما نمونه‌هایی از هر یک از این سه حوزه را به منظور نشان دادن نوع رویکرد اتخاذ شده در توسعه یک پروتئین درمانی را مورد توجه قرار خواهیم داد.

محصولات DNA نوترکیب برای کاربردهای پزشکی در مقایسه با مواد غذایی تغییر شکل یافته ژنتیکی، اغلب راحت‌تر توسط عموم مردم مورد پذیرش قرار می‌گیرند.

معمولاً بیماری‌های رایج دیابت[1] (DM) به دو علت ایجاد می‌شود، یا سلول‌های بتا در جزایر لانگرهانس لوزالمعده مقادیر کافی از هورمون انسولین را تولید نمی‌کنند و یا سلول‌های هدف قادر به پاسخ به این هورمون نیستند. میلیون‌ها نفر از مردم در سراسر جهان به بیماری قند مبتلا

[1] Diabetes mellitus

هستند و سازمان بهداشت جهانی تخمین می‌زند که شیوع جهانی دیابت تا سال ۲۰۲۵ دو برابر شود. حدود ۶-۳ درصد از مردم انگلیس و آمریکا مبتلا به دیابت هستند. افراد مبتلا به دو گروه تقسیم می‌شوند: دیابت نوع یک[۱] (که قبلاً به‌عنوان دیابت وابسته به انسولین[۲] شناخته می‌شد) و یا دیابت نوع دو[۳] (که قبلاً به عنوان دیابت غیر وابسته به انسولین[۴] شناخته می‌شد). حدود ۱۰ درصد از بیماران مبتلا به دیابت نوع یک و حدود ۹۰ درصد بیماران به دیابت نوع دو مبتلا هستند. همچنین برخی از انواع دیگر این بیماری که بسیار کمتر رایج است وجود دارد. بدیهی است که بیماران مبتلا به دیابت نوع یک به هورمون انسولین نیاز دارند، اما بسیاری از مبتلایان به دیابت نوع دو نیز برای کنترل رضایت‌بخش وضعیت بیماری خود انسولین استفاده می‌کنند. دریافت انسولین از طریق تزریق (سرنگ‌های سنتی و یا دستگاه قلم مانند)، تزریق با استفاده از یک پمپ کوچک و سوند و یا استنشاق پودر انسولین صورت می‌گیرد.

[1] Type I DM
[2]. Insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM
[3] Type II DM
[4]. NIDDM

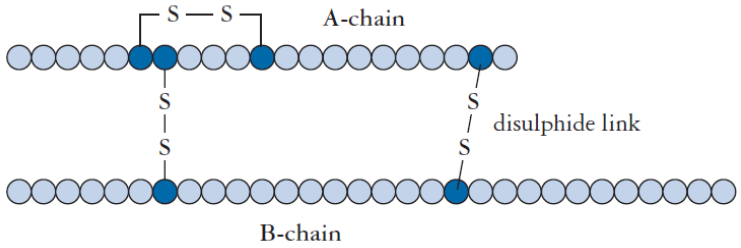
جدول ۱۱-۱) فرآورده‌های دارویی مبتنی بر DNA نوترکیب برای استفاده انسان

Product	Type	Trade name	FDA App.	Company	Use
Insulin	R/S	Humulin	1982	Eli Lilly	Diabetes treatment
Growth hormone	R/S	Protropin	1985	Genentech	Growth hormone deficiency in children
α-Interferon	SDT	Intron A	1986	Schering-Plough	Hairy cell leukaemia
Hepatitis B vaccine	V	Recombivax HB	1986	Merck & Co.	Hepatitis B prevention
Tissue plasminogen activator	SDT	Activase	1987	Genentech	Myocardial infarction
Growth hormone	R/S	Humatrope	1987	Eli Lilly	Growth hormone deficiency in children
Hepatitis B vaccine	V	Engerix-B	1989	SmithKline Beecham	Hepatitis B prevention
Factor VIII	R/S	Recombinate rAHF (antihaemophiliac factor)	1992	Baxter Healthcare	Treatment of haemophilia
Factor VIII	R/S	Kogenate	1993	Bayer	Treatment of haemophilia
DNase	SDT	Pulmozyme	1993	Genentech	Treatment of cystic fibrosis symptoms
Erythropoietin	R/S	Epogen	1993	Amgen	Anaemia
Imiglucerase	R/S	Cerezyme	1994	Genezyme	Type I Gaucher disease
Insulin	R/S	Humalog	1996	Eli Lilly	Diabetes treatment
Factor IX	R/S	BeneFix	1997	Wyeth	Treatment of haemophilia
Factor VIIa	R/S	NovoSeven	1999	Novo Nordisk	Treatment of haemophilia bleeding episodes
Insulin analogue	R/S	NovoLog	2000	Novo Nordisk	Diabetes treatment
Insulin analogue	R/S	Lantus	2000	Aventis	Diabetes treatment
Hepatitis A & B vaccine	V	Twinrix	2001	SmithKline Beecham	Mixed vaccine for hepatitis A & B
Laronidase	R/S	Aldurazyme	2003	BioMarin Pharmaceuticals & Genzyme	Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I
Galsulphase	R/S	Naglazyme	2005	BioMarin Pharmaceuticals	Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI
Hyaluronidase	-	Hylenex	2005	Halozyme Therapeutics	Adjuvant for use with other drugs
Insulin	R/S	Exubera	2006	Pfizer	Inhalable form of insulin for diabetes treatment

توجه: نوع به جای‌گزینی یا الحاق (R/S)، درمان بیماری خاص (SDT)، یا واکسن (V) اشاره دارد. تاریخ‌ها در ستون ۴ مربوط به زمان اولین مجوز صادر شده سازمان غذا و دارو برای استفاده در آمریکا می‌باشد. مجوزهای بعدی برای کاربردها یا اصلاحات اضافی نشان داده نشده است. فرآورده‌ها به ترتیب زمانی با توجه به سال صدور اولین مجوز ذکر شده است. اسامی تجاری، علائم تجاری ثبت شده شرکت‌های مورد نظر می‌باشند. اسامی شرکت‌ها بر اساس مجوز صادر شده می‌باشد و ممکن است نام آن به دلیل سیاست شرکت

تغییر کرده باشد یا با شرکت‌های دیگر ادغام شده باشد. برای اطلاعات بیشتر می‌توانید به وب سایت http://www.fda.gov. مراجعه کنید. فهرست مفیدی از محصولات درمانی در سایت http://www.bio.org/ speeches/ pubs/ er/ approveddrugs.asp.گردآوری شده است.

انسولین از دو زنجیرهٔ اسیدآمینه بنام‌های زنجیره A (بخش اسیدی با ۲۱ اسیدآمینه) و زنجیره B (بخش بازی با ۳۰ اسیدآمینه) تشکیل شده است. هنگامی که انسولین به طور طبیعی سنتز می‌شود، این زنجیرها با یک پپتید ۳۰ اسیدآمینه‌ای دیگر به نام زنجیره C متصل می‌شود. این مولکول پیش ساز ۸۱ اسیدآمینه‌ای، پروانسولین[1] نامیده می‌شود. زنجیرهای A و B با پیوندهای دی سولفید بین اسیدهای آمینه سیستئین به یکدیگر متصل هستند و برای تولید هورمون فعال، پروانسولین توسط یک پروتئاز شکسته می‌شود (شکل ۱۱-۸). انسولین اولین پروتئینی بود که در اواسط دهه ۱۹۵۰ توسط فردریک سنگر تعیین توالی شد.



شکل ۱۱-۸) ساختار انسولین. اسیدهای آمینه با دایره نشان داده شده‌اند. زنجیره A (با ۲۱ اسید آمینه) و زنجیره B (با ۳۰ اسید آمینه) با پیوند دی سولفید بین اسیدهای آمینه سیستئین (دوایر پر شده) به یکدیگر متصل هستند.

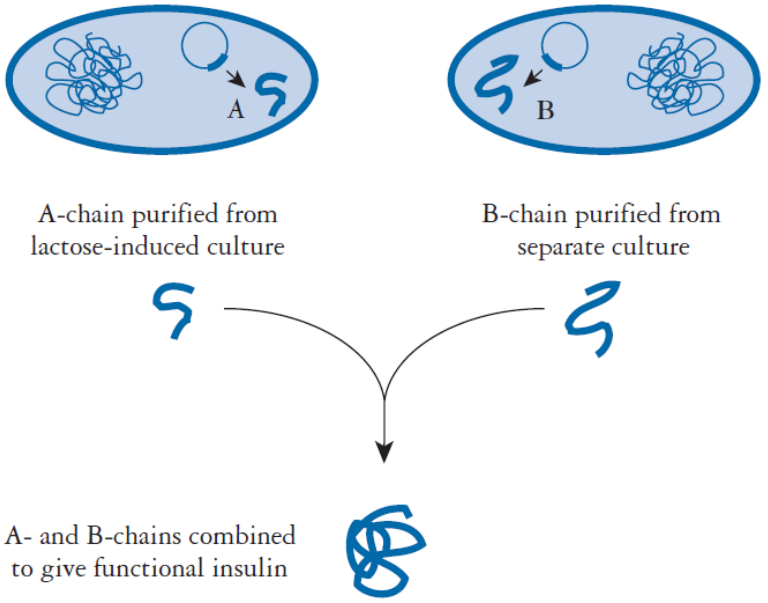
همان‌گونه که بیماری قند (MD) توسط اختلالی در مواد تشکیل دهنده بدن (انسولین) ایجاد می‌شود، درمان آن به دو صورت جای‌گزینی و یا استفاده از مواد مکمل انجام می‌گیرد. درمان با استفاده از انسولین در سال ۱۹۲۱به بهترین وجه توسعه یافت و به مدت ۶۰ سال یا بیشتر، بیماران مبتلا، به منابع طبیعی انسولین وابسته بودند و با مشکلات تهیه و کیفیت محصول مواجه بودند. در اواخر دهه ۱۹۷۰ و اوایل دهه ۱۹۸۰ فناوری DNA نوترکیب دانشمندان را قادر به سنتز انسولین در سلول‌های باکتریایی نمود و اولین مجوز تولید تا سال ۱۹۸۲ اعطا گردید. در حال حاضر انسولین نوترکیب به اشکال مختلف در دسترس است و تأثیر عمده‌ای روی درمان دیابت دارد. یکی از اشکال

[1]. Proinsulin

انسولین که به‌طور گسترده استفاده می‌شود تحت نام تجاری Humulin™ توسط شرکت Eli Lilly به بازار عرضه شده است.

استفاده از انسولین نوترکیب برای درمان دیابت یکی از موفقیت‌های عمده DNA نوترکیب مبتنی بر بیوتکنولوژی می‌باشد و در دسترس بودن آن تأثیر مهمی بر زندگی میلیون‌ها نفر از مردم داشته است.

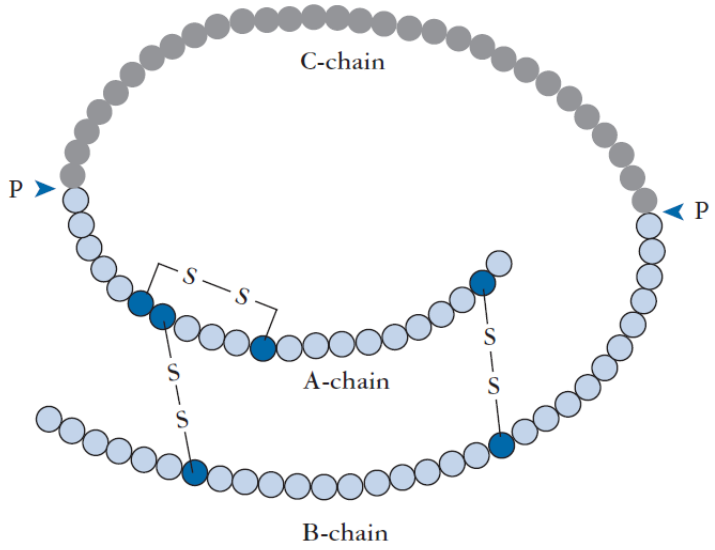
در روش اولیه برای تولید انسولین نوترکیب، زنجیرهای A و B انسولین به طور جداگانه در دو سویه مختلف باکتری سنتز می‌شدند. ژن‌های A و B انسولین تحت کنترل پروموتر *lac* قرار داده شدند، به طوری که بیان ژن‌های کلون شده با استفاده از لاکتوز به عنوان القاء کننده صورت گرفت. پس از خالص سازی زنجیرهای A و B، این زنجیرها با یک واکنش شیمیایی برای تولید مولکول نهایی انسولین به هم متصل شدند. این مراحل در شکل ۱۱-۹ نشان داده شده است. توسعه این روش شامل سنتز کل پلی پپتید پروانسولین با بیان یک توالی ژن می‌باشد (در شکل ۱۱-۱۰ نشان داده شده است. این محصول (پروانسولین) با فرآیند آنزیمی به انسولین تبدیل می‌شود.



شکل ۱۱-۹) تولید انسولین نوترکیب توسط تخمیر جداگانه زنجیرهای A و B. برای تحریک رونویسی توالی ژن کلون شده از پروموتور *lac* از ماده لاکتوز استفاده می‌شود. بعد از ترجمه، محصولات خالص شده و جهت اخذ فرآورده نهایی به طور شیمیایی با یکدیگر ترکیب می‌شوند.

پروتئین‌های نوترکیب بسیاری به‌منظور استفاده در درمان بیماری‌های خاص وجود دارند. فعال کننده پلاسمینوژن بافتی[1] (TPA) نمونه‌ای از این نوع پروتئین نوترکیب می‌باشد. این فعال کننده یک نوع پروتئاز می‌باشد که به طور طبیعی در سلول‌ها وجود دارد و در جلوگیری از لخته شدن خون نقش دارد. فعال کننده TPA روی پیش‌ساز غیر فعال پروتئاز به نام پلاسمینوژن تأثیر گذاشته و آن را به فرم فعال خود یعنی پلاسمین تبدیل می‌کنند. این پروتئاز با تجزیه پروتئین فیبرین که در تشکیل لخته خون نقش دارد موجب جلوگیری از بروز لخته در خون می‌شود. PTA به عنوان دارویی برای قربانیان حمله‌های قلبی استفاده می‌شود. اگر این دارو بلافاصله بعد از حمله قلبی مصرف شود، می‌تواند به کاهش آسیب‌های ناشی از انسداد شریان کرونری قلب کمک کند.

فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی نمونه دیگری از پروتئین درمانی ارزشمند است که با فناوری DNA نوترکیب تولید شده است.



شکل ۱۱-۱۰) پروانسولین. این پیش ماده انسولین به صورت یک پلی پپتید ۸۱ اسید آمینه ساخته می‌شود. سپس به منظور تشکیل مولکول نهایی انسولین، توالی پپتیدی زنجیر C توسط یک پروتئاز (P) از زنجیرهای A و B جدا می‌شود. حالا پروانسولین در جریان تولید انسولین مبتنی بر DNA نوترکیب به طور کامل ساخته می‌شود.

[1]. Tissue plasminogen activator

TPA نوترکیب در اوایل دهه ۱۹۸۰ توسط شرکت Genentech با استفاده از فناوری DNA مکمل (cDNA) ساخته شد. مجوز تولید این فراورده به منظور استفاده در درمان انفارکتوس حاد میوکاردیال قلب در سال ۱۹۸۷ در ایالات متحده آمریکا با نام تجاری Activase صادر شد. این دارو اولین پروتئین درمانی نوترکیب بود که از سلول‌های کشت شده پستانداران تولید شد که در شرایط مناسب رشد موجب ترشح TPA نوترکیب می‌شود. مقدار پروتئین نوترکیب TPA تولید شده در این روش برای کاربرد درمانی کافی بود، بنابراین پیشرفت عمده‌ای در مراقبت عروق کرونر به‌دست آمد. کاربردهای بعدی این فراورده در سال ۱۹۹۰ (برای انسداد ریوی بسیار شدید) و در سال ۱۹۹۶ (برای سکته مغزی ischaemic حاد) مورد تأیید قرار گرفت.

گروه نهایی از فراورده‌های نوترکیب واکسن‌ها می‌باشند. در حال حاضر واکسن‌های متعددی برای حیوانات وجود دارد و تولید واکسن انسانی نیز با تأثیر در برنامه‌های بهداشت و درمان شروع شده است. یکی از واکسن‌هایی که با روش DNA نوترکیب تولید شده است واکسن هپاتیت نوع B است. مخمر *S. cerevisiae* برای بیان آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B[1] تحت کنترل پروموتور الکل دهیدروژناز استفاده شده است. سپس پروتئین بیان شده را می‌توان از محیط تخمیر استخراج و برای تلقیح استفاده نمود. این روش استخراج و تلقیح، احتمال آلودگی این واکسن توسط ویروس‌ها یا سموم منتقله از راه خون و یا مواد سمی را از بین می‌برد، چون اگر از منابع طبیعی برای تولید واکسن استفاده شود خطری برای انسان محسوب می‌شود.

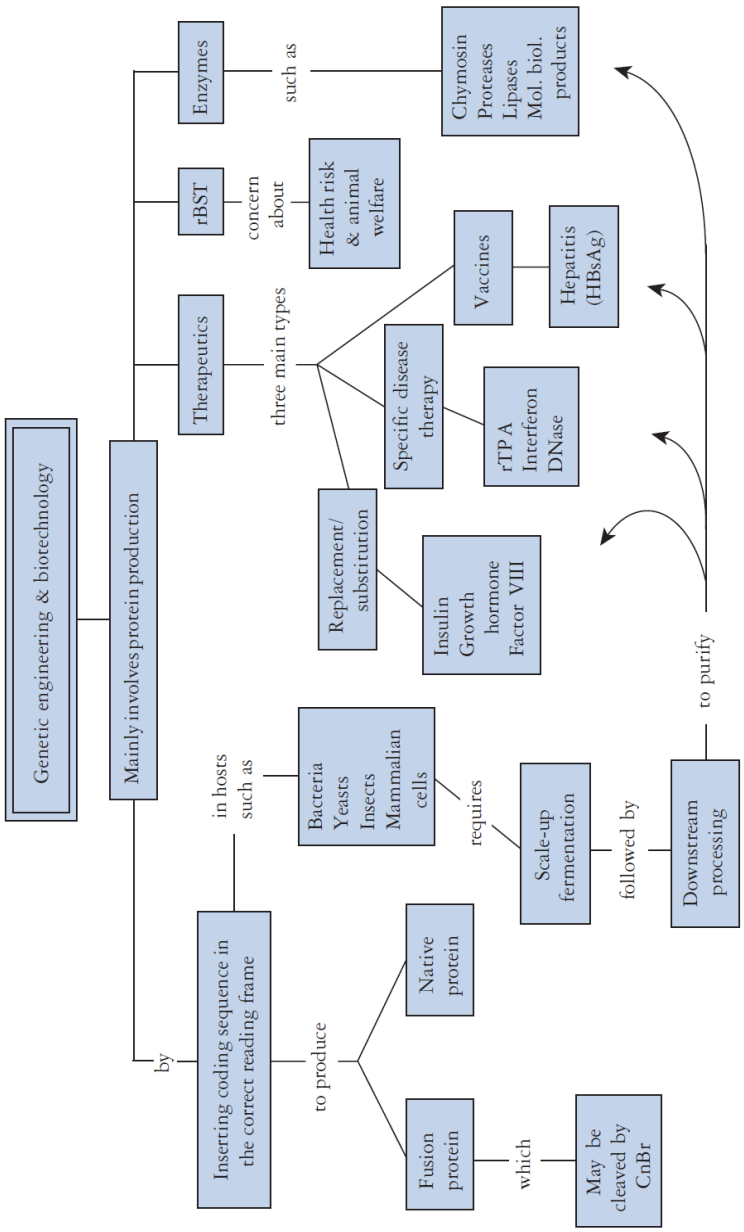
توسعه بعدی در فناوری واکسن شامل استفاده از گیاهان تراریخته به‌عنوان یک مکانیسم مناسب برای واکسیناسیون می‌باشد. این حوزه از تحقیق و توسعه از پتانسیل زیادی برخوردار است به ویژه برای ارائه واکسن در کشورهای توسعه نیافته که روش‌های سنتی واکسیناسیون ممکن است به‌دلیل هزینه و مشکلات توزیع به طور کامل موثر نباشد. جاذبه داشتن یک موز یا گوجه فرنگی حاوی واکسن روشن است و در حال حاضر تلاش‌هایی برای تولید انواع واکسن‌های گیاهی در حال انجام است.

ارائه واکسن به‌صورت تلفیق در مواد غذایی فکر زیبایی می‌باشد که بالقوه به نفع میلیون‌ها نفر از مردم کشورهایی است که واکسیناسیون در مقیاس وسیع با روش‌های سنتی در این کشورها دشوار است.

استفاده از تکنیک دست‌کاری ژن در صنعت فناوری زیستی، بخش در حال توسعه و مهم در زمینه علوم کاربردی محسوب می‌شود. علاوه بر جنبه‌های علمی و مهندسی کار، تأمین مالی شرکت‌های بیوتکنولوژی موضوعی است که مخاطرات و موفقیت‌های بالقوه خاص خود را دارد. به‌عنوان مثال،

[1]. Hepatitis B virus antigen, HBsAg

تولید یک داروی جدید با هزینه صدها میلیون پوند ممکن است ۱۵-۱۰ سال طول بکشد. حتی شرکت‌های با سابقه و دارای وضعیت مالی مناسب در برابر خطرات مرتبط با تولید یک محصول جدید در امان نیستند. قطعاً در چند سال آینده این بخش از صنعت علم کاربردی جالب خواهد بود.



نقشهٔ مفهومی فصل یازدهم

فصل دوازدهم: کاربردهای پزشکی و پزشکی قانونی

دست‌ورزی ژن

اهداف:

* اثردست‌ورزی ژن در علوم پزشکی و پزشکی قانونی؛
* توصیف الگوهای توارث برای برخی از بیماری‌های ژنتیکی؛
* ارزیابی پتانسیل ژن درمانی و RNA مداخله‌گر در درمان بیماری‌ها؛
* توصیف استفاده از فناوری دست‌ورزی ژن در یک طرح تحقیقاتی.

خلاصه فصل / نتایج یادگیری:

بعد از خواندن این فصل به اطلاعات زیر دست خواهید یافت:

* تشخیص و تعیین خصوصیات شرایط پزشکی؛
* الگوهای اصلی توارث در موضوعات ژنتیکی؛
* بیماری‌های ژنتیکی؛
* ژن درمانی؛
* RNA مداخله‌گر و نقش آن درکاربردهای درمانی؛
* پروفایل DNA و کاربردهای آن در تجزیه و تحلیل ژنوم.

لغات کلیدی:

نواقص حین تولد، سبب شناسی، ویروس نقص ایمنی انسان (HIV)، سندروم نقص ایمنی اکتسابی (AIDS)، روش الایزا (ELISA)، بررسی فعالیت آنزیم به روش ایمونو، وسترن بلات، سنجش غیر مستقیم ایمونو فلورسانس (IFA)، بیماری سل، ویروس پاپیلومای انسانی، بیماری Lyme، دیپلوئید، کروموزوم‌های غیر جنسی، کروموزوم‌های جنسی، هاپلوئید، گامت، میوز، سلول تخم، تک ژنی، چند ژنی، آلل، غالب، مغلوب، هموزیگوت، هتروزیگوت، اتوزومال غالب، اتوزومال مغلوب، بیماری‌های مرتبط با کروموزوم X، الگوی مادری توارث، قابلیت نفوذ، شدت بیان، نفوذ ناقص، شدت بیان متغیر، آلل‌های چندگانه، غالبیت ناقص، غالب، غالبیت نسبی، چند فاکتوری، پایگاه آنلاین داده‌های وراثت مندلی در انسان (OMIM)، ناهنجاری‌های کروموزومی (انحراف)، جهش‌های ژنی، تعداد پلوئیدی، تریپلوئید، تتراپلوئید، آنئوپلوئید، منوزومیک، تری زومیک، سندرم داون، غیرگسست، فیبروزسیستیک (CF)، ترشحات خارجی لوزالمعده، کمبود، تنظیم کننده هدایت غشایی فیبروز سیستیک (CFTR)، همسانه‌سازی بر مبنای مکان‌یابی،گام‌زنی کروموزومی، پرش کروموزومی، فنیل آلانین، الیگو نوکلئوتیدهای آللی خاص (ASOs)، بیماری هانتینگتون (HD)، تکرار سه نوکلئوتیدی، تحلیل عضلانی (MD)، تحلیل عضلانی دوشن (DMD)، تحلیل عضلانی(BMD) Becker، دیستروفین، ترانس ژن، ژن درمانی، سلول رویشی، سلول بنیادی، ژن درمانی

جایگزینی، ژن درمانی افزایشی، mRNA آنتی‌سنس، ژن درمانی در خارج سلول زنده، ژن درمانی داخل موجود زنده، ناقل، رتروویروس، آدنوویروس، ویروس وابسته به آدنوویروس، لیپوزوم، لیپولکس، کمبود آدنوزین دی‌آمیناز، سندرم نقص ایمنی ترکیبی شدید، درمان بر مبنای جایگزینی آنزیم، حیوان مدل، کمبود اورنیتین ترانس‌آمیلاز، سندرم نقص ایمنی ترکیبی حاد مرتبط به کروموزوم X، RNA مداخله‌گر (RNAi)، تنظیم کاهنده، قطع بیان (knockdown)، خاموشی ژن، خاموشی ژن پس از رونویسی، آنزیم دایسر، اسلایسر، RNA مداخله‌گر کوتاه (siRNA)، مجموعه القاء کننده خاموشی RNA (RISC)، میکرو RNA (miRNAs)، تخریب شبکیه چشم وابسته به سن (AMD)، ماکولا، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، دوقلوهای تک تخمی، انگشت نگاری DNA، پروفایل DNA، مینی‌ستلایت، توالی‌های متغیر تکراری پشت سر هم، کاوشگر چند مکانی، کاوشگر تک مکانی، توالی تکراری کوتاه پشت سر هم، میکروستلایت (STR)، شبکه اروپایی مؤسسات علوم پزشکی قانونی، سیستم ترکیبی نمایه DNA، دیرینه شناسی مولکولی، بوم شناسی مولکولی.

تشخیص و درمان بیماری‌های انسانی یکی از موضوعاتی است که دستورزی ژنتیکی اثرگذاری قابل ملاحظه‌ای بر آن را آغاز نموده است. همچنان که در فصل ۱۱ نیز توضیح داده شد، در حال حاضر تعداد زیادی از پروتئین‌های درمانی توسط روش‌های DNA نوترکیب (rDNA) ساخته می‌شوند و تعداد این نوع پروتئین‌ها در حال افزایش است. بنابراین درمان بیماری‌ها با استفاده از فرآورده‌های نوترکیب به خوبی توسعه یافته است. در این فصل، ما نگاهی به این موضوع که چگونه تکنیک‌های دستورزی ژن مستقیماً در تشخیص و درمان بیماری‌ها مؤثر هستند خواهیم داشت و همچنین استفاده از فناوری DNA نوترکیب را در پزشکی قانونی مورد توجه قرار خواهیم داد. البته پیشرفت‌های اخیر در این دو بخش، به دانش رو به افزایش ما درباره ژنوم انسانی بستگی دارد و بدون شک همچنان که دانش ما در این زمینه گسترش می‌یابد، پیشرفت‌های جدیدی در کاربردهای پزشکی و پزشکی قانونی به‌وجود خواهند آمد.

۱۲-۱) تشخیص و تعیین ویژگی‌های شرایط پزشکی

بیماری‌های ناشی از مشکلات ژنتیکی (که اغلب بیماری‌های ژنتیکی خوانده می‌شوند) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌ها در کودکان مطرح می‌باشد. نقصی که در کودکی به‌وجود می‌آید، اختلال زمان تولد[1] نامیده می‌شود و حدود ۵ درصد از نوزادانی که به دنیا می‌آیند، از این نوع اختلالات شدید پزشکی رنج می‌برند. در بیشتر این موارد، یک عامل مهم ژنتیکی در ایجاد این بیماری‌ها نقش دارد. تخمین زده می‌شود که حدود یک سوم از پذیرش‌های اولیه در بیمارستان‌های کودکان به علت مشکلات ژنتیکی باشد، در حالیکه در حدود ۷۰ درصد از موارد به علت نواقص ژنتیکی است. علاوه بر ناهنجاری‌های ژنتیکی که در زمان تولد یا کودکی ظاهر می‌شوند، به نظر می‌رسد که نسبت بالایی از بیماری‌ها که بعداً طی زندگی به‌وجود می‌آیند نیز ناشی از مشکلات یا زمینه‌های ژنتیکی باشند. از این رو ژنتیک پزشکی به شکل سنتی و تغییر نیافته خود، قبلاً در تشخیص بیماری اثر مهمی داشته است. توسعه ژنتیک مولکولی و فناوری DNA نوترکیب نه تنها سبب گسترش دامنه روش‌های تشخیص شده، بلکه توانسته است به کمک ژن درمانی بیماری‌های خاص را درمان کند.

همان‌گونه که اغلب بیماری‌ها دارای یک منشاء ژنتیکی می‌باشند، فناوری دست‌ورزی ژن ابزارهای جدیدی را برای تحقیق و درمان بیماری‌های ژنتیکی فراهم کرده است.

۱۲-۱-۱) تشخیص آلودگی

علاوه بر شرایط ژنتیکی که افراد را متأثر می‌سازد، فناوری DNA نوترکیب در تشخیص انواع خاصی از آلودگی‌ها مهم است. معمولاً تشخیص آلودگی باکتریایی ساده است. بنابراین پس از یک بررسی ساده توسط پزشک عمومی، تجویز آنتی‌بیوتیک صورت می‌گیرد. بررسی دقیق‌تر ویژگی عامل بیماری را می‌توان با استفاده از روش‌های کشت میکروبیولوژیکی انجام داد و این کار اغلب زمانی لازم است، که عامل بیماری به خوبی به درمان پاسخ ندهد. ممکن است تشخیص آلودگی‌های ویروسی سخت‌تر باشد، اگرچه بیماری‌هایی مانند آلودگی‌های ناشی از هرپس[2] معمولاً به آسانی قابل تشخیص هستند.

باوجود استفاده از روش‌های سنتی در موارد متعددی، اما گاهی ممکن است استفاده از این روش‌ها مناسب نباشد. به عنوان نمونه می‌توان آلودگی ناشی از ویروس نقص ایمنی انسان[3] را نام برد. این

---

[1] Congenital
[2] Herpes
[3] Human immunodeficiency virus, HIV

ویروس عامل سندرم نقص ایمنی اکتسابی[1] است. آزمون استاندارد برای آلودگی ویروس نقص ایمنی انسان به ردیابی ایمنولوژیکی با استفاده از آنتی‌بادی علیه ویروس HIV نیاز دارد که برای این کار از روش‌هایی مانند الایزا[2] (که گاهی ایمنی سنجی آنزیمی نامیده می‌شود)، وسترن بلات و سنجش غیر مستقیم ایمونوفلورسانس[3] استفاده می‌شود. با این وجود در یک فرد آلوده، پس از آلودگی اولیه تا هفته‌ها، این آنتی‌بادی‌ها قابل ردیابی نخواهند بود. در خلال این مدت ممکن است سایر افراد به این بیماری مبتلا شوند. انجام آزمایشی مانند این روش ردیابی که حتی زمانی که فرد آلوده است هیچ نتیجه مثبتی به‌دست نمی‌آید، یک کار بیهوده است. استفاده از فناوری کاوشگرهای DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با بررسی اسید نوکلئیک ویروس عامل در لمفوسیت‌های T فرد بیمار می‌تواند این مشکل را حل کند. لذا این امکان را فراهم می‌کند که قبل از آن‌که آنتی‌بادی‌ها قابل ردیابی باشند، بتوان عامل بیماری را تشخیص داد.

در بعضی موارد، آلودگی‌های ویروسی با استفاده از روش‌های مبتنی بر DNA نوترکیب (مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) قابل تشخیص می‌باشند. قبل از این که سطح آنتی‌بادی به حدی برسد که قابل ردیابی باشد، DNA ویروس با روش PCR قابل شناسایی و ردیابی است.

نمونه‌های دیگر در خصوص استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب در تشخیص آلودگی‌ها شامل بیماری‌هایی از قبیل بیماری توبرکلوسیس یا سل (که عامل آن باکتری *Mycobactrium tuberculosis* می‌باشد)، آلودگی ناشی از ویروس پاپیلومای انسانی و بیماری باکتریایی Lyme (که توسط اسپیروکیت *Borrelia burgdorferi* ایجاد می‌شود) را می‌توان نام برد.

۱۲-۱-۲) الگوهای توارث

اگرچه تشخیص آلودگی از جمله کاربردهای مهم فناوری DNA نوترکیب است، اما به‌دلیل ماهیت بیماری ژنتیکی، شاید بیشترین استفاده از این فناوری تا به امروز در پزشکی بوده باشد. قبل از این‌که به طور دقیق‌تر به جزئیات برخی از بیماری‌های خاص بپردازیم، شاید مفید باشد مروری به ویژگی‌های اساسی ژنتیک انتقال داشته باشیم و گروهی از فاکتورها را بررسی کنیم که تعیین کننده چگونگی ایجاد یک بیماری خاص در بیمار هستند.

از آنجایی که این مسئله در سال ۱۹۰۰ مجددا کشف شد، کارهای گریگور مندل پایه درک ما از این که چگونه ویژگی‌های ژنتیکی از نسلی به نسل دیگر منتقل می‌شوند را تشکیل می‌دهد. می‌دانیم که ژنوم انسانی از حدود سه میلیارد جفت باز تشکیل شده است. ژنوم انسان به شکل یک

---

1. Acquired immune deficiency syndrome, AIDS
2. Enzyme linked inmmunosorbent assay, ELISA
3. Indirect immunofluorescenceassay,

مجموعه دیپلوئید ۴۶ کروموزومی سازماندهی شده است و به شکل ۲۲ جفت کروموزوم غیر جنسی و یک جفت کروموزوم جنسی آرایش یافته است. قبل از تولید مثل، گامت‌های نر و ماده هاپلویید (به ترتیب اسپرم و اُوُسیت) با روش کاهش تقسیم کروموزومی میوز به وجود می‌آیند که تعداد کروموزوم‌ها را به ۲۳ عدد کاهش می‌دهند. پس از باروری اُوسیت توسط اسپرم، حالت دیپلوییدی احیاء می‌شود و زیگوت عضوی از هر جفت کروموزوم خود را از پدر و مادر دریافت می‌کند. کروموزوم‌های جنسی در نرها X و Y و در ماده‌ها XX هستند و بنابراین این پدر است که جنسیت فرزند را تعیین می‌کند.

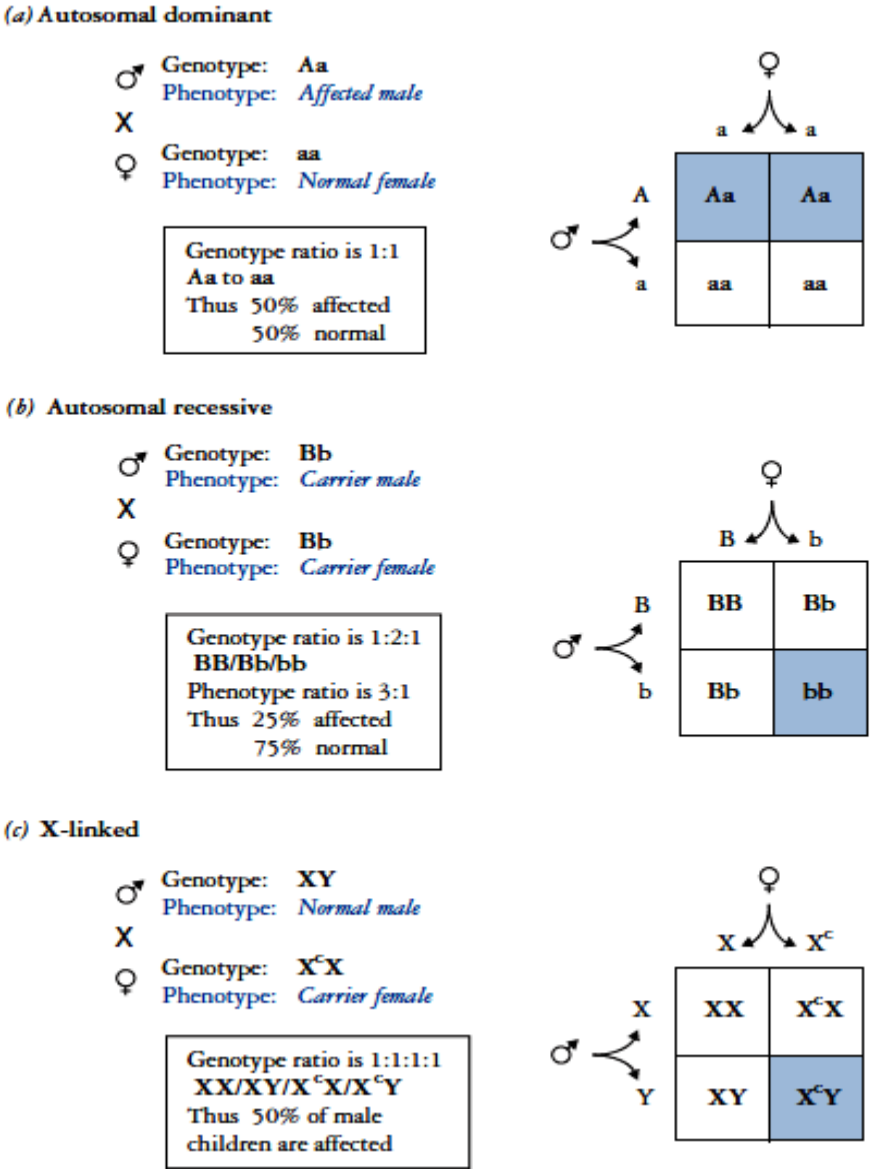
ژنتیک انتقالی، اصولی که برای اولین بار توسط گریگور مندل ابداع شد، هنوز هم بخش مهمی از پزشکی مدرن است. ژنتیک مولکولی به عنوان مکمل ژنتیک انتقالی عمل کرده و طیف گسترده‌ای ازروش‌ها را برای تجزیه و تحلیل ژنتیکی فراهم کرده است.

صفات ممکن است توسط یک ژن منفرد یا توسط تعداد زیادی ژن که به طور دسته جمعی عمل می‌کنند، کنترل شوند. بیماری‌هایی که تحت کنترل یک ژن هستند، اختلالات تک ژنی، درحالی‌که بیماری‌هایی که توسط چند ژن کنترل می‌شوند، اختلالات چند ژنی نامیده می‌شوند. توارث بیماری تک ژنی معمولاً از الگوی اصلی مندلی تبعیت می‌کند و در نتیجه اغلب می‌توان آن صفت را در یک خانواده به وسیله آنالیز شجره‌نامه خانوادگی ردیابی نمود. یک ژن ممکن است آلل‌هایی داشته باشد (اشکال مختلف) که ممکن است غالب (زمانی آن صفت بروز می‌کند که آلل مورد نظر حضور داشته باشد) و یا مغلوب باشد (اثر آن به وسیله آلل غالب پوشانده می‌شود). در مورد یک ژن خاص، افراد یا هموزیگوت (هر دوی آلل‌ها یکسان هستند) و یا هتروزیگوت (آلل‌ها متفاوتند، شاید یکی غالب و دیگری مغلوب) می‌باشند. الگوی توارث صفات منوژنیک می‌توانند با آتوزوم‌ها (آتوزومی غالب یا آتوزومی مغلوب) و یا ممکن است با جنسیت مرتبط باشند (معمولاً به کروموزوم X ارتباط داشته، بنابراین توارث مرتبط با کروموزوم X را نشان می‌دهد). الگوهای مندلی و نسبت‌های این نوع توارث‌ها در شکل ۱۲-۱ نشان داده شده‌اند. علاوه بر کروموزوم‌های داخل هسته، ژن‌های جهش یافته مربوط به ژنوم میتوکندری نیز می‌توانند موجب ایجاد بیماری شوند. همچنان که میتوکندری‌ها همراه با سلول تخم به ارث می‌رسند این صفات، الگوهای مادری توارث را نشان می‌دهند. ما در بخش بعد نمونه‌های خاص الگوهای توارث را مورد بررسی قرار می‌دهیم.

صفات ژنتیکی می‌توانند از نسلی به نسل دیگر به روش‌های مختلف منتقل شوند. این الگوهای توارث از مجموعه قوانینی تبعیت می‌کنند و می‌توانند در تشخیص و ردیابی الگوهای بیماری در خانواده مفید باشند.

اثر یک ژن نه تنها به شکل آلل و ماهیت آن بستگی دارد، بلکه به نحوه بیان آن نیز وابسته است. از واژه‌های قابلیت نفوذ و شدت بیان برای توصیف این حالت استفاده می‌شود. قابلیت نفوذ معمولاً به

صورت درصد افرادی که یک آلل خاص را حمل می‌کنند یا افـرادی کـه فنوتیـپ مربوطـه را نشـان می‌دهند قابل تعریف است. شدت بیان یک آلل خـاص بـه میـزان حضـور فنوتیـپ مربوطـه اطـلاق می‌شود (شدت حضور فنوتیپ مربوطه یکی از روش‌های نشـان دادن شـدت بیـان اسـت). بنـابراین آلل‌هایی که نفوذ ناقص یا شدت بیـان متغیـر نشـان مـی‌دهنـد، مـی‌تواننـد بـه میـزان زیـادی بـر فنوتیپ‌های بدست آمده از الگوی توارث مندلی ساده اثر بگذارند. پیچیدگی‌هـای بیشـتر زمـانی بـه وجود می‌آیند که چندین آلل در تعیین صفات نقش داشته باشند، یـا هنگـامی‌کـه آلـل‌هـا غالبیـت ناقص، حالت غالب، یا غالبیت نسبی را از خود نشان دهند. در بسیاری از مـوارد مسـیر ژنوتیـپ بـه فنوتیپ نیز شامل یک یا چند عامل محیطی می‌باشد که در این حالت گفته می‌شود صفات ماهیـت چند عاملی دارند.



شکل ۱۲-۱) الگوهای توارث. a) آلل غالب یک بیماری آتوزومی با علامت A و آلل نرمال با حرف a مشخص است. نصف گامت‌ها از یک فرد آلوده (در این مورد آلل مرد) آلل بیماری را حمل خواهند کرد. در یک لقاح (شکل مربع) گامت‌ها می‌توانند با همدیگر ترکیب شوند. نتیجه آن است که نصف نتاج هتروزیگوت و در نتیجه بیمار هستند (توسط مربع‌های رنگی نشان داده شده‌اند). b) یک الگوی آتوزومال مغلوب. آلل عامل بیماری با حرف b و آلل نرمال با حرف B مشخص شده‌اند. در لقاح بین دو هتروزیگوت دارای آلل ناقص، شانس داشتن یک نوزاد بیمار یک چهارم است. c) الگوی مرتبط با کروموزوم X برای یک آلل بیمار با حرف

c مشخص شده است. در این مورد یک آلل مغلوب نشان داده شده است. نصف نوزادان پسر بیمار خواهند بود، زیرا در اینجا فقط یک کروموزوم X وجود دارد و بنابراین هیچ آلل غالبی وجود ندارد که این اثر را بپوشاند. هیچ نوزاد دختری بیمار نخواهد بود. با این وجود در ارتباط با الل غالب وابسته به کروموزوم X، ماده‌ها نیز بیمار می شوند.

پایگاه داده توارث مندلی آنلاین در انسان (OMIM)، یکی دیگر ازنمونه‌های موفق می‌باشد که چگونه دسترسی به رایانه و اینترنت، روش مواجهه ما با مجموعه داده‌های پیچیده را تغییر داده است.

باوجود پیچیدگی‌های الگوهای انتقال و نتایج، موارد متعددی وجود دارند که می‌توان یک بیماری را با اطمینان ردیابی نمود. همچنان که در فصل ۱۰ بیان شد، اطلاعات برای انتقال صفات بیماری در پایگاه داده‌ای توارث مندلی آنلاین در انسان[1] جمع آوری می‌شوند که در حال حاضر دارای بیش از ۱۷۰۰۰ داده در گروه‌های مختلف می‌باشد. این پایگاه داده‌ای نسخه الکترونیکی متن توارث مندلی در انسان می‌باشد که توسط ویکتور مک‌کوزیک[2] از دانشگاه جان هاپکینز ارائه شده و اولین نسخه آن در سال ۱۹۶۶ چاپ شد. به درستی آقای مک‌کوزیک پدر ژنتیک پزشکی شناخته شده است.

۱۲-۱-۳) شرایط بیماری ژنتیکی

مشکلات ژنتیکی ممکن است یا از اختلالات کروموزومی (انحراف‌ها) و یا از جهش‌های ژنی به‌وجود آیند. یک کروموزوم غیرعادی می‌تواند شامل کل مجموعه‌های کروموزومی (تنوع در تعداد پلوییدی از قبیل تریپلوییدی[3]، تتراپلوییدی[4] و مانند آن) یا کروموزوم‌های منفرد (آنیوپلوییدی[5]) باشد. چنین تنوعی معمولاً عواقب خیلی شدیدی دارد و اغلب منجر به سقط جنین فوری می‌شود، زیرا تعداد زیادی از ژن‌ها تحت‌تأثیر قرار می‌گیرند. مجموعه‌های چند کروموزومی در بیشتر حیوانات نادر هستند، اما در گیاهان اغلب یافت می‌شوند. همچنان‌که تشکیل گامت‌ها در تقسیم میوز رخ می‌دهد، که شامل تفکیک کروموزوم‌های همولوگ طی تقسیم با کاهش کروموزومی است، حتی مجموعه‌های چندتایی جور[6] هم در گونه‌های گیاهی پلی‌پلوییدی که زنده باقی می‌مانند، خیلی متداول است.

---

[1]. Online Mendelian Inheritance in Man
[2]. Victor McKusick
[3] Triploid
[4] Tetraploid
[5] Aneuploidy
[6]. Even-numbered multiple sets

از آنجایی‌که اثر اختلال در حفظ تعادل طبیعی ژنتیکی معمولاً شدید است، ناهنجاری‌های کروموزومی هم اغلب اثرات خیلی شدیدی بر موجود زنده می گذراند.

آنیوپلوئیدی یک فرم خیلی متداول‌تر تغییرات کروموزومی در انسان است، اما هنوز هم تعداد نسبتاً کمی از این گونه نوزادان زنده به دنیا می‌آیند. حذف یک کروموزوم منجر به وضعیت منوزومی می‌شود که معمولاً خیلی حاد بوده و جنین نمی‌تواند به‌طور کامل نمو یابد. یک کروموزوم اضافی منجر به وضعیت تریزومی می‌شود. مونوزومی[۱] و تریزومی[۲] می‌توانند روی کروموزوم‌های آتوزوم[۳] و جنسی اثر بگذارند و سندرم‌های شناخته شده‌ای از جمله سندرم دان را سبب شوند (تریزومی کروموزوم شماره ۲۱).

بیشتر مواردی که به تغییر در تعداد کروموزوم می‌انجامد، ناشی از عدم تفکیک کروموزوم‌ها در مرحله میوز طی تشکیل گامت‌ها است. علاوه بر تغییر در تعداد کروموزوم، تغییرات ساختاری نیز می‌توانند بر کروموزوم‌ها اثر بگذارند و نیز می‌توانند عامل ایجاد مسائل مختلف شوند. برخی از نمونه‌های مربوط به اختلالات کروموزومی انسان در جدول ۱۲-۱ نشان داده شده‌اند.

اگرچه اختلالات کروموزومی نوع بسیار مهمی از نقص‌های ژنتیکی محسوب می‌شوند اما در تعیین ویژگی جهش‌های ژنی، ژنتیک مولکولی بیشترین تأثیر را داشته است. در حال حاضر ویژگی تعداد زیادی از بیماری‌ها به طور کامل، هم از نظر روش انتقال و هم تأثیر آن‌ها در دو سطح کروموزومی و مولکولی تعیین شده است. جدول ۱۲-۲ فهرست تعدادی از حالت‌های عمومی‌تر اختلال منوژنی موثر در انسان را نشان می‌دهند. ما برخی از این اختلالات را با جزئیات بیشتری بررسی خواهیم کرد تا نشان دهیم که چگونه می‌توان یک بیماری را از نظر اثرات ایجاد شده توسط یک ژن جهش یافته ویژگی‌یابی کرد.

بیماری فیبروزسیستیک[۴] رایج‌ترین بیماری ژنتیکی در جمعیت سفیدپوستان اروپای غربی با فراوانی حدود یک بیمار در هر ۲۰۰۰-۲۵۰۰ تولد محسوب می‌شود. این بیماری به‌صورت یک مشخصه آتوزومی (خودتنی) مغلوب انتقال می‌یابد و در نتیجه تولد یک نوزاد آلوده می‌تواند اولین علامت نشان‌دهنده یک مشکل در خانواده باشد. فراوانی ناقل بیمار برای آلل نقص فیبروزسیستیک در حدود یک ناقل در ۲۰-۲۵ نفر است. این بیماری با علایم مختلفی بروز می‌کند که جدی‌ترین علایم آن بسته شدن مسیرهای تنفسی با موکوس ضخیم و چسبنده است. این موکوس ضخیم‌تر از آن است که بتواند توسط مژک‌هایی که مسیر هوا را باز می‌کنند حرکت داده شود و احتمالاً بیمار از

---

[1] Monosomic
[2] Trisomic
[3] Autosome
[4] Cystic fibrosis

آلودگی‌های مداوم و تکراری رنج خواهد برد. در نتیجه عملکرد شُش‌ها در بیماران فیبروزسیستیک به خطر می‌افتد و حتی در مواردی که بیمار بهبود می‌یابد امید به زندگی در این بیماران به حدود ۳۰ سال کاهش می‌یابد. همچنین این بیماری ممکن است مجرای پانکراس را تحت‌تأثیر قرار دهد و منجر به نقص ترشح پانکراس به خارج از محل خود شود که مشکلاتی را در هضم غذا به‌وجود می‌آورد.

فیبروزسیستیک نمونه‌ای از یک بیماری مهم می‌باشد که از دیدگاه ژنتیک مولکولی، ژنتیک انتقالی و ژنتیک جمعیت مطالعه شده است.

جدول ۱۲-۱) نمونه‌هایی از انواع اختلالات کروموزومی در انسان

Condition	Chromosome designation	Syndrome	Frequency per live births
Autosomal			
Trisomy-13	47, 13+	Patau syndrome	1:12 500–1:22 000
Trisomy-18	47, 18+	Edwards syndrome	1:6 000 -1:10 000
Trisomy-21	47, 21+	Down syndrome	1:800
Sex chromosome variation			
Missing Y	45, X	Turner syndrome	1:3 000 female births
Additional X	47, XXX	Triplo-X	1:1 200 female births
Additional X	47, XXY	Klinefelter syndrome	1:500 male births
Additional Y	47, XYY	Jacobs syndrome	1:1 000 male births
Structural defects	**Cause**		
Deletion	Part of chromosome deleted e.g. ABCDEFGH → ABFGH		
Duplication	Part of chromosome duplicated e.g. ABCDEFGH → ABCDBCDEFGH		
Inversion	Part of chromosome inverted e.g. ABCDEFGH → ABCFEDGH		
Translocation	Fragment moved to different chromosome e.g. ABCDEFGH → PQRDEFSTUV		
Fragile-X syndrome	Region of X-chromosome susceptible to breakage; known as Martin–Bell syndrome, presenting as 1:1 250 male births and 1:2 500 female births		

(نکته: در ستون نام کروموزوم، کل تعداد کروموزوم‌ها و سپس نقص خاص آن فهرست شده است. بنابراین +۱۳ ۴۷ بیان‌گر یک کروموزوم اضافی شماره ۱۳ می‌باشد XXY ۴۷، یک نر با یک کروموزومی X اضافی را نشان می‌دهد. سندرم معمولاً به نام شخصی که برای بار اول آن را توصیف کرده نام‌گذاری می‌شود; گاهی اوقات هنوز هم در نامگذاری از حالت مالکیت استفاده می‌شود (*Down's* syndrome) اما در روش جدید از حالت مالکیت برای نامگذاری سندرم استفاده نمی‌شود (*Down* syndrome).

جدول ۱۲-۲) بیماری‌های منوژنیک در انسان.

Inheritance pattern/disease	Frequency per live births	Features of the disease condition
Autosomal recessive		
Cystic fibrosis	1:2000–1:2500 in Western Caucasians	Ion transport defects; lung infection and pancreatic dysfunction result
Tay-Sachs disease	1:3000 in Ashkenazi Jews	Neurological degeneration, blindness, and paralysis
Sickle-cell anaemia	1:50–1:100 in African populations where malaria is endemic	Sickle-cell disease affects red blood cells; heterozygous genotype confers a level of resistance to malaria
Phenylketonuria	1:2000–1:5000	Mental retardation due to accumulation of phenylalanine
α_1-antitrypsin deficiency	1:5000–1:10000	Lung tissue damage and liver failure
Autosomal dominant		
Huntington disease	1:5000–1:10000	Late onset motor defects, dementia
Familial hypercholesterolaemia	1:500	Premature susceptibility to heart disease
Breast cancer genes BRCA1 and 2	1:800 (1:100 in Ashkenazi Jews)	Susceptibility to early onset breast and ovarian cancers
Familial retinoblastoma	1:14000	Tumours of the retina
X-linked		
Duchenne muscular dystrophy	1:3000–1:4000	Muscle wastage, teenage onset
Haemophilia A/B	1:10000	Defective blood clotting mechanism
Mitochondrial		
Leber hereditary optic neuropathy (LHON)	Mitochondrial defect, maternally inherited/late onset thus difficult to estimate	Optic nerve damage, may lead to blindness, but complex penetrance of the defective gene due to mitochondrial pattern of inheritance

فیبروزسیستیک را می‌توان در داستان‌های فرهنگ عامه اروپایی هم ردیابی و مشاهده کرد و این جمله مستاصلانه باتوجه به این بیماری گفته شده که: "وای بر بچه‌ای که زمانی که پیشانیش بوسیده شود، مزه نمک دهد. او افسون شده و باید به زودی بمیرد". علائم این بیماری اولین بار به طور بالینی در سال ۱۹۳۸ توصیف شد، اگرچه تا زمانی که ژن عامل بیماری در سال ۱۹۸۹ همسانه‌سازی شد، تعیین مشخصات این بیماری در سطح مولکولی انجام نشده بود. این بیماری روی پروتئین غشایی مسئول انتقال یون کلرید اثر می‌گذارد و باعث می‌شود که صفحه‌های سلول مخاطی فاقد سطح هیدراسیون کافی شده و در نتیجه موکوس چسبنده به‌وجود آید. همچنین محتوای نمک عرق بالا می‌رود، بنابراین جمله‌ای که قبلاً نقل شد به همین دلیل است. ژن /پروتئین

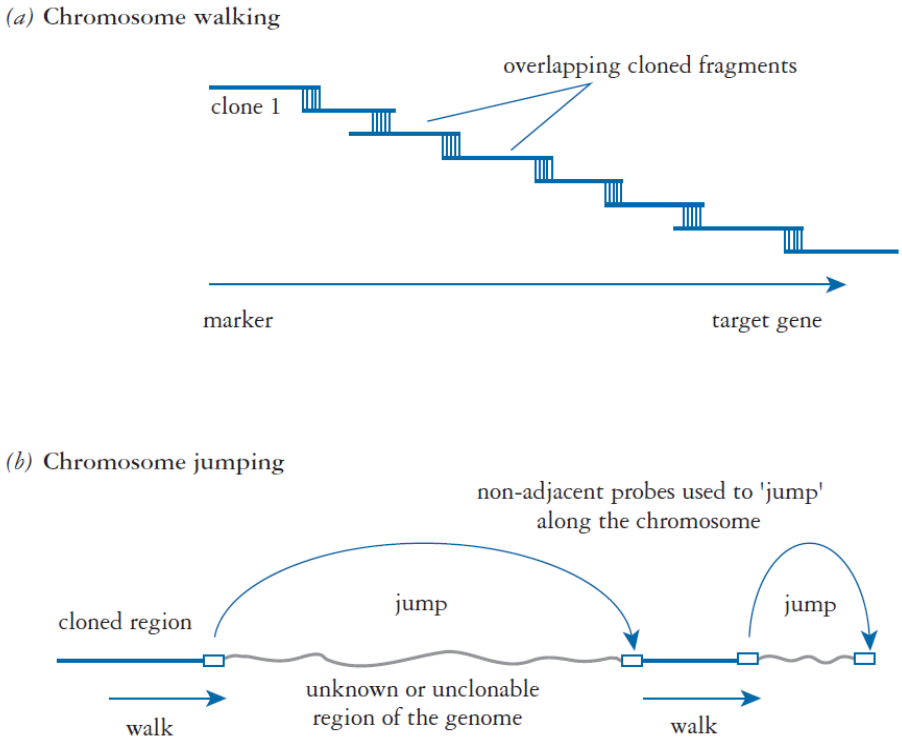
عامل بیماری فیبروزسیستیک، تنظیم کننده هدایت ورای غشایی فیبروزسیستیک[1] (CFTR) نامیده می‌شود. پس چگونه ژن عامل این بیماری همسانه‌سازی و ویژگی‌یابی شد؟

جستجوی ژن فیبروزسیستیک مثال خوبی است درباره این‌که چگونه می‌توان از روش همسانه‌سازی بر مبنای مکان‌یابی[2] برای یافتن ژنی که فرآورده پروتئین آن ناشناخته و همچنین اطلاعات سیتوژنتیکی یا پیوستگی در مورد آن محدود است، استفاده کرد. همسانه‌سازی بر مبنای مکان‌یابی، همان گونه که از نام آن مشخص است شامل شناسایی یک ژن به وسیله شناسایی موقعیت آن، به‌ویژه با پی بردن به ارتباط بین فنوتیپ و ژنوتیپ ژن مورد نظر می‌باشد. در سال ۱۸۸۵، یک مارکر پیوسته (به نام *met*) شناسایی شد که محل ژن فیبروزسیستیک را روی بازوی طویل کروموزوم شماره ۷ تعیین کرد. جستجو برای یافتن مارکرهای دیگر موجب شناسایی دو مارکر دیگر شد که هیچ نوترکیبی با جایگاه ژن فیبروزسیستیک نداشت– بنابراین آنها خیلی به ژن فیبروزسیستیک نزدیک‌تر بودند. این مارکرها به عنوان مکان‌های شروع برای تکثیر حدود ۲۸۰ کیلوباز از DNA ژن‌هایی با پتانسیل ایجاد فیبروزسیستیک استفاده شدند. این کار با استفاده از روش‌های گام زنی کروموزومی[3] و پرش کروموزومی[4] به منظور یافتن توالی‌های کانتیگی DNA انجام شد (این کار قبل از آن صورت گرفت که حامل‌های کروموزوم مصنوعی مخمری و باکتریایی امکان همسانه‌سازی قطعات بزرگ را فراهم آورند). در شکل ۱۲-۲ مبانی و اصول روش‌های گام زنی کروموزومی و پرش کروموزومی نشان داده شده است. با استفاده از این روش‌ها، اطلاعات توالی کد کننده ۴ ژن مشخص شناسایی شدند و با الگوهای ردیابی بیان ژن هر کدام از این ژن‌ها در بیماران فیبروزسیستیک، انتهای '۵ یک ژن بزرگ را که در بافت‌های مناسب بیان شده شناسایی شد. این ژن، ژن تنظیم کننده هدایت غشایی فیبروزسیستیک نامیده شد. خلاصه‌ای از مسیر تحقیق برای ژن تنظیم کننده هدایت ورای غشایی فیبروزسیستیک در شکل ۱۲-۳ نشان داده شده است.

موقعیت مکانی و تشخیص ژن تنظیم کننده هدایت غشایی فیبروز سیستیک، پیشرفت بزرگی در ژنتیک پزشکی بود.

---

1. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
2. Positional cloning
3. Chromosome walking
4. Chromosome jumping



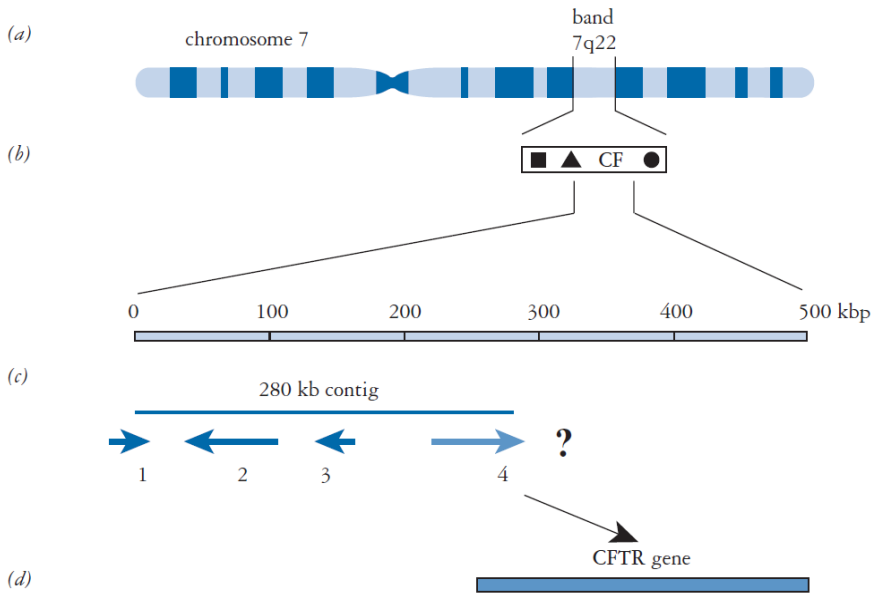
شکل ۱۲-۲) روش‌های گام زنی کروموزومی و پرش کروموزومی. a) روش گام زنی کروموزومی از کاوشگرها استفاده می‌کند که از انتهای همسانه‌های همپوشان بدست می‌آیند تا امکان یک "گام" در طول توالی را فراهم کند. بنابراین، یک کاوشگر از کلون شماره یک، کلون بعدی را شناسایی می‌کند که آن هم به نوبه خود کاوشگر بعدی را برای کلون بعدی فراهم می‌کند و به همین ترتیب الی آخر. با این روش یک توالی بزرگ پیوسته را می‌توان تجمیع کرد. در پرش کروموزومی (b)، می‌توان از مناطقی که کلون کردن آنها مشکل است عبور کرد. کاوشگرها با استفاده از تکنیکی تهیه می‌شوند که در آن امکان جداسازی قطعاتی در مکان‌های دور در یک کلون مجزا را با حلقوی کردن یک قطعه بزرگ و جداسازی ناحیه حاوی کاوشگر اصلی و کاوشگر دور فراهم می‌سازد. بنابراین از این روش می‌توان برای جداسازی یک کلون حاوی توالی‌هایی از نواحی با فواصل زیاد استفاده کرد. اغلب ترکیبی از روش‌های گام زنی و پرش کروموزومی برای شروع با استفاده از یک مارکر (از قبیل مارکر RFLP) برای رسیدن به توالی ژن مورد نظر استفاده می‌شود (با کسب اجازه از Nicholl (2000), *Cell & Molecular Biology*, Advanced Higher Monograph Series, Learning and Teaching Scotland.).

با شناسایی ژن تنظیم‌کننده هدایت ورای غشایی فیبروزسیستیک (CFTR)، امکان تعیین ویژگی‌های دقیق‌تر محصولژن نرمال و شناسایی اساس وضعیت بیماری را می‌تواند شروع کرد. این

ژن به طول حدود ۲۵۰ جفت کیلوباز و دارای ۲۷ اگزون بوده که پروتئینی با ۱۴۸۰ اسید آمینه تولید می‌کند. این پروتئین شبیه به گروه پروتئین‌های انتقال دهنده غشایی متصل به ATP است. هنگامی‌که ویژگی‌های این ژن تعیین شد، عنوان گردید که در حدود ۷۰ درصد موارد CF، دارای یک ناحیه مشابه معیوب در توالی خود هستند (حذف سه جفت باز در اگزون شماره ۱۰). این تغییر باعث می‌شود که اسید آمینه فنیل آلانین از توالی پروتئین حذف شود. این جهش، جهش ΔF508 نامیده می‌شود (Δ نشان دهنده حذف، F مخفف فنیل آلانین و ۵۰۸ موقعیت آن در توالی اولیه پروتئین می‌باشد). حذف این اسید آمینه روی شکل فضایی پروتئین تنظیم کننده هدایت ورای غشایی فیبروزسیستیک اثر می‌گذارد که بدین معنی است که این پروتئین پس از ترجمه به درستی قابلیت پردازش نداشته و به غشاء تزریق نمی‌شود. بنابراین بیمارانی که دو آلل ناقص F508Δ را حمل می‌کنند، پروتئین فعال مربوط به ژن تنظیم کننده هدایت ورای غشایی فیبروزسیستیک را تولید نکرده و به همین دلیل فنوتیپ مرتبط با بیماری فیبروزسیستیک ظاهر می‌شود. این جهش در شکل ۱۲-۴ خلاصه شده است.

تعیین ویژگی مولکولی یک ژن، امکان تشخیص دقیق آلل‌های بیماری را فراهم می‌کند. اگرچه تشخیص سنتی بیماری فیبروزسیستیک بر اساس آزمایش از روی عرق صورت می‌گرفت، در حال حاضر طیفی از روش‌های مولکولی وجود دارد که می‌توان از آن‌ها برای تأیید حضور یک آلل معیوب در ژن تنظیم کننده هدایت غشایی فیبروزسیستیک استفاده کرد. این روش‌ها می‌توانند ناقلین هتروزیگوت را با قاطعیت شناسایی کنند. دو عدد از این روش‌ها شامل استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر یک منطقه اطراف ناحیه ΔF508 به منظور شناسایی سه جفت باز حذف شده و استفاده از الیگونوکلئوتیدهای مختص آلل[1] در آزمایشات هیبریدیزاسیون است. استفاده از این روش‌ها در شکل ۱۲-۵ نشان داده شده است.

[1]. Allele-specific oligonucleotides



شکل ۱۲-۳) جستجوی ژن فیبروزسیستیک. a) مطالعات مکان‌یابی، این ژن را روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۷ در موقعیت باند 7q22 قرار داد. b) مارکرهای مربوط به این ناحیه (مربع، مثلث و دایره) در ارتباط باژن CF مکان یابی شده‌اند. c) یک ناحیه به طول تقریبی ۵۰۰ جفت کیلوباز بررسی شد و یک توالی پیوسته (کلون کاتیگ 'contig' clone) به طول ۲۸۰ جفت کیلوباز شناسایی شد. این ناحیه حاوی ۴ توالی ژنی مشخص یا قطعات ترجمه شونده به پروتئین[1] (قطعاتی که بصورت ۱-۴ نام‌گذاری شدند) می‌باشد. آنالیز بیشتر نسخه‌های mRNA و توالی‌های DNA، سرانجام قطعه ترجمه شونده به پروتئین شماره ۴ را به عنوان شروع ژن CF شناسایی کرد که این قطعه ترجمه شونده به پروتئین، ژن تنظیم کننده هدایت غشایی فیبروزسیستیک نام گذاری شد.

اگرچه جهش ΔF508 رایج‌ترین عامل ایجاد بیماری فیبروزسیستیک است، تا به امروز حدود ۱۵۰۰ جهش در ژن تنظیم کننده هدایت غشایی فیبروزسیستیک شناسایی شده است. یک پایگاه داده برای توالی جهش‌های این ژن توسط کارکنان بیمارستان کودکان تورنتو، جایی که این ژن در آن‌جا کشف شد، تهیه شد. همچنین می‌توان این اطلاعات را در سایت http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app به‌دست آورد. جهش‌های متنوعی در ژن تنظیم کننده هدایت غشایی فیبروزسیستیک از قبیل جهش‌های ناحیه پیشبر، تغییر قاب، جای‌گزینی‌های اسید آمینه، نقص در برش‌دهی و پیرایش اینترون‌ها و حذف قطعاتی از توالی این ژن انجام شده‌اند. با ابداع

[1] OREs

روش‌های تشخیص مدرن‌تر، بیماران با علائم خفیف‌تر بیماری فیبروزسیستیک قابل تشخیص بودند. علائم فوق ممکن است در مراحل اولیه مشاهده نشوند و یا آن اندازه مشابه علایم ناشی از بیماری ΔF508 نباشند. بنابراین داستان فیبروزسیستیک مثال خوبی از حوزه زیست‌شناسی مولکولی در تشخیص پزشکی فراهم می‌کند، به طوری که این روش‌ها علاوه بر این که قابلیت تشخیص انواع معمول بیماری را دارند، دانش ما را نیز در مورد نحوه تأثیر یک جایگاه به شدت پلی‌مورف بر طیفی از عواقب ناشی از جهش، بهبود می‌بخشند.

جهش‌های مختلفی در ژن تنظیم کننده هدایت غشایی فیبروزسیستیک شناسایی شده‌اند. هر چند شایع‌ترین این جهش‌ها، نبود اسید آمینه فنیل آلانین در موقعیت ۵۰۸ در فرآورده پروتئینی آن است.

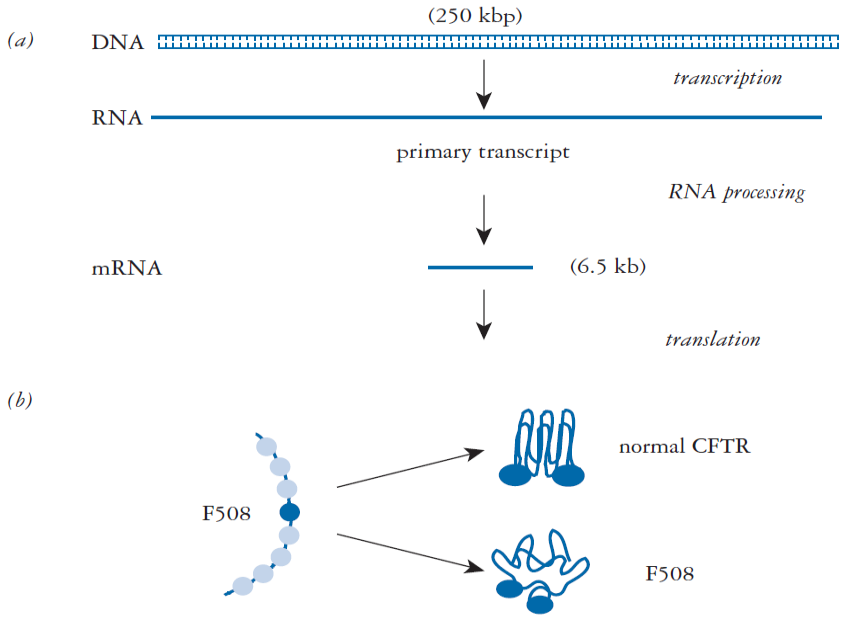
در ناحیه اطراف دریاچه ماراکایبو در ونزوئلا، یک گروه خانوادگی بزرگ از مردمی وجود دارند که از زنی بوجود آمده‌اند که در سال ۱۸۰۰ از اروپا به آنجا مهاجرت کرده است. اعضای این خانواده دارای یک بیماری مزمن مشترک هستند. آن‌ها حرکت‌های عجیب و غریب غیر ارادی از خود نشان داده و از جنون و افسردگی رنج می‌برند. زمان شروع بیماری تقریباً در سنین ۴۰-۵۰ سالگی است. فرزندان آن‌ها که از والدین به ظاهر سالم متولد می‌شوند نیز علائم بیماری را نشان می‌دهند که بیماری هانتینگتون[1] نامیده می‌شود (این بیماری قبلاً Huntington's chorea (HD) نامیده می‌شد که حرکت‌های تشنج مانند بیماران را توصیف می‌کند).

یک روانشناس بالینی که نانسی وکسلر نام داشت، مطالعه طولانی روی هزاران بیمار HD ساکن اطراف دریاچه ماراکایبو انجام داد و یک تجزیه و تحلیل شجره‌ای وسیع به عمل آورد. این تحقیق تأیید می‌کند که HD از یک الگوی توارث غالب آتوزومی تبعیت می‌کند که در این شرایط، حضور تنها یک آلل معیوب کافی است تا بیماری به وجود آید. بنابراین فرزندان یک پدر و مادر بیمار، شانس ۵۰ درصد توارث این بیماری را دارند. به دلیل اینکه علائم بیماری دیر ظاهر می‌شود (نسبت به سن دوران کودکی)، تعداد زیادی از مردم دوست دارند بدانند که آیا حامل آلل معیوب هستند تا این که با در اختیار داشتن این اقدام به انتخاب افراد مورد نظر برای تشکیل خانواده نمایند. تحقیق روی ژن عامل بیماری HD موجب ردیابی یک قطعه پلی‌مورف RFLP شد که ارتباط نزدیکی با جایگاه HD دارد. قطعه پلی‌مورف RFLP در سال ۱۹۸۳ شناسایی و G8 نامیده شد. در ۹۷ درصد موارد G8 از ژن HD تفکیک می‌شود. در نهایت خود ژن HD در سال ۱۹۹۳ شناسایی شد که تقریباً در انتهای بازوی کوتاه کروموزوم ۴ واقع شده است. این نقص شامل یک فرم نسبتاً غیر معمول جهش می‌باشد که تکرار سه نوکلئوتیدی نامیده می‌شود. ژن HD دارای تکرارهای متعددی

[1]. Huntington disease

از توالی CAG می‌باشد که گلوتامین را کد می‌کند. در افراد عادی، این ژن تا ۳۴ عدد از این تکرارها را دارد. در آلل‌های HD، وجود بیش از ۴۲ عدد از این تکرارها نشان می‌دهد که بیماری ظاهر خواهد شد. همچنین ارتباطی بین تعداد تکرارها و سن شروع بیماری وجود دارد به گونه‌ای که اگر تعداد بیشتری از این تکرارها وجود داشته باشد، بیماری زودتر ظاهر می‌شود. مانند بیماری CF، دسترسی به توالی این ژن موجب شد که آزمایشات تشخیصی برای بیماری HD توسعه یابد. با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز می‌توان ناحیه تکرار را تکثیر و محصول واکنش را با الکتروفورز جداسازی نمود تا تعداد تکرارها و بنابراین سرنوشت ژنتیکی افراد را به توجه به HD تعیین نمود.

تجزیه و تحلیل شجره‌ای می‌تواند ابزاری برای ردیابی الگوی توارث یک صفت در جمعیت باشد.



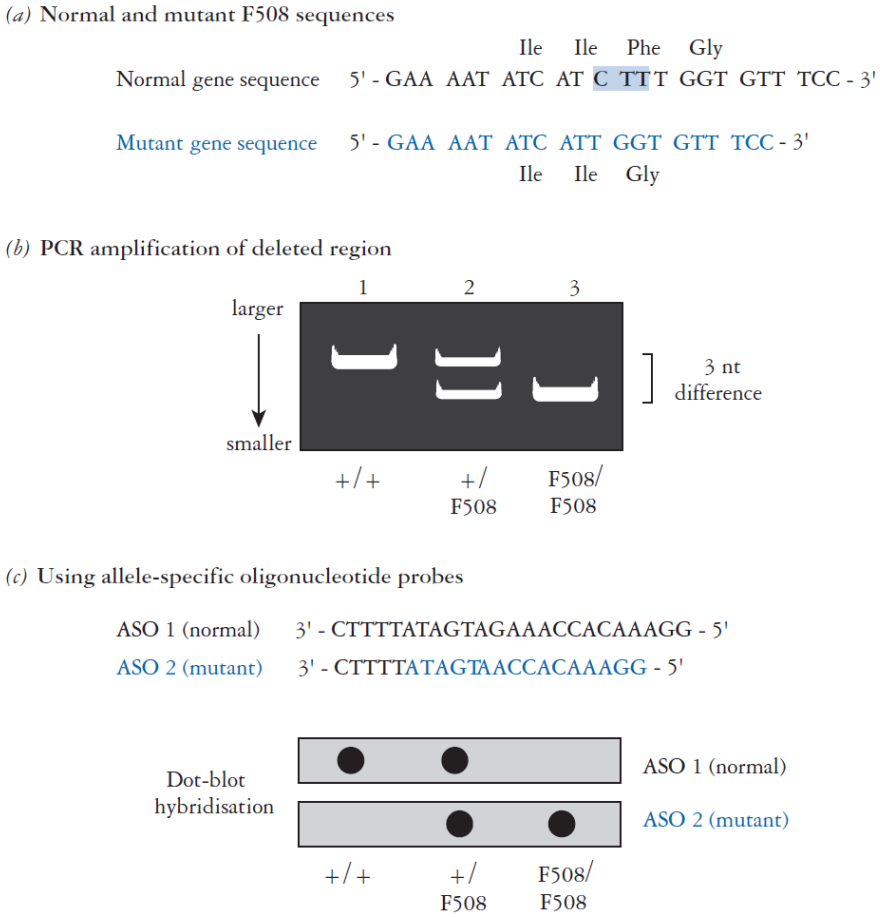
شکل ۱۲-۴) جهش ΔF508 فیبروز سیستیک. a) ژن فیبروزسیستیک. رونویسی، یک نسخه رونوشت RNA اولیه تولید می‌کند که با پردازش و حذف توالی‌های اینترون، به یک mRNA فعال به طول ۶/۵ کیلوباز تبدیل می‌شود. پس از ترجمه، پروتئین تنظیم کننده هدایت غشایی فیبروزسیستیک تولید می‌شود. b) پروتئین‌های نرمال و جهش یافته نشان داده شده‌اند. پروتئین نرمال تنظیم کننده هدایت غشایی فیبروزسیستیک در موقعیت ۵۰۸ دارای فنیل آلانین می‌باشد. در پروتئین جهش یافته ΔF508، این اسید آمینه حذف شده است و با تغییر شکل پروتئین، مانع از رسیدن به مکان اتصال آن در غشاء می‌شود (با

کسب اجازه از Nicholl (2000), *Cell & Molecular Biology*,Advanced Higher Monograph Series, Learning and Teaching Scotland.).

بیشتر اختلالات ژنی مربوط به کروموزوم X مغلوب هستند، با وجود این الگوی توارث آن‌ها به این معنی است که این‌ها به‌طور مؤثری در افراد نر غالب می‌باشند (XY)، زیرا بر خلاف ماده‌ها (XX) و یا در حالت آتوزومی دیپلویید، آلل دوم در افراد نر (XY) وجود ندارد. بنابراین، بیماری‌های مرتبط با کروموزوم X مانند بیماری تحلیل ماهیچه‌ای[1] (MD) اغلب در پسرها خیلی جدی هستند. این بیماری، بیماری تخریب ماهیچه بوده و پیش رونده می‌باشد و معمولاً در همان سنین نوجوانی ایجاد و باعث مرگ پیش از بلوغ می‌شود. حالت شدید بیماری، تحلیل ماهیچه‌ای دوشن[2] (DMD) نامیده می‌شود، البته یک شکل ملایم‌تر بیماری نیز وجود دارد که تحلیل ماهیچه‌ای Becker نامیده می‌شود. هر دوی این نقص‌ها در موقعیت مشابه روی کروموزوم X قرار دارد. ژن MD در سال ۱۹۸۷ با استفاده از روش‌های همسانه‌سازی موضعی جدا شد. این ژن خیلی بزرگ بوده و ۲/۴ مگاباز از کروموزوم X را در بر می‌گیرد (که این میزان معادل ۲۴۰۰ جفت کیلوباز یا تقریباً ۲ درصد از کل کروموزوم X است!). ۷۹ اگزون در ژن MD یک رونوشت به طول ۱۴ کیلوباز تولید می‌کند که یک پروتئین ۳۶۸۵ اسید آمینه‌ای بنام دیستروفین را می‌سازند. عملکرد این پروتئین، اتصال سیتواسکلت سلول‌های ماهیچه‌ای به سارکولما (غشاء) می‌باشد.

---

1. Muscular dystrophy
2. Duchenne musculardystrophy



شکل ۱۲-۵) تشخیص آلل ΔF508 CF a) توالی‌های ژن جهش یافته و نرمال در اطراف موقعیت ۵۰۸ (فنیل آلانین) نشان داده شده‌اند. سه جفت باز حذف شده در توالی نرمال سایه‌دار شده‌اند. این امر منجر به فقدان اسید آمینه فنیل آلانین می‌شود. b) آزمایشی بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز. با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز یک ناحیه ۱۰۰ جفت بازی اطراف ناحیه حذف شده تکثیر و فرآورده واکنش بر روی ژل، الکتروفورز شد که موجب تفکیک بخش نرمال و جهش یافته از یکدیگر شده و قطعه جهش یافته سه نوکلئوتید کوتاهتر خواهد بود. ستون‌های ۱، ۲ و ۳ الگوهای بدست آمده برای هموزیگوت نرمال (+/+)، حامل هتروزیگوت (+/ΔF508) و هموزیگوت مغلوب بیمار فیبروزسیستیک را نشان می‌دهد. c) یک الگوی مشابه با استفاده از کاوشگرهای الیگونوکلئوتیدی مختص آلل (ASOs) دیده می‌شود. توالی کاوشگر که از ژن F508 (بخش a شکل) تهیه شده نیز نشان داده شده است. با تکثیر نمونه‌های DNA بیماران با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و انجام هیبریداسیون لکه‌گذاری نقطه‌ای با

کاوشگر الیگونوکلئوتید ASOs تیمار شده با مواد رادیواکتیو، تشخیص ساده ممکن می‌شود. در این مثال، با روش هیبریداسیون به کمک هر یک از کاوشگرها و با انجام اتو رادیوگرافی به طور جداگانه می‌توان سه نوع ژنوتیپ را تعیین کرد.

ژن دیستروفین که در دیستروفی عضلانی نقش دارد، بسیار طویل و به طول حدود ۲/۴ مگا باز می‌باشد.

میزان جهش در ژن MD نسبت به حالت عادی خیلی بیشتر است و تقریباً دو برابر بیشتر از سایر مکان‌های متصل به کروموزوم X می‌باشد. این ممکن است به علت اندازه خیلی طویل ژن باشد که مکان مناسبی را برای جهش فراهم می‌کند. بیشتر جهش‌هایی که تاکنون ویژگی آن‌ها تعیین شده، از نوع حذف هستند. جهش‌هایی که روی قاب خواندنی باز اثر گذاشته و موجب تغییر آن می‌شوند معمولاً بیماری حاد DMD را ایجاد می‌کنند در حالی که جهش‌هایی از نوع حذف که قالب خواندنی باز را تغییر نمی‌دهند معمولاً موجب بیماری BMD می‌شوند.

۱۲-۲) درمان با استفاده از فناوری DNA نوترکیب - ژن درمانی

از زمانی‌که عیوب ژنتیکی شناسایی و خصوصیات آن‌ها مطالعه شد، امکان درمان بیماری فراهم گردید. اگر ژن معیوب با یک نسخه فعال و سالم قابل جایگزینی باشد و به طور صحیح بیان گردد (گاهی اوقات ترانس‌ژن نامیده می‌شود، مانند ترانس‌ژنیک)، می‌توان از بروز بیماری ناشی از ژن معیوب جلوگیری کرد. این روش، ژن درمانی نامیده می‌شود. اگرچه این روش تاکنون به انتظارات اولیه خود دست نیافته است، اما هنوز هم به عنوان یکی از روش‌های بالقوه در استفاده از فناوری ژن در پزشکی محسوب می‌شود. دو روش ممکن برای ژن درمانی وجود دارد. ۱- تزریق یک ژن ترانس‌ژن به درون سلول‌های سوماتیک بافت معیوب یا ۲) تزریق ژن به درون سلول‌های زایا (سلول‌های جنسی[1]). این دو روش به طور مشخص مفاهیم اخلاقی متفاوتی دارند. بیشتر دانشمندان و محققان، ژن درمانی سلول‌های سوماتیک را یک عمل قابل‌قبول می‌دانند و معتقدند که اثر غیر اخلاقی آن بیشتر از خوردن آسپرین نیست. هر چند در ارتباط با سلول‌های زایا، انتقال ژرم لاین، موجب تغییر مخزن ژنی گونه‌های انسانی می‌شود. که اکثر مردم آن‌را غیر قابل قبول می‌دانند. بنابراین مهندسی ژنتیک سلول‌های ژرم لاین، حوزه‌ای است که فعلاً با این محدودیت‌ها باقی خواهد ماند.

ژن درمانی تبلور وعده بزرگی می‌باشد که هنوز به طور کامل تحقق نیافته است.

برای این‌که روش ژن درمانی مفید واقع شود، چندین پروتکل وجود دارد. اول این‌که، خصوصیات ژن معیوب تعیین و این ژن در یک حامل همسانه‌سازی شده و به شکل مناسب برای استفاده در

---

[1]. Germ line cell

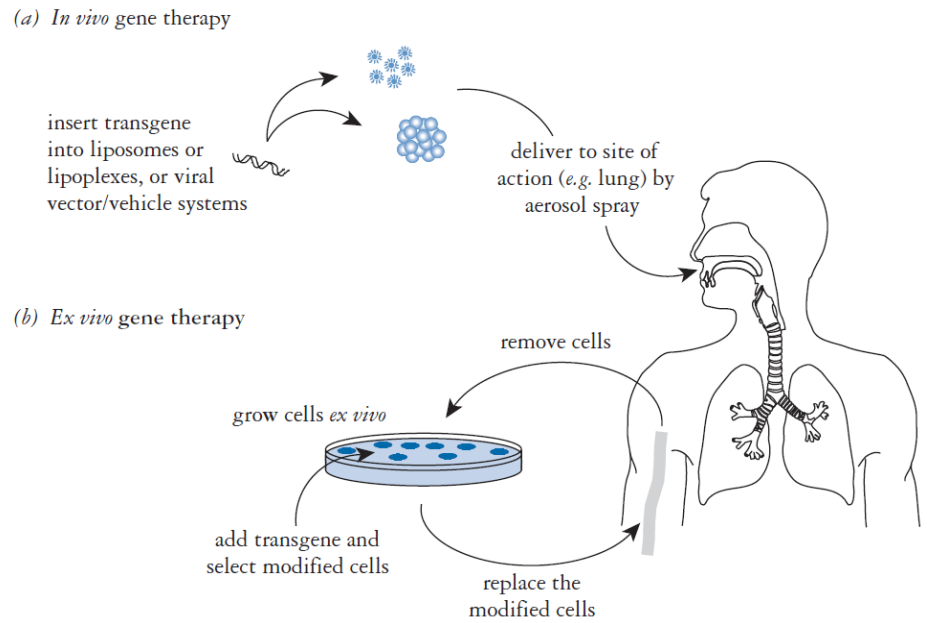
برنامه بالینی تهیه می شود. دوم آن‌که بایستی سیستمی بـرای قـرار دادن ژن در مکـان صـحیح در بدن بیمار وجود داشته باشد. سیستم‌های حامل مورد استفاده در این روش از نظر عملکـرد معـادل حامل‌هایی هستند که در روش استاندارد همسانه‌سازی ژن استفاده می‌شوند که نقش آن‌هـا انتقـال توالی DNA به داخل سلول‌های هدف می‌باشد. این روش همچنین به مکانیسمی نیـاز دارد تـا ژن مورد نظر به‌صورت فیزیکی به مکان هدف منتقـل گـردد. ایـن انتقـال ممکـن اسـت بـا اسـتفاده از روش‌هایی از قبیل استنشاق، تزریق یا سایر روش‌های مشابه صورت گیرد. در نهایت اگر این الزامات رعایت شوند، ژن الحاق شده باید در سلول‌های هدف بیـان شـود. در حقیقـت، ژن معیـوب بایـد بـا نسخه ژن فعال جایگزین شود. این عمل ژن درمانی جایگزینی[1] نام دارد و نیازمنـد نـوترکیبی بـین ژن معیوب و ژن فعال الحاق شده می‌باشد. به دلیل مشکلات تکنیکی برای انجام صحیح این کار در سلول‌های هدف، از روش ژن افزون درمانی[2] بعنوان روش جایگزین استفاده می شـود. در ایـن روش دیگر نیازی به تبادل دو طرفه توالی‌های ژن نیسـت و ژن الحـاق شـده بـه مـوازات ژن معیـوب بـه فعالیت خود ادامه می‌دهد. این روش تنها زمانی مفید خواهد بود که ژن معیوب غالب نباشد، که در این حالت آلل غالب پروتئین معیوب را تولید کرده و ممکن است بر تمـام اثـرات تـرانس ژن غالـب شود. درمان وضعیت‌های غالب می‌تواند با استفاده ازآنتی سنس mRNA صورت گیرد کـه در ایـن روش یک نسخه معکوس از ژن برای تولیدآنتی سـنس mRNA اسـتفاده مـی‌شـود. آنتـی سـنس mRNA می‌تواند به آلل معیوب mRNA متصل شده و به طور مؤثری مانع از ترجمه ژن معیوب شود. استفاده از فناوری آنتی سنس برای خاموشی ژن در فصل ۱۳ به طور دقیـق‌تـر بحـث خواهـد شد.

اگر چه مفهوم جایگزینی ژن یا ژن جایگزین درمانی به نظر زیبا و ساده می‌باشد، اما دستیابی به آن در واقعیت بسیار دشوار است.

پیچیدگی بیشتر در ژن درمانی، خود سیستم سلول یا بافت هـدف اسـت. در برخـی مواقـع ممکـن است سلول‌ها را از بدن بیمار خارج و در بیرون از بدن دست‌ورزی کـرد. سـپس سـلول‌هـای تغییـر یافته را در مکان قبلی جایگزین کرد. این روش، ژن درمانی خارج سلولی[3] نام دارد. این روش بیشتر برای بیماری‌هایی مناسب است که روی سیستم خونی اثر می‌گذارند و برای بیمـاری‌هـای بـافتی از قبیل DMD یا فیبروزسیستیک مناسب نیست، زیرا در این بیماری‌ها، مشکل در بافت‌های پراکنده و گسترده مانند شش‌ها و لوزالمعده یا ماهیچه‌های اسکلتی وجود دارد. تصور این‌که چطور می‌تـوان بیماری‌های مذکور را با ژن درمانی خارج سلولی تیمار نمود مشکل است، بنابراین، برای تیمار کردن

[1] Gene Replacement Therapy
[2] Gene addition therapy
[3] *Ex vivo* gene therapy

این بیماری‌ها باید از روش تیمار در مکان بیماری استفاده شود. روشی که برای درمان این بیماری‌ها استفاده می‌شود ژن درمانی داخلی[1] نامیده می‌شود. ویژگی‌های این دو نوع ژن درمانی درشکل ۱۲-۶ نشان داده شده و استفاده از هر دوی این روش‌ها با موفقیت‌هایی همراه بوده است.



شکل ۱۲-۶) مسیرهای ژن درمانی داخلی و خارجی برای ژن درمانی. روش ژن درمانی داخلی در بخش a) نشان داده شده است. ژن مورد نظر را در روی یک حامل یا لیپوزوم / لیپولکس قرار داده، سپس حامل نوترکیب به بافت هدف فرد بیمار منتقل می‌شود. در این مثال، شش بافت هدف است و می‌توان از یک آئروسول (دستگاه استنشاق) برای انتقال ترانس‌ژن استفاده نمود. از چنین روشی می‌توان برای درمان فیبروزسیستیک استفاده کرد. b) مسیر ژن درمانی خارجی. سلول‌ها (برای مثال سلول خونی یا سلول مغز استخوان) از بدن بیمار خارج و در یک محیط کشت رشد داده می‌شوند. سپس ترانس ژن‌ها در خارج از بدن به درون سلول‌ها منتقل می‌شوند. سلول‌های تغییر یافته را می‌توان انتخاب و قبل از انتقال به بدن بیمار تکثیر کرد (مانند روش همسانه‌سازی معمول ژن در سلول‌های پستانداران).

۱۲-۲-۱) انتقال ترانس ژن‌ها به بیماران

قبل از بررسی دو نمونه از روش‌های ژن درمانی، مرور روش‌های مهم موجود برای انتقال ترانس‌ژن به سلول‌های بیمار، مفید خواهد بود. همچنان که قبلاً دیدیم، برای این کار ۲ جنبه وجود دارند. زیست شناسی این سیستم باید ایجاد و ارزیابی شود و سپس باید به روش‌های فیزیکی برای انتقال

[1] *in vivo*gene therapy

ژن به محل اثر در سلول هدف توجه شود. تصمیم گیری در مورد بهترین روش برای رسیدن به این دو جنبه از یک روش درمان، بخش مهمی از راهبرد درمان می‌باشد.

همان‌گونه که حامل‌ها در همسانه‌سازی استفاده می‌شوند، ویروس‌ها نیز به‌عنوان یک گزینه جالب برای انتقال ژن به درون سلول‌های انسانی محسوب می‌شوند. ما می‌توانیم از اصطلاح حامل برای این گونه ویروس‌ها در همسانه‌سازی استفاده کنیم، چون قطعه‌ای از DNA به‌عنوان ترانس‌ژن در آن الحاق می‌شود. اغلب پیکره ویروس به علت توانایی انتقال ترانس‌ژن ناقل[1] نامیده می‌شود اگرچه برخی محققان، کل سیستم انتقال ژن را خیلی ساده، حامل[2] توصیف می‌کنند. سیستم‌های ویروسی که برای ژن درمانی توسعه یافته‌اند عمدتا بر اساس رتروویروس‌ها، آدنوویروس‌ها و ویروس‌های وابسته به گروه آدنوویروس هستند. مزیت استفاده از سیستم‌های ویروسی این است که این ویروس‌ها روش ویژه و موثری را برای انتقال DNA به درون سلول‌های هدف فراهم می‌کنند. با این وجود باید اطمینان حاصل نمود که پیکره‌های زنده ویروس طی فرایند درمان در سلول‌های میزبان تکثیر نشوند زیرا تکثیر ویروس برای بیمار خطرناک است.

بسیاری از مشکلات مرتبط با ژن درمانی به‌دلیل استفاده از پیکره ویروس به‌عنوان ناقل برای انتقال ژن در روش ژن درمانی بوده است.

علاوه بر سیستم‌های انتقال ژن بر اساس ناقلین ویروسی، می‌توان DNA را به وسیله روش‌های غیر ویروسی به سلول‌های هدف منتقل نمود. DNA فاقد پوشش مستقیماً قابل انتقال است، هر چند این روش کارآیی بالایی ندارد. به‌طور جای‌گزین، می‌توان DNA فاقد پوشش را در یک پوشش لیپیدی به نام لیپوزوم پوشش‌دار کرد. توسعه این روش، ساختارهای پیچیده‌تری به وجود می‌آورد که شبیه پیکره‌های ویروسی است و لیپولکس[3] به آنها اطلاق می‌شود تا از لیپوزوم‌ها قابل تفکیک باشند. برخی ویژگی‌های سیستم‌های انتقال ژن در جدول ۱۲-۳ نشان داده شده‌اند.

زمانی‌که یک سیستم انتقال ژن در دسترس باشد، می‌توان ویروس را به روش‌های مختلف به بیمار انتقال داد. انتقال ژن به درون شش‌ها به وسیله استنشاق روش مناسبی برای درمان با روش ژن درمانی درون سلول زنده برای بیماری فیبروزسیستیک است زیرا شش بافت هدف محسوب می‌شود. تزریق روش دیگری است به ویژه اگر از سیستم ژن درمانی خارج سلول زنده استفاده شده باشد ممکن است این روش مفید واقع شود.

---

1. Vehicle
2. Vector
3. Lipoplexes

جدول ۱۲-۳) سیستم‌های حامل / وکتور برای ژن درمانی

System	Features
Viral-based	
Retroviruses	RNA genome, usually used with cDNA, requires proliferating cells for incorporation of the transgene into the nuclear material. Not specific for one cell type and can activate cellular oncogenes.
Adenoviruses	Double-stranded DNA genome, virus infects respiratory and gastrointestinal tract cells, thus effective in non- or slowly dividing cells. Generally provokes a strong immune response.
Adeno-associated viruses	Replication-defective, thus requires helper virus. Some benefits over adenoviral systems; may show chromosome-specific integration of transgene.
Non-viral	
Liposomes	System based on lipid micelles that encapsulate the DNA. Some problems with size, as micelles are generally small and may restrict the amount of DNA encapsulated. Inefficient compared to viral systems.
Lipoplexes	Benefits over liposomes include increased efficiency due to charged groups present on the constituent lipids. Non-immunogenic, so benefits compared to viral systems.
Naked DNA	Inefficient uptake but may be useful in certain cases.

۱۲-۲-۲) ژن درمانی برای کمبود آدنوزین دی‌آمیناز

اولین تیمار ژن درمانی انسانی در سپتامبر ۱۹۹۰ در یک دختر ۴ ساله به نام آشانتی داسیلوا[1] صورت گرفت که گلبول‌های سفید خونی تغییر یافته ژنتیکی خودش را دریافت کرد. آشانتی از یک نقص مغلوب به نام کمبود آدنوزین دی آمیناز رنج می‌برد که موجب ایجاد بیماری سندرم نقص ایمنی حاد ترکیبی می‌شود. اگرچه این بیماری نادر است، ولی نشان داد کهبرای انجام اولین مراحل ژن درمانی که طی آن نقص ژنی شناخته شده است، سوژه مناسبی است (این ژن به طول ۳۲ جفت کیلوباز از DNA می‌باشد که روی کروموزوم شماره ۲۰ قرار دارد)، و از راهبرد ژن درمانی در خارج سلول زنده می‌توان برای این منظور استفاده کرد.

قبل از ابداع روش ژن درمانی، بیماران با روش درمان جایگزینی آنزیم تیمار می‌شدند. بخش مهم در این روش، آماده کردن آنزیم آدنوزین دی آمیناز به وسیله پلی اتیلن گلیکول می‌باشد تا انتقال آنزیم به طور مداوم انجام شود. این روش هنوز هم به‌عنوان مکملی برای ژن درمانی اهمیت زیادی دارد که پاسخ به آن در میان بیماران مختلف متغیر است.

ژن درمانی برای نقص DNA اولین درمان موفقیت آمیزی بود که می‌توانست وضعیت بیماری را بهبود بخشد.

در اولین تیمارهای آدنوزین دی آمیناز، سلول‌های لنفوسیت بیمار بیرون آورده شد و سپس در معرض ناقلین رتروویروسی نوترکیب قرار گرفت تا ژن آدنوزین دی آمیناز عمل کننده به درون سلول منتقل شود. سپس سلول‌های لنفوسیت حاوی رتروویروس نوترکیب در بیمار جایگزین می‌شوند. پیشرفت‌های بیشتر در این فرآیند زمانی صورت گرفت که سلول‌های مغز استخوان برای تغییر استفاده شدند. سلول‌های بنیادی که لنفوسیت‌های T را تولید می‌کنند در مغز استخوان قرار دارند، بنابراین تغییر این سلول‌های مولد باید تأثیر ترانس‌ژن آدنوزین دی آمیناز، به ویژه طول دوره اثر آن‌را بهبود بخشد. مشکل این است که سلول‌های بنیادی لنفوسیت T تنها در بخش کوچکی از سلول‌های مغز ستخوان وجود دارند و بنابراین انتقال مؤثر ترانس‌ژن مشکل است. خون بند ناف منبع فراوانتری از سلول‌های هدف است و از این روش برای تأثیر ژن درمانی آدنوزین دی آمیناز در نوزادان تازه به دنیا آمده که بیمار بوده‌اند، استفاده شده است.

۱۲-۲-۳) ژن درمانی برای فیبروزسیستیک

بیماری فیبروزسیستیک یک هدف واضح برای ژن درمانی بشمار می رود. زیرا شیوع این بیماری بسیار بیشتر از بیماری کمبود آدنوزین دی آمیناز بوده و یک مشکل عمده برای سلامتی محسوب

---

[1] Ashanti DaSilva

می‌شود. روش دارو درمانی می‌تواند به کاهش برخی از علائم و نشانه‌های بیماری فیبروزسیستیک با استفاده از مکمل آنزیم‌های گوارشی و نیز استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای مقابله با عفونت کمک کند. با این حال، مانند بیماری آدنوزین دی آمیناز، درمان آنزیمی جایگزین یکی از راه‌های مقابله با علائم این بیماری است و روی عامل بیماری تأثیری ندارد. همان طور که در بخش ۱۲-۱-۳ مشخص شده، ژن یا پروتئین معیوب مرتبط با بیماری فیبروزسیستیک کاملاً مشخص و ویژگی آن تعیین شده است. به طوری که بیماری فیبروزسیستیک ناشی از وضعیت مغلوب یک پروتئین ناقص است، اگر بتوان یک نسخه کاربردی از ژن تنظیم کننده هدایت غشایی فیبروزسیستیک را به درون بافت مناسب (عمدتاً ریه) منتقل کرد، در نتیجه پروتئین عادی ژن تنظیم کننده هدایت غشایی فیبروزسیستیک توسط سلول‌ها ساخته شده و بنابراین مکانیسم نقل و انتقال نمک به حالت طبیعی باز خواهد گشت. مشاهده‌های اولیه‌ای که امکان استفاده از این روش را ارائه کردند، از آزمایشی به دست آمدند که نشان داد، ژن تنظیم کننده هدایت غشایی فیبروزسیستیک طبیعی می‌تواند در سلول‌ها بیان شود تا این که عملکرد طبیعی ژن تنظیم کننده هدایت غشایی فیبروزسیستیک معیوب را باز گرداند. در نتیجه امکان جدی استفاده از این روش در بیماران فراهم گردید. پیشرفت یک درمان مناسب برای بیماری‌هایی از قبیل فیبروزسیستیک معمولاً شامل توسعه یک مدل حیوانی برای این بیماری می‌باشد، به طوری که می‌توان پژوهش را به تقلید از درمان در یک سیستم مدل و قبل از این که به آزمایشات بالینی برسد انجام داد. در بیماری فیبروزسیستیک، این روش درمان با استفاده از موش‌های تراریخته که فاقد عملکردژن تنظیم کننده هدایت غشایی فیبروز سیستیک بودند، ایجاد شده است. استفاده از سیستم‌های حامل یا ناقل بر اساس آدنوویروس موثر بوده است. بنابراین، به نظر می‌رسید که این سیستم درمان مؤثر باشد و درمان بیماری‌های انسان می‌توانست آغاز شود. برای ایجاد یک چشم انداز بالینی انسانی، علاوه بر شناخت ژن و سیستم انتقال آن، نکات متعددی باید در نظر گرفته شوند. به عنوان مثال، چگونه می‌توان اثربخشی این روش را اندازه‌گیری کرد؟ از آنجایی که درمان فیبروزسیستیک به سلول‌های بافت ریه مرتبط است، دسترسی به این سلول‌ها برای بررسی بیان طبیعی ترانس‌ژن تنظیم کننده هدایت غشایی فیبروز سیستیک دشوار است. استفاده از بافت بینی در این خصوص می‌تواند تا حدی مناسب باشد، اما به طور کامل قابل اعتماد نیست. همچنین چه مقدار از انتقال یا بیان ترانس‌ژن به منظور تولید یک اثر بالینی موثر می‌باشد؟ آیا تمام سلول‌های تحت‌تأثیر قرار گرفته ریه، درمان می‌شوند و یا درصد خاصی از آن‌ها قادر به ترمیم سطوح طبیعی انتقال یون نمک می‌باشند؟

جدول ۱۲-۴) ناقلین و روش‌های انتقال ژن مورد استفاده در ژن درمانی از سال ۱۹۸۹.

Vector/delivery method	Number of trials	% of total
Adenovirus	318	25.2
Retrovirus	290	23
Naked/plasmid DNA	229	18.2
Lipofection	99	7.9
Vaccinia virus	63	5
Poxvirus	60	4.8
Adeno-associated virus	46	3.7
Herpes simplex virus	43	3.4
Poxvirus + vaccinia virus	25	2
RNA transfer	16	1.3
Lentivirus	8	0.6
Other vectors/methods	43	3.4
Unknown	36	2.9
Total	**1260**	

توجه: داده‌ها تعداد آزمایشات ژن درمانی را با استفاده ازانواع مختلف ناقلین یا روش‌های انتقال ژن نشان می‌دهد. از سال ۱۹۸۹ تا ۲۰۰۷ در مجموع ۱۲۶۰ مورد ثبت شده است. منبع: اطلاعات با کسب اجازه از مقاله ژن درمانی بالینی در سراسر جهان موجود در مجله (*The Journal of Gene Medicine*, copyright John Wiley & Sons. Ltd (2004, 2007)) انتخاب شده است.

باوجود مشکلات موجود در ارتباط با ابداع، کاربرد و نظارت بر ژن درمانی بیماری فیبروزسیستیک، بیش از ۱۲۰۰ آزمایش بالینی از سال ۱۹۸۹ تا ۲۰۰۷ انجام شده است (مراجعه به جدول ۱۲-۴) که برخی از آن‌ها با موفقیت همراه بوده است. هر دو سیستم انتقال ژن مبتنی بر ویروس و لیپوزوم یا لیپولکس استفاده شده‌اند، هر چند کاربرد ژن درمانی بیماری فیبروزسیستیک با استفاده از یک روش قوی، مؤثر و به طور گسترده در دسترس هنوز هم وجود ندارد. به هر حال پیشرفت تدریجی صورت گرفته است و بسیاری از دانشمندان بر این باورند که درمان مؤثر برای بیماری فیبروزسیستیک در حال دستیابی است.

با وجود پیشرفت‌های مداوم در ژن درمانی پزشکی، برای دسترسی به یک روش قابل اعتماد وآزمایش شده برای انواع مختلف بیماری‌ها، هنوز راه درازی باقی مانده است.

۱۲-۲-۴) وضعیت آینده ژن درمانی

همان‌طور که پیشتر گفته شد، هنوز پتانسیل کامل ژن درمانی در کاربردهای بالینی ارایه نشده است. این واقعیت ناامید کننده است، توقع این است که با تسریع پیشرفت در ژنتیک مدرن، موفقیت فوری در این زمینه حاصل شود. متأسفانه روش‌هایی شبیه به ژن درمانی چالش‌های بسیار پیچیده‌ای بوجود می آورند و در نتیجه خیلی نباید تعجب کنیم که پیشرفت به حد مورد انتظار سریع است. در حال حاضر ژن درمانی هنوز یک برنامه آزمایشگاهی بوده و از آنجائی‌که این فناوری به طور کامل توسعه نیافته ممکن است در برخی موارد مشکلاتی داشته باشد. در دوره ۱۰ ساله از سال ۱۹۹۰، چند هزار بیمار توسط ژن درمانی عمدتاً بدون موفقیت طولانی مدت تحت درمان قرار گرفتند.

عدم موفقیت از دیدگاه بیمار تحت معالجه بسیارناامید کننده (و اغلب مخرب) است، اما ناراحت کننده‌تر مواردی است که موجب مرگ و میر بیماران می‌شود. بسیاری ازمشکلات در ارتباط با استفاده از ناقلین ویروسی است. در سال ۱۹۹۹یک مرد جوان به نام جسی جلسینگر[1] برای درمان بیماری کمبود اورنیتین ترانس‌کاربامیلاز[2] تحت ژن درمانی قرار گرفت. متأسفانه او نسبت به ناقل واکنش‌های منفی نشان داد و چند روز پس از درمان درگذشت. شکست دیگر توسعه یک بیماری شبه سرطان خون در بیماران مورد بررسی در فرانسه بود که در ابتدا به درمان سندرم نقص ایمنی حاد ترکیبی مرتبط با کروموزوم X[3] نتیجه مثبت نشان داده بودند. بعد از هرشکست بزرگی مانند درمان این بیماری، اغلب سال‌ها طول می‌کشد تااعتماد عمومی ترمیم شود.

هر روش جدید درمانی با مشکلاتی مواجه خواهد شد. در کاربردهای پزشکی، عواقب ناشی از درمان، اغلب ناراحت کننده است به طوری که می‌تواند از موانع جدی برای به کارگیری روش درمانی تلقی شود.

علاوه بر وجود چالش‌های آشکار علمی و پزشکی، نگرانی‌های اخلاقی زیادی در زمینه ژن درمانی وجود دارند. همان‌طور که قبلاً ذکر شد، تفاوت مشخصی بین درمان با سلول‌های سوماتیکی و درمان با سلول‌های بنیادی وجود دارد که توسط اکثر دانشمندان پذیرفته شده است. با این حال، همان طور که ما از نظر اخلاق اجتماعی پیش می رویم، ممکن است این تمایز بین روش‌ها کاهش

---

[1]. Jesse Gelsinger
[2] Ornithine transcarbamylase
[3]. X-linked severecombined immunodeficiency syndrome

یافته و حتی ممکن است مورد سوال قرار گیرد. مشکل اخلاقی دیگر زمانی ایجاد می‌شود که به جای درمان بیماری، ما ژن درمانی را به مفهوم افزایش شناخت ویژگی‌های بیماری مورد توجه قرار دهیم. استفاده بالقوه از ژن درمانی افزایشی، که به موجب آن صفات مشخصی در یک فرد می‌تواند افزایش یابد، سبب افزایش مسائل بسیار دشوار اخلاقی شده است.

ارتقاء یک ویژگی فردی با استفاده از ژن درمانی، سئوالات دشوار اخلاقی را افزایش می‌دهد.

۱۲-۳) RNA مداخله گر - کشف اخیر با پتانسیل زیاد

همان طور که در فصل ۷ دیدیم، زمانی‌که واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد توجه قرار گرفت، از دوره‌ای به دوره دیگر همواره با ظهور یک کشف جدید، امکان ایجاد تغییر در سیستم علمی این پدیده فراهم شد. کشف RNA مداخله‌گر یک نمونه اخیر از این کشفیات است، که در سال ۲۰۰۶ به دلیل این کشف به آقایان اندرو فایر و کری گملو[1]جایزه نوبل در فیزیولوژی یا پزشکی اهدا شد. RNA مداخله‌گر موضوع جالب و پیچیده‌ای است که قادر نخواهیم بود در این کتاب به خوبی به آن بپردازیم. با این حال به طور بالقوه RNA مداخله‌گر کاربردهای بسیار مهمی در هر دو شاخه علوم پایه و درمان دارد، لذا حداقل معرفی مبنای RNA مداخله‌گر و موارد کاربرد آن مهم است.

بسیاری از دانشمندان معتقدند کهRNA مداخله‌گر می‌تواند به عنوان یک ابزار درمانی عمده در مبارزه با طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها استفاده شود.

۱۲-۳-۱) RNA مداخله‌گر چیست؟

هر چند در نخستین پژوهش‌هایی که با ژن‌های رنگ، در گل اطلسی صورت گرفته بود، این پرسش مطرح شد که چگونه اضافه شدن یک ژن می‌تواند به کاهش تظاهر بیان یک ژن دیگر منجر شود، RNA مداخله‌گر درنهایت در سال ۱۹۹۸ در نماتد *Caenorhabditis elegans* شناسایی شد. تصور می‌شد که RNA مداخله‌گر به‌عنوان یک مکانیزم دفاعی در برابر ویروس‌ها و ترانسپوزون‌ها باشد، به طوری که این سیستم در حضور مولکول‌های دو رشته‌ای RNA فعال می‌شود. واژه تداخل[2]، برخی نکات کلیدی در مورد عملکرد سیستم RNA مداخله‌گر را مطرح می‌کند. این اصطلاح به کاهش تنظیم (یا سرکوب) بیان ژن یا خاموشی ژن اشاره دارد که با استفاده از مولکول‌های RNA کوتاه تنظیم می‌شود. در واقع این مولکول‌ها قادرند که بیان mRNA را به‌صورت خاصی تنظیم کنند. در گیاهان این فرایند، خاموشی ژن پس از رونویسی[3] نامیده می‌شود.

---

[1]. Andrew Fire and Craig Mello
[2] Interference
[3]. Post-transcriptional gene silencing, PTGS

کنترل خاموشی ژن توسط RNA مداخله‌گر پیچیده است، اما در واقع این سیستم بر مبنای تسهیل تخریب mRNA است که بر اساس شناسایی یک توالی اختصاصی عمل می‌کند. دیگر مکانیسم‌ها ممکن است با اتصال RNA آنتی‌سنس از ترجمه پروتئین جلوگیری کرده و یا ممکن است با متیلاسیون بازها در توالی پروموتر ژن هدف، از رونویسی ژن ممانعت کنند.

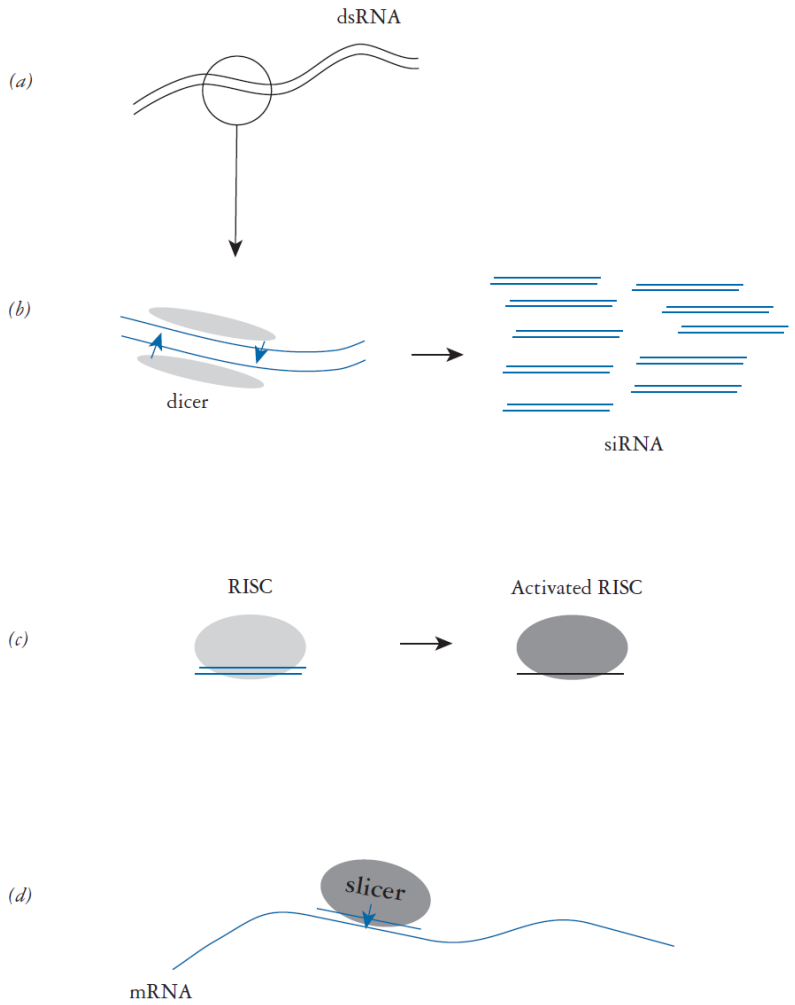
RNA مداخله‌گر موجب کاهش یا خاموشی بیان ژن بعد از رونویسی mRNA می‌شود. از این رو گاهی اوقات خاموشی ژن بعد از رونویسی نامیده می‌شود.

مکانیسم تخریب mRNA شامل عملکرد دو آنزیم به نام دایسر[۱] و اسلایسر[۲] می‌باشد. در سلول، RNA دو رشته‌ای توسط آنزیم دایسر شناسایی می‌شود که طی فرآیندی RNA دو رشته‌ای به قطعاتی به طول حدود ۲۱ نوکلئوتید شکسته می‌شود. این قطعات کوتاه، RNA کوچک مداخله‌گر[۳] نامیده می‌شوند. این RNA کوچک مداخله‌گر به همراه یک مجموعه پروتئینی، بنام کمپلکس RNA القاء کننده خاموشی ژن[۴] نامیده می‌شود و حاوی یک نوکلئاز بنام اسلایسر می‌باشد. مجموعه RISC زمانی فعال می‌شود که قطعه RNA دو رشته‌ای به حالت تک رشته تبدیل شده باشد. مجموعه RISC دارای توالی قطعه RNA آنتی‌سنس می‌باشد که به توالی مکمل خود در مولکول RNA پیک متصل می‌شود. سپس آنزیم اسلایسر، RNA پیک را برش داده و قطعات برش داده شده توسط نوکلئازهای سلولی تخریب می‌شود. بنابراین، بیان ژن به طور مؤثر با حذف رونوشت‌های RNA پیک متوقف و خنثی می‌شود. طرح کلی مکانیسم RNA مداخله‌گر در شکل ۱۲-۷ نشان داده شده است.

آنزیم‌های دخیل در تولید RNA های کوچک مداخله‌گر، دایسر و اسلایسر می‌باشند که نقش آن‌ها برش و قطعه قطعه کردن مولکول‌های RNA است.

---

1. Dicer
2. Slicer
3. Short interfering RNAs, siRNAs
4. RNA induced silencing complex, RISC



شکل ۱۲-۷) RNA مداخله‌گر. همان گونه که در قسمت a نشان داده شده است، این سیستم توسط RNA دو رشته‌ای تحریک می‌شود. آنزیم دایسر، مولکول‌های RNA را به قطعاتی به طول حدود ۲۱ جفت باز برش می‌دهد، همانطور که در شکل b نشان داده شده است. این عمل موجب ایجاد RNA کوتاه مداخله‌گر (siRNA) می‌شود که به مجموعه پروتئینی RISC متصل شده و موجب فعال شدن آن می‌گردد (شکل c) . این مجموعه به توالی مکمل RNA کوتاه مداخله‌گر درمولکول RNA پیک متصل می‌شود و آنزیم اسلایسر مولکول mRNA را برش می‌دهد (شکل d).

گاهی سنتز RNAهای کوتاه از ژن‌های کنترل کننده، بر تولید RNA مداخله‌گر مؤثر هستند. این RNA های کوتاه، میکرو RNA نام دارند که مورد هدف آنزیم دایسر قرار می‌گیرند و به منظور ایجاد واکنش و خاموشی ژن هدف با تخریب یا جلوگیری از ترجمه نسخه mRNA عمل می‌کنند.

۱۲-۳-۲) استفاده از RNA مداخله‌گر به عنوان ابزاری برای مطالعه بیان ژن

همان طور که در فصل ۱۰ شرح داده شد، بسیاری از روش‌های مطالعه بیان ژن،به کار فشرده و اطلاعاتی در مورد ژن و عملکرد آن نیاز دارد. با دسترسی به فناوری تعیین توالی DNA در مقیاس وسیع، تولید اطلاعات توالی ژنوم به واقعیت تبدیل شد. در حالی که اطلاعات مربوط به این توالی‌ها فراهم شده است، در بسیاری از موارد درباره نقش توالی یک ژن خاص (یک ژن بالقوه) اطلاعات کمی به ما می‌دهد.

توالی‌یابی ژنوم اطلاعات لازم برای بررسی بیان ژن با استفاده از روش RNA مداخله‌گر را فراهم می‌کند.

کشف RNA مداخله‌گر ابزاری را در اختیار دانشمندان ژنوم قرار داده است که سال‌ها بدنبال آن بوده‌اند- توانایی خاموش کردن هر ژنی که توالی DNA آن مشخص باشد. با ایجاد RNAهای دو رشته‌ای که مجموعه‌های آنتی‌سنس RISCs را برای هر ژن تولید می‌کند، می‌توان تأثیر خاموش کردن بیان ژن مورد نظر را مورد بررسی قرار داد. این فناوری محققان را قادر خواهد ساخت تا به بررسی بیان ژن در سطح ژنوم با روشی که قبلاً غیر ممکن بود بپردازند و بسیاری از محققین در حال حاضر به طور سیستماتیک در حال غیر فعال کردن همه ژن‌های مضر یک موجود خاص تحت مطالعه خود هستند. همکاری‌های بین‌المللی در ارائه توالی‌های کلون شده که تولید RNA دو رشته‌ای می‌کنند بدان معنی است که به نظر می‌رسد آینده RNA مداخله‌گر در بررسی بیان ژن برای سال‌ها قابل اطمینان باشد و اطلاعات مفیدی را در مورد نحوه کار سلول فراهم کند.

۱۲-۳-۳) RNA مداخله‌گر به عنوان یک درمان بالقوه

یکی از هیجان انگیزترین چشم‌اندازه‌ها برای RNA مداخله‌گر، کاربردهای درمانی آن است. بعضی از دانشمندان با توجه به مشکلات مطرح شده پیرامون ژن درمانی در خصوص انتظارات خیلی زود هنگام کاربرد این روش کمی محتاط هستند (همان‌طور که قبلاً در بخش ۱۲-۲ مشخص شده، ژن درمانی هنوز کاملاً تائید نشده و درمان قطعی ندارد). با این حال، بسیاری از دیگر دانشمندان متقاعد شده‌اند که فناوری RNA مداخله‌گر می‌تواند تقریباً درمان‌هایی را برای بیماری‌هایی که در اثر بیان ژن یا ژن‌ها ایجاد شده‌اند، ارائه دهد. اگر ژن قابل شناسایی باشد و توالی اختصاصی RNA

دو رشته‌ای آن به درون سلول‌های هدف منتقل شود، در نتیجه سیستم RNA مداخله‌گر فعال شده و موجب از کار افتادن ژن مورد نظر شود.

همچنانکه در خصوص ژن درمانی ملاحظه شد، مراحل متعددی وجود دارند که در صورت درمان با تیمار داروئی از اهمیت زیادی برخوردار هستند. مرحله اول تهیه اسیدنوکلئیک است که باید به سلول‌های هدف منتقل شود. در ژن درمانی، اسید نوکلئیک مورد استفاده معمولاً یک ژن عملکردی است که شاید مشکل‌ساز باشد زیرا ژن‌ها اغلب بزرگ و پیچیده هستند. در سیستم RNA مداخله‌گر، RNA دو رشته‌ای بسیار کوتاه‌تر بوده و احتمالاً مشکلات کمتری خواهد داشت. مرحله بعد انتقال اسیدنوکلئیک به سلول‌های هدف می‌باشد که دارای مشکلاتی مشابه با روش ژن درمانی است. در برخی موارد برای بافت‌های قابل دسترس، تزریق مستقیم RNA های دو رشته‌ای قابل انجام است، در حالی که برای بافت داخلی مشکلات بسیار پیچیده‌تر هستند.

باوجود برخی مشکلات فنی، ملاحظه شده در هر فناوری در حال توسعه، در صورتی‌که بتوان اسیدنوکلئیک را به سلول‌های هدف منتقل کرد و بر فعالیت‌های سلولی مسلط شد، RNA مداخله‌گر روش بسیار ساده‌ای خواهد بود.

با فرض این‌که انتقال RNA دو رشته‌ای قابل دستیابی باشد، گام نهایی تأثیر عمل درمان است. در این روش RNA مداخله‌گر پتانسیل بالایی دارد و وقتی که RNA دو رشته‌ای وارد سلول می‌شود این سیستم عمل کرده و اثر خودش را می‌گذارد. بنابراین، نیازی به نوترکیبی یا بیان توالی یک ژن نیست، در حالی که در مورد ژن درمانی به نوترکیبی یا بیان ژن نیاز می‌باشد. نقطه ضعف عمده این روش این است که اثرات RNA مداخله‌گر در پاسخ به انتقال RNA دو رشته‌ای زودگذر می‌باشد. در نتیجه، اگر هدف دستیابی به نتیجه مثبت در بلند مدت باشد به احتمال زیاد انتقال مداوم روش درمان لازم است.

بیماری کاهش بینایی وابسته به سن، هدف اولیه برای توسعه درمان با روش RNA مداخله‌گر بود. در این بیماری، افزایش بیش از حد رشد عروق خونی در چشم، منجر به کاهش عملکرد بینایی بخش حساس شبکیه می‌شود. این بیماری به علت تولید بیش از حد پروتئینی به نام فاکتور رشد اندوتلیال عروقی ایجاد می‌شود که موجب تحریک رشد و تکامل عروق خونی می‌گردد.

بنابراین همه عناصر مورد نیاز برای استفاده از RNA مداخله‌گر (یک پروتئین هدف مشخص که به درمان با RNA مداخله‌گر پاسخ می‌دهد، یک ناحیه محدود بافتی و یک روش انتقال ساده مانند تزریق مستقیم) در درمان بیماری چشمی آب سیاه وابسته به سن وجود دارند. فاز شماره یک مطالعات بالینی در سال ۲۰۰۴ توسط شرکت داروسازی آکوئیتی آمریکا آغاز شد، که برای اولین بار RNA مداخله‌گر به عنوان یک روش بالقوه درمان به بیماران منتقل شد. ارائه نتایج فاز شماره ۲

در سال ۲۰۰۶ به نظر امیدوار کننده بود و توسعه این روش تا دستیابی به امکان درمان با RNA مداخله‌گر همچنان ادامه دارد.

باوجود مشکلات مرتبط با RNA مداخله‌گر به‌عنوان یک روش درمان، بسیاری از محققین در این زمینه معتقدند که RNA مداخله‌گر شاید بهترین روش برای کاهش بیان ژن توسط یک مکانیسم خاص و هدف‌دار باشد. علاوه بر بیماری تخریب بخش حساس شبکیه چشم، بیماری‌هایی مانند رتینوپاتی دیابتی، فیبروز سیستیک، ویروس نقص ایمنی انسان، هپاتیت C، عفونت‌های تنفسی، بیماری هانتینگتون و بسیاری از بیماری‌های دیگر اهداف بالقوه درمان با روش RNA مداخله‌گر هستند. البته مشکلات زیادی وجود دارند که باید بر طرف شوند و شاید ابداع درمان‌های مؤثر برای صفات چند ژنی دشوار باشند، اما خوش‌بینی بسیار بالایی برای توسعه RNA مداخله‌گر به عنوان مهم‌ترین روش درمان مبتنی بر ژن در سال‌های پیش رو وجود دارد.

۱۲-۴) پروفایل DNA

باتوجه به اندازه ژنوم انسان و دانش ما از ساختار ژنوم، تعیین اینکه ژنوم هر شخص منحصر به فرد است کاری نسبتاً آسان است، تنها استثناء، وجود دوقلوهای مونوزیگوت (دوقلوهای به دست آمده از یک تخمک بارور) می‌باشد. در صورتی که تکنیک‌های مناسب برای ایجاد نتایج قابل اعتماد در دسترس باشند، می‌توان از ژنوم بعنوان یک شناسه منحصر به فرد در این خصوص استفاده کرد. روش اصلی در این زمینه انگشت نگاری DNA نامیده می‌شود، اما با بهبود فناوری، طیف آزمایش‌های قابل استفاده افزایش یافته و امروز استفاده از واژه عمومی‌تر پروفایل DNA ترجیح داده می‌شود. این روش کاربردهای زیادی در موارد جنایی و در اختلاف بر سر خویشاوندی افراد (اختلاف نظر روی اصل و نسب افراد و مهاجرت شایع‌ترین این موارد هستند) دارد. اساس تمام این روش‌ها این است که یک نمونه از DNA فرد مشکوک (اصل و نسب یک فرد) را می‌توان با نمونه مرجع (فرد قربانی جرم و جنایت و یا وابستگی در موارد غیر جنایی) مقایسه کرد. در تحقیقات جنایی، این روش می‌تواند با مقدار اندکی از DNA موجود در نمونه‌های پزشکی قانونی انجام شود. روش‌های جدید از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر و شناسایی نمونه‌های کمی از DNA موجود در لکه‌های خون، مایعات بدن، تکه‌های پوست یا ریشه مو استفاده می‌کند.

روش‌های پروفایل DNA، این واقعیت که هر ژنومی منحصر به فرد است را اثبات کرد (به استثنای ژنوم دوقلوهای مونوزیگوت همسان).

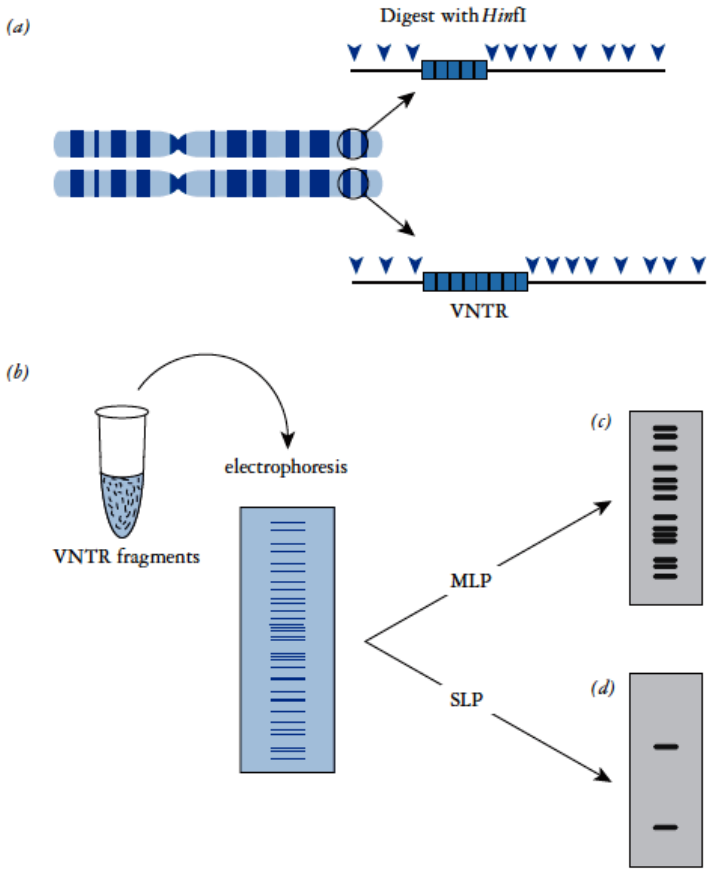
۱۲-۴-۱) تاریخچه انگشت نگاری ژنتیکی

روش انگشت‌نگاری اولیه از DNA در سال ۱۹۸۵ توسط الک جفریز[1] ابداع شد، او متوجه شد که کارهایی که روی توالی‌های درون ژن میوگلوبین انجام می‌دهد، می‌تواند اهمیت گسترده‌تری داشته باشند. این روش بر این واقعیت استوار است که مناطق بسیار متغیری در ژنوم وجود دارند که خاص هر فرد می‌باشند. این مناطق مینی ساتلایت[1] نام دارند که حاوی تعداد متغیری از توالی‌های تکراری کوتاه به نام VNTRs[2] می‌باشند (شکل ۱۰-۱۰ فصل ۱۰ را ببینید). در داخل توالی‌های VNTR، موتیف‌های توالی مرکزی وجود دارند که می‌توانند در چند مکان VNTR پلی‌مورفیک دیگر شناسایی شوند و همچنین حاوی توالی‌هایی باشند که منحصراً به VNTR خاصی تعلق دارند. ترتیب توالی‌های VNTR و انتخاب یک توالی کاوشگر مناسب، عناصر کلیدی هستند که قادر می‌سازند تا یک اثر انگشت ژنتیکی منحصر به فرد تولید شود.

اولین اقدام، جداسازی DNA، برش آنزیمی و آماده‌سازی قطعات برای الکتروفورز می‌باشد. همان طور که در شکل ۱۰-۱۰ نشان داده شده است، اگر استفاده از یک آنزیم برشی موجب برش توالی مرکزی DNA نشود، اما باعث برش فراوان نواحی اطراف آن شود، ناحیه VNTR به طور مؤثر جداسازی شده است. برای DNA انسان اغلب از آنزیم *Hin*fI استفاده می‌شود. با استفاده از یک کاوشگر که به توالی ناحیه مرکزی موتیف متصل شود و با انجام هیبریداسیون در غلظت پائین نمک، محل اتصال پلی مورف کاوشگر قابل ردیابی و شناسایی است. از آنجائی که این کاوشگر به مکان‌های متعددی متصل می‌شود به آن کاوشگر چند مکانی[3] می‌گویند. این کار باعث ایجاد الگویی از باندهای منحصر به فرد یا اثر انگشت ژنتیکی می‌شود. اگر کاوشگر مورد استفاده مخصوص توالی خاصی از VNTR باشد (کاوشگرهای تک مکانی)، یک اثر انگشت اختصاصی‌تر تولید می‌شود، مانند این مورد که دو آلل از توالی در هر فرد وجود دارد که یکی از آلل‌ها از مادر و دیگری از پدر مشتق می‌شوند. نمای کلی مبنای این روش در شکل ۱۲-۸ نشان داده شده است.

---

[1] Alec Jeffreys
[2] Minisatellite
[3]. Variable number tandem repeats
[4] .Multi-locus probe



شکل ۱۲-۸) انگشت نگاری ژنتیکی توالی‌های مینی ساتلایت DNA. a) یک جفت کروموزوم با یک جایگاه مینی ساتلایت مشخص شده است (VNTR). در این مورد مکان مینی ساتلایت از نظر طول VNTR به صورت هتروزیگوت است. برش DNA با آنزیم برشی *Hinf*I به طور مؤثری موجب جداسازی VNTR شده است. b) قطعات VNTR (با جایگاه‌های متعدد) ایجاد و توسط الکتروفورز جدا و به کاغذ نیتروسلولز منتقل شدند. استفاده از یک کاوشگر چند مکانی الگوی بارکد نشان داده شده در بخش c را تولید می‌کند. اگر از یک کاوشگر تک مکانی استفاده شود، همان گونه که در قسمت d نشان داده شده است، تنها دو آلل خاص VNTRشناسایی می‌شوند.

در حال حاضر روش اصلی ایجاد پروفایل DNA (گاهی اوقات انگشت نگاری DNA نامیده می‌شود) نتایج را به صورت بارکد تولید می‌کند.

در حال حاضر در تجزیه و تحلیل پزشکی قانونی، روش اصلی پروفایلینگ DNA تا حد زیادی با روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز که بخش‌هایی ازDNA بنام توالی‌های تکراری کوتاه

پشت سر هم[1] (STRs، به عنوان میکروساتلایت نیز شناخته می‌شود) را تکثیر می‌کند، جایگزین شده است. این توالی‌های تکراری دارای ۲، ۳، ۴، و ۵ جفت بازمی‌باشند. یک مزیت عمده این روش نسبت به تکرارهای مینی‌ستلایت این است که توالی‌های تکراری کوتاه و پشت سر هم (میکروستلایت‌ها) در سرتاسر ژنوم وجود دارند، بنابراین، نسبت به مینی ستلایت‌ها پوشش بهتری را در ژنوم ایجاد می‌کنند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز هر گونه مشکلی در ارتباط با مقادیر بسیار کم نمونه که اغلب در صحنه جرم یافت می‌شود را بر طرف کرده است. این روش به منظور تکثیر مکان خاصی از ژنوم به کار می‌رود، اگر مکان‌ها با دقت انتخاب شوند معمولاً ۳ یا ۴ مکان برای بهینه سازی اطلاعات تولید شده کافی است. با استفاده از مواد فلورسنت و تجهیزات اتوماتیک تشخیص DNA (شبیه تجهیزات تعیین توالی ژنوم که در شکل ۱۰-۸ نشان داده شده است) پروفایل DNA را می‌توان سریع و با دقت تولید کرد.

۱۲-۴-۲) پروفایل DNA و قانون

در حال حاضر استفاده از پروفایل DNA به‌عنوان یک روش مهم برای تولید شواهد قانونی پذیرفته شده است. علاوه بر مسائل علمی، که ممکن است شامل کاوشگرهای چند مکانی یا تک مکانی، یا (معمول‌تر) تکثیر STR باشد، عوامل متعددی وجود دارند که در صورت وجود مدارک باید در نظر گرفته شوند. این روش‌ها باید قابل اطمینان و در دسترس کادر فنی آموزش دیده قرار داشته باشد، این افراد باید از مشکلات بالقوه استفاده از پروفایل DNA آگاه باشند. برای اطمینان از این که نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل پروفایل DNA به عنوان مدرک در موارد قانونی قابل قبول باشد، اقدامات کنترل کیفیت دقیق باید در جای خود انجام شود. این اقدامات شامل ثبت دقیق نمونه‌ها وقتی که به آزمایشگاه منتقل می‌شوند و بررسی دقیق توالی فرایندهای آزمایشی جهت اطمینان از این که آزمایشات به درستی انجام گرفته و نمونه‌ها با هم مخلوط نشده‌اند، می‌باشند. اگر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به عنوان بخشی از روش تشخیص مورد استفاده قرار می‌گیرد، دقت زیادی باید صورت گیرد تا اطمینان حاصل شود که هیچ اثری از آلودگی در DNA وجود نداشته باشد. اغلب یک لکه از عرق اپراتور می‌تواند برای خراب کردن نتیجه یک آزمایش کافی باشد، بنابراین روش‌های عملیاتی دقیق باید رعایت شوند، آزمایشگاه باید به طور مداوم بازرسی شده و اجازه انجام آزمایش صادر شود. اگر هدف حفظ اعتماد عمومی به کارایی این روش است باید نکات فوق رعایت شوند.

برای این‌که در یک مفهوم قانونی، پروفایل DNA مفید باشد، باید این پروفایل در یک چارچوب توافق شده، مدیریت و تنظیم شود به طوری که مردم بتوانند به آن اعتماد کنند.

---

[1]. Short tandem repeats

علاوه بر جزئیات پروتکل‌های آزمایشگاهی و مدیریت عملیاتی آزمایشگاه‌های پزشکی قانونی، بخش مهمی از حصول اطمینان از پذیرش شواهد DNA، چارچوب علمی و قانونی روش انجام شده است. نتیجه استفاده از روش‌های مبتنی بر توالی‌های تکراری کوتاه پشت سر هم منجر به تنظیم پروتکل‌های استاندارد پذیرفته شده و جایگاه ژن یا توالی‌های هدف شده است. در اروپا این پروتکل تحت نظارت شبکه اروپایی مؤسسات علوم پزشکی قانونی[1] و در ایالات متحده آمریکا توسط سیستم ایندکس DNA پلیس FBI[2] اداره می‌شود.

یکی از ملاحظات مهم در موارد قانونی احتمال مطابقت پروفایل‌های DNA تولید شده بین دو نفر مختلف به صورت تصادفی است. بدیهی است در مواردی که تصمیم گیری‌های قانونی بر اساس شواهد و مدارک اثر انگشت DNA اتخاذ می‌شود، موضوع مسلما بسیار مهم و چالش انگیز بوده و شاید منجر به صدور حکم زندان شود. اگرچه هیچ اختلاف نظری در مورد این واقعیت که همه ما دارای ژنوم منحصر به فرد هستیم وجود ندارد و البته پروفایل DNA تنها می‌تواند بخش کوچکی از ژنوم را بررسی کند. در نتیجه، احتمال وقوع یک مطابقت مشابه، باید بررسی شود. هر چه تعداد باندها در پروفایل DNA بیشتر باشد، احتمال یک تطبیق بی ربط کمتر خواهد بود. شانس عدم وقوع تطبیق مشابه، برای تعداد مختلف باند در یک پروفایل DNA در جدول ۱۲-۵ نشان داده شده است. به طور کلی پذیرفته شده که اگر یک مؤسسه پروفایل DNA تأیید شود که در شرایط توافق شده ، مطابق با پروتکل‌های استاندارد فعالیت می‌کند، نتایج آن معتبر و قابل اعتماد است. همچنانکه قانون در مورد کاربردهای پزشکی قانونی تجزیه و تحلیل DNA بهبود یافته، پذیرش عمومی نیز افزایش یافته است و در حال حاضر روش‌های تشخیص و ردیابی به نظر قدرتمندتر شده‌اند. علاوه بر مواجهه با موارد جدید، مدرک DNA برای موارد قدیمی نیز استفاده می‌شوند و در بسیاری از این موارد محکومیت‌های قبلی تأیید یا لغو می‌شوند.

---

1. European Network of ForensicScience Institutes
2. American FBI’s Combined DNA Index System

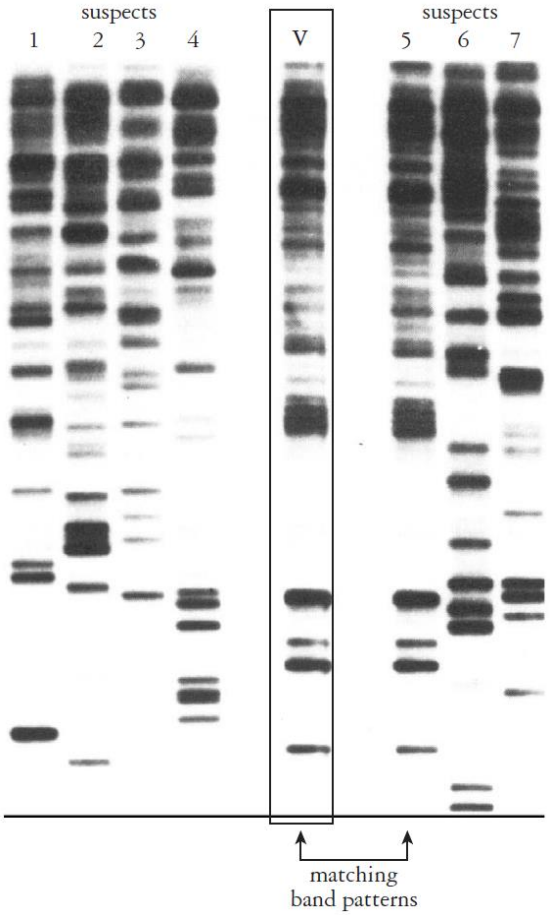
جدول ۱۲-۵) شانس عدم وقوع تطبیق مشابه در یک انگشت نگاری DNA

Number of bands in fingerprint	Odds against a chance match
4	250: 1
6	4 000: 1
8	65 000: 1
10	1 million: 1
12	17 million: 1
14	268 million: 1
16	4 300 million: 1
18	68 000 million: 1
20	1 million million: 1

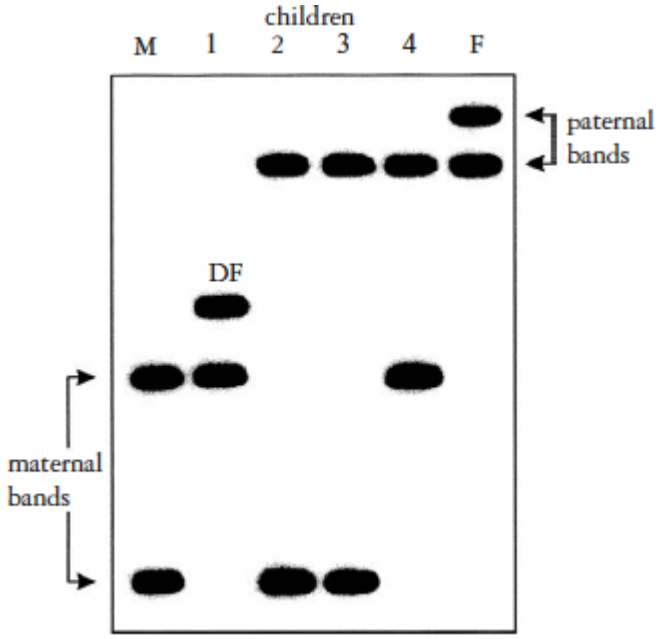
توجه: هر چه تعداد باند در یک اثر انگشت نگاریDNA بیشتر باشد، احتمال وقوع هر گونه تطابق مشابه تصادفی کمتر خواهد بود. به هر حال، فراوانی آلل برای ژن‌های مختلف باید در نظر گرفته شود. فراوانی آلل می‌تواند در جوامع مختلف متفاوت باشد، این موضوع شاید در یک موقعیت حقوقی مهم باشد. به طور کلی، با در نظر گرفتن تمام عوامل شناخته شده می‌توان از بروز مشکلات جلوگیری کرد و خطر وقوع یک تطابق مشابه تصادفی را با در نظر گرفتن بالاترین برآورد ریسک تخمین زد.

نمونه‌ای از کاربرد پروفایل DNA چند مکانی در یکی از موارد پزشکی قانونی در شکل ۱۲-۹ نشان داده شده است. در این مثال، نمونه مرجع خون قربانی است. نمونه‌های هفت مظنون به همراه نمونه قربانی استفاده شدند. با تطبیق الگوهای باندی روشن است که نمونه مظنون شماره ۵، مجرم است.

کاوشگرهای تک مکانی تنها به یک رشته مکمل در ژنوم هاپلوئید متصل خواهند شد. بنابراین در نتیجه رادیوگرافی دو باند قابل مشاهده خواهد بود، یکی کروموزوم پدری و یکی کروموزوم مادری. در نتیجه یک پروفایل ساده ایجاد خواهد شد که اغلب برای نشان دادن غیر مبهم ارتباط بین مظنون و مرجع کافی است. نتیجه آزمایش تشخیص پدر با استفاده از کاوشگر تک مکانی در شکل ۱۲-۱۰ نشان داده شده است. گاهی اوقات برای افزایش تعداد باندهای پروفایل می‌توان از دو یا چند کاوشگر استفاده کرد. کاوشگرهای تک مکانی از کاوشگرهای چند مکانی حساس‌تر بوده و قادرند مقادیر بسیار کمتری از DNA را ردیابی کنند. معمولاً کاوشگرهای تک و چند مکانی با هم برای هر موردی استفاده شده و نتایج حاصله با هم ترکیب می‌شوند.



شکل ۱۲-۹) تولید پروفایل DNA با استفاده ازکاوشگر چندمکانی. نمونه‌های DNA جدا شده از قربانی (V) و هفت مظنون (۱-۷) که با آنزیم برشی محدودالاثر هضم شده و در ژل آگارز از هم جدا شدند. قطعات DNA از داخل ژل بر روی کاغذ نیتروسلولز، لکه گذاری شده و با یک کاوشگر رادیواکتیو ردیابی شدند. کاوشگر به توالی‌های مکمل هدف متصل شده و هنگامی که در معرض اشعه ایکس قرار گیرد یک الگوی باندی روی فیلم عکاسی ایجاد می‌گردد. الگوهای باندی نمونه قربانی و مظنون شماره ۵ با یکدیگر منطبق هستند.



شکل ۱۲-۱۰) یک پروفایل DNA با استفاده ازکاوشگر تک مکانی برای آزمایش پدری تهیه شد. نمونه‌های DNA مادر (M)، چهار فرزند (۱-۴)، و پدر (F) بر اساس شکل ۱۲-۹ تهیه شدند. یک کاوشگر تک مکانی در این تجزیه و تحلیل مورد استفاده قرار گرفت. بنابراین الگوهای باندی نشانگر شامل دو باند مادری و دو باند پدری نشان داده شده است. در مورد کودک شماره ۱، الگوی باند پدری آن از هر کدام از دو باند ردیف F متفاوت است که نشان دهنده این است که دارای پدر متفاوتی می‌باشد (الگوی باند با علامت DF نشان داده شده است). این کودک در واقع از مادری متولد شد که قبلاً با فرد دیگری ازدواج کرده بود.

۱۲-۴-۳) اسرار گذشته توسط تشخیص دهنده‌های ژنتیکی آشکار شد

پیشرفت و کاربرد جالب دیگر فناوری DNA نوترکیب بررسی و ارزیابی گذشته است، نوعی مسیر و جریان تاریخ ژنتیکی. اگر چه کتاب پارک ژوراسیک (و فیلم‌های بعدی) احتمالاً کمی بیش از حد خیالی بود، تعجب آور است که چگونه برخی از ایده‌ها که در داستان به تصویر کشیده شده‌اند، در دنیای واقعی استفاده شده‌اند.

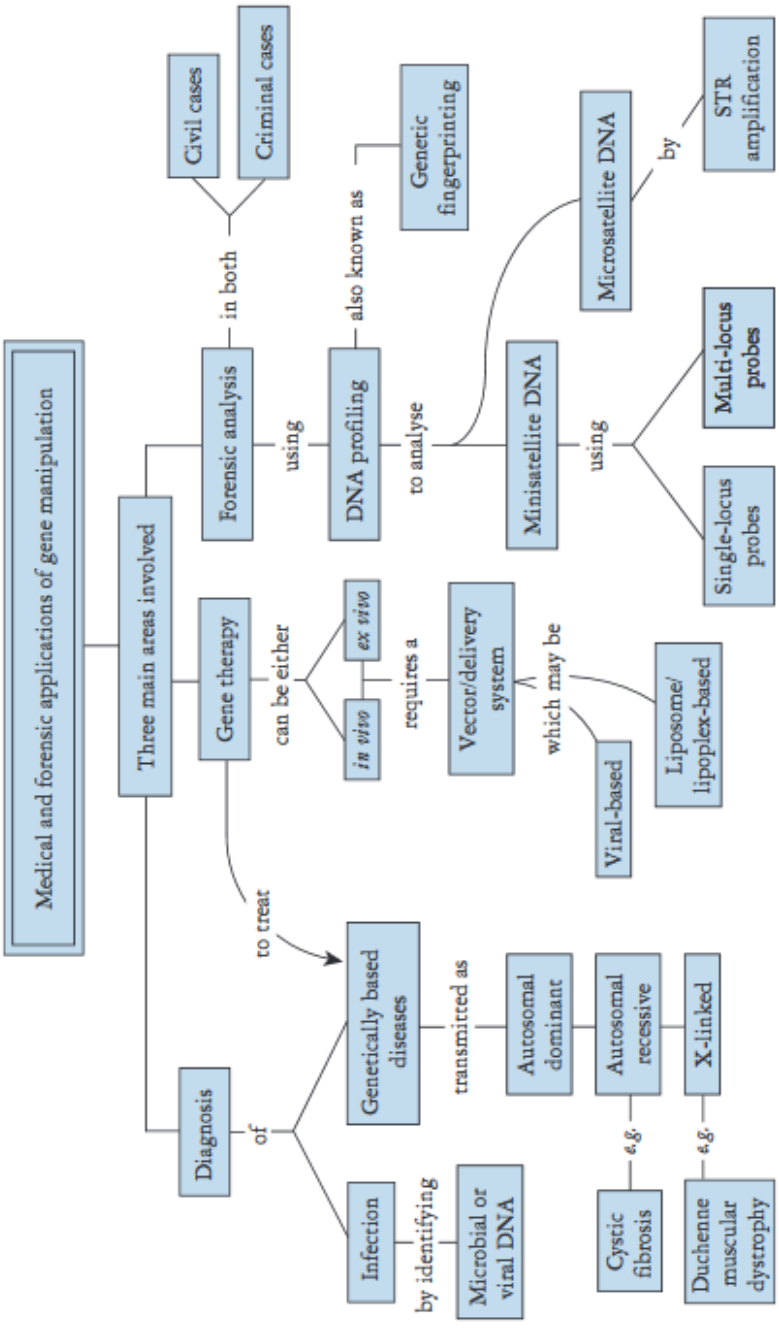
شناسایی افراد با استفاده از پروفایل DNA می‌تواند به زمان‌های گذشته و دور برگردد، جایی که فرد متوفی با تجزیه و تحلیل DNA شناسایی می‌شود. در دهه ۱۹۹۰، تجزیه و تحلیل DNA امکان شناسایی افراد برجسته مانند جوزف منگل و سزار نیکلای دوم از روسیه را فراهم نمود، در نتیجه بحث‌های طولانی در مورد مرگ آن‌ها را بر طرف کرد. همچنین DNA یک مومیایی مصری (۲۴۰۰ ساله) و استخوان یک انسان با طول عمر ۵۵۰۰ سال استخراج شد! بنابراین، امکان استفاده

از فناوری DNA نوترکیب برای مطالعه DNA باستانی به دست آمده از نمونه‌های موزه و یا یافته‌های جدید باستان‌شناسی وجود دارد. اگر نمونه‌های DNA که بیش از حد تخریب نشده در دسترس باشند، می‌توان موضوعاتی از قبیل مهاجرت جمعیت مردم باستان، درجه خویشاوندی بین گروه‌های مختلف حیوانات و تکامل گونه‌ها را مورد بررسی قرار داد. کارهایی از این قبیل گاهی اوقات دیرینه‌شناسی مولکولی نامیده می‌شود. به نظر می‌رسد که "ژنتیک اعصار گذشته" با استخراج DNA از سنگواره‌هایی با قدمت ۶۵ میلیون سال، اطلاعات بسیار مفیدی را در آینده برای زیست‌شناسان تکاملی، تاکسونومیست‌ها و دیرینه‌شناسان فراهم کند.

استفاده از این علم در شناسایی عوامل بیماری‌زا نیز می‌تواند یک حوزهٔ مفید در پژوهش باشد. برای مثال، بحث‌هایی در خصوص منبع بیماری سل در آمریکا وجود دارد. آیا این بیماری قبل از کاشفان اولیه آمریکا در آن جا وجود داشت و یا این که این بیماری هدیه‌ای از کاشفان آمریکا بود؟ محققان با بررسی و آنالیز DNA بافت ریه یک مومیایی در پرو دریافتند که DNA آن با نوکلئیک‌اسید باکتری عامل بیماری سل به نام *Mycobacterium tuberculosis* مطابقت دارد، در نتیجه اثبات شد که این بیماری در واقع در آمریکا قبل از ورود مهاجران اروپایی به صورت بومی و اندمیک وجود داشته است.

علاوه بر کاربردهای پزشکی و پزشکی قانونی، استفاده از پروفایل DNA و تکنیک‌های شناسایی از اعتبار قابل توجهی در بسیاری از حوزه‌های دیگر علم برخوردار است.

علاوه بر استفاده از این روش در مراحل قانونی و حقوقی و در ردیابی تاریخ ژنتیکی، پروفایل DNA نیز یک ابزار تحقیقاتی بسیار قدرتمند است که می‌تواند در بسیاری از زمینه‌های مختلف به کار گرفته شود. روش‌هایی مانند تجزیه و تحلیل RAPD و پروفایل ژنتیکی برای بسیاری از موجودات دیگر از جمله گربه، سگ، پرندگان و گیاهان استفاده شده است. کاربرد این روش در حوزه اکولوژی قادر است تا مشکلاتی را که قبلاً با روش‌های کلاسیک زیست محیطی مورد مطالعه قرار می‌گرفتند در سطح مولکولی مورد بررسی قرار گیرند. این نوع استفاده از اکولوژی مولکولی به احتمال زیاد تأثیر عمده‌ای در مطالعه موجودات زنده در محیط طبیعی خودشان دارد و (مانند فسیل شناسی مولکولی) مثال خوبی از گرد هم آمدن گرایش‌های علوم می‌باشد که به‌طور سنتی به‌عنوان رشته‌های مجزا مورد مطالعه قرار می گرفتند.



نقشهٔ مفهومی فصل دوازدهم

فصل سیزدهم: گیاهان و حیوانات تراریخته

اهداف:

* تصویری کلی از پتانسیل و محدوده فعالیت فناوری تراریخته سازی؛
* توصیف روش‌های مورد استفاده برای تولید حیوانات و گیاهان تراریخت؛
* بحث در خصوص روند جاری و پتانسیل استفاده از موجودات تراریخت؛
* مباحث علمی، تجاری سازی و اخلاقی پیرامون فناوری‌های ایجاد جانداران تراریخت.

خلاصه فصل/نتایج یادگیری

بعد از خواندن این فصل به اطلاعات زیر دست خواهید یافت:

* تعریف اصطلاح "ترانس‌ژنیک"؛
*برخی از روش‌های مورد استفاده برای تولید موجودات تراریخت؛
* موارد مصرف و پتانسیل کاربردی گیاهان تراریخت؛
* موارد مصرف و پتانسیل کاربردی حیوانات تراریخت؛
* مشکلات مربوط به تبدیل تراریخت‌ها به محصولات تجاری موفق.
* مباحث و ابهامات اخلاقی پیرامون توسعه و استفاده از موجودات تراریخت.

لغات کلیدی:

تراریخت، مواد غذایی تغییر یافته ژنتیکی، اصلاح بر مبنای انتخاب، موجودات تغییر یافته ژنتیکی (GMOs)، افراد پلی‌ژنیک، ویروس موزائیک گل کلم، جمینی‌ویروس، *Agrobacterium tumefaciens*، بیماری گال طوقه، پلاسمید Ti، اپین، اکتپین، نوپالین، T-DNA، آنزیم تولید کننده اکتپین، تلاقی سه جانبه، تلفیق مجدد (co-integration)، وکتورهای خلع سلاح شده، وکتورهای دوتایی، Ti- کوچک، "Frankenfoods" باکتری‌های تولید کننده هسته یخ، *Pseudomonas syringae*، باکتری‌های ضد یخ، رهاسازی پیش بینی شده، *Bacillis thuringiensis*، گیاهان Bt، گلایفوسیت، رانداپ ™، Tumbleweed™ آنزیم سنتز کننده EPSP، مقاوم به رانداپ، Flavr Savr، فناوری آنتی سنس، کمبود آهن، کمبود ویتامین A، ریزمغذی، بتا-کاروتن، برنج طلایی، فناوری حفاظت از ژن، سیستم‌های حفاظتی، استفاده از فناوری آنزیم‌های محدودالاثر (GURT)، فناوری های کنترل ژنتیکی صفات، مواد دارویی وابسته به گیاه (PMPs)، حیوانات مزرعه ای، فارمینگ، انتقال هسته‌ای، هسته گامت قبل از امتزاج، سوپرموش، موزاییک، شیمر، انکوموش، انکوژن *c-myc*، ویروس سرطان پستان در موش (MMT)، پروستات موش، سندروم نقص ایمنی شدید (SCIDS)، بیماری آلزایمر، موش ناک اوت شده، موش ناک اوت شده و جهش‌دار (MKMD)، فعال کننده پلاسمیوژن بافتی (TPA)، فاکتور IX مربوط به انعقاد خون، پروتئین اسیدی whey (WAP)، بتا-لاکتوگلوبولین (BLG)، آلفا-۱-آنتی تریپسین، فیبرینوژن، زنوترانس‌پلنتیشن، پروتئین فلورسنت سبز (GFP). xenotransplantation

تولید موجودات تراریخت[1] مستلزم تغییر در ژنوم است به‌طوری که طی آن یک تغییر دائمی ایجاد شود. تغییرات ژنتیکی در فناوری ژن درمانی در سلول‌های غیرجنسی به گونه دیگری است، چرا که تغییرات اعمال شده، منحصراً سلول دریافت‌کننده ژن مورد نظر را متأثر خواهد کرد. نقطه عطف در تولید موجودات تراریخت ایجاد تغییراتی در ژنوم این موجودات است به گونه‌ای که این تغییرات در قالب یک الگوی ثابت ژنتیکی از نسلی به نسل بعد طی فرآیند تولید مثل انتقال یابند. این امر تنها گوشه‌ای از فناوری مهندسی ژنتیک است که موجب توجه عموم شده در حالی‌که مشکلات فراوان و پیچیده‌ای در زمینه توسعه و استفاده از موجودات تراریخت وجود دارد. علاوه بر این، مشکلات ابزاری و علمی در مهندسی ژنتیک موجودات عالی بسیار جدی بوده و غلبه بر آن‌ها بسیار سخت است. بخشی از این مشکلات ناشی از اندازه و پیچیدگی ژنوم این موجودات است و بخش دیگر به پیچیدگی فرآیند تکامل گیاهان و حیوانات ارتباط دارد چرا که این فرآیند از نظر مولکولی کاملاً شناخته شده نمی‌باشد. با وجود این مشکلات، به‌تازگی روش‌های ایجاد گیاهان و جانوران تراریخت طراحی شده و مورد استفاده قرار می‌گیرند و این فناوری هم اکنون تأثیر شگرفی بر نظام‌های مختلف بر جای گذاشته است. در این فصل به بررسی برخی از جنبه‌های توسعه و استفاده از موجودات تراریخت خواهیم پرداخت.

۱۳-۱) گیاهان تراریخت

مجموعه حیات روی کره زمین، وابسته به تثبیت فتوسنتزی دی اکسید کربن در گیاهان است. گاهی ما از این حقیقت چشم‌پوشی می‌کنیم، چنانکه اغلب مردم استفاده از غذاهای طبیعی را ترک کرده و می‌بینیم که سوپرمارکت‌ها غذاهای مصنوعی و فراوری شده جدید و غذاهای آماده‌ای که فاقد سبزیجات است را به فروش می‌رسانند. در این شرایط تولید گیاهان تراریخت به ویژه محصولات غذایی تراریخت، با چنان واکنش گسترده و غیر منتظره عمومی روبرو شده که برای هیچ کس قابل پیش بینی نبود. در فصل ۱۵ به این جنبه از موضوع باز خواهیم گشت اما در این فصل هدف ما بررسی علمی تولید گیاهان تراریخت است.

امروزه ممکن است حتی فراموش کنیم که برای تولید غذا وابسته به عمل فتوسنتز هستیم و اینکه گیاهان مهم‌ترین بخش در تأمین چرخه مواد غذایی ما هستند.

[1] Transgenic

۱۳-۱-۱) چرا گیاهان تراریخت؟

در طی هزاران سال انسان از طریق اصلاح نبات کلاسیک (روش انتخابی) اقدام به تغییر صفات ژنتیکی گیاه می‌کرد. این روش بسیار موفقیت آمیز بود و بنابراین ادامه یافت و نقش عمده‌ای در کشاورزی اجرا کرد. با این وجود روش‌های اصلاح نبات کلاسیک مستلزم آن بود که دو گیاه خاص مورد نظر با همدیگر تلاقی داده شوند. این گیاهان می‌بایست از نظر جنسی با همدیگر سازگار باشند (این امر به منزله قرابت شدید آن‌ها از نظر ارثی بود). بنابراین امکان ترکیب صفات ژنتیکی خاص از گونه‌های متفاوت وجود نداشت. اما با ابداع مهندسی ژنتیک این محدودیت از پیش پای متخصصین برداشته شده و به‌عنوان یک روش مؤثر امکان ترکیب صفات شناخته شده ژنتیکی درگیاهان را فراهم کرد. تغییرات ژنتیکی اعمال شده اغلب در جهت افزایش راندمان و تولید گیاهان زراعی بوده است که هر دو هدف جهت تأمین نیاز غذایی و پوشاک جمعیت در حال افزایش دنیا بسیار حائز اهمیت هستند.

در کشاورزی، چه با روش‌های اصلاح سنتی و یا روش دست‌ورزی ژن، بهبود ابعاد مختلف رشد گیاه از جمله اهداف بالقوه می‌باشد.

اعمال تغییرات ژنتیکی در گیاهان با استفاده از تلفیقی از علوم شامل: ژنتیک گیاهی، بیوشیمی، فیزیولوژی و پاتولوژی انجام می‌شود. برخی از اهداف اولیه تولید گیاهان زراعی در جدول ۱۳-۱ آمده است. بسیاری از این اهداف اکنون به طور گسترده حاصل شده‌اند. با این حال آزادسازی موجودات تغییر یافته ژنتیکی[1] در طبیعت و امکان تأثیرات اکولوژیک آن‌ها بر محیط از جانب افکار عمومی قابل پذیرش نمی‌باشد و این جنبه از موضوع، بسیار جنجال برانگیز است. در حقیقت به سادگی نمی‌توان گفت که پیامدهای بلند مدت این پدیده چیست به طوری که ممکن است با ایجاد تغییرات بسیار کوچک، در توازن سیستم طبیعی اخلال ایجاد شود. مثلاً تولید گیاهان بسیار قوی و مقاوم به بیماری‌ها ممکن است تأثیرات بسیار شگرف بر جای بگذارد.

در فرآیند دست‌ورزی ژنتیکی گیاهان دو موضوع اساسی وجود دارند: ۱- انتقال ژن دست‌ورزی شده به گیاه هدف و ۲- شناخت جزئیات سیستم ژنتیکی تغییر یافته از نظر مولکولی. در بسیاری از موارد موضوع دوم دارای محدودیت است و این موضوع به ویژه در صفات تحت کنترل چند ژن (پلی ژن) پیچیده‌تر می‌باشد. با این وجود و علی رغم مشکلات، اکنون دست‌ورزی ژنتیکی گیاهان تأثیرات قابل توجهی برکشاورزی گذاشته است.

[1] Genetically Modified Organisms (GMOs)

۱۳-۱-۲) پلاسمید Ti به عنوان وکتور برای سلول‌های گیاهی

انتقال DNA کلون شده به سلول‌های گیاهی امروزه به‌صورت رایج در بسیاری از آزمایشگاه‌های سراسر دنیا انجام می‌شود. روش‌های گوناگونی برای این منظور مورد استفاده قرار می‌گیرند از جمله روش‌های فیزیکی مانند ریز تزریقی[1] و روش بیولیستیک [2] . از طرفی می‌توان از روش‌های بیولوژیک نیز استفاده کرد که در این روش‌ها DNA کلون شده از طریق یک ناقل واسطه به گیاه منتقل شده و در ژنوم گیاه تلفیق می‌شود. هم اکنون استفاده از ویروس‌های گیاهی مانند کالموویروس‌ها[3] و جمینی‌ویروس‌ها[4] به عنوان وکتور، توجه بسیاری را به خود جلب کرده اند، اما با این وجود این روش دارای مشکلات فراوان است. در حال حاضر پلاسمید Ti باکتری *Agrobacterium tumefactions* بیشترین استفاده را به‌عنوان ناقل در سلول‌های گیاهی دارد. این باکتری خاکزی بوده و عامل بیماری گال تاجی در ناحیه طوقه است. این باکتری از طریق زخم‌های ساقه، گیاه را آلوده کرده و یک توده سرطانی به شکل تاج بر روی گیاه تشکیل می‌دهد.

پلاسمید Ti آگروباکتریوم بیش‌ترین استفاده را در انتقال DNA نوترکیب به سلول‌های گیاهی دارد.

[1] Micro injection
[2] Biolistic
[3] Calumoviruses
[4] Geminiviruses

جدول ۱۳-۱) اهداف احتمالی بهبود گیاهان زراعی

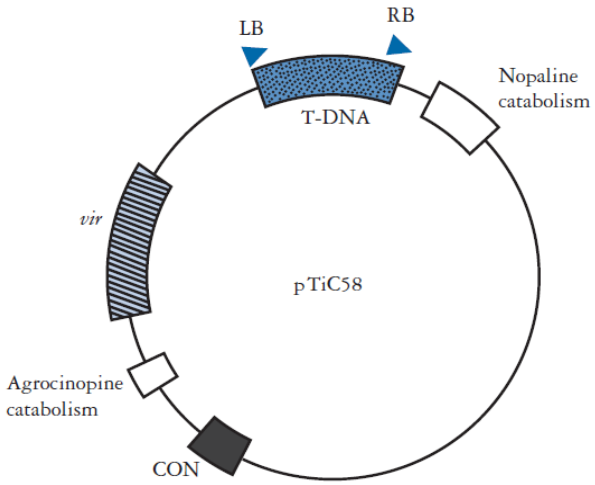
Target	Benefits
Resistance to: Diseases Herbicides Insects Viruses	Improve productivity of crops and reduce losses due to biological agents
Tolerance of: Cold Drought Salt	Permit growth of crops in areas that are physically unsuitable at present
Reduction of photorespiration	Increase efficiency of energy conversion
Nitrogen fixation	Capacity to fix atmospheric nitrogen extended to a wider range of species
Nutritional value	Improve nutritional value of storage proteins by protein engineering
Storage properties	Extend shelf-life of fruits and vegetables
Consumer appeal	Make fruits and vegetables more appealing with respect to colour, size, shape, *etc.*

در واقع خود باکتری باعث تشکیل گال نمی‌شود، بلکه پلاسمید آن که تحت عنوان Ti-plasmid خوانده می‌شود عامل ایجاد گال است (Ti مخفف القاء کننده تومور است). اندازه پلاسمید Ti بزرگ بوده و در حدود 140-235kb است. این پلاسمید علاوه بر ژن‌های عامل تشکیل گال (تومور)، حاوی گروهی از ژن‌ها است که باعث تشدید اثر بیماریزایی شده و همچنین ژن‌هایی که در سنتز مشتقات آمینواسیدی غیرمعمول که تحت عنوان اوپین‌ها[1] خوانده می‌شوند نیز بر روی این پلاسمید قرار دارند. دو نوع عمده از این اپین‌ها معمولاً یافت می‌شوند که شامل اکتوپین و نوپالین می‌باشند و پلاسمیدهای Ti بر این اساس دارای ویژگی‌های متفاوتی هستند. در شکل ۱۳-۱ پلاسمید Ti نوپالین نشان داده شده است.

منطقه‌ای از پلاسمید Ti که مسئول ایجاد گال (تومور) است را T-DNA گویند. این منطقه ۳۰-۱۵ کیلوباز طول داشته و حاوی ژن‌های سنتز کننده اکتوپین یا نوپالین است. در هنگام آلودگی، T-DNA با ژنوم سلول گیاهی تلفیق می‌شود که احتمالاً یکی از راه‌های ورود DNA خارجی به

[1] Opines

ژنوم گیاه است. تلفیق T-DNA با ژنوم سلول ممکن است در مکان‌های مختلف از ژنوم اتفاق بیافتد که ظاهراً به‌صورت تصادفی این اتفاق رخ می‌دهد. T-DNA نوپالین یک قطعه‌ای، اما DNA اکتوپین دارای دو ناحیه به نام‌های قطعه راست و چپ است. قطعه سمت چپ از نظر ساختمانی مشابه قطعه نوپالین است و قطعه راست اصولاً جهت تشکیل گال ضروری نیست. در شکل ۱۳-۲ ساختار T-DNA نوپالین نشان داده شده است. از نظر شکل گال، ژن‌ها به سه گروه شامل tms (گال سرشاخه) tmr (گال ریشه) و tml (گال بزرگ) تقسیم بندی می‌شوند. ژن مسئول تولید نوپالین به نام *nos* است (این ژن در T-DNA اکتوپین بنام *ocs* خوانده می‌شود که مسئول کد کردن آنزیم اکتوپین سینتاز[1] است). ژن‌های *nos* و *ocs* از نظر مشخصات به صورت ژن‌های یوکاریوت هستند و پروموتور آن‌ها به طور گسترده در ساختار وکتورهای بیانی کاربرد دارد.

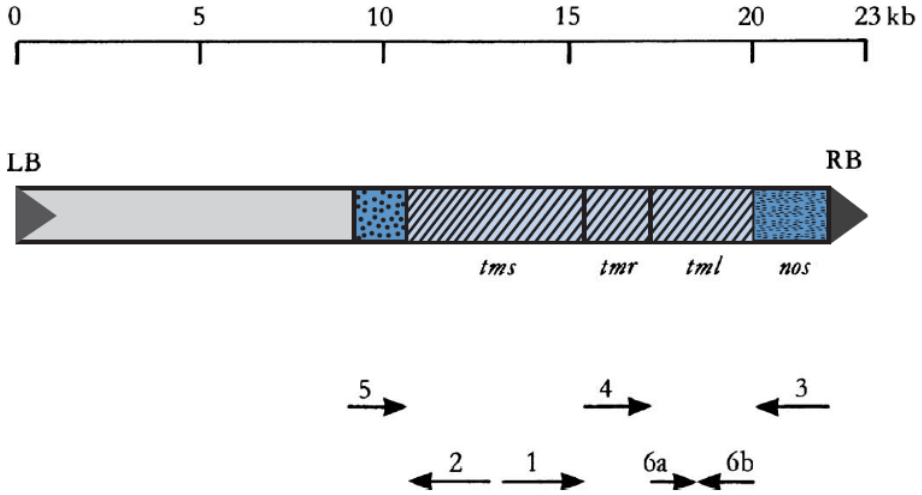


شکل ۱۳-۱) نقشه پلاسمید نوپالین pTiC58. مناطق نشان داده شده شامل T-DNA (سایه خورده) که دو طرف آن توالی‌های تکراری چپ (LB) و راست (RB) قرار دارد، ژن‌های کاتابولیسم کننده نوپالین و اگروسینوپین و ژن‌های بیماریزا (vir) دیده می‌شوند. منطقه CON مسئول انتقال به طریق هم‌یوغی است. مستخرج شده از Old و Primrose (۱۹۸۹)، اصول دستکاری ژن، Blackwell.

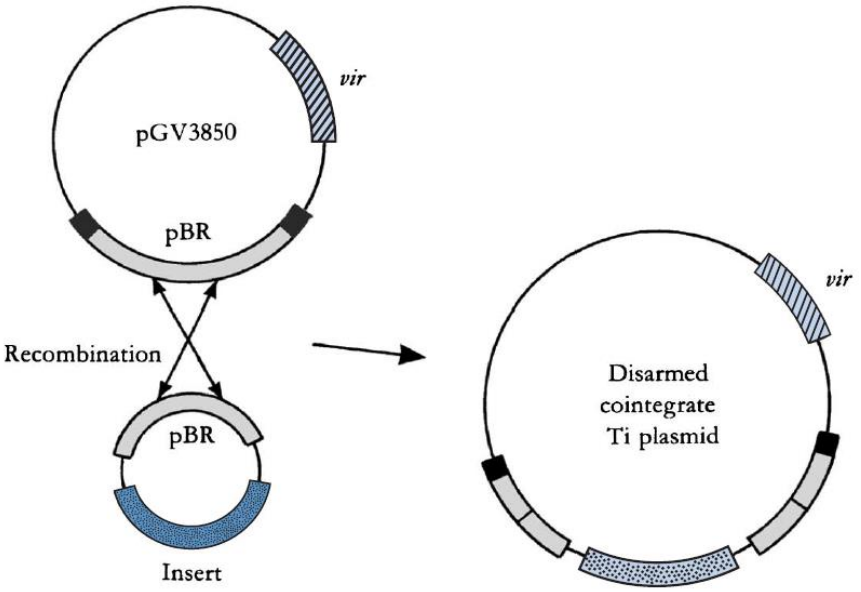
پلاسمیدهای Ti بقدری بزرگ هستند که نمی‌توان مستقیماً از آن‌ها استفاده کرد، لذا برای داشتن ویژگی‌های مناسب به عنوان یک وکتور همسانه‌سازی خوب، دستکاری شده‌اند.

[2] Octopine synthase

در واقع پلاسمید Ti بسیار بزرگ‌تر از آن است که بتوان بـه طـور مسـتقیم بـه عنـوان ناقـل از آن استفاده کرد. لذا وکتورهای کوچک‌تر ساخته می شوند کـه بـرای دسـتکاری در شـرایط *in vitro* مناسب ترند. این وکتورها تمام ژن‌های مورد نیاز (که بوسیله پلاسمید Ti منتقل می‌شود) را ندارند لذا باید در تلفیق با سایر پلاسمیدها مورد استفاده قرار گیرند تا قابلیت الحاق قطعـه DNA کلـون شده در ژنوم سلول گیاهی مورد نظر را داشته باشند.



شکل ۱۳- ۲) نقشه ناحیه T-DNA نوپالین. مرزهای سمت چپ و راسـت بـا علائـم LB و RB مشـخص شده‌اند. ژن‌های سنتز کننـده نوپـالین (*nos*) و ایجـاد مورفولـوژی تومـور (tms، tmr و tml) نشـان داده شده‌اند. نقشه رونوشت (ترانسکریپت) در زیر نقشـه T-DNA نشـان داده شـده اسـت. رونوشـت‌هـای ۱ و ۲ (*tms*) در تولید اکسین و رونوشت ۴ (*tmr*) در تولید سیتوکنین نقش دارند. ایـن رونوشـت‌هـا شـاخص تومورهای ریشه یا سر شاخه نیز می‌باشند. رونوشت۳ کدکننده نوپالین سنتاز و رونوشت‌های ۵ و ۶ کدکننده محصولاتی هستند که در سرکوب فرآیند تمایز نقش دارند. مستخرج شـده از Old و Primrose (۱۹۸۹)، اصول دستکاری ژن، Blackwell.



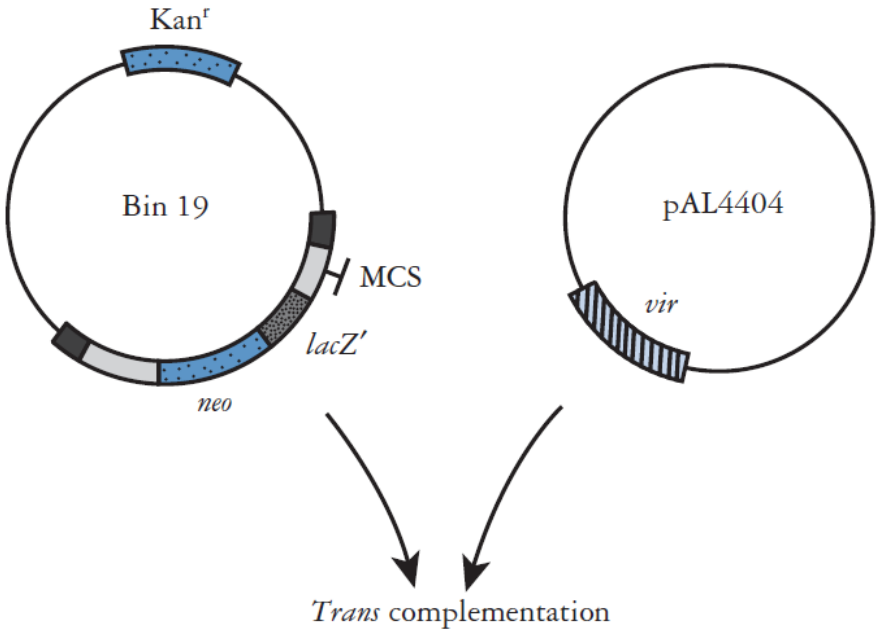
شکل ۱۳-۳) تشکیل یک پلاسمید Ti تلفیقی. پلاسمید pGV3850 حامل ژن‌های *vir* است که برخی از نواحی T-DNA آن با توالی‌های پلاسمید pBR322 (pBR) جایگزین شده است. مرزهای چپ و راست T-DNA نیز با رنگ تیره مشخص شده‌اند. قطعه‌ای (سایه زده) که در یک پلاسمید نوع pBR322 کلون شده می‌تواند با استفاده از نوترکیبی همولوگی وارد پلاسمید pGV3850 شده و درون توالی pBR آن قرار گیرد که به معنی ایجاد یک وکتور خلع سلاح شده تلفیقی است.

در صورتی که قطعه نوترکیب در یک *سویه E.coli* و پلاسمید مسئول تلاقی نیز در سویه دیگر باشد، اغلب یک تلاقی سه جانبه (یا سه والده یا سه گانه) ضروری است. یک پلاسمید مشتق از ناحیه Ti نیز در باکتری *A.tumefaciens* وجود دارد. هنگامی که سه *سویه* با هم ترکیب می‌شوند، پلاسمید "کمکی" مسئول تلاقی (پلاسمید کمکی) به درون *سویه* حاوی پلاسمید نوترکیب منتقل می‌شود که نهایتا جابجاشده و به اگروباکتریوم منتقل می گردد. سپس طی فرآیند نوترکیبی امکان تلفیق DNA کلون شده با پلاسمید Ti فراهم می‌شود که می تواند DNA نوترکیب را به ژنوم گیاهی طی فرآیند آلودگی منتقل کند.

۱۳-۱-۳) تولید گیاهان تراریخت

در توسعه روش‌های تولید گیاه تراریخته، دو شیوه بر مبنای استفاده از پلاسمید Ti پدید آمد: ۱- Cointegration و ۲- سیستم وکتورهای دوتایی[1]. در روش Cointegration یک پلاسمید بر پایه pBR322 برای کلون کردن ژن مورد نظر استفاده می‌شود. (شکل ۱۳-۳). سپس این پلاسمید با یک وکتور بر پایه پلاسمید Ti مانند پلاسمید pGV3580 ادغام می‌شود. این وکتور حامل ناحیه vir است (که عامل ایجاد آلودگی است) و همچنین دارای نواحی مرزی چپ و راست T-DNA است که جهت تلفیق (دخول یا اینتگریشن) ناحیهT-DNA ضروری هستند. به هر حال بیشتر ناحیه T-DNA با توالی pBR322 جایگزین شده است. در نتیجه امکان تشکیل پلاسمید نوترکیب از طریق فرآیند نوترکیبی همولوگوس[2] فراهم می‌شود. لذا یک پلاسمید بزرگ پدید می‌آید که امکان تلفیق توالی کلون شده با ژنوم هدف را فراهم می‌کند. حذف ناحیه T-DNA نتیجه مهم دیگری هم دارد چرا که سلول‌های آلوده شده از این طریق تولید گال نمی‌کنند و بنابراین باز تولید گیاهان ترانس‌ژن از طریق روش‌های کشت بافت بسیار آسان‌تر خواهد بود. پلاسمیدهای بر پایه پلاسمید Ti که ویژگی تولید تومور را ندارند تحت عنوان پلاسمیدهای خلع سلاح شده[3] نامیده می‌شوند.

[1] Bianary-vector
[1] Homologous recombination
[2] Disarmed veetors



شکل ۱۳-۴) سیستم وکتور دوتایی بر پایه پلاسمید Bin 19. پلاسمید Bin 19 حامل توالی ژنی برای α-پپتید و β-گالاکتوزیداز (*lacZ′*) در پایین دست ناحیه پلی‌لینکری (MCS) که محل همسانه‌سازی DNA ژنومی است، می باشد. نواحی پلی لینکر/*neo*/*lacZ′* با توالی‌های مرزی (انتهائی) T-DNA احاطه شده‌اند (نواحی پر شده با رنگ تیره). علاوه بر این ژن‌های نئومایسین فسفوترانسفراز (*neo*) و مقاومت به کانامایسین (Kan^r) می‌توانند به عنوان ژن‌های گزینش‌گر استفاده شوند. این پلاسمید در ترکیب با پلاسمید pAL4404 که حامل ژن‌های بیماریزایی (*vir*) است، اما T-DNA ندارد، مورد استفاده قرار می‌گیرد. این دو پلاسمید به صورت ترانس عمل کرده و فعالیت یکدیگر را در انتقال DNA کلون شده به ژنوم گیاه تکمیل می‌کنند. مستخرج از Old و Primrose (۱۹۸۹)، اصول دستکاری ژن، Blackwell.

باززائی یک موجود زنده و کارا، بخش مهم در تولید یک گیاه تراریخت است که اغلب با استفاده از روش حلقه‌های برگی (دیسک‌های برگی) به دست می‌آید.

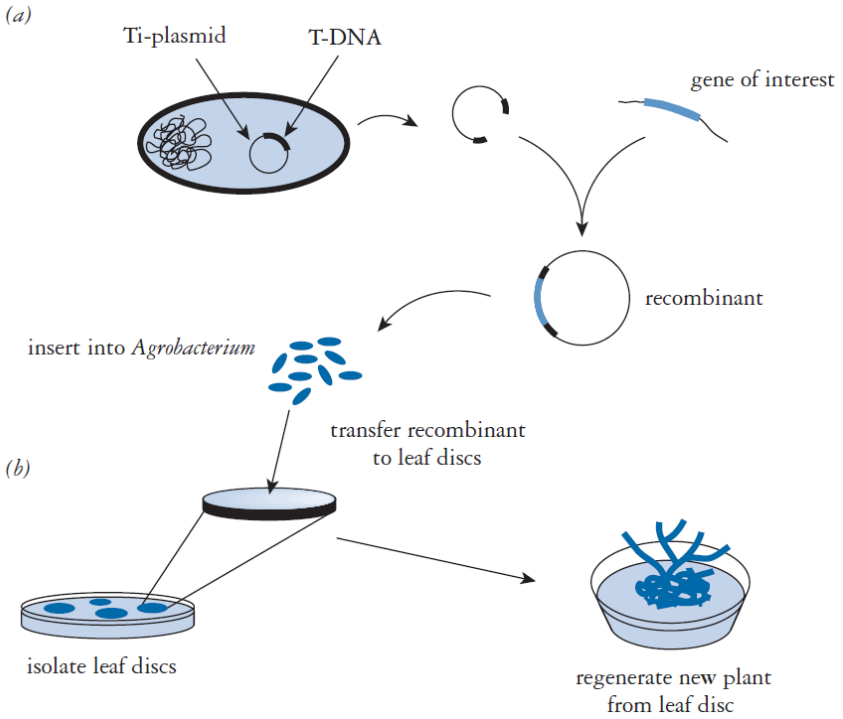
سیستم وکتورهای دوتایی از پلاسمیدهای جداگانه برای پشتیبانی از T-DNA خلع سلاح شده (پلاسمیدهای mini-Ti) و فعالیت‌های بیماری‌زایی استفاده می‌کند. پلاسمید mini-Ti از طریق تلاقی سه گانه به یک سویه از *A.tumefaciens* (حاوی یک پلاسمیدسازگار با ژن‌های بیماری‌زای *vir*) منتقل می‌شود. ژن‌های کلون شده در پلاسمید mini-Ti با روش مکمل ترانس به ژنوم سلول گیاهی منتقل می‌شود در حالی که فرآیند بیماری‌زایی از طریق پلاسمید دوم اعمال می‌گردد (شکل ۱۳-۴).

هنگامی که یک سویه مناسب از *A.tumefaciens* حاوی یک وکتور نوترکیب خلع سلاح و مشتق شده از Ti تولید شد، آلودگی گیاه امکان پذیر خواهد شد. این فرآیند اغلب با استفاده از حلقه‌های برگی[1] از گیاهانی که به آسانی قابلیت بازتولید دارند انجام می‌شود. با استفاده از این روش، ژن‌های فراوانی به گیاهان منتقل شده‌اند. خلاصه این روش در شکل ۱۳-۵ آمده است. یکی از مشکلات این روش این است که این باکتری بطور معمول در گیاهان تک لپه مانند غلات و گیاهان علفی ایجاد آلودگی نمی کند. از آنجائی که بسیاری از گیاهان زراعی هدف تک لپه‌ای‌ها هستند، اعمال این روش روی گیاهان تک لپه با مشکلاتی مواجه کرده است. با این حال سایر روش‌ها (مانند روش‌های مستقیم انتقال ژن یا روش بیولستیک) می‌توانند برای انتقال DNA نوترکیب به داخل سلول‌های تک لپه‌ای‌ها استفاده می شوند.

۱۳-۱-۴) به‌کارگیری فناوری

سالهاست است که فناوری تولید گیاهان تراریخت با میزان موفقیت متفاوت مورد استفاده قرار می‌گیرد. در حال حاضر یکی از مشکلات عمده که قبلا هم بیان کردیم، پذیرش گیاهان تراریخته از جانب افکار عمومی است. در حقیقت گاهاً این مقاومت از جانب افکار عمومی بیش از واقعیت علمی این مشکل است.

[1] leaf discs



شکل ۱۳-۵) باززایی گیاهان تراریخت از حلقه‌های برگی. (a) ژن هدف در یک وکتور بر پایه پلاسمید Ti کلون شده است. پلاسمید نوترکیب وارد *Agrobacterium tumefaciens* (اغلب از طریق تلاقی سه جانبه) می‌شود. سپس باکتری برای آلوده سازی دیسک‌های (حلقه‌های) برگی گیاهی استفاده می‌شود که در شکل (b) نشان داده شده است. از طریق قرار دادن حلقه‌های برگی روی محیط کشت مناسب، این حلقه‌ها باززایی می‌شوند.

اطمینان عمومی و قبول گیاهان تراریخت یک جنبه مهم و دشوار در زیست فناوری است که موافقان و نقطه نظرات مختلفی در مورد آن وجود دارد. اگر این فناوری سرانجام می‌خواهد دارای اعتبار همه گیری شود، یک مباحثه عقلانی و متعادل در این خصوص ضروری به نظر می‌رسد.

در اواخر سال ۱۹۹۹یک جریان شدید عمومی علیه غذاهای ترانسژنیک شکل گرفت که در نهایت باعث وارد آمدن خسارات شدیدی به شرکت‌های تولید کننده مواد غذایی مربوطه شد. چنانکه گاهی از طریق برخورد مستقیم و دادگاه و گاه نیز به‌طور غیر مستقیم و به‌صورت عدم خرید محصولات تراریخته روبه رو شد. این موضوع به طور مفصل در فصل ۱۵ بحث خواهد شد.

یکی از نخستین آزمایش‌های DNA نوترکیب که بر روی گیاهان صورت گرفت، در حقیقت، منجر به تولید هیچ گیاه تراریخته‌ای نشد، ولی درعوض استفاده از باکتری‌های تغییر یافته ژنتیکی را برای

نخستین بار مرسوم کرد. در طبیعت، یخ اغلب در دماهای پایین، در اثر ارتباط با پروتئین‌ها سطحی برخی از باکتری‌ها که به باکتری‌های یخساز مشهورند و در بسیاری از گونه‌های گیاهی نیز یافت می‌شوند، تشکیل می‌گردد. یکی از گونه‌های بسیار معمول باکتری‌های یخساز *pseudomonas syringae* است. در اواخر دهۀ ۱۹۷۰ و اوایل دهۀ ۱۹۸۰، دانشمندان ژن عامل تولید پروتئین یخساز را از این گونه حذف و لذا باکتری یخ-منفی ساخته شد. اگرچه برنامه‌های اسپری کردن سویه باکتری یخ-منفی بر روی گیاهان یک مزرعه تحقیقاتی قبل از سال ۱۹۸۲ آماده بود، اما تأیید انجام نخستین آزمایش بر روی گیاهان مزرعه، بدلیل مباحث مطرح شده، به تأخیر افتاد. در نهایت در سال ۱۹۸۷با این موضوع موافقت شد و آزمایش در سطح مزرعه انجام شد. موفقیت‌هائی در استفاده از باکتری مهندسی شده در کاهش خسارت ناشی از یخزدگی در تیمارهای آزمایش شده بدست آمد.

باکتری *Bacillus thuringiensis* برای تولید گیاهان تراریخت تحت‌عنوان Bt-plant مورد استفاده قرار گرفته است. این باکتری نوعی سم کریستالی تولید می‌کند که در صورت دریافت سم توسط لارو آفات، باعث مرگ آنها می‌شود. در واقع این آفات با هضم سم از بین می‌روند. این باکتری به عنوان حشره کش، مستقیما بروش اسپری کردن بر روی گیاهان زراعی مورد استفاده قرار گرفته است. در نهایت ژن عامل تولید سم کریستالی از باکتری جدا شده و به گیاهان زراعی از جمله ذرت، پنبه، سویا و سیب زمینی منتقل شد و نخستین گیاهان Bt در سال ۱۹۹۶کشت شدند. تا سال ۲۰۰۰ بیش از ٪۵۰ از سویای کشت شده در ایالات متحده از نوع Bt بود، هر چند مشکلاتی در مورد بروز مقاومت نسبت به سم Bt در آفات ایجاد شده بود.

گیاهان Bt که در آنها وجود یک سم باکتریایی در برابر آفات لاروی موجب مقاوم می‌شود، با موفقیت تولید و در بسیاری از کشورها نیز به‌صورت تجاری رشد داده می‌شود.

یکی از نگرانی‌ها در مورد مسئله کشت ذرت Bt، خطر بالقوه آن برای گونه‌های غیر اختصاصی و غیر هدف Bt است. در سال ۱۹۹۹ براساس گزارش مجله nature لارو پروانه شاهی که در سراسر آمریکای شمالی گسترش دارد تحت تأثیر دانه گرده ذرت Bt دچار خسارت بسیار شده است، اگر چه فرایندهای تأیید خسارت احتمالی ذرت Bt، بررسی و موضوع را مورد بررسی و آزمایش قرار دادند و هیچ‌گونه ریسک معنی داری را نیافتند. در واقع خطر این موضوع به دو دلیل، سمیت و ماندگاری این سم است، اما تحقیقات نشان می‌دهند که مقدار ماندگاری این سم بسیار کمتر از آن است که برای پروانه‌ها خطرناک باشد. به هرحال این موضوع همچنان در حال بررسی است. این نمونه نشان می‌دهد که جهت بدست آوردن پذیرش کامل افکار عمومی در مورد محصولات تراریخته، تحقیقات گسترده‌ای در این زمینه مورد نیاز است.

مقاومت به علفکش‌ها یکی از زمینه‌هایی است که تلاش‌های فراوانی در مورد آن صورت گرفته است. تئوری سادهٔ آن این است، اگر گیاهان مطلوب مقاوم به علفکش تولید شوند با استفاده از علفکش‌های وسیع الطیف می‌توان علف های هرز را از بین برد، در حالی که خسارتی متوجه گیاهان زراعی نمی شود. یکی از علفکش‌های رایج گلایفوسیت است که تحت نام‌های تجاری رانداب[۱] و تومبلوید[۲] در دسترس است. گلایفوسیت از فعالیت آنزیم ۵-انول پیرووویل شیکیمات -۳- فسفات سینتاز[۳] (EPSP سینتاز یا EPSPS) که در سنتز آمینواسید دخیل است جلوگیری می‌کند. گیاهان مقاوم هم از طریق افزایش سنتز EPSPS به واسطه تولید تعداد نسخه‌های بسیار زیاد ژن و یا از طریق انتقال ژن EPSPS باکتریایی به گیاه که تفاوت اندکی با نوع گیاهی داشته و با تولید یک پروتئین مقاوم به گلایفوسیت ایجاد مقاومت در گیاه می‌کند، تولید می شوند. در این زمینه شرکت مونسانتو[۴] گیاهان مختلفی را تولید کرده است، نظیر سویا، که تحت عنوان رقم مقاوم به رانداپ[۵] می‌باشد. این گیاهان به طور وسیعی در ایالات متحده آمریکا و برخی از کشورها کشت می‌شوند و مقاومت به علف کش معمول‌ترین نوع دستکاری گیاهان تغییر یافته ژنتیکی (GM) است.

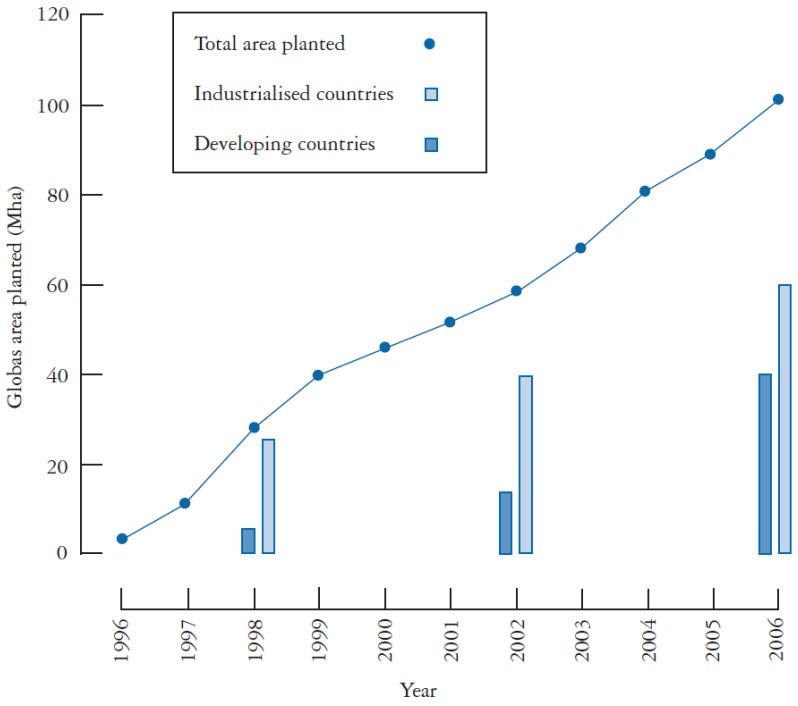
مقاومت به علفکش موضوعی است که توسط پژوهشگران زیست فناوری بمنظور مهندسی گیاهان کشف شد.این گیاهان مقاوم به علفکش بوده و برای کنترل علف‌های هرز مورد استفاده قرار میگیرند.

از زمانی‌که نخستین گیاهان تغییر یافته ژنتیکی (GM) زراعی به‌صورت تجاری کشت شدند، به طور فزاینده‌ای سطح زیر کشت این محصولات در سراسر دنیا در حال افزایش است. شکل ۱۳-۶ کل سطح زیر کشت این محصولات را از سال ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۶ نشان می‌دهد. در اینجا علاوه بر افزایش سالانه سطح زیر کشت این محصولات، دو نکته حائز اهمیت است. اول، در سال ۲۰۰۶ به طور نمونه، مرز ۱۰۰ میلیون هکتار زمین زیر کشت شکسته شد. دوم، در کشورهای در حال توسعه گیاهان GM پذیرش بالاتری داشته‌اند و میزان کشت این گیاهان در حال پیشی گرفتن از کشورهای صنعتی است. این موضوع نیز در جدول ۱۳-۲ که نشان داده شده است. چنانچه ملاحظه می‌شود این جدول نشان‌دهنده میزان سطح زیرکشت گیاهان GM در سال ۲۰۰۶ در هر یک از ۲۲ کشوری که این گیاهان را به‌صورت تجاری کشت می‌کنند، است.

---

[1] Roundup™
[2] Tumbleweed™
[3] 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
[4] Monsanto
[1] Roundup-ready

امروزه تقریباً گیاهان GM در حدود ۲۲ کشور جهان کشت می‌شوند. در سال ۲۰۰۶ سطح زیر کشت آن‌ها بیش از ۱۰۰ میلیون در هکتار بوده است.



شکل ۱۳-۶) کل مساحت زیر کشت گیاهان زراعی تغییر یافته ژنتیکی در سرتاسر جهان طی دوره زمانی ۲۰۰۶-۱۹۹۶. مساحت‌ها بر حسب میلیون بر هکتار (MHa) است. در سال‌های ۱۹۹۸، ۲۰۰۲ و ۲۰۰۶ تعادل بین کشورهای صنعتی و کشورهای در حال توسعه با استفاده از ستون‌های سایه خورده مشخص شده است. اطلاعات فوق از James (۲۰۰۶) گرفته شده است. ISAAA Brief 35. (برای اطلاعات بیشتر به سایت www.isaaa.org مراجعه کنید.)

چهار گیاه زراعی مهم GM عبارتند از سویا، ذرت، پنبه وکانولا (کلزای روغنی). جدول ۱۳-۳ مناطق تحت کشت واریته‌های تغییر یافته ژنتیکی از هریک از این گیاهان را نشان می‌دهد. رایج‌ترین گیاه زراعی تغییر یافته ژنتیکی سویا است به گونه‌ای که در سال ۲۰۰۶ حدود ۵۹٪ از سطح زیرکشت گیاهان GM به این گیاه اختصاص داشت.

علاوه بر چهار گیاه نام برده، گیاهان دیگر از جمله گوجه فرنگی نیز از نظر این ویژگی مورد دستورزی قرارگرفته‌اند. گوجه فرنگی‌ها معمولاً به صورت سبز (نرسیده) برداشت می‌شوند، لذا در

برابر لهیدگی و آسیب ناشی از ارسال و حمل و نقل مقاوم هستند. سپس این گوجه‌ها به صورت مصنوعی و با استفاده از گاز اتیلن رسیده می‌شوند، به گونه‌ای که اتیلن به عنوان عامل کلیدی در شروع فرآیند رسیدن بشمار می رود. جهت تأخیر در رسیدن طبیعی دو روش مورد استفاده قرار می‌گیرد. اول، تغییر در مسیر سنتز اتیلن که باعث تأخیر در شروع نرمال فرآیند رسیدگی طبیعی می‌شود. روش دوم در واقع نشان می دهد که چگونه یک ایده چدید که میتواند بر پایه فناوری پیشرفته ژنی پاسخی قاطع برای حل یک پیدا نماید، ممکن است بر اثر عوامل و پارامترهای دخیل دیگر با شکست مواجه شود که این موضوع در واقع داستان گوجه فرنگی Flavr Savr (sic) است.

شرکت زیست‌فناوری کال‌ژن[1] با استفاده از فناوری موسوم به آنتی‌سنس[2] گوجه فرنگی Flavr Savr را تولید کرد. در این روش توالی ژن مورد نظر در جهت معکوس کلون می‌شود، بنابراین در اثر فرآیند رونویسی یک رشته mRNA که در واقع مکمل mRNA نرمال است، از روی توالی مورد نظر ساخته می‌شود. لذا این mRNA آنتی‌سنس به mRNA طبیعی در سلول متصل شده و با جلوگیری از ترجمه آن درنهایت بیان ژن را خاموش می‌کند.

[1] Calgene
[2] Antisense technology

جدول ۱۳-۲) سطح زیر کشت گیاهان تغییر یافته ژنتیکی با ذکر نام کشور در سال ۲۰۰۶.

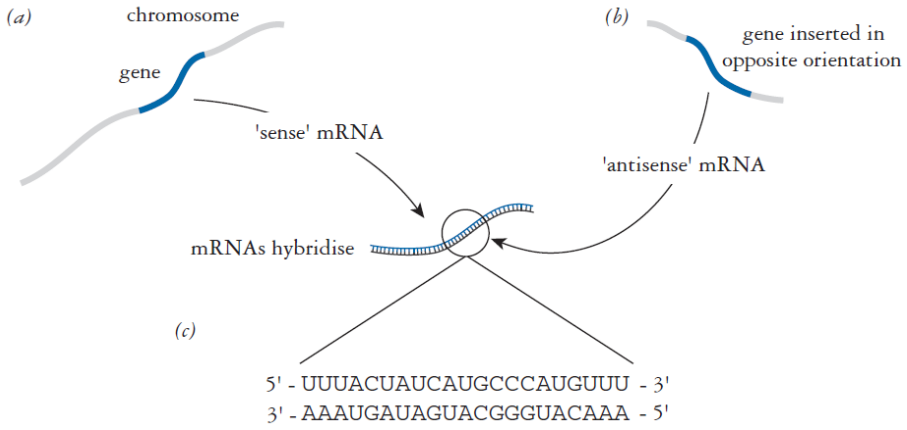
Country	Total area planted (MHa)
Countries planting > 50000 Ha	
USA	54.6
Argentina	18.0
Brazil	11.5
Canada	6.1
India	3.8
China	3.5
Paraguay	2.0
South Africa	1.4
Uruguay	0.4
Philippines	0.2
Australia	0.2
Romania	0.1
Mexico	0.1
Spain	0.1
Countries planting < 50000 Ha	
Czech Republic	–
France	–
Germany	–
Iran	–
Slovakia	–
Portugal	–
Honduras	–
Colombia	

توجه: سطح زیر کشت گیاهان تغییر یافته ژنتیکی با ذکر نام کشور. منبع: James (۲۰۰۶). ISAAA Brief 35. (برای اطلاعات بیشتر به سایت www.isaaa.org مراجعه کنید.)

جدول ۱۳-۳) چهار گیاه اصلی تغییر یافته ژنتیکی

Year	1998		2002		2006	
	MHa	%	MHa	%	MHa	%
Soybean	14	(54)	36	(62)	59	(58)
Maize	8	(30)	12	(21)	25	(24)
Cotton	2	(8)	7	(12)	13	(13)
Canola (oilseed rape)	2	(8)	3	(5)	5	(5)
Total	26	(100)	58	(100)	102	(100)

توجه: مساحت تقریبی این چهار گیاه اصلی تغییر یافته ژنتیکی (در میلیون هکتار) و به عنوان درصدی از کل گیاهان زراعی تغییر یافته ژنتیکی رشد یافته در سال‌های ۱۹۹۸، ۲۰۰۲ و ۲۰۰۶ نشان داده شده است. منبع: James (۲۰۰۶، ۲۰۰۲ و ۱۹۹۸). ISAAA Brief 8, 27 and 35. (برای اطلاعات بیشتر به سایت www.isaaa.org مراجعه کنید.)



شکل ۱۳-۷) فناوری آنتی سنس. ژن هدف در قسمت a نشان داده شده است. یک نسخه از این ژن در جهت مخالف در مکان مجزای دیگری از ژنوم وارد می‌شود همانطور که در قسمت (b) نشان داده شده است. با رونویسی از ژن آنتی‌سنس یک mRNA آنتی‌سنس تولید می‌شود این رشته به توالی mRNA عادی متصل شده و از ترجمه آن جلوگیری می‌کند. بخشی از این توالی در قسمت c نشان داده شده است.

گاهی ممکن است یک راه حل جالب علمی و خوب طراحی شده برای حل یک مشکل خاص، موفقیت تجاری برای محصول را تضمین نکند، زیرا عوامل متعددی روی موفقیت یا شکست یک محصول GM مؤثر هستند.

در گیاه savr flavr، ژن کد کننده آنزیم پلی گالاکتورونیداز است[1] (PG) هدف است. این آنزیم باعث هضم پکیتن دیواره سلولی شده و بنابراین باعث نرمی میوه و شروع لهیدگی در آن می‌شود. براساس یک تئوری، جلوگیری از تولید PG لزوماً باعث کند شدن روند فاسد شدن و راحت شدن حمل و نقل و جابجایی میوه می‌شود. این پدیده باعث ماندگاری بیشتر بوته در حالت بلوغ شده و بنابراین باعث افزایش کیفیت می‌شود. پس از بررسی‌ها و تغییرات فراوان، Flavr Savr نخستین غذای حاصل ازمهندسی ژنتیک بود که در ۱۹۹۴جهت استفاده در آمریکا مورد موافقت قرار گرفت. مقدار PG این محصول به میزان ۱٪ حالت معمولی آن است و درآغاز به نظر می‌رسید عامل موفقیت‌های تجاری فراوانی باشد. اما مشکلات فراوان ناشی از رشد و برداشت این گیاه زراعی (گوجه)، باعث شکست پروژه Flavr Savr از نظر تجاری شد. اکنون شرکت کالژن بخشی از شرکت مونسانتو است و باوجود شکست پروژه Flavr Savr، شرکت کالژن به نوآوری‌های خود در زمینه بیوفناوری ادامه می‌دهد که از آن جمله می‌توان به کلزای روغنی (که در آمریکا به عنوان روغن کانولا[2] شناخته می‌شود) اشاره کرد. این روغن حاوی میزان بالایی از اوریک اسید بوده که جهت سلامتی بسیار سودمند است.

گیاه برنج دارای چنان اهمیتی است که به عنوان یک ماده غذایی اصلی، هدف پژوهشگران در تولید گیاهان GM می‌باشد.

تلاش برای بهبود ارزش غذایی گیاهان زراعی محدود به بخش‌های تجاری یا غذای سالم نمی‌شود. برای میلیون‌ها نفر در سراسر جهان دستیابی به حداقل موادغذایی بجای اینکه یک انتخاب باشد، یک موضوع حیاتی است. برنج غذای عمده حدود ۳ میلیارد نفر را تشکیل می‌دهد. در حدود ۱۰٪ از این تعداد، از بیماری‌های ناشی از کمبود ویتامین A رنج می‌برند. تحقیقات نشان می‌دهد که سالانه یک میلیون کودک پیش از بلوغ در اثر این کمبود می‌میرند و بیش از ۳۵۰۰۰۰ نفر کور می‌شوند. لذا برنج یکی ازگیاهان زراعی است که با توجه به وابستگی غذایی زندگی حدود نصف جمعیت جهان به آن، مورد مطالعه گسترده قرارگرفته است. از نتایج این موضوع تولید برنج Miracle است که یکی از محصولات انقلاب سبز دهه ۱۹۶۰ محسوب می‌شود. با این حال، گسترش کشت در جنوب شرق آسیا منجر به تک کشت شدن برنج در این نواحی شده و باعث افزایش حساسیت به بیماری‌ها و آفات و وابستگی آن به آفت‌کش‌های مورد استفاده شد. بنابراین سازگاری گونه‌های

[1] Polygalacturonase(PG)
[2] Canola

جدید گیاهان زراعی موجود نیز مشابه گیاهان تغییر یافته ژنتیکی ممکن است با مشکلاتی مواجه گردد.

دو مشکل اصلی کمبود تغذیه‌ای به‌طور خاص در کشورهای در حال توسعه شایع است. این مشکلات شامل کمبود آهن و کمبود ویتامین A بوده و هر دو این موارد به دلیل کمبود این ریز مغزی‌ها در رژیم غذایی رخ می‌دهند. در آندوسپرم برنج مقدار بسیار اندکی آهن وجود دارد. مشکل دیگر باز جذب آهن است که به دلیل وجود ترکیبات شیمیایی تحت عنوان فیتات[1] دچار اشکال می‌گردد. کمبود سولفور نیز به مشکلات می‌افزاید، چرا که این ترکیب در جذب مناسب آهن از روده بسیار حائز اهمیت است. کمبود ویتامین A نیز به دلیل عدم بیوسنتز بتاکاروتن[2] در برنج است چرا که این ترکیب پیش‌ساز بیوسنتز ویتامین A است. در سال ۱۹۹۹ شرکت Ingo potrykus در زوریخ موفق به تولید برنج طلایی[3] شد، آندوسپرم دانه‌های این برنج حاوی بتاکاروتن است، در حالی که برنج معمولی فاقد آن است. بتاکاروتن پیش‌ساز ویتامین A است، لذا برنج‌هایی که از طریق مهندسی ژنتیک تولید می‌شوند (برنج طلایی) می‌توانند در رفع بخشی از مشکل کمبود ویتامین A موثر باشند. به نظر می‌رسد که این یک پیشرفت مثبت باشد. به هرحال منافع کمپانی در زمینه حقوق ثبت اختراع فناوری‌های مرتبط، و دیگر مشکلات غیر علمی باید قبل از حصول موافقت برطرف گردد تا کشورهای در حال توسعه بتوانند آزادانه به این فناوری دسترسی پیدا نمایند. روند توسعه و مسائل قانونی پیش رو همچنان ادامه دارند، اما این موضوع به روشنی مطرح است که برقراری توازن میان جنبه‌های تجاری کار و مزیت‌های بالقوه فناوری گیاهان تراریخت مشکل است. این مسئله موقعی بسیار حساس است که افرادی که باید بیشتر از آن بهره‌مند شوند شاید ابزار لازم برای تامین فناوری را نداشته و بنابراین مجددا پرسش‌های اخلاقی مشکل مطرح می‌شود.

مشکل بعدی در تقابل با مباحث خوب و رایج، می‌تواند در ارتباط با فناوری معروف حفاظت ژن مطرح باشد. این مرحله‌ای است که شرکت‌ها سیستم‌های خود را طراحی می‌کنند، لذا استفاده آنها با برخی دست‌ورزی‌ها که اساسا جدای از فناوری اصلی تراریخته است قابل کنترل است. این مسئله نگرانی بزرگی را در بین عموم و گروههای فشار بوجود آورده و بحث‌های تندی را بین این گروهها و شرکت‌هایی که فناوری را توسعه داده بودند به‌وجود آورد. حتی در زمینه معرفی اصطلاحات برای تشریح فناوری‌های مختلف نقطه نظرات بسیار متفاوت مخالفین و موافقین را می‌توان ملاحظه نمود. بنابراین یک روش تحت‌عنوان سیستم حفاظت از فناوری بوسیله شرکت ها ایجاد و فناوری پایان

---

[1] Phytat
[2] β-carotene
[3] Golden-rice

دهنده توسط دیگران بوجود آمد. یک نوع سیستم دیگر تحت عنوان فناوری محدودکنندهٔ استفاده از مواد ژنتیکی[۱] (GUTR) یا فناوری کنترل صفات ژنتیکی[۲] است. این روش همچنین تحت عنوان فناوری traitor نیز مشهور است. پس چه چیزی منجر به ایجاد چنین واژه‌های شده و آیا نیاز به نگرانی در این مورد وجود دارد؟

توسعه برنج طلایی یک مثال خوب علمی و یک هدف مطلوب است. اگرچه مسائل سیاسی ممکن است بر تعیین اینکه چطور منابع حاصله به اشتراک گذاشته و توزیع شوند موثر باشند.
توسعه و استقرار فناوری‌های حفاظتی یک موضوع بحث انگیز و احساسی در زمینه دست‌ورزی ژنتیکی گیاهان است که طرفین بحث دارای نقطه نظرات قوی هستند.

فناوری پایان دهنده در جائی استفاده می شود که گیاهان بطور جدی برای تولید بذور عقیم و یا عدم جوانه زنی مطلوب مهندسی می‌شوند. بنابراین کشاورزان برای امکان جمع آوری بذور جهت کشت در سال بعدی محدود شده و به به شرکت‌های تولید بذر وابسته می‌شود، به گونه‌ای که هر سال مجبور به خرید بذر هستند. شرکت‌ها بطور منطقی ادعا می کنند که به سرمایه قابل توجهی برای تولید یک گیاهان زراعی تراریخته نیاز دارند. گروهی دیگر بر این باور اصرار دارند که این شرایط محدود کننده باعث می‌شود که کشاورزان فقیر درکشورهای در حال توسعه متضرر شوند، چرا که امکان نگهداری بذر بعد از یک سال جهت کشت در سال زراعی بعدی وجود ندارد. تقریباً نیمی از کشاورزان دنیا در گروه فقیر قرار می گیرند و توان خرید بذر جدید برای فصل بعدی را ندارند. این درحالی است که آن‌ها در حدود ٪۲۰ از غذای دنیا را تولید کرده و خوراک ۱/۴ میلیارد نفر از مردم دنیا را تأمین می‌کنند. بنابراین در صورتی که استفاده از فناوری پایان دهنده فراگیر شود، موضوع محدودیت کشت مجدد بذر حاصل از یک سال در سال دیگر بعنوان یک موضوع اخلاقی مطرح خواهد بود. موضوع قابل توجه دیگر امکان انتقال عقیمی حاصل از این فناوری به سایر واریته‌ها، گونه‌ها و جنس‌ها است که این موضوع تأثیرات بسیار مخربی بر جوامع کشاورزی جهان سوم خواهد داشت.

فناوری Traitor یا GUTR شامل استفاده از یک "سوییچ" (که اغلب توسط یک ماده شیمیایی افزودنی کنترل می‌شود) برای صدور مجوز یا محدودیت استفاده از یک صفت خاص مهندسی شده‌است. شاید این روش دارای تقابل کمتری نسبت به فناوری پایان دهنده (Terminator Technology) باشد، زیرا بجای جلوگیری از تولید بذر، هدف آن تنظیم یک تغییر خاص است. با این وجود افراد زیادی هستند که در خصوص پتانسیل استفاده از این فناوری بسیار نگران هستند،

[3] Genetic use restriction technology
[4] Genetic trait control technology

اگر این "سوییچ" به فناوری خاصی نیاز داشته که در انحصار یک کمپانی خاص باشد، مجددا کشاورزان را به یک کمپانی خاص وابسته می‌کند.

برخی از شرکت‌های عمده بیوتکنولوژی کشاورزی به طور عمومی اعلام کرده‌اند که آنها فناوری پایان دهنده را توسعه نخواهند داد، که بنظر می‌رسد این یک موفقیت جزئی در برابر واکنش‌های منفی عمومی، کشاورزان و گروه‌های فشار باشد. با این وجود، در این زمینه هنوز مسائل مبهمی وجود دارد، با توجه به اینکه برخی گروه‌ها ادعا می‌کنند که فناوری GUTR در حال توسعه است. و اینکه یکی از شرکت‌های ادغام شده، میتواند قولهای داده شده توسط طرف دیگر ادغام را نفی کند. به طور کلی فناوری تولید گیاهان تراریخته با توجه به وجود دیدگاه‌ها و علایق متضاد و بعضاً عیب جویی‌های فراوان در این زمینه دچار تردید و بی‌ثباتی است و بررسی این موضوع تا مدت‌ها ادامه خواهد یافت.

استفاده از گیاهان به‌عنوان کارخانه های تولید کننده پروتئین‌های داروئی امری است که اخیراً توسعه یافته است و با این روش مواد دارویی با استفاده از گیاه تولید می‌شود (PMPs).

علاوه بر گیاهان زراعی GM، گیاهان تراریخته دارای پتانسیل قابل‌توجهی در زمینه تولید پروتئین دارویی را نیز دارند. چنانچه در فصل ۱۱ توضیح داده شده است، باکتری ها، مخمر و سلول‌های پستانداران جهت تولید پروتئین‌های ضروری با بهره گیری از فناوری DNA نوترکیب بطور رایج مورد استفاده قرار می‌گیرند. افق روشنی در خصوص استفاده از گیاهان تراریخت جهت تولید پروتئین‌های ضروری وجود دارد. تکثیر گیاهان نسبت به سلول‌های میکروبی و پستانداران بسیار ارزان‌تر است. هزینه پایین و عدم محدودیت، یک فرصت نامحدود در استفاده ازگیاهان تراریخت، جهت تولید پروتئین‌های ضروری ایجاد می‌کند. این زمینه به سرعت در حال توسعه است و تحت-عنوان تولید داروهای تولید شده در گیاه[1] (PMPs) نامیده می‌شود.

۱۳-۲) حیوانات تراریخته

تولید حیوانات تراریخته یک جنبه بسیار پیچیده از مهندسی ژنتیک است، چرا که از دو جهت سختی در تکنیک و از جهت ابهامات اخلاقی با مشکلاتی مواجه است. بسیاری از افرادی که مفید بودن دستورزی ژنتیکی قارچها، باکتری‌ها و گیاهان را سودمند میدانند، متوجه شدند که پذیرش دستورزی ژنتیکی حیوانات (به ویژه پستانداران) با مشکلاتی همراه است. به نظر می‌رسد که مباحثات عینی و مبنایی میان مجامع علمی، رسانه‌ها و مردم بر سر این موضوع در چند سال آینده یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های علمی باشد.

[1] Plant-made pharmaceuticuls

بحث پیرامون استفاده از فناوری GM موقعی‌که در مورد حیوانات مطرح شد، بسیار دور از دسترس شده و اغلب موجب طرح مسائلی در زمینه نگهداری حیوانات و همچنین تغییر جنبه‌های ژنتیکی این فناوری می‌شود.

۱۳-۲-۱) چرا حیوانات تراریخته؟

مهندسی ژنتیک تا الان تأثیر قابل‌توجهی بر مطالعه ساختار و بیان ژن در سلول‌های جانوری داشته است و این زمینه درحال توسعه است. مطالعات مربوط به سرطان یک نمونه شناخته شده در این زمینه است و مطالعات جاری در زمینه ژنتیک مولکولی بیماری‌ها، نیازمند استفاده گسترده از فناوری دست‌ورزی ژن است. در مورد تولید پروتئین در زیست فناوری (در فصل ۱۱ مورد بحث قرار گرفته است)، سنتز بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب حیوانی اغلب به‌صورت بسیار مطلوبی با استفاده از کشت سلول‌های پستانداران صورت می‌گیرد که اغلب این سلول‌ها تنها میزبان‌های تضمین کننده بیان درست ژن‌های مورد نظر است.

اصطلاح ترانس‌ژنیک بیشتر برای توصیف موجوداتی به کار می‌رود که با برخی ژن‌های معین و به صورت پایداری تغییر یافته اند، به طوری که بتوانند ژن مذکور را به نسل بعد انتقال دهند.

همانطور که در بالا به‌طور مختصر بیان شد کاربردهای مبتنی بر سلول به‌عنوان یک بخش مهم از مهندسی ژنتیک در حیوانات محسوب می‌شوند. با این حال اصطلاح ترانس‌ژنتیک معمولا برای یک موجود زنده کامل بکار می‌رود و تولید حیوان ترانس‌ژنیک بمراتب پیچیده‌تر از کار کردن با سلول‌های کشت شده است. بسیاری از مشکلات با استفاده از یک واریته از آن حیوانات مانند دوزیستان، ماهی، موش، خوک و گوسفند برطرف شدند.

تراریخته‌سازی می‌تواند برای اهداف مختلفی مانند تحقیقات پایه و کاربردهای بیوتکنولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات توسعه جنین‌شناسی بر مبنای انتقال ژن به تخم‌ها و یا جنین‌های نارس گسترش یافته است و فضای گستره‌ای برای دست‌ورزی حیوانات اهلی (مزرعه‌ای) با الحاق صفات مطلوب با استفاده از روش ترانسژنزیز وجود دارد. استفاده از موجودات کامل برای تولید پروتئین‌های نوترکیب نیز امکان پذیر بوده و در بعضی از گونه‌ها انجام شده است. این بخش تحت-عنوان حیوان مزرعه یا فارمینگ[1] (برگرفته از عبارت داروسازی[2]) بوده و در واقع در مورد استفاده از حیوانات تراریخته جهت تولید پروتئین‌های ضروری دارویی مطرح می‌باشد.

هنگامی‌که این موضوع مورد توجه جهانی قرار گیرد، امکان استفاده ازحیوانات تراریخته به نظر تقریباً نامحدود خواهد بود. رسیدن به این مرحله (فراگیری این فناوری) در بسیاری از موارد بسیار

[1] Pharming
[2] Pharmaceutical

سخت و زمان بر است. نتایج مورد نظر به گونه‌ای است که برای رسیدن به آن در حال حاضر تلاش و سرمایه فراوانی مورد نیاز است.

۱۳-۲-۲) تولید حیوانات تراریخته

روش‌های متعددی جهت انتقال ژن به جنین وجود دارد که هرکدام دارای مزایا و معایب خاصی هستند. برخی از این روش‌ها عبارتند از ۱- انتقال مستقیم و یا روش آلودگی Retrovial به سلول‌های بنیادی جنین که با وارد نمودن این سلول‌ها به یک جنین در مرحله بلاستوسیت[1] همراه باشد؛ ۲- روش آلودگی Retrovial جنین زودرس؛ ۳- ریزتزریقی مستقیم DNA به داخل گامت های ماده (تخمک ها)، سلول‌های تخم یا سلول‌های جنین نارس؛ ۴- انتقال به واسطه اسپرم؛ ۵- انتقال به سلول تخم تلقیح نشده؛ ۶-روش‌های فیزیکی مانند بیولیستیک[2] و الکتروفیوژن[3]. علاوه بر روش‌های گفته شده، روش انتقال هسته‌ای [4] (استفاده شده در کلون کردن بافت ها، بحث شده در فصل ۱۴) نیز وجود دارد که گاهی از جمله پروتکل‌های ترانس‌ژنزیز محسوب می‌شود.

ایجاد یک ابرموش در ابتدای سال‌های ۱۹۸۰ به‌عنوان یک نقطه عطف در مهندسی ژنتیک شناخته می‌شد.

موفقیت اولیه با استفاده از تزریق DNA به داخل یکی از پیش هسته‌های (گامت نر یا ماده) تخم بارور شده و درست قبل از مرحله ادغام پیش هسته‌ها و تشکیل تخم دیپلوئید، بدست آمد. این روش در اوایل ۱۹۸۰ منجر به تولید افتخارآمیز ابرموشی شد که یکی از نقطه عطف‌های مهندسی ژنتیک بود. در این آزمایشات یک کپی از ژن تولید کننده هورمون رشد موش[5] (GH) تحت کنترل پروموتر متالوتیوتین[6] (mMT) قرار گرفت. در این فرآیند، یک قطعه خطی از پلاسمید نوترکیب حامل ژن (MGH)، به سلول اسپرم که در شکل‌گیری تخم لقاح یافته شرکت می‌کند تزریق شد (به نظر می‌رسد که قطعه خطی بسیار راحت‌تر از توالی حلقوی داخل ژنوم وارد شوند). سپس تخم‌های بارور حاصله در رحم مادران نگهدارنده قرار می‌گیرند، و برخی از موش‌های حاصله ژن GH را بیان می‌کنند. چنان موش‌هایی دارای سرعت رشدی ۲ تا ۳ مرتبه سریع‌تر و اندازه‌ای بیش از ۲ برابر موش‌های شاهد هستند. خلاصه روش ریزتزریقی در شکل ۱۳-۸ آمده است.

---

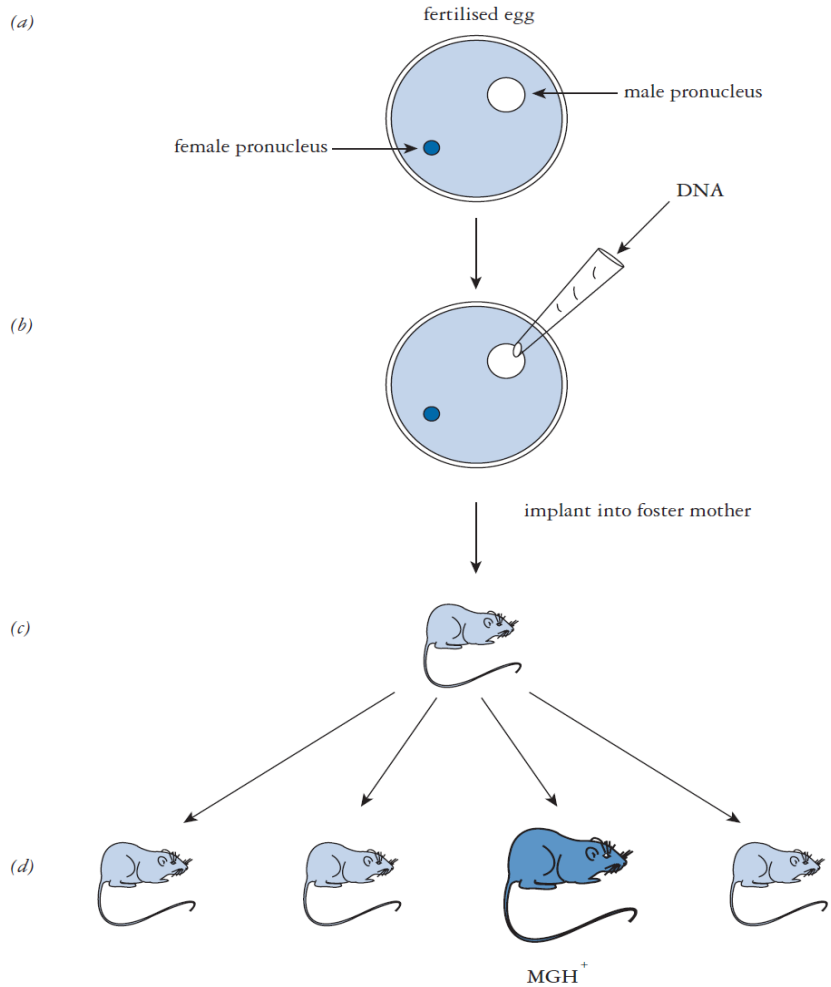
[1] Blastocyst
[2] Biolistics
[3] Electrofusion
[4] Nclear transfer
[5] Growth hormone
[6] Metallothionine

موزائیک و شیمر تغییراتی هستند که در همه سلول‌های حیوانی حامل ترانس‌ژن دیده نمی‌شوند، بلکه تنوعاتی هستند که ممکن است در موقع تولید حیوانات تراریخت ایجاد شوند.

در تولید حیوانات تراریخت، بهتر است که همه سلول‌های آن حیوان حاوی ترانس‌ژن باشند. حضور ترانس‌ژن در سلول‌های جنسی جاندار باعث می‌شود که ژن به صورت موفقیت آمیز به نسل های بعد منتقل شود و اگر قرار است موجود تراریخت در دراز مدت استفاده شود، ضروری است که ترانس‌ژن به نسل بعد منتقل شود. بنابراین انتقال ژن‌ها باید در مراحل اولیه رشد تخم و به طور ایده آل در مرحله زیگوت تک سلولی صورت گیرد. اگر این هدف محقق نشود، ممکن است که جنین به صورت موزاییک رشد کند، یعنی فقط بعضی از سلول‌های آن حامل ترانس‌ژن باشند. مثال دیگر از این نوع تنوع در جنین این است که جنین از دو فرد جداگانه تولید شود، مانند زمانی که از سلول‌های بنیادی جنینی استفاده می‌شوند. نتیجتاً یک موجود شیمر ایجاد می‌شود. در عمل ضرورتاً این امر یک مشکل نیست به طوری که موجود می‌تواند تلاقی داده شود و فرزندانی ایجاد کند که در تمام سلول‌های‌شان به صورت هموزیگوت ترانس‌ژن هستند. یک موجود شیمر که دارای ترانس‌ژن در سلول‌های جنسی خود است می‌تواند ژن را به نسل بعد انتقال دهد، لذا نتاج برای این ترانسژن هتروزیگوت خواهند بود (با فرض اینکه والد دیگر آنها هموزیگوت غیرترانسژن باشد). یک تلاقی دیگر با افراد همان نسل منجر به تولید ۲۵٪ نتاج نسل بعد به صورت هموزیگوت برای ترانس‌ژن خواهد شد. این روش به‌طور خلاصه برای موش در شکل ۱۳-۹ آمده است.

۱۳-۲-۳) کاربردهای فناوری حیوانات تراریخت

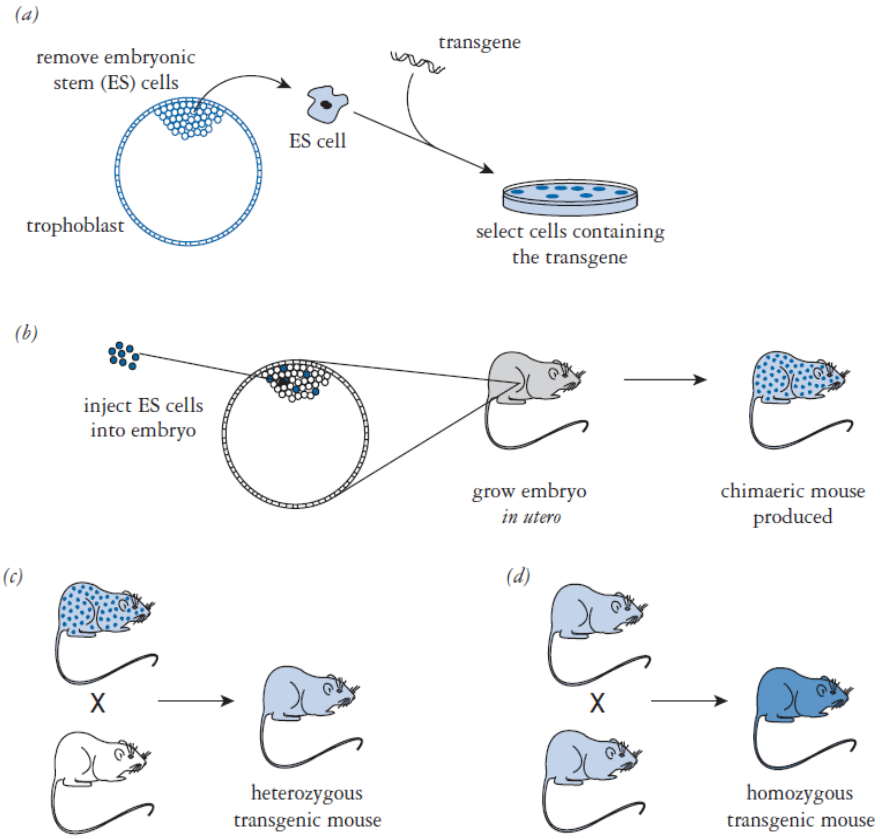
ژن سنتز کننده هورمون رشد به بسیاری از حیوانات از جمله خوک انتقال یافته است، البته در بیشتر موارد این فرآیند با عوارض جانبی نامطلوبی همراه بوده. خوک‌های حاوی ژن هورمون رشد نسبت به حالت عادی راندمان تغذیه ای بیشتری داشته و میزان چربی زیرپوستی آنها نسبت به حالت نرمال کمتر است. با این حال مشکلاتی از قبیل افزایش بیش از اندازه حجم قلب، افزایش زخم‌های دستگاه گوارش، بیماری‌های پوستی، بیماری‌های کلیوی و بیماری‌های مفاصل در این حیوانات بوجود آمده است. بر این اساس تولید حیوانات سالم مزرعه‌ای بسیار دشوار است. هرچند این فناوری اکنون مورد استفاده است اما با این حال روشن است که جهت استفاده گسترده از این فناوری زمان و کار فراوانی مورد نیاز است.



شکل ۱۳-۸) تولید ابرموش. (a) تخم‌های بارور شده از یک موش ماده جدا و (b) DNA حامل ژن هورمون رشد موش رت/ پروموتر متالوتیونین (MGH) موش به درون هسته گامت نر تزریق شد. (c) سپس تخم‌ها به یک مادر نگهدارنده منتقل می‌شوند. (d) برخی از بچه‌ها، ژن MGH را بیان کرده (MGH^+) و نسبت به بچه‌های طبیعی، بزرگ‌تر هستند.

مطالعه مبحث تمایز، یکی از جنبه‌های مهندسی ژنتیک است که تا کنون اطلاعات مهمی از آن بدست آمده است. با استفاده از انتقال ژن به جنین می‌توان فرآیند تمایز را از طریق بیان ژن‌های ویژه در بافت‌های خاص مطالعه کرد. با کلون کردن ژنها از مگس سرکه و استفاده از عوامل متحرک ژنی (ترانسپوزون P) به عنوان وکتور، می‌توان لاین‌های پایدار تراریخته مگس سرکه

Drosophila melanogaster را تولید نمود. در واقع مگس سرکه که یکی از موجودات موثر در مطالعات ژنتیک کلاسیک بود، اکنون در مطالعات ژنتیک مولکولی و از طریق استفاده از تکنیک های مهندسی ژنتیک کاربرد بسیار دارد.



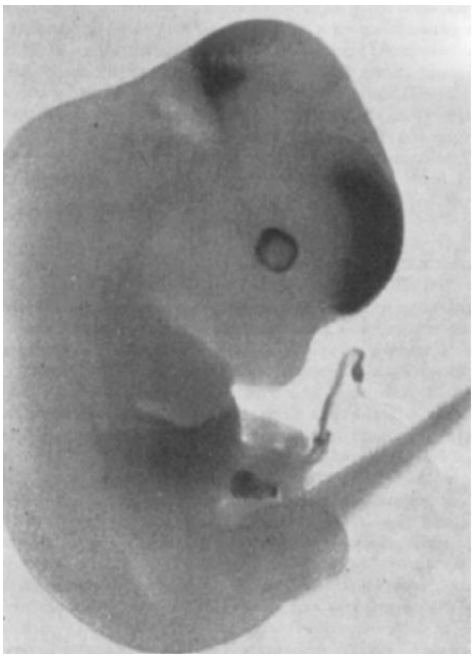
شکل ۱۳-۹) تولید موش تراریخته با استفاده از فناوری سلول‌های بنیادی. (a) سلول‌های بنیادی (ES cells) از جنین نارس جدا و سپس کشت می‌شوند. ترانس‌ژن هدف وارد سلول‌های بنیادی می‌شود به گونه‌ای که این سلول‌ها قادر به رشد در محیط رشد انتخابی باشند. (b) سلول‌های بنیادی حامل ترانس‌ژن به درون سلول‌های بنیادی یک جنین دیگر تزریق می‌شوند، به طوری که این سلول‌ها به مجموعه همه سلول‌ها وارد شوند. جنین وارد یک مادر باردار شده و یک موش تراریخت شیمر ایجاد می‌شود. با تلاقی شیمر با یک موش نرمال همانطور که در شکل نشان داده شده (c) بعضی از تراریخت‌ها به صورت هتروزیگوت تولید خواهند شد. حال اگر تراریخت‌های هتروزیگوت با هم تلاقی داده شوند ۲۵٪ از نتاج به صورت موش‌های تراریخت هموزیگوت خواهند بود (d).

در پستانداران، موش یکی از مناسب ترین سیستم‌های مدل برای مطالعات نمو جنینی را فراهم می‌کند و بیان بسیاری از ترانس‌ژن‌ها در این حیوان مورد مطالعه قرار گرفته است. در شکل ۱۳-۱۰ مثالی از این موضوع نشان داده شده است. در این شکل فرآیند استفاده از ژن *lacZ* به عنوان نشانگر برای ردیابی بیان ژن اختصاصی بافت نشان داده شده است. در این مثال ژن *lacZ* تحت کنترل پروموتر ضعیف تیمیدین کیناز[1] (TK) ویروس عامل تبخال (HSV) الحاق و سازه HSV-TK-lacZ حاصل شده است. این ساختار جهت شناسایی دومین‌های فعال کروموزمی در جنین های در حال تمایز مورد استفاده قرار می‌گیرد و جهت تشخیص بیان ژن‌های مخصوص مغزی در شکل ۱۳- ۱۰ نشان داده شده است.

موش یکی از مفیدترین جانداران مدل در تحقیقات تاریخته‌سازی است. انواع مختلفی از این جاندار برای اهداف مختلف تولید شده‌اند.

اگر چه استفاده از موجودات تراریخت، درک بسیاری از فرآیندهای رشدی را فراهم می‌کند، اما همیشه بیان ژن‌های الحاق شده مشابه آنچه در بیان جنین‌های نرمال رخ می‌دهد نیست. بنابراین هنگام تفسیر نتایج، رعایت احتیاط لازم است. با وجود مشکلات بالقوه، پدیده ترانس‌ژنی یک ابزار قوی برای زیست شناسان تمایز محسوب می‌شود.

[1] Thymidine kinase



شکل ۱۳-۱۰) بیان یک ترانس‌ژن در جنین موش. ناحیه کدکننده β-galactosidase (*lacZ*) تحت کنترل پروموتر تیمیدین کیناز از ویروس تبخال برای تولید ساختار ژنی HSV-TK-lacZ قرار گرفته است. این ژن به درون هسته‌های گامت نر تزریق و موش تراریخت تولید شد. شکل فوق یک جنین ۱۳ روزه را از یک سویه تراریخت نشان می‌دهد که ترانس‌ژن را درون بافت مغزی در دوران جنینی بیان می‌کند. بررسی با استفاده از روش رنگ سنجی و تولید رنگ آبی با استفاده از فعالیت β-galactosidase روی ماده X-gal انجام شد. بنابراین نواحی تیره در قسمت‌های جلو و عقب مغز نشان دهنده مکان‌های بیان ژن *lacZ* است. عکس از دکتر S. Hettle. از Allen و همکاران (۱۹۸۸) مجله Nature (لندن) ۳۳۳: ۸۵۲-۸۵۵. حق تألیف (۱۹۸۸) مربوط به مجله Macmillan.

موش همچنین به‌عنوان یک حیوان مدل در بررسی وضعیت بیماری‌ها نیز کاربرد دارد. یک مثال مشهور از انکوموش[1] توسط فیلیپ لیدر[2] و همکارانش در دانشگاه هاروارد به دست آمد. موش‌های تولید شده حاوی ژن تومورزای c-myc و نیز بخش‌هایی از ویروس عامل تومور پستان موش (MMT) بودند که ژن اخیر باعث سرطان سینه می‌شود. انکوموش[3] به عنوان نخستین حیوان پرسلولی تغییر یافته در آمریکا شناخته می‌شود. علاوه براین در بررسی بیماری‌های سرطان

[1]. Oncomouse
[2]. Philip Leder
[3]. Oncomouse

پروستات، سندرم سیستم ایمنی (SCIDS) و آلزایمر نیز از موش‌های تراریخته استفاده شده است.

بسیاری از واریته‌های موش تراریخت تولید و به‌عنوان بخش مهمی از تحقیقات بررسی بسیاری از بیماری‌های انسانی استفاده شدند. توسعه علم ژنتیک مولکولی و بهبود روش‌های تولید حیوانات تراریخته منجر به تولید موش‌های تراریخته که حاوی ژن‌های فعال یا غیر فعال هستند، شده است. هنگامی که ژن غیر فعال می‌شود و یا با یک ژن موتانت جایگزین می‌شود، یک ناک اوت موش بوجود میآید. استفاده از موش‌های ناک اوت شده در تحقیقات بیماری کیست مثانه[1] (FC)، نمونه‌ای از کاربرد این گونه تحقیقات در ۲ زمینه علوم پایه و توسعه فرآیندهای ژن درمانی است. در این پروژه موش‌های مورد نظر جهت بیان آلل‌های موتانت CF مهندسی شدند، در این کار موتاسیون فقدان ژن F508 که مسئول بروز شدید CF است نیز استفاده شد. موش به عنوان یک حیوان مدل این امکان را برای محقق فراهم می‌کند که آزمایش‌هایی که امکان انجام آن بر روی انسان وجود ندارد را اجرا کند. هر چند ممکن است نتایج حاصل کاملاً به انسان قابل تعمیم نباشد.

بیش از ۵۰۰۰ نمونه در پایگاه‌های اطلاعاتی موش‌های ناک اوت جهش دار وارد شده که منبع بزرگی برای پژوهشگران در خصوص استفاده از موش به‌عنوان یک موجود مدل جهت مطالعه بیان ژن، رشد و توسعه و نیز مطالعه بیماری‌ها است.

در سال ۱۹۹۵ یک بانک اطلاعاتی موش‌های ناک اوت شده برای جمع آوری جزئیات موش‌های ناک اوت راه اندازی شد. این بانک تحت عنوان پایگاه اطلاعاتی موش‌های ناک اوت و جهش یافته (MKMD) شناخته می‌شود و آدرس آن (http://research.bmn.com/mkmd/) است. در حال حاضر بیش از ۵۰۰۰ نمونه در این پایگاه وجود داشته که حاوی ۲۰۰۰ ژن ویژه بوده و روزانه نیز به این تعداد افزوده می‌شود. این موضوع نشان دهنده آن است که موش به‌عنوان یکی از حیوانات مؤثر و اساسی در تحقیقات مدرن ترانس‌ژنیک است.

مثال‌های اولیه در زمینه تولید پروتئین‌ها در حیوانات تراریخته شامل بیان پروتئین فعال کننده پلاسمینوژن بافت‌های انسانی (TPA) در موش تراریخت، و فاکتور IX انعقاد خون انسانی (FIX) در گوسفند تراریخت است. در هر دو مورد گفته شده، پروتئین‌های مورد نظر در شیر حیوان تولید می‌شوند و لذا ژن پروتئین مورد نظر تحت کنترل پروموتور ژن شیر قرارگرفت. در موش توالی مورد نظر تحت کنترل توالی تنظیمی WAP قرار گرفت وساختار WAP-TPA تشکیل شد. در گوسفند ژن بتا-لاکتوگلوبولین (BLG) جهت ایجاد ساختار BLG-FIX و بیان پروتئین مورد نظر استفاده شد. سایر حیوانات تراریخت به‌عنوان یک بیوراکتور مورد استفاده قرار گرفته و

[1] Cystic fibrosis

فراورده‌های ضروری انسانی را تولید می‌کنند، از جمله: تولید هموگلوبین انسانی در خوک و گاوهایی که لاکتوفرین انسانی را تولید می‌کنند.

تولید یک پروتئین دارویی در شیر یک روش ایده آل برای تهیه منبعی قابل اطمینان از حیوانات شیرده را فراهم می‌کند، و فرایند خالص‌سازی پروتئین از شیر یک فرآیند شناخته شده است. این روش توسط دانشمندان انستیتو روزلین[۱] که در نزدیکی ادینبرگ واقع است انجام شده که با شرکت بیوفناوری داروئی PPL همکاری می‌کرد. در سال ۱۹۹۱ نخستین گوسفند تراریخت به نام تریسی[۲] تولید شد. پروتئین‌های انسانی تولید شده در شیر این گوسفند در حدود ۴۰ گرم بر لیتر بود که این پدیده نشان دهنده یک پتانسیل بالا در این زمینه است. شرکت PPL در ادامه تولید پروتئین‌های مذبور مواردی شامل: آلفا-۱-آنتی تریپسین[۳] (برای درمان بیماری CF)، فیبرینوژن[۴] (برای استفاده در موارد پزشکی) و فاکتو[۵]IX (برای درمان هموفیلی نوع B) را تولید کرد.

استفاده از حیوانات تراریخته به‌عنوان تولیدکنندگان محصولات با ارزش بالا در مقایسه با گیاهان تراریخته بیشتر توسعه یافته است. اگرچه بر سر راه موفقیت این فناوری اغلب مشکلات علمی و تجاری ممکن است وجود داشته باشد.

حیوانات به عنوان بیوراکتورها می‌توانند جایگزینی برای تخمیر باکتری‌ها یا مخمرهای حاوی ژن مورد نظر استفاده شوند. این روش اکنون روشی مرسوم بوده و در بسیاری از شرکت‌های زیست فناور مورد استفاده قرار می‌گیرد. همانگونه که قبلا مشاهده شد، این فناوری گاهاً تحت عنوان فارمینگ[۶] خوانده می‌شود که در مورد حیوانات تراریخت اشاره به حیوانات مزرعه دارد. باتوجه به مشکلات در زمینه بیان صحیح و فراوری برخی از پروتئین‌های پستانداران در میزبان‌های غیر پستاندار، این اثبات کننده اهمیت توسعه فناوری حیوان تراریخت است.

چنانکه در فصل ۱۱ گفته شد، دانش خوب ضرورتاً منجر به تولید یک فراورده مفید نخواهد شد، لذا توجه به جنبه‌های تجاری و راهبردی برای ارایه یک فراورده خوب به بازار مهم است. یک مثال در این زمینه تلاش برای استفاده از پتانسیل تخم مرغ جهت تولید داروی ضد سرطان است که اخیراً صورت گرفته است. بر مبنای همکاری بین موسسه روزلین، موسسه علوم زیستی دارویی آکسفورد و موسسه ویراژن[۷] پروتئین‌های مفیدی در سفیده تخم مرغ‌های تراریخته تولید شدند. در حالی که این علم بسیار جدید وهیجان‌انگیز است، جنبه‌های تجاری این پروژه در سال ۲۰۰۷ توسط شرکت

---

1. Roslin Institute
2. Tracy
3. α-1-antitrypsin
4. Fibrinogen
5. Factor IX
6. Pharming
7. viragene

ویراژن به‌صورت یک بیانیه که حاکی از توقف استفاده از این سیستم بود مطرح گردید. چنین مواردی غیر معمول نیست و ممکن است بنظر یک شکست تلقی شود، اما کار در یک نگاه کلی ادامه خواهد داشت، همچنانکه صنعت بالغ می‌شود، توسعه موفقیت‌های تجاری بدون شک در آینده بیشتر خواهد شد.

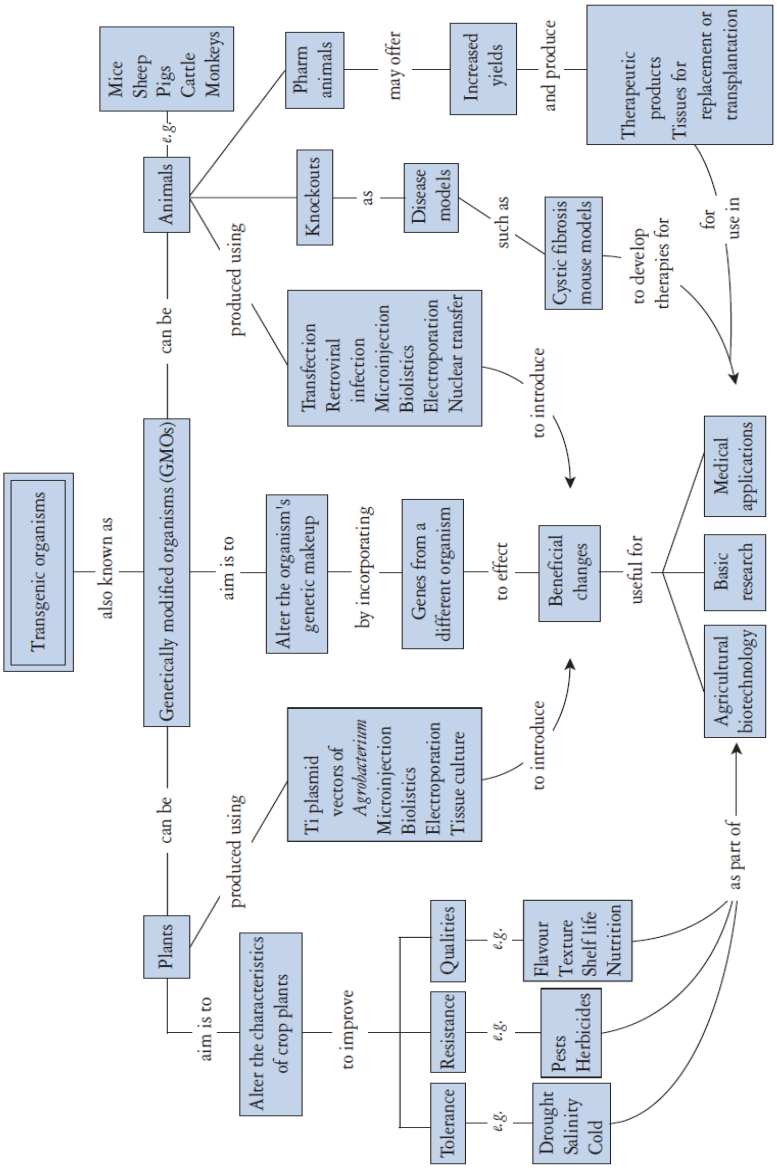
حیوانات تراریخته همچنین پتانسیلی جهت تولید بافت‌ها برای انجام زنوترانسپلنتیشین[1] به‌وجود آورده‌اند. از حیوانات مورد استفاده برای این منظور می‌توان خوک را نام برد، چرا که اندام‌های این حیوان از نظر اندازه مشابه اندام‌های انسان است. جهت توسعه این فناوری، هدف اصلی این است که ویژگی‌های تشخیصی سطح سلولی بافت دهنده تغییر نماید، چرا که در این صورت بافت پیوند خورده به وسیله سیستم ایمنی انسان پس زده نخواهد شد. علاوه بر اندام‌های کامل حیوانات بالغ، امکان جای‌گزینی بافت در حال رشد به‌عنوان یک بخش اضافی یک حیوان تراریخت وجود دارد. هر دو جنبه زنوترانسپلنتیشی در حال بررسی است و در این راستا بسیاری از مشکلات علمی و ابهامات اخلاقی در حال حل شدن است. با توجه به اشکالات بافت دهنده و نتایج از دست دادن زندگی یا از دست دادن کیفیت زندگی تحت تأثیر آن بافت، بسیاری از انسان‌ها احساس می‌کنند که باید روش زنوترانسپلنتیشین به صورت شفاف‌تری مورد بحث قرار گیرد تا این روش هنگامی که کاملاً توسعه یافت به عنوان یک ابزار عملاً از آن استفاده شود.

استفاده از فناوری ترانس‌ژنیک به‌عنوان زنوترانسپلنتیشین امری است که می‌تواند برخی مشکلات مربوط به عرضه و تقاضا، که در زمینه پیوند اعضاء وجود دارد را برطرف کند.

آخرین نکته ما در ارتباط با حیوانات تراریخته این است که این فناوری را به انسان‌ها نزدیک‌تر کرده است. در ژانویه ۲۰۰۱ نخستین پستاندار غیر انسان تراریخت تولد یافت. این جاندار یک میمون بود. این جاندار توسط دانشمندان در اورگون پرتلند تولد یافت. او به نام اندی[2] نام‌گذاری شد که دارای یک قطعه DNA خاص است. جهت تایید وضعیت سلول‌های تراریخت اندی از یک ژن نشانگر ستاره دریایی که پروتئین فلورسنت سبز رنگ (GFP) تولید می‌کند، استفاده شد. اندی به عنوان یک حیوان با شباهت زیاد به انسان امکانات تازه‌ای را برای بررسی بیماری ها و درمان آن ها فراهم کرده است. او همچنین باعث پدید آمدن سئوالات و ابهامات اخلاقی پیرامون تحقیقات ترانس‌ژنیک در انسان شد، چنان‌که برخی افراد دچار یک مقدار ناراحتی می‌شوند. حقیقتاً در سال‌های آینده توسعه فناوری ترانس‌ژن، بسیار مورد توجه خواهد بود.

---

[1] Xenotransplantation
[2] Andi



نقشهٔ مفهومی فصل سیزدهم

فصل چهاردهم: سایر منابع کلون سازی

اهداف

* معرفی کلی محدوده و هدف تکنولوژی کلون سازی موجودات؛
* توصیف روش‌های مورد استفاده در جهت کلون سازی گیاهان و جانوران؛
* بحث در خصوص موارد استفاده رایج در خصوص کلونینگ توارثی و درمانی؛
* معرفی موارد علمی، اقتصادی و اخلاقی مربوط به تکنولوژی کلون سازی موجودات.

خلاصه فصل/ موارد یادگیری:

بعد از مطالعه این فصل باید به توانایی های زیر دست یابید:

* تعریف اصطلاح کلون سازی توارثی و کلون سازی درمانی؛
* تاریخچه کلون سازی جانداران و نحوه توسعه آن؛
* مفاهیم سلولی توتی پوتنت، پلوری پوتنت و مالتی پوتنت؛
* روش های مورد استفاده در کلون سازی جانداران؛
* تفاوت های موجود در انتقال هسته‌ای و تکنیک قطعه قطعه کردن جنین؛
* موارد اخلاقی پیرامون کلون سازی جانداران.

لغات کلیدی:

دالی، کلون سازی مولکولی، کلون سازی جانداران، کلون سازی توارثی، کلون سازی درمانی، توسعه، همونکلوس، اپی ژنتیک، موقتی (دوره‌ای)، فضایی، انتقال هسته، انتقال هسته سلول‌های جنینی (SNCT)، تکه سازی جنین، توتی پوتنسی هسته‌ای، پلوریپوتنت، مالتی پوتنت، تمایزیافته برگشت ناپذیر، Rana pipiens، *Xenopus laevis*، چرخه سلولی، مرحله G_0، تلومر، سندروم زاده بزرگ.

در پنجم ماه جولای ۱۹۹۶ در مؤسسه تحقیقاتی روزلین[1] نزدیک به ادینبرگ[2] یک بره به دنیا آمد. این موضوع در ظاهر یک امر طبیعی بود، اما هنوز هم به‌عنوان یک دستاورد مهم در علم زیست شناسی شناخته می‌شود. این بره در واقع یک کلون بود و بنام دالی[3] نام‌گذاری شد. دالی اولین موجودی بود که از کلون کردن سلول‌های بالغ تمایز یافته بدست آمد، که این موفقیت را بعنوان دستاورد بزرگ و مهم جلوه می‌داد. در این فصل به طور خلاصه به بحث در مورد این جنبه از تکنولوژی ژنتیک می‌پردازیم.

تا کنون در این کتاب، در مورد موضوع همسانه سازی مولکولی بحث کرده‌ایم، جائیکه هدف یک فرآیند آزمایشی جداسازی توالی یک ژن برای آنالیزهای بعدی و استفاده از آن است. در همسانه سازی موجودات، هدف تولید یک موجود از یک سلول حاوی یک مجموعه کامل از ساختار ژنتیکی فرد است. در مورد روش‌های تولید موجودات تراریخته در فصل ۱۳ بحث شد. همچنین در ابتدای آن فصل در خصوص همسانه‌سازی صحبت شد، هرچند که موجودات تراریخت ضرورتاً کلون نیستند. همچنین می‌توان گفت که یک کلون ضرورتاً تراریخت نیست. بنابراین همسانه‌سازی موجودات یک قسمت مهم از فناوری دست‌ورزی ژن بوده و نیز بیشترین سهم را در علم ژنتیک دارد. از نظر دورنمای گسترده تر همسانه‌سازی موجودات به‌عنوان یک موضوع نگران کننده است، بنابراین بحث در مورد آن در کتابی که هدف اولیه آن آموزش روش‌های دست‌ورزی ژن است، ضروری به نظر می‌رسد.

همسانه‌سازی موجودات را می‌توان بر اساس هدف انجام آن به چند قسمت تقسیم کرد. هنگامی‌که هدف تولید یک نسخه از موجود اصلی باشد، اصطلاحاً به آن همسانه‌سازی تولیدمثلی Reproductive گویند. پیشرفت‌های اخیر در زمینهٔ فناوری سلول‌های بنیادی زمینه‌هایی را برای استفاده از همسانه‌سازی جنین ها جهت تولید انواع بافت‌ها برای بهره‌گیری در تحقیقات و تیمار بیماری‌ها فراهم کرده است. این جنبه از همسانه‌سازی تحت عنوان همسانه‌سازی درمانی نامیده می‌شود.

همسانه‌سازی موجودات را می‌توان به دو بخش تولیدمثلی Reproductive و درمانی تقسیم کرد که هرکدام اهداف خاص خود را دارند.

---

[1] Roslin
[2] Edinburgh
[3] Dolly

۱۴-۱) عقاید اولیه و آزمایش‌ها

خبر تولد دالی در نشریهٔ نیچر[1] در ماه فوریه سال ۱۹۹۷، جامعه علمی را به شدت تحت تأثیر قرار داد. با این حال اصول علمی اولیهٔ آن تاریخچه‌ای طولانی دارد و می‌تواند به گذشته و به آزمایشات مربوط به کشت جنین در اواخر سال ۱۸۰۰ و اوایل ۱۹۰۰ مرتبط گردد. در ابتدا جنین شناسان در جست و جوی پاسخ به پرسش نمو بودند یعنی: چگونه یک موجود پر سلولی پیچیده از یک تخم بارور شده به وجود می‌آید؟

دو نظریه روشن در خصوص نمو و توسعه وجود دارد. یکی از آنها این است که هر چیزی به طریقی از قبل ایجاد شده است و نمو به سادگی یعنی بازشدن الگوهائی که از قبل موجود بوده اند. این نظریه پیش تشکیلی[2] نام دارد و در غایت نهایی آن تصور میشود که یک موجود کامل به نام Homunculus (یک انسان کوچک) در داخل اسپرم قرار داشته و آماده رشد و تبدیل به یک فرد جدید در طی فرایند نموی خود است. در مقابل آن نظریه اپی ژنز[3] مطرح است که در آن نمو به عنوان یک فرآیند تکراری است که در آن رشد و توسعه سلول‌ها بر اساس ارتباط شان با هم و با محیط شان شکل می گیرد. همچنانکه در مورد سایر تئوری‌های متضاد دیده می‌شود، هر روز ممکن است جنبه خاصی از هر یک از این نظریه‌ها مورد توجه قرار گیرد. مطمئناً اطلاعات ژنتیکی از قبل شکل گرفته‌اند. بنابراین ژنوم می‌تواند به عنوان یک مجموعه از راهنمایی‌های راهبردی باشد که باز شدن ساختارهای در هم پیچ خورده جنین را محقق می سازد. به هر حال با افزایش اهمیت جایگاه پروتئین‌ها در سلول (پروتئوم)، پرواضح است که فرایند نمو، فرآیندی برهمکنشی است که شامل بسیاری از فاکتورها بوده و بیان متفاوت ژن‌ها مکانیسمی است که بواسطه آن از اطلاعات ژنتیکی موجود در جنین ساختارهای پیچیده ایجاد می‌شود. علاوه برکنترل بیان ژن که ضرورتاً تأثیر مستقیمی بر جنین‌زایی دارد، حرکت سلول‌ها و تشکیل الگوهای تعریف شده امکان ایجاد ساختارهای پیچیده را فراهم می‌کند. روی هم رفته فرایند نمو شامل یک سری از مراحل پیچیده برهمکنش در دو بخش زمان و مکان است. این مراحل در شکل ۱۴-۱ نشان داده شده‌اند.

تکامل یک جنین از یک سلول یک فرایند پیچیده ایست که شامل برهمکنش بین سلول‌ها و محیط اطراف آن‌ها می‌شود.

بیان متفاوت ژن و برهمکنش عوامل مختلف در زمان و مکان برای پیشرفت نرمال فرایند نمو جنین امری ضروری و لازم به‌شمار می‌رود.

---

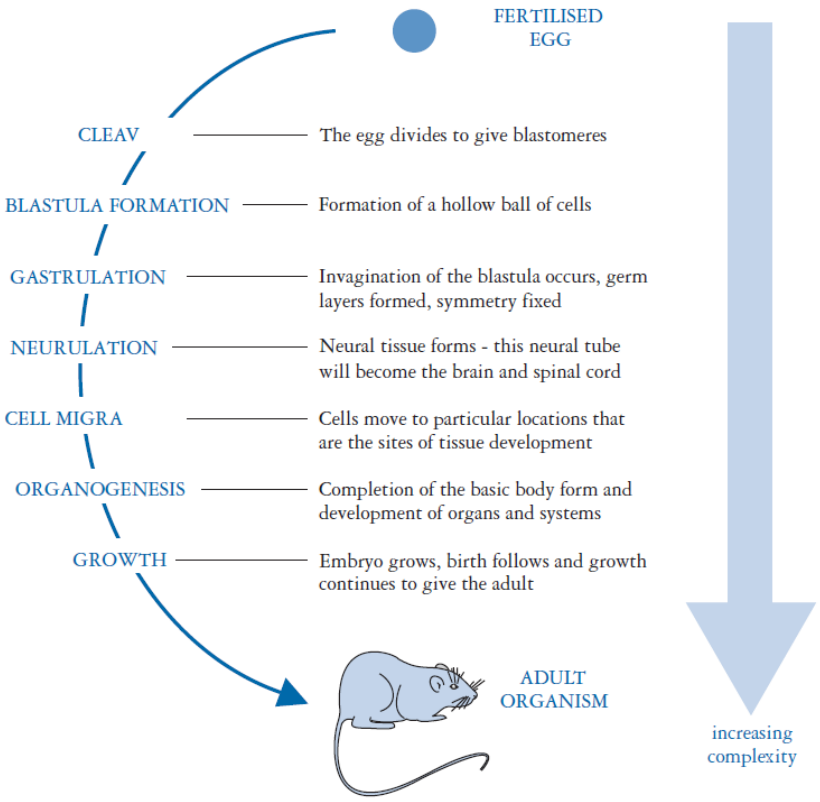
[1] *Nature*
[2] Preformationism
[3] Epigenesist

۱۴-۱-۱) اولین مراحل بسوی کلون سازی

دانش اخیر ما در پیشرفت‌های مربوط به جنین شناسی، همان طور که در شکل ۱۴-۱ نشان داده شده، در مدت زمان طولانی محقق شده است. اولین جنین شناس ارسطو بود، وی اولین کسی بود که نظریهٔ اپی ژنز[1] (تشکیل از نو) را بیان کرد. اخیراً آگوست =وایزمن[2] تلاش کرد تا پدیدهٔ نمو را به صورت یک فرایند یک طرفه بیان کند. در سال ۱۸۸۵ وی پیشنهاد کرد که اطلاعات ژنتیکی سلول‌ها با هر تقسیم سلولی در طی نمو کاهش می یابند. این تئوری موجب شد تا گروهی از دانشمندان در زمینه اثبات و یا رد این تئوری کار کنند. نتایج بدست آمده تا حدی متناقض بود، اما در سال ۱۹۰۲ هانس اسپمان [3] با استفاده از یک تار موی سر پسرش توانست یک جنین سمندر دو سلولی را به دو قسمت تقسیم کند. وی مشاهده کرد که در نهایت هر قسمت به یک موجود نرمال تبدیل شد. تحقیقات بیشتر تأیید کنندهٔ این نتایج بود، و همچنین نشان داده شد در مواردی که یک هسته از جنین جدا شد و برای تولید یک سلول کامل، یک موجود کاملاً نرمال از آن بدست می‌آمد. بنابراین نظریهٔ وایزمن در خصوص کاهش (تدریجی) منابع ژنتیکی درست نبود- یعنی کلیهٔ سلول‌ها در جنین در حال نمو توانایی هدایت کامل فرآیند تکوین جنینی خود را حفظ می کنند.

آزمایش‌های اولیه در زمینه کلون سازی، از تکنیک تقسیم جنین به قسمت‌های کوچکتر برای ایجاد موجودات کلون شده استفاده می‌کرد.

[1] Epigenesis
[2] August Weismann
[3] Hans Spemann



شکل ۱۴-۱) روند تدریجی نمو در موش. حرکت از یک تخم بارور شده به سمت یک موجود بالغ شامل تقسیم سلولی، تمایز سلول و ایجاد الگوهای پیچیده در حین جنین زایی است. تمام این موارد باید بطور هماهنگ در زمان و مکان مناسب انجام شود تا فرآیند به نحو موفقیت امیزی تکمیل گردد. زیست شناسی سلولی و مولکولی (Nicholl, 2000).

در سال ۱۹۳۸ اسپمان، کتابش با عنوان " توسعه و القا جنین[1]" که مربوط به جزئیات آزمایشات وی بود، را چاپ کرد. در این کتاب وی آنچه را که تحت عنوان "آزمایشات خارق العاده" می‌نامید، مطرح کرد، که در آن هسته از یک سلول حذف و در یک تخم که قبلاً هستهٔ آن خارج شده است، قرار گیرد. اسپمان نتوانست موفقیتی در این زمینه به‌دست آورد، بنابراین وی از واژهٔ خارق‌العاده در این خصوص استفاده کرد. با این حال وی تکنیکی را پیشنهاد کرد که بعدها تحت‌عنوان کلون کردن با استفاده از انتقال هسته نامیده شد (بهتر شناخته شده تحت عنوان انتقال هسته سلول

[1] *Embryonic Development and Induction*

سوماتیکی[1] یا SCNT). متأسفانه، وی نتوانست زنده بماند تا نتیجهٔ تلاش‌هایش را ببیند. اولین موفقیت در مورد همسانه‌سازی تا قبل از سال ۱۹۵۲ حاصل نشد، دقیقاً هفت سال پس از مرگ وی.

ایده انتقال کامل یک هسته به درون یک سلول تخم با هدف تولید یک کلون در سال ۱۹۳۸ ارائه شد. این تکنیک به حد کافی توسعه نیافت تا اینکه در سال ۱۹۹۶ دالی با این تکنیک متولد شد.

۱۴-۱-۲) توتی پوتنسی هسته ای

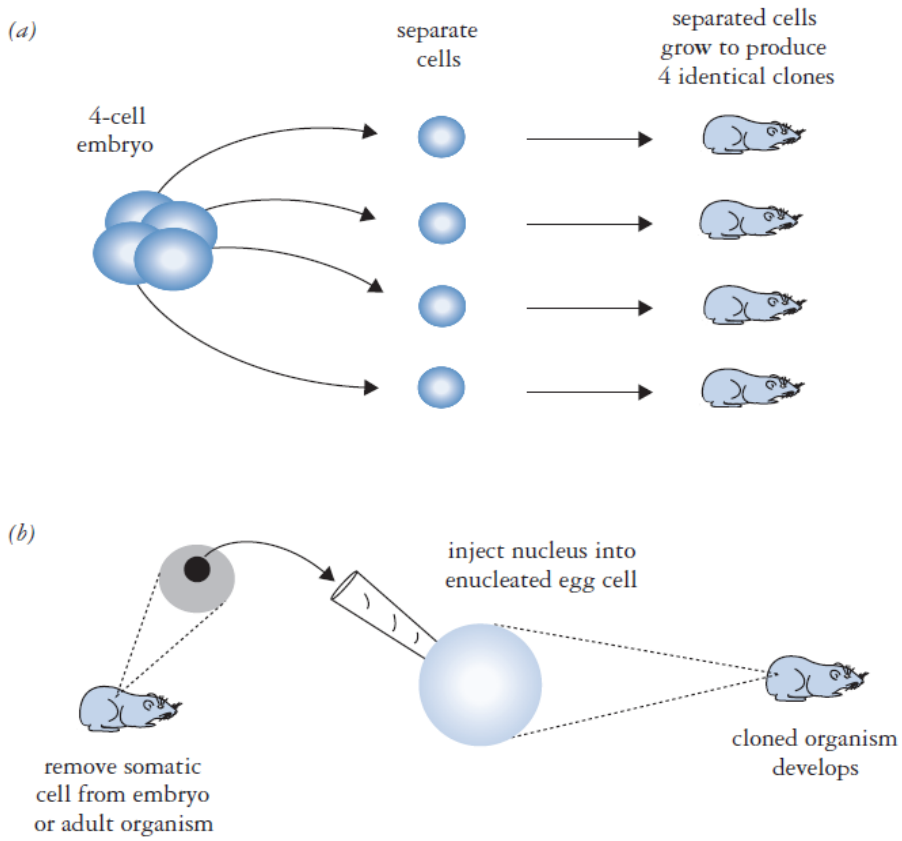
تحقیقات اسپمان قسمت مهمی از توسعهٔ تکنولوژی جنین شناسی نوین بود. به راستی که می‌توان وی را پدر این علم دانست. وی تئوری انتقال هسته را ارائه داد و همسانه‌سازی را با استفاده از تقسیم جنین[2] به چند قسمت نشان داد. اصول اصلی این دو روش در شکل ۱۴-۲ نشان داده شده است. آزمایشات تقسیم جنین که ایده‌های وایزمن را رد کرده بود نشان داد که سلول‌های جنینی توانایی تشکیل تمام انواع سلول‌ها را دارند. این پدیده تحت عنوان توتی پوتنسی هسته ای[3] شناخته می‌شود که امروزه قسمت اصلی ژنتیک نمو است. به یک سلول توتی پوتنت گویند که بتواند به صورت مستقیم تمام سلول‌ها را در موجود مورد نظر ایجاد کند. اگر سلول بتواند تعداد محدودی سلول را تولید کند به آن پلوری پوتنت[4] یا مالتی پوتنت[5] گویند. به سلولی که توانایی نمو را در شرایط مناسب ندارد تمایز یافته غیر قابل برگشت گفته می‌شود.

وضعیت نموی سلول‌ها از این نقطه نظر که ایده توتی پوتنسی هسته‌ای بخش مهمی از تفکر هدایت کننده بسوی انجام آزمایشات همسانه‌سازی بر مبنای SCNT را تشکیل می دهد.

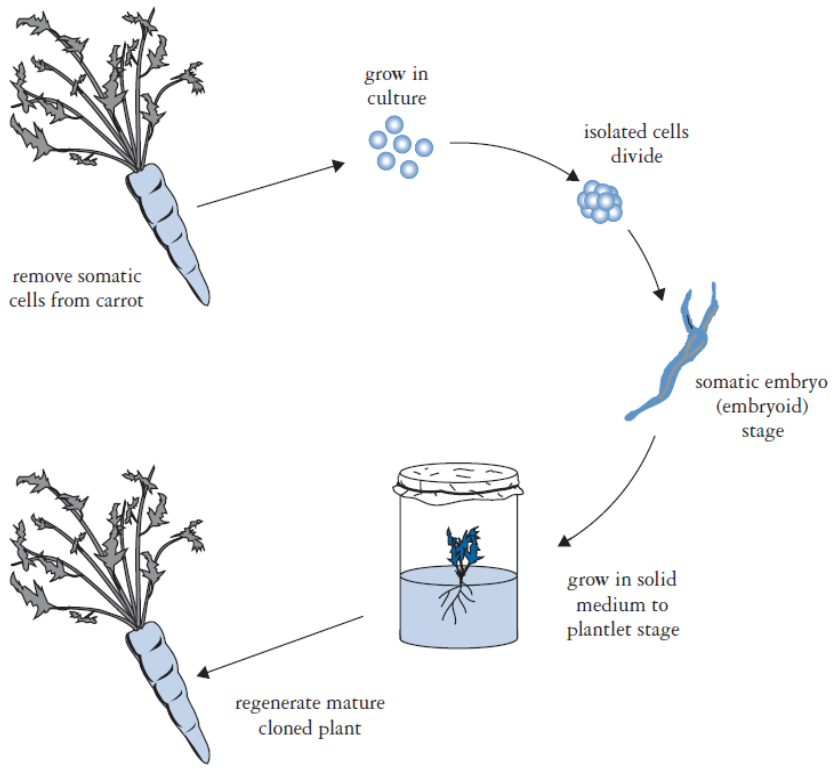
توتی پوتنسی هسته ای به طرق گوناگون خود استنادی[6] است (یعنی صحت خودش را تائید می کند)، چون یک فرد بالغ دارای انواع مختلف سلول می‌شود. ژنوم اصلی یک زیگوت با استفاده از تقسیم میتوزی بطور پی در پی انتقال می‌یابد و باید توانایی تولید انواع مختلف سلول‌ها را داشته باشد. به هر حال، مسئله کلیدی در زمینه توسعه همسانه‌سازی این نبود که ایده توتی پوتنسی درست است یا خیر، بلکه موضوع اصلی، تلاش‌هایی بودند که نشان دهند که چه موقع سلول‌های جنین تمایز غیرقابل برگشتی پیدا می‌کنند و احتمالا توانایی توتی پوتنسی خود را از دست می‌دهند. آزمایشات بعدی در این خصوص در سال ۱۹۵۰ انجام شد.

---

[1] Somatic cell nuclear transfer
[2] Embryo splitting
[3] Nuclear totipotency
[4] Pluripotent
[5] Multipotent
[6] Self-evident



شکل ۱۴-۲) دو روش برای کلون کردن حیوانات (a) تقسیم جنین به بخش‌های کوچکتر. سلول‌ها از یک جنین اولیه جدا می‌شوند (که به صورت یک جنین چهار سلولی نشان داده شده است.) و به آنها اجازهٔ نمو داده می‌شود. هر سلول برای تولید یک فرد جدید مستقیماً مراحل نموی را طی کرد. چهار موجود ایجاد شده از نظر ژنتیکی به صورت کلون های یکسان بودند. (b) تکنیک انتقال هسته. یک هسته از یک سلول سوماتیک جدا (از جنین و یا از یک فرد بالغ) و به درون یک سلول تخم بدون هسته وارد شد. اگر مراحل نمو انجام شود، یک کلون ایجاد می‌شود. توجه کنید که در این مورد کلون الزاماً با والد خود یکسان نیست؛ چون DNA میتوکندریایی از سیتوپلاسم به ارث می‌رسد و لذا تاثیرات خود در سلول تخم را اعمال می‌کند. این موضوع تحت عنوان الگوی توارث مادری شناخته می شود.



شکل ۱۴-۳) همسانه‌سازی هویج. ابتدا سلول‌های سوماتیکی جدا و در محیط کشت رشد داده می‌شود. در شرایط مناسب سلول‌ها شروع به تقسیم شدن می‌کنند و سپس جنین سوماتیکی با نام embryoids ایجاد می‌شود. سپس این سلول‌ها به محیط کشت جامد انتقال می‌یابند تا یک گیاه کامل ایجاد کنند. مرحلهٔ نهایی باززایی ارگانیسم کامل است.

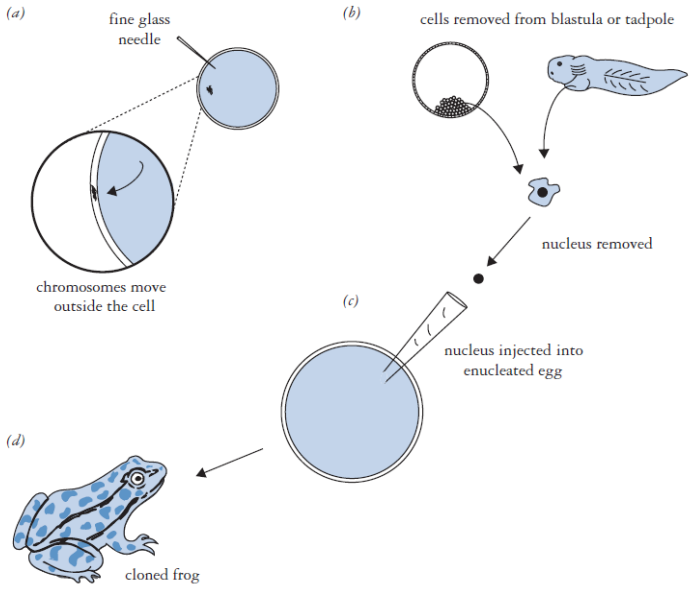
۱۴-۲) قورباغه، وزغ و هویج

تکوین و نمو گیاهان تا حدی نسبت به نمو جانوران ساده‌تر است، و آن هم عمدتا به این دلیل است که در گیاهان تنوع تیپ‌های سلولی در ساختارهای در حال نمو نسبت به جانوران محدودتر است. به هر حال مفهوم توتی پوتنسی هسته‌ای همچنانکه در گیاهان معتبر و قابل قبول است، در جانوران نیز پذیرفته شده است.در واقع یکی از اولین آزمایشات نشان‌دهندهٔ توتی پوتنسی هسته‌ای با استفاده از آزمایشات بر روی هویج در اواخر سال ۱۹۵۰ به‌دست آمد. کارهای استوارت[1] و

[1] F. C. Steward

همکارانش در دانشگاه کرنل[1] نشان دادند که گیاهان هویج می‌توانند از بافت‌های غیر جنسی (سوماتیکی) ایجاد شوند، که در شکل ۱۴-۳ نشان داده شده است. امروزه این تکنیک در تکثیر گیاهان در کشاورزی استفاده می‌شود. توانایی گیاهان برای باززایی سال‌های سال کشف شده و بصورت برش و پیوند انجام می‌شد- در واقع این ها اساسا به عنوان فرآیندهای همسانه‌سازی غیر جنسی مطرح می باشند.

دوزیستان سیستم‌های مفیدی را در تحقیقات جنین شناسی فراهم می‌کنند، به طوری که در آنها تخم ها نسبتاً بزرگ و فراوان است و روند نموی را در شرایط محیطی کمتر مطلوب را در مقایسه با جنین‌های پستانداران بهتر پشت سر می‌گذارند.



شکل ۱۴-۴) همسانه‌سازی دوزیستان. این روش توسط بریج و کینگ در سال ۱۹۵۲ ارائه شد. (a) سلول‌های تخم با استفاده از یک سوزن شیشه ای مناسب خراش داده می‌شوند. این کار موجب فعال شدن تخم و موجب حرکت کروموزوم به سمت بیرون از سیتوپلاسم می‌شود. هسته سلول دهنده از جنین اولیه یا یک بچه وزغ جدا می‌شود که در قسمت (b) نشان داده شده است. سپس هستهٔ دهنده به درون تخم فاقد هسته تزریق می‌شود (c) و روند نمو انجام می‌شود. هستهٔ دهنده در مراحل اولیه جنین نتایج بهتری را در قیاس با هسته هایی که در مراحل انتهای نمو هستند می‌دهد.

[1] Cornell

قورباغه *Rana pipiens* که توسط رابرت بریج[1] و توماس کینگ[2] در سال ۱۹۵۲ بر مبنای آزمایش خارق العادهٔ اسپمان استفاده شد. با استفاده از هستهٔ جدا شده از سلول‌های بلاستولا، آنها توانستند جنین را کلون کنند که حتی برخی از این سلول‌ها به صورت بچه وزغ نمو یافتند (شکل ۱۴-۴). با انجام آزمایشات بیشتر مشخص شد که سلول‌های جنین های اولیه می‌توانند به‌صورت مستقیم نمو یابند. اما شانس ایجاد کلون از هسته‌هایی که از جنین های با سن بیشتر جدا شده‌اند، کمتری است.

در سال ۱۹۵۰ قورباغه *Rana pipiens* در آزمایشات مربوط به انتقال هسته در جانوران استفاده شد.

پرواضح است که باید این نکته را در نظر داشت که اطلاعات و برنامه موجود در DNA سلول را به آسانی نمی‌توان حذف و از آن مستقیماً برای ایجاد یک موجود جدید استفاده کرد. این امر برای سال‌های سال به عنوان یک عامل محدود کننده در همسانه‌سازی ژن باقی ماند. بعدا آزمایشات توسط جان گوردن در دانشگاه آکسفورد با استفاده از وزغ *Xenopus laevis* توسعه پیدا کرد. وی تا حدی موفق شد که با استفاده از هستهٔ سلول روده، وزغ بارور بالغ را ایجاد کند. در برخی آزمایشات انتقال‌های سریالی وجداگانه انجام شد، و اجازه داده شد که هسته کاشته شده نمو یابد، سپس این سلولها جهت جداسازی هسته برای انتقال در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. به هر حال، یک موضوع در مورد اینکه آیا گوردان از سلول‌های کاملاً تمایز یافته و از سلول‌های دارای قدرت تولید نسل استفاده کرده است، بحث وجود دارد.

۱۴-۳) گوسفند مشهور- یک دستاورد مهم

باوجود ابهام در آزمایشات گوردن، کار بر روی قورباغه‌ها و وزغ‌ها بنظر آمد که اگر شرایط مناسب در آزمایشات وجود داشته باشد، کلون کردن حیوانات با استفاده از انتقال هسته واقعا یک برنامه امکان پذیر است. اگرچه این آزمایشات امیدبخش بود، اما همسانه‌سازی از یک سلول کاملاً تمایز یافته بالغ هنوز هم انجام نشده بود. این شبهه وجود داشت که دست‌ورزی‌های انجام شده در انجام آزمایشات ممکن است موجب آسیب به هستهٔ دهنده شود، و تا قبل از دهه ۱۹۷۰ مشخص شد که به روش‌های توسعه یافته تری در این خصوص نیاز است. گزارشات موش کلون شده از هسته جنین نارس در سال ۱۹۷۷ مطرح شد، اما نتایج این ازمایش قانع کننده و قابل تکرار نبود.

کار در زمینهٔ قورباغه ها و وزغ ها موجب امکان پذیر شدن همسانه‌سازی جانوران بر پایهٔ SCNT شد و کار را برای ادامهٔ مسیر همسانه‌سازی باز کرد.

---

[1] Robert Briggs
[2] Thomas King

توسعهٔ فناوری در زمینه کلونینگ با انتقال هسته همچنان ادامه یافت و اهداف اصلی آن موجوداتی مانند گوسفند و گاو بود، زیرا آنها دارای پتانسیل کاربردی لازم در بیوتکنولوژی کشاورزی بوده و نیز می‌توان از آنها جهت تولید پروتئین‌های لازم جهت مصارف پزشکی استفاده کرد. تا قبل از اواسط دهه ۱۹۸۰ چند گروه در زمینه انتقال هسته از جنین نارس موفق شدند. نقش اصلی را در این زمان استین ویلادسن[1] دانشمند دانمارکی انجام داد، دانشمندی که در سال ۱۹۸۴ اولین گوسفند را کلون کرد. وی این کار را با استفاده از تکنیک انتقال هسته از سلول جنین نارس انجام داد. در سال ۱۹۸۵، ویلادسن یک گاو را با استفاده از سلول‌های جنین کلون کرد، و در سال ۱۹۸۶ به نتایج مشابهی با استفاده از سلول‌های گرفته شده از جنین های با سن بیشتر رسید. نتایج تحقیقات روی جنین های با سن بیشتر (در مرحلهٔ ۶۴ تا ۱۲۸ سلولی) منتشر نشد، اما ویلادسن ثابت کرد که کلون کردن با سلول‌های مسن‌تر، ممکن است امکان پذیر باشد، همچنانکه بسیاری از مردم اینگونه فکر میکردند. در این مرحله چندین شرکت در زمینه تکنولوژی همسانه‌سازی مخصوصاً در زمینه گاو فعالیت میکردند و آینده ای امیدبخش برای این تکنولوژی را رقم زدند. با این حال، همچنان مشکلاتی در زمینهٔ استقرار کلونینگ در امور تجاری سازی گوجه فرنگی تراریخت Flavr Savr وجود داشت؛ و علی رغم وعده‌های داده شده برای برطرف نمودن مشکلات فوق تا قبل از اوایل دهه ۱۹۹۰، اتفاقی نیافتاد.

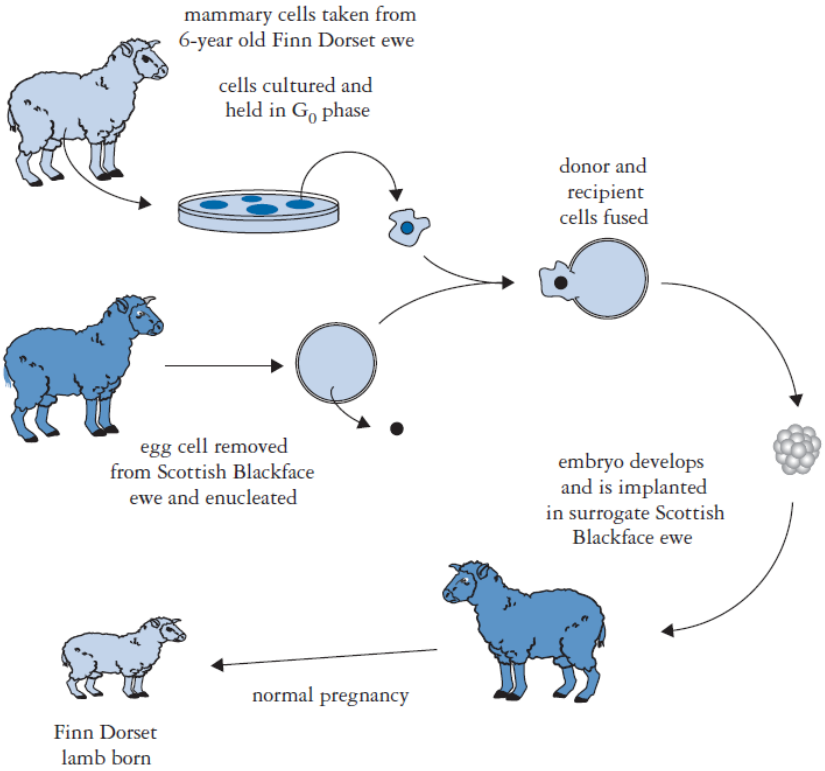
در همین زمان بود که علاقه‌مندی‌های تجاری در خصوص همسانه‌سازی در حال شکل‌گیری بود. یان ویلموت[2] که در نزدیکی ادینبرگ کار می کرد، جایی که به موسسه روزلین مبدل شد، مشغول تولید گوسفند ترانس ژنیک شد. وی تلاش کرد تا کارایی این روش را افزایش دهد و بنظر می‌آمد که کلونینگ یک روش جذاب برای انجام این کار باشد. اگر سلول‌ها در محیط کشت رشد کنند و به جای تزریق به درون تخم بارور شده، ترانس ژن‌های مورد نظر به این سلول‌ها اضافه شوند، میتوان سلول‌های ترانس ژنیک را انتخاب و سپس جهت همسانه‌سازی یک موجود استفاده کرد. این رویکرد با موفقیت با استفاده از سلول های رویانی در موش اجرا شد. هرچند که ثابت شده بود که جداسازی سلول‌های یکسان از گوسفند، گاو و خوک غیر ممکن است. به هر حال، سلول‌های مسن‌تری که از یک رویان یا یک فرد بالغ گرفته شده بودند، به آسانی توانستند در محیط کشت رشد کنند. بنابراین، در صورتی فرآیند فوق موفقیت‌آمیز خواهد بود و سلولهای مسن میتوانند وارد فرآیند نموی شوند کهاین سلول‌ها در یک آزمایش انتقال هسته ای استفاده شوند. این همان مرحله ایست که تصور می‌رفت غیر ممکن باشد.

---

[1] Steen Willadsen
[2] Ian Wilmut

به اثبات رسید که مشکل اصلی در کلونینگ باروری در دهه ۱۹۸۰ و اوایل ۱۹۹۰، استفاده از سلول‌های بالغ مسن به عنوان دهنده در آزمایشات SCNT است.

در سال ۱۹۸۶ ویلموت در یک ملاقات علمی در دوبلین حضور و در مورد آزمایشات کلونینگ ۶۴-۱۲۸ سلولی گاو مطالبی را از یک دامپزشک که با ویلادسن همکاری می کرد شنید.

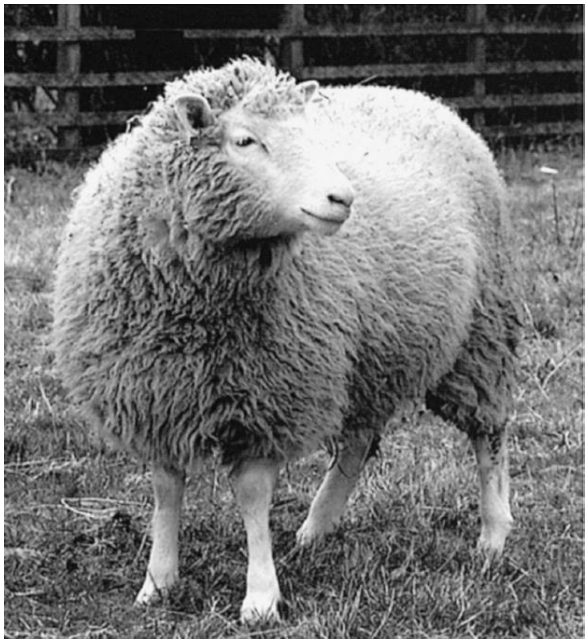


شکل ۱۴-۵) روش همسانه‌سازی که منجر به ایجاد دالی شد. سلول‌های پستانداران از یک گوسفند ماده بالغ جدا، کشت و سپس در مرحلهٔ G_0 از سیکل سلولی نگه داشته شدند. این‌ها سلول های دهنده بودند. سلول‌های تخم از یک فرد دیگر گرفته شد که هستهٔ آن خارج شد تا به عنوان گیرنده عمل کند. سلول‌های گیرنده و دهنده با هم ممزوج و کشت شدند. در مرحلهٔ بعد جنین‌ها وارد یک مادر جایگزین شدند و بارداری رخ داد. پنج ماه بعد دالی به دنیا آمد.

این موضوع وی را برای ادامه کار همسانه‌سازی ترغیب کرد. توسعه کلیدی در این زمینه با ملحق شدن کیت کمپل[1] به گروه ویلموت در سال ۱۹۹۰ بدست آمد. کمپل کارشناس تقسیم سلولی بود

[1] Keith Campbell

و می‌توانست تکنیک‌های مربوط به رشد سلول‌ها در محیط کشت را ارایه نماید و سپس موجب ورود سلول‌ها به مرحلهٔ G_0 از سیکل سلولی شد. ویلموت و کمپل تصور کردند که ممکن است این یک عامل مهم در موفقیت و احتمالاً کلید موفقیت باشد آنها با تولد مگان و موراگ در سال ۱۹۹۵ اینموضوع را اثبات کردند. این بره‌ها با استفاده از تکنیک انتقال هسته توسط کشت سلول‌هایی که از جنین‌های نارس بدست آمده بودند ایجاد شدند. توسعه و بهینه‌سازی این کار برنامه ریزی شد، و توسط مرکز درمانی PPL مورد حمایت قرار گرفت، که یک شرکت بیوتکنولوژی است و در سال ۱۹۸۷ تأسیس شد تا فناوری تولید گوسفند تراریخت را به صورت تجاری در آورد. ویلموت و کمپل یک آزمایش پیچیده توصیه کردند که در آن آنها از سلول‌های جنینی، سلول‌های رویانی، و سلول‌های فرد بالغ در یک فرآیند همسانه‌سازی استفاده نمودند. در این زمان یک اتفاق عجیب در تاریخ افتاد- سلول‌های بالغ از یک ویال که طی سه سال به صورت منجمد در موسسهٔ PPL ذخیره شده بود و منبع حیوانات اصلی آنها برای مدت طولانی فراموش شده بود، بدست امد. با این حال، این موضوع مشخص شد که سلول‌ها از یک میش فنلاندی زیر شش سال گرفته شده بودند. فرایند همسانه‌سازی در شکل ۱۴-۵ خلاصه شده است.



شکل ۱۴-۶) دالی-اولین پستاندار کلون شده از یک سلول بالغ تمایز یافتهٔ سوماتیکی. تصویر فوق در موسسهٔ روزلین گرفته شده است.

۲۹ جنین از ۲۷۷ سلول بالغ کشت شده بدست آمد. سپس این جنین‌ها وارد یک مادر جایگزین اسکاتلندی Scottish Blackface شدند و بعد از ۱۴۸ روز در ۵ جولای ۱۹۹۶ یک بره متولد شد. وی دالی نام گرفت. دالی در شکل ۱۴-۶ نشان داده شده است. رخدادی که در روزگاری غیر ممکن می نمود با موفقیت محقق شد.

۱۴-۴) فراتر از دالی

تولد دالی نشان داد که سلول‌های بالغ تمایز یافته می-توانند در شرایط مناسب، به کلون‌ها تبدیل شوند. در حالی که عظمت این دستاورد علمی توسط ویلموت و همکارانش مورد تحسین بود، اما پاسخ مردمی به آن قدری برای آنها حیرت انگیز بود. بطور ناگهانی ویلموت، کمپل و ران جیمز از موسسهٔ PPL با موضوعی ناشناخته برای دانشمندان در مرکز توجهات قرار گرفتند. خود دالی در رسانه ها معروف شد، دالی در سال ۱۹۹۷ با یک گوسفند انگلیسی تلاقی داده شد و در سال ۱۹۹۸ یک بره ماده به نام بونیه را بدنیا آورد. بنابراین ثابت شد که تولید یک موجود با استفاده از تکنیک کلون کردن بنظر نمی‌آید که اثر منفی بر توانایی تبادل نسل داشته باشد.

به‌عنوان یک گوسند معروف، دالی به‌طور کاملاً طبیعی موضوع مطالعات بسیار جزیی قرار گرفت، و بنابراین زمانی که علائم پیری زودرس احتمالی دیده شد که دالی حدود ۵ سال داشت و لذا موجب بعضی نگرانی ها شد. چند دلیل برای این امر وجود دارد. یک دلیل برای این امر کوتاه شدن تدریجی تلومرهای کروموزوم است که در تقسیم های سلولی پی در پی رخ می دهد و فرایند سن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از آنجایی که سلول دهنده برای تولید دالی شش سال سن داشت، به نظر می‌رسد که وی باید هنگام تولد شش ساله باشد (حداقل از منظر ژنتیک سلولی). بنابراین شاید این امر موجب تاثیر بر طول عمر وی شده باشد. همچنین دالی دارای علایمی از التهاب مفاصل بود. اما در این زمینه ابهام و شک وجود دارد که آیا بین این موضوع با موضوع اینکه او یک کلون بوده وجود دارد

طول تلومر و موضوع سن از موارد مهمی است که در بحث همسانه‌سازی reproductive مورد توجه است.

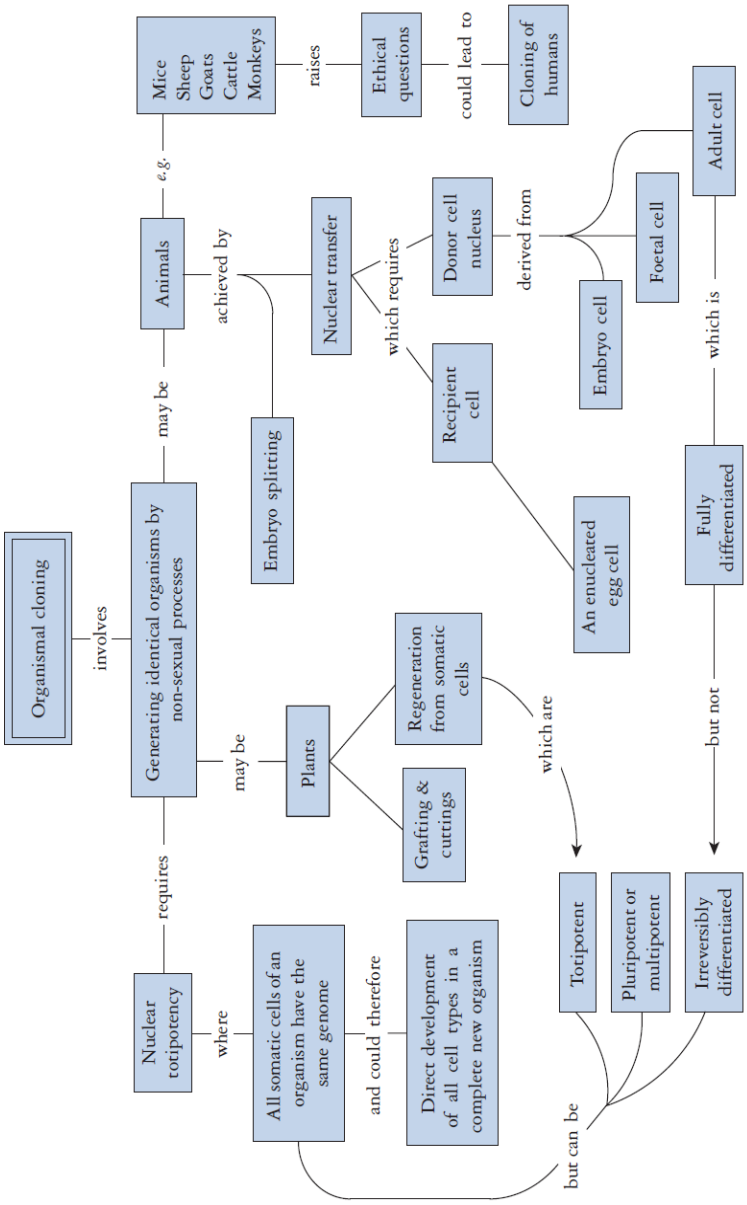
دالی در ۱۴ فوریه سال ۲۰۰۳ به دلیل یک بیماری مزمن رتروویروسی تنفسی در ریه که گوسفند به این بیماری حساس است، درگذشت. مرگ وی به دلیل پیامد همسانه‌سازی نبود. کالبد وی در موزهٔ رویال در ادینبرگ در معرض دید عموم قرار دارد. برخی مفسران می گویند که دالی تقریباً نصف طول عمر یک گوسفند عادی را داشت و این نیمه عمر به واسطهٔ سلولی بود که از فرد دهنده گرفته شده بود. این امر بسیار ساده است و در این خصوص تحقیقات زیادی برای بررسی ویژگی های فیزیولوژیکی و ژنتیکی موجودات کلون شده باید انجام شود. همچنانکه کار پیش می رفت،

پرواضح است که پیچیدگیهای خاصی در ارتباط با این نوع کارها وجود دارد، و اینکه امکان برنامه ریزی مجدد برای DNA سلول دهنده در طی فرایند SCNT وجود ندارد. این امر موجب حدوث مشکلاتی در این زمینه شد که ممکن است بیان ژن به طور کامل تحت تأثیر شرایط توسعه جنین در کلون قرار نگیرد. همچنین به نظر می رسد که در حدود یک سوم موارد، موجود کلون شده در هنگام تولد از موجود عادی بزرگتر است و با نام سندروم فرزندان بزرگ خوانده می‌شود.

با اینکه فناوری همسانه‌سازی امروزه به صورت مسلم پذیرفته و انجام می‌شود، اما هنوز هم با مشکلات تکنیکی زیادی روبه رو است.

با موفقیت در تولید دالی، ویلموت و همکارانش تلاشی را برای تولید اولین گوسفند ترایخته کلون شده را آغاز و گوسفند پالی که حامل ژن فاکتور IX بود را تولید نمودند. بنابراین هدف تولید ترانس ژنیک‌ها با استفاده از تکنولوژی انتقال هسته در اواخر ۱۹۹۰ بدست آمد.

همسانه‌سازی تعدادی از موجودات از جمله گربه، موش، بزغاله، گاو، خرگوش، اسب، خر و میمون هم با روش جداسازی جنین و یا روش انتقال هسته‌ای انجام شده است. همسانه‌سازی جنین انسان با استفاده از تکنیک جداسازی جنین در سال ۱۹۹۳ گزارش شد. اگرچه بیشتر دانشمندان اعتقاد داشتند که نباید همسانه‌سازی با روش انتقال هسته‌ای در انسان انجام شود. با این حال پیشنهادات برای همسانه‌سازی انسان رو به گسترش است، به طور قابل ملاحظه ای توسط ریچارد سید در سال ۱۹۹۷ و بوسیله یک کارشناس تولید مثل ایتالیائی، کسی که اظهار داشت در حال تنظیم برنامه ای برای کلون کردن انسان است، مطرح شد. همچنانکه در خصوص بسیاری از جنبه‌های ژنتیک مدرن مطرح است، شکی نیست که در آینده پیشرفت‌های چشم‌گیری در زمینهٔ همسانه‌سازی جانوران انجام خواهد شد.



نقشهٔ مفهومی فصل چهاردهم

فصل پانزدهم: ایجاد دنیایی جدید یا کابوس ژنتیکی؟

فصل ۱۵ فصل کوتاهی است. در این فصل به هیچ پرسشی پاسخ داده نمی‌شود، اما سعی شده تا به سادگی پرسش‌هایی را برای جلب توجه بیشتر مطرح نماید. هیچ پاسخ درستی به این پرسش‌ها وجود ندارد. زیرا این پرسش‌ها باید با توجه به دیدگاه‌های شخصی فرد، خانواده، جامعه، طایفه یا ملتی که با این شرایط مواجه هستند پاسخ داده شود. در این خصوص هیچ دیاگرام یا تصاویری وجود ندارد، و حتی میزان محدودی اطلاعات واقعی نیز وجود ندارد. به هر حال عناوین بحث شده احتمالاً مهمترین موضوعاتی هستند که یک دانشجوی مهندسی ژنتیک باید به آنها توجه نماید. در عمل، تعداد نسبتاً محدودی از افراد وارد حیطهٔ علم و تکنولوژی می‌شوند، ولی ما همه مجبوریم با نتایج حاصل از تحقیقات بر مبنای ژنتیک و کاربردهای آن هماهنگ باشیم. آگاهی و به بحث گذاشتن این موضوعات تنها راهی است که توسعه تکنولوژی دست‌ورزی ژن را می‌تواند قابل پذیرش نموده و مبانی آن را مستحکم نماید.

۱۵-۱) آیا علم از نظر خوب و بد اخلاقی بی طرف است؟

اغلب گفته می‌شود که علم خود به خود نه خوب است و نه بد، بنابراین علم از جهات اخلاقی بی طرف است. در حالی‌که این امر، حقیقت علم به عنوان یک فرایند را نشان می‌دهد، در واقع رشد و توسعه و کاربردهای که از فرآیندهای علمی بدست میآید موجب بوجود آمدن طرح سؤالات اخلاقی می شود. مثالی که عموماً در این خصوص مطرح می‌شود، توسعهٔ دانش مربوط به ساخت بمب اتم است- که علمی جدید و جالب است، و از نظر اخلاقی خودش بیطرف، اما کاربرد آن (به عنوان مثال یک ابزار در جنگ) سؤالات اخلاقی کاملاً متفاوتی را مطرح نمود. همچنین، علم توسط دانشمندان ایجاد می‌شود، کسانی که در واقع نمی‌توانند از نظر اخلاقی بی‌تفاوت باشند. تصوری که افراد عامی دارند این است که دانشمند و فرایند علمی یکی هستند، که متأسفانه اینطور نیست.

اینکه آیا علم مطابق با اخلاق است یا اینکه بی طرف است، به آسانی قابل پاسخ نیست زیرا می‌تواند دارای جنبه‌های متعددی باشد.

باوجود اینکه علم در مباحث علمی محض، از مسائل اخلاقی مصون است، اما من اعتقاد دارم که جداسازی فرایند علمی از کاربرد آن یک تمایز ساختگی است. در جهان پیشرفته، ما در جوامعی زندگی می‌کنیم که فناوری در آن نهادینه شده است، این فناوری براساس کشفیات علمی دانشمندان بدست آمده است. ما باید این مسئولیت سیاسی فناوری ژنتیکی جدید را با هم بپذیریم.

۱۵-۲) فاکتورهای مباحث اخلاقی

پیشرفت در علوم پایهٔ ژنتیک، معمولاً مشکلاتی را از دیدگاه اخلاقی مطرح می‌کند. بیشتر نگرانی‌ها عموماً از آزمایشات واقعی مجزا است- که این امر شاید به دلیل استفاده از حیوانات در تحقیقات، یا پتانسیل گیاهان زراعی تراریخته در زمینه آلودگی گیاهان غیرتراریخت و یا جمعیت‌های وحشی باشد. در این خصوص به برخی از مشکلات اخلاقی مطرح در زمینه پزشکی، بیوتکنولوژی، موجودات تراریخت و همسانه‌سازی موجودات می‌پردازیم. به هر حال ممکن است هر یک از این موارد با هم همپوشانی قابل ملاحظه‌ای داشته باشند و مجدداً جداسازی این موارد از همدیگر از جهاتی می‌تواند بصورت ساختگی صورت گیرد.

در علم پزشکی، مباحثی بر علیه توسعهٔ داروها و درمان‌های جدید. صورت می‌گیرد. احتمالا یکی از موارد دشوار در زمینهٔ کاربردهای تحقیقات ژنتیکی مرتبط با پزشکی، اطلاعات ژنوم انسان است. بنابراین یکی از مباحث مهم در این زمینه، غربالگری ژنتیکی و امکان تفکیک ژنتیکی است. تشخیص مولکولی بیماری‌های ژنتیکی امروزه به خوبی شناسایی شده و بزرگ‌ترین مشکل در این مورد هنگامی مطرح می‌شود که در صورت شناسائی عامل ایجاد یک بیماری، آیا باید جنین مربوطه سقط شود؟ مسائل اخلاقی زمانی پیچیده خواهند شد که بحث در مورد غربال‌گری و انتخاب آسان

بیماری‌های پلی‌ژنتیکی و صفات چندعاملی و احتمالاً مشکلات شخصیتی و تعصبات تا آسیب‌های رفتاری، امکان‌پذیر شود. مجموعه موضوعات مربوط به تمایلات شخصیتی، از آنجائیکه مغایر با وجود ارتباط بین ژن‌ها و بیماری‌ها هستند، تعیین قوانین اخلاقی در این زمینه مبحثی دشوار خواهد بود، به طوری که بسیاری از مشکلات بالقوه هنوز به صورت یک فرضیه وجود دارند.

امکان تفکیک ژنتیکی بر اساس دانش توالی ژنوم دریچه جدیدی از نگرانی را گشود، جایی که تعصبات شخصیتی به عنوان یک مشکل مهم در کنار شرایط واقعی که یک فرد را رنج می‌دهد قرار می‌گیرد.

تعریف بیوتکنولوژی صنعتی یکی از موضوعات دشوار است، همچنانکه کاربردهای فناوری ژن در کاربردهای زیست فناوری بسیار متنوع است. یکی از موضوعات اخلاقی که پیوند دهنده کاربرهای مختلف است، تأثیر منافع صنعتی می‌باشد. مالکیت ثبت توالی ژن‌ها همانند تولید سوماتوتروپین گاوی، سؤالاتی را مطرح کرده است. بیشتر مردم به وضوح مواردی از کاربردهای بیوتکنولوژی که تحت‌تاثیر نیازهای تجاری عرضه شده را مشاهده می‌کنند و برخی به راحتی با این موضوع کنار نمی‌آیند. پرسش‌های مشابهی را می توان از هر فرآیند تولیدی در نظر گرفت، اما به نظر می‌رسد که استفاده از مواد بیولوژیکی در ذهن بسیاری از مردم موجب ایجاد نگرش و تفکرات متفاوتی شده است. در برخی موارد رفتار برخی از شرکت‌های بیوتکنولوژی موجب ایجاد اضطراب در افرادی می شوند که ممکن است در واقع با اهداف کلی آن شرکت موافق باشند. در این زمینه برخی شرکت‌ها فهمیده‌اند که نظرات عمومی می‌تواند به‌عنوان یک نیروی قوی بر میزان موفقیت و یا شکست یک محصول خاص مؤثر باشد.

نظرات عموم، خصوصاً با توجه به پذیرش مصرف کننده یک محصول، می‌تواند اثرات بسیار مهمی بر موفقیت تجاری آن محصول داشته باشند.

توسعه و استفاده از موجودات تغییر یافته ژنتیکی موجب ایجاد سؤالات اخلاقی می‌شود. مساله‌ای که کمی تعجب‌آور است، این است که به محض مطرح شدن موجودات تراریخته، مباحث و نظرات رایج در مورد گیاه و حیوان تغییر می‌کنند. بطور سنتی، موضوع وضعیت و رفتار با حیوانات منشاء اصلی مشکل در بین گروه‌های فشار، افراد نگران ، محققین و مسئولین، بود. تا اواخر ۱۹۹۰ گیاهان بطور گسترده‌ای در زمینه مباحث اخلاقی فراموش شده بودند تا زمانی که عکس‌العمل عمومی در خصوص غذاهای تغییر یافته ژنتیکی (GM) به منظور اثرگذاری بر آنچه شرکت‌های تجاری انجام می‌دهند، آغاز شد.

نگرانی‌ها در این خصوص به دو دسته تقسیم می‌شوند: تأثیر مواد غذایی تغییر یافته ژنتیکی بر سلامت و نیز اثر آن بر محیط زیست. مباحثات مربوط به موارد زیست محیطی به طور ویژه‌ای به واسطهٔ گروه‌های مختلفی ایجاد شده‌اند. افرادی که مدعی هستند با ظهور تکنولوژی گیاهان تغییر

یافتهٔ ژنتیکی به واسطهٔ انجام گـرده‌افشـانی متقابـل بایـد منتظـر وقـوع یـک وضـعیت فاجعـه بـار اکولوژیکی باشیم. نمی‌توان پیش‌بینی نمود کـه چـه اتفـاقی ممکـن اسـت رخ دهـد. هرچنـد کـه هواداران گیاهان تغییر یافته ژنتیکی موضوع ضرورت ارزیابی خطرات مربوطـه را مطـرح مـی‌کننـد. پاسخ ساده به این پرسش این است که ما نمی‌دانیم این گیاهان در دراز مدت چه اثری بر اکولـوژی و محیط خواهند گذاشت.

مشکل حیوانات تراریخت به بزرگی مشکل گیاهان تراریخت نیسـت. ایـن امـر ممکـن اسـت کمـی شگفت‌انگیز بنظر برسد، اما حقیقت را این گونه می‌توان توضیح داد که حیوانات ساده‌تر شناسـایی و حفاظت می‌شوند (زیرا حیوانات به جای گرده‌افشانی نیاز به نزدیکی دارند) و بنـابراین خطـر انتقـال صفات ترانس‌ژنیک به جمعیت‌های وحشی بسیار کمتر از گیاهان زراعی اسـت. همچنـین حیوانـات تراریخت اغلب در موارد پزشکی استفاده می‌شوند که مزایای آن بسـیار قابـل لمـس و قابـل تقـدیر است. نگرانی در مورد وضعیت نگهداری حیوانات هنـوز وجـود دارد، ولـی اسـتانداردهای مربـوط بـه مواظبت از حیوانات در تحقیقات تراریخت بسیار زیاد است و در بیشتر کشورها بـدقت نظـارت مـی شود. در مجموع پذیرش موش تراریخت به عنوان یک مـدل بـرای بررسـی بیمـاری‌هـا و حیوانـات تراریخت به‌عنوان بیوراکتورها به طور کلی مشکلات کمتری نسـبت بـه بیوتکنولـوژی گیـاهی دارد. پیشنهاد می‌شود که استفاده از تکنیک زنوترانسپلنتیشین[1] می‌تواند امیدبخش باشد امـا سـوالاتی را در این خصوص ایجاد می‌کند، خصوصاً برای گروه‌های مذهبی و اخلاقی که بـر ایـن نـوع کاربردهـا ایراداتی گرفته‌اند.

همسانه‌سازی موجودات احتمالاً مشکل‌ترین بخش از نقطه نظر اخلاقی است. همان‌طور که احتمـال همسانه‌سازی انسان وجود دارد و به طور جدی توسط برخی از افـراد پیگیـری مـی‌شـود. در مـورد طبیعت منحصر به فرد شخصیت، ویژگی، روح، سرشت و یا هر آنچه که نامیده می‌شـود، مباحثـاتی وجود دارد. یک شخص کلون شده واقعا چیست؟ مباحثات و مناقشاتی وجود دارد، نظرات متفاوتنـد و از آنهایی که فکر می‌کنند فرد کلون شده یک فرد دوزخی یا جهنمی است تا آن‌هـایی کـه تصـور می‌کنند هیچ تفاوتی بـین یـک کلـون و یـک فـرد عـادی بـه واسـطهٔ ویژگـی‌هـای بیوشـیمیایی و فیزیولوژیکی وجود ندارد.

شاید همسانه‌سازی حیوانات خانگی در مقایسه با همسانه‌سازی انسان موضوعی کمتر نگران کننـده باشد، اما نقطه نظرات جدی در مورد این جنبه از همسانه‌سازی که اخیراً بـه واقعیـت تبـدیل شـده وجود دارند. همسانه‌سازی یک حیوان خانگی دوست داشتنی مرده، بیشتر یک مشـکل اقتصـادی و مالی است تا اینکه یک معضل اخلاقی محسوب شود. لذا این موضـوع جنبـه‌ای خـاص از مشـکلات

[1] Xenotransplant

اخلاقی را مطرح کرده که در مقایسه با سایر جنبه‌های دست‌ورزی ژن و همسانه‌سازی موجودات، دارای اهمیت است.

در روشی مشابه برای پیشرفت در تحقیقات مربوط به پروژهٔ دالی و بسط آن در همسانه‌سازی جانداران (پالی)، بسیاری از مردم از این امر در هراسند که امکان تولید موجودات تاریخته "نوزادان طراحی شده" به واقعیت بسیار نزدیک و در آینده عملی شود. ایده‌های عادی چون غربال‌گری ژنتیکی، ترانس ژن‌ها برای جایگزینی ژن‌های معیوب، پیوند اعضاء و توسعه آن تا حد کمال و یا شاید انتخاب یک مجموعه از ویژگی‌های مهم از یک لیست و تولید فنوتیپ مطلوب با استفاده از دست‌ورزی ژنوم وجود دارند. این موارد می‌توانند در زمان حال بسیار وهم برانگیز باشند. در اوایل سال ۱۹۹۰ عقاید و موارد مشابهی در خصوص همسانه‌سازی از سلول‌های بالغ مطرح بود. دالی در سال ۱۹۹۶ ایجاد شد.

۱۵-۲-۱) نقش دانشمند

در صورتی‌که تمام مباحث بیان شده خلاصه شوند، ما می‌توانیم به بررسی دو جنبهٔ مهم در این خصوص بپردازیم. دانشمندانی که کارهای تحقیقاتی و توسعه دهنده انجام می‌دهند و جوامعی که این تحقیق در آنجا انجام می‌شود. هر یک از این دو گروه نقش مهمی در مناقشات بازی می‌کنند.

دانشمندان و نیز سایر افرادی که در زمینهٔ صنایع کاربردی که بر مبنای تحقیق و توسعه بنیادی شکل گرفته‌اند، فعالیت می‌کنند، اغلب به عنوان محقق حرفه‌ای شناخته می‌شوند. با این حال دو نکته اساسی در اینجا وجود دارد. اولاً، که قبلاً نیز بیان شد، دانشمندان البته بخشی از جامعه، با تمام فرصت‌ها و مسئولیت‌های مربوطه هستند. ثانیاً، ممکن است دانشمندان در زمینهٔ رشتهٔ خاص خود ممکن است کارشناس باشند، اما ممکن است یک کارشناس خبره در موضوعات اخلاقی و فلسفی نباشند. بنابراین، موقعیت یک دانشمند ضرورتاً یک جایگاه ساده نیست. تمام آنچه که می‌توان در خصوص جوامع علمی پرسید این است که اعضاء آن کارهایشان را با دقت، صادقانه و بر اساس مسئولیت پذیری اخلاقی انجام دهند. بسیاری از دانشمندان نیز مشتاق هستند تا کارشان را توسعه داده و اغلب می‌خواهند با کارشناسان رشته‌های مکمل کار کرده و با آنها تبادل نظر کنند.

جوامع علمی نقش مهمی در ارائه مباحثات اخلاقی ژنتیک مدرن بازی می‌کنند. متأسفانه، همانند تمام گام‌های زندگی، گاهی مواردی در علم پیش می‌آید که مطابق با آنچه که از قبل طراحی شده نیستند. اغلب پیشرفت به آرامی رخ می‌دهد و گاهی نیز ممکن است نتیجه‌ای حاصل نشود. البته این موضوع بخش جدایی ناپذیر در روش‌های علمی است و توسط تمام افرادی که در این حیطه فعالیت می‌کنند مورد پذیرش است (اگرچه گاهی مردم انتظارات خیلی مبالغه آمیزی از دانشمندان شبیه به یک معجزه‌گر دارند). به هر حال، بسیاری از مشکلات هنگامی پیش می‌آیند که اطلاعات

توسط دانشمندان تحریف یا به یکپارچگی داده ها آسیب بزنند البته قابل توجه است که این موارد نادر بوده، اما با این حال رخ می‌دهند و موجب آسیب‌های جدی به یک رشتهٔ علمی می‌شوند. در این خصوص یکی از جنبه‌های مثبت آن این است که از آنجاییکه جوامع علمی بسیار هوشمند هستند، در هنگام مواجهه با این موارد تصمیم درست را اتخاذ می‌کنند.

۱۵-۲-۲) نقش جوامع

اگر دانشمندان وظایف خود را مسئولانه انجام دهند، جوامع نیز برخی از این مسئولیت‌ها را می‌پذیرند. جامعه یک بافت و مجموعه پیچیده از انواع مختلف مردم، گروه‌ها و مؤسسات بازرگانی است که همگی دارای دیدگاه‌های مختلفی می‌باشند. برخی از این افراد می‌توانند افراطی و اغلب مخالف باشند و لذا توجه و دقت لازم باید اتخاذ گردد تا دیدگاه‌های اقلیتی، به مباحث مهمی که مربوط به تصمیمات مهم از جانب دولت‌مردان و قانون‌گذاران هستند، آسیب وارد نکنند.

مکانیسم‌های ارتباطی مدرن به این معنی است که اطلاعات عمومی به سرعت در کل جهان قابل دسترس باشد که موجب تغییر در پویایی تعاملات و مباحثات می‌شود.

برای اطمینان از ارائه نظرات همه جانبه، باید تعادل در مباحث حفظ شود. همچنین حفاظت ضروری است در مقابل آسیب گروه‌های مختلفی که دارای اعضای واقعا نگران هستند ضروری است. اغلب اوقات بحث و تنبادل نظر میتواند منجر به تجزیه موضوع شود. اکنون ما در "دهکدهٔ جهانی" فعالیت می‌کنیم، جایی که اطلاعات به سرعت در سرتاسر جهان توسط رسانه‌ها قابل دسترس هستند. بنابراین طیف گسترده‌ای از واکنش‌ها در مقایسه با گذشته وجود خواهد داشت.

به‌طور خلاصه در خصوص عوامل و فاکتورهای مباحث و مناقشات اخلاقی، پذیرش این موضوع مهم است که تمام اعضای جوامع در تعیین قوانین و فرایندهای نظارت، تنظیم و مشاوره در زمینه دست‌ورزی ژن و کاربردهای فراوانش دارای نقش هستند. در بیشتر موارد با انجام مباحثات می‌توان به یک توافق کلی رسید. البته ضروری نیست که تمام افراد با تصمیم اتخاذ شده موافق باشند. ولی بیشتر مردم این روش تعاملی را به عنوان بهترین روش پذیرفته‌اند.

۱۵-۳) آیا هیولای فرانکستین درون جعبهٔ پاندورا زندگی می‌کند؟

سؤال نسبتا زشتی که تیتر را در قسمت آخر این فصل تشکیل داده این است که چگونه دو اصطلاح که در واقع نمی‌توانند در یک جمله قرار گیرند، می‌توانند به هم متصل شوند. این سؤال همان جوهرهٔ اصلی دست‌ورزی ژن است- قطعات جدا شدهٔ DNA به هم متصل شده و ایجاد مولکول‌های نوترکیبی کنند که این مولکول‌های نوترکیب در شرایط طبیعی وجود ندارند. در کتاب حاضر به برخی از روش‌های دست‌ورزی ژن پرداختیم، در این خصوص روش‌های پایه و اصلی و نیز

روش‌های پیشرفته ذکر شد. در پاسخ به این پرسش که "آیا این کار خوب است یا بد" نظر ما این است که پاسخی به این پرسش وجود ندارد. همانند تمام جنبه‌های فعالیت‌های انسانی، مسئولیت استفاده از تکنولوژی مهندسی ژنتیک بر عهده اشخاصی است که آن را کشف کرده‌اند، وفق داده‌اند، اجرا و تنظیم کرده‌اند. با این حال فشارهایی که در هنگام تجاری‌سازی مهندسی ژنتیک وجود دارد موجب ایجاد تغییر در این تعادل می‌شوند. بسیاری از دانشمندان صادقانه کار می‌کنند و در اجرای آن امانت‌داری کرده و نتایج و داده‌های حاصل از آزمایشات را تحریف نمی‌کنند. لذا باید به آنها برای آنچه که انجام می‌دهند، افتخار کرد. هنگامی که علم به یک تکنولوژی تبدیل می‌شود، عوامل مرتبط با آن کاملاً واضح نبوده و گاهی تعریف مسئولیت جمعی آن آنقدر آسان نیست که بتوان آن را برای تک تک افراد اجرا کننده‌اش تعریف کرد.

در هنگام چاپ دوم این کتاب، ما به پیشرفت‌هایی در علم ژنتیک و دست‌ورزی ژن دست یافتیم. حتی مواردی پیش آمده که کاربردهای دست‌ورزی ژن، ژنتیک و زیست‌شناسی سلولی بیشتر به صورت روزانه بوده و در روز بعد یک تکنیک جدید جایگزین تکنیک قبلی شده است. در واقع، در حال حاضر همان طور که روی فایل‌های نهایی کتاب کار می‌کنم (نوامبر ۲۰۰۷) اولین گزارش از سلول‌های سوماتیکی همسانه‌سازی شده با استفاده از تکنیک انتقال هسته‌ای چاپ شده است. علاوه بر این، برنامه‌ریزی مجدد سلول‌های پوست انسان جهت تولید همه انواع سلول‌ها (پلوریپتنت[1])، گزارش داده شده است. این دو دستاورد به ایده امکان تولید دوباره دارو در انسان نزدیک می شوند.

حتی آن‌هایی که پیشکسوت رشته‌های مختلف علمی در خصوص ژنتیک و دست‌ورزی ژن هستند، اغلب متعجب می‌شوند که چگونه این پیشرفت‌ها حاصل می‌شود خصوصاً پروژهٔ توالی‌یابی ژنوم. در هنگام چاپ این کتاب پیشرفت‌های بسیاری در زمینهٔ علم رخ داده است. امیدوارم با خواندن این کتاب کمی آمادگی بیشتری جهت بررسی پیشرفت‌های جدید پیدا کنید و وظیفه خودتان را در این بحث که همه باید از این موضوع اطمینان پیدا کنیم که تکنولوژی ژن بعنوان یک ضرورت برای داشتن زندگی خوب مهم است انجام دهید.

[1] Pluripotent

پیشنهادات برای مطالعه بیشتر[1]

در این بخش منابعی که ممکن است در خصوص موضوعات مطرح شده در متن مفید باشند را معرفی کرده‌ام. اختلافی که نسبت به چاپ‌های قبلی وجود دارد این است که من در این نسخه، متون خاصی را لیست نکرده‌ام. عدم معرفی به دلیل عدم دسترسی آن‌ها نبوده است در واقع متون بسیار خوبی برای مطالعه بیشتر شما در ارتباط با موضوع وجود دارد. به هر حال، شبکه گسترده جهانی در حال حاضر دسترسی آسان به بسیاری از اطلاعات را که تقریباً معرفی آن‌ها کار اضافه‌ای می‌باشد، فراهم کرده است. علاوه بر این، مرور یک کتابخانه خوب دانشگاهی، معمولاً بهترین راه برای دسترسی به متون مورد نظر می‌باشد. من شما را به منابع اصلی که از طریق برخی متون و مجلات مروری قابل دسترسی است ارجاع نداده‌ام.

کتاب‌ها

موتورهای جستجوگر عمومی در شبکه جهانی اینترنت، ناشران دانشگاهی و دیگر منابع اطلاعاتی مربوط به متون علمی را شناسایی خواهند کرد. سایت‌های خاصی مانند فروشگاه کتاب آمازون امکانات جستجوی داخلی را فراهم کرده، به طوری که در آن متون با موضوعات مختلف قابل شناسایی می‌باشند. اگر با دقت موضوعات را انتخاب کنید متون وابسته به موضوع، اطلاعات مفیدی را فراهم کرده و معمولاً ایده‌های ارائه شده در کتاب را گسترش داده و یا موضوعات را با تأکید متفاوت در اختیار قرار می‌دهند. همه منابع باید برای خوانندگان این کتاب قابل دسترس باشند. معمولاً متون تفسیری (و یا حتی داستانی) که اغلب مورد توجه هستند، مخصوصاً متون تاریخی در زمینه‌های مختلف می‌توانند درکی در جهت چگونگی کارکرد علم و طرح شخصیت‌های محوری ارائه دهند.

مجلات مروری

مجلات مروری منبع خوبی از اطلاعات دقیق در مورد موضوعات خاص می‌باشند و اغلب فهرست گسترده‌ای از منابع اولیه مربوط به موضوع را ارائه می‌دهند. این گونه از مجلات ممکن است به صورت سالانه، ماهانه یا هفتگی منتشر شوند. برخی از نمونه‌های مجلات مروری عبارتند از *Scientific American* و *New Scientist*، که مقالات خواندنی متعددی در طیف گسترده‌ای از موضوعات منتشر می‌کنند. مجلاتی مانند سری‌های *Annual Reviews* مقالاتی را در حوزه بیوشیمی و ژنتیک منتشر می‌کنند و مجموعه مقالات *Trends* مقالاتی را در حوزه‌هایی با

[1] http://www.amazon. co.uk or http://www.amazon.com

عنـــوان‌هـــای *Trends in Genetics*، *Trends in Biotechnology* و *Trends in Biochemical Sciences* منتشر می‌کنند. همه این مجلات مروری باید در کتابخانه‌های خـوب دانشگاهی و برخی کتابخانه‌های عمومی بزرگ در دسترس باشند. علاوه بر مجلات مروری، بسـیاری از مجلات پژوهشی پیشتاز نیز مقـالات مـروری مفیـدی چـاپ مـی‌کننـد و در مـورد گـرایش‌هـای تحقیقاتی مربوطه اطلاعاتی منتشر می‌کنند. شناخته شده‌ترین مجلات پژوهشـی پیشـتاز در علـوم، مجلات *Nature* (با نسخه‌هـایی ماننـد *Nature Genetics* و *Nature Biotechnology*) و *Science* می‌باشند. در حال حاضر اکثر مجـلات بـه صـورت الکترونیکـی از طریـق کتابخانـه‌هـای دانشگاهی در دسترس هستند.

استفاده از شبکه جهانی وب۱

در مدت زمانی بسیار کوتاه، اینترنت و شبکهٔ جهانی وب تأثیر عظیمی روی چگونگی دسترسی ما به اطلاعات و استفاده از آن داشته است. واژه "اینترنت" به طور کلی برای توصیف شبکه‌ای از رایانه‌هـا است که زمینه را برای انتشار و به اشتراک گذاری اطلاعات فراهم می‌کنند در حالی‌کـه واژه شـبکه جهانی وب، توصیف عمومی‌تر از اطلاعات می‌باشد که بـا اسـتفاده از اینترنـت منتشـر شـده اسـت. اگرچه این دو اصطلاح اغلب به جای یکدیگر اسـتفاده مـی‌شـوند و عبـارت‌هـای گشـت و گـذار در اینترنت و گشت و گذار در شبکه به بخشی از زبان پیشرفته امروزی تبدیل شده‌اند. اگر شـما کـاربر شبکه جهانی اینترنت باشید به این بخش نیاز ندارید. اما اگر شما برای اولین بار بخواهیـد از شـبکه جهانی اینترنت استفاده نمایید، من برخی از اطلاعات مورد نیاز برای شـروع را در اختیارتـان قـرار می‌دهم. شبکه جهانی اینترنت یک فضای هیجان انگیز و آسان را برای استفاده فراهم مـی‌کنـد کـه بسیار با ارزش بوده و البته سرگرم کننده نیز است!

شروع به کار

شما به یک کامپیوتر و اینترنت جهت ارتباط نیاز دارید. دسترسی شما از طریق کامپیوتر بـه شـبکه جهانی اینترنت ممکن است در محل کار یا مطالعه صورت گیرد، یا این که شما می‌توانید در خانه از شبکه اینترنت استفاده نمائید. معمولاً دانشگاه‌ها، دانشکده‌هـا، مؤسسـات تحقیقـاتی و شـرکت‌هـا از فناوری اطلاعات برخوردار بوده و اغلب دارای سیستم اینترانت می‌باشند.

اگر شما دانشجو یا کارمند مؤسسات مذکور باشید دسترسی به سایت‌های اینترنتی آسـان، سـریع و رایگان می‌باشد. بیشتر مؤسسات دارای قوانین مربوط به استفاده از شـبکه اینترنـت مـی‌باشـند کـه

---

[1]. World Wide Web

معمولاً به سیاست‌های شیوه استفاده مورد قبول معروف است. وضع این قوانین برای جلوگیری از استفاده نادرست از سیستم، مانند دانلود مطالب نامناسب، دسترسی به چت‌روم‌های غیر مرتبط با وظیفه کاربر، بازی اینترنتی و مانند آن می‌باشد. شما برای داشتن یک حساب شخصی به یک کامپیوتر به همراه یک مودم و همچنین عضویت در یک شرکت ارائه دهنده خدمات اینترنتی[1] نیاز دارید. معمولاً این کار هزینه‌هایی را در بر دارد و ممکن است این هزینه برای استفاده از اینترنت و یا هزینه‌های شارژ تلفن دریافت گردد. اکثر شرکت‌های ارائه دهنده خدمات اینترنتی طیف وسیعی از خدمات را با توجه به الگوی مصرف به شما ارائه می‌دهند به طوری که به شما اطمینان می‌دهند که بهترین گزینه را انتخاب کرده‌اید. بسیار ساده است که برای زمان قابل توجهی از اینترنت استفاده کنید و اگر شما یک کاربر معمولی نباشید، استفاده از اینترنت با دسترسی نامحدود احتمالاً بهترین گزینه می‌باشد. استفاده از اینترنت با پهنای باند[2] بهتر از گزینه استفاده از خط تلفن[3] است و هم اکنون در اغلب مناطق جغرافیایی بیشتر از امکانات پهنای باند استفاده می‌شود. بسیاری از شرکت‌های ارائه دهنده خدمات اینترنتی، تارنمای اینترنتی و پایگاه خبری به علاوه امکانات ایمیل خودشان را در اختیار قرار می‌هند. در واقع با مشاهده در صفحات شبکه، شما به یک مرورگر شبکه بر روی کامپیوترتان نیاز خواهید داشت. دو نسخه از رایج‌ترین مرورگرها *Netscape* و *Internet Explorer* می‌باشند. معمولاً یکی از دو مرورگر فوق با کامپیوتر شما عرضه شده است، یا این که می‌توان آن را از CD- ROM کامپیوتر دیگر و نیز از طریق شبکه اینترنت دریافت نمود. اگر شما بدانید کجاها را بگردید، پیدا کردن وب سایت‌ها به طور کلی ساده است. هر وب سایت دارای یک آدرس تحت عنوان URL می‌باشد. برخی از این سایت‌ها در متن ذکر شده‌اند. معمولاً URL با http://www. و یک آدرس اختصاصی بعد از آن آغاز می‌شود. بسیاری از کتاب‌های درسی جدید به وب سایت‌هایی مرتبط هستند همان گونه که گروه‌های تحقیقاتی، بخش‌های دانشگاهی، شرکت‌ها و غیره سایت مربوط به خود را دارند. اگر با URL آشنا نیستید و یا این که به دنبال وب سایت خاصی هستید، شرکت ارائه دهنده خدمات اینترنتی شما به طور معمول دارای موتور جستجوگر بوده و اغلب امکان دسترسی به بسیاری از این URLها را برای شما فراهم می‌کند. یک موتور جستجو شما را قادر می‌سازد با استفاده از طیف وسیعی از واژه‌ها، اطلاعاتی به دست آورید و حجم اطلاعاتی که شما می‌توانید به آن دسترسی پیدا کنید حیرت انگیز است. با این حال، احتیاط توصیه می‌شود.

---

[1].Internet service provider
[2]. Broadband
[3]. Dialup

احتیاط!

اطلاعات بسیار نامناسبی در شبکه اینترنت وجود دارند! بسیار آسان است که اثرات انحرافی آن را به حداقل رساند و از هدر رفتن زمان در جستجوی سایت‌هایی که ارزشی ندارند جلوگیری کرد. من با استفاده از موتور جستجوگر ارائه شده توسط شرکت ارائه دهنده خدمات اینترنتی تنها برخی از عبارات را جست و جو می‌کنم. تعداد مطالب به دست آمده برای واژه‌های مختلف به شرح زیر بود:

Genetics	۵۵۶۳۸۰۱
Cloning	۲۲۴۴۰۱۳
Cystic fibrosis	۹۶۶۴۰۶
DNA cloning	۴۹۹۸۲۴
Sheep cloning	۱۲۷۷۰۷
Plasmid vector	۷۱۲۲۸
Homopolymer tailing	۱۲۳

نکتهٔ قابل‌توجه این است که هر چه واژه جستجو اختصاصی‌تر، تعریف شده‌تر و یا محدودتر باشد نتیجه کار بهتر است. با این حال حتی با واژه‌هایی مانند شبیه‌سازی گوسفند یا وکتور پلاسمیدی، اطلاعات بسیار زیادی وجود دارند، بنابراین یادگیری شیوه استفاده از امکانات جستجوی پیشرفته ارائه شده توسط موتورهای جستجوگر مختلف ارزش تلاش را دارد.

انواع وب سایت

نکته اصلی که به هنگام استفاده از شبکه اینترنت باید در نظر داشت این است که محدودیت بسیار کمی در مورد این‌که چه موضوعی و توسط چه کسی منتشر می‌شود وجود دارد. سیستم کاوش که در مورد مطالب علمی استفاده میشود، اغلب از اطلاعات اینترنتی استفاده نمی‌کند، زیرا همه اطلاعات موجود در اینترنت ممکن است درست و دقیق نباشند. اغلب نوع وب سایت می‌تواند نشانه‌هایی را به شما بدهد که چقدر اطلاعات موجود در آن قابل‌اطمینان هستند. آخرین بخش URL معمولاً نشان‌دهنده نوع سازمان می‌باشد، اگر چه این بخش بر اساس نوع کشور با یکدیگر متفاوت است.

نمونه‌هایی مانند gov. برای نشان دادن سایت دولت، ac.uk. برای نشان دادن سایت‌های دانشگاهی انگلیس (edu. برای برخی کشورهای دیگر استفاده می‌شود) و com. یا co. برای

سایت‌های تجاری و شرکت‌ها استفاده می‌شود. ویژگی‌های این نوع از سایت‌ها را می‌توان به شرح زیر توصیف نمود:

سایت‌های دولتی: معمولاً اطلاعات دقیق را منتشر می‌کنند اما انجام این کار دقت خاصی نیاز دارد. گاهی اوقات نفوذ و چرخش سیاسی می‌تواند اطلاعات بسیار مشکوکی را برای برخی از سایت‌های دولتی منتشر نماید، آگاهی از وضعیت منطقه در این خصوص مفید است.

دانشگاه‌ها و مؤسسات تحقیقاتی: اغلب سایت‌های بسیار مفیدی هستند زیرا مطالب موجود در آن توسط افرادی منتشر می‌شود که قبلاً داوری و بازبینی شده‌اند و در نتیجه با دقت و آگاهی کامل و بدون تعصب منتشر می‌شوند.

سایت‌های شرکتی: این سایت‌ها نیز اطلاعات زیادی را ارائه می‌کنند، اما روشن است که در اکثر موارد اطلاعات ارائه شده برای حمایت از سیاست‌های شرکت می‌باشد. بسیاری از شرکت‌های مسئول، مراقب ارائه مطالب با نگاه متعادل می‌باشند و اغلب پیوندهایی به دیگر منابع اطلاعاتی نیز ارائه می‌دهند.

انتشارات: محدوده‌ای از ناشران کتاب تا مجلات آنلاین را شامل می‌شود. معمولاً مطالب بسیار عالی ارائه می‌دهند، اما برای دسترسی به برخی از سایت‌های مجله ممکن است به انجام ثبت نام و پرداخت هزینه برای دانلود هر مقاله نیاز باشد.

اطلاعات ورودی سایت‌ها: بسیاری از حوزه‌های تحقیق تخصصی دارای سایت‌های مرتبط بوده که آخرین پیشرفت‌های مربوطه را منتشر می‌کنند. اغلب به روز رسانی ایمیل جهت ارسال مستقیم مطالب جدید منتشر شده پس از ثبت نام امکان‌پذیر می‌باشد. همان گونه که در خصوص مجلات، برای دسترسی به طیف گسترده‌ای از امکانات نیاز به ثبت نام و اشتراک است.

سایت‌های گروه فشار: اطلاعات مفیدی را می‌توانند در اختیار قرار دهند، معمولاً نظرات افراد مختلف در مقابله با یکدیگر در این سایت‌ها منتشر می‌شوندبا وجود خطرات آشکار ناشی از پذیرش دیدگاه‌های ارائه شده، بسیاری از این سایت‌ها در ارائه اطلاعات دقیق بسیار مراقب هستند. از نظر دیدگاه‌های ارائه شده می‌توان این سایت‌ها را از متوسط تا عالی دسته بندی نمود.

سایت‌های شخصی: توسط افراد تهیه می‌شوند، در نتیجه به احتمال زیاد از نظر محتوا و نظر متغیرترین محسوب می‌شوند. طیفی از سایت‌های بسیار خوب که توسط متخصصین شناخته شده اداره می‌شوند تا سایتی که برای مطالعه، بهتر است از آن اجتناب شود وجود دارند.

مشکل اصلی در سایت‌های غیر مفید (یا کاملاً عجیب و غریب) این است که هر فرد با استعداد می‌تواند وب سایتی طراحی کند که به نظر قابل توجه و معتبر باشد. در مقابل، اگر برخی از سایت‌های بسیار مفید توسط یک طراح شبکه حرفه‌ای ایجاد نشده باشند می‌توانند کمی کسل کننده به نظر بیایند.

یکی از سایت‌های نسبتاً جدید و جالب چاپ و نشر در شبکه اینترنت، دایره‌المعارف ویکی پدیا[1] می‌باشد که در سال ۲۰۰۱ طراحی شد. ویکی پدیا یک دایره‌المعارف فعال می‌باشد که توسط کاربران آن قابل ویرایش است و در نتیجه یک نوع انتشار جدید محسوب می‌شود. تفکر راه‌اندازی ویکی پدیا این است که یک سایت خود تنظیم بوده که با افزایش مقالات آن، همزمان ویرایش و اصلاح می‌شوند. به طور کلی مقالات توسط نویسندگانی که در رشته خود تخصص دارند نگاشته شده و این افراد مسئول صحت و دقت موضوع نوشته شده می‌باشند. بنابراین ویکی پدیا منبع مفیدی محسوب می‌شود، اما اگر بر روی یک موضوع خاص مطالعه مهمی انجام شده باشد باید برای تأیید و صحت اعتبار موضوع مورد بررسی قرار گیرد. به هر حال ویکی پدیا منبع هیجان‌انگیز و خلاقانه‌ای از اطلاعات می‌باشد که مبنای جدیدی برای انتشار مبتنی بر وب محسوب می‌شود.

از جمله جذابیت‌های استفاده از شبکه اینترنت این است که این شبکه مانند یک رسانه متنوع و گسترده همواره در حال تغییر و گسترش است. اگر چه من فهرستی از آدرس‌های مفید[2] را قبلاً ارائه داده‌ام، به دلایل متعدد دوباره روی آن‌ها تأکید می‌کنم. اولاً، برخی از آدرس‌ها در بخش‌های خاصی از متن داده شده که راهی را برای ورود به موضوع خاص فراهم می‌کنند. ثانیاً، اگر شما از این کتاب به‌عنوان یک متن درسی استفاده می‌کنید، معلم باید بتواند برای تأیید موضوع درس، شما را به هر وب سایت خاصی که مفید است راهنمایی کند. ثالثاً، استفاده از موتور جستجوگر، موثرترین راه کسب اطلاعات جدید می‌باشد و با یافتن سایت‌های مرتبط، به سرعت قادر خواهید بود مجموعه‌ای از لینک‌هایی که شما را به سایت‌های مرتبط دیگر هدایت می‌کنند، دسترسی پیدا کنید.

---

[1] .http:// en.wikipedia.org

[2] .Uniform resource locators, URLs

واژه‌نامه

Abundance class: فراوانی نسبی مولکول‌های مختلف mRNA سلول در یک زمان خاص.

Acquired immune deficiency syndrome (AIDS): بیماری سیستم ایمنی، عامل بیماری ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسان (ایدز)، با کاهش لمفوسیت‌های T، بیمار نسبت به آلودگی و سایر مسائل بالینی از خود حساسیت نشان می‌دهد.

Activase™: فعال کننده پلاسمینوژن نوترکیب بافتی، اولین DNA نوترکیب که از سلول پستانداران در اوایل دهه ۱۹۸۰ تولید شد.

ADA: آدنوزین دی آمیناز، نتیجه کمبود در SCIDS.

Adaptor: الیگونوکلئوتید ساخته شده تک رشته‌ای غیر مکمل که برای اتصال به توالی یک لینکر جهت اضافه شدن به انتهای مولکول DNA استفاده می‌شود.

Adenine (A): نوکلئوتید نیتروژن دار موجود در DNA و RNA.

Adenosine: نوکلئوزید حاوی ریبوز و آدنین.

Adenosine deaminase: آنزیمی که آدنوزین را به اینوزین تبدیل می‌کند. کاهش آدنوزین موجب افزایش نوکلئوزید سمی شده و با ضعف سیستم ایمنی باعث ایجاد بیماری SCIDS می‌شود.

Adeno-associated virus: ویروس مورد استفاده در روش‌های ژن درمانی.

Adenovirus: ویروسی که می‌تواند از طریق بینی، بیماری ایجاد کند و در روش‌های ژن درمانی استفاده می‌شود.

Adsorption: ۱. اتصال مولکول‌ها یا ماکرو مولکول‌ها به یک لایه یا صفحه، ۲. همچنین برای توصیف اتصال یک باکتریوفاژ به سطح سلول باکتری به کار می‌رود.

Aetiology: عوامل مرتبط با علت ایجاد بیماری.

Affinity chromatography: روش جداسازی مواد سلولی توسط اتصال و جدا شدن انتخابی با استفاده از یک محیط مناسب که ماده مورد نظر به آن متصل خواهد شد. مانند جداسازی mRNA از RNA کل با استفاده از روش الیگو تیمین-سلولز.

Age-related macular degeneration: وضعیت بیماری شبکیه چشم که با پیشرفت بیش از حد رشد عروق خونی موجب تخریب عملکرد بینایی می‌شود. هدف بالقوه برای درمان با استفاده از RNA مداخله‌گر.

Agrobacterium tumefaciens: باکتری بیمارگر گیاهان و عامل بیماری سرطان ریشه و طوقه. دارای یک پلاسمید (Ti plasmid) مورد استفاده در دست ورزی ژن در گیاهان.

Agarose: ماتریکس ژل مانند، که از جلبک‌های دریایی استخراج می‌شود و به عنوان تکیه گاه در جداسازی اسید نوکلئیک در روش الکتروفورز استفاده می‌شود.

AIDS: سندرم نقص کسب ایمنی را ببینید.

Alcohol oxidase (AOX): آنزیم متابولیسم الکل. پروموتور این ژن می‌تواند برای ساخت ناقلین بیان ژن در مخمر استفاده شود.

Alkaline phosphatase: آنزیمی که گروه فسفات را از انتهای مولکول‌های DNA در ناحیه 5' حذف و گروه هیدروکسیل را در ناحیه 5' باقی می‌گذارد.

Allele: یکی از دو یا چند نوع از یک ژن معین.

Allele-specific oligonucleotide (ASO): الیگونوکلئوتیدی با توالی مشخص که توانایی اتصال دقیق به یک آلل خاص در شرایط هیبریداسیونی دارد.

Alpha-1-antitrypsin: جلوگیری کننده از فعالیت پروتئاز که در درمان فیبروز سیستیک استفاده می‌شود.

Alpha peptide: قسمتی از پروتئین بتاگالاکتوزیداز که توسط ژن *lacZ'* ساخته می‌شود.

Alzheimer disease: بیماری زوال عصبی که ویژگی آن تخریب پیشرونده در عملکرد شناختی می‌باشد.

Ampicillin (Ap): آنتی بیوتیک نیمه ترکیبی بتا لاکتام.

Amplicon: محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

Aneuploidy: تنوع در تعداد کروموزوم وقتی که کروموزوم‌های انفرادی مد نظر باشند. در نتیجه مجموعه کروموزوم به طور دقیق ضریبی از تعداد کروموزوم‌های هاپلوئید نیست.

Animal model: معمولاً یک موش تراریخته که برای یک بیماری خاص مهندسی شده است. همچنین *knockout mouse*, *knockin mouse*, *oncomouse* را ببینید.

Antibody: ایمیونوگلوبولینی که به طور اختصاصی به آنتی‌ژن متصل شده و آن را شناسایی می‌کند.

Anticodon: سه نوکلئوتید مولکول tRNA که مکمل یک کدون در مولکول mRNA هستند.

Antigen: مولکولی که آنتی بادی به آن متصل می‌شود. همچنین به عنوان مولکولی که توانایی تحریک واکنش ایمنی را دارد تعریف می‌شود. اگر چه به مفهوم مناسب‌تر به عنوان یک ماده ایمیونوژن می‌باشد.

Antiparallel: ترتیب قرار گرفتن رشته‌های DNA مکمل که در جهت مخالف یکدیگر و هریک در جهت 5' به 3' قرار دارند.

Antisense RNA: تولید یک توالی ژن الحاق شده در جهت مخالف، که این نسخه مکمل mRNA طبیعی بوده و در نتیجه می‌تواند به آن متصل و از ترجمه آن جلوگیری کند.

AP-PCR: واژه *arbitrarily primed PCR* را ببینید.

Arabidopsis thaliana: گیاه کوچک مناسب به عنوان یک موجود زنده تحقیقاتی برای زیست شناسان مولکولی گیاهی.

Arbitrarily primed PCR: انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای تصادفی، مناسب آنالیز RAPD برای انگشت نگاری ژنوم.

ASO: واژه *allele-specific oligonucleotide* را ببینید.

Aspergillus niger: قارچ آسکومیست مناسب برای تحقیقات ژنتیک و زیست فناوری.

Autoradiograph: تصویر ایجاد شده روی فیلم اشعه ایکس در واکنش به تشعشع ذرات رادیواکتیو.

Autosome: کروموزوم غیر جنسی.

Auxotroph: سلولی که برای رشد به مواد غذایی نیاز دارد.

BAC: کروموزوم مصنوعی باکتریایی که برای همسانه سازی قطعات بزرگ DNA ژنومی استفاده می‌شود.

Bacillus thuringiensis: باکتری مورد استفاده در محافظت از گیاه و در تولید گیاهان Bt که در برابر حمله حشرات مقاومند. این باکتری سمی تولید می‌کند که روی حشرات موثر است.

Bacteriophage: ویروس باکتریایی.

Baculovirus: نوع خاصی از ویروس که سلول‌های حشره را آلوده کرده و اینکلوژن‌های بزرگی را در سلول‌های آلوده تولید می‌کند.

Bacterial alkaline phosphatase (BAP): واژه *alkaline phosphatase* را ببینید.

Bal 31 nuclease: اگزونوکلئازی که همزمان هر دو رشته مولکول DNA را تخریب می‌کند.

Beta galactosidase: آنزیمی که توسط ژن *lacZ* تولید می‌شود. این آنزیم لاکتوز را به گلوکز و گالاکتوز تبدیل می‌کند.

Beta lactoglobulin (BLG): پروتئین عمده در شیر گاو. پروموتور این ژن می‌تواند در ساخت ناقلین بیان ژن مورد استفاده قرار گیرد.

Binary vector: نوعی سیستم ناقل که در آن از دو پلاسمید استفاده شود. هر پلاسمید نقش خاصی را ایفا می‌نماید که با تکمیل همدیگر، نقش کاربردی ناقل را کامل می‌کنند.

Bioinformatics: شاخه در حال توسعه تلفیق و تجزیه و تحلیل اطلاعات بیولوژیکی، به ویژه اطلاعات توالی ژنوم.

Biolistic: روش انتقال DNA به درون سلول‌ها با بمباران آن‌ها و پرتاب ذراتی که DNA را حمل می‌کنند.

Biological containment: ویژگی‌های بیولوژیکی یک سلول یا سیستم وکتور که به معنی عدم توانائی بقای آن سلول یا وکتور در خارج از محیط آزمایشگاهی است. آلودگی فیزیکی (. Cf. *physical containment*.)

Biological data set: به هر مجموعه داده با منشاء بیولوژیکی اطلاق می‌شود، اما از نظر مفهومی به معنی پایگاه داده‌ای توالی‌های طویل که در نتیجه تحقیقات جدید زیست شناسی مولکولی به دست آمده‌اند، می‌باشد.

Biotechnology: اصطلاح ژنریک به معنی کاربرد علوم بیولوژیکی به منظور استفاده مفید نوع بشر است. این علم طیف وسیعی از گرایش‌ها و روش‌ها را شامل می‌شود، اما به اشتباه تصور می‌شود که زیست فناوری تنها استفاده صنعتی از موجودات ریز تغییر یافته ژنتیکی می‌باشد.

BLG: واژه *beta lactoglobulin* را ببینید.

Blunt ends: مولکول DNA بدون انتهای '3 یا '5 آزاد. همچنین به نام *flush ends* معروف است.

Bovine somatotropin (BST): هورمون رشد گاوی که به صورت rBST در گاوهای شیری به منظور افزایش تولید شیر استفاده می‌شود.

BST: واژه *bovine somatotropin* را ببینید.

Bt plants: گیاهان تراریخته حامل ژن تولید سم باکتری *Bacillus thuringiensis* به منظور محافظت گیاه در برابر حمله حشرات.

CAAT box: توالی نوکلئوتیدی که تقریباً ۷۵bp قبل از محل شروع رونویسی در موجودات یوکاریوت قرار دارد و یکی از توالی‌هایی می‌باشد که احتمال اتصال RNA پلیمراز به محل دقیق شروع رونویسی را افزایش می‌دهد.

Caenorhabditis elegans: نماتد مورد استفاده به عنوان یک موجود الگو در مطالعات رشد و مولکولی.

Calf intestinal phosphatase (CIP): واژه *alkaline phosphatase* را ببینید.

Cap: تغییر شیمیایی که به انتهای '5 مولکول mRNA موجودات یوکاریوت در جریان پردازش بعد از رونویسی رونوشت اولیه اضافه می‌شود.

Capsid: پوشش پروتئینی ویروس.

Carbohydrate: مولکول حاوی کربن، هیدروژن و اکسیژن، با فرمول تجربی CH_2O که در ذخیره انرژی و واکنش‌های تبدیلی در سلول اهمیت دارد. مانند گلوکز، فروکتوز و لاکتوز.

پلیمری از کربوهیدرات‌ها پلی‌ساکارید نام دارند که به عنوان ترکیبات ذخیره انرژی استفاده می‌شوند.

cDNA: ساخت DNA از روی نسخه mRNA با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس.

cDNA library: مجموعه‌ای از کلون‌های تهیه شده از روی mRNA یک سلول یا بافت، که نشانگر اطلاعات ژنتیکی بیان شده توسط سلول‌های مذکور می‌باشد.

Cell membrane: ساختار لیپیدی دو لایه حاوی پروتئین‌های موجود در داخل و یا روی غشاء می‌باشد. به عنوان یک مانع انتخابی نفوذ پذیر عمل کرده و سلول را از محیط اطراف خود جدا می‌کند.

Cell wall: در باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها و گیاهان وجود دارد، دیواره سلولی یک ساختار سخت است که غشاء و محتویات سلول را محصور می‌کند. از ترکیبات پلی ساکاریدی از قبیل پپتیدوگلی‌کان (باکتری‌ها)، کیتین (قارچ‌ها)، و سلولز (گیاهان، جلبک ها و قارچ‌ها) تشکیل شده است.

Central Dogma: واژه‌ای در مورد انتقال یک طرفه اطلاعات از DNA به RNA و در نهایت به پروتئین.

Centrifugation: روش تفکیک مواد با چرخش در سرعت بالا. نیروهای جاذبه باعث می‌شوند مواد رسوب کرده و یا در محیط سانتریفوژ حرکت کنند. از سانتریفوژ جهت رسوب سلول‌ها، بقایای سلولی، اسیدهای نوکلئیک و سایر اجزا سلولی استفاده می‌شود. همچنین از سانتریفوژ با دور بالا برای جداسازی ماکرو مولکول‌ها استفاده می‌شود.

CFTR gene (protein): ژن و پروتئین تنظیم کننده هدایت غشای فیبروز سیستیک، با ایجاد اشکال در انتقال یون در غشا باعث ایجاد فیبروز سیستیک می‌شود.

Chimaera: موجود (معمولاً تراریخته) متشکل از سلول‌هایی با ژنوتیپ‌های مختلف.

ChIP assay: واژه *chromatin immunoprecipitation assay* را ببینید.

Chromatin immunoprecipitation assay: روش شناسایی مناطقی از DNA که با پروتئین‌های معینی در ارتباط بوده و با روش رسوب ایمیونولوژیکی ناحیه پروتئین/DNA، رسوب می‌کنند.

Chromatography: روش جداسازی انواع مختلفی از مولکول‌ها بر اساس تمایل و یا خصوصیات فیزیکی آن‌ها، زمانی که از یک زمینه (ماتریس) عبور کرده و در یک حلال مناسب شسته شده و جدا می‌گردند.

Chromosomal abnormalities (aberrations): این واژه برای توصیف تغییرات ژنتیکی شامل اخذ یا حذف کل یا بخشی از کروموزوم استفاده می‌شود.

Chromosome: مولکول DNA حاوی مجموعه‌ای از ژن‌ها. تعداد کروموزوم از یک عدد در موجوداتی مانند باکتری‌ها و یا چندین عدد در موجوداتی مانند یوکاریوت‌ها متفاوت می‌باشد.

Chromosome jumping: روشی برای جداسازی نواحی غیر پیوسته DNA با "پریدن" از روی فواصلی که ممکن است نتیجه همسانه‌سازی غیر موفق مناطقی از DNA در یک کتابخانه ژنی باشند.

Chromosome walking: روشی برای جداسازی قطعات DNA همسانه سازی شده پیوسته با استفاده از هر قطعه به عنوان یک کاوشگر برای جداسازی نواحی مجاور قطعه همسانه سازی شده.

Chymosin (chymase): آنزیم مورد استفاده در تولید پنیر، که به عنوان یک محصول نوترکیب در دسترس است.

***Cis*-acting element**: توالی DNA که تنها روی مولکول DNA مشابه عمل می‌کند. به عنوان مثال، توالی CAAT box برای رونویسی در موجودات یوکاریوت یک توالی با نقش سیس می‌باشد.

Cistron: توالی از نوکلئوتیدها در DNA که تعیین کننده یک پلی‌پپتید می‌باشند.

Clone: ۱. مجموعه‌ای از موجودات مشابه، اغلب برای توصیف یک سلول حاوی یک قطعه DNA نوترکیب استفاده می‌شود. ۲. به عنوان فعلی برای توصیف تولید سلول‌های نوترکیب استفاده می‌شود. ۳. تولید موجود زنده (مانند گوسفند) از یک هسته سلول جنینی توسط انتقال هسته به درون یک تخمک تلقیح شده.

Clone bank: واژه *cDNA library, genomic library* را ببینید.

Clone contig: توالی‌های به هم پیوسته کلون شده. مجموعه‌ای از کلون‌های به هم پیوسته که نشان دهنده ترتیب واقعی توالی DNA موجود می‌باشد به گونه‌ای که در داخل سلول وجود دارد.

Co-dominance: غالبیت هم بارز، آلل‌هایی که به طور یکسان در فنوتیپ بیان شوند.

Codon: سه نوکلئوتید موجود در mRNA و تعیین کننده یک اسید آمینه خاص بعد از فرآیند ترجمه.

Cohesive ends: انتهای مولکول‌های DNA که دارای توالی‌های مکمل کوتاه هستند و با ایجاد پیوند این توالی‌های کوتاه در دو مولکول DNA موجب اتصال دو مولکول به هم می‌شوند. انتهای چسبنده اغلب توسط آنزیم‌های برشی محدود الاثر تولید می‌شود.

Cointegration: تشکیل یک مولکول DNA از دو جز، معمولاً به تشکیل یک ناقل پلاسمید بزرگتر از دو بخش پلاسمید کوچک‌تر اشاره دارد.

Comparative genome analysis: استفاده از روش‌های تجزیه و تحلیل ژنوم برای ایجاد شباهت‌ها و تفاوت‌ها بین ژنوم موجودات در سطوح مختلف تاکسونومیکی.

Competent: اشاره به سلول‌های باکتری که قادر به اخذ DNA با منشاء خارجی است.

Competitor RT-PCR: روش مورد استفاده برای تعیین مقدار محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در نمونه‌هائی ثابت از مقادیر DNA که با مقادیر شناخته شده‌ای از یک توالی رقابتی مورد تکثیر قرار می‌گیرند.

Complementary DNA: واژه cDNA را ببینید.

Complementation: فرآیندی که در آن ژن‌ها در مولکول‌های مختلف DNA با هم برهمکنش نشان می‌دهند. معمولا شامل فراورده یک پروتئین است و از آن جایی که این فراورده یک مولکول قابل انتشار است می‌تواند بر روی DNA در محل دورتر اثر بگذارد. به عنوان مثال، ژن $lacZ^+$ *روی* پلاسمید می‌تواند نقش یک ژن جهش یافته ($lacZ^-$) روی کروموزوم را با سنتز بتاگالاکتوزیداز تکمیل نماید.

Computer hardware: تجهیزات کامپیوتری که زیر ساخت مورد نیاز را برای اجرای برنامه‌های نرم افزار فراهم می‌کنند.

Computer software: برنامه‌هایی که بر روی سخت افزار کامپیوتر نصب می‌شوند. نرم افزارها امکان دستکاری و پردازش انواع مختلف داده، متن و گرافیک را فراهم می‌کنند.

Concatemer: مولکول DNA متشکل از قطعات متعدد که با انتهای چسبنده به هم متصل شده‌اند.

Congenital: مادرزادی، معمولاً برای توصیف اختلالات ژنتیکی استفاده می‌شود.

Conjugation: هم یوغی؛ انتقال با واسطه پلاسمیدی مواد ژنتیکی از باکتری دهنده "نر" به باکتری گیرنده "ماده"

Consensus sequence: توالی که در اغلب نمونه‌های یک ترکیب ژنتیکی خاص وجود دارد و درجه بالایی از حفاظت شدگی و شباهت را نشان می‌دهد. توالی CAAT box نمونه‌ای از این توالی‌ها است.

Containment: واژه biological containment و physical containment را ببینید.

Contiguous: در زیست شناسی مولکولی، اشاره به توالی‌هایی از DNA دارد که به یکدیگر متصل هستند.

Copy number: ۱. تعداد مولکول‌های پلاسمید در یک سلول باکتری. ۲. تعداد نسخه‌های یک ژن در ژنوم یک موجود.

***cos* site**: ناحیه‌ای که بعد از اتصال دو انتهای چسبنده DNA لامبدا به هم ایجاد می‌شوند.

Cosmid: ناقل هیبرید متشکل از توالی‌های پلاسمید و دو انتهای چسبنده باکتریوفاژ لامبدا.

Covalent bond: پیوند مولکولی نسبتاً قوی که در آرایش الکترونی اتم‌های تشکیل دهنده یک ماده با اشتراک گذاشتن الکترون‌ها صورت می‌گیرد.

Crown gall disease: بیماری گیاهی ناشی از پلاسمید Ti باکتری آگروباکتریوم، که پس از عفونت در بافت طوقه گیاه، گال ایجاد می‌شود.

Crystallisation: روش تغلیظ محلول با تشکیل ساختار بلورین، معمولاً در نتیجه تبخیر حلال به دست می‌آید.

C terminus: انتهای کربوکسیل، که با گروه COOH اسید آمینه یا پروتئین مشخص می‌شود.

Cyanogen bromide: ماده شیمیایی مورد استفاده برای جداسازی محصول پروتئین الحاق شده از توالی ناحیه N ترمینال یک ناقل بعد از تهیه پروتئین مورد نظر.

Cystic fibrosis: بیماری نقص انتقال یون‌ها توسط ژن CFTR در ریه‌ها و بافت‌های دیگر

Cytidine: نوکلئوزیدهای متشکل از ریبوز و سیتوزین.

Cytosine (C): نوکلئوتید نیتروژن دار موجود در DNA و RNA.

Data mining: روش جستجوی پایگاه داده‌ها (انواع مختلف) برای کسب اطلاعات.

Data warehouse: اشاره دارد به وسیله ذخیره سازی داده‌ها، معمولاً به فضای ذخیره‌سازی در یک کامپیوتر که در آن داده‌ها به اشکال مختلف الکترونیکی نگهداری می‌شوند.

Database: مجموعه‌ای از اطلاعات ثبت شده مرتبط که به صورت الکترونیکی نگهداری می‌شوند. مانند پایگاه داده توالی DNA و پروتئین.

DDBJ: بانک اطلاعات DNA ژاپن، پایگاه داده توالی DNA مرکزی ژاپن.

Dehydration synthesis: شکلی از واکنش تراکمی که در آن دو مولکول با حذف یک مولکول آب به هم متصل می‌شوند.

Deletion: تغییر مواد ژنتیکی ناشی از حذف بخشی از توالی بازها در DNA.

Deoxynucleoside triphosphate (dNTP): ماده پیش ساز حاوی سه فسفر (دارای انرژی بالا) که برای سنتز DNA لازم است، که در آن N یکی از چهار نوکلئوتید (A، G، T و C) می‌باشد.

Deoxyribonucleic acid (DNA): هتروپلیمر متراکم متشکل از نوکلئوتید. DNA ماده ژنتیکی اولیه در تمام موجودات زنده به غیر از برخی از ویروس‌های دارای RNA می‌باشد و معمولاً دو رشته‌ای است.

Deoxyribose: قند موجود در DNA.

Deoxyribonuclease (DNase): نوعی آنزیم نوکلئاز که موجب برش یا هضم DNA تک و دو رشته‌ای می‌شود.

Deproteinisation: حذف آلودگی‌های پروتئینی در هنگام تهیه اسید نوکلئیک.

Diabetes mellitus (DM): وضعیتی که در آن سطوح بالای گلوکز در خون به دلیل مشکلاتی در تنظیم میزان قند ایجاد می‌شود. این بیماری ممکن است به علت کمبود انسولین یا نقایص دیگر در سیستم تنظیم گلوکز ایجاد شود.

Dicer: آنزیم مؤثر در RNA مداخله‌گر.

Dideoxynucleoside triphosphate (ddNTP): شکل تغییر یافته dNTP که در توالی‌یابی DNA به عنوان پایان دهنده واکنش استفاده می‌شود.

Diploid: دارای یک جفت کروموزوم.

Directed evolution: روش مهندسی تغییرات در ساختار پروتئین با ایجاد تغییرات تصادفی و انتخاب مفیدترین آن، شبیه به یک فرایند تکاملی.

Disarmed vector: ناقلی که در آن برخی از ویژگی‌ها (مانند انتقال ماده ژنتیکی) غیر فعال شده است.

DMD: واژه *Duchenne muscular dystrophy* را ببینید.

DNA: واژه *Deoxyribonucleic acid* را ببینید.

DNA chip: تراشه DNA مورد استفاده در تجزیه و تحلیل ساختار و بیان ژن. متشکل از توالی‌های اولیگونوکلئوتیدی که به ترتیب روی یک تراشه آرایش داده شدند.

DNA fingerprinting: واژه *genetic fingerprinting* را ببینید.

DNA footprinting: روش شناسایی مناطقی از DNA که در آن نواحی پروتئین‌های تنظیم کننده متصل خواهند شد.

DNA ligase: آنزیم مورد استفاده برای اتصال مولکول‌های DNA با تشکیل یک پیوند فسفو دی استر بین فسفات ناحیه '5 و یک گروه هیدروکسیل ناحیه '3.

DNA microarray: واژه *DNA chip* را ببینید.

DNA polymerase: آنزیمی که از روی DNA الگو، نسخه‌هایی را می‌سازد.

DNA profiling: این واژه برای توصیف روش‌های مختلف به منظور تجزیه و تحلیل DNA برای تائید هویت فردی به کار می‌رود.

DNA shuffling: اشاره به تولید انواع مختلف از اجزای ژن با استفاده از توالی اگزون در ترکیبات مختلف دارد. می توان از آن در مهندسی پروتئین استفاده نمود، اگر چه در داخل سلول زنده رخ می‌دهد، جایی که معمولاً به عنوان به هم آمیختگی اگزون نامیده می‌شود.

DNase protection: روش مورد استفاده برای تعیین نواحی اتصال پروتئین به توالی DNA که در آن مناطق، پروتئین از DNA در برابر هضم آنزیمی محافظت می‌کند.

Dominant: آللی که بیان شده و در فنوتیپ افراد هتروزیگوت ظهور می‌یابد.

Dot blot: روشی که در آن لکه‌های کوچک یا قطعات اسید نوکلئیک در یک غشاء نیتروسلولزی و یا نایلونی برای هیبریداسیون ثابت می‌شوند.

Downstream processing: روش‌های مورد استفاده برای خالص سازی محصولات (معمولاً پروتئین‌ها) پس از این که در سلول‌های باکتریایی، قارچی، یا پستانداران بیان شده باشند.

Down syndrome: وضعیت بالینی ناشی از تریزومی کروموزوم شماره ۲۱ (سه نسخه از کروموزوم شماره ۲۱)، در نتیجه عدم تفکیک کروموزوم‌ها در مرحله میوز.

Draft sequence: یک توالی DNA (یا پروتئین) به شکل ویرایش نشده، اغلب ناقص یا با برخی اشکالات اصلاح نشده.

Drosophila melanogaster: مگس سرکه، به عنوان یک موجود زنده الگو که در مطالعات ژنتیکی، رشد و مولکولی استفاده می‌شود.

Duchenne muscular dystrophy: بیماری تحلیل عضلانی وابسته به کروموزوم X، در اثر نقص در ژن پروتئین دیستروفین.

Dystrophin: پروتئین بزرگی که اسکلت سلولی را به غشای سلول‌های عضلانی متصل می‌کند، نقص در این پروتئین باعث دیستروفی عضلانی می‌شود.

EBI: مؤسسه بیوانفورماتیک اروپا.

Edman degradation: روش مورد استفاده برای تعیین توالی اسیدآمینه یک پلی پپتید.

Electroporation: روشی برای انتقال DNA به داخل سلول‌ها با استفاده از جریان الکتریکی.

ELISA: واژه *Enzyme-linked immunosorbent assay* را ببینید.

ELSI: گاهی اوقات به اختصار برای توصیف مفاهیم اخلاقی، حقوقی و اجتماعی مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد.

EMBL: آزمایشگاه زیست شناسی مولکولی اروپا.

Embryo splitting: روش مورد استفاده برای کلون کردن موجودات به وسیله تفکیک سلول‌ها در اوایل دوره جنینی، که پس از رشد نسخه‌های مشابهی از موجود را تولید کند.

Emergent properties: به ظهور ویژگی‌های جدید با افزایش پیچیدگی‌ها اشاره دارد که در آن اغلب از روی اطلاعات قطعات تشکیل شده نمی‌توان سطح بعدی پیچیدگی را پیش بینی کرد. گاهی اوقات به صورت "کل گویاتر از مجموع بخش‌ها است" توصیف شده است.

End labeling: اضافه کردن یک مولکول رادیواکتیو به انتهای یک زنجیر نوکلئوتیدی.

Endonuclease: آنزیمی که مولکول اسید نوکلئیک را از وسط برش می‌دهد، بر عکس آن اگزونوکلئاز است که موجب برش یا هضم مولکول DNA از یک یا هر دو انتها می‌شود.

Endothia parasitica: قارچ مورد استفاده در برنامه‌های کاربردی زیست فناوری.

Enhancer: توالی که باعث افزایش رونویسی از پروموتور یک ژن یوکاریوتی می‌شود. ممکن است چند هزار جفت نوکلئوتید دورتر از پروموتر قرار داشته باشد.

Ensembl: مرورگری برای جستجو در اطلاعات توالی DNA از پروژه‌های تعیین توالی ژنوم. این مرورگر توسط آزمایشگاه زیست شناسی مولکولی اروپا (EMBL) و موسسه Wellcome Trust Sanger Institute توسعه یافته است.

Enzyme: پروتئینی که منجر به تسریع یک واکنش خاص می‌شود.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): روش تشخیص و ردیابی آنتی‌ژن‌های خاص با استفاده از آنتی‌بادی متصل به یک آنزیم که در نتیجه یک محصول رنگی تولید می‌شود. آنتی‌ژن‌ها بر روی یک سطح (یک صفحه پلاستیکی دارای ۹۶ چاهک) ثابت شده و در نتیجه تعداد زیادی از نمونه‌ها را می‌توان در یک زمان بررسی نمود.

Enzyme replacement therapy: روش درمانی است که در آن عملکرد ناقص یک آنزیم با جایگزین کردن خود آنزیم بازسازی می‌شود.

Epigenesis: پس‌زائی، نظریه رشد مشتمل از یک مجموعه از مراحل تکراری، که در آن نشانه‌های مختلف و رویدادهای کنترلی به منظور تنظیم رشد در تعامل هستند.

EPSP synthase: (نام کامل آن: ۵- انول پیرویل شیکیمیت -۳- فسفات سینتاز) آنزیم بیوسنتز اسید آمینه که علفکش گلیفوسیت از فعالیت آن جلوگیری می‌کند.

Error-prone PCR: انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تحت شرایط غلظت پائین نمک موجود در بافر، که در نتیجه آن انواع فرآورده تولید می‌شود. از این روش می‌توان در جهش زایی کنترل شده استفاده کرد.

Escherichia coli: عمومی‌ترین باکتری مورد استفاده در زیست شناسی مولکولی.

Ethidium bromide: مولکولی که به DNA متصل می‌شود و در هنگام مشاهده زیر نور ماوراء بنفش نارنجی رنگ است. برای رنگ آمیزی DNA استفاده می‌شود.

Eukaryotic: ویژگی داشتن یک هسته دارای غشاء.

Exon: ناحیه‌ای از یک ژن یوکاریوتی که از طریق mRNA بیان می‌شود.

Exon shuffling: واژه *DNA shuffling* را ببینید.

Exonuclease: آنزیمی که موجب هضم یا برش مولکول اسید نوکلئیک از یک یا هر دو انتها می‌شود.

Expressivity: مقداری که یک ژنوتیپ خاص اثر خود را روی فنوتیپ اعمال می‌کند.

Expressome: به تمام اجزای بیان شده در هر سلول شامل رونوشت‌های اولیه، mRNA بالغ و پروتئین‌ها اشاره دارد.

Extrachromosomal element: مولکول DNA که بخشی از کروموزوم سلول میزبان نیست.

Ex vivo: در شرایط آزمایشگاهی و خارج از بدن. برای توصیف روش ژن درمانی استفاده می‌شود که در آن دستکاری‌های ژن در خارج از بدن انجام می‌شود و سلول‌های تغییر یافته پس از پردازش به مکان اصلی خود در بدن موجود زنده باز گردانده می‌شوند.

Factor IX: یک گروه از فاکتورهای لخته شدن خون، که در گوسفند تراریخته تولید شده است.

False negative: نتایج آزمونی که وضعیت واقعی را شناسایی نکند، همان طور که در مورد آزمایش ایدز اتفاق می‌فتد که در آن آنتی بادی‌ها ممکن است در مراحل اولیه غیر قابل ردیابی باشند. بنابراین، نتیجه آزمون در این مرحله می‌تواند منفی باشد حتی در صورتی که فرد آلوده است.

False positive: کسب نتیجه مثبت که در واقع نادرست است. این نتیجه غلط می‌تواند روی تعدادی از روش‌های مختلف و تکنیک‌های تجربی تاثیر بگذارد.

Fibrin: پروتئین نامحلول که در تشکیل لخته خون موثر است.

Fibrinogen: ماده پیش‌ساز فیبرین، که با دخالت ترومبین به فیبرین تبدیل می‌شود.

Filtration: روش جدا سازی ترکیبات جامد و مایع از یک سوسپانسیون با عبور از فیلتر.

Finished sequence: به توالی کامل DNA یا پروتئین که ناهنجاری‌ها و نواحی ناقص آن اصلاح شده اشاره دارد.

Flavr Savr (***sic***): گوجه فرنگی تراریخته که در آن ساخت پلی‌گالاکتورونـاز با استفاده از فناوری آنتی‌سنس محدود شده است. علی‌رغم استفاده از این علم جدید، Flavr Savr به موفقیت تجاری دست نیافت.

Flush ends: واژه Blunt ends را ببینید.

Foldback DNA: نوعی DNA که دارای نواحی تکراری برگشتی یا معکوس بوده و هنگامی که دو رشته DNA از یکدیگر جدا هستند به سرعت به هم متصل می‌شوند.

Food and Drug Administration (**FDA**): سازمان تنظیم مقررات غذائی و داروئی در ایالات متحده آمریکا

Formulation: مورد استفاده برای توصیف دستورالعمل کاربردی برای تولید دارو.

Freeze-drying: روش مورد استفاده برای تغلیظ مواد حل شده با حذف آب تحت شرایط خلاء و دمای پایین (انجماد خشک).

FTP: پروتکل انتقال فایل که در انتقال داده‌ها بین سیستم‌های کامپیوتری اهمیت دارد.

Fusion protein: پروتئین هیبرید نوترکیب که شامل اسید آمینه ساخته شده ناقل در ناحیه N terminus می‌باشد.

Gamete: اشاره دارد به سلول‌های نر (اسپرم) و سلول ماده (تخم) هاپلوئید که برای تولید سلول تخم دیپلوئید در مرحله تولید مثل جنسی با هم ترکیب می‌شوند.

Gel electrophoresis: روشی برای جداسازی مولکول‌های اسید نوکلئیک بر اساس حرکت آن‌ها در داخل ژل تحت تاثیر میدان الکتریکی می‌باشد. (آگارز و پلی آکریلامید را ببینید).

Gel retardation: روش تعیین مکان‌های اتصال پروتئین به قطعات DNA بر اساس کاهش حرکت آن‌ها نسبت به DNA آزاد با انجام الکتروفورز.

GenBank: پایگاه داده اولیه توالی DNA، در حال حاضر یکی از منابع اصلی برای داده‌های توالی ژنوم محسوب می‌شود.

Gene: واحد توارث، که روی کروموزوم قرار دارد. از نظر مولکولی معمولا به معنای ناحیه‌ای از DNA می‌باشد که نقشی را ایفا می‌کند. به طور کلی، یک ژن یک پروتئین را می‌سازد.

Gene addition therapy: شیوه‌ای از ژن درمانی که در آن بدون نیاز مطلق به تبادل ژنتیکی برای جایگزینی یک ژن معیوب، نقشی از ژن به مکمل آن در ژنوم اضافه شده است.

Gene bank: واژه Genomic library را ببینید.

Gene cloning: جداسازی ژن‌های منفرد با ساخت مولکول‌های DNA نوترکیب و تکثیر در یک سلول میزبان و تولید یک کلون که شامل یک قطعه از DNA هدف می‌باشد.

Gene protection technology: روش‌های مورد استفاده برای کسب اطمینان از سازه‌های نوترکیب تجاری سازی شده که بدون انجام فرآیند کنترل توسط شرکت‌های تهیه کننده سازه‌های نوترکیب، قابل استفاده نمی‌باشند. همچنین به نام فناوری محدودیت استفاده از مواد ژنتیکی و فناوری کنترل صفات ژنتیکی مشهور هستند.

Gene therapy: استفاده از ژن کلون شده در درمان اختلالات ژنتیکی. ممکن است در داخل بدن یا در شرایط آزمایشگاهی انجام شود. ممکن است به صورت ژن اضافی یا نسخه‌های ژن جایگزینی ارائه شود.

Genetic code: کدون سه تایی که تعیین کننده نوع اسید آمینه‌ای می‌باشد که به یک پلی‌پپتید در مرحله ترجمه اضافه می شود. ۶۱ کدون برای ۲۰ اسید آمینه (به اضافه ۳ کدون توقف ساخت اسید آمینه) وجود دارند.

Genetic fingerprinting: روشی که از کاوشگرهای رادیواکتیو برای شناسایی باندهای به دست آمده از نواحی متغیر DNA استفاده می‌کند. الگوی باندی برای یک فرد منحصر به فرد است و می‌تواند برای تعیین هویت و یا نسبت‌های خانوادگی مورد استفاده قرار گیرد.

Genetic mapping: روشی برای تعیین جایگاه ژن بر روی کروموزوم.

Genetic marker: ویژگی فنوتیپی که می‌توان به یک ژن خاص نسبت داد.

Genetic trait control technology: نسخه فناوری حفاظت ژن.

Genetic use restriction technology (GURT): واژه *Gene protection technology* را ببینید.

Genetically modified food (GMF): یک موجود تغییر یافته ژنتیکی، به طور خاص برای استفاده به عنوان ماده غذایی.

Geneticallymodifiedfood(GMF)AGMO(q.v.)specificallyforuseasa foodstuff.

Genetically modified organism (GMO): موجود زنده‌ای که در آن یک تغییر ژنتیکی انجام شده است. معمولاً برای توصیف گیاهان و حیوانات تراریخته استفاده می‌شود.

Genome: برای توصیف مواد ژنتیکی کامل یک ویروس، سلول و یا موجود زنده به کار می‌رود.

Genomics: مطالعه ژنوم، به ویژه مطالعه توالی‌یابی ژنوم.

Genomic library: مجموعه‌ای از کلون‌ها که با هم نشان دهنده کل ژنوم یک موجود می‌باشند.

Genotype: اساس ژنتیکی یک موجود زنده.

Germ line: سلول‌های تولید کننده گامت که منجر به تولید سلول‌های تخم و اسپرم می‌شود.

GFP: واژه Green fluorescent protein را ببینید.

Gigabase (Gb): $۱۰^۹$ نوکلئوتید و یا $۱۰^۹$ جفت نوکلئوتید.

GIGO effect: از علوم کامپیوتر، به معنی حذف داده‌های نادرست. ضرورت اطمینان از دقت و صحت داده‌های ورودی، در صورتی نتایج معتبر به دست می‌آیند که توسط برنامه‌های مختلف کامپیوتر پردازش شده باشند.

Glyphosate: علف کشی که از ساخت ماده EPSP جلوگیری می‌کند.

GMF: واژه Genetically modified food را ببینید.

GMO: واژه Genetically modified organism را ببینید.

Green fluorescent protein: پروتئین مفید به عنوان یک نشانگر برای فرآیندهای مختلف در زیست شناسی سلولی و روش‌های DNA نوترکیب. همان گونه که از نام واژه مشخص است بافت‌هایی که پروتئین GFP را بیان می‌کنند با نور سبز رنگ مشخص هستند.

Guanine (G): نوکلئوتید نیتروژن دار که در DNA و RNA وجود دارد.

Guanosine: نوکلئوزید متشکل از قند ریبوز و گوانین.

GURT: واژه‌های Genetic use restriction technology و Gene protection technology را به ببینید.

Hansela polymorpha: گونه‌ای از مخمر مورد استفاده در برنامه‌های کاربردی زیست فناوری.

Haploid: حاوی مجموعه‌ای از کروموزوم‌ها.

Heterologous: توالی‌های غیر یکسان ژن، اما درجه متفاوتی از شباهت را نشان می‌دهند.

Heteropolymer: پلیمر متشکل از انواع مختلف مونومر. بیشتر مولکول‌های پروتئین و اسید نوکلئیک هترو پلیمر می‌باشند.

Heterozygous: موجود دیپلوئید (سلول یا هسته) که دارای دو آلل مختلف در یک جایگاه خاص می‌باشد.

HGP: واژه Human Genome Project را ببینید.

HIV: واژه Human immunodeficiency virus را ببینید.

Hogness box: واژه TATA box را ببینید.

Homologous: ۱. کروموزوم‌های زوج در موجودات دیپلوئید. ۲. برای توصیف توالی‌های DNA کاملا یکسان استفاده می‌شود. هر چند، درصد شباهت بین توالی‌های مرتبط گاهی اوقات کامل نیست.

Homologue: یکی از کروموزوم‌های زوج.

Homopolymer: پلیمر متشکل از تنها یک نوع مونومر، از قبیل پلی فنیل آلانین (پروتئین) یا اسید نوکلئیک چند آدنینی.

Homozygous: موجود دیپلوئید (سلول یا هسته) که دارای آلل‌های یکسان در یک جایگاه خاص می‌باشد.

Host: سلول مورد استفاده برای تکثیر مولکول‌های DNA نوترکیب.

HPV: واژه Human papilloma virus را ببینید.

HUGO: سازمان ژنوم انسان.

Human Genome Project: تلاش مشترک چند ملیتی جهت تعیین توالی DNA ژنوم انسان.

Human immunodeficiency virus (HIV): رتروویروس، عامل سندرم نقص ایمنی اکتسابی.

Human papilloma virus (HPV): عامل انواع زگیل، زگیل ناحیه تناسلی، و مرتبط با سرطان دهانه رحم. بیش از ۱۰۰ نوع از آن توصیف شده است.

Humulin™: انسولین انسانی نوترکیب.

Huntington disease: بیماری مخرب اتوزومال غالب که در میان سالی آغاز می‌شود. گاهی به علت ویژگی‌های حرکات فیزیکی افراد مبتلا به بیماری تشنج هانتینگتون معروف است.

HUPO: سازمان پروتئوم انسان، یک کنسرسیوم بین‌المللی پژوهشگران پروتئومیکس که در مفهوم مشابه سازمان ژنوم انسان می‌باشد.

Hybrid-arrest translation: روش‌های مورد استفاده برای شناسایی محصول پروتئین یک ژن کلون شده که با تشکیل هیبرید mRNA – DNA، از ترجمه mRNA جلوگیری می‌شود.

Hybrid-release translation: روشی که یک mRNA مشخص به وسیله هیبریداسیون با توالی DNA کلون شده همولوگ خود جدا سازی شده و سپس به یک محصول پروتئینی قابل شناسایی ترجمه می‌شود.

Hybridisation: به هم پیوستن مولکول‌های اسید نوکلئیک با تشکیل پیوند هیدروژنی بین بازهای مکمل، که به طور مصنوعی از هم جدا می‌شوند.

Hydrolysis: واکنشی که دو مولکول متصل به یکدیگر با افزودن و مصرف مولکول‌های آب از هم جدا می‌شوند. در واقع برعکس واکنش دهیدراسیون است.

Hypervariable region (HVR): ناحیه‌ای در ژنوم که متشکل از تعداد متغیری از توالی‌های تکراری می‌باشد که ترتیب این توالی‌ها برای هر فرد اختصاصی است. واژه انگشت نگاری ژنتیکی را ببینید.

Ice-minus bacteria: باکتری‌های مهندسی شده برای ایجاد اختلال در فرآیند طبیعی تشکیل هسته یخ، که به منظور محافظت گیاهان در برابر آسیب سرما به کار می‌روند.

IFA: واژه Indirect immunofluorescent assay را ببینید.

IGF-1: واژه Insulin-like growth factor را ببینید.

In silico: برای توصیف آزمایش‌های مجازی انجام شده بر روی یک کامپیوتر استفاده می‌شود، که اغلب با دستکاری توالی داده‌ها همراه است. یکی از نمونه‌ها پیش بینی اثر تغییر بخش‌های خاصی از توالی ژن روی ساختار یک پروتئین می‌باشد.

In vitro: به معنای واقعی کلمه "در شیشه"، یعنی درون لوله آزمایش، به جای داخل سلول یا درون موجود زنده.

In vivo: به معنای واقعی کلمه "درون موجود زنده"، یعنی در وضعیت طبیعی، درون یک سلول یا موجود زنده.

Indirect immunofluorescence assay (IFA): روشی برای ردیابی و تشخیص آنتی‌ژن با استفاده از آنتی بادی ثانویه.

Information technology (IT): معمولاً (و گاهی به ندرت) برای توصیف دستکاری مجموعه‌ای از داده‌های متنوع با استفاده کامپیوتر به کار می‌رود.

Inosine: نوکلئوزید موجود در tRNA، گاهی اوقات در ساخت الیگو نوکلئوتیدها در موقعیت‌هایی که توالی‌های متفاوت نوکلئوتیدی قرار دارند مورد استفاده قرار می‌گیرد. زیرا اینوزین می‌تواند به نوکلئوتیدهای دیگر DNA متصل گردد.

INSDC: همکاری پایگاه داده توالی نوکلئوتیدی بین‌المللی، شبکه‌ای که برای کمک به مدیریت پایگاه توالی داده‌ها راه اندازی شده است.

Insertion vector: ناقل باکتریوفاژی که دارای یک مکان همسانه سازی برای الحاق DNA است.

Insulin: هورمون پروتئینی موثر در تنظیم سطح قند خون. از دهه ۱۹۸۰ انسولین به شکل نوترکیب در دسترس بوده است.

Insulin-like growth factor (IGF-1): هورمون پلی‌پپتیدی، که ساخت آن توسط هورمون رشد القا می‌شود. نگرانی‌هایی در مورد ایمنی استفاده از هورمون رشد گاوی نوترکیب برای افزایش تولید شیر گاو وجود دارد.

Interactome: این واژه برای توصیف مجموعه‌ای از همکنش‌ها بین اجزای سلولی از قبیل پروتئین‌ها و سایر متابولیت‌ها استفاده می‌شود.

Intervening sequence: ناحیه‌ای در ژن یوکاریوت‌ها که در mRNA پردازش شده بیان نمی‌شود.

Intron: واژه Intervening sequence را ببینید.

Inverse PCR: روشی است که از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر DNA که هیچ اطلاعاتی از توالی آن برای طراحی آغازگر وجود ندارد استفاده می‌شود. روش کار به گونه‌ای است که با حلقوی و معکوس کردن توالی هدف می‌توان از آغازگرهای درون نواحی با توالی مشخص برای تکثیر استفاده کرد.

Inverted repeat: توالی کوتاهی از DNA که معمولا در انتهای یک توالی بلند در جهت معکوس تکرار می‌شود.

IPTG: ایزو پروپیل تیو گالاکتوزید، القا کننده پروموتر اپرون *lac* می‌باشد. با اضافه شدن این ماده شیمیایی به محیط کشت، رونویسی ژن فرودست پروموتر *lac* فعال می‌شود.

IT: واژه Information technology را ببینید.

Kilobase (kb): تعداد 10^3 نوکلئوتید یا جفت نوکلئوتید، به عنوان یک واحد برای تعیین طول مولکول‌های DNA یا RNA به کار می‌رود.

Klenow fragment: قطعه‌ای از DNA پلیمراز I پروکاریوت‌ها که فاقد فعالیت اگزو نوکلئازی در جهت '5 به '3 می‌باشد.

Kluyveromyces lactis: گونه‌ای از مخمر که در برنامه‌های کاربردی زیست فناوری مفید است.

Knockdown: اشاره به کاهش بیان ژن دارد که اغلب در نتیجه تغییر در توالی ژن هدف با استفاده از روش‌های DNA نوترکیب حاصل می‌شود.

Knockin mouse: موش تراریخته‌ای که عملکرد یک ژن به آن اضافه شده است. در ابتدا برای تولید الگوهای حیوانی برای مطالعه بیماری انسان استفاده شد (مانند بیماری فیبروز سیستیک).

Lambda: باکتریوفاژ مورد استفاده در ساخت ناقل، معمولاً برای تولید ناقلین الحاقی و جایگزینی استفاده می‌شود. ناقلین جایگزینی معمولا برای تهیه کتابخانه ژنومی مورد استفاده قرار می‌گیرند و توانایی کسب قطعات DNA به طول حدود ۲۳kb را دارند.

Linkage mapping: روشی از نقشه برداری ژنتیکی که برای ایجاد میزان ارتباط بین ژن‌ها استفاده می‌شود. همچنین واژه Recombination frequency mapping را ببینید.

Linker: اولیگونوکلئوتیدهای ساختگی با توالی مکمل یکدیگر که حاوی جایگاه آنزیم برشی محدودالاثر می‌باشد. برای اضافه کردن انتهای چسبنده به مولکول‌های DNA که دارای انتهای صاف هستند به کار می‌رود.

Lipase: آنزیمی که موجب هیدرولیز چربی‌ها (لیپیدها) می‌شود.

Liposome (lipoplex): روش مبتنی بر لیپید برای ژن درمانی.

Locus: مکان یک ژن روی کروموزوم.

Lysogenic: اشاره به عفونت باکتریوفاژ که موجب تخریب سلول میزبان نمی‌شود.

Lytic: اشاره به عفونت باکتریوفاژ که باعث تخریب سلول میزبان می‌شود.

Macromolecule: مولکول‌های پلیمر بزرگ متشکل از واحدهای مونومر، برای توصیف پروتئین‌ها (مونومرهای آن اسیدهای آمینه هستند) و اسیدهای نوکلئیک (مونومرهای آن نوکلئوتید هستند) به کار می‌روند.

Maternal inheritance: الگوی توارث از سیتوپلاسم سلول ماده. ژن‌های میتوکندریایی از این راه به ارث می‌رسند، زیرا میتوکندری از راه تخمک به ارث می‌رسد.

Mega (M): 10^6.

Megabase (Mb): 10^6 نوکلئوتید یا 10^6 جفت نوکلئوتید.

Megahectare (MHa): 10^6 هکتار.

Messenger RNA (mRNA): مولکول اسید ریبونوکلئیک رونویسی شده از مولکول DNA که حامل کدون‌های تعیین توالی اسیدهای آمینه در پروتئین می‌باشد.

Metabolome: جمعیت متابولیت‌های یک سلول، که همراه با پروتئومیکس و ترانس‌کریپتئومیکس می‌تواند یک تصویر کلی از فعالیت سلول در هر مرحله از زمان بدهد.

Micro (μ): 10^{-6}.

Microinjection: انتقال DNA به داخل هسته یا سیتوپلاسم سلول با تزریق مستقیم.

Micro RNAs (miRNAs): مولکول‌های کوتاه RNA که به عنوان بخشی از مکانیسم RNA مداخله‌گر می‌باشد.

Microsatellite DNA: نوعی توالی DNA که بارها در ژنوم تکرار می‌شود. بر اساس تکرار دو نوکلئوتیدی، ریزماهواره‌ها به شدت متغیر هستند و می‌توان از آن‌ها در مطالعات نقشه برداری ژن و تهیه پروفایل DNA استفاده نمود.

Milli (m): 10^{-3}.

Minisatellite DNA: نوعی توالی تکراری پشت سر هم به تعداد متغیر (VNTRs) می‌باشد. در مطالعات نقشه برداری ژن و تهیه پروفایل DNA استفاده می‌شود.

Mini-Ti vector: ناقلی برای همسانه‌سازی در سلول‌های گیاهی، بر اساس بخشی از پلاسمید Ti در باکتری *Agrobacterium tumefaciens*

miRNA: واژه Micro RNAs را ببینید.

Molecular cloning: واژه جایگزین برای همسانه‌سازی ژن.

Molecular ecology: استفاده زیست شناسی مولکولی و روش‌های DNA نوترکیب در مطالعه موضوعات اکولوژیکی.

Molecular paleontology: استفاده از روش‌های مولکولی به منظور بررسی وقایع گذشته، مانند تهیه پروفایل DNA از نمونه‌های مومیایی یا سنگواره‌ها.

Monocistronic: مولکول RNA که دارای یک نقش باشد.

Monogenic: صفت ناشی از یک ژن واحد.

Monomer: واحد سازنده پلیمر. نوکلئوتیدها و اسیدهای آمینه به ترتیب مونومرهای اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها می‌باشند.

Monosomy: سلول‌های دیپلوئیدی که یکی از جفت کروموزوم‌های همولوگ آن حذف شده است.

Monozygotic: اشاره به دوقلوهای همسان دارد که از تقسیم یک جنین در مراحل اولیه تولید می‌شود.

mRNA: واژه Messenger RNA را ببینید.

Mosaic: جنین و یا موجودی که سلول‌های آن دارای ژنوم مشابه نیستند.

Multifactorial: تحت تاثیر عوامل متعدد (به عنوان مثال شاید بسیاری از ژن‌ها و عوامل محیطی در بروز یک صفت ژنتیکی موثر باشند).

Multi-locus probe: کاوشگر DNA برای شناسایی باندهای مختلف در یک اثر انگشت یا پروفایل DNA. در یک اثر انگشت ژنتیکی موجب ایجاد الگوی بارکد می‌شود.

Multiple cloning site (MCS): ناحیه کوتاهی از DNA در یک ناقل که دارای جایگاه‌های شناسایی مختلف برای آنزیم‌های برشی محدودالاثر می‌باشد.

Multipotent: سلولی که می‌تواند به طیف وسیعی از سلول‌های تمایز یافته تبدیل شود.

Mus musculus: موش، یک موجود زنده الگو برای استفاده در مطالعات ژنتیک مولکولی. بسیاری از انواع مختلف موش‌های تراریخته در دسترس هستند.

Mutagenesis: فرآیند ایجاد جهش در مولکول DNA.

Mutagenesis *in vitro*: ایجاد جهش‌های مشخص در یک توالی کلون شده در شرایط آزمایشگاه (لوله آزمایش). همچنین واژه Oligonucleotide-directed mutagenesis را ببینید.

Mutant: موجود (ژن) حامل یک جهش ژنتیکی.

Mutation: ایجاد تغییر در توالی نوکلئوتیدهای DNA. ایجاد جهش ممکن است با الحاق یا اضافه کردن، حذف و یا تغییر نوکلئوتیدها انجام شود.

Muteins: پروتئین‌هایی که با ایجاد جهش ساخته شده باشند.

Nano (n): 10^{-9}.

Native protein: پروتئین نوترکیبی که از انتهای آمینی خود ساخته می‌شود به جای این که از انتهای آمینی یک وکتور همسانه‌سازی ساخته شود.

NCBI: مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری.

Nested fragments: مجموعه‌ای از قطعات اسید نوکلئیک که با یکدیگر در یک یا تنها چند نوکلئوتید (از نظر طول) متفاوتند.

Nested PCR: شیوه‌ای از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز که در آن از دو جفت آغازگر استفاده می‌شود، یک جفت از آغازگرها با توجه به جفت آغازگر دیگر، برای تکثیر قسمت درونی (nested) به کار می‌روند.

Neutral molecular polymorphism: چند شکلی مولکولی که هیچ اثر نامطلوبی ندارد و می‌تواند برای برچسب زدن توالی ژنی که از آن مشتق شده است استفاده شود.

Nick translation: روشی برای نشان دار کردن DNA با نوکلئوتیدهای رادیواکتیو.

Non-disjunction: عدم جدا شدن کروموزم‌ها در مرحله میوز که منجر به ایجاد آنئوپلوئیدی می‌شود. مانند بیماری سندرم داون، ناشی از عدم تفکیک کروموزم‌ها و در نتیجه تولید وضعیت تریزومی در کروموزوم شماره ۲۱.

Northern blotting: انتقال مولکول‌های RNA به غشای نیتروسلولزی به منظور ردیابی توالی‌های خاص با انجام هیبریداسیون.

N terminus: انتهای آمینی، که با گروه آمینی NH2 در یک اسید آمینه یا پروتئین مشخص می‌شود.

Nuclear transfer: روشی برای همسانه سازی موجودات که در آن هسته دهنده از یک سلول سوماتیک به تخمک پذیرنده منتقل می‌شود.

Nuclease: آنزیمی که پیوندهای فسفودی‌استر را هیدرولیز می‌کند.

Nucleoside: نوکلئوتید نیتروژن‌دار متصل به قند.

Nucleotide: نوکلئوزید متصل به یک گروه فسفات.

Nucleoid: ناحیه‌ای در یک سلول باکتری که مواد ژنتیکی در آن قرار گرفته است.

Nucleus: ناحیه دارای غشا در سلول‌های یوکاریوت که دارای ماده ژنتیکی است.

Oligo: پیشوندی با چند معنی، مانند اولیگو نوکلئوتید یا الیگو پپتید.

Oligo(dT)-cellulose: توالی کوتاه از دی‌اکسی تیمیدین متصل به صفحه سلولزی مورد استفاده در خالص سازی mRNA یوکاریوتی.

Oligolabelling: واژه Primer extension را ببینید.

Oligomer: واژه عمومی برای توالی کوتاه منومر.

Oligonucleotide: توالی کوتاهی از چند نوکلئوتید.

Oligonucleotide-directed mutagenesis: فرآیندی که طی آن با استفاده از یک الیگونوکلئوتید ساختگی تغییر مشخصی در DNA ایجاد می‌شود.

OMIM: توارث مندلی آنلاین در انسان، یک پایگاه داده‌ای بر اساس موقعیت‌های ژنتیکی.

Oncomouse: موش تاریخته مهندسی شده حساس به سرطان.

Oocyte: مرحله‌ای از رشد گامت ماده یا تخمک. اغلب واژه‌های اُوسیت و تخمک به جای هم به کار می‌روند.

Operator: ناحیه‌ای از اپران، نزدیک به پروموتر، که یک پروتئین ممانعت کننده به آن متصل می‌شود.

Operon: مجموعه‌ای از ژن‌های باکتریایی که تحت کنترل یک ناحیه تنظیم کننده هستند.

Organismal cloning: تولید نسخه مشابه‌ای از یک موجود با روش‌هایی از قبیل تقسیم جنین و یا انتقال هسته. واژه فوق برای تمایز این روش از همسانه سازی مولکولی استفاده می‌شود.

Ornithine transcarbamylase deficiency (OTCD): وضعیت کمبود آنزیم که مورد هدف ژن درمانی قرار گرفته است.

Ovum: گامت ماده بالغ یا سلول تخم که از اُوسیت بوجود آمده است. اغلب واژه‌های Ovum و اوسیت به جای همدیگر به کار می‌روند.

Palindrome: توالی DNA که در هر دو رشته و در یک جهت (مانند 5’ به 3’) شبیه به هم خوانده می‌شود. بسیاری از جایگاه‌های شناسایی آنزیم‌های محدودالاثر نمونه‌هایی از این توالی‌ها می‌باشند.

Pedigree analysis: تعیین ویژگی‌های انتقال یک ژن خاص با بررسی سابقه فامیلی.

Penetrance: نسبت افراد با یک ژنوتیپ خاص که خصوصیت ژنوتیپ را در فنوتیپ نشان می‌دهد. قابلیت بروز.

PCR: واژه Polymerase chain reaction را ببینید.

Phage: واژه Bacteriophage را ببینید.

Phagemid: ناقل حاوی توالی‌های پلاسمید و فاژ.

Pharmanimal: حیوانات تراریخته مورد استفاده برای تولید دارو.

Phenotype: ویژگی‌های قابل مشاهده یک موجود که توسط ژنوتیپ و محیط تعیین می‌شود.

Phosphodiester bond: پیوند گروه‌های 5’ فسفات و 3’ هیدروکسیل بین دو نوکلئوتید.

Physical containment: مهندسی اقدامات ایمنی شامل آزمایش‌های GM و اطمینان از این که سیستم‌های میزبان یا ناقل به محیط زیست منتقل نمی‌شوند. شامل اتاق‌های تحت فشار منفی، دارای تهویه و دسترسی امن و خروجی در طراحی آزمایشگاه.

Physical mapping: نقشه برداری ژن‌ها در ارتباط با موقعیت فیزیکی آنها روی کروموزوم. در مقایسه با نقشه برداری ژنتیکی، جزئیات بیشتری را ارائه می‌کند.

Physical marker: برچسب متشکل از توالی که ناحیه‌ای از ژنوم را نشان‌دار می‌کند. برچسب‌های متعددی از این قبیل وجود دارند که می‌توان از آن‌ها در مطالعات نقشه برداری استفاده نمود.

Pichia pastoris: گونه‌ای از مخمر که در برنامه‌های کاربردی زیست فناوری استفاده می‌شود.

Pico (p): پیشوندی به معنی 10^{-12} می‌باشد.

Plaque: ناحیه مشخصی روی محیط کشت باکتریایی ناشی از آلودگی توسط یک باکتریوفاژ لایتیک.

Plasmid: مولکول DNA خارج کروموزومی حلقوی شکل که به طور طبیعی در باکتری‌ها و برخی موجودات زنده دیگر یافت می‌شود. پلاسمیدهای مهندسی شده به طور گسترده به عنوان ناقل برای همسانه سازی استفاده می‌شوند.

Plasmin: شکل فعال آنزیم پروتئاز که از پلاسمینوژن مشتق شده است و نقش آن هیدرولیز فیبرین (از اجزای لخته شدن خون) می‌باشد.

Plasminogen: ماده پیش‌ساز پلاسمین، که با فعال کننده پلاسمینوژن بافتی، به شکل فعال خود تبدیل می‌شود.

Ploidy number: به تعداد کروموزوم‌ها اشاره دارد (مانند هاپلوئید، دیپلوئید، تریپلوئید و غیره).

Pluripotent: سلولی که می‌تواند به طیف وسیعی از سلول‌های تمایز یافته تبدیل شود.

Polyacrylamide: ماده‌ای برای الکتروفورز قطعات کوچک اسیدهای نوکلئیک در درجه اول برای الکتروفورز DNA استفاده می‌شود. برای الکتروفورز پروتئین‌ها نیز استفاده می‌شود.

Polyadenylic acid: زنجیره‌ای از نوکلئوتیدهای آدنین. دنباله چند آدنینی که در انتهای 3’ اکثر مولکول‌های mRNA یوکاریوتی یافت می‌شود.

Polycistronic: مولکول RNA دارای بیش از یک نقش. اُپرون بسیاری از باکتری‌ها از طریق mRNAهای چند ژنی بیان می‌شوند.

Polygalacturonase: آنزیم موثر در تخریب پکتین. در Flavr Savr گوجه فرنگی با استفاده از فناوری آنتی‌سنس مورد استفاده قرار گرفته است.

Polygenic trait: صفتی که در همکنش با بیش از یک ژن تعیین می‌شود (مانند رنگ چشم در انسان).

Polyhedra: ساختار کپسید در باکیلوویروس‌ها که از پروتئین پلی‌هدرین تشکیل شده است.

Polylinker: واژه Multiple cloning site را ببینید.

Polymer: توالی طویلی از مونومر.

Polymerase: آنزیم تکثیر نوکلئیک اسید.

Polymerase chain reaction (PCR): روشی برای تکثیر انتخابی توالی‌های DNA. انواع متنوعی از این روش با کاربردهای مختلف وجود دارند.

Polymorphism: وجود انواع متعدد آلل از یک ژن خاص یا توالی موتیف DNA. از این روش و با نقشه برداری ژنتیکی و روش‌های پروفایل DNA می‌توان برای شناسایی افراد استفاده کرد.

Polynucleotide: پلیمری از مونومرهای نوکلئوتیدی.

Polynucleotide kinase (PNK): آنزیمی که موجب انتقال یک گروه فسفات بر روی یک گروه هیدروکسیل در ناحیه 5' می‌شود.

Polypeptide: زنجیری از اسیدهای آمینه.

Polystuffer: قطعه مصرفی در یک ناقل که از توالی‌های تکراری فراوان تشکیل شده است.

Posilac™: سوماتوتروپین نوترکیب گاوی که به صورت تجاری در دسترس می‌باشد.

Positional cloning: همسانه سازی ژن‌هایی که صرف نظر از محل آن‌ها بر روی کروموزوم، اطلاعات کمی از آن‌ها در دسترس است.

Post-transcriptional gene silencing (PTGS): معادل واژه RNA مداخله گر.

Post-translational modification: تغییر پروتئین پس ساخته شدن آن. افزوده شدن قند به پروتئین به منظور تولید گلیکوپروتئین نمونه‌ای از این تغییرات می‌باشد.

Preformationism: تفکری که معتقد است هر گونه رشد و توسعه‌ای در مرحله تخم از قبل رمز گذاری شده است و با بیان ساده رشد و توسعه بروز اطلاعات رمز گذاری شده است. در حال حاضر این واژه معادل بیش از حد ساده در نظر گرفته می‌شود.

Pribnow box: توالی موجود در پروموتر پروکاریوت‌ها که برای شروع رونویسی مورد نیاز است. این توالی عبارت است از TATAAT.

Primary database: پایگاه داده‌ای که ارسال داده‌ها به آنجا بدون دست‌کاری یا با حداقل تغییرات انجام می‌شود و شاید ابزارهای جستجو و پردازش پیشرفته داشته باشد.

Primary transcript: فرآورده رونویسی اولیه و اغلب طویل ژن یوکاریوت‌ها، که برای تولید mRNA بالغ پردازش می‌شود.

Primer extension: تولید یک نسخه نوکلئیک اسید با استفاده از یک پرایمر. از این روش برای نشان دار کردن DNA و تعیین مکان شروع رونویسی استفاده می‌شود.

Probe: مولکول نشان دار مورد استفاده در روش‌های هیبریداسیون.

Processivity: افزودن متوالی اجزای یک ماده توسط آنزیم، به عنوان مثال، DNA پلیمراز و RNA پلیمراز این گروه آنزیم‌ها هستند.

Proinsulin: ماده پیش ساز انسولین که شامل یک توالی پلی پپتیدی اضافی است که برای تولید مولکول انسولین فعال، برش داده می‌شود.

Prokaryotic: ویژگی هسته فاقد غشاء (به عنوان مثال در باکتری‌هایی مانند ایشرشیا کولی).

Promoter: توالی DNA قبل از یک ژن که RNA پلیمراز به آن ناحیه متصل می‌شود.

Pronucleus: یکی از هسته‌ها درون تخم بارور شده قبل از ادغام گامت‌ها.

Prophage: باکتریوفاژ نگهداری شده در حالت لیزوژنیک درون سلول.

Protease: آنزیمی که پلی‌پپتیدها را تجزیه می‌کند.

Protein: هتروپلیمر متشکل از آمینو اسیدهای متصل به هم با پیوندهای پپتیدی برای تولید یک پلی‌پپتید.

Proteome: مجموعه‌ای از پروتئین‌های تولید شده یک سلول.

Protoplast: سلولی که دیواره سلولی آن حذف شده است.

Prototroph: سلولی که می‌تواند در یک محیط رشد غیر کامل رشد کند.

PTGS: واژه Post-transcriptional gene silencing را ببینید.

Purine: باز نیتروژن دار دو حلقه‌ای مانند آدنین و گوانین.

Pyrimidine: باز نیتروژن دار تک حلقه‌ای مانند سیتوزین، تیمین و یوراسیل.

Radiolabelling: توالی کوتاه برای نشاندار کردن با ماده رادیواکتیو، روش مورد استفاده برای تلفیق ایزوتوپ‌های رادیواکتیو به مولکول‌های زیستی. نشاندار کردن نوکلئوتید اسیدهای نوکلئیک با ایزوتوپ فسفر ۳۲ (^{32}P) به منظور تهیه کاوشگر اختصاصی برای استفاده در آزمایش‌های هیبریداسیون.

Random amplified polymorphic DNA (RAPD): روش مبتنی بر PCR از پروفایل DNA که در آن تکثیر توالی‌ها با استفاده از آغازگرهای تصادفی صورت می‌گیرد. این روش نوعی اثر انگشت ژنتیکی ایجاد می‌کند که می‌تواند برای شناسایی افراد مورد استفاده قرار گیرد.

RAPD: واژه Random amplified polymorphic DNA را ببینید.

Rational design: فرآیند مهندسی تغییرات در ساختار پروتئین با استفاده از دانش موجود برای طراحی این گونه تغییرات.

Reading frame: الگوی توالی‌های کدون سه‌تایی در ژن. بسته به این که چه نوکلئوتیدی به عنوان اولین نوکلئوتید محاسبه شود، سه قاب خواندنی وجود دارد. جهش‌های الحاقی و حذفی می‌توانند قاب خواندنی را مختل و عواقب بدی داشته باشند، به طوری که توانایی تولید پروتئین توالی کد کننده بعد از ایجاد جهش از دست می‌رود.

Recessive: آللی که در فنوتیپ افراد هتروزیگوت ظاهر نمی‌شود.

Recombinant DNA: مولکول DNA نوترکیب، متشکل از توالی‌هایی که به طور معمول در کنار یکدیگر قرار ندارند.

Recombination frequency mapping: روش مورد استفاده در نقشه برداری ژنتیکی به منظور برآورد فاصله بین ژن‌ها از وقایع متعددی که در طول مرحله میوز رخ می‌دهد.

Redundancy: در زیست شناسی مولکولی، اشاره به این حقیقت دارد که برخی از اسیدهای آمینه می‌توانند توسط کدون‌های متعددی شناسایی شوند، در نتیجه باز سوم در mRNA (موقعیت لغزشی (وابل) در کدون) به طور موثری از نظر انفورماتیکی افزایش یافته و چند نوکلئوتید کدون می‌تواند با یک باز موجود در tRNA متصل گردد.

Regulatory gene: ژنی که اثر خود را با کنترل بیان ژن دیگر اعمال می‌کند.

Renaturation kinetics: روش تجزیه و تحلیل پیچیدگی ژنوم با مطالعه الگوهای به دست آمده از DNA هنگامی که پیوند هیدروژنی بین نوکلئوتیدهای آن از یکدیگر جدا و به آرامی به هم متصل می‌شوند.

Repetitive sequence: توالی که بارها در ژنوم تکرار شود.

Replacement vector: ناقل باکتریوفاژ که در آن جایگاه‌های همسانه سازی به صورت جفت و دوتایی مرتب شده است، به طوری که بخشی از ژنوم بین این مکان‌ها را می‌توان با DNA خارجی جایگزین نمود.

Replication: تکثیر ماده ژنتیکی در طی چرخه سلولی. همچنین برای سنتز DNA فاژ جدید در مرحله تکثیر فاژ به کار می‌رود.

Replicon: قطعه‌ای از DNA حاوی یک مبدا تکثیر (*ori*).

Restriction enzyme: اندونوکلئازی که مولکول DNA را در مکان‌های با توالی‌های مشخص برش می‌دهد.

Restriction fragment: قطعه‌ای از DNA تولید شده با هضم آنزیمی توسط آنزیم برشی محدودالاثر.

Restriction fragment length polymorphism (RFLP): وجود تنوع در موقعیت جایگاه‌های برش در منطقه خاصی از DNA، به طوری‌که ممکن است قطعه شناسایی جایگاه‌های برش در افراد مختلف از نظر طول متفاوت باشند.

Restriction mapping: روش مورد استفاده برای تعیین موقعیت جایگاه‌های برش در مولکول DNA.

Retrovirus: ویروسی که دارای ژنوم از نوع RNA بوده و در روند آلودگی از روی RNA مولکول DNA نسخه‌برداری می‌شود.

Reverse transcriptase: آنزیم DNA پلیمراز وابسته به RNA در رتروویروس‌ها که در شرایط آزمایشگاهی برای ساخت cDNA استفاده می‌شود.

RFLP: واژه Restriction fragment length polymorphism را ببینید.

Rhizomucor miehei: قارچ مورد استفاده در کاربردهای زیست فناوری.

Rhizomucor pusillus: قارچ مورد استفاده در کاربردهای زیست فناوری.

Ribonuclease (RNase): آنزیمی که موجب تجزیه RNA می‌شود.

Ribonucleic acid (RNA): هتروپلیمر متشکل از ریبونوکلئوتیدهای مختلف.

Ribosomal RNA (rRNA): مولکول RNA موجود در ساختار ریبوزوم‌ها.

Ribosome: محل سنتز پروتئین، متشکل از rRNA و پروتئین.

Ribosome-binding site: ناحیه‌ای در مولکول mRNA که در اتصال ریبوزوم‌ها در مرحله ترجمه نقش دارد.

RISC: واژه RNA-induced silencing complex را ببینید.

RNA: واژه Ribonucleic acid را ببینید.

RNA-induced silencing complex (RISC): مجموعه پروتئین و آنزیم نوکلئاز اسلایسر که در فرآیند RNA مداخله‌گر نقش دارد.

RNA interference (RNAi): مجموعه فرآیند درون سلول زنده که با مداخله در دسترسی مولکول mRNA در تنظیم بیان ژن بعد از رونویسی نقش دارد.

RNA processing: تشکیل RNA عمل کننده از رونوشت اولیه. در تولید mRNA بالغ، پردازش RNA با حذف اینترون‌ها و افزودن کلاهک در ناحیه ’5 و تعداد متعددی آدنین در ناحیه ’3 صورت می‌گیرد.

RT-PCR: در این روش از روی mRNA یک نسخه cDNA ساخته شده و سپس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، تکثیر قطعه مورد نظر DNA صورت می‌گیرد.

S1 mapping: روشی برای تعیین محل شروع رونویسی.

S1 nuclease: آنزیمی که موجب تخریب یا تجزیه DNA تک‌رشته می‌شود.

Saccharomyces cerevisiae: مخمر تک سلولی (مخمر نان) که به طور گسترده به عنوان یک موجود یوکاریوت میکروبی الگو در مطالعات مولکولی استفاده می‌شود. همچنین در صنعت زیست فناوری برای طیف وسیعی از برنامه‌های کاربردی و همچنین در تهیه نان استفاده می‌شود.

Schizosaccharomyces pombe: مخمر مورد استفاده در انواع برنامه‌های کاربردی در تحقیقات پایه و زیست فناوری.

SCIDS: سندرم نقص ایمنی ترکیبی حاد، بیماری که در نتیجه نقص یک آنزیم (آدنوزین دی آمیناز) ایجاد می‌شود.

Scintillation counter (spectrometer): دستگاهی برای تعیین میزان ماده رادیواکتیو در یک نمونه. دستگاهی که اشعه رادیواکتیو منتشره از یک صفحه را ردیابی می‌کند.

Screening: شناسایی یک همسانه در یک کتابخانه ژنومی یا cDNA با استفاده از روشی که بتواند همسانه‌های مختلف را از یکدیگر تفکیک کند.

Secondary database: پایگاه داده‌ای که اطلاعات آن با دستکاری مجموعه‌ای از داده‌های موجود مشتق شده باشد.

Seedcorn funding: بودجه مراحل اولیه صاحبان سهام برای تاسیس یک پروژه یا شرکت جدید می‌باشد. این بودجه اغلب توسط نهادهای دولتی، خصوصی و یا بنیادهای خیریه که مایل به انجام خطر می باشند تامین می‌شود.

Selection: بهره برداری از ژنتیک یک موجود نوترکیب به منظور انتخاب و تفکیک مطلوب ژنوم‌های نوترکیب از غیر نوترکیب در طول دوره رشد.

Sequence tagged site: اشاره به توالی DNA منحصر به فرد در ژنوم دارد که می‌تواند در مطالعات نقشه برداری ژنوم استفاده شود. معمولاً با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شناسایی می‌شود.

Sex chromosome: کروموزوم‌های جنسی X و Yدر انسان که جنسیت افراد را تعیین می‌کند. مردان از نظر کروموزومی XY و زنان XX هستند.

Sex-linked: اشاره به الگوی توارث دارد که آلل بر روی یک کروموزوم جنسی قرار گرفته است.

Shine--Dalgarno sequence: واژه *Ribosome-binding site* را ببینید.

Short interfering RNAs (siRNAs): RNAهای کوتاهی که در تنظیم بیان ژن از طریق فرآیند RNA مداخله گر نقش دارند.

Short tandem repeat (STR): عناصر تکراری کوتاه (۲-۵ جفت باز) در ژنوم که به عنوان میکروساتلایت‌ها شناخته می‌شوند. معمولا برای نقشه برداری و برچسب زدن ژنوم مفید هستند.

Shotgun cloning: روشی از همسانه سازی که در آن قطعات به صورت تصادفی همسانه سازی می‌شوند، بدون این که تلاشی برای ترتیب و یا نظم قطعات همجوار و پیوسته به عنوان بخشی از مرحله همسانه سازی انجام گیرد.

Single-locus probe: کاوشگر مورد استفاده در انگشت نگاری DNA که یک توالی منحصر به فرد در ژنوم را شناسایی می‌کند. بنابراین موجودات دیپلوئید معمولا دو باند در یک اثر انگشت مولکولی نشان می‌دهند، یک آلل از هر یک از والدین.

Single nucleotide polymorphism: الگوی چند شکلی در یک باز، اساساً کوچکترین واحد چند شکلی که قابل شناسایی است.

Single-pass sequence data: توالی داده‌هایی که با یک بار خواندن تولید شده و اغلب دارای خطا یا ناهنجاری‌هایی می‌باشند.

siRNAs: واژه Short interfering RNAs را ببینید.

Site-directed mutagenesis: واژه Oligonucleotide-directed mutagenesis را ببینید.

Slicer: آنزیم نوکلئاز دخیل در فرآیند RNA مداخله گر (RNAi) به عنوان بخشی از مجموعه RISC.

Slot-blot: مشابه روش لکه گذاری نقطه‌ای، اما در روش اسلات از یک دستگاه الگو به جای نقاط حلقوی استفاده می‌شود.

SME: شرکت کوچک تا متوسط؛ این واژه برای توصیف یک شرکت با کارکنان نسبتا زیاد استفاده می‌شود که البته هنوز خیلی بزرگ نشده باشد. بسیاری از این گونه شرکت‌های موفق با گسترش دامنه تولیدات و خدمات‌شان به شرکت‌های بزرگتر تبدیل می‌شوند.

SNP: واژه Single nucleotide polymorphism را ببینید.

Somatic cell: سلول غیر جنسی، متضاد سلول جنسی.

Somatotropin: هورمون رشد، واژه *Bovine somatotropin* را ببینید.

Southern blotting: روشی برای انتقال قطعات DNA به غشا نیتروسلولز به منظور ردیابی یا تشخیص توالی خاص با انجام هیبریداسیون.

Specific activity: میزان رادیواکتیویته موجود در یک ماده، به عنوان مثال، یک کاوشگر نشاندار باید دارای فعالیت ویژه 106 واحد در دقیقه در هر میکروگرم باشد. همچنین برای تعیین کمیت فعالیت آنزیم استفاده می‌شود.

Sperm: گامت نر بالغ.

Sticky ends: واژه Cohesive ends را ببینید.

Structural gene: ژنی که یک فرآورده پروتئینی تولید می‌کند.

STR: واژه Short tandem repeat را ببینید.

STS: واژه Sequence tagged site را ببینید.

Stuffer fragment: بخشی از یک ناقل جایگزینی حذف شده می‌باشد که توسط DNA الحاقی جایگزین می‌شود.

Substitution vector: واژه Replacement vector را ببینید.

SwissProt: یکی از پایگاه‌های داده‌ای عمده توالی پروتئین می‌باشد.

T-DNA: ناحیه‌ای از پلاسمید Ti در آگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefaciens*) که می‌تواند برای انتقال DNA نوترکیب درون ژنوم سلول گیاهی مورد استفاده قرار گیرد.

Tandem repeat: مجموعه منظمی از توالی‌ها که به طور پیوسته در جهت مشابه تکرار شده باشند.

***Taq* polymerase**: DNA پلیمراز مقاوم به حرارت که از باکتری گرما دوست *Thermus aquaticus* استخراج می‌شود. مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

TATA box: توالی موجود در پروموتور سلول‌های یوکاریوت. همچنین به عنوان جعبه Hogness شناخته می‌شود و معمولا توالی آن به صورت TATAAAT می‌باشد.

Technology transfer: در زیست فناوری، به روند حرکت از مقیاس علوم آزمایشگاهی به فرآورده تجاری گفته می‌باشد. این مرحله از فناوری معمولاً مرحله‌ای پیچیده و مخاطره‌آمیز در توسعه فرآورده محسوب می‌شود.

Temperate: اشاره دارد به باکتریوفاژهایی که می‌توانند وارد مرحله عفونت لیزوژنی در سلول میزبان شوند.

Terminal transferase: آنزیمی که نوکلئوتیدها را به انتهای ناحیه 3' زنجیر الیگو نوکلئوتیدی می‌افزاید.

Tetracycline (Tc): آنتی‌بیوتیکی که معمولاً استفاده می‌شود.

Text mining: استفاده از پایگاه‌های داده کتابشناختی به منظور جستجوی اطلاعات، مشابه جستجوی پایگاه‌های داده مربوط به توالی نوکلئوتیدی یا پروتئینی.

Thermal cycler: سیستم گرمایشی و خنک کننده برای انجام برنامه‌های کاربردی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز. این دستگاه مراحل واسرشت سازی، اتصال آغازگرها، و چرخه‌های توسعه و تکثیر قطعه DNA را به صورت خودکار انجام می‌دهد.

Thermus aquaticus: باکتری گرمادوست که آنزیم تک پلیمراز آن استخراج شده است. گونه‌های دیگر این جنس عبارتند از *Thermus flavus* و *Thermus thermophilus*.

Thymine (T): باز نیتروژن دار که فقط در DNA موجود است.

Thymidine: نوکلئوزید متشکل از قند دی‌اکسی ریبوز و تیمین.

Ti-plasmid: پلاسمید آگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefaciens*) عامل بیماری گال طوقه.

Tissue plasminogen activator (TPA): پروتئازی که به طور طبیعی وجود دارد و در جلوگیری از لخته شدن خون نقش دارد. این آنزیم بر روی پیش‌ساز غیر فعال (پلاسمینوژن) عمل کرده و آن را به شکل فعال (پلاسمین) تبدیل می‌کند. این عمل با شکستن پروتئین موثر در ایجاد لخته خون به نام فیبرین، از بروز لخته خون جلوگیری می‌کند.

Totipotent: سلولی که می‌تواند به تمام انواع سلول‌های یک موجود زنده تمایز یابد. کاربرد سلول‌های بنیادی توتی‌پوتنت با همسانه سازی هویج از سلول‌های سوماتیک، و آزمایشات انتقال هسته در حیوانات نشان داده شده است.

TPA: واژه Tissue plasminogen activator را ببینید.

Traitor technology: واژه Genetic trait control technology را ببینید.

***Trans*-acting element**: عنصر ژنتیکی که می‌تواند اثر خود را روی مولکول دیگری به عنوان توالی هدف اعمال کند. معمولاً این گونه مواد، فرآورده پروتئینی (آنزیم یا یک پروتئین تنظیم کننده) تولید می‌کنند که می‌تواند به جایگاه عمل منتقل گردد.

Transcription (TC): ساخت RNA از روی DNA الگو.

Transcriptional unit: توالی DNA که مولکول RNA را می‌سازد. (یعنی از محل آغاز تا مکان پایان رونویسی).

Transcriptome: جمعیتی از مولکول‌های RNA (معمولا mRNA) که توسط سلول خاصی بیان می‌شود.

Transfection: انتقال فاژ و یا DNA ویروس خالص شده به داخل سلول.

Transfer RNA (tRNA): RNA کوچکی (به طول حدود ۷۵-۷۸ باز) که آنتی‌کدون و اسیدآمینه مورد نیاز برای سنتز پروتئین را حمل می‌کند.

Transformant: سلولی که یک DNA با منشا خارجی به آن منتقل شده است.

Transformation: فرآیند انتقال DNA (معمولا DNA پلاسمیدی) به داخل سلول. همچنین برای توصیف تغییر در ویژگی رشد یک سلول سرطانی به کار می‌رود.

Transgene: ژن هدف موثر در تولید یک موجود تراریخته.

Transgenic: موجود زنده حاوی توالی‌های DNAای که به طور معمول این توالی‌ها را در ژنوم خود ندارد.

Translation (TL): ساخت پروتئین از روی یک mRNA الگو.

Transposable element: عنصر ژنتیکی که می‌تواند اطلاعات خود را در مکان‌های مختلف ژنوم تلفیق نماید. گاهی اوقات عناصر ژنتیکی جابجا شونده "ژن‌های پرشی" (jumping genes) نامیده می‌شوند.

TREMBL (Translated EMBL): ابزاری برای استخراج داده‌های توالی پروتئین از پایگاه داده توالی نوکلئوتیدی محسوب می‌شود.

Trisomy: وضعیت آنیوپلوئیدی که در آن یک کروموزوم اضافی وجود داشته باشد. مثال معمول آن وضعیت تریزومی کروموزوم شماره ۲۱ می‌باشد که باعث سندرم داون می‌شود.

Uracil (U): باز نیتروژن‌دار که تنها در RNA وجود دارد.

Uniform resource locator (URL): URL آدرس وب سایت که معمولاً دارای پیشوند *http://* و یا *www* می‌باشد. اغلب URLها به عبارت‌های عمومی (مانند co.، com.، gov.،ac.) ختم می‌شوند و شاید دارای یک شناسه کشور نیز باشند (در نتیجه ac.uk. شناسه یک مؤسسه آکادمیک در انگلستان محسوب می‌شود.

UniProt: منبع پایگاه داده توالی پروتئین.

URL: واژه Uniform resource locator را ببینید.

Variable number tandem repeat (VNTR): DNA تکراری متشکل از چند نسخه از یک توالی کوتاه، موثر در ایجاد جایگاه‌های چند شکل که در انگشت نگاری ژنتیکی مفید می‌باشد. همچنین به عنوان نواحی فوق متغیر شناخته می‌شود.

Vector: مولکول DNA که قادر به همانند سازی در میزبان بوده و به عنوان یک مولکول حامل برای ساخت DNA نوترکیب به کار می‌رود.

Venture capital: بودجه مورد استفاده برای تقویت شرکت‌های جوان به منظور رشد و توسعه آن‌ها به یک مرحله امن‌تر می‌باشد. اغلب بعد از بودجه seedcorn، سرمایه گذاری تجاری (capital venture) معمولاً خطر نسبتا زیادی برای سرمایه گذاران دارد.

Virulent: اشاره به باکتریوفاژهایی دارد که موجب تخریب سلول میزبان می‌شوند.

Virus: عامل بیماری‌زایی که بدون سلول میزبان قادر به تکثیر نمی‌باشد.

VNTR: واژه Variable number tandem repeat را ببینید.

WAP: واژه Whey acid protein را ببینید.

Western blotting: انتقال باندهای پروتئین تفکیک شده با الکتروفورز به غشای نیتروسلولز به منظور ردیابی توسط آنتی بادی.

WGS: واژه Whole genome shotgun را ببینید.

Whey acid protein: پروتئین شیر، پروموتر ژنی که می‌تواند برای بیان ناقلینی که قادر به تولید فرآورده‌های DNA نوترکیب در شیر حیوانات شیرده هستند استفاده شود.

Whole genome shotgun: روش تعیین توالی ژنوم در مقیاس وسیع.

Wobble: اشاره به ماهیت خطای باز سوم در بسیاری از کدون‌ها.

World Wide Web (WWW): منبع اطلاعات موجود در اینترنت که امکان دسترسی تقریباً فوری به انواع مختلف اطلاعات را می‌دهد. به یک بخش اساسی از زندگی روزمره تبدیل شده است و به طور گسترده در تمام زمینه‌های علمی و فناوری استفاده می‌شود.

Xenotransplantation: استفاده از بافت‌ها یا اندام‌های یک منبع غیر انسانی برای پیوند در انسان.

X-gal: ۵- برومو ۴- کلرو – ۳ – ایندولیل بتا گالاکتوپیرونوزید، یک سوبسترای رنگی برای بتا گالاکتوزیداز محسوب می‌شود که بعد از تجزیه موجب تولید رنگ آبی در محیط کشت می‌شود.

X-linked: الگوی توارث که آلل آن روی کروموزوم X قرار دارد. در انسان، این عامل می‌تواند موجب بیان ویژگی‌های مغلوب شود که به طور معمول در یک هتروزیگوت اتوزومال پنهان خواهد بود.

YAC: کروموزوم مصنوعی مخمر، ناقلی برای همسانه سازی قطعات بسیار بزرگ DNA در مخمر.

Yarrowia lipolytica: گونه مخمر مورد استفاده در کاربردهای زیست فناوری.

YCp: پلاسمید سانترومر مخمر.

YEp: پلاسمید اپی‌زومال مخمر.

YIp: پلاسمید تلفیقی مخمر.

YRp: پلاسمید تکثیری مخمر.

Zygote: محصول تک سلولی حاصل از تلفیق یک گامت نر و یک گامت ماده که با تقسیمات متوالی میتوز به جنین تبدیل می‌شود.

University of Guilan Press

An Introduction to Genetic Engineering

by:

Desmond S. T. Nicholl

Translated by:

Reza Shirzadian-Khorramabad, ph. D

Ahmad Rouhibakhsh, ph. D

Sedigheh Nasr Ramzi, ph. D