فصل دوم

مهندسی ژنتیک و همسانه‌سازی ژن

مقدمه

مهندسی ژنتیک شامل دست‌ورزی مواد ژنتیکی به‌صورت هدایت‌شده و از پیش مشخص در جهت هدف مورد نظر است. این فناوری، DNA نوترکیب یا همسانه‌سازی ژن نیز نامیده می‌شود. مهندسی به‌معنی طراحی، ساخت و دست‌ورزی بر اساس برنامهٔ از قبل تنظیم شده است. هدف از مهندسی ژنتیک، جداسازی قطعات DNA و نوترکیبی آنهاست. تکنیک کار کاملاً ساده است. دو مولکول DNA جداسازی شده و با یک یا چند آنزیم اختصاصی بریده می‌شود و سپس قطعات در ترکیبی مطلوب با یکدیگر اتصال می‌یابند و برای تکثیر و تولیدمثل به سلول برگردانده می‌شوند. همچنین اصطلاح DNA نوترکیب، به طور اختصاصی به مولکول‌های DNA مرکب که از ترکیب فیزیکی قطعات DNA حاصل از منابع مختلف ایجاد شده است، اطلاق می‌شود.

مهندسی ژنتیک در اواسط دههٔ ۱۹۷۰، یعنی زمانی که برش DNA و انتقال قطعات ویژهٔ DNA حاوی اطلاعات از یک موجود به موجود دیگر امکان‌پذیر شد، شکل گرفت. در نتیجه، ویژگی‌های دومین موجود (پذیرنده) براساس روشی ویژه و از قبل تعیین‌شده تغییر می‌یابد. زمانی که موجود پذیرنده، یک میکروب مثلاً یک باکتری تک سلولی باشد، قطعهٔ DNA انتقال‌یافته، همزمان با تکثیر میکروب پذیرنده چندین برابر تکثیر می‌شود و میلیون‌ها سلول یکسان یعنی کلون از سلول‌ها پدید می‌آیند. در نتیجه، دستیابی به میلیون‌ها کپی از

یک ناحیهٔ ویژهٔ DNA ممکن می‌شود.

علاقهٔ فعلی به مهندسی ژنتیک به دلیل کاربردهای گوناگون آن است: ۱. جداسازی یک ژن خاص، بخشی از یک ژن یا ناحیه‌ای از یک ژنوم، ۲. تولید مولکول‌های RNA و پروتئین خاص به مقادیری که قبلا قابل دستیابی نبود، ۳. بهبود تولید مواد بیوشیمیایی (نظیر آنزیم‌ها و داروها) و مواد شیمیایی آلی که از نظر اقتصادی اهمیت دارند، ۴. تولید واریته‌های گیاهی دارای صفات مطلوب ویژه (مانند نیاز به کود کمتر یا مقاومت به بیماری و...)، ۵. اصلاح نقایص ژنتیکی موجودات عالی، ۶. ایجاد موجوداتی با ویژگی‌های اقتصادی مهم (مانند گیاهانی با قابلیت زودرسی بیشتر یا عملکرد زیادتر). تمام موارد مذکور از طریق روش‌های پایه‌ای که اساس مهندسی ژنتیک را تشکیل می‌دهند، امکان‌پذیر است. عوامل اساسی مهندسی ژنتیک عبارتند از:

۱) اتصال فیزیکی دو قطعه DNA به یکدیگر؛

۲) یک قطعه خودتکثیرشونده DNA (ناقل همسانه‌سازی) که قادر به تکثیر در میزبان است و می‌تواند به قطعه DNA که باید همسانه‌سازی شود، اتصال یابد؛

۳) روشی برای انتقال مولکول‌های DNA به سلول پذیرندهٔ فعال؛

۴) وسیله‌ای برای گزینش موجوداتی که DNA مطلوب را کسب کرده‌اند.

به‌طور خلاصه، همسانه‌سازی ژن یا مهندسی ژنتیک شامل ادغام یک قطعهٔ خاص DNA خارجی در یک سلول است، به‌نحوی‌که DNA ادغام شده، تکثیر و در خلال تقسیم سلولی به سلول‌های دختری منتقل شود. عوامل اصلی دخیل در همسانه‌سازی ژن عبارتند از:

۱) جداسازی ژن (یا قطعهٔ دیگری از DNA) برای همسانه‌سازی؛

۲) ادغام ژن درون قطعه‌ای دیگر از DNA به‌نام ناقل؛

۳) انتقال ناقل‌ها نوترکیب به سلول‌های باکتری از طریق ترانسفورماسیون یا آلودگی با ویروس‌ها؛

۴) انتخاب سلول‌هایی که حامل ناقل‌های نوترکیب مطلوبند؛

۵) رشد باکتری‌ها می‌تواند به‌طور نامحدود ادامه یابد تا DNA همسانه‌سازی‌شده در حد نیاز به‌دست آید؛

۶) بیان ژن برای دستیابی به فراوردهٔ مطلوب.

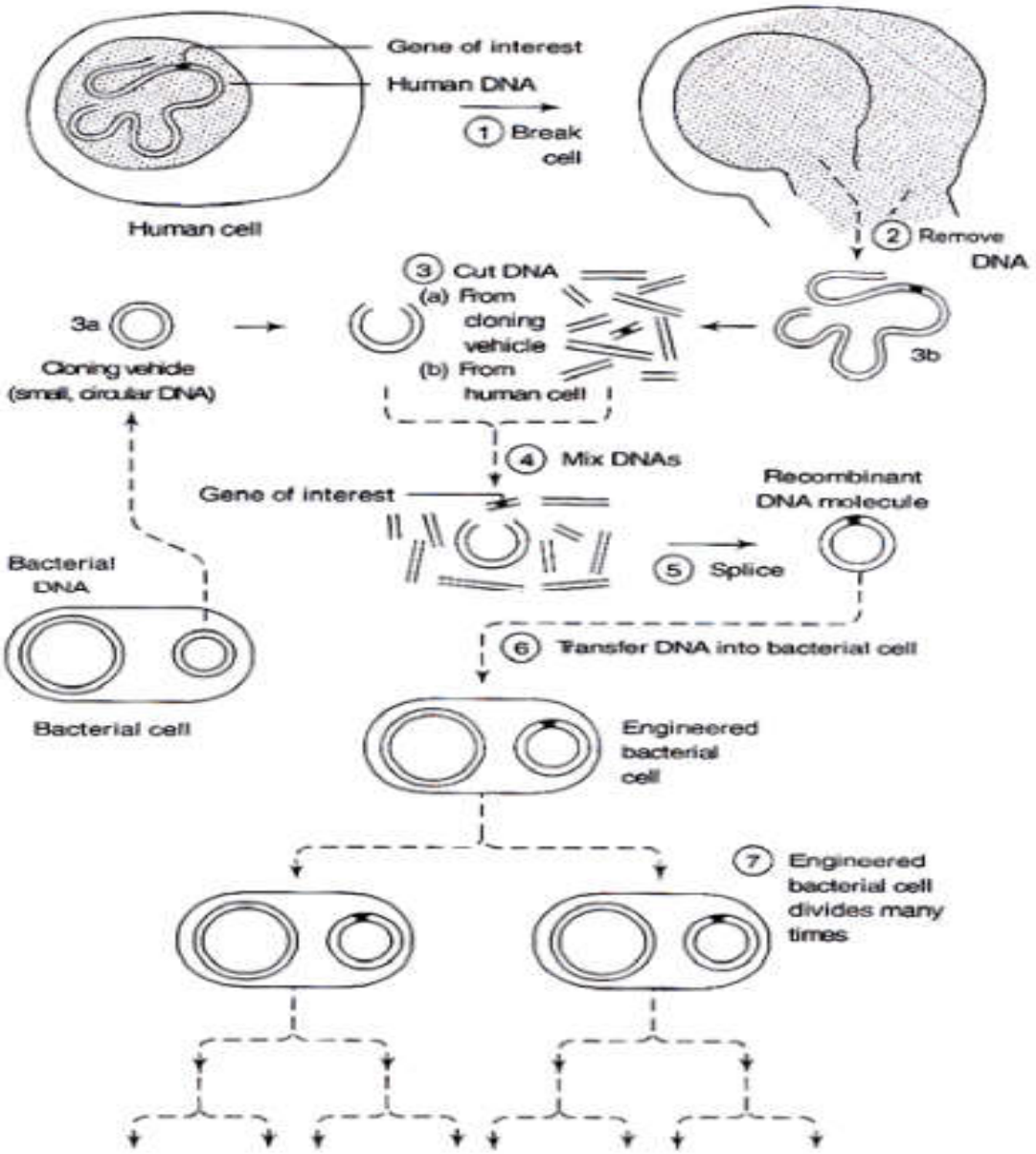
۱-۲- طرح کلی روش مهندسی ژنتیک

مهندسی ژنتیک به دو دانش یعنی آگاهی از زیست‌شناسی مولکولی و آشنایی با دست‌ورزی‌های آزمایشگاهی نیاز دارد. مراحل اصلی مهندسی ژنتیک به طور خلاصه در شکل ۱-۲ مشاهده می‌شود.

۱) شکستن سلول‌های زنده؛ روش‌های مختلفی برای این کار وجود دارد. یک روش عمومی، ریختن سلول‌ها در مخلوط‌کن و تیمار آنها با یک مادهٔ شوینده است؛

۲) جمع‌آوری مواد ژنتیکی سلول‌ها کار آسانی است؛ اطلاعات به‌صورت شیمیایی در قالب DNA ذخیره می‌شود. چون مولکول‌های DNA بسیار طویل‌تر از اکثر مولکول‌های بزرگ موجود در سلول‌ها هستند، توسعهٔ تکنیک‌های تخلیص DNA امکان‌پذیر بوده است. DNA با استفاده از روش‌های مختلفی جداسازی و خالص می‌شود؛

DNA ناقل همسانه‌سازی قرار گرفته است). با این فرایند، بخشی از اطلاعات ژنتیکی به سلول انتقال می‌یابد و موجودی جدید ایجاد می‌شود.



شکل ۱-۲- مراحل اصلی همسانه‌سازی ژن. ۱. سلول‌های انسان شکسته می‌شوند (برای وضوح بیشتر تنها یک سلول نشان داده شده است)، ۲. DNA حاوی ژن موردنظر از سلول انسان به‌دست می‌آید، ۳. DNA انسان و یک ناقل همسانه‌سازی در یک محل اختصاصی بریده می‌شوند، ۴. دو نوع DNA مخلوط می‌شوند، ۵. قطعات DNA برای تشکیل یک DNA نوترکیب به هم متصل می‌شوند، ۶. DNA نوترکیب به سلول باکتری منتقل می‌شود، ۷. سلول‌های مهندسی‌شده که در مرحله ۶ تولید شدند، فرصت می‌یابند تا تکثیر شده و میلیون‌ها سلول یکسان را در قالب کلونی ایجاد کنند.

در کل، همسانه‌سازی یک قطعهٔ DNA کافی نیست و اطلاعات DNA باید به فراورده‌ای مفید تبدیل شود. برای ایجاد یک فراورده، اطلاعات DNA از ژن به محل سنتز پروتئین جدید انتقال می‌یابد.

انسولین مثال خوبی برای شرح یکی از کاربردهای فناوری DNA نوترکیب است. ژن انسولین ناحیه‌ای در DNA است که حامل اطلاعات تولید انسولین است. برخی از مبتلایان به دیابت، انسولین کافی تولید نمی‌کنند و قادر به کنترل مناسب متابولیسم قند خود نیستند؛ در نتیجه، این بیماران باید روزانه انسولین تزریق کنند. قبل از ایجاد و توسعهٔ مهندسی ژنتیک، انسولین فقط از طریق فرایند پرهزینهٔ استخراج پروتئین از پانکراس خوک به‌دست می‌آمد، اما به کمک روش‌های همسانه‌سازی ژن، ژن‌های انسولین انسان در باکتری‌ها قرار گرفتند. انسولین خوک بنا به این دلایل مطلوب واقع نمی‌شود: ۱) برخی از مردم به آن حساسیت دارند، ۲) گران است، ۳) حیوانات زیادی باید ذبح شوند.

از طریق مهندسی ژنتیک، مقادیر زیادی انسولین به‌وسیلهٔ باکتری تولید می‌شود و دستیابی به انسولین از باکتری نسبت به بافت پانکراس آسان‌تر است. علاوه براین باکتری‌های مهندسی ژنتیک‌شده، انسولین انسانی تولید می‌کنند که برای دیابتی‌هایی که به انسولین خوک حساسند ویژگی مهمی محسوب می‌شود.

به‌طور خلاصه، مهندسی ژنتیک یک راهکار انتقال مقادیر کوچکی از اطلاعات ژنتیکی (DNA) از یک موجود به موجود دیگر است. قطعات DNA خاص، خصوصیت موجود پذیرنده را به صورت مفید، پیش‌بینی‌پذیر و همیشگی تغییر می‌دهند.

۲-۲- اندونوکلئازهای برشی

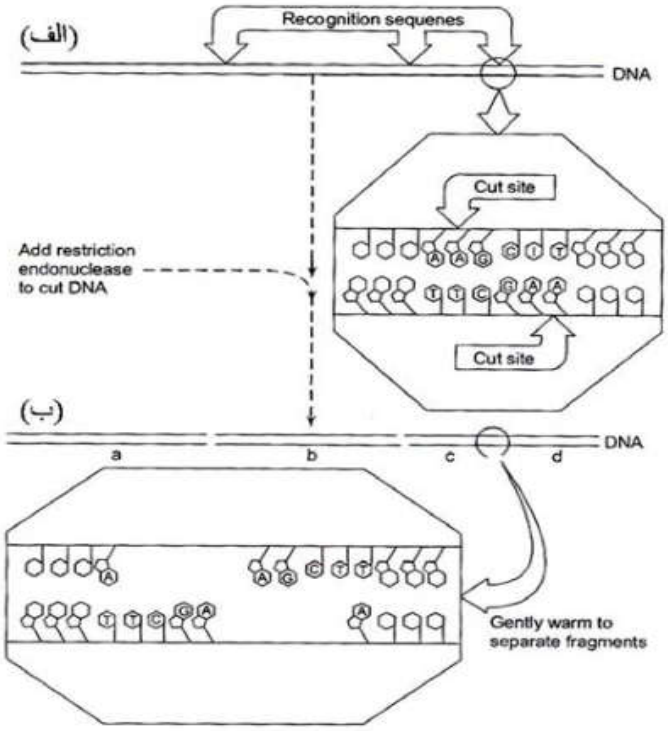
۱-۲-۲- ماهیت

آنزیم‌هایی که پیوندهای فسفو دی استری زنجیره‌های پلی‌نوکلئوتیدی را برش می‌زنند، نوکلئاز نام دارند و نوکلئازهایی که پیوندهای داخلی را می‌شکنند، به اندونوکلئازها معروفند. در دهۀ ۱۹۷۰، مشخص شد که باکتری‌ها حاوی نوکلئازهایی هستند که توالی‌های نوکلئوتیدی کوتاه DNA دورشته‌ای را شناسایی می‌کنند و اسکلت فسفو دی‌استری را در جایگاه‌های بسیار اختصاصی می‌برند. این آنزیم‌ها، اندونوکلئازها یا آنزیم‌های برشی نامیده می‌شوند.

کشف انواع اندونوکلئازهای برشی یکی از دلایل پیشرفت سریع فناوری DNA نوترکیب است. آنزیم دو شکاف، یکی در هر یک از اسکلت‌های فسفاتی مارپیچ مضاعف و بدون صدمه زدن به بازها ایجاد می‌کند. انواع اندونوکلئازهای موجودات مختلف، توالی‌های نوکلئوتیدی متفاوتی را شناسایی می‌کنند و DNA را در جایگاه‌های برشی مختلف می‌برند (شکل ۲-۲). جدول ۱-۲ فهرستی از برخی اندونوکلئازهای برشی و جایگاهی برشی آنها را نشان می‌دهد.

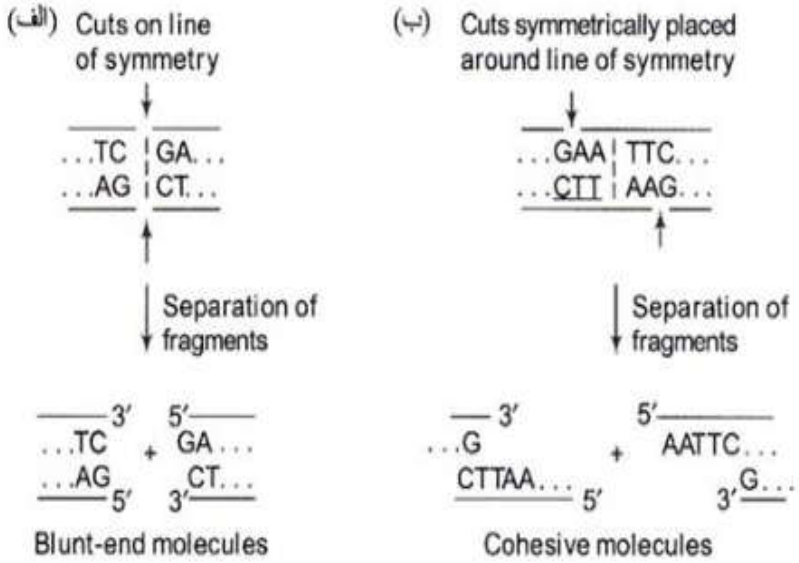
در طبیعت، آنزیم‌های برشی برای تخریب DNAهای ویروسی مختلف که ممکن است به سلول وارد شوند، توسط باکتری استفاده می‌شود و در نتیجه رشد ویروس را محدود می‌کند. از این‌رو، آنزیم‌های برشی به عنوان یک مکانیسم دفاعی عمل می‌کنند. باکتری‌ها از طریق متیله کردن بازهای خود در جایگاه‌های حساس، در مقابل تهاجم آنزیمی حفظ می‌شوند. آنزیم‌های برشی قیچی‌های مولکولی هستند که برای تشخیص و برش DNA در توالی‌های خاص استفاده می‌شوند. جایگاه‌های شناسایی آنزیم، توالی‌ها یا جایگاه‌های شناسایی نام دارند. از طریق تعیین مکان موقعیت‌های جایگاه‌های برشی بعضی از آنزیم‌های برشی در یک قطعه DNA، می‌توان نقشه‌های برشی[1] تهیه کرد.

گاهی آنزیم‌های برشی هر دو رشتهٔ DNA را در جهاتی کاملاً متضاد بر روی هر دو رشته شناسایی می‌کنند و می‌برند و قطعاتی با انتهای صاف ایجاد می‌کنند. در برخی موارد، دو رشته DNA در مقابل هم بریده نمی‌شوند و انتهای چسبنده تشکیل می‌دهند. شکل۳-۲ دو نوع شکاف را نشان می‌دهد. اکثر آنزیم‌های برشی فقط یک توالی بازی کوتاه را در مولکول DNA شناسایی می‌کنند و دو شکاف تک‌رشته‌ای، یکی در هر رشته ایجاد می‌کنند و گروه‌های 3'-OH و 5'-P را به وجود می‌آورند. این توالی‌های شناسایی شده غالباً پالیندروم هستند، یعنی توالی‌های تکراری معکوس و متقارن.



شکل ۲-۲- برش DNA با اندونوکلئاز برشی. الف) DNA به شکل دو خط موازی مشاهده می‌شود و ممکن است شامل توالی‌های کوتاه زیادی به عنوان جایگاه برش آنزیم باشد. ب) وقتی آنزیم برشی به DNA اضافه می‌شود، آن را برش می‌دهد. DNA موجود در شکل، به چهار قطعهٔ کوتاه‌تر DNA یعنی a,b,c و d با انتهای چسبنده شکسته است.

در یک پالیندروم توالی بازی اولین نیمهٔ یک رشته مارپیچ مضاعف DNA، تصویر آینه‌ای نیمه دوم رشته مکمل خود است. آنزیم‌های برشی می‌توانند DNA را به سه روش برش بزنند و انتهای صاف، انتهای چسبناک با دنباله‌های '۳ و انتهای چسبناک با دنباله‌های '۵ را ایجاد کنند. نحوهٔ شکستن DNA صرفاً به آنزیم‌های برشی بستگی دارد. هر آنزیمی با یک نام اختصاری سه یا چهار حرفی خوانده می‌شود (حروف ایتالیک هستند) که منشأ آن را مشخص می‌کند. اعداد رومی (I، II و III) برای تمایز بین آنزیم‌های متعددی که منشأ یکسانی دارند، به نام آنها اضافه می‌شود (مثلاً *Eco*RI).



شکل ۳-۲- دو نوع برشی که آنزیم‌های برشی ایجاد می‌کنند. خطوط منقطع نشان‌دهندهٔ مرکز تقارن توالی است و پیکان‌ها محل برش را نشان می‌دهند.

۲-۲-۲- خصوصیات

تابه‌حال آنزیم‌های برشی زیادی جداسازی شده‌اند. تمام این آنزیم‌ها از پروکاریوت‌ها هستند. در چند موجود یوکاریوتی که تاکنون بررسی شده‌اند، هیچ آنزیم مشابهی شناخته نشده‌است.

آنزیم‌های برشی به سه نوع؛ I، II و III تقسیم می‌شوند. در نوع I و III، فعالیت‌های متیلازی و برشی با یک کمپلکس آنزیمی بزرگ انجام می‌گیرد. در نوع II، فعالیت برشی آنزیم مستقل از فعالیت متیلازی است و برش در جایگاه‌های خیلی اختصاصی که درون یا نزدیک به توالی تشخیصی هستند، رخ می‌دهد. برخی آنزیم‌ها، DNA را در جایگاه غیراختصاصی دور از جایگاه تشخیصی برش می‌زنند. تمامی آنزیم‌ها توالی‌های اختصاصی خود را دارند و از این رو تعداد برش‌هایی که در یک مولکول DNA ویژه یا جمعیتی از مولکول‌ها ایجاد می‌کنند، وابسته به تعداد دفعاتی است که آن توالی خاص در DNA موجود است.

توالی‌های شناسایی‌شده به‌وسیلهٔ آنزیم‌های برشی ۴ تا ۸ نوکلئوتید هستند و با نوع خاصی از تقارن درونی مشخص می‌شوند. علاوه بر برش، بعضی آنزیم‌ها تغییر متیلاسیونی هم برخی اعمال می‌کنند. این آنزیم‌ها تغییردهنده[1] (متیلاز) نام دارند. متیلاسیون ژن‌ها را در حالت‌های فعالیت مختلف قرار می‌دهد. همچنین، آنزیم‌هایی وجود دارند که هر دو عمل برش و تغییر را انجام می‌دهند. بر اساس این خواص، آنزیم‌های برشی به انواع مختلفی گروه‌بندی شده‌اند؛ سیستم‌های آنزیم‌های برشی نوع II (مثلاً *Eco*RI) که دارای آنزیم‌های متفاوتی برای تغییر و برش هستند، سیستم‌های آنزیمی نوع I (*Eco*K) و نوع III (*Eco*PI) که یک آنزیم هر دو فعالیت را دارد، هرچند که جایگاه‌های تغییر و برش به لحاظ موقعیتی با هم فرق دارند.

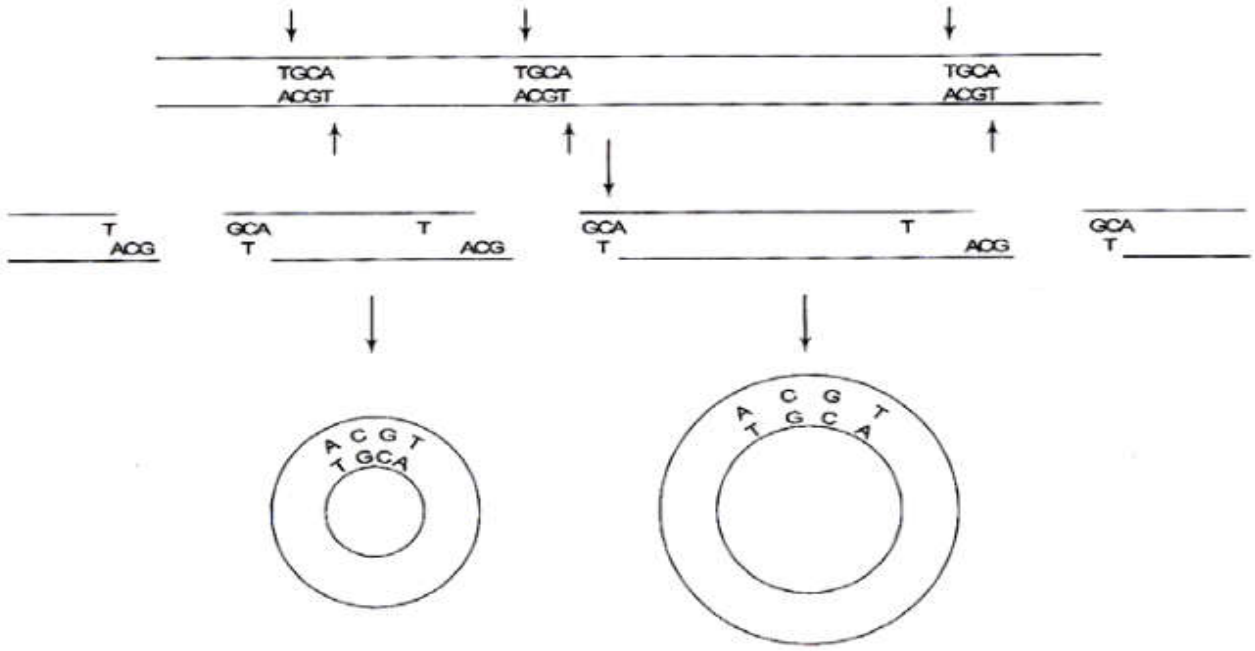
از دو گروه فوق، آنزیم‌های برشی نوع II در اهداف همسانه‌سازی مهمترند. زمانی که برای دستیابی به قطعاتDNA کوچک، به برش زیادی در قطعه نیاز باشد، آنزیم‌هایی که دارای جایگاه هدف چهاربازی هستند، استفاده می‌شوند و زمانی که برش کمتری مدنظر بوده و دستیابی به قطعات DNA طویل لازم باشد، آنزیم‌هایی با جایگاه‌های هدف هشت‌بازی استفاده می‌شوند. از طرفی، اکثر آنزیم‌ها، جایگاه‌های هدف شش‌بازی دارند. برخی از آنها قادرند هم نواحی متیله و هم نواحی غیرمتیله را برش دهند، اما اکثر آنها تنها نواحی غیرمتیله را می‌برند.

یکی از مهم‌ترین رخدادهای مطالعهٔ آنزیم‌های برشی، مشاهدهٔ حلقوی شدن قطعات حاصل از آنزیم‌های برشی با میکروسکوپ الکترونی است. شکل ۴-۲ این پدیده را نشان می‌دهد. با گرمادهی حلقه‌ها مجدداً قابلیت خطی‌شدن دارند، اما اگر بعد از حلقوی شدن، تیمار با DNA لیگاز *E.coli* انجام گیرد گروه‌های 3'-OH و 5'-P به هم متصل شده و به‌صورت دائمی حلقوی می‌شوند. آنزیم *Eco*RI که در آزمایشگاه‌های دوسویکس و بویر[1] شناخته شد قادر به برش یک مولکول DNA حلقوی و تشکیل یک مارپیچ مضاعف خطی با دو انتهای مکمل بود (شکل ۵-۲).

جدول ۱-۲- بعضی از اندونوکلئازهای برشی، منابع و توالی مورد شناسایی

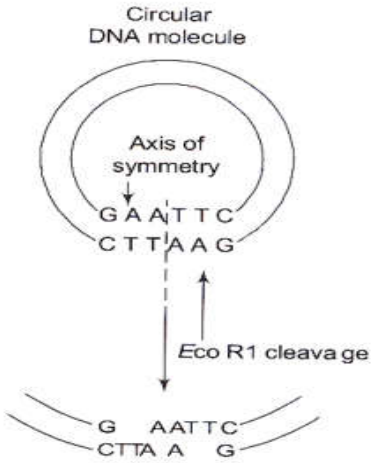
Enzyme	Source	Recognition sequence and clearage site
Eco Rl	*Escherichia coli* Ry13	↓ G AATTC GTTAA G ↑
Hind II	*Haemophilus influenzae*	↓ GTPy PuAC CAPu PyTG ↑
Hind III	*Haemophilus influenzae* Rd	↓ A AGCTT TTC GA A ↑
Hpa I	*Haemophilus parainfluenzae*	↓ GTT AAC CAA TTG ↑
Hpa II	*Haemophilus parainfluenzae*	↓ CC GG GG CC ↑
Bam HI	*Bacillus amyloliquefaciens*	↓ G GATCC CCTAG G
Bgl III	*Bacillus globigi*	↓ A GATCT TCTAG A ↑
Hae II	*Haemophilus aegyptius*	↓ PuGG GC Py PyCG CGPu ↑
Hae III	*Haemophilus aegyptius*	↓ GG CC CC GG ↑

Contd…



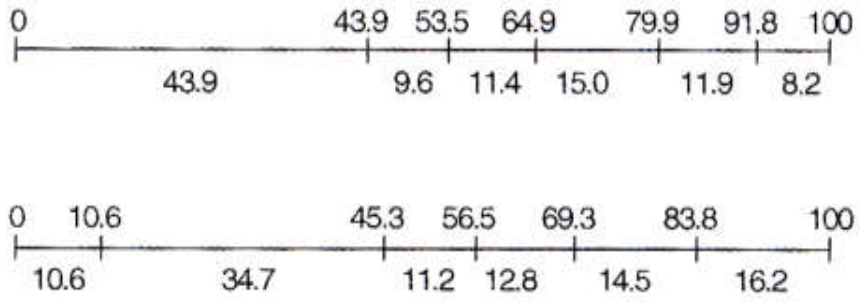
شکل ۴-۲- حلقوی شدن قطعات DNA حاصل از آنزیم برشی

اکثر آنزیم‌های برشی بدون توجه به منبع DNA تنها یک توالی بازی را تشخیص می‌دهند. از این رو، چنانچه یک نوع آنزیم قطعات حاصل از مولکول DNA دو موجود مختلف را ببرد، انتهای چسبنده یکسانی تولید می‌کند. این خصوصیت یکی از پایه‌های فناوریDNA نوترکیب است. چون اکثر آنزیم‌های برشی یک توالی منحصربه‌فرد را تشخیص می‌دهند، تعداد قطعات برش‌یافتهٔ DNA یک موجود به‌وسیلهٔ یک آنزیم خاص، محدود است. مولکول‌های DNA کوچک‌تر نظیر DNA ویروس یا پلاسمید ممکن است تنها ۱ تا ۱۰ جایگاه برش (یا فاقد جایگاه برش) برای آنزیم‌های خاص داشته باشند. پلاسمیدهایی که یک جایگاه برای یک آنزیم خاص دارند، بسیار ارزشمندند.



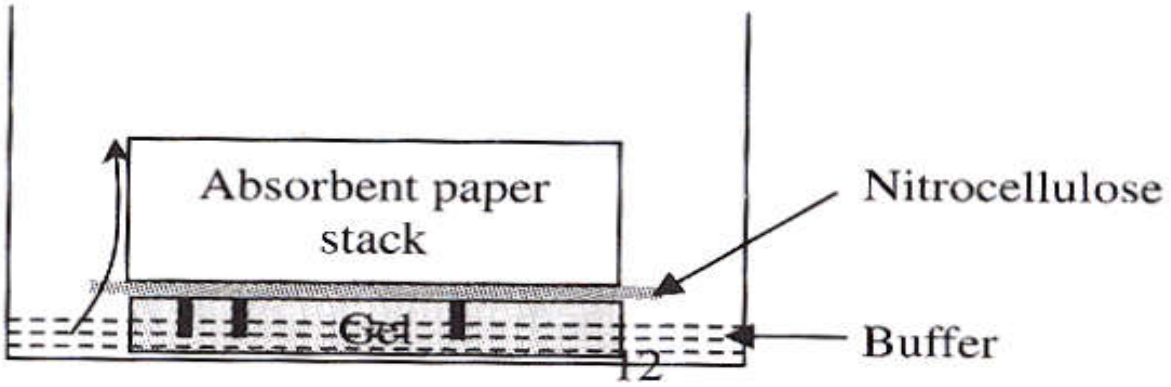
شکل ۵-۲- یک DNA حلقوی با یک محل برش آنزیم *Eco* RI بریده‌شده و ساختار خطی با انتهای مکمل ایجاد می‌کند. به تقارن و الگوی محل برش توجه کنید.

به‌دلیل اختصاصی بودن برش، یک آنزیم برشی خاص مجموعه‌ای منحصربه‌فردی از قطعات DNA را ایجاد می‌کند و آنزیم دیگر، مجموعه‌ای متفاوت از قطعات حاصل از همان مولکول DNA را ایجاد خواهد کرد. شکل ۶-۲ جایگاه‌های برش DNA فاژ لامبدای *E.coli* را به‌وسیلهٔ آنزیم‌های *Eco* RI و *Bam* HI نشان می‌دهد. نقشه‌ای که جایگاه‌های برش DNA یک موجود به‌وسیلهٔ یک آنزیم خاص را نشان می‌دهد، نقشهٔ برشی نام دارد. قطعات حاصل از برش آنزیمی را می‌توان از طریق الکتروفورز DNA تشخیص داد و قطعات DNA خاص با برش بخشی از ژل حاوی قطعات DNA، از ژل جدا و بازیابی می‌شوند.



شکل ۶-۲- نقشهٔ برشی DNA حاصل از آنزیم‌های *Eco* R1 و *Bam* H1 خطوط عمودی محل برش‌ها را نشان می‌دهند. اعداد بالای خطوط نشان‌دهندهٔ درصد کل طول DNA از انتهای سمت چپ است. اعداد زیر خطوط طول هر قطعه را بر حسب درصد کل طول نشان می‌دهد.

تکنیک‌های متعددی برای تعیین مکان ژن‌های خاص بر روی قطعات یک نقشهٔ برشی استفاده می‌شوند. یکی از معمول‌ترین این روش‌ها، سادرن بلات است. در سادرن بلاتینگ، یک ژل که در آن مولکول‌های DNA به‌وسیلهٔ الکتروفورز از هم تفکیک شده‌اند، برای ایجاد DNA تک‌رشته با ماده قلیایی تیمار می‌شود و سپس این رشته به صفحه نیتروسلولزی انتقال می‌یابد، به‌طوری‌که موقعیت‌های نسبی باندهای DNA حفظ می‌شود (شکل ۷-۲). سپس نیتروسلولزی که DNA تک‌رشته‌ای محکم به آن اتصال یافته است، در معرض کاوشگر RNA یا DNA رادیواکتیو قرار می‌گیرد و به ایجاد حالت اولیه دورشته‌ای منجر می‌شود. کاوشگر نشاندار با مواد رادیواکتیو تنها در موقعیت‌هایی که در آن توالی‌های بازی با کاوشگرها مکمل هستند، به‌طور پایداری به DNA متصل می‌شود (در برابر شست‌وشو مقاومت دارد). رادیواکتیویته از طریق قرار دادن کاغذ در تماس با فیلم پرتو ایکس مشخص می‌شود؛ بعد از ظهور فیلم، نواحی تیره‌شده، موقعیت رادیواکتیویته را نشان می‌دهد. اگر از یک نوع mRNA رادیواکتیو رونویسی شده از یک ژن خاص به‌عنوان کاوشگر استفاده شود (مثلاً mRNA جدا شده از یک سلول تخصصی که به‌طور عمده یک نوع RNA خاص را ایجاد می‌کند)، فقط با قطعهٔ برشی حامل آن ژن هیبرید خواهد شد.



شکل ۷-۲- سادرن بلاتینگ

۳-۲- ناقل‌های همسانه‌سازی

ناقل‌های همسانه‌سازی، مولکول‌های DNA پلاسمید، فاژ یا ویروس جانوری مورد استفاده برای انتقال یک قطعه DNA از یک لوله آزمایش به سلول زنده هستند و توانایی تکثیر خود را دارند. ناقل‌ها ممکن است از نوع همسانه‌سازی یا بیانی باشند. ناقل‌های همسانه‌سازی برای تکثیر قطعات DNA موردنظر در یک میزبان مناسب استفاده می‌شوند اما رونویسی یا ترجمه ژن همسانه‌سازی‌شده اتفاق نمی‌افتد. ناقل‌های همسانه‌سازی در ایجاد کتابخانه ژنومی یا بانک ژن، تهیه کاوشگر و... استفاده می‌شوند. ناقل بیانی برای بیان ژن همسانه‌سازی‌شده استفاده می‌شود یعنی ژن همسانه‌سازی‌شده، رونویسی و ترجمه می‌شود. ناقل‌های بیانی در تولید گیاهان یا حیوانات تراریخته استفاده می‌شوند.

سادرن بلاتینگ

با توجه به ویژگی مویینگی کاغذ جادب، بافر از ژل به کاغذ جاذب حرکت می‌کند. قطعات DNA نیز همراه بافر به غشا انتقال خواهند یافت.

ناقل مناسب دارای ویژگی‌های زیر است؛

۱) توانایی تکثیر دارد، به‌نحوی‌که همراه با همانندسازی ناقل، کپی‌های زیادی از قطعهٔ DNA مورد نظر تشکیل می‌شود؛

۲) براحتی به سلول میزبان وارد می‌شود؛

۳) حامل جایگاه‌های هدف منحصربه‌فردی برای آنزیم‌های برشی است تا DNA خارجی بتواند بدون اختلال در کارکرد خود به آن وارد شود؛

۴) اگر نیاز به بیان DNA خارجی است، ناقل باید پروموتر، اپراتور و... داشته باشد.

یکی از مهم‌ترین کاربردهای فناوری DNA نوترکیب، همسانه‌سازی قطعات DNA تصادفی یا cDNA است که اغلب به‌عنوان کاوشگر استفاده می‌شوند یا همسانه‌سازی ژن‌های اختصاصی است که ممکن است از ژنوم جدا شده باشند یا به‌طریق شیمیایی از اندام یا به صورت cDNA از mRNA سنتز شوند. این همسانه‌سازی DNA فقط با کمک مولکول DNA دیگری که قابل تکثیر در میزبان است، امکان‌پذیر است و به عنوان یک ناقل می‌تواند یک پلاسمید، باکتریوفاژ، فاژمید (فاژ + پلاسمید) یا حتی یک ویروس باشد. گاهی از طریق ادغام یک قطعه DNA در ناقل به منظور قرار دادن جایگاه(های) منحصربه‌فرد یک یا چند آنزیم برشی و با هدف تسهیل استفاده از آن، تغییراتی در ناقل اعمال می‌شود. این DNA اضافه شده "پلی لینکر[1]" نام دارد.

برخی از انواع مولکول‌های کوچک DNA بیماری‌زا هستند و زمانی که وارد سلول زنده شوند، می‌توانند از ماشین سلول برای تکثیر خود استفاده کنند. براساس تعریف متخصصان بیوشیمی از حیات، این مولکول‌های DNA زنده نیستند؛ آنها قادر به تکثیر خود نیستند. از جمله نیازهای آنها، RNA پلیمراز میزبان (باکتری آلوده) برای رونویسی DNA به mRNA است. همچنین آنها برای ترجمه پیام‌ها به پروتئین به ریبوزوم‌های میزبان نیاز دارند. اما با وجود این کمبودها، DNAهای آلوده تأثیر عمیقی بر سلول‌های زنده دارند. برخی از انواع آنها یک سلول را اشغال می‌کنند و آن را از بین می‌برند، درحالی‌که انواع دیگر ممکن است برای سلول مفید باشند.

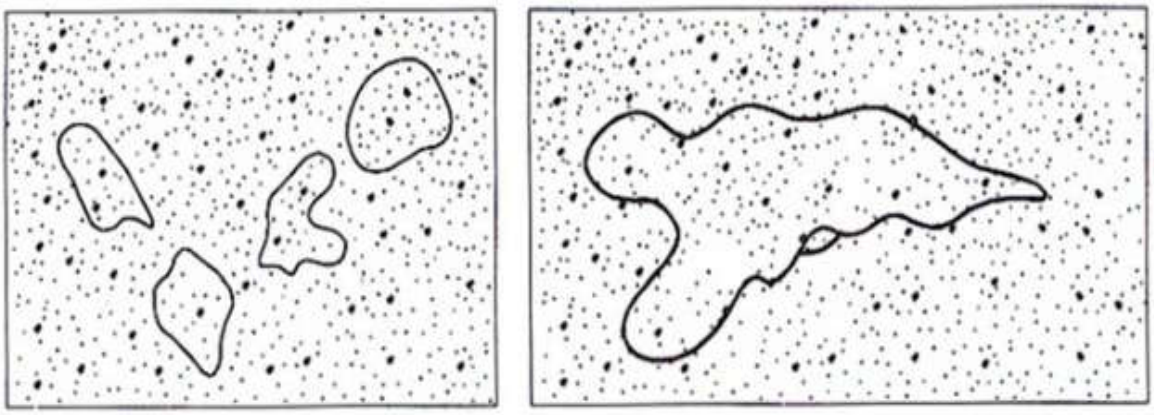
این مولکول‌های DNA بیماری‌زا به دو نوع کلی تقسیم می‌شوند، ویروس‌ها و پلاسمیدها. مولکول‌های DNA ویروس‌ها در یک پوشش حفاظتی پروتئینی احاطه می‌شود و قادر نیستند به مدت طولانی خارج از سلول میزبان زنده بمانند. از طرف دیگر پلاسمیدها مولکول‌هایDNA حلقوی فاقد پوشش هستند و عموماً داخل سلول یافت می‌شوند. می‌توان مولکول‌های DNA پلاسمیدها و باکتریوفاژها (ویروس‌هایی که به باکتری‌ها حمله می‌کنند) را در یک مکان مشخص برش داد و همراه با حفظ اطلاعات ضروری برای آلودگی با پلاسمید یا فاژ، قطعه‌ای از DNA خارجی را به آنها وارد کرد. از این‌رو، این مولکول‌های DNA بیماری‌زا به‌عنوان ابزارهای انتقال DNA از یک نوع سلول به سلول دیگر موثرند.

۱-۳-۲- پلاسمیدها

پلاسمیدها مولکول‌هایDNA حلقوی، کوچک، دورشته‌ای و خودتکثیرشونده‌اند (شکل ۸-۲). پلاسمیدها دارای ناحیه ویژه‌ای به‌نام مبدأ همانندسازی هستند که به‌عنوان یک سیگنال شروع برای DNA پلیمراز عمل می‌کند تا مولکول DNA پلاسمید به‌وسیلهٔ سلول میزبان تکثیر شود.

انواع زیادی از پلاسمیدها شناخته شده‌اند. پلاسمیدها از نظر طول و نوع ژن‌هایی که حمل می‌کنند با هم تفاوت دارند. برخی از پلاسمیدهای کوچک‌تری که در همسانه‌سازی ژن متداول‌اند، حدود ۵۰۰۰ جفت نوکلئوتید دارند که DNA کافی برای حدود پنج پروتئین با اندازهٔ متوسط را شامل می‌شود. به‌عنوان مقایسه ، *E.coli* حامل تقریبا بیش از چهار میلیون جفت نوکلوتید است و DNA انسان حدود چهار میلیارد جفت نوکلئوتید دارد. پلاسمیدهایی وجود دارند که بزرگ ترند و برای دست‌ورزی دشوارند (یعنی پلاسمیدهای قابل انتقال[1]). آنها به‌طور کلی برای همسانه‌سازی ژن مورد استفاده قرار نمی‌گیرند. برخی از پلاسمیدهایی که توانایی ادغام شدن در کروموزوم میزبان را دارند، اپی‌زوم نامیده می‌شوند. فاکتور F که در همیوغی *E.coli* دخیل است، مثالی از یک اپی‌زوم است.

یک ویژگی مهم پلاسمیدها این است که غالبا حامل ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک هستند و این ویژگی نقش مهمی در شناسایی و انتخاب مولکول‌های DNA نوترکیب دارد. در کل، ناقل‌های پلاسمیدی دانسیتهٔ شناوری متفاوتی نسبت به DNA میزبان دارند و به همین دلیل تخلیص آنها آسان است. پلاسمید pBR322 برای همسانه‌سازی مولکولی بسیار استفاده شده‌است (شکل ۹-۲). این پلاسمید از نوع غیرهمیوغ است؛ همیوغی را تحریک نخواهد کرد و هر سلول *E.coli* که با آن ترانسفورم شود، شش تا هشت کپی به ازای کروموزوم میزبان خواهد داشت. pBR322 حاصل مهندسی پلاسمیدهای طبیعی در آزمایشگاه است و ویژگی‌هایی دارد که برای آزمایش‌های همسانه‌سازی مفیدند. تکثیر آن در سلول *E.coli* وابسته به حضور ناحیهٔ مبدأ همانندسازی(*rep*) است. pBR322، ۴۳۶۳ جفت باز طول و وزنی معادل $۲/۷ \times ۱۰^{۶}$ دالتون دارد.



الف
Col EI type DNA molecules

ب
Enlargement of plasmid similar to Col EI

شکل ۸-۲- پلاسمیدهای مشاهده شده تحت میکروسکوپ الکترونی. الف) چهار مولکول DNA به‌نام Col E1. این DNAهای خطی و حلقوی طولی معادل ۰.۰۰۱ طول *E. coli* دارند. ب) تصویر بزرگ‌شدهٔ پلاسمید مشابه Col E1 که در بخش کوچکی از آن دو رشته در حال جدا شدن از هم هستند.

مجموعهٔ دیگری از پلاسمیدهایی که به عنوان ناقل‌های همسانه‌سازی استفاده می‌شوند، متعلق به مجموعه pUC است. آنها دارای جفت‌هایی با جهت معکوس جایگاه‌های برشی نسبت به پروموتر *lacZ* هستند. pUC8 و pUC9 یک جفت را می‌سازند. این ناقل‌های پلاسمیدی عمدتاً برای همسانه‌سازی DNAهای کوچک (تا ۱۰ کیلوباز) استفاده می‌شوند.

ناقل همسانه‌سازی pSC 101 مشتق از پلاسمید *R-6-5* بوده و دارای یک جایگاه برشی *Eco*RI است، سبب مقاومت به تتراسایکلین می‌شود و توان تکثیر خود را دارد. ادغام DNA خارجی در این پلاسمید، سایر کارکردهای آن به‌ویژه فعالیت‌های مقاومت و تکثیر را تغییر نمی‌دهد. این مسئله در همسانه‌سازی ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک، DNA ریبوزومی وزغ *زنوپوس* و ژن‌های هیستونی توتیای دریایی با موفقیت استفاده شده‌است. تنها عیب PSC 101 این است که نوع وحشی آن را نمی‌توان از مشتقات نوترکیب تشخیص داد.

پلاسمید القاکنندهٔ تومور به‌وسیلهٔ باکتری *Agrobacterium tumefaciens* حمل می‌شود. این باکتری پلاسمید را به سلول‌های گیاه انتقال می‌دهد و موجب القای گال‌های طوقه می‌شود. هم‌اکنون انواع تغییریافتهٔ پلاسمید Ti برای مهندسی ژنتیک گیاهان استفاده می‌شود. جزئیات بیشتری از این مورد در بخش ۴ ارائه شده است. pUC18 یک پلاسمید متداول و بسیار کاربردی است که اولین بار در دانشگاه کالیفرنیا ساخته شد. دارای ۲۶۸۶ جفت باز، ژن مقاومت به آمپی‌سیلین و ژن *LacZ* است و جایگاه‌های همسانه‌سازی متعددی دارد.

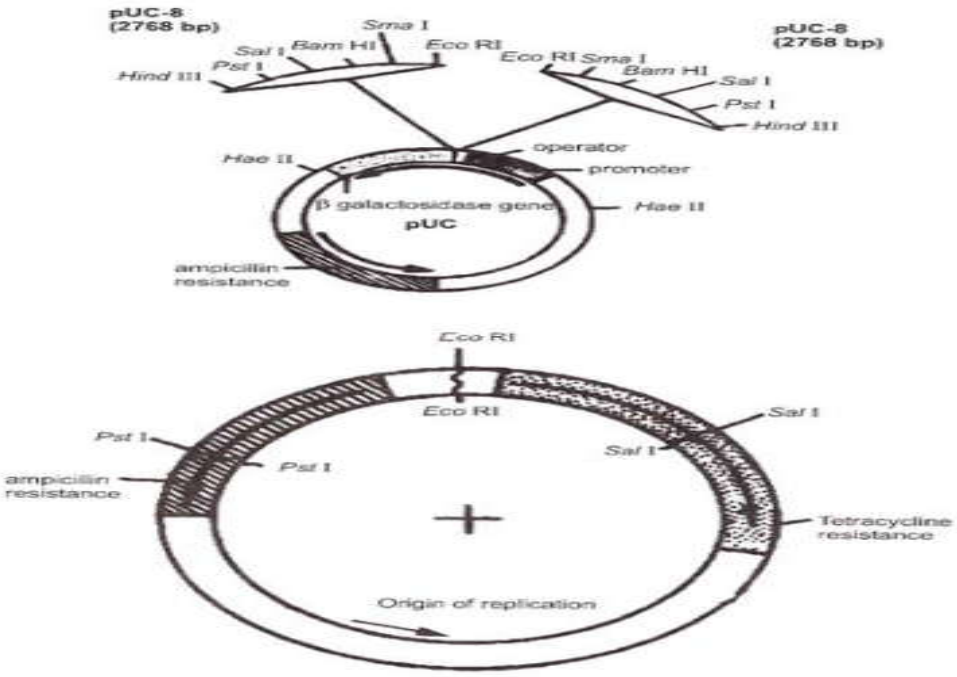
پلاسمیدهای متعددی وجود دارند که عوامل ژنتیکی باروری، مقاومت به آنتی‌بیوتیک، قابلیت تخمیر قندها و حتی هیدروکربن‌هایی نظیر نفت و تولید باکتریوسین‌ها و همولیزین‌ها را دارند. تمام این پلاسمیدها برای تولید پلاسمیدهای مناسبی به‌عنوان ناقل‌های کوچک، اصلاح شده‌اند. آنها بر اساس ویژگی‌های سازگارپذیری گروه‌بندی می‌شوند. پلاسمیدها وقتی ناسازگار تلقی می‌شوند که به خاطر رقابت بر سر جایگاه‌های همانندسازی موجود در غشا، قادر به استقرار خود نیستند.

برخی از پلاسمیدها که به گروه P تعلق دارند، قادرند دامنهٔ گسترده‌ای از باکتری‌های گرم منفی را آلوده کنند. از این رو، برای انتقال ژن‌های جدید استفاده می‌شوند. پلاسمیدهای F پلاسمیدهای طبیعی فاکتور جنسی هستند که همیوغی را القا می‌کنند و در آزمایش‌های همسانه‌سازی استفاده نمی‌شوند.

پلاسمید F تصادفی در کروموزوم *E.coli* ادغام می‌شود و گاه همراه با بخشی از ماده باکتریایی جدا می‌شود. همچنین فاژها قابلیت ادغام با ذرات F را دارند و توان آلوده‌سازی[1] را کسب می‌کنند.

پلاسمیدهای R ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک را حمل می‌کنند و بعضی از آنها دامنهٔ میزبانی گسترده‌ای دارند. برای مثال، RP4 از *Pseudomonas* به‌دست می‌آید و به‌آسانی از طریق همیوغی به اکثر باکتری‌های گرم منفی *E.coli* منتقل می‌شود. پلاسمیدهای R دو قطعه منحصربه‌فرد، یکی عامل مقاومت (*r-det*) و دیگری فاکتور انتقال مقاومت (*R-tf*) را دارند.

پلاسمیدهای Col (پلاسمیدهای کلیسین[۲]) پلاسمیدهایی هستند که آنتی‌بادی‌های باکتریایی به‌نام کلیسین را کد می‌کنند. برای مثال، col. E1 قابلیت تولید مادهٔ کلیسین E1 را داراست و حدود ۳۰-۲۰ کپی از آن در یک سلول قرار دارد. در حضور کلرامفنیکول تکثیر می‌شود، یعنی زمانی که کروموزوم باکتری همانندسازی را متوقف می‌کند، col. E1 به‌مدت ۱۲ تا ۱۶ ساعت به تکثیر ادامه می‌دهد که سبب می‌شود ۳۰۰۰-۱۰۰۰ کپی به‌ازای هر سلول ایجاد شود و حدود ۴۵ درصد از کل DNA سلول را به خود اختصاص دهد. Col. E1 یک جایگاه *Eco*RI دارد و زمانی که DNA خارجی در آن ادغام شود، کلیسین تولید نشده و به همین دلیل پلاسمیدهای نوترکیب را به آسانی می‌توان شناسایی کرد. پلاسمیدهایی ساخته شده‌اند که دارای جایگاه cos لامبدا هستند. این پلاسمیدها که کاسمید نام دارند، به‌عنوان ناقل استفاده می‌شوند. در واقع کاسمیدها پلاسمیدهایی با حدود ۲۵۰ جفت باز از DNA لامبدا هستند. ناقل کاسمیدی از pBR322، قطعه λ با جایگاه cos، جایگاه شناسایی *Pst*I و *Pvu*I در ژن مقاومت به آمپی‌سیلین و *Bam*HI تشکیل یافته است. برخی از ویروس‌ها برای ایجاد ناقل سلول‌های جانوری استفاده می‌شوند.



شکل ۹-۲- نقشهٔ فیزیکی ناقل‌های همسانه‌سازی pBR322 و pUC

۲-۳-۲- باکتریوفاژها

باکتریوفاژها ویروس‌هایی هستند که باکتری‌ها را آلوده می‌کنند و معمولاً فاژ نامیده می‌شوند. آنها پیچیده‌تر از پلاسمیدها هستند و علاوه بر داشتن یک مبدأ همانندسازی، حامل ژن‌های کدکننده پروتئین‌هایی هستند که یک پوشش حفاظتی را دور DNA تشکیل می‌دهند. فاژها همانند پلاسمیدها فاقد سیستم تولید پروتئین هستند و در نتیجه، فقط در سلول‌های باکتریایی زنده تکثیر می‌شوند. فاژها بر اساس اجزای اسید نوکلئیک خود به انواع فاژهای DNA دورشته‌ای(dsDNA)، DNA تک‌رشته‌ای(ssDNA)، dsRNA و ssRNA گروه‌بندی می‌شوند. فاژها برای فرار از میزبان، آنزیم‌هایی مانند لیزوزیم را تولید می‌کنند. این آنزیم‌ها پپتیدوگلیکان را تجزیه می‌کنند.

بسیاری از فاژها شبیه سرنگ‌های زیرپوستی مینیاتوری هستند (شکل۱۰-۲). DNA فاژ داخل ساختار پروتئینی سر قرار دارد. زمانی که ذرهٔ فاژ در تماس با سلول باکتری قرار گیرد، دم فاژ به دیوارهٔ سلول می‌چسبد و DNA از دم به درون سلول باکتری رانده می‌شود و بعد از اینکه DNA فاژ درون سلول قرار گرفت، شروع به کنترل سلول می‌کند. RNAپلیمراز باکتری ژن‌های اختصاصی فاژ را رونویسی می‌کنند و mRNAهای حاصل با استفاده از ریبوزوم‌های باکتری ترجمه می‌شوند. در مراحل اولیه آلودگی برخی از فاژها پروتئین‌هایی تولید می‌کنند که DNA باکتری را تخریب کرده و آن‌را به نوکلئوتیدهای مجزا تجزیه می‌کنند و چون تمام اطلاعات مورد نیاز تخریب شده است، باکتری از بین می‌رود. برخی از فاژها ژن‌هایی دارند که RNAپلیمراز کد می‌کنند و در نتیجه نیازی به پلیمراز باکتری ندارند. فاژ لامبدا امکان همسانه‌سازی قطعاتی به طول حدود ۲۵-۲۰ کیلوباز را فراهم می‌کند و ناقل‌های کاسمیدی یا فاژمیدی امکان همسانه‌سازی قطعاتی تا حدود ۴۵ کیلوباز را فراهم ساخته‌اند.

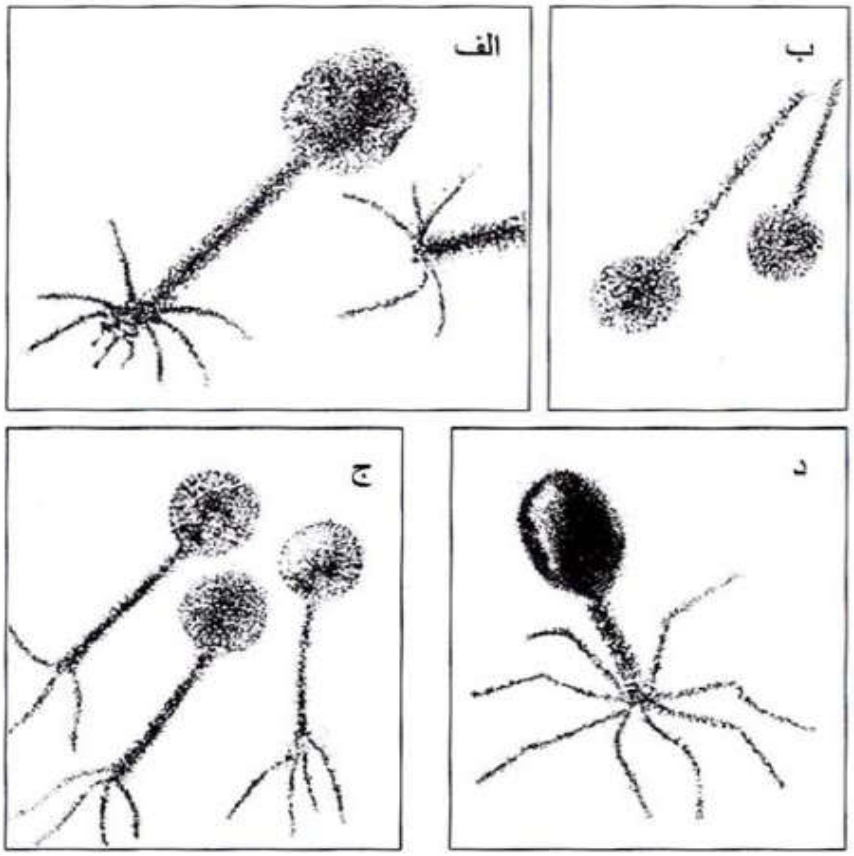
کارایی فاژ شگفت‌آور است. یک فاژ صدها نتاج تولید می‌کند و هر نتاج یک سلول باکتری را آلوده می‌کند و چند صد ذرهٔ فاژی دیگر تولید می‌شود. تنها با تکرار چهار چرخهٔ آلودگی، یک ذره فاژی می‌تواند به مرگ بیش از یک میلیارد سلول باکتری منجر شود. اگر یک قطعهٔ DNA بدون تخریب ژن‌های مهم، به یک مولکول DNA فاژ اتصال یابد، فاژ در زمان آلودگی سلول باکتری آن قطعه را همراه با DNA خودش تکثیر خواهد کرد.

۱-۲-۳-۲- فاژهای لامبدا (باکتریوفاژ معتدل)

لامبدا یکی از فاژهای مورد استفاده در همسانه‌سازی است و نسبتاً پیچیده‌تر از فاژهای دیگر می‌باشد. زمانی که DNA لامبدا به سلول باکتری تزریق شود، می‌تواند دو مسیر را طی کند. لامبدا می‌تواند تکثیر شده و باکتری

را تخریب کند یا در سلول استقرار یابد. این فرایند به چرخه لیزوژنیک معروف است. زمانی که وارد مسیر دوم شود، DNA لامبدا در کروموزوم باکتری ادغام شده و بخشی از کروموزوم باکتری می‌شود (شکل ۱۱-۲). ژن‌های فاژ که به‌طور طبیعی پروتئین‌هایی برای از بین بردن میزبان تولید می‌کنند، به‌وسیلهٔ یک پروتئین بازدارندهٔ فاژی غیرفعال می‌شوند. از این‌رو، هر زمان که باکتری همانندسازی کند، لامبدا تکثیر می‌شود. لامبدا در این وضعیت مقدار بیشتری پروتئین بازدارنده برای حفظ خاموشی ژن‌های خود تولید می‌کند. در این زمان، چنانچه DNA فاژهای لامبدای دیگری به سلول وارد شود به سرعت به بازدارندهٔ موجود در سلول اتصال می‌یابند. به این ترتیب DNA واردشده قادر به شروع آلودگی لیتیک که به مرگ سلول منجر می‌شود، نخواهد بود. در نتیجه می‌توان لیزوژن‌ها را به آسانی تشخیص داد.

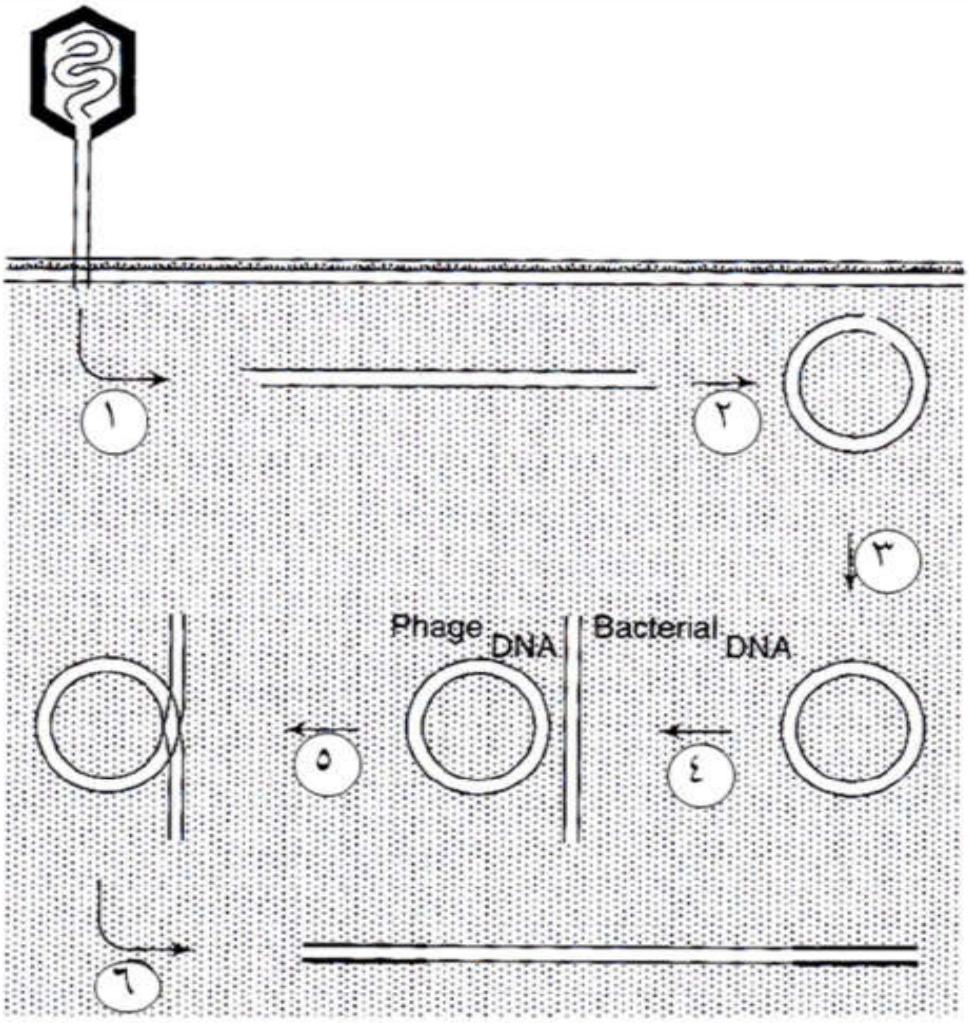
زمانی که لیزوژن حاصل آلودگی با یک فاژ حامل ژن همسانه‌سازی شده باشد، سلول باکتری قطعه همسانه‌سازی شده را به طور دائمی حمل خواهد کرد. با ایجاد نواحی تنظیمی مناسب روی ژن موردنظر، کنترل آن ژن امکان‌پذیر خواهد بود. بنابراین پلاسمیدها و فاژها برای ادغام ژن در باکتری استفاده می‌شوند. با تخریب بازدارندهٔ فاژ، می‌توان ژن‌های همسانه‌سازی‌شده را از وضعیت لیزوژن بازیابی کرد. سپس DNA فاژ، کروموزوم باکتری را از بین می‌برد و سلول را به‌سمت ایجاد ذرات فاژی هدایت می‌کند.



شکل ۱۰-۲- تصویر باکتریوفاژ با میکروسکوپ الکترونی. الف) باکتریوفاژ P2، بزرگنمایی ۲۶۶۰۰۰ مرتبه. ب) باکتریوفاژ لامبدا، بزرگنمایی

برای ایجاد لیزوژن، ژنوم آلوده باید به‌واسطهٔ انتهای تک‌رشته‌ای مکمل حلقوی شود. نوترکیبی متقابل بین فاژ و باکتری در جایگاه‌های خاصی رخ می‌دهد. ادغام و جداشدن DNA فاژ تحت تأثیر سیستم آنزیمی فاژ است. باکتریوفاژ لامبدا به عنوان ناقل همسانه‌سازی، مزایای زیادی دارد. زمانی که یک سلول باکتری چند صد ذرهٔ لامبدا تولید می‌کند، DNA هیبرید به مقدار زیادی تولید می‌شود. این DNA هیبرید به آسانی تخلیص می‌شود. هرچند، فاژ لامبدا این اشکال را دارد که دارای پنج جایگاه هدف *Eco*RI است و باید طوری تغییر کند تا به یک ناقل همسانه‌سازی مناسب تبدیل شود.

مشتقات فاژی متعددی ایجاد شده‌اند که استفاده از آنها آسان است، بقای کمتری در محیط‌های طبیعی دارند و بنابراین خیلی ایمن هستند.



شکل ۱۱-۲- ایجاد فاژ لیزوژن. ۱) باکتریوفاژ لامبدا DNA خود را وارد سلول باکتری می‌کند. DNA خطی حاصل دارای انتهای چسبنده است. ۲) DNA به صورت حلقوی در می‌آید و ۳) اتصال ناحیه مکمل صورت می‌گیرد. در این مرحله فاژ دو راه در مقابل دارد. می‌تواند به تکثیر DNA خود بپردازد و نتاج جدید تولید کند و به مرگ باکتری منجر شود و یا اینکه در DNA باکتری ادغام شود (۶-۴) و تا چندین نسل در وضعیت خاموش باقی بماند. پروتئین‌های فاژ و باکتری هر دو در فرایند تلفیق نقش مهمی دارند.

۲-۲-۳-۲- فاژ Mu

باکتریوفاژ *Mu* یک فاژ منحصر به‌فرد با قابلیت انتقال عمومی و توانایی ادغام DNA در تعداد زیادی جایگاه در ژنوم میزبان است. چون ادغام بی‌قاعده‌ای دارد موجب دامنهٔ گسترده‌ای از بازآرایی‌های کروموزومی شامل جابه‌جایی، حذف، وارونگی و... می‌شود.

۳-۲-۳-۲- کاسمیدها و فاژمیدها

کاسمیدها ذرات پلاسمیدی هستند که دارای توالی‌های DNA ویژه‌ای به‌نام جایگاه *cos* هستند. چون این جایگاه امکان بسته‌بندی DNA در قالب ذرهٔ فاژ را فراهم می‌کند، کاسمیدها نیز به‌واسطهٔ آن در شرایط مصنوعی قادر به بسته‌بندی و تخلیص خواهند بود. همچنین همانند پلاسمیدها به باکتری نفوذ می‌کنند و فاقد ژن‌های لیتیک هستند.

فاژمیدها به طور مصنوعی و از طریق ترکیب ویژگی‌های فاژ (مانند M13) با پلاسمید ساخته شده‌اند. فاژمیدی که معمولا در آزمایشگاه‌های زیست‌شناسی مولکولی استفاده می‌شود، pBluescript II KS است که از pUC19 مشتق شده و ۲۹۶۱ جفت باز طول دارد. این فاژمید یک ناقل بیانی است و جایگاه همسانه‌سازی آن بین پروموترهای T_3 و T_7 است که در جهت عکس هم خوانده می‌شوند.

۳-۳-۲- عناصر ژنتیکی جابه‌جاشونده

فناوری همسانه‌سازی ژن امکان ادغام قطعات کوچک و مجزای DNA را در جایگاه‌های خاص سایر مولکول‌های DNA میسر می‌سازد. طبیعت نیز این توانایی را دارد. عناصر ژنتیکی متحرک می‌توانند دارای از یک مکان ژنوم به مکان دیگر حرکت کنند. عناصر جابه‌جاشونده، عناصر ژنتیکی متحرک یا ژن‌های جهنده نیز نامیده می‌شوند.

۱-۳-۳-۲- عناصر ادغامی

ذرت، سال‌ها تنها سیستم ژنتیکی بود که در آن عناصر متحرک مشاهده شد. بعدها شواهد متعددی به دست آمد که احتمالا جایگاه‌های ژنتیکی در دروزوفیل که قابلیت جهش بالایی دارند ممکن است با عناصر کنترل متحرک ارتباط داشته باشند. اما اکثر متخصصان ژنتیک توجه کمی به چنین جایگاهی داشتند. در اواخر دههٔ

۱۹۶۰، جهش‌های بسیار پلیوتروپیک (جهش‌هایی که تاثیر چندگانه دارند) در *E. coli* کشف شد که ناشی از ادغام قطعات بزرگی از DNA به‌نام توالی‌های ادغامی[۲] (IS) بودند.

یک عنصر یا توالی ادغامی، قطعه‌ای کوتاه از DNA دورشته‌ای با طول متغیر ۷۶۸ تا ۵۷۰۰ جفت باز است که مبدأ تکثیر ندارد و بنابراین باید به‌صورت ادغامی به ارث رسیده باشد. توالی‌های ادغامی کمی در *E.coli* شناخته شده‌اند، مانند IS1، IS2، IS3، IS4 و IS5. کپی‌های متعددی از عناصر IS1 و IS3 در سراسر کروموزوم *E.coli* پراکنده‌اند. نه تنها عناصر IS قابلیت جابه‌جایی دارند بلکه اگر جفت‌هایی از آنها با فاصلهٔ نزدیک در جایی قرار گرفته باشند، بصورت یک واحد انتقال یافته و می‌توانند ژن‌های مابین خود را جابه‌جا کنند (شکل ۱۲A-۲).

۲-۲-۳-۲- ترانسپوزون‌ها

ترانسپوزون نوع دیگری از عناصر ژنتیکی متحرک است که در بسیاری از باکتری‌ها وجود دارد. ترانسپوزون‌ها پیچیده‌تر از توالی‌های ادغامی هستند دارای قطعات DNA کوتاهند و توان تکثیر خود را ندارند. به‌دلیل اینکه درون کروموزوم یا پلاسمید ادغام و با DNA میزبان تکثیر می‌شوند، پایدارند. این عناصر قادر به حرکت از یک جایگاه به جایگاه دیگر هستند. یک ترانسپوزون معمولی حامل یک یا چند ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک است و دو تکرار معکوس در دو انتهای خود دارد (شکل۱۲B-۲). بیش از ۳۵ ترانسپوزون شناسایی شده است، از جمله Tn3، Tn4، Tn5، Tn9، Tn10، Tn903. سه نوع ترانسپوزون (I، II و III) وجود دارد. نوع III ترانسپوزون‌ها به عناصر جابه‌جاشوندهٔ دارای تکرار معکوس مینیاتوری یا MITES[۱] معروفند.

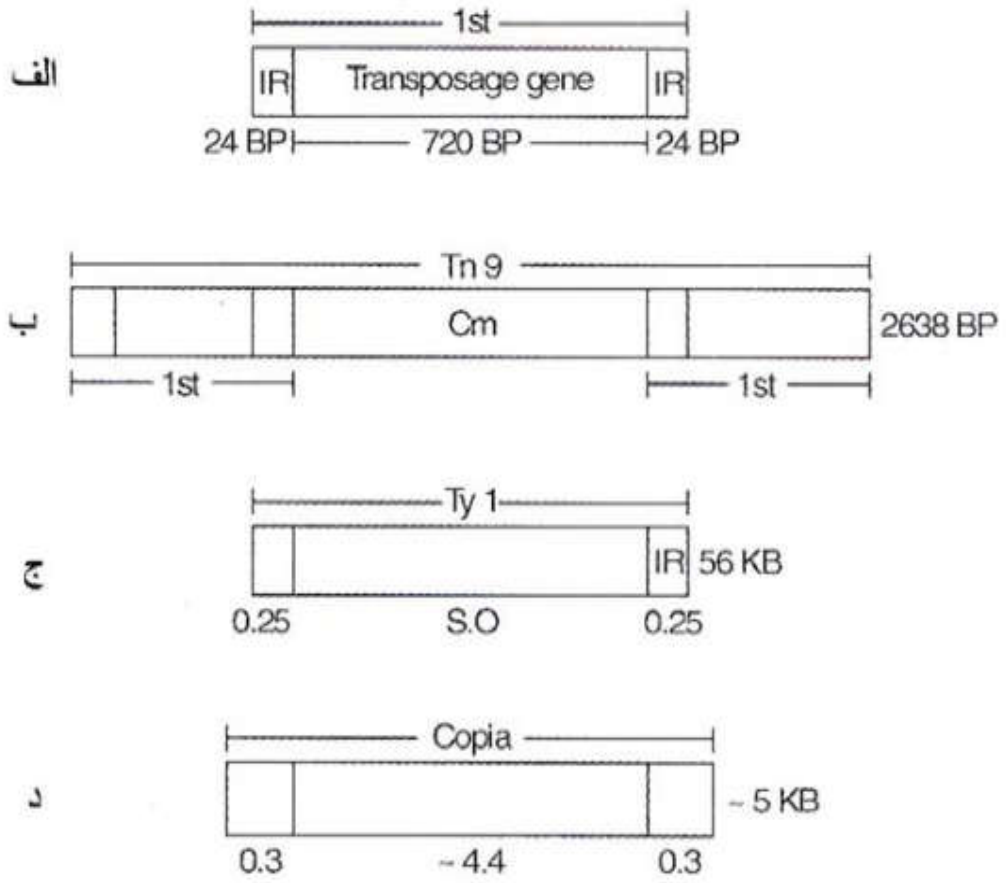
۳-۳-۳-۲- عناصر موجود در ذرت

عناصر دارای توان جابه‌جایی یا عناصر کنترلی، نوع دیگری از عناصر ژنتیکی متحرکند که در ذرت مشاهده شده‌اند. این عناصر، بیان ژن‌های استاندارد را تغییر می‌دهند و فعالیت‌های آنها در طول نمو تنظیم می‌شود. این عناصر تغییر مکان می‌دهند و در خلال رشد و نمو گیاه در زمان‌ها و فراوانی‌های مشخص بازآرایی‌های ژنتیکی را القا می‌کنند.

این عناصر در باکتری‌ها بسیار مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، اما باربارا مک‌کلینتاک[۲] برای نخستین بار آنها را در ذرت، *Zea mays*، کشف کرد. این عناصر ژنتیکی مکان کروموزومی ثابتی ندارند و از بیان سایر ژن‌های ذرت که در مجاورت آنها قرار دارند، جلوگیری می‌کنند. چندین خانواده از عناصر کنترلی در ژنوم ذرت وجود دارند. تعداد، نوع و موقعیت‌های این عناصر خاص هر نژاد ذرت هستند.

دو نوع از عناصر کنترلی وجود دارند: ۱. مستقل[۱] ؛ ۲. غیرمستقل[۲]. عناصر مستقل توانایی برش و جابه‌جایی دارند؛ ادغام آنها در هر مکان ژنی سبب ایجاد یک آلل "بی‌ثبات[۳]" می‌شود. فقدان عنصر مستقل یا عدم قابلیت جابه‌جایی آن عنصر، یک آلل ناپایدار را به یک آلل پایدار تبدیل می‌کند. عناصر غیرمستقل پایدارند؛ حرکت نمی‌کنند و دستخوش تغییرات خودبه‌خودی نمی‌شوند. تنها زمانی ناپایدار می‌شوند که یک عضو مستقل از همان خانواده در جایی از ژنوم وجود داشته باشد. عناصر مستقل مستعد جابه‌جایی‌اند و فعالیت‌های دیگری (مانند تاثیر بر بیان ژن) نیز دارند.

عناصر مستقل و غیرمستقل به چهار خانواده گروه‌بندی می‌شوند (جدول ۲-۲). عنصر مستقل، تغییر مکان می‌دهد و به سمت یک جایگاه جدید حرکت می‌کند. عنصر غیرمستقل به کمک عنصری مستقل نیاز دارد تا به سمت محل جدیدی حرکت کند.



شکل ۱۲-۲- انواع مختلف عناصر جابه‌جاشونده. الف) عناصر ادغامی؛ ب) ترانسپوزون‌ها؛ ج) عنصر T_Y مخمر؛ د) عنصر copia دروزوفیل.

۴-۳-۳-۲- عناصر Ty مخمر

عنصر Ty نوع دیگری از عناصر ژنتیکی متحرک است و خانواده‌ای از توالی‌های تکراری DNA هستند که در نژادهای مختلف مخمر در مکان‌های متفاوتی یافت می‌شوند. Ty، مخفف "ترانسپوزون مخمر[۴]" است. ۵ جفت باز از DNA هدف در هر طرف عنصر Ty ادغامی، تکرار می‌شود (شکل ۱۲C-۲). فراوانی جابه‌جایی Ty کمتر از ترانسپوزون باکتری است. دو نوع اصلی Ty وجود دارند: Ty 1 و Ty 917. ایجاد ناقل کروموزوم مصنوعی مخمر (YAC)[۵] با قابلیت حمل قطعه DNA چندصد کیلوبازی، مطالعهٔ ژنوم پیچیده و همسانه‌سازی ژن‌های بزرگ را امکان‌پذیر ساخته است. چون YACها قابلیت حمل قطعه‌های بزرگ را دارند، امکان تهیه کانتیگ[۶]هایی (مجموعه‌هایی از کلون‌ها یا توالی‌های هم‌پوشان) با بیش از چند مگاباز وجود دارد و ساخت نقشه‌های کروموزومی بزرگ را تسهیل می‌کند.

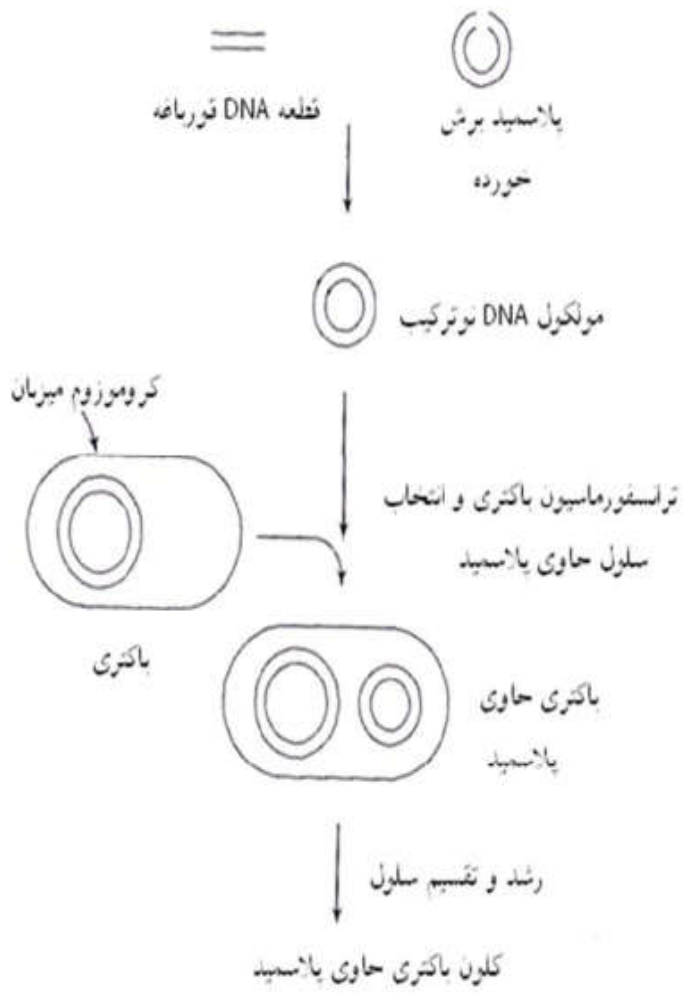
۵-۳-۳-۲- عناصر Copia

عناصر P.x.copia نوعی از عناصر ژنتیکی متحرک در دروزوفیل هستند (شکل ۱۲D-۲). عناصر ژنتیکی همچون FB[۱] و عناصر P نیز در دروزوفیل مشاهده می‌شوند.

۴-۲- ادغام یک مولکول DNA خاص در ناقل

قبلاً مطالبی دربارهٔ آنزیم‌های برشی و ناقل‌های همسانه‌سازی مطرح شد. در اینجا به نحوهٔ استفاده از آنها در ایجاد مولکول‌های DNA نوترکیب اشاره می‌شود. مجموعه‌ای از قطعات هضم‌شده با یک آنزیم برشی برای اتصال به ناقل برش‌یافته تولید شده و در ادامه تعداد زیادی ناقل هیبرید حامل قطعات مختلف DNA خارجی ایجاد می‌گردند (شکل۱۳-۲). چنانچه لازم باشد قطعه DNA یا ژن خاصی همسانه‌سازی شود، ناقل دارای آن قطعه خاص باید از سایر ناقل‌های دارای DNA خارجی تفکیک شود.

برای تعداد زیادی از ژن‌ها، تکنیک‌های انتخابی ساده‌ای به منظور بازیابی ناقل حامل ژن وجود دارد. یک روش این است که اگر DNA موردنظر در یک قطعهٔ برشی ویژه‌ای حمل می‌شود، می‌توان آن قطعه را بعد از الکتروفورز از روی ژل جداسازی و به ناقل مناسب وارد کرد. البته سلول‌های یوکاریوتی دارای حدود یک میلیون جایگاه برش برای یک آنزیم برشی خاص هستند، از این‌رو جداسازی مستقیم یک ژن یوکاریوتی از طریق الکتروفورز امکان‌پذیر نیست.

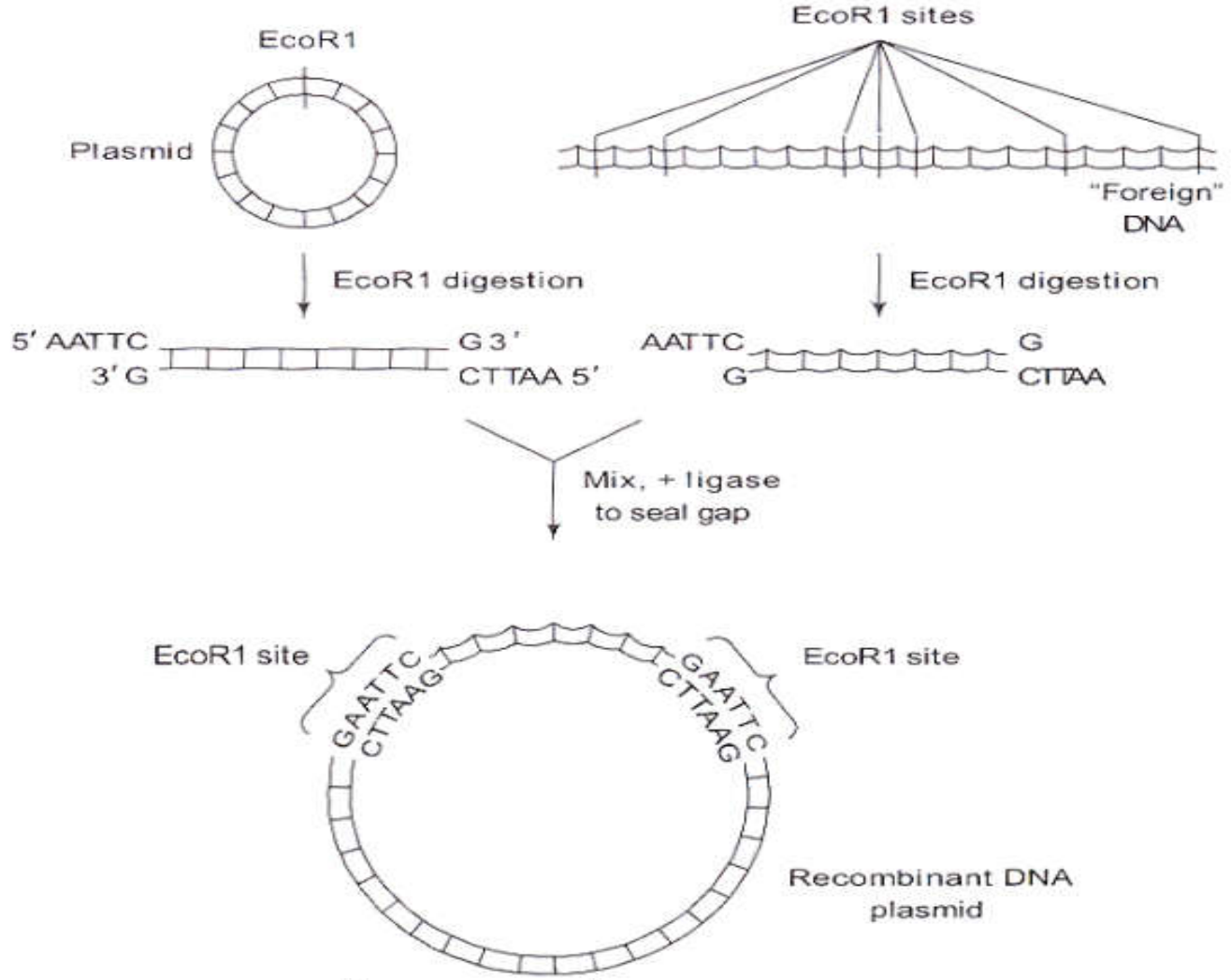


شکل ۱۳-۲- مثالی از همسانه‌سازی. قطعه‌ای از DNA قورباغه در یک پلاسمید ادغام می‌شود. پلاسمید هیبرید به یک باکتری منتقل می‌شود و پس از تکثیر باکتری، DNA قورباغه در تمام نتاج باکتری وجود خواهد داشت.

تکنیک دیگر در همسانه‌سازی یک مولکول DNA ویژه، مربوط به پلیمراز ترانس‌کریپتاز معکوس است که می‌تواند از یک مولکول DNA تک‌رشته (نظیر mRNA)، یک کپی DNA تک‌رشته به‌نام DNA مکمل یا cDNA را سنتز کند. اگر RNA الگو یک mRNA باشد (یعنی اینترون‌ها از نسخه اولیه برداشته شوند) cDNA متناظر، شامل یک توالی کدکننده خواهد بود. این توالی، توالی ژن یوکاریوتی اولیه نیست؛ هرچند، اگر هدف از ایجاد مولکولDNA نوترکیب، سنتز یک فراورده ژنی یوکاریوتی در یک سلول باکتری باشد و بتوان چنین RNA پردازش‌شده‌ای را استخراج کرد، cDNA به‌دست آمده از آن گزینهٔ مناسبی برای ادغام خواهد بود.

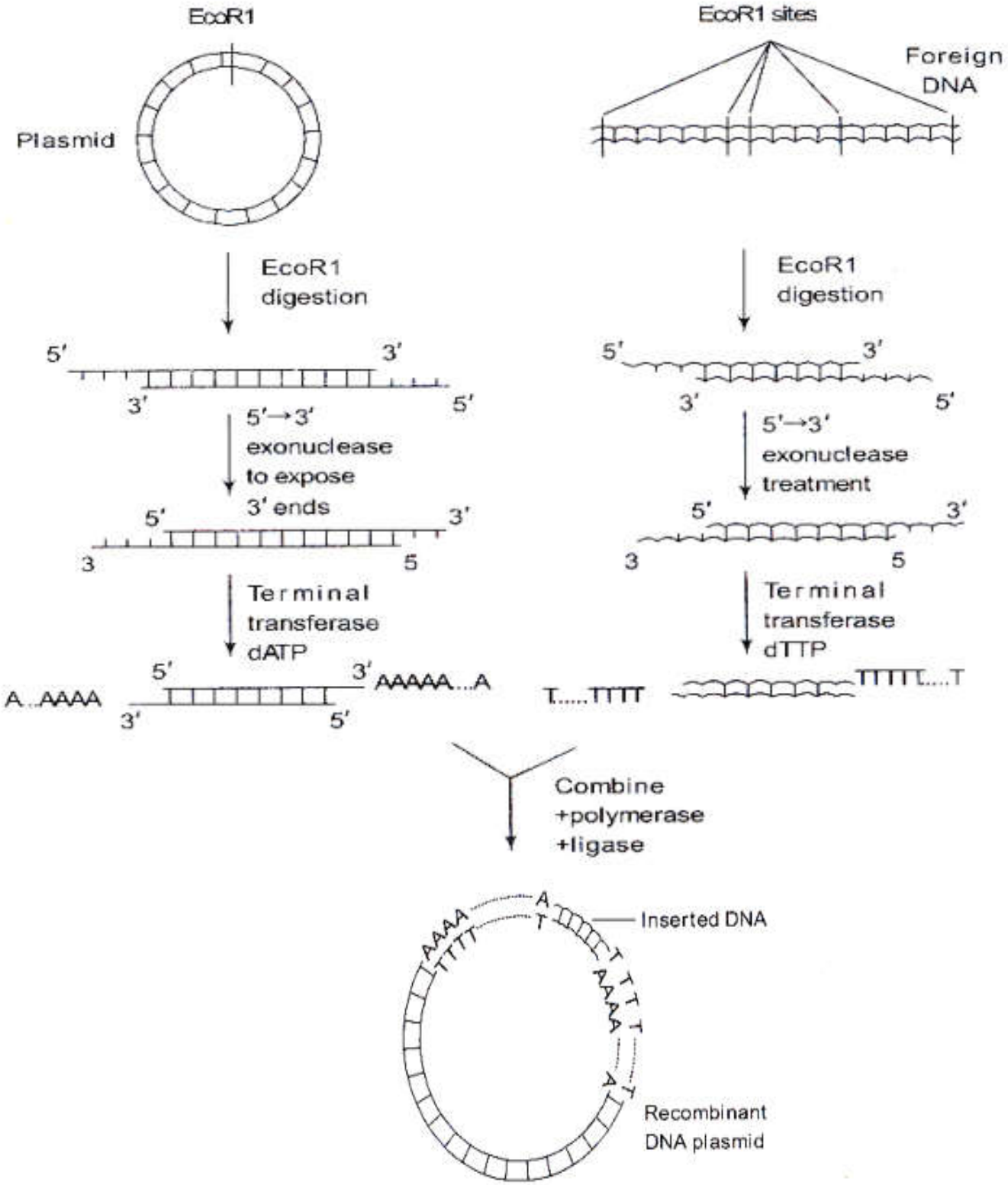
می‌توان DNA خارجی را با استفاده از یک آنزیم برشی به قطعاتی برید و با همان آنزیم یک برش در ناقل پلاسمیدی (مثلا pBR322) ایجاد و پلاسمید حلقوی را به یک مولکول خطی تبدیل کرد. شکل ۱۴-۲ این حالت را در مورد *Eco*RI نشان می‌دهد. چون *Eco*RI در یک جایگاه خاص برش ایجاد می‌کند، انتهای تک‌رشتهٔ ناقل‌های پلاسمیدی با انتهای تک‌رشته‌ای قطعات حاصل از *Eco*RI در DNA خارجی مکمل هستند. چنانچه دو DNA در یک محلول قرار گیرند، از طریق پیوند هیدروژنی در نواحی انتهایی مکمل، یک DNA حلقوی بزرگ تر ایجاد می‌کنند. در حضور آنزیم پلی‌نوکلئوتید لیگاز، شکاف‌های تک‌رشته‌ای در اسکلت‌های قند-فسفات ترمیم می‌شوند و این ساختار پایدار می‌ماند. در نتیجه یک مولکول DNA نوترکیب به‌وجود می‌آید. چون انتهای قطعات DNA حاصل از هضم *Eco*RI یکسان است، DNA خارجی ممکن است در دو جهت در ناقل پلاسمیدی ادغام شود و این جهت تصادفی خواهد بود. این جهت‌یابی می‌تواند بر رونویسی ژن‌ها یا قطعات ژنی DNA خارجی تأثیر داشته باشد، زیرا آغاز رونویسی به مکان پروموتر و سایر جایگاه‌های تنظیمی ناقل وابسته است.

در عمل، بعد از هضم با آنزیم برشی تعداد نوکلئوتیدهای تک‌رشته‌ای DNA کم است و در نتیجه احتمال اینکه توالی‌های مکمل در محلول با یکدیگر مواجه شوند، نسبتاً کم خواهد بود. به علاوه، برخی آنزیم‌های برشی، انتهای چسبنده ایجاد نمی‌کنند و بعضی از روش‌های تولید قطعه DNA همسانه‌سازی‌شده، به DNA دورشته‌ای با انتهای صاف منجر می‌شوند. در این موارد، سنتز زنجیرهٔ تک‌رشته، با استفاده از آنزیم ترمینال داکسی نوکلئوتیدیل‌ترانسفراز امکان‌پذیر است. برای مثال، در حضور dATP، این آنزیم یک دنبالهٔ پلی(dA) در هر انتهای ۳' DNA ایجاد خواهد کرد. در عمل برای ادغام یک قطعه DNA در ناقل پلاسمیدی، دنباله‌های پلی(dA) (تقریباً بطول ۱۰۰ نوکلوتید) بر روی پلاسمید خطی و دنباله‌های پلی(dT) با همان طول بر روی DNAخارجی پلیمریزه می‌شوند (شکل ۱۵-۲). به این ترتیب با ترکیب DNAها در محلول و افزودن پلی‌نوکلئوتید لیگاز، یک مولکول DNA نوترکیب تولید می‌شود.



شکل ۱۴-۲- ساخت یک پلاسمید نوترکیب DNA با استفاده از آنزیم برشی *Eco* R1 این آنزیم DNA خارجی و پلاسمید را هضم می‌کند و با مخلوط دو نوع DNA، پلاسمید نوترکیب ایجاد می‌شود.

آنزیم لیگاز پیوند فسفودی‌استری بین گروه‌های آزاد ´۵ فسفوریل و ´۳ هیدروکسیل ایجاد می‌کند و دو مولکول DNA را به هم پیوند داده یا یک مولکول خطی را حلقوی می‌کند. منبع اصلی لیگاز، فاژ T4 است و این آنزیم برای عمل خود به ATP نیاز دارد. یک ویژگی مهم لیگاز T4، توانایی این آنزیم در پیوند انتهای صاف مولکول‌های DNA به یکدیگر است. تکنیک دنباله‌دار کردن هموپلیمر[1] برای اتصال مولکول‌هایی که انتهای صاف دارند قابل استفاده است و این مزیت را دارد که پیوندها، تنها بین ناقل و قطعه DNA رخ می‌دهد. ناقل و قطعه به‌صورت مجزا تحت تیمار با ترمینال‌ترانسفراز قرار می‌گیرند و به‌وسیلهٔ dATP/dTTP دم پلی dA در انتهای ´۳ یکی و دم dT در انتهای دیگری قرار می‌گیرد. در هنگام مخلوط کردن دو نوع مولکول، مولکول‌های هیبرید پایداری ایجاد می‌شود. عیب این روش این است که چون مکان برشی در دو طرف قطعه ایجاد نمی‌شود، بازیابی قطعه مشکل خواهد بود.



شکل ۱۵-۲- ساخت پلاسمید نوترکیب DNA با استفاده از آنزیم ترمینال‌ترانسفراز به‌منظور سنتز انتهای مکمل روی پلاسمید خطی و قطعهٔ DNA خارجی

۲-۵- ترانسفورماسیون و رشد سلول‌ها

قبل از اینکه DNA نوترکیب از طریق همسانه‌سازی تکثیر شود، باید ترانسفورماسیون انجام شود یعنی یک سلول باکتریایی به‌عنوان میزبان، پلاسمید را با ژن خارجی بپذیرد و رونویسی از آن ژن را شروع کند. معمولا از یک نژاد *E.coli* فاقد سیستم برشی برای این هدف استفاده می‌شود. سلول‌هایی که تیمار نشوند، تا حدود زیادی DNA را جذب نخواهند کرد، به همین دلیل باید با اعمال پیش‌تیمار سلول‌های مستعد را ایجاد کرد. این پیش‌تیمار معمولاً شامل نگهداری سلول‌های در حال رشد تصاعدی با $CaCl_2$، در درجه حرارت‌های کم است و بعد از آن DNA افزوده می‌شود؛ سپس، یک شوک گرمایی ملایم به جذب DNA منجر می‌شود.

معمولاً انتخاب سلول‌های تغییرشکل‌یافته، به مقاومت آنها به یک آنتی‌بیوتیک وابسته است. از این‌رو، باید در حدود یک ساعت سلول‌ها در محیط بدون آنتی‌بیوتیک قرار گیرند تا ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در پلاسمید بیان شوند. در ادامه سلول‌ها بر روی محیط جامد حاوی آنتی‌بیوتیک کشت می‌شوند تا کلونی‌های حامل DNA نوترکیب انتخاب شوند.

۲-۶- آشکارسازی مولکول‌های نوترکیب

زمانی که ناقل با یک آنزیم برشی هضم و با مخلوطی از تمام قطعات برش‌یافتهٔ موجود هم‌سرشته[1] شود، انواعی از مولکول‌ها به‌وجود می‌آیند؛ مانند ناقلی که مجدد حلقوی شده و هیچ قطعه‌ای دریافت نکرده، ناقلی که یک یا چند قطعه دریافت کرده و یا مولکولی متشکل از تعداد زیادی از قطعه‌های اتصال یافته. برای تسهیل جداسازی یک ناقل حامل ژن خاص باید مطمئن شد که ناقل بعد از ترانسفورماسیون حاوی یک قطعه از DNA باشد و آن قطعه، همان DNA موردنظر باشد.

در استفاده از روش ترانسفورماسیون $CaCl_2$ برای قرارگرفتن پلاسمید در یک باکتری، هدف اولیه، جداسازی باکتری حامل پلاسمید از ترکیبی از کلونی‌های حامل پلاسمید یا عاری از پلاسمید است. یک روش عمومی، استفاده از پلاسمید دارای نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک و رشد باکتری بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک است. تنها سلول‌هایی که پلاسمید را دریافت کرده‌اند، کلونی تشکیل خواهند داد. pBR322 یک پلاسمید کارامد است. این پلاسمید دو نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک (مقاومت به تتراسایکلین(*tet-r*) و مقاومت به آمپی‌سیلین (*amp-r*)) دارد. از این‌رو، سلول‌های تغییرشکل‌یافتهٔ حامل پلاسمید، با رشد بر روی محیط کشت حاوی یکی از

این دو آنتی‌بیوتیک مشخص می‌شوند. همچنین pBR322 تنها دارای یک کپی از هر هفت نوع مختلف جایگاه‌های آنزیم‌های برشی است، به‌طوری‌که محل DNA ادغام‌شده همیشه مشخص است.

علاوه بر روش ارزیابی در شناسایی سلول‌های حامل پلاسمید، روشی مورد نیاز است تا پلاسمیدهایی که در آنها DNA موردنظر وارد شده است، شناسایی شوند. حضور دو نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک در pBR322، استفاده از روشی به‌نام غیرفعال‌سازی الحاقی[۲] را ممکن می‌سازد. این روش بدین صورت انجام می‌گیرد؛ در pBR322، ژن *tet* حامل جایگاه‌های برش *Bam* HI و *Sal* I است. از این‌رو، ادغام در هر یک از این جایگاه‌ها، پلاسمیدی به وجود خواهد آورد که مقاوم به آمپی‌سیلین است اما به تتراسایکلین حساس است. اگر نوع سلول‌های وحشی (حساس به آمپی‌سیلین و تتراسایکلین) با مخلوط DNA حاوی pBR322 هضم‌شده و قطعات برشی، تغییرشکل یابند و سلول‌ها بر روی یک محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین کشت شوند، تمام کلونی‌های زنده مانده به آمپی‌سیلین مقاوم بوده و بنابراین دارای پلاسمید هستند. برخی از این کلونی‌ها به تتراسایکلین مقاوم و برخی حساس هستند و با replica-plating روی محیط کشت حاوی تتراسایکلین شناسایی می‌شوند. چون pBR322 آلل مقاومت به تتراسایکلین (*tet-r*) را حمل می‌کند، یک کلونی مقاوم به آمپی‌سیلین (*amp-r*) مقاوم به تتراسایکلین نیز خواهد بود مگر اینکه آلل *tet-r* به خاطر ادغام DNA خارجی در آن، غیرفعال شده باشد. به این ترتیب یک سلول مقاوم به آمپی‌سیلین و حساس به تتراسایکلین حامل pBR322 DNA و قطعهٔ DNA موردنظر است.

۷-۲- انتخاب و غربالگری نوترکیب‌های خاص

چگونه می‌توان از میان تعداد زیادی کلونی، کلونی‌های حامل قطعه DNA خاصی را جدا کرد؟ یکی از کاراترین روش‌ها، هیبریداسیون کلونی[۱] است (شکل ۱۶-۲). این آزمون حضور هر ژنی را که mRNA رادیواکتیو آن موجود باشد آشکار می‌کند. کلونی‌های مورد بررسی، نسخه همانند یک محیط کشت بر روی یک کاغذ نیتروسلولزی هستند. بخشی از هر کلونی بر روی محیط کشت باقی می‌ماند که پلیت مرجع را تشکیل می‌دهد. تیمار کاغذ با NaOH موجب لیز شدن سلول‌ها و واسرشته‌شدن DNA می‌شود. سپس کاغذ با mRNA نشاندار به فسفر P^{32} که مکمل ژن مورد بررسی است اشباع شده و هیبرید DNA-RNA تشکیل می‌شود. بعد از شست‌وشو و حذف mRNA نشاندار اتصال‌نیافته، مکان‌های فسفر رادیواکتیو از طریق اتورادیوگرافی مشاهده شده و مکان کلونی‌های مطلوب تعیین می‌شود. آزمون مشابهی نیز برای ناقل‌های فاژی انجام می‌گیرد.

اگر فراوردهٔ پروتئینی ژن موردنظر سنتز شود، تکنیک‌های ایمونولوژیکی امکان شناسایی کلونی تولیدکننده پروتئین را میسر می‌سازند. در یکی از روش‌ها، کلونی‌ها همانند هیبریداسیون کلونی منتقل می‌شوند و کپی‌های انتقال‌یافته، علیه پروتئین موردنظر در معرض آنتی‌بادی رادیواکتیو هدفمند قرار می‌گیرند. کلونی‌هایی که رادیواکتیویته دارند، حامل ژن موردنظرند. رادیواکتیویته از طریق اتورادیوگرافی آشکار می‌شود.

۸-۲- کتابخانه‌های DNA ژنومی و cDNA

کتابخانهٔ DNA ژنومی مجموعه‌ای از قطعات DNA یک موجود در ناقل است که شامل حداقل یک کپی از هر توالی DNA ژنوم می‌باشد. کتابخانهٔ ایده‌آل کتابخانه‌ای است که با کمترین تعداد کلونی، تمام توالی‌ها را به نمایش بگذارد.

کتابخانه‌های DNA ژنومی را در یوکاریوت‌ها به دو روش می‌توان تهیه کرد؛

۱) DNA ژنومی با یک آنزیم برشی کاملا هضم شده و قطعات در یک ناقل مناسب که معمولا لامبدا است، قرار می‌گیرند. یک اشکال این روش این است که اگر توالی هدف دارای جایگاه شناسایی برای آنزیم برشی مورد استفاده باشد، توالی به دو یا چند قطعه می‌شکند. اشکال دیگر این است که با هضم DNA یوکاریوتی توسط آنزیم‌های برشی که توالی‌های تشخیصی شش جفت بازی دارند، اندازهٔ متوسط قطعهٔ تولید شده نسبتا کوچک (حدود ۴ کیلوباز) خواهد بود. از این‌رو، یک کتابخانه کامل ضرورتا شامل تعداد خیلی زیادی فاژ نوترکیب خواهد بود و غربال چنین کتابخانه‌ای از طریق هیبریداسیون دشوار است.

۲) هر دو مشکل ذکر شده را با همسانه‌سازی قطعات بزرگ DNA (حدود ۲۰ کیلوبازی) که با برش تصادفی DNA یوکاریوتی ایجاد می‌شوند، می‌توان رفع کرد. این روش تضمین می‌کند که توالی‌ها به دلیل پراکندگی جایگاه‌های برشی، از کتابخانهٔ تهیه‌شده حذف نشوند.

این روش بدین ترتیب انجام می‌گیرد؛ DNA یوکاریوتی با وزن مولکولی زیاد به‌طور تصادفی قطعه قطعه می‌شود، به‌طوری‌که جمعیتی از مولکول‌ها با اندازهٔ متوسط ۲۰ کیلوبازی تولید شود. سپس این DNA با آنزیم‌های برشی که توالی‌های تشخیصی چهارجفت بازی دارند، هضم ناقص می‌شود. از سانتریفیوژ با شیب چگالی ساکارز و یا الکتروفورز ژل آگارز برای جمع‌آوری قطعاتی با اندازهٔ مطلوب استفاده می‌شود. در نتیجه مجموعه‌ای از قطعات تصادفی همپوشان ایجاد می‌شود و چون انتهای قطعات از طریق هضم آنزیم برشی تولید شدند، مستقیما همسانه‌سازی می‌شوند.

نوع دیگر کتابخانهٔ DNA مکمل(cDNA)[1] است که با رونویسی معکوس از mRNA سلول حاصل می‌شود. یک مولکول cDNA می‌تواند دورشته‌ای شده و کلون شود.

۱-۸-۲- پویش کروموزومی

برای تجزیه‌وتحلیل چندصد کیلوباز از اطلاعات یک ژنوم یوکاریوتی نمی‌توان DNA بزرگی را بر روی یک فاژ یا کاسمید منفرد به‌دست آورد. هرچند یک فاژ یا کاسمید نوترکیب می‌تواند برای جداسازی نوترکیب دیگری که حامل اطلاعات همپوشان با آن هست، استفاده شود. این تکنیک به پویش کروموزومی معروف است و از این طریق جداسازی یک قطعه کوچک DNA از انتهای اولین نوترکیب و استفاده از آن قطعه DNA به منظورغربال مجدد کتابخانه فاژی یا کاسمیدی و دستیابی به یک نوترکیب دیگری که حامل آن قطعه DNA و بخش بعدی ژنوم باشد، انجام می‌گیرد. نوترکیب دوم برای دستیابی به نوترکیب سوم و در نتیجه مجموعه‌ای از قطعات همسانه‌سازی‌شدهٔ همپوشان استفاده می‌شود.

۹-۲- توالی‌یابی DNA

توالی DNA به ترتیب بازهای نوکلئوتیدی در امتداد اسکلت قند- فسفات اشاره دارد. به واسطهٔ جفت‌شدن اختصاصی بازها و صرف‌نظر از توالی، یک مارپیچ مضاعف DNA ساختار ثابتی را حفظ می‌کند. اختلاف بین مولکول‌های DNA مربوط به توالی‌های جفت بازی آنها و نه اندازهٔ ساختاری آنهاست.

هیچ تکنیکی قادر نیست توالی بازهای یک کروموزوم کامل را در یک آزمایش تعیین کند، بنابراین برش کروموزوم‌ها به قطعاتی با اندازهٔ قابل کنترل (به‌طول چند صد باز) و خالص‌سازی هر نوع قطعه، لازم است. این کار از طریق همسانه‌سازی قطعه در یک ناقل ویروسی یا پلاسمیدی انجام می‌گیرد. بعد از تکثیر، قطعات همسانه‌سازی‌شده از طریق هضم آنزیمی با یک اندونوکلئاز برشی، برای توالی‌یابی جدا می‌شوند.

اولا، مجموعه‌ای از مولکول‌های DNA تک‌رشته ایجاد می‌شوند که هر مولکول یک باز از قبلی بزرگ‌تر است. مولکول‌های DNA با توالی یکسان که از لحاظ طول در حد یک باز با هم اختلاف دارند، از طریق الکتروفورز بر روی ژل‌های اکریل‌آمید تفکیک‌پذیرند. از این حساسیت در اندازه، برای توالی‌یابی استفاده می‌شود. از دو روش برای دستیابی به این مجموعه توالی‌ها استفاده می‌شود. یک روش استفاده از واکنش‌های شیمیایی است که DNA را در بازهای خاصی برش می‌زنند. روش دیگر استفاده از یک واکنش آنزیمی است که طی آن DNA در شرایط مصنوعی سنتز می‌شود، به‌طوری‌که واکنش به‌طور اختصاصی در باز مشخصی خاتمه می‌یابد. در این مورد برای تعیین توالی مولکول، فرایندی در چهار واکنش جداگانه انجام می‌گیرد که هر واکنش برای یکی از چهار باز اجرا شده و طی آن یک شکاف در DNA نزدیک به G، A، هر پیریمیدین (T یا C) و C ایجاد می‌شود.

روش تجزیهٔ شیمیایی ماکسام و گیلبرت

این روش را ماکسام و گیلبرت از دانشگاه هاروارد ارائه کردند. در این روش، معرف‌های شیمیایی برای تخریب بازهای نوکلئوتیدی خاص استفاده می‌شوند و مولکولDNA را در جایگاه‌های ویژه می‌شکنند. این مراحل عبارتند از:

۱) مولکول‌های DNA با افزودن ^{32}P-dATP به یک انتها نشاندار می‌شوند؛

۲) دو رشتهٔ DNA از هم جدا می‌شوند تا رشته‌های مکمل منفرد به‌دست آید؛

۳) هر رشتهٔ DNA منفرد مکمل که از انتها نشاندار شده است، با چهار معرف شیمیایی مختلف که رشته‌ها را در یک انتها یا در دو نوکلئوتید ویژه می‌شکنند، تیمار می‌شوند. این شکاف در C، G+A، C+T یا T رخ می‌دهد؛

۴) هضم حاصل از چهار ترکیب واکنش، به‌طور جداگانه و همزمان الکتروفورز می‌شوند تا قطعات برحسب اندازه تفکیک شوند. کوتاه‌ترین قطعات، قطعاتی هستند که سریع‌ترین حرکت را دارند و دورتر قرار می‌گیرند؛

۵) هر رشتهٔ مکمل مستقل توالی‌یابی شده و سپس توالی‌ها برای تأیید مقایسه می‌شوند؛

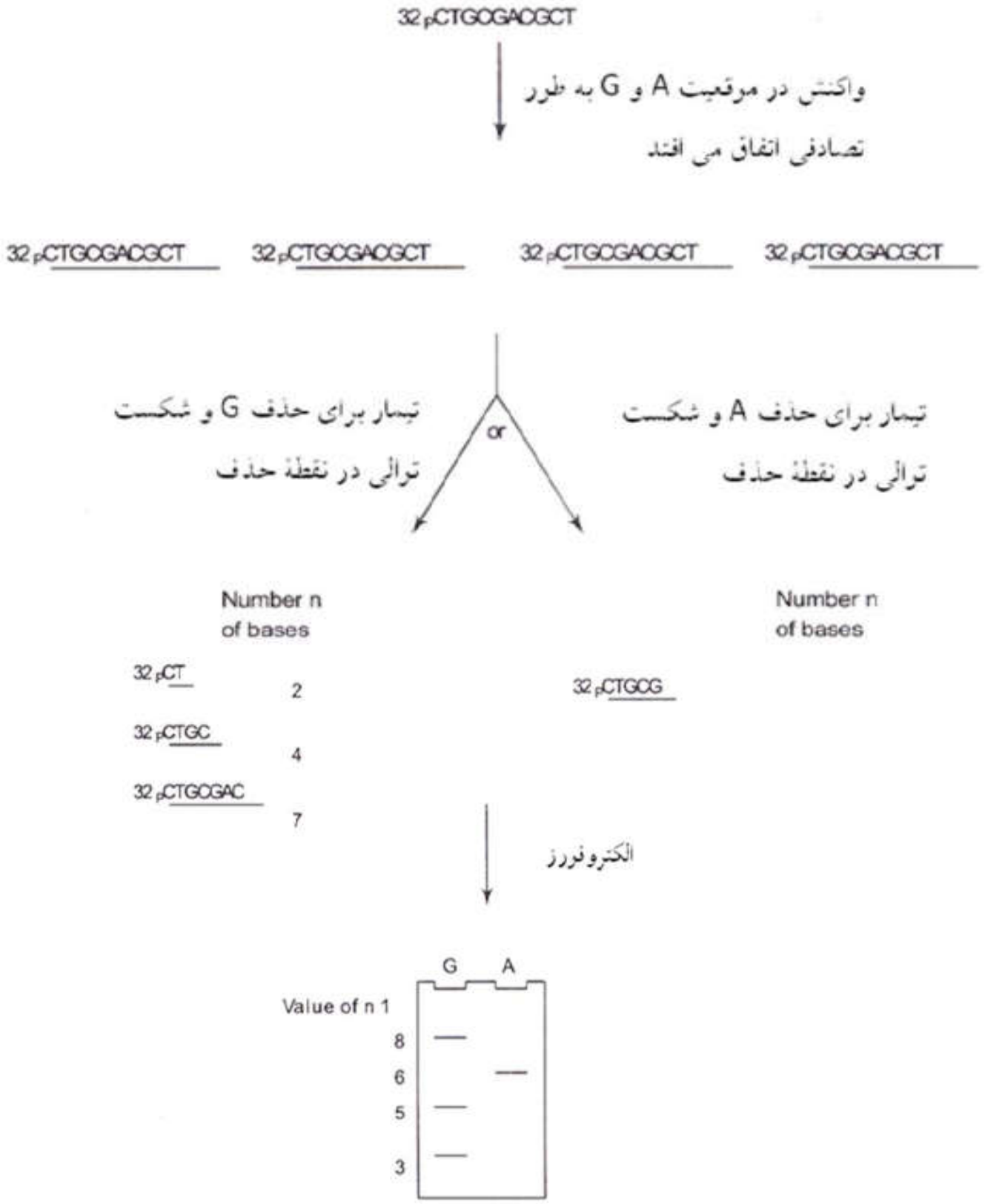
۶) می‌توان مکان باندها را با قراردادن یک اتورادیوگراف (واکنش‌دهنده به رادیواکتیویته) بر روی ژل تعیین کرد.

روش توالی‌یابی یک قطعه DNA در شکل ۱۶-۲ مشاهده می‌شود.

موقعیت A و G در رشتهٔ منفرد بر اساس قوانین زیر تعریف می‌شود:

۱) اگر یک قطعه حامل n نوکلئوتید از طریق یک تیمار شیمیایی که سبب شکاف در جایگاه یک باز خاص می‌شود، ایجاد شود، آن باز در موقعیت n+1 رشتهٔ DNA (موقعیتی که از انتهای ´۵ شمارش شود) قرار دارد؛

۲) اگر یک باند حامل n نوکلئوتید در A، G، C یا فقط در C + T باشد، A، G، C یا T به ترتیب در موقعیت n+1 در مولکول اولیه قرار دارند.



شکل ۱۶-۲- تعیین موقعیت G و A در یک قطعهٔ DNA حاوی ده باز. مقدار n+1 برای هر چهار نوع باز، با توجه به موقعیت هر چهار باند بر روی ژل که حاوی نمونه‌های A,C,G و C+T است تعیین می‌شود.

روش مصنوعی دی داکسی نوکلئوتید سنگر

این تکنیک را فردریک سنگر و ا. آر. کولسان[1] از اعضای شورای تحقیقات پزشکی کمبریج پیشنهاد کردند. در این روش، یک آنزیم پلیمراز برای ادغام داکسی ریبونوکلئوزیدهای تری‌فسفات (dNTP) مکمل زنجیرهٔ DNA به‌کار گرفته‌شده و از دی داکسی ریبونوکلئوزیدهای تری‌فسفات (ddNTP) برای خاتمه زنجیره DNA استفاده می‌شود، زیرا ddNTP قادر به تشکیل پیوند فسفودی‌استری با dNTP بعدی نیست. چهار dNTPs (dATP، dGTP، dCTP و dTTP) و چهار ddNTPs (ddATP، ddGTP، ddCTP و ddTTP) وجود دارد. مراحل اصلی این روش عبارتند از:

۱) برش DNA با آنزیم برشی و ایجاد قطعات DNA مختلف با طول تقریبی ۵۰۰ جفت باز؛

۲) واسرشته‌سازی قطعات DNA (از طریق گرم و سرد کردن یا تیمار قلیایی)؛

۳) تقسیم DNA به چهار گروه در لوله‌های جداگانه؛

۴) یک الیگونوکلئوتید نشاندار رادیواکتیو (به‌عنوان آغازگر) که مکمل با انتهای ´۳ DNA تک‌رشته‌ای است و همچنین آنزیم DNA پلیمراز، هر چهار نوع dNTPs و مقدار کمی از ddATP به لولهٔ اول، ddGTP به لولهٔ دوم، ddCTP به لولهٔ سوم، ddTTP به لولهٔ چهارم اضافه می‌شوند. (به ترتیب سبب خاتمهٔ زنجیره در بازهای خاص می‌شود (A, G, C, T)).

۵) انکوباسیون مخلوط واکنش در شرایط مناسب انجام می‌گیرد. الیگونوکلئوتید نشاندار به انتهای ´۳ DNA تک رشته اتصال می‌یابد و به‌عنوان یک آغازگر برای افزودن dNTPs به زنجیره در حال ساخت به‌کار می‌رود. زمانی که ddNTP به مکان dNTP طبیعی اتصال می‌یابد، زنجیره خاتمه می‌یابد. در نتیجه، قطعات ناقص DNA نشاندار با طول‌های مختلف ایجاد می‌شود.

۶) بارگذاری چهار مخلوط واکنش در چاهک‌های جداگانه بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید؛

۷) ژل برای اتورادیوگرافی و مشاهدهٔ باند استفاده می‌شود و بر اساس موقعیت باندها، می‌توان به توالی قطعه DNA پی برد.

۱۰-۲- شناسایی ژن و ترسیم نقشه

چندشکلی طولی قطعات برشی(RFLP)[1]، DNA چندشکلی تکثیر شده تصادفی(RAPD)[2] و تکنیک‌های انگشت‌نگاری DNA به‌طور گسترده‌ای در ترسیم نقشه ژن و شناسایی سیستم‌های مختلف استفاده می‌شوند. RFLPها به‌طور اختصاصی، کارایی نقشه‌یابی مکان‌های صفات کمی (QTL)[3] را افزایش داده‌اند. فناوری‌های جدید نظیر ریبوزیم‌ها[4] و نشانمندکردن ژن[5] برای همسانه‌سازی امیدوارکننده‌اند. واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ابزار کاربردی زیست شناسی، کشاورزی و پزشکی است و ممکن است با روشی جدید به نام واکنش زنجیره‌ای لیگازی (LCR)´ جایگزین شود. آنالیزهای نشانگرهای مولکولی، تشخیص، ترسیم نقشهٔ ژن و شناسایی، گواهی و حفظ حق ثبت فراورده‌ها را امکان‌پذیر می‌کند.

۱-۱۰-۲- چندشکلی طولی قطعه برشی

استفاده از قطعات همسانه‌سازی‌شده DNA کروموزومی به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی معمولاً به RFLP معروف است. این تکنیک به تنوع طبیعی توالی بازی DNA و هضم DNA با آنزیم برشی وابسته است. قطعات برشی همولوگ DNA که در اندازه، یا طول با هم فرق دارند، به عنوان نشانگرهای ژنتیکی به منظور پیگیری قطعات کروموزومی در تلاقی‌های ژنتیکی استفاده می‌شوند. با استفاده از این تکنیک، نقشه‌های لینکاژی RFLP تهیه می‌شوند. این نقشه‌ها و نشانگرهای مولکولی، یک روش مستقیم در انتخاب ژن‌های مطلوب نظیر مقاومت به بیماری، تأیید واریته و... را در دسترس قرار می‌دهند. اشباع بسیار زیاد نشانگرهای RFLP در مجاورت ژن‌های هدف از طریق لاین‌های تقریباً ایزوژنیک تحقق می‌یابد. مزیت اساسی این تکنیک این است که پیوستگی یک کاوشگر با یک ژن را تنها از طریق مقایسه الگوهای RFLP والد دهنده، والد برگشتی و یک یا چند لاین ایزوژنیک صفت هدف می‌توان تشخیص داد.

تنوع پیوسته اکثر صفات نتیجهٔ آن است که صفات کمّی از تفکیک ژن‌های متعددی که تحت تاثیر محیط قرار می‌گیرند، ایجاد می‌شوند. چون توارث یک ژنوم کامل را نمی‌توان با نشانگرهای ژنتیکی بررسی کرد، لینکاژ و نقشه‌یابی دقیق مکان‌های صفات کمّی امکان‌پذیر نبود. استفاده از RFLPها، کارایی نقشه‌یابی مکان‌های صفات کمّی را افزایش داد، زیرا این حالت نسبت به نشانگرهایی نظیر ایزوزیم‌ها[1] یا نشانگرهای مورفولوژیکی، نشانگر بیشتری برای نمره‌دهی در یک جمعیت دارد. همچنین به این ترتیب، بررسی تاثیر محیط بر بیان مکان‌های ژنی ویژهٔ موثر در یک صفت پیچیده و تعیین کارایی اثر متقابل محیط-ژنوتیپ امکان‌پذیر شد. در کشاورزی، تجزیه و تحلیل مکان‌های صفات کمّی (از جمله مقاومت به بیماری‌ها و آفات، تحمل خشکی، سرما و سایر شرایط منفی و استفاده کارا از ذخایر و کیفیت غذایی)، به تعیین مکان صفات کمّی مفید نهفته در گونه‌های وحشی کمک می‌کند.

۲-۱۰-۲- DNA چندشکل تکثیرشدهٔ تصادفی

پیچیدگی تکنیکی آنالیز RFLP و استفادهٔ گسترده از رادیوایزوتوپ‌هایی با نیمه‌عمر کوتاه، مناسب بودن استفادهٔ رایج از RFLP را در مقیاس وسیع مورد تردید قرار می‌دهد. ویلیامز و همکاران (۱۹۹۰) یک آزمون چندشکلی DNA جدید مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ارائه کردند که در آن از تکثیر قطعات تصادفی تکثیرشده با آغازگرهای اختیاری استفاده می‌شود. این نوع نشانگرها RAPD نام دارند. روش RAPD به لحاظ تکنیکی ساده و سریع است، به مقادیر کم DNA نیاز دارد، از هیچ ماده رادیواکتیوی استفاده نمی‌شود و برای استفاده در سیستم‌هایی با مقدار نمونهٔ زیاد که برای اصلاح، ژنتیک جمعیت و تنوع زیستی مورد نیاز است، بسیار مناسب است.

در تکنیک RAPD از آغازگرهایی با توالی‌های نوکلئوتیدی اختیاری (توالی‌های حدود ۱۰ نوکلئوتیدی) استفاده می‌شود. RAPD تکثیر توالی‌های DNA در سراسر ژنوم را امکان‌پذیر می‌کند. الگوهای باندی در قطعات تکثیری، چندشکلی را نشان می‌دهند و به انگشت‌نگاری ژنتیکی افراد درون یک جمعیت یا یک گونه کمک می‌کنند. همچنین این تکنیک به تشخیص موجودات زنده‌ای که ویژگی‌های بیوشیمیایی مشابهی دارند، کمک می‌کند.

توالی‌های تکراری ساده[۲]

توالی‌های تکراری ساده(SSR) یا ریزماهواره‌ها[۳]، تکرارهای پشت سر هم به‌طول ۶-۱ نوکلئوتید هستند که در سراسر ژنوم اکثر موجودات پراکنده‌اند. توالی‌های تکراری سادهٔ داخلی(ISSR)[۴] حاصل تکرارهای سادهٔ دو یا سه نوکلئوتیدی هستند که ۱ تا ۳ نوکلئوتید به ´۵ یا ´۳ نوکلئوتیدها متصل هستند. قرارگیری آغازگرها بر روی رشته‌های مقابل مولکول DNA الگو وقتی مشاهده می‌شود که آنها در یک فاصلهٔ قابل تکثیر سبب تولید فراورده‌های مجزا شوند. نشانگرهای SSR و ISSR به‌وسیلهٔ واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز تک‌آغازگر و مشابه روش RAPD ایجاد می‌شوند. هرچند، نشانگرهایSSR و ISSR نسبت به RAPD چندشکلی بیشتری نشان می‌دهند و تکرارپذیری بیشتری دارند.

۳-۱۰-۲- آنالیز انگشت‌نگاری DNA

در DNA ژنومی گونه‌های مختلف، توالی‌های DNA ماهوارک‌ها[1] و ریزماهواره‌ها کشف شده‌اند که جایگاه‌های متعددی متشکل از تکرارهای پشت سر هم یک توالی نوکلئوتیدی کوتاه (۶۰-۱۰ جفت بازی) را نشان می‌دهند. آنالیز این توالی‌ها سطح بسیار بالایی از چندشکلی را نشان می‌دهد. این رخداد مربوط به تکرارهای ردیفی است که احتمالاً از تبادل میتوزی یا میوزی نامتعادل یا به‌واسطهٔ لغزش DNA در خلال عملیات تکثیر ایجاد می‌شود. بنابراین در یک مکان مشخص، وجود آلل‌های زیادی بر اساس تفاوت در تعداد تکرارها ممکن است. کاوشگرهایی شناخته شده‌اند که به‌طور همزمان با قطعات چند جایگاه متغیر هیبرید می‌شوند و یک اتورادیوگراف پیچیده به‌نام انگشت‌نگاری DNA را تولید می‌کنند. این قطعات توارث مندلی دارند و بنابراین تکنیک مناسبی برای تجزیه و تحلیل ژنتیکی هستند. انگشت‌نگاری‌های DNA در مطالعات تنوع ژنتیکی، مطالعات اکولوژیکی و قانونی، برنامه‌های اصلاحی و ژنتیک جمعیت و در آنالیز و شناسایی ژنوم و شناسایی واریته، بسیار اختصاصی و کاربردی هستند.

انگشت‌نگاری DNA به‌طور گسترده در شناسایی قربانیان قتل، تصادف و... ، در تأیید مجرمان موارد تجاوز به عنف، قتل و... و تعیین والدین کودکان استفاده می‌شود.

۴-۱۰-۲- واکنش زنجیره‌ای لیگاز

واکنش زنجیره‌ای لیگاز نسخه‌ای از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) است. این واکنش موثرتر از PCR بوده و برای تشخیص دو فرد که در جایگزینی یک جفت باز فرق دارند، مفید است.

۵-۱۰-۲- ریبوزیم‌ها

ریبوزیم‌ها مولکول‌های RNA هستند که به عنوان آنزیم عمل می‌کنند و در کاتالیز درون‌سلولی (مانند خودبرش[2] یا خودپردازش[3]) حضور دارند. ریبوزیم‌ها دو نوع دارند که قادرند RNA را به‌صورت اختصاصی برش بزنند. در اولین نوع، واکنش خودپردازش برای حذف اینترون از RNA اولیهٔ ریبوزومی صورت می‌گیرد. این ریبوزیم‌ها یک توالی شناسایی چهار جفت بازی دارند و برای برش‌های خاص RNA در شرایط مصنوعی

سودمندند. نوع دوم ریبوزیم‌ها به واکنش‌های خودبرش که در خلال تکثیر برخی از ویروئیدها و RNAهای ماهواره‌ای رخ می‌دهند، مرتبط است.

۱۱-۲- تجزیه‌وتحلیل تلفیق و بیان ژن‌های همسانه‌سازی‌شده

ادغام ژن‌های همسانه‌سازی‌شده با آنالیز سادرن بلات قابل بررسی است و موقعیت ژن با استفاده از هیبریداسیون در محل[1] تعیین می‌شود. بیان یک ژن با استفاده از نوردرن بلات تجزیه‌وتحلیل می‌شود.

۱-۱۱-۲- سادرن بلات

در این روش که ای. ام. سادرن[2] آن را ارائه کرده است، از هیبریداسیون قطعات DNA مکمل برای شناسایی DNA خارجی ادغام‌شده استفاده می‌شود. DNA کل تخلیصی موجود، با آنزیم برشی هضم و قطعات DNA دورشته‌ای حاصل (dsDNA) بر اساس وزن مولکولی از طریق الکتروفورز ژل آگارز تفکیک می‌شوند. برای ایجاد قطعات DNA تک‌رشته، dsDNA به کمک محلول قلیایی واسرشته شده و سپس به یک کاغذ نیتروسلولزی انتقال می‌یابد و پس از تثبیت با قطعات همسانه‌سازی‌شدهٔ نشاندار رادیواکتیو(کاوشگر) انکوبه می‌شود. برای مثال، کاوشگر با ^{32}P نشاندار می‌شود. کاوشگرها به‌طور اختصاصی به cDNA موجود بر روی فیلتر اتصال می‌یابند و بر روی یک اتورادیوگراف آشکار می‌شوند. از کاوشگرهای غیررادیواکتیو نیز می‌توان استفاده کرد.

۲-۱۱-۲- آنالیز نوردرن بلات

این روش برای شناسایی RNAهایی که از طریق ژل الکتروفورز تفکیک شده‌اند، به‌کار می‌رود و شامل آنالیز mRNA رونویسی شده است. mRNA به غشای نیتروسلولزی انتقال یافته و هیبرید می‌شود. DNA نشاندار به مواد رادیواکتیو، فقط با RNA رونویسی‌شده هیبرید خواهد شد.

۳-۱۱-۲ آنالیز وسترن بلاتینگ

از این تکنیک برای شناسایی پروتئین‌های خاص استفاده می‌شود. زمانی که یک ژن انتقالی در سلول‌های تغییرشکل‌یافته بیان می‌شود، فراوردهٔ ترجمه‌شده در قالب پروتئین با این تکنیک شناسایی می‌شود. پروتئین‌های مورد بررسی تحت الکتروفورز قرار می‌گیرند و به غشای نیتروسلولزی منتقل می‌شوند. این غشا با آنتی‌بادی نشاندار اختصاصی برای اتصال با پروتئین کاوش می‌شود. با استفاده از اتورادیوگراف، اتصال رؤیت می‌شود. این تکنیک به ایمیونوبلاتینگ[3] نیز معروف است.

۲-۱۱-۴- آنالیز دات بلات

در دات بلات، DNA همسانه‌سازی‌شده یا خالص بر روی یک غشا نیتروسلولزی در مجاورت یکدیگر به‌صورت نقاطی لکه‌گذاری می‌شود. DNA، تثبیت شده و برای تشکیل رشته‌های منفرد واسرشته می‌شود. این DNA با یک کاوشگر هیبرید شده و سیگنال‌ها از طریق اتورادیوگرافی شناسایی می‌شوند.

۲-۱۱-۵- هیبریداسیون در محل

می‌توان موقعیت یک ژن خاص بر روی نقشه سیتولوژیکی موجود را با هیبریداسیون در محل مستقیما تعیین کرد. یک کاوشگر رادیواکتیو به‌عنوان نمایشگر یک ژن(یک کلون cDNA نشاندار حاصل از mRNA) با DNA واسرشته‌شدهٔ کروموزوم‌های پلی‌تن در مکان خود هیبرید می‌شود. از طریق اتورادیوگرافی موقعیت(های) ژن‌های متناظر شناسایی می‌شود. هیبریداسیون فلورسنتی در محل (FISH)[1] در شناسایی توالی‌های منحصر به‌فرد با طول متغیر، نواحی کروموزومی یا کل کروموزوم‌های درون سلول‌های متافازی یا اینترفازی، نقشه‌یابی سریع و مرتب کردن قطعات DNA بر روی باندهای کروموزومی متافازی بسیار مؤثر است. از تغییرات این روش، هیبریداسیون در محل ژنومی (GISH)[2] است که برای شناسایی کروماتین بیگانه در گسترهٔ کروموزومی استفاده می‌شود.

۲-۱۲- تکثیر و غربالگری ژن

۲-۱۲-۱- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) روشی آزمایشگاهی برای تکثیر DNA است به‌طوری‌که مقدار DNA هدف به‌طور تصاعدی افزایش می‌یابد. حتی یک کپی از ژن به‌وسیلهٔ PCR طی چند ساعت به یک میلیون کپی تکثیر می‌شود. PCR متشکل از چرخه‌های تکراری واسرشته‌سازی DNA از طریق افزایش درجهٔ حرارت (برای تبدیل DNA دورشته‌ای به DNA تک‌رشته‌ای)، اتصال آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی به DNA هدف و بسط DNA از طریق افزودن نوکلئوتید به آغازگرها به‌واسطهٔ عمل DNA است. ناحیهٔ هدف با آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی منحصربه‌فرد که مجاور یک قطعهٔ DNA هستند، تعریف می‌شود. آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی برای هیبرید شدن

با نواحی DNA که مجاور توالی هدف هستند و با رشته‌های مکمل توالی هدف اتصال می‌یابند، طراحی می‌شوند. سپس آغازگرها در طول توالی هدف با استفاده از یک DNA پلیمراز مقاوم به حرارت در حضور داکسی نوکلئوزید تری‌فسفات (dNTPs) آزاد بسط می‌یابند و به تکثیر دو برابری مادهٔ اولیه منجر می‌شوند. با تکرار فرآیند سه مرحله‌ای مذکور، افزایش تقریبا تصاعدی در مقدار DNA هدف حاصل می‌شود. فراوردهٔ هر چرخه PCR مکمل و دارای قابلیت اتصال با آغازگرهاست و از این‌رو مقدار DNA در هر چرخه دوبرابر می‌شود.

چنانچه فراورده‌های PCR با رنگ‌های فلورسنتی نشاندار شوند به ترسیم نقشهٔ ژن مورد بررسی کمک خواهند کرد. این کار از طریق سنتز آغازگر برای هر مکان ژنی با استفاده از درج مادهٔ فلورسنت در انتهای ´۵ آغازگر جدید، انجام می‌گیرد. تعداد زیادی رنگ PCR وجود دارد: (آبی)FAM ، (سبز)VIC، (زرد) NED، (قرمز) PET و (نارنجی) LIZ.

پیشرفت یک واکنش PCR در Real Time PCR (RT-PCR) مشاهده می‌شود. حتی مقادیر خیلی کم فراورده‌های PCR را می‌توان شمارش کرد. RT-PCR بر اساس تشخیص فلورسانسی حاصل از مولکول گزارشگر است که همراه با پیشرفت واکنش، افزایش می‌یابد. مولکول‌های گزارشگر فلورسنت رنگ‌هایی دارند که به DNA دورشته‌ای یا کاوشگرهای اختصاصی توالی اتصال می‌یابند.

DNA Taq پلیمراز

DNA Taq پلیمراز، پلیمراز DNA وابسته به DNA است که در برابر حرارت پایدار است. این پلیمراز اولین بار از باکتری بسیار گرمادوست *Thermus aquaticus* به‌دست آمده است و هم‌اکنون به‌صورت مهندسی‌شده در دسترس است. این آنزیم‌ها فعالیت اگزونوکلئازی وابسته به پلیمریزاسیون ´۳ → ´۵ دارند. این آنزیم بسته به توالی هدف در ۸۰-۷۵ درجهٔ سانتی‌گراد بهترین عملکرد را دارد. این آنزیم از DNA ژنومی یا cDNA تک رشته به عنوان الگوی اولیه استفاده کرده و آن را $۱۰^{۶}$ برابر تکثیر می‌کند. این آنزیم در ترسیم نقشه و توالی‌یابی جهش‌های DNA ژنومی یا mRNA همسانه‌سازی‌نشده و برای همسانه‌سازی توالی‌های DNA ژنومی یا mRNA هدف بسیار سودمند است. DNA Taq پلیمرازهای متعددی جداسازی شده‌اند.

سه پلیمراز بسیار کاربردی:

پلیمراز	فعالیت اگزونوکلئازی ´۳ → ´۵	منبع
Taq	خیر	*Thermus aquaticus*
Pfu	بله	*Pyrococcus furiosus*
Vent	بله	*Thermus litoralis*

کاربردها

PCR روش به نسبت ساده‌ای برای همسانه‌سازی ژن‌هاست. با تکثیر توالی‌های ژن، PCR مقادیر کافی از یک ژن هدف را برای افزایش احتمال همسانه‌سازی موفق تولید می‌کند. علاوه بر ایجاد مقادیر کافی از یک ژن برای همسانه‌سازی، PCR در ایجاد توالی‌های ژنی جدید با افزودن توالی‌های بیانی و ادغام یا حذف توالی‌ها در DNA برای همسانه‌سازی ژن استفاده می‌شود. حتی زمانی که اطلاعات توالی هدف محدود باشد یا بالقوه هیچ اطلاعاتی مشخص نباشد، می‌توان از PCR برای همسانه‌سازی ژن استفاده کرد. می‌توان فراورده‌های PCR را قبل از توالی‌یابی همسانه‌سازی کرد یا مستقیما آنها را توالی‌یابی کرد. از PCR برای جهش‌زایی هدایت‌شده[1] نیز استفاده می‌شود.

۲-۱۲-۲- تراشه‌های DNA و ریزآرایه‌ها

در اواسط دهۀ ۱۹۹۰ برای تسریع روند ایجاد اطلاعات توالی‌های DNA تراشه‌های DNA و ریزآرایه‌هایی که با نمونه‌های DNA بارگذاری می‌شوند، در دسترس قرار گرفتند. این ریزآرایه‌ها بر روی سطوح جامد (پلیت‌های شیشه‌ای، اسلایدها) آماده می‌شوند و ردیف‌های کوچکی با تراکم زیاد نمونه‌های مولکولی را ارائه می‌کنند که غربال نمونه‌های DNA ژنومی یا cDNA را برای یافتن یک در صدهزار یا حتی بیشتر در یک هیبریداسیون فراهم می‌کند. توالی‌های روی تراشه‌های DNA ممکن است الیگونوکلئوتیدهایی با توالی مشخص یا توالی‌های cDNA با کارکرد شناخته‌شده باشند. این ریزآرایه‌ها با یک نمونه DNA نشاندار ناشناخته هیبرید شده و الگوهای هیبریداسیون با کامپیوتر تجزیه و تحلیل می‌شوند. کاربردهای مهم آنها عبارتند از: ۱) توالی‌یابی DNA از طریق هیبریداسیون که به آشکارسازی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی منجر می‌شود، ۲) تشخیص و ترسیم نقشه ژنتیکی، ۳) بررسی‌های بیان ژن و ۴) پروتئومیکس.

۱۳-۲- تکنیک‌های ویژه

۱-۱۳-۲- مکان‌یابی ژن[1]

مکان‌یابی ژن از طریق جایگزینی دقیق یک ژن با DNA خارجی همولوگ آن از طریق نوترکیبی همولوگ[2] انجام می‌گیرد. به این ترتیب تبادل متقابل توالی‌های ژنتیکی بین دو مولکول DNA رخ می‌دهد. از طرفی، ممکن است این تبادل از پدیدهٔ تبدیل ژن که به انطباق توالی یک رشته بر رشتهٔ دیگر منجر می‌شود، حاصل شود. تبدیل ژن شامل کپی کردن موضعی اطلاعات ژنتیکی از یک رشته به رشته دیگر است و لزوماً با کراس‌اور[3] مرتبط نیست. سیستم غیرفعال‌سازی اختصاصی و هدفمند ژن، موجب خاموشی پایدار و توارث‌پذیر ژن همراه با تکرارپذیری بیشتر نسبت به سیستم‌های مرسوم نظیر آنتی‌سنس[4] و بازدارندگی توأم[5] می‌شود.

غیرفعال کردن ژن‌های هدف به روش کارا، نیاز به جمعیت‌های بزرگ گیاهان غیرفعال برای ارزیابی کارکرد ژن را برطرف خواهد کرد. همچنین تغییر هدفمند توالی‌های ژن، مهندسی پروتئین در شرایط طبیعی را به واقعیت تبدیل کرده و به‌خصوص مهندسی تنوع‌های جدید ژنتیکی را پیش‌بینی‌پذیر و هدایت‌شده خواهد کرد. از سوی دیگر مکان‌یابی ژن، جایگزینی و تبادل آسان ژن‌ها و پروموترها را در ژنوم میسر خواهد کرد. ژن جدید می‌تواند در مجاور پروموتری قرار گیرد که یک الگوی بیان مطلوب را در زمینهٔ نرمال کروموزومی ایجاد کند و به سطوح و الگوهای بیانی پیش‌بینی‌پذیری از ژن منجر شود. این مسئله، تغییرات تاریخی مرسوم را منسوخ خواهد کرد، زیرا تکنیک‌های رایج به تلفیق تصادفی در ژنوم و تنوع گستردهٔ ناشی از تأثیر محل[6]، در سطح بیان ژن انتقال یافته منجر می‌شود.

۲-۱۳-۲- تکنیک RNA آنتی‌سنس

فرضیهٔ اساسی زیست‌شناسی مولکولی شامل جریان اطلاعات ژنتیکی از DNA به پروتئین با واسطهٔ mRNA است که با کمک رونویسی و ترجمه انجام می‌گیرد. در DNA دورشته‌ای، رشته‌ای که ژن را کد می‌کند، رشتهٔ سنس نام دارد که مکمل mRNA است. جریان اطلاعات ژنتیکی از DNA به mRNA و پروتئین را می‌توان با ورود توالی RNA که آنتی‌سنس mRNA هدف است، متوقف کرد. RNA آنتی‌سنس یک توالی ژنی خاص، از طریق معکوس کردن توالی کدکنندهٔ آن ژن تحت کنترل پروموتر در جهت طبیعی ایجاد می‌شود. مهار ژن‌های خاص با ورود RNA آنتی‌سنس یا الیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنسRNA در سلول امکان‌پذیر است.

۳-۱۳-۲- سازه‌های ریبوزیمی

ریبوزیم‌ها مولکول‌های RNA کاتالیتیک هستند که واکنش‌های برش و اتصال اختصاصی را انجام می‌دهند. انتقال مراکز کاتالیتیکی ریبوزیمی به RNA آنتی‌سنس موجب می‌شود ریبوزیم مولکول‌های mRNA خاصی را هدف قرار می‌دهند و آنها را تجزیه می‌کنند.

۴-۱۳-۲- بازدارندگی توأم

بازدارندگی توأم به قابلیت یک ترانسژن سنس در مهار بیان یک ژن درون‌زاد[۲] همولوگ اشاره دارد. تلفیق کپی‌های متعدد از ترانسژن به بازدارندگی برخی از ترانسژن‌ها یا همهٔ آنها و بازدارندگی همزمان ژن‌های درون‌زاد همولوگ منجر می‌شود. بازدارندگی توأم شامل خاموشی در سطوح رونویسی یا پس از رونویسی می‌شود.

۵-۱۳-۲- خاموشی ترانسژن

خاموشی ترانسژن پدیدهٔ پیچیده‌ای است که در تمام یوکاریوت‌ها رخ می‌دهد. این پدیده با ورود اسیدنوکلئیک خارجی به درون سلول ایجاد می‌شود. معمولا بیان ترانسژن تحت تأثیر کاهش یا افزایش متیلاسیون در مکان ترانسژن از بین می‌رود. خاموشی وابسته به مکان[۳]، خاموشی وابسته به توالی[۴] و خاموشی وابسته به همولوژی[۵] در سطوح رونویسی یا پس از رونویسی گزارش شده‌است. خاموشی ژن ممکن است مکانیسمی دفاعی علیه اسیدهای نوکلئیک مهاجم باشد.

۶-۱۳-۲- تداخل RNA[۶]

تداخل RNA (RNAi) ابزار مفیدی در خاموشی ژن است. زمانی که RNA آنتی‌سنس و سنس، همزمان به یک موجود زنده انتقال یابند، اثر بازدارندگی شدید و اختصاصی مشاهده می‌شود.

۷-۱۳-۲- جهش‌زایی تلفیقی

اگر عناصر متحرک با فراوانی کافی جابه‌جا شوند، می‌توانند برای مختل کردن ژن‌های فعال و ایجاد موتانت‌های تلفیقی استفاده شوند. DNA خارجی وارد شده به یک سلول ممکن است به‌طور اتفاقی در ژن موجود قرار گیرد و بیان آن را مختل کند.

۸-۱۳-۲- نشانمندسازی ژن

زمانی که جهش‌زایی تلفیقی رخ می‌دهد، مکان ژنی از هم گسسته شده و با یک توالی منحصربه‌فرد نشانمند می‌شود. این تکنیک در شناسایی ژن مختل سودمند است. از آنالیز مبتنی بر PCR می‌توان برای تکثیر مستقیم DNA ژنومی مجاور یک ترانسژن نشانمند استفاده کرد.