

همایش ملی مطالعات و پژوهش های علمی علوم انسانی

نهاد برگزار کننده همایش: موسسه قانون یار با حمایت معنوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه
سردبیر علمی و مسئول برگزاری همایش: دکتر بهنام اسدی
شماره مجوز: ۴۸۵۳-۷۸۸۶۴
سال برگزاری همایش: ۱۳۹۷
شماره مقاله: ۸۳۵/۹۴۸
رده بندی کنگره: ج ۵۰۳/۲

تحلیل و شناخت مبنای تکنیک های ژنتیک در عصر نوین

فاطمه رسولی نژاد^۱

فاطمه میرزایی چهارراهی

چکیده

تکنیکهای فنی ژنتیکی بعد از شناسایی کامل DNA از سال ۱۹۵۳ آغاز شد بعد با کشف حکم مرکزی در سال ۱۹۵۸ توسط فرانسیس کریک اتفاق افتاد. ژنتیک وارد مسیری تازه شد که هدف آن درک پنج الگوی رفتاری سلولی رشد تقسیم تمایز، حرکت و میانکشی است. میزان پیشرفت در این زمینه باعث بهت و حیرت و حتی خویش بین ترین دانشمندان باشد بطور روزانه کشفیات بدست آمده از آزمایشگاههای تحقیقاتی خبر از شناسایی ژن های جدید عامل بیماری ها یا محصولات بیوتکنولوژی نوید بخش می دهند اکثر کشفیات مهم ژنتیکی با استفاده از ساده ترین موجودات (ویرو ها ، باکتری ها) بدست آمده اند اگر چه امروزه یافته های جدید در مورد گیاهان و پستانداران نیز ارائه شده است.

واژگان کلیدی: ژنتیک، DNA، بیوتکنولوژی، سلول، بیماری ژنتیکی

بخش اول: بررسی ساختار DNA

ساختار DNA پلی است که از تعداد زیادی نوکلئوتید ساخته شده فرق نوکلئوتید ها در بازنیتروزن داراست دانشمندی به نام Charaff با امکانات ساده مقدار G,A . C,T را در موجودات مختلف استخراج کرد و مقدار نسبی آن را حساب کرد و نتایجی گرفت. دیدار

$$\frac{G+A}{C+T} = 1 \quad \frac{G}{C} = 1, \frac{A}{T} = 1$$

همه DNA های دو رشته ای و همواره است.

خانم فرانکلین و ویل کین DNA را استخراج کرده و از طریق اشعه X متوجه شدند DNA دو رشته ای است اما سرانجام Watson و crick در سال ۱۹۵۳ مدل DNA را ارائه دادند و گفتند که مولکول DNA مولکولی دو رشته ای است و مارپیچ Doule Helix علت مارپیچ DNA است و جفت نوکلئوتید ها با هم زاویه دارند.

اندازه زاویه هر جفت را ۳۶ محاسبه کردند و اثبات کردند که در هر ۱۰ نوکلئوتید وجود دارد طول هر DNA A ۳۴ درجه هر چفت باز ۰,۳۴nm در نتیجه زاویه های ویچ ها دارای شیار بزرگ و کوچک است به آن قسمتی از DNA است که اگر ازیرون به آن بنگریم جفت نوکلئوتیدها را می بینیم این شیارها محل اتصال هستند این شیار به وسیله پروتئین هایی به آنها متصلند نقش مهمی در میان ژن ها دارند.

بند اول: علت ایجاد شیار

نیروهای موجود در DNA از نوع هیدروژنی ، هیدروفوب DNA به فرمهای B,Z,A وجود دارد. فرم A در سلول وجود ندارد و از آبدگیری DNA-B بدست می آیند در یک DNA-A در هر دور بجای ۱۰ تانوکلئوتید وجود دارد و قطری بجای ۲۳-۲۰A درجه است مثل DNA-B راست گرد زاویه حدود ۳۴ است در اینجا هم شیار بزرگ و کوچک

وجود دارد. ما در سلول هیرید DNA-RNA را مشابه DNA-A داریم. فرم DNA-B همان فرم است که واتسون و کریک شرح دادند و فرم شایع DNA در سلول است اما فرم ۲ در مناطقی از DNA تشکیل می شود که G-C فراوان دارند خیلی باریک است قطر ۱۸ Å است و در هر دو جفت نوکلئوتید دارند و تنها DNA چپ گرد است و فقط شیار کوچک دارد و طرف دیگر صاف است در طول هر دو ۴۵ Å است. فرم های D, E, C هم فقط در شرایط آزمایشگاه ساخته شده اند.

DNA بصورت حلقوی - خطی تک رشته ای و دو رشته ای مارپیچ وجود دارد. رشته الگوی آن Coding نام دارد و رشته دیگر Non coding نام دارد. وقتی در DNA تعداد دورها با تعداد دفعات که یک رشته DNA و RNA دیگر را قطع می کند مساوی باشد یعنی در حقیقت DNA بر روی DNA باشد نه رشته بر روی رشته حالت supyeoil داریم حالت چپ گرد سوپرکویل به فرم فعال DNA نزدیک است در تکنیک های جدیدی از آنزیم های توپوایز که در تبدیل حالات سوپر کویل از چپ به راست یا حالت خنثی استفاده می کنند. فشرده کردن DNA در فضاهای کوچکتر از خود DNA بسته بندی DNA می گویند که در یوکاریوتها اهمیت بیشتری دارد. در این کار بوسیله پروتین هایی انجام می شود. پروتین های هیستون که شدیداً قلیایی هستند (لیزین و آرژنین زیاد دارند) در این کار نقش عمده ای دارند این پروتین ها شامل $H_1, H_2, H_3, H_4, H_5, H_6, H_7, H_8, H_9, H_{10}, H_{11}, H_{12}, H_{13}, H_{14}, H_{15}, H_{16}, H_{17}, H_{18}, H_{19}, H_{20}, H_{21}, H_{22}, H_{23}, H_{24}, H_{25}, H_{26}, H_{27}, H_{28}, H_{29}, H_{30}, H_{31}, H_{32}, H_{33}, H_{34}, H_{35}, H_{36}, H_{37}, H_{38}, H_{39}, H_{40}, H_{41}, H_{42}, H_{43}, H_{44}, H_{45}, H_{46}, H_{47}, H_{48}, H_{49}, H_{50}, H_{51}, H_{52}, H_{53}, H_{54}, H_{55}, H_{56}, H_{57}, H_{58}, H_{59}, H_{60}, H_{61}, H_{62}, H_{63}, H_{64}, H_{65}, H_{66}, H_{67}, H_{68}, H_{69}, H_{70}, H_{71}, H_{72}, H_{73}, H_{74}, H_{75}, H_{76}, H_{77}, H_{78}, H_{79}, H_{80}, H_{81}, H_{82}, H_{83}, H_{84}, H_{85}, H_{86}, H_{87}, H_{88}, H_{89}, H_{90}, H_{91}, H_{92}, H_{93}, H_{94}, H_{95}, H_{96}, H_{97}, H_{98}, H_{99}, H_{100}$ هستند مولکولهای حفظ شده در تمام گونه ها هستند که در مقابل موتاسیون ها از بین نرفته اند و این دلیل بر حساسیت کار آنها است و در نهایت کار بسته بندی DNA شکل کروموزوم بوجود می آید که در مرحله مستافاز بهترین فشرده گی دیده می شود. یا غلظت نمک کم ساختمانی دیده می شود که قطر آن ۱۰ nm است و شبیه گردن بند تسبیح مانند است و // که بین دانه های تسبیح قرار دارند را می توان DNA هضم کرد پی برد که اینکه

DNA است دانه ای روی گردنبند را نوکلئورد گویند که دارای پروتئین های هیستون است. در غلظت نمک بال گردنبند یک شکل پیچیده به نام سولئوئید به خود می گیرد که قطر آن ۳۰nm است و بعد از حالت سلنوتندی کروموزوم در نتیجه پیچش بیشتر رخ میدهد.

بند دوم: توالی های DNA

بیشتر توالی های DNA Noncoding هستند درصد کمی از ژنوم انسان بیان می شود که به آنها کودینگ می گویند و مابریخی از توالی هادر DNA اشاره می کنیم. این توالی ها تکراری و فعال هستند انواع متعددی از پروئن ها بوسیله فامیل های ژنی همولوگ که در سر تا سر ژنوم پراکنده شده اند که می شوند چنین فامیله ایی دارای چند ژن و یا تعداد بسیاری ژن هستند مثل آکتین ها (۵ تا ۳۰ ژن) کوآتین ها (بیش از ۲۰ ژن) و هستیرتما (۱۰۰ تا ۱۰۰۰ ژن) ژن های همولوگ متفاوت ممکن است وظایف نسبتاً متفاوتی داشته باشند بعضی از ژن های درون فامیل ممکن است فعال نباشند و لذا سبب ژن های کاذب رونویسی شده شود.

فامیل های در این ژنها بصورت رشته ای پشت سر هم قرار گرفته اند مثل سازمان دهنده هستک (No) امروزه مشخص شده که No بر روی کروموزم های x,y مکش میوه به ترتیب دارای ۱۵۰ تا ۲۵۰ نسخه پشت سر هم از ژنهای rRND می باشد. یا مثال دیگر tRNA

تلمورها، دارای رشته های پشت سر هم ساده ای از توالی های DNA هستند که RNA و یا محصول پروتئینی را که نمی کشند اما وظیفه معینی دارند مثلاً در تاژک تکراری از توالی TTGGGG در انسان تکراری از توالی TTAGGG وجود دارد. این توالی ها نسخه

های بیشتری در ژنوم نسبت به توالی های فعال هستند اندازه آن در ژنوم تعجب آور است
مثلا در انسان حدود ۲۰٪ از ژنوم انسان است و این توالی ها به سه دسته تقسیم می شوند.

۱- DNA سانترامری با تکرار زیاد:

هنگامیکه DNA ژنومی برای مدت طولانی در شیب کرید سدیم در سایر هویژ قرار می
گیرد DNA بصورت یک باند قابل رویت در می آید اما باندها ماهواره ای نیز مشاهده می
شوند که متمایز از باند اصلی DNA هستند چنین DNA هایی ماهواره ای را چندین تکرار
پشت سر هم از توالی های نوکلئوتیدی کوتاه هستند که اگر باز شوند طول آنها صدها کیلو
باز خواهد شد. هنگامیکه از چنین توالی های ساده ای DNA کاوشگر تهیه می شود برای
نشانه گذاری کروموزوم از آن استفاده می شود مشاهده می شود که حجم زیادی از
DNA ماهواره ای ناحیه هتروکروماتین قرار دارد که مجاور سانتی و مراست تعداد
واحد های تکراری یک یا چند تا است که معمولا طول آنها کمتر از ۱۰ بار است.

۲- VNTR : یک دسته بخصوص از تکرارهای پشت سر هم تعداد متغیری را در
مکانهای کروموزومی متفاوت در اعضای انفرادی یک گونه شان می دهد این نوع تکرار
را تکرار پشت سر هم با تعداد متغیر VNTR و بعضی اوقات DNA ماهوارک می گویند
این مکان ها در انسان توالی هایی یک تا پنج کیلو باز هستند که شامل تعداد متغیری از
واحد های تکراری با طول ۱۵ تا ۱۰۰ نوکلئید می باشد. روش هایی مخصوص توالی
VNTR است که در پزشکی قانونی کاربرد فراوان دارد. و از این نوع DNA برای تهیه
نشانگرهای مولکولی بمنظور نقشه یابی در ژنوم انسان و سایر موجودات استفاده می شود.

۳- توالی های جابجا شده:

بخش A زیادی از ژنوم یوکاریوتها دارای این توالی هستند که از طریق رونویسی خود در داخل ژنوم تکثیر شده اند و می توانند به محل های جدید حرکت کنند این عناصر را در مجموع توالی های جابجا شده گویند. (ترانس پوزون) بسیاری از ژنومها دارای چندین نسخه از چنین عناصری هستند و یا اینکه نگارشهای ناقصی از آنها در سراسر ژنوم پراکنده شده است. دسته دیگر توالی های جابجا شده رتردرانسپوزونها هستند که توالی DNA هایی هستند که از طریق آنزیم ترانس کریزاز معکوس خود را تکثیر می کنند. نوع دیگر مربوط به رتردوویروسهاست. از طریق نسخه برداری RNA آنها به DNA جابجا می شود و سپس به سراسر ژنوم معلق می شود. عناصر پرانده بینابینی پستانداران عناصری هستند غیر ویروسی و برگشتی، با طول یک تا ۵ کیلو باز تعداد ۲۰ هزار تا ۴۰ هزار آنها در ژنوم انسان وجود دارند توالی های Alu نیز دارای ناحیه هدف آنزیم برشی به اسم Alu ناقص و کامل می باشد این توالی ها بین ژن ها در درون اینترونها پراکنده شده و ۵ درصد از DNA انسان را تشکیل می دهند این توالی بطور کامل حدود ۲۰۰ نوکلئوید طول دارد، شباهت قابل ملاحظه ای از VSLRNA را احتمالا توالی های Alu بصورت نسخه های معکو از این مولکول ها RNA ناشی می شوند تکرارهای پراکنده کوتاه بنیابینی مثل ALU را SINES گویند. نمونه دیگری از این عناصر تکرارهای ژن های کاذب هستند که توسط فرآیند رونویسی معکوس به وجود آمده اند و شامل انتیرون نبینند. دسته نهایی DNA DNAی حد فاصل است که عبارت است از آنچه که بعد از شناسائی کلیه واحدها باقی می ماند اطلاعات چندانی درباره DNA حد فاصل وجود ندارد احتمالا تنها وظیفه این DNA فاصله دادن است وجود DNA های که وظیفه آنها معلوم نیست یکی از مجهولات پژوهشگران ژنتیک است عناصر تکراری که بیشتر DNA های غیر فعال را بوجود می آورند در معرض انتخاب طبیعی نیستند این DNA های غیر فعال را DNA خود خواه

گویند آنها نوعی از DNA هستند که فقط وجود دارند و فنوتیپ خاصی ندارند. کروموزوم ها را فقط در جریان تقسیم سلولی می توان مشاهده کرد اما استفاده از تکنیک های بخصوص می توان آنها را مشاهده کرد که بصورت رشته پیچیده در طول خود هستند و نظریه های متعددی پیرامون این رشته مطرح شده که ما به بیان مختصر آن می پردازیم. ۱- مدل چند رشته ای: بر طبق این مدل هر کروموزوم از چندین رشته ساخته شده است که از مولکول های پروتئین و DNA ساخته شده اند هر کروموزوم از دو کروماتید تشکیل شده هر کروماتید نیز از دو رشته گردنما ساخته شده بطور کلی در هر کروموزوم چهار کروموزوم نما وجود دارد.

مدل تک رشته ای: مدل تک رشته ای کروموزوم یک رشته مولکول DNA طویل، پیچیده همراه پروتئین هستیون می باشد برای توضیح این مدل تایلر در سال ۱۹۵۷ مدل هزار پا را مطرح کرد. بر طبق نظر وی یک اسکلت پروتئینی وجود دارد که از آن در رشته های پیچید DNA مثل پاهای هزار پا بیرون می آید ولی بعدا تایلر مدل خود را به مدل قریزر تغییر داد. در سال ۱۹۶۵ راپرامدلی به اسم مدل رشته های تا شده به نفع مدل تک رشته ای ارائه داد بر طبق این مدل هر کروموزوم شامل یک زنجیره طویل DNA است که اول در نوکلئوپروتئین پیچیده شده و سپس پیچ خورده، یک رشته با ضخامت ۲۵۰ تا ۳۰۰ آنگستروم را بوجود آورده و بعد این رقم رو به عقب تا خورد هجسم کروماتید را تشکیل می دهد. این مدل توسط فردریک ، لامپرت، حک دومات مورد تائید قرار گرفت در مولکول پروتئین DNA هر دو کروماتید یک کروموزوم در ناحیه سانترومر باقی می ماند مدل رشته تا شده توسط تجزیه سیتوشیمیایی مشاهده میکروسکپ الکترونیکی مورد تائید قرار گرفته است.

مدل نوکلئوزوم: بخوبی تشخیص داده شده است که کروموزوم های یوکاریوتی از DNA و پروئین تشکیل شده ات تقریباً ۱۳ تا ۲۰٪ از کروموزوم های پستانداران DNA و بقیه آن از پروئین مقدار کمی RNA تشکیل شده است هیستونها پروئین های معمولی همراه DNA رشته کروماتینی پیشنهاد کرد و گفت این رشته مانند دانه های تسبیح است که بر روی نخ قرار گرفته اند و واحدهای تکراری زیادی را تشکیل می دهند در سال ۱۹۷۵ ادت، همکارانش این واحدهای تکرار شده را اجسام ۷ یانوکلئوزوم ناحیه به نظر می رسد که کلئوزوم اساس ساختمان کروماتین را تشکیل می دهد. هر نوکلئوزوم دارای DNA مارپیچ است که در اطراف مولکول های هستون پیچیده شده و تشکیل یک عضو مغزی می دهد که پلاتی زوم نامیده می شود. طول هر نوکلئوزوم از ۱۴۰ تا ۲۰۰ جفت نوکلئوتید بازکمیل شده هر نوکلئوزوم توسط ۱۵ تا ۱۰۰ جفت نوکلئوتید DNA رابط با DNA بین نوکلئوزومی به دیگری متصل شده است قطر نوکلئوزوم حدود ۲۰۰ آنگستروم است. کروموزوم های غول پیکر: علاوه بر کروموزومهای دوکروماتیدی کروموزومهای دیگری نیز وجود دارند که اندازه آنها بسیار بزرگ است و در سلول های کرومی هستند که شامل دو دسته اند:

۱- کروموزوم های پلی تن

بالبیانی اولین کسی بود که در سال ۱۸۸۱ کروموزومهای غدد بزاقی را مشاهده کرد کروموزومهای غدد بزاقی به دلیل آنکه دارای تعداد زیادی کرومونا هستند توسط کولرپلی تن نامیده شدند در سلول های روده، ماهیچه ها، چربی و تعدادی از گیاهان یافت می شوند در این کروموزوم ها DNA چندین بار همانند سازی کرده ولی به کروماتید مجزا تقسیم شده. همزمان طویل و ضخیم نیز می شود.

۲- کروموزوم بطری شکل

کروموزومهای خط چینی که دارای حلقه های جانبی هستند را کروموزوم های بطری شکل گویند زیرا این کروموزومها شبیه یک لوله شوی هستند این کروموزومها اولین بار در سال ۱۸۸۲ توسط فلمینگ مشاهده شدند اما نامگذاری در سال ۱۸۹۲ توسط راکرت صورت گرفت. این کروموزومها از کروموزومهای غدد بزاقی بزرگتر هستند و بزرگی بیش از حد این کروموزومها مربوط به ازدیاد طول کروماتید آنها است این کروموزومها دارای یک محور کروموزومی هستند که حلقه ای جانبی از آن منشعب شده است این محور دارای دو کروموزوم بی والالت است که هر یک دارای دو کروماتید می باشد. لذا هر یک دارای چهار کروماتید می باشد که این کروماتید ها حلقه های جانبی را به وجود می آورند از نظریو شیمیایی محور کروموزوم از DNA و پروتئین تشکیل شده است قطر این محور بین ۳۰ تا ۵۰A است.

بخش دوم: فن آوری ژنتیکی

با اثبات تئوری کروموزومی وراثت و رمزگان ژنتیک و همچنین نظریه یک ژن یک آنزیم (حکم مرکزی) فن آوری ژنتیک مبنا و اساس درمان بیماری، بهبود محصولات کشاورزی، بهداشتی و ... قرار گرفت که با آشنائی به فنون جدید و آشنائی با چگونگی رونویسی ژن ها و همچنین ترجمه و کشف نقشه ژنوم بسیاری از موجودات راه برای دسترسی به فن آوری های زیستی هموارتر می شود. امروزه با استفاده تلفیق علوم پایه با یکدیگر در حال توسعه این فن آوری هستند در کنار آن از بسیاری از حیوانات برای تأیید نظریات خود استفاده می کنند. موجودات آزمایشگاهی: نخود فرنگی جزء اولین گیاهان است که به وسیله آن راه برای مطالعات ژنتیک باز شد بعدها مگس سرکه، خوکچه هندی و خرگوش کمک های شایانی به این علم کردند و امروزه نیز از حیوانات میمون، اسب ...

نیز در آزمایشگاه و کارگاه‌های تحقیقاتی استفاده می‌شود. نام علمی مگس سرکه *Drosophila melanogast* است. این موجود بعد از نخود فرنگی شدن اساس آزمایشات آمیزشی ژنتیکی قرار گرفت مگسومیوه یا *Fnitfly* نخود در تکامل علم ژنتیک نقش عمده دارد. ژنوم این موجود ۵٪ ژنوم انسان است تعداد بازهای تشکیل دهنده آن حدود ۱۷۰۰۰۰ می باشد در حالیکه انسان درای 3×10^9 kb می باشد ۲۱٪ ژنوم مگس سرکه توالی تکراری است و تعداد ژن های شناخته شده آن حدود ۱۵۰۰۰ - ۱۲۰۰۰ و تعداد کروموزوم های آن ۴ جفت ات. کروموزوم های x, y جزء کروموزومهای جسمی (اتوزدم) هستند که از آنها کروموزوم ۲ و ۳ متسانتريک x, y آکروسانتريک کروموزوم y ساب متسانتريک است. لارو نوزاد کرمی شکل سفید رنگ به دیوار شیشه محیط کشت چسبیده دارای حرکت است. بعد از یک روز لارو وارد انیتار ۱ مرحله یک می شود و در روز سوم لارو مرحله دوم را اسپری می کند روز پنجم مرحله سوم است و بیشتر مرحله رشد مربوط به مرحله لاروی است بعد از این مرحله وارد مرحله *pupa* یا شفیره می شود در این مرحله پوست لایه ضخیم و کوتیکومیس را تشکیل می دهد بی حرکت است و اندامها درباقت های داخل مگس سرکه کاملاً تشکیل می شود و سپس دگر ریزی در بین روزهای دوازدهم تا چهاردهم کامل می شود و سپس حشره بالغ از شفیره بیرون می آید و بدین ترتیب پس از ۱۴ روز حشره بالغ داریم که می تواند تکثیر کند. کمبود حیوانات عالی آزمایشگاهی در سراسر جهان ممکن است در انجام پژوهش های علمی برای یافتن معالجات دارویی و ژنتیکی مانع ایجاد می کند تحقیقاتی که به کمک پستانداران عالی در سراسر جهان انجام می شود اخیراً برای نخستین بار مورد بررسی و تجزیه قرار گرفته است از این حیوانات بیشتر برای پیشرفت های علمی با هدف HIV و بیماری های عصبی استفاده می شود. امروزه حدود ۲۰۰ هزار پستاندار عالی سالانه در تحقیقات علمی مورد استفاده قرار می گیرد و از این میان میمون های جهان کهند به دلیل نزدیکی به گونه انسان در ۶۵ کل

آزمایشها بکار رفته اند و میمون های جهان نو ۱۵٪ مطالعات بکار گرفته شده اند . خانواده گودیل و شامپانزه ها تنها ۹٪ موارد استفاده دارند.

بند اول: تکنیک های تجربه ژنتیکی

مطالعه ژنها روش قدرتمندی برای اصلاح از سیستم های بیولوژیکی است نظر به اینکه ژن ها کلیه جنبه های ساتاری ، کارکردن موجود را تحت تاثیر قرار می دهند لذا شناسائی و تعیین نقش ژن ها، پروتین های که کد می کنند قدم بسیار مهمی برای کشف فرآیندهای متعددی است که در بررسی یک صفت بخصوص دخالت دارند برای مطالعه ژن ها و فعالیت آنها روشهای مختلفی به شرح زیر است:

۱- جداسازی موتانتا نهایی که فرآیند تحت مطالعه را تحت تاثیر قرار می دهند.

هر ژن جهش یافته جزء ژنتیکی فرآیند را نشان می دهد و روی هم رفته دامنه پروتین هایی که در یک فرایند بخصوص اثر متقابل دارند را نشان میدهند.

۲- تجزیه نتایج حاصل از آمیزش های تحت کنترل بین موتان و ها و سایر واریانت های ناپیوسته: این نوع تجزیه ژن ها، آلل های آنها محل کروموزومی آنها و الگوی وراثتی آنها را شناسایی می کند.

۳- تجزیه بیو شیمیائی فرآیندهای سلولی تحت کنترل ژن ها:

حیات یک مجموعه پیچیده از واکنش های شیمیائی است لذا مطالعه راههایی که توسط آنها ژنها در ارتباط با این واکنش ها هستند یکی از راههای مهم تجزیه این شیمی پیچیده است.

الل های موتانت مربوط به فعالیت های ناقص برای این نوع تجزیه ارزشمند نیستند هدف اصلی ان است که دریابیم چگونه شیمی سلول در افراد موتانت توزیع می شود و با استفاده

از این اطلاعات نقش ژن را استنباط کنیم استنباط‌های مربوط به ژن‌های متعدد تصویر بزرگتری را نشان خواهد داد.

۴- تجزیه میکروسکوپی ساختمان و حرکت کروموزومها جزء انفکاک ناپذیر است اما تکنولوژی‌های جدید راه‌های جدیدی را برای نشان کردن ژن‌ها و محصولات آنها فراهم آورده است بطوریکه بتوان جایگاه آنها را زیر میکروسکوپ مشاهده کرد.

۵- تجزیه مستقیم DNA نظریه اینکه ماده ژنتیکی مرکب از DNA است تشخیص نهایی تجزیه خود DNA است در این ارتباط روش‌های متعددی از جمله کلون کردن استفاده می‌شود کلون کردن روشی است که توسط یک ژن منفرد را می‌توان جدا و تکثیر کرد. تا یک نمونه خالص برای تجزیه بدت آید بعد از آنکه کلون‌های یک ژن بدست آمدند می‌توان توالی نوکلئوتیدی آن را بدست آورد و لذا اطلاعات مهمی درباره ساختمان و فعالیت آن بدست آورد بعلاوه می‌توان از ژن‌های کلون شده بعنوان کاوشگرهای بیولوژیکی استفاده کرد برای کلون کردن ژنی را که قرار است تکثیر شود به یک کروموزوم کوچک ملحق می‌کنند و به این کروموزوم اجازه داده می‌شود همانند سازی کند و قطعه ژن مورد نظر را تکثیر نماید این کروموزوم کوچک را ناقل گویند ناقله‌ایی که معمولاً به کار می‌روند پلاسمید هستند پلاسمیدها مولکولهای DNA اضافی و غیر لازمی هستند که بطور طبیعی در بسیاری از باکتری‌ها یافت می‌شوند. DNA یک موجود را می‌توان بداخل یک ناقل وارد کرد سپس این ساختار هیبرید را وارد یک سلول باکتری سازی می‌کند و کشت زاید از این سلول بوجود می‌آید سپس ناقل و ژن ملحق شده را از سلولهای پاره شده جدا می‌کنند و برای مطالعات مربوطه به کار می‌برند.

حدود یک بیستم کروموزوم باکتری است معمولاً بصورت DNA حلقوی دور رشته است شبیه کروموزوم است و دارای یک مبدا کپی سازی بنا Cori است پلاسمید نظیر کروموزوم باکتری در حالت استراحت بصورت سوپر کویل است این سوپر کویل تحت

تاثیر پروتئین هایی نظیر هیستون است زمانی که سلول فعال است سوپرکویل بصورت حلقوی در می آید. پلاستید ها انواع مختلفی دارند مثل پلاستیدهای کابخوگاتيو (F) یا مقاوم به آنتی بیوتیک (R) تولید کننده توکسین ، تولید کننده باکتریوسین و ... پلاستیدهای کابخوگاتيو غالبا وزن مولکولی بالائی دارد و تعداد در سلول کم ات پلاستیدهای غیر کابخوگاتيو به تعداد ۴۰-۱۰ پلاستید در سلول ها دیده می شود و بصورت مصنوعی تا ۳۰۰۰ تا هم می تواند تکثیر شود. پلاستید در مهندسی ژنتیک نقش بسزائی دارند و پلاستیدهای مهندسی شده زمانی به وجود می آمدند که نوکلئاز شناخته شده حدود ۴۰۰-۳۰۰ پلاستید ساخته شد که همه مفید نبودند . مشهورترین پلاستید دنیا -PBR۳۲۲ است که به صورت مصنوعی ساخته شده است و مادر پلاستید های امروزی است امروزه در صنایع تخمیری استفاده می شود البته انتقال پلاستیدهای خاصی به میکروارگانیسم، می توان آلودگی های فاضلاب و در کشاورزی در حشره کش ها و یا مقاوم کردن گیاهان در شرایط نامساعد و آفت گیاهی استفاده کرد. امروزه توسط سوار کردن ژن مصنوعی ساخته شده بر روی پلاستیدها و کلون کردن آنها در باکتری و سلول های دیگر باعث بیان پروتئین های موجود در ژنوم پلاستید می شوند که از جمله این پروتئین انسولین را می توان نام برد.

بخش سوم: ویژگی های یک پلاستید ایده آل مصنوعی

۱- باید دارای وزن مولکولی کم باشد و کوچک باشد تا بتواند در سلول تکثیر بالائی داشته باشد و ثبات آن هم بالا برود و هر چه کوچکتر باشد پارگی آن هم احتمال کمتری دارد. این پلاستید های کوچک را می توان تا ۳۰۰۰-۲۰۰۰ تکثیر داد.

۲- سلول میزبان براحتی آن را از طریق ترانسفورماسیون بپذیرد.

۳- باید ژن مورد نظر را به خوبی بیان کند

۴- باید Ori آرام داشته باشد و کروموزوم تاثیری روی آن نگذارد.

۵- اپراتور فعال داشته باشد.

۶- براحتی بصورت سوپرکویل درآید.

۷- بتوان میزان زیادی توالی غریبه را در آن ادغام کرد.

۸- جهت شکستن با آن دو نوکلئاز مورد نظر فقط یک جایگاه داشته باشد.

ابتدا قطعات ژن مورد نظر را از کروموزوم، پلاسمید ژنوم ویروس بوسیله آندو نوکلئازهای خاص برش داده می شود بعد دو ژن برش داده شده توالی مکچل با ند هیدروژنه می دهند و با آنزیم لیگاز حلقوی می شوند باید توالی مکمل را بصورت مصنوعی ساخت شناسایی ژن نیز از روی پرتین های ساخته شه یا mRNA انجام می گرفت بعد روی ژن این توالی را پیدا کرده و دو سر انتهایی را معلوم می شود و بعد از روی ۳۰ آندونوکلئاز آن نوکلئازی که برش می دهد را پیدا کرده برای سوار کردن شان بر روی پلاسمید باید پلاسمیدی را یافت که با همان آندونوکلئاز پاره می شود و بعد ژن و پلاسمید را به یکدیگر متصل می کنند بالیگاز ترمیم صورت می گیرد.مهمترین پلاسمید مصنوعی PBR۳۲۲ در سال ۱۹۷۷ بوسیله دو دانشمند بنام بلوبر و رودریگر برای ساخت انسولین طراحی شده ۱۹۸۰ هم برای ساختن انسولین از ژن مصنوعی و ۱۹۸۲ نیز از ژن طبیعی انسولین ساخته شد. نظر به اینکه ماکرو مولکول های اصلی ژنتیک DNA و RNA و پروئین هستند اغلب هدف از تجربه ژنتیکی کشف مو لکول های بخصوص از این سه نوع مولکول است چگونه می توان در بین هزاران نوع مولکول در سلول این نوع مولکول ها را شناسائی کرد؟ وسیعترین روشی که برای کشف ماکرومولکولهای بخصوص در یک مخلوط بکار می رود کاوشگری می باشد. در این روش از خصوصیت پیوندهای بین

مولکولی استفاده می شود معمولا کاوشگر را با روشهای مختلفی توسط اتم های رادیو اکتیو یا ترکیبات فلورسنت نشاندار می کنند بطوریکه می توان ناحیه پومری را براحتی شناسایی کرد هم اکنون کاوشگرهای DNA و RNA و پروئین را مورد بحث قرار می دهیم.

۱- کاوشگری یک DNA بخصوص: برای پیدا کردن قطعات DNA از یک ژن

کلون شده بعنوان کاوشگر استفاده می کنند قطعات DNA یاد شده باید دارای همان توالی کاوشگر و یا توالی خیلی شبیه آن باشند. بعنوان مثال اگر ژن G از یک قارچ کلون شده باشد ممکن است بخواهیم تعیین کنیم که آیا گیاهان نیز دارای همین ژن هستند یا خیر؟ لازمه استفاده از ژن کلون شده به عنوان کاوشگر آن است که به قاعده جفت شدن تکمیلی بازها رجوع کنیم کاوشگر در قالب این اصل عمل می کند بدینصورت که حرکت تصادفی مولکول های کاوشگر سبب می شود توالی های بازها اشغال نمی شود DNA گیاه جدا می شود و با آنزیم های برشی موجود قطع می شود این آنزیم ها DNA را در توالی های بخصوص هدف دارای چهار و یا چند باز قطع می کنند توالی های هدف در کلیه سلول های مورد استفاده در یک موقعیت قرار گرفته اند لذا آنزیم ژنوم را به جمعیت های قطعات دارای اندازه بخصوص و معین برش می دهد و با استفاده از اکتروفورز می توان این قطعات را از یکدیگر تفکیک کرد الکتروفورز جمعیت قطعات اسید نوکلئیک را بر مبنای اندازه از هم جدا می کند مخلوط قطعات برش داده شده در یک چاهک کوچکی در یک ژل قرار می گیرد و ژل در یک میدان الکتریکی قوی قرا می گیرد جریان الکتریسیته سبب می شود که مولکولو ها در ژل حرکت کنند میزان سرعت حرکت مولکول ها در ژل عکس اندازه آنهاست یعنی قطعات بزرگتر کند تر حرکت می کنند بعد از جدا شدن قطعات جدا شده بر روی یک غشاء منغذ دار لکه گذاری می شوند جایگاه آنها بر

روی غشاء همان جایگاه قبلی بر روی ژل است این روش را لکه گذاری ساوترن گویند بعد از حرارت دادن برای جدا کردن رشته های DNA و حفظ DNA در جایگاه خود غشاء در داخل محلول کاوشگر قرار می گیرد.

کاوشگری یک RNA مخصوص: گاهی اوقات می خواهیم پی ببریم به اینکه آیا در یک بافت بخصوص ژن رونویسی شده است یا خیر؟ برای تعیین این موضوع از تجربه لکه گذاری ساوترن تغییر یافته استفاده می کنیم کل Mrna ی بافت مربوطه استخراج می شود توسط اکتروفوز از هم تفکیک می شوند و بر روی غشاء لکه گذاری می شوند (این فرآیند را لکه گذاری نورتون گویند). ژن کلون شده بعنوان کاوشگر بکار می رود و نشانه آن بر روی غشاء m RNA مورد نظر را در صورت وجود نشان می دهد.

۳- کاوشگری یک پروئین بخصوص: معمولاً برای کاوشگری پروئین ها از آنتی بادها استفاده می شود زیرا آفتی بادی دارای یک رابطه قفل و کلید با آنتی ژن خود است مخلوط پروتئن را الکتروفورز می کنیم و سپس بر روی غشاء لکه گذاری می شود. (این روش لکه گذاری وسترن گویند) مکان یک پروتئن بخصوص بر روی غشاء از طریق شست و شوی غشاء در یک محلول آنتی بادی حاصل از خرگوش که پروئین به آن تزریق شده است آشکار می شود مکان پروئین توسط مکان شانه ای که آمیتی بادی حمل می کند آشکار می شود.

با توجه به جهش ژنوم باکتری ها و مقاومت آنها در مقابل آنتی بیوتیکها آنتی بیوتیک برای درمان ارزش کمتری دارند. روش Genesoft روشی جدید است که موسوم به ریز چسبنده های DNA می باشد در این روش مولکول های ریزی در نقاط متعدد به DNA باکتری متصل شده عملکرد ژن های این میکرو ارگانیسم را چنان مختل می نماید که سلول

را وادار به خود کشتی می کند. امروزه این روش توسط شرکت های داروئی ویژه سازمان دفاعی آمریکا به وسیله قرص هایی که دارای این مواد ریز چسبنده هستند بر علیه عوامل بیوترور مانند ویروس آبله یا باکتری انتراکس دارد عمل می شود.

در این تکنیک برای کل m RNA های یک سلول Prob اختصاصی طراحی شده و در یک صفحه فیکس می کنیم کل m RNA های استخراج و Label می کنند سپس m RNA مربوطه انجام می شود این عمل را Reverse hybridization می نامند.

یعنی به جای اینکه پروب به m RNA متصل شود m RNA به Prob متصل می شود در این تکنیک تفاوت در سطح m RNA سلول های متفاوت مشاهده می شود.

نقشه ژنتیکی مقدمه دستکاری ژنتیکی: مطالعات مندل و سایر دانشمندان ژن را عامل توارث صفات بر روی کروموزوم نامیدند و با مطالعات بیشتر به مورفولوژی ژنتیک هر موجودی ژنتیک پزشکی مندلی پایه ریزی شده بود. تغییرات صفات که بر روی کروموزوم های جسمی (اتوزدم) هست را بیماری های اتوزدمی و تغییراتی که در صفات بر روی کروموزوم های جنی بود را بیماری های وابسته به جنش می نامیدند. و با کشف نقشه ژنوم انسان که در سال ۲۰۰۱ به وقوع پیوست راههای جدیدی بر روی درمان بیماری های ژنتیکی آغاز شد. نوع ژن هایی که یک موجود دارد و موقعیت آنها بر روی کروموزوم خصوصیت اصلی تجزیه ژنتیکی است مهمترین دلایل نقشه یابی مربوط به وظیفه ژن ، تکامل ژن جداسازی ژن می باشد. عمل ژن ظهور آن را در بسیاری از موارد تحت تأثیر قرار می دهد ژن هایی که کارکرد مربوط بهم دارند اغلب در کروموزوم های باکتریایی پهلوی هم قرار دارند عموماً بدلیل آنکه بصورت یک واحد رونویسی می شوند مکان یک ژن یوکاریوتی در هتروکروماتین یا نزدیک آن می تواند ظهور آن را تحت

تأثیر قرار دهد. اطلاع از مکان ژن در مطالعات تکوین نیز مهم است زیرا از مکان نسبی ژن‌های مشابه در موجودات خویشاوند می‌توان نوتیپ‌های کروموزومی در دوره تکامل را استخراج کرد. بالاخره اگر بخواهیم یک ژن را برای تجزیه مولکولی جلو سازی کنیم محل آن اولین قدم برای شروع جدا ازی (کلون کردن مکانی) تا به حال نقشه کروموزومی بسیاری از موجودات بدست آمده نقشه یابی با نشانگرهای مولکولی: در ۷۰ سال اول تهیه نقشه‌های ژنتیکی نشانگرهای روی نقشه‌ها ژنهایی با ال‌های متنوع بودند که تفاوت‌های فنوتیپی قابل کشفی را بوجود می‌آورند با پژوهشهای بیشتر بر روی موجودات از تعداد بیشتری از این ژن‌ها می‌توان بعنوان نشانگر بر روی نقشه‌ها استفاده کرد. اما حتی در موجوداتی که نقشه آنها پر از کلویهای دارای اثرات فنوتیپی مشخص است اندازه گیری نشان داده است که فاصله‌های کروموزومی بین ژن‌ها می‌بایستی دارای مقدار وسیعی از DNA باشد. این فاصله‌ها را نمی‌توان با استفاده از تجزیه پیوستگی نقشه یابی کرد زیرا در آن نواحی نشانگری وجود نداشت آنچه که مورد نیاز بود تعداد زیادی نشانگرهای ژنتیکی اضافه بود که بتوان از آنها برای پر کردن این فاصله‌ها استفاده کرده یک نقشه شفاف تهیه نمود این نیاز توسط کشف نشانگرهای مولکولی متعدد بر طرف شد. یک نشانگر مولکولی یک ناحیه هیتروزیگوسیستی برای بعضی از انواع تغییرات DNA خاموش است که ارتباطی با تغییرات فنوتیپی قابل اندازه گیری ندارد. چنین لکوس DNA ی اگر هتروزیگوت باشد می‌توان از آن برای تحلیل نقشه یابی درست مثل یک جفت ال‌های هتروزیگوت متعارف استفاده کرد. نظر به اینکه نشانگرهای مولکولی براحتی قابل کشف هستند و تعداد آنها نیز در ژنوم زیاد است هنگامیکه با تجزیه پیوستگی نقشه یابی شوند فضای خالی بین ژن‌های دارای فنوتیپ معلوم را پر می‌کنند لازم به ذکر است که در نقشه یابی خود اهمیت بیولوژیکی نشانگر DNA مورد توجه نیست فقط ناحیه هتروزیگوت است که بعنوان یک

مرجع راحت برای یافتن راه در اطراف کورموزوم مورد استفاده قرار می گیرد. دو نوع اصلی نشانگرهای مولکولی آنهایی هستند که بر مبنای تنوع ناحیه برش و DNA تکراری می باشند.

بخش چهارم: استفاده از RFLP در نقشه یابی

آنزیم های برشی باکتریایی DNA را در توالی های هدف ویژه ای که بصورت شانسی در DNA موجودات دیگر وجود دارد قطع می کنند معمولاً نواحی هدف در همان مکان DNA افراد متفاوت در یک جمعیت یافت می شوند یعنی در DNA کروموزومها همولوگ اما گاهی اوقات ممکن است یک ناحیه بخصوص در نتیجه بعضی از جهش های خاموش از بین برد جهش ممکن است در داخل یک ژن و یا در یک ناحیه بین ژنی غیر کد کننده باشد اگر یک فرد از نظر وجود و فقدان هتروزیگوت باشد در آن صورت آن لکوس می تواند در نقشه یابی مورد استفاده قرار گیرد. نواحی بوسیله تجزیه های سادترن با استفاده از یک کاوشگر حاصل از DNA ی آن ناحیه یافت می شود بعنوان نمونه وضعیت زیر را در نظر بگیرید. هنگام دورگ گیری ساوترن چنین فردی کاوشگر سه قطعه با اندازه ۱، ۲، ۳ کیلو بازر نشاندار خواهد کرد. یک فرد دیگر برای قطعه بلند باید هموزیگوت باشد و در دورگ گیری ساوترن فقط باند ۳-kb را نشان خواهد داد. کراسینگ اوربین این نواحی محصولات نوترکیبی را بوجود می آورد که بصورت ۳D- و ۲d- قابل کشف هستند در این صورت، یک کلوس RFLP را می توان در ارتباط با ژن ها یا ساینز نشانگر های مولکولی نقشه یابی کرد. تعداد واحدهای تکرار شده در یک شعاع پشت ر هم متغیر است واقعیت مهم آن است که افرادی که از نظر تعداد متفاوت تکرارهای پشت سر هم

مثال زیر از نواحی هدف آنزیم برشی که خارج از شعاع تکراری هستند استفاده می‌کند واحد اصلی شعاع بصورت پیکان نشان داده شده است. این کلو VNTR در اوتورادیوگرام رگ گیری ساوترن دو باند نشان خواهد داد یکی بلند و دیگری کوتاه در اینجا نیز مثل لکوس RFLP می‌توان از این ناحیه هتروزیگوت در نقشه یابی استفاده کرد.

بخش پنجم: نقشه یابی پیوستگی با نوترکیبی در انسان

انسان دارای هزارها فنوتیپ ارثی اتوزومی است و براحته می‌توان ژن‌های کنترل کننده این فنوتیپ‌ها را با استفاده از تکنیک‌های تعیین نقشه کرد اما نقشه یابی این لکوس‌ها به دلایل متفاوتی به آهستگی پیشرفت کرده است اول اینکه نمی‌توان از تلاقی‌های کستروال شده در انسان استفاده کرد. نوترکیبی یکی از عوامل نشان دهنده پیوستگی ژن‌ها یا مستقل بودن و عدم آن است و در صورت پیوسته بودن به وسیله قوانینی که در اینجا بدان نمی‌پردازیم می‌توان حتی فاصله آن‌ها را بدست آورد در نوترکیبی‌هایی که نبت والدین (P) و نوترکیب‌ها (R) مساوی باشد آن دو ژن متصل اند یعنی بر روی کروموزوم‌های متفاوت قرار دارند اگر این $R = 0$ باشد فاصله دو ژن صفر است دو ژن‌ها پیوسته هستند و حالت سوم پیوسته ژن‌ها را نشان می‌دهد که فاصله بین آنها معنی دارد در این حالت اختلاف بیم P, R زیاد است و برای تعیین فاصله باید درصد نو ترکیب را مشخص کرد. معمولاً کروموزوم X انسان برای تهیه نقش بوسیله تحلیل نو ترکیبی راحت تر از اتوزومها است و اولین نقشه کروموزوم مربوط به کروموزوم X بود دلیل این موفقیت آن است که نرها از نظر ژن‌های وابسته به کروموزوم X همی زیگوت هستند و درست مثل مگس رکه اگر فقط به نتایج نر یک ماده دی هیبرید نگاه کنیم براحته می‌توان از نتایج گامتی آن نمونه گیری کرد عبارت دیگر یک تست کرا تقریبی انجام داده ایم. مثالی را در نظر بگیریم که در آن ال‌های مغلوب وابسته به X تا در کنترل کننده ناقص فرآیند قند

سازی (g) در کولوس و ژن مغلوب کنترل کننده رنگ کوری (c) در لکوس دیگر قرار دارند یک نر مبتا (cg/y) با یک زن طبیعی که مطمئناً دارای ژنوتیپ (CG/CG) است ازدواج می کند. دخترهای حاصل از این ازدواج هتروزیگوت و در وضعیت سیس هستند پسرهای زنهای این نوع فرصتی را برای کارشناسان ژنتیک فراهم می آورد تا فراوانی نو ترکیبی حاصل از میوزهای مادری را فراهم آورد نقشه یک کروموزوم X انسان مربوط به ژن هایی که فنوتیپ های وابسته به X را تحت تاثیر قرار می دهد.

سه مفهوم کلیدی فراوانی نو ترکیب، محصولات تصادفی دمیز تحلیل پیوستگی ژن ها را ممکن ساخت. فراوانی نو ترکیب همواره اندازه دقیق فاصله نقشه را بدست نمی دهد. بعضی از موجودات نیز بعلت روشی که توسط آن سیکل زندگی خود را کامل می کنند به پژوهشگران اجازه میدهند که فرآورده های میوزهای منفرد را مطالعه می کند. هدف از ژنتیک پی بردن به ساختمان، وظیفه و تکامل ژنوم است لذا پی بردن به محل ژن از اهمیت ویژه ای برخوردار است. ما در اینجا بصورت گذرا بدانها می پردازیم و به علت اهمیت آن در پی بردن به ساختمان ژنوم به آنها اشاره می کنیم.

۱-RC در مبنای فراوانی نو ترکیبی

۲-توزیع پوسین (ابزاری ریاضی است که بطور وسیع در تحلیل ژنتیکی به کار می رود)

۳-استخراج تابع نقشه یابی (توزیع کراس او را در طول یک کروموزوم در جریان میوز نشان میدهد)

اگر یک نقشه کلون شده باشد کلون را می توان در یک تکنیک نقشه یابی ویژه برای یافتن محل کروموزومی ژن بکار برد کلون نشاندار شده بعنوان کاوشگر برای دو رگ گیری در جا بکار می رود محلولی از کاوشگر برای شستشوی نمونه کروموزومی که در آن

قسمتی از DNA سر رشته شده است بکار می رود و لذا دو رشته کمی از هم دور می شوند بعد از انتشار کاوشگر پیوندهای هیدروژنی مکمل بین کاوشگر ژن مکان کروموزومی اصلیش اتفاق می افتد نشانه مکان ژنی دو رگ گیران و در نتیجه موقعیت کروموزوم را نشان می دهد برای نشان دار کردن از مواد رادیواکتیو و فلورنست استفاده می شود در فرآیند درگه گیری در جا با فلورسنس کلو با رنگ فلورسانت نشانه گذاری می شود و نمونه کروموزومی را سر رشته شده در کاوشگر شستشو داده می شود. کاوشگر به کروموزوم در جای خود پیوند می خورد و محل قطعه کلون شده بوسیله لکه های روشن فلورنست آشکار می گردد.

نقشه یابی ژن های انسان با استفاده از دورگ سلول های شماتیکی انسان-جوندگان: با استفاده از تجزیه و نو ترکیبی نقشه یابی ژن های انسان مشکل است با استفاده از دو رگ گیری سلول های انسان و جوندگان می توان این مشکل را حل کرد. از این روش می توان برای انتساب ژن ها به کروموزوم های بخصوص و تعیین مکان نقشه استفاده کرد.

الکتروفورز با ژل زمینه متحرک (PFGE) در صورتی که کوچکی کروموزوم ها برای تفکیک PFGE کافی باشد می توان با هیبریداسیون از باندهای DNA روی ژل جهت تعیین مکان ژن ها ی جدید استفاده نمود. ابتدا باید از طریق همبستگی ها معلوم نمود کروموزومی که با باند DNA مطابقت دارد کدام است در این رابطه اندازه جابجائی بین کروموزوم های شناخته شده و هیبریداسیون با کاوشگرهای دارای مکان مشخص مفید می باشند سپس می توان از یک ژن کلون شده جدید بعنوان کاوشگر در لکه گذاری ساوترن با ژل PFGE استفاده نمود و در نهایت مکان کروموزومی آن را مشخص کرد.

روش هیبریداسیون سلول بدنی به طور گسترده در تهیه نقشه ژنومی انسان به کار رفته است اما اصولاً می‌توان از آن در سیستم‌های حیوانی مختلف استفاده کرد در این روش از سلول‌های در حال رشد در محیط کشت استفاده می‌شود و ویروس بنام سندائنی ویژگی سودمندی دارد که تهیه نقشه ژنتیکی را امکان‌پذیر می‌سازد هر ویروس سندائنی دارای چندین نقطه اتصال است بدین ترتیب که می‌تواند به طور همزمان به دو سلول که به طور اتفاقی در مجاورت همدیگر قرار می‌گیرد بچسبد معهداً در مقایسه با یک سلول یک ویروس خیلی کوچکتر است بطوریکه دو سلولی که به ویروس چسبیده‌اند در واقع خیلی نزدیک بهم نگه داشته می‌شوند در حقیقت ممکن است غشاهای دو سلول ادغام گردند و ترکیب شوند. و یک سلول دو هسته‌ای هتروکاریون بوجود آید. اگر کشت‌های تعلیقی از سلول‌های انسان و موش در حضور ویروس سندائنی که بوسیله نور ماورا بنفش غیر فعال شده با هم مخلوط شوند ویروس می‌تواند بعنوان واسطه برای الحاق سلول‌های این گونه‌های مختلف عمل نماید زمانیکه سلول‌ها ترکیب شدند متعاقباً هسته‌ها ترکیب می‌شوند تا یک لاین سلولی تک هسته‌ای متشکل از هر دو دسته کروموزومی موش و انسان تشکیل شد از آنجائیکه کروموزوم‌های انسان و موش از لحاظ تعداد و شکل با هم تفاوت‌های زیادی دارند در سلول‌های هیبرید می‌توان از این دو دسته را به راحتی از هم تشخیص داد با این وجود در دور بعدی تقسیمات سلولی برل‌یل ناشناخته کروموزوم‌های انسان به تدریج به طور تصادفی از هیبرید حذف می‌شوند شاید این فرآیند با پدیده هابلو شری شدن در قارچ آسپرژیلوس مشابهت داشته باشد. با روشهایی می‌توان مانع از دست رفتن کروموزوم انسان شد در نتیجه تشکیل یک هیبرید جزئی پایدار را ترغیب نمود سلول‌های موش مورد استفاده از لحاظ برخی از فعالیت‌های بیوشیمیایی جهش یافته‌اند بنابراین اگر این سلول‌ها قادر به رشد گردند فعالیت بیوشیمیایی از دست رفته می‌بایست توسط ژنوم

انسان تامین شده باشد این روش انتخابی موجب بقای سلول‌های هیبریدی می‌گردد که یک دسته کامل از کروموزومهای موش و تعداد کمی از کروموزومهای انسان را دارند ضمن اینکه تعداد نوع کروموزومها از هیبری به هیبرید دیگر فرق داشته و همیشه کروموزوم‌های انسان حامل ال‌نوع وحشی هستند که در ژنوم موش کمبود آن وجود دارد. حال ژن‌های خاصی مورد بحث قرار می‌گیرد که عمل اجرای سیستم انتخابی را امکان‌پذیر می‌سازد. DNA دو سلول از طریق دنو یا از مسیر نجاتی که از اسکلت مولکولی موجود استفاده می‌کنند ساخته می‌شود روش انتخابی مستلزم استفاده از یک ماده شیمیایی به نام آمینو پترین است که مسیر سنتز جدید را متوقف می‌نماید و نستر DNA را به مسیر نجات منحصر می‌سازد در این سیستم دو آنزیم نجات دهنده به نحویکه واکنش زیر نشان داده شده است ضروری می‌باشد. چون هر کدام از لاین‌های سلولی از نظر یک آنزیم دچار کمبود هستند نه سلولهای موش و نه سلولهای انسان به تنهایی قادر به ساختن DNA نیستند در سلول‌های هیبرید tk⁺ چهار مکمل hgprt و لذا از این سلول‌ها می‌توانند هر دو آنزیم را بسازند بنابراین DNA ساخته شده و سلول‌ها می‌توانند تکثیر یابند اکثر کروموزوم‌های انسان از کشت‌های سلولی هیبرید حذف شوند زیرا از دست رفتن آنها اثری بر توانایی رشد کشت‌ها ندارند اما یک هیتر کشت برای ادامه رشد در محیط‌های حاوی هایپوزانتین، آمینوپترین، نمیدین (محیط HAT) باید حداقل یکی از کروموزوم‌های انسان که حامل ال‌TK باشد را محفوظ نگه دارد. خوشبختانه می‌توان حذف تدریجی کروموزوم‌های انسان از لاین‌های سلولی الحاق یافته را در زیر میکروسکوپ تعقیب نمود زیار کروموزومهای موش به آسانی از کروموزومهای انسان قابل تمایز می‌باشند بعلاوه رنگ آمیزی‌های کروموزومی از قبیل کونیا کربن و گمیس الگوی باند شدن بین کروموزومها را آشکار می‌سازند که از کروموزومی به کروموزوم دیگر تفاوت دارد اما الگوی باند شدن

بسیار انحصاری بوده و برای هر کروموزوم ثابت است بنابراین شناسایی کروموزوم های انسان در لول هیبرید نسبتاً آسان می باشد می توان سلول های هیبرید متفاوت را به طور مجزا برای تولید لاین کشت نمود و در نهایت کتابخانه داری از لاین ها را تولید کرد که شامل تمام کروموزومهای انسانی باشند. می توان از یک تابخانه کامل کروموزم ها برای تعیین مکان کروموزومی ژن ها یا نشانگرها استفاده نمود در صورتیکه مجموعه کروموزومی انسان برای یک نشانگر مولکولی انسان مانند الل مربوط به آنتی ژن سطحی سلول، مقاومت به یک دارو یک نیاز غذایی یک پروتئین ویژه یا یک نشانگر DNA هموزیگو باشد آنگاه وجود یا عدم وجود این نشانگر ژنتیکی در هر لاین از سلول های هیبرید می تواند با حضور یا فقدان کروموزم های معینی از انسان در هر لاین مرتبط باشد. درجه اولی این مشاهدات نمایانگر کرد عدم و حضور ژن های وابستگی و پیوستگی را می توان مشاهده کرد تا کنون به همین روش مکان تعداد زیادی از ژن های انسان روی کروموزوم های مختلف تعیین شده ات. کاربرد دورگ های سلول انسان- موش در تعیین محل ژن ها در کروموزوم ها شرح داده شد این روش را می توان برای بدست آوردن داده های لازم برای تعیین نقشه بسط داد یکی از بسط های تکنیک سلول هیبرید انتقال ژن با واسطه کروموزوم می باشد ابتدا نمونه هایی از کروموزومهای یک انسان از طریق مرتب کردن کروموزوم فعال شده با فلورسنت (FACS) در این روش کروموزومهای متافاز با دو نوع رنگ، رنگ آمیزی می شوند. یکی از این رنگ ها به نواحی غنی از AT و دیگری به نواحی غنی از GC متصل می شوند سلول ها جهت آزاد شدن تمام کروموزمها در داخل سوسپانسیون مایع بهم زده می شوند این سوسپانسیون در یک اسپری با غلظتی از کروموزومها نگهداری می شود بطوریکه هر بخش اسپری حاوی کی کروموزم آزاد شده باشد این اسپری از میان اشعه های لیزری همراه با تحریک بوسیله فلورسنس عبور داده می

شود هر کروموزوم علامت فلورسنس خاص خود را که به صورت الکتورنیک‌ی شناخته می‌شود تولید می‌کند و دو ظرف پتری حفره دار مسیر قطره محتوی کروموزوم دیگری مورد نیاز را بداخل یک لوله هدایت و آن را جمع آوری می‌کنند آنگاه نمونه ای از یک کروموزوم معین مورد مطالعه به سلول‌های موش اضافه می‌شود کروموزوم‌های انسان بوسیله سلول‌های چونده موش احاطه گردیده و تمامی آنها با قطعاتی از آنها در هسته چونده داخل می‌شود سب همبستگی بین کروموزوم‌های انسان یا قطعات آنها و نشانگرهای انسانی بدست می‌آید. هر قدر دو نشانگر روی یک کروموزوم بهم نزدیکتر باشند بیشتر با هم منتقل می‌شوند. روش دیگری است که انتقال ژن با ادغام در طی پرتو تابی (IFGT) نامیده می‌شود نوعی بسط روش فوق‌ات که جهت تولید نقشه‌هایی با دقت و ظرافت بالاتر از نشانگرهای مولکولی در طول قطعه قطعه شدن کروموزوم پرتو تابی می‌شوند سپس سلول‌های پرتو شده با سلول‌های موش جهت تشکیل یک پانل از هیبریدهای مختلف آموزش داده می‌شوند. در این حالت هیبریدها ترتیبی از قطعات کروموزوم‌های انسان را دارا می‌شوند اگر چه اکثر قطعات درد اخل کروموزوم‌های موش ادغام شده‌اند اما کروموزوم‌های ناقص انسانی نیز یافت می‌شود ابتدا دوام انواع نشانگرهای مولکولی در هیبریدها محاسبه می‌شوند. مرحله بعدی محاسبه فراوانی با دوام با هم بودن جفت‌های نشانگرهای مولکولی انسان است فرض بر این است که فراوانی دوام توام نشانگرهای کاملاً پیوسته بالا باشد زیرا احتمال اینکه شکستگی بوسیله پرتو تابی بین این مکانها رخ دهد کم است و فور نشانگرهای دور از هم و نشانگرهای روی کروموزوم‌های مختلف بایستی کمتر باشد تا فراوانی بالای دوام توام نشانگر در هر فرد حفظ گردد. یکی از مزایای این روش اندازه نمونه است تعداد زیادی از هیبریدهای پرتو تابی شده را می‌تان به آسانی مورد آزمون قرار داد. اصلاح نژاد یکی از تکنیکهای جدید مهندسی ژنتیک است که ارزش

اقتصادی بالائی را به خود اختصاص داده است امروزه در صنعت از دو روش برای اصلاح نژاد برای اهداف مختلفی استفاده می شود مونتاسیون و نو ترکیبی این دو روش هستند همانطور که قبلا به مونتاسیون های اشاره شد مونتاسیون ها در طبیعت بطور خود بخود حدود ۱ از هر ۱۰^۹ باکتری است که در پاساژهای مکرر در مورد باکتری ها در هر کلوی یک باکتری موتان بدت می آید از مونتاسیون های القائی نیز برای ایجاد مونتاسیون و ایجاد سوش و نمونه های سازگارتر استفاده می شود که قبلا از عوامل القای مونتاسیون گفته ایم. نو ترکیبی راه دیگر اصلاح نژاد در وضعیت یتوتکنولوژی باشد که خود شامل ورش های مختلفی است که ما در زیر به آنها می پردازیم:

الف) القاح جنسی: این روش صرفا برای میکرو ارگانیسم های یوکاریوت انجام می شود زیرا پروکاریوت ها جنسیت ندارند و در قارچ ها و پروتوزوئو سرها عمل است در این روش دو سلول باید از نظر توالی های اسید هسته ای یا ژنتیک در کروموزوم همخوانی نزدیک داشته باشند مثلا زئوسپورهای پنی سیلین را با اسپورهای سفالوسپورین مخلوط می کنند و کشت می دهند. این القا $2N$ کروموزومی است.

ب) القاء شبه جنسی: این روش القاح دو روش سوماتیک با $n2$ کروموزوم است بنابراین کراسینگ آدر ما بین کروموزمهای این سلول ممکن است انجام شود سلول بزرگ $4n$ کروموزومی است برای این کار در قارچ ها سلیم ها روی هم قرار می گیرند و تعادل ژنتیکی ایجاد می شود و سلول $4n$ کروموزومی ایجاد می شود.

ج) ترانسفورماسیون: این روش اولین بار اسپریتوکوکوس نومونیا کشف شد ولی امروزه این پدیده در بسیاری از سلول های حیوانی ، گیاهی- قارچ ، پروتوزوئومرها دیده می شود.

این روش در مهندس ژنتیک کاربرد وسیعی دارد در این روش همخوانی قطعه‌های ژن مهم نیست چون عامل پذیرنده لول می باشد.

د) کانجوگاسیون: در کانجوگاسیون باید ۲ سلول بسیار نزدیک و همخوان باشند سلول دهنده باید دارای پلاسمیدی بنام پلاسمید کابخو گاتیو باشد اگر این پلاسمید را نداشته باشد کابخوگاسیون انجام نمی گیرد پلاسمید کابخو گاتیو علاوه بر ژن‌های ساختاری کلاستر هم دارد (۱۴-۱۳) ژن ساختمانی دارد. که به آن ژن *tra* می گویند که بین این ژن‌ها پیل‌های کانجوگاتیو را در سلول دهنده ایجاد می کند که راس پیل‌ها کانجوگاتیو به سلول گیرنده متصل می شود از این طریق پیل‌های کانجوگاتیو پلاسمید منتقل می شوند.

در بعضی موارد پلاسمید کانجوگاتیو بصورت اپی زدم در می آید. یعنی در کروموزوم ادغام می شوند وقتی جدا می شوند قطعه‌ای از ژن کروموزوم را با خود حمل می کنند وقتی به سلول گیرنده منتقل می شوند این ویژگی را هم داخل آن می برد.

بوسیله ژن کابخوگاتیو ژن انسولین را به *E.Coli* اضافه می کنند و انسولین می سازند.

(ذ) ترانس واکنش: در این روش انتقال قطعه ژنی از کروموزوم یا پلاسمید یک باکتری به باکتری همخوان دیگر انجام می گیرد در طبیعت یک ژن از باکتری به باکتری می رود ژن باکتریوناز که کوچکتر است تکثیر می یابد و کروموزوم سلول می ترکد و قدرت تکه ژن را از دست می دهد. در حالیکه بعد باکتریوفاژ به مرحله لینک می رود و هزاران فاژ اخته می شود فاژی که سرودم آن کامل است فشار کامل نام دارد و ناژی که سرودم آن از فاژ است ولی ژنوم آن قطعه باکتری یا پلاسمید است سود و فاژ است که این دو فاژ کامل و سود فاژ می توانند باکتری دیگری را آلوده کنند در این روش باید دو سلول حتما از یک جنس باشد. *Ecali* - *ecail* دیگر می توان ویژگی را متصل کرد.

ه) ادغام پروتوپلاسم: به غیر از روش القاح جنسی که دو تا n کروموزوم را ادغام می شود تنها در این روش است که می توانیم کل کروموزومهای یک سلول را به سلول دیگر منتقل کرد اگر در سلول همخوان را مجاور یکدیگر قرار دهیم و اینها را به وسیله ماده ای ادغام می نمایند. غشاء سیتوپلاسمی این دو سلول در همدیگر فیوز یا ادغام می شود.

برای اولین بار در سال ۱۹۸۲ آلفوندی این روش را برای ادغام سلول های گیاهی بررسی کرد و امروزه این روش برای همه سلول نا قابل استفاده است.

ادغام با استفاده از ماده PEG (پلی اتیلن گلیکول) و روش فیزیکی انجام می شود با استفاده از دستگاه الکتروپور میزان معینی از PGC (برای اکتیو میت ۲۰٪ حجمی و برای قارچ ها ۴۰٪ حجمی و ...) که در نتیجه پروتوپلاسم بوسیله این ماده دارای حفره می شود و سیستم این کار روی شیکر انجام می گیرد و احتمال اینکه در سلول همخوان دارای حفره به هم برسند افزایش می یابد و غشاء در نتیجه نیوز می شود و سلول $n2$ کروموزومی ایجاد می شود دارندمان این کار ۶۰٪ است. در روش فیزیکی پرتو پلاسم را در معرض میدان الکتریکی متناوب با ولتاژ بالا قرار می دهند در نتیجه حفره در غشاء ایجاد می شود زمانیکه سلول های دارای حفره که ادغام می شوند را دنامان این روش الکتریکی (الکترو فورز) ۹۰٪ است. اولین گزارش ادغام پروتوپلاسم در سال ۱۹۲۵ توسط mellen ارائه شد و اکنون برای افزایش راندمان اکتیو میت های تولید کننده آنتی بیوتیک به کار می رود.

موارد استفاده از ادغام پروتو پلاسم: ۱-الحاق درون گونه ای سویه هایی که فراوانی نو ترکیبی در آنها پائین است هدف از این الحاق بالا بردن راندمان محصولات بیو تکنولوژی است.

۲-الحاق بین گونه ای برای بدست آوردن سویه های کاملاً جدید که بتواند متابولیت های اصلاح شده را نستز کند این روش برخلاف (اتخال ژن بوسیله پلاسمیر) و (انتقال ژنتیکی توسط فاژ) و (انتقال ژن بوسیله مستقیم) که فقط قطعاتی از مجموعه ژنی را منتقل

می‌کند و در پرتو پلاسما نیوژن تمام مجموعه ژنی منتقل می‌شود و به علاوه برای تبادل ماده ژنتیکی نیازی به حضور فاکتورهای باروروی (f) است و میتوان یک تا چهار ژنوتیت والدین را منتقل کرد.

در سال ۱۹۸۲ با این تکنیک تولید پنی سیلین از قارچ پنی سیلین کریزوژنوم به میزان ۵٪ افزایش یافت دو سویه جدیدی که از فیوژن *S.griseluseus* , *S.auerofaciens* بدست آمده بود که اثر مهار کنندگی استرپتوماسین بطور قابل ملاحظه کاهش و راندمان تولید ۲٪ افزایش یافت.

تهیه پروپلاسما: سلول های گیاهی را در بانر می گذارند و آنزیم های سلولاز- همی سلولاز- پکتیاز و آنتی بیوتیک و میکروز اضافه می نمایند اگر باکتری باشد از EDTA و آنتی بیوتیک و ساکروز استفاده می شود دلیل استفاده سوکروز و پروتوپلاسما را جدا می کنند. سپس با روش که قبلا گفته شد پروتلاسما را ادغام می کند (شیمیایی و فیزیکی)

مزایای ادغام پروتوپلاسما: در این روش می توان میزان بالائی از عوامل ژنتیکی را اضافه کرد و ویژگی سلول دو رگه کاملاً شناخته شده است می توان دو هسته را کنار هم گذاشت بطوریکه کروموزوم صدمه دارد نشود. و همچنین محدود به یک گروه از خانواده موجودات نیست. در تمام سلول های همخوان. راندمان این کار پیدا کردن سلول های دو رگه پائین است روش کار پیچیده تقریباً مشکل است و هزینه برات نگهداری سلول های دو رگه یا والد بسیار سخت است. کشت گران قسمت است و باید سلول ها همخوانی زیادی داشته باشند.

منابع و مآخذ

- ۱- آساد، محمد تقی. مبانی ژنتیک. دنیا، ۱۳۸۰.
- ۲- جبارپور بنیادی، حسین پور فیضی. ژنتیک انسانی و بیماری های ژنتیکی انسان. هنر و فرهنگ ۱۳۶۶.
- ۳- حق جو، مصطفی. بانک اطلاعات علمی-کاربردی. جلد اول، مفاهیم بنیادین، ویرایش سوم. دانشگاه علم و صنعت ایران. ۱۳۸۵
- ۴- حق جو، مصطفی؛ صفائی، علی اصغر. بانک اطلاعات علمی-کاربردی. جلد دوم، مفاهیم پیشرفته، ویرایش سوم. دانشگاه علم و صنعت ایران. ۱۳۸۵
- ۵- داورپناه، احمد؛ مهدی قلی خان رامین. مدیریت مدارک پزشکی، معاونت پژوهشی وزارت بهداشت، ۱۳۷۲
- ۶- شریفی بیدگلی، مینا و دیگران. "یک سامانه ذخیره سازی گرافی برای ذخیره داده-های همه گیری شبکه ای". نوزدهمین کنفرانس ملی سالانه انجمن کامپیوتر ایران، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ۱۳۹۲