

بسمه تعالی:

مبنای تکنیک های ژنتیک

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 میانگش 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. اگر چه باکتری ها و باکتریوفاژ ها هنوز هم پیچیده هستند اما نسبت به سلولهای جانوری و گیاهی سیستم ساده تری دارند، با استفاده از این سیستم های ساده بود که دانشمندان توانستند DNA را بعنوان مولکول حاوی اطلاعات ژنتیکی یک سلول معرفی کنند.

DNA در سال ۱۸۶۹ توسط میکشن در اسپرم ماهی شناسایی شد ولی عملکرد و اهمیت آن در سلول به عنوان مسئول صفات توارثی تا قرن اخیر نا شناخته ماند ساختار فیزیکوشیمیایی DNA توسط واتسون و کریک بدست آمد .

با فاصله زمانی کوتاه بعد از شناسایی DNA ساختار DNA شناخته شد که به عنوان ماکرو مولکول حد واسط مهم در سنتز آنزیمها و سایر پروتئین ها عمل می کند.

بدنبال این کشفیات شاخه جدید بنام ژنتیک مولکولی در اواخر دهه ۱۹۵۰ و اوایل دهه ۱۹۶۰ بوجود آمد که مفاهیم جدید را معرفی کرد موفقیت های اولیه و تجمع مقدار انبوه اطلاعات دانشمندان را قادر ساخت تا تکنیک های قوی و روش های منطقی را برای موضوعات گوناگون ژنتیک مولکولی و عملکرد عصب، عضله- عملکرد آنتی بیوتیک...) ارائه دهند.

اعتقاد به یک شکل ذاتی فرآیند های زیستی یک فاکتور مهم در زمینه رشد سریع شاخه ژنتیک مولکولی بر دانشمندان معتقد هستند که ساختار اصول بیولوژیکی که فعالیت ارگانیسم های ساده را هدایت می کند در مورد سلول های پیچیده نیز صادق هستند و فقط در یک سری جزئیات تفاوت دارند که این نظریه با یک سری نتایج آزمایشگاهی بدست آمده نیز مورد تأیید قرار گرفت.

ساختار DNA:

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

$$\text{DNA های دو رشته ای } \frac{G}{C} = 1, \frac{A}{T} = 1 \text{ و همواره } \frac{G+A}{C+T} = 1 \text{ است.}$$

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 Double Helix علت مارپیچ DNA است و جفت نوکلئوئید 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 جفت باز ۰.۳۴ nm در نتیجه زاویه های وپیچ ها دارای شیار بزرگ و کوچک است به آن قسمتی از DNA است که اگر از بیرون 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.

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 آبگیری B- DNA بدست می آیند در یک A- DNA در هر دور بجای ۱۰ تانوکلئوتید وجود دارد و قطری بجای ۲۰A-۲۳A درجه است مثل B- DNA راست گرد زاویه حدود ۳۴ است در اینجا هم شیار بزرگ و کوچک وجود دارد. ما در سلول هیرید RNA- DNA را مشابه A- DNA داریم. فرم B- DNA 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 ۱۸A 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 ۴۵A است. فرم های D,E,C هم فقط در شرایط آزمایشگاه ساخته شده اند.

فرم DNA:

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.

دسته بندی DNA

فشرده کردن DNA در فضاهای کوچکتر از خود DNA بسته بندی DNA می گویند که در یوکاریوتها اهمیت بیشتری دارد.

در این کار بوسیله پروفین هایی انجام می شود. پروتن 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_2A , H_2B , H_3 , H_4 هستند مولکولها ی 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 فشردگی دیده می شود.

یا غلظت نمک کم ساختمانی دیده می شود که قطر آن 10nm 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 گردن بند را نوکلئورد گویند که دارای پروتئین های هیستون است. در غلظت نمک بال گردن بند یک شکل پیچیده به نام سولئوئید به خود می گیرد که قطر آن 30nm است و بعد از حالت سلنوتندی کروموزوم در نتیجه پیچش بیشتر رخ میدهد.

توالی های DNA:

بیشتر توالی های Noncoding DNA هستند درصد کمی از ژنوم انسان بیان می شود که به آنها کودینگ می گویند و مابریخی از توالی هادر DNA اشاره می کنیم.
فامیل های ژنی پراکنده :

این توالی ها تکراری و فعال هستند انواع متعددی از پروئن ها بوسیله فامیلهای ژنی همولوگ که در سرتا 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)
کواتین 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.

رشته فامیل های ژنی پشت سر هم:

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

توالی های فعال فاقد کد:

تلومرها، 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.

توالی هایی که وظیفه آن ها معلوم نیست:

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 واحدهای 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 احتمالاً توالی های Alu بصورت نسخه های معکو از این مولکول ها RNA ناشی می شوند تکرارهای پراکنده کوتاه بینابینی 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 نبندند.

DNA فاصله دهنده:

دسته نهایی DNA. DNA ی 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.

ساختمان فوق العاده کروموزوم:

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 نوکلئوپروتین 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 پروتین 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.

۳- مدل نوکلئوزدم:

بخوبی تشخیص داده شده است که کروموزوم های یوکاریوتی از DNA و پروئین تشکیل شده ات تقریبا 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 یانوکلئوزدم ناحیه به نظر می رسد که کلئوزدم اساس ساختمان کروماتین را تشکیل می دهد. هر نوکلئوزدم 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 نوکلئوزدم از ۱۴۰ تا ۲۰۰ جفت نوکلئوتید بازکمیل شده هر نوکلئوزدم توسط ۱۵ تا ۱۰۰ جفت نوکلئوتید DNA رابط با DNA بین نوکلئوزدمی به دیگری متصل شده است قطر نوکلئوزدم حدود ۲۰۰ آنگستروم است.

کروموزوم های غول پیکر:

علاوه بر کروموزومهای دو کروماتیدی 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 کرومونا 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 نظر بیوشیمیایی محور کروموزوم از DNA و پروتئین تشکیل شده است قطر این محور بین ۳۰ تا ۵۰A است.

حکم مرکزی در ژنتیک مولکولی:

این حکم عبارت است از جریان انتقال اطلاعات به همراه جریان انتقال اطلاعات از DNA به RNA متدرینوزات ولی در DNA ذراکسی ریبوز و نیز تمیتن T در RNA با ادرایل U جایگزین شده بنابراین یک جریان یک سو به DNA از RNA و سپس پروتئین برقرار است. البته هزاران آنزیم در این حکم نقش دارند که بستگی به نوع سلول و بیان ژن مخصوص نقش هر یک متفاوت است.

ریبوزدم یک آنزیم مهم در این مورد است که نقش مهمی در پروتئین سازی دارد و MRNA بوسیله نشستن بر روی این آنزیم پروتئین سازی می کند. Tma هم نوعی RNA است که نقش انتقال اسیدهای آمینه را از سیتوپلاسم با توجه به رمزگان m RNA بر روی رینوزدم دارد.

تا بدینجا به مبنای کروموزومی دراشت پرداخته شده و اشکال و قوانین بنیادین برای تفهیم فن آوری های ژنتیکی که در فصل بعدی بدان ها می پردازیم.

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 تائید 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، خوچه هندی و خرگوش کمک های شایانی به این علم کردند و امروزه نیز از حیوانات میمون، اسب ... نیز در آزمایشگاه و کارگاههای تحقیقاتی استفاده می شود.

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 است.

کروموزوم های X,Y جزء کروموزومهای جسمی (اتوزدم) هستند که از آنها کروموزوم ۲ و ۳ متاسانتریک X,Y آکروسانتریک کروموزوم Y ساب متاسانتریک است.

محیط کشت مگس سرکه:

شامل آرد، شکر، آگار در آب حل کرده است که حرارت داده شده است و ۱۰ CC ماده اید پیورپیونیک به عنوان ماده نگهدارنده که مانع فاسد شدن و عفونت قارچی است به محیط اضافه شده مگس سرکه را در دمای ۲۵-۲۲ درجه برای ۱۴ روز در آن قرار می دهند تا تکثیر یابند.

سیکل زندگی مگس سرکه:

مگ سرکه در طول ۱۴ روز تکثیر می یابند جنس نر دارای اپرماتوروئید و ماده تخمک ات سلول تخم دارای منفذی بنام میکروپلای که دو بال آبی دارد مانع این می شود که تخم داخل محیط کشت شود. بعد از عمل لقاح تخم بارور شده بعد از ۱ روز تشکیل لارو می شود.

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 در بافت های داخل مگس سرکه کاملا

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.

اهمیت مگس سرکه در تحقیقات:

این موجود دارای ژنوم کوچک است و کار را راحت می کند و همچنین دارای سیکل تکثیر و

بالغ شدن کوتاه و تعداد زاده های زیاد است (قوانین امتحانات منزل را هموار می کند) و

همچنین محیط کشت ارزان قیمت دارد و بنابراین اهمیت زیادی در تحقیقات دارد.

گلوگاه تحقیقات بیوتکنولوژی:

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 اخیرا 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.

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 واریافت 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 آن 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 ژن های متعدد تصویر بزرگتری را نشان خواهد داد.

۴- تجزیه میکروسکوپی ساختمان و حرکت کروموزومها جزء انفکاک ناپذیر است اما تکنولوژی های جدید راههای جدیدی را برای نشان کردن ژن ها 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 روش های متعددی از جمله کلون کردن استفاده می شود کلون کردن روشی است که توسط یک ژن منفرد را می توان جدا و تکثیر کرد. تا یک نمونه خالص برای تجزیه بدت آید بعد از آنکه کلون های یک ژن بدست آمدند می توان توالی نوکلئوتیدی آن را بدست آورد و لذا اطلاعات مهمی درباره ساختمان و فعالیت آن بدست آورد

بعلاوه می توان از ژن های کلون شده بعنوان کاوشگرهای بیولوژیکی استفاده کرد برای کلون کردن ژنی را که قرار است تکثیر شود به یک کروموزوم کوچک ملحق می کنند. و به این کروموزوم اجازه داده می شود همانند سازی کند و قطعه ژن مورد نظر را تکثیر نماید این کروموزوم کوچک را ناقل گویند ناقلهایی که معمولا به کار می روند پلاسمید هستند پلاسمید ها مولکولهای DNA اضافی و غیر لازمی هستند که بطور طبیعی در بسیاری از باکتری ها یافت می شوند.

DNA یک موجود را می توان بداخل یک ناقل وارد کرد سپس این ساختار هیبرید را وارد یک سلول باکتری سازی می کند و کشت زاید از این سلول بوجود می آید سپس ناقل و ژن ملحق شده را از سلولهای پاره شده جدا می کنند و برای مطالعات مربوطه به کار می برند.

پلاسمید:

حدود یک بیستم کروموزوم باکتری است معمولا 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 پروتئن هایی نظیر هیستون است زمانی که سلول فعال است سوپر کویل بصورت حلقوی در می آید.

پلاسمید ها انواع مختلفی دارند مثل پلاسمیدهای کابخوگاتیو (F) یا مقاوم به آنتی بیوتیک (R) تولید کننده توکسین ، تولید کننده باکتریوسین و ... پلاسمیدهای کابخو گایتو غالبا وزن مولکولی بالائی دارد و تعداد در سلول کم ات پلاسمیدهای غیر کابخوگاتیو به تعداد ۴۰-۱۰ پلاسمید 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 PBR-۳۲۲ 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.

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 موردنظر 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.

تهیه پلاسید مصنوعی:

ابتدا قطعات ژن مورد نظر را از کروموزوم، پلاسید ژنوم و 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 پرنین 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 پلاسید باید پلاسیدی را یافت که با همان آندونوکلئاز پاره می شود و بعد ژن و پلاسید را به یکدیگر متصل می کنند بالیگاز ترمیم صورت می گیرد. مهمترین پلاسید مصنوعی ۳۲۲ PBR 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.

کشف مولکول های بخصوص DNA و RNA و پروئین:

نظر به اینکه ماکرو مولکول های اصلی ژنتیک DNA و RNA و پروئین هستند اغلب هدف از تجربه ژنتیکی کشف مولکول 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 بعنوان 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 مولکول 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. کاوشگر تک رشته ای توالی DNA مکمل خود را پیدا کرده است و با آن جفت می شود بعنوان مثال:

پروب (کاوشگر) TaGGCAGCG

قطعه ژنومی ACTAATCCTAGCTTA

۲- 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 بادهای استفاده می شود زیرا آنتی بادی دارای یک رابطه قفل و کلید با آنتی ژن خود است مخلوط پروتئین را الکتروفورز می کنیم و سپس بر روی غشاء لکه گذاری می شود. (این روش لکه گذاری وسترن گویند)

مکان یک پروتئین 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 آنتی بادی حمل می کند آشکار می شود.

روش Genesoft :

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 ارگانیم را چنان مختل می نماید که سلول را وادار به خود کشی می کند. امروزه این روش توسط شرکت های دارویی 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.

تکنیک microarray :

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 جنس 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 ژن های مشابه در موجودات خویشاوند می توان نوتتیپی کروموزومی در دوره تکامل را استنتاج کرد بلاخره 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 نقشه های ژنتیکی نشانگرهای روی نقشه ها ژنهایی با الل های متنوع بودند که تفاوت های فنوتیپی قابل کشفی را بوجود می آورند با پژوهشهای بیشتر بر روی موجودات از تعداد بیشتری از این ژن ها می توان بعنوان نشانگر بر روی نقشه ها استفاده کرد. اما حتی در موجوداتی که نقشه آنها پر از کلویهای دارای اثرات فنوتیپی مشخص است اندازه گیری نشان داده است که فاصله های کروموزومی بین ژن ها می بایستی دارای مقدار وسیعی از DNA باشد. این فاصله ها را نمی توان 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 فاصله ها استفاده کرده یک نقشه شفاف تهیه نمود این نیاز توسط کشف نشانگر های مولکولی متعدد بر طرف شد.

یک نشانگر مولکولی یک ناحیه هیتروزیگوستی برای بعضی از انواع تغییرات DNA خاموش است که ارتباطی با تغییرات فیوتیسی قابل اندازه گیری ندارد. چنین لکوس DNA ی اگر هتروزپگوت باشد می توان از آن برای تحلیل نقشه یابی درست مثل یک جفت ال هتروزپگوت 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 ژن های دارای فیوتیپ معلوم را پر می کنند لازم به ذکر است که در نقشه یابی خود اهمیت بیولوژیکی نشانگر DNA مورد توجه نیست فقط ناحیه هتروزپگوت 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.

استفاده از RFLP در نقشه یابی:

آنزیم های برشی باکتریائی 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 ۳، ۲، ۱ کیلو بازر نشاندار خواهد کرد.

یک فرد دیگر برای قطعه بلند باید همزیگوت باشد و در دورگ گیری ساوترن فقط باند ۳- kb را نشان خواهد داد.

همولوگ ۱

همولوگ ۲

این شکل های چند گانه این ناحیه، یک چند شکلی طول قطعه برشی را نشان خواهد داد که به آن RFLP گویند در تلاقی دو فردی که قبلا بیان شد نیمی از نتایج هنگام کاوشگری سر قطعه و نیم دیگر طبق قانون یکسان مندل مثل یک ژن یک قطعه نشان خواهند داد. بنابراین یک RFLP را می توان مثل هر ناحیه کروموزومی دیگر نقشه یابی کرد وضعیت زیر پیوستگی RFLP را می توان مثل هر ناحیه کروموزومی دیگر نقشه یابی کرد وضعیت زیر پیوستگی RFLP هتروزیگوت را نسبت به یک ژن هتروزیگوت نشان می دهد بطوریکه D با وضعیت جفت دسیس پ دارای شکل یک با اضافه دو است.

کراسنیگ اوربین این نواحی محصولات نو ترکیبی را بوجود می آورد که بصورت ۳-D و ۲-d قابل کشف هستند در این صورت، یک کلوس RFLP را می توان در ارتباط با ژن ها یا سایز نشانگر های مولکولی نقشه یابی کرد.

استفاده از چند شکلی VNTRS ها در نقشه یابی:

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 هتروزیگوت هستند را می توان کشف کرد و ناحیه هتروزیگوت را می توان بعنوان یک نشانگر در نقشه یابی بکار برد. کاوشگری که به DNA تکراری متصل شود مورد نیاز است مثال زیر از نواحی هدف آنزیم برشی که خارج از شعاع تکراری هستند استفاده می کند 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 می توان از این ناحیه هتروزیگوت در نقشه یابی استفاده کرد.

نقشه یابی پیوستگی با نو ترکیبی در انسان:

انسان دارای هزارها فنوتیپ ارثی اتوزومی است و براحتی می توان ژن های کنترل کننده این فنوتیپ ها را با استفاده از تکنیک های تعیین نقشه کرد اما نقشه یابی این لکوس ها به دلایل متفاوتی به آهستگی پیشرفت کرده است اول اینکه نمی توان از تلاقی های کنترل شده در انسان استفاده کرد.

نو ترکیبی یکی از عوامل نشان دهند ه پیوستگی ژن ها یا مستقل بودن و عدم آن است و در صورت پیوسته بودن به وسیله قوانینی که در اینجا بدان نمی پردازیم می توان حتی فاصله آن

ها را بدست آورد در نو ترکیبی هایی که نبت والدین (P) و نو ترکیب ها (R) مساوی باشد آن دو ژن متصل اند یعنی بر روی کروموزوم های متفاوت قرار دارند اگر این $R=0$ باشد فاصله دو ژن صفر است دو ژن ها پیوسته هتند و حالت سوم پیوسته ژن ها را نشان می دهد 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.

T در اینجا حالت نو ترکیبی است که هم والدینی داریم و هم نوکلوتدی تعدادی حالت ها برای محاسبه فراوانی نو ترکیبی از روی هیبریدهایی استفاده شده است که بصورت شانس به وجود آمده اند

بررسی ژن های پیوسته:

الف) محاسبه فاصله ژن های پیوسته: اگر بر اساس فراوانی نو ترکیب باشد به آن نقشه ژنتیکی گویند.

ب) محاسبه نقشه فیزیکی: تعداد جفت نوکلئوتیدها که واحد آن سانتی مورگان است $r = 1cm = 10^6 pb$ که اگر نو ترکیبی $\% 50$ باشد دو ژن مستقل که قابل تشخیص نیست و اگر نو ترکیبی کمتر از $\% 50$ باشد باید از فرمولها خاص استفاده کرده و فاصله را بدست آورد.

ج) نقشه پیوستگی: هنگامیکه تعداد ژن های پیوسته از دو تا بیشتر باشد یعنی ترتیب ژن های پیوسته روی کروموزوم از روی فاصله آنها از یکدیگر محاسبه می شود.

البته در مورد ژنوم انسان این روش ها متداول نیست زیرا آمیزشهای مشابه تست کراس در انسان به شدت نادر است دوم اینکه نتایج حاصل از آمیزش های انسانی معمولاً کوچک هستند و لذا بدست آوردن داده های کافی برای محاسبه فواصل نقشه، قابل اعتماد مشکل است سوم

آنکه ژنوم انسان بسیار بزرگ است که بدان معناست که بطور متوسط فواصل بین ژنهای شناخته شده بزرگ است نشانگرهای DNA برای تهیه نقشه کروموزوم های انسان مفید بوده اند.

نقشه یابی کروموزوم X :

معمولا 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 ژن های وابسته به کروموزوم X همی زیگوت هستند و درست مثل مگس رکه اگر فقط به نتایج نر یک ماده دی هیبرید نگاه کنیم براحتی می توان از نتایج گامتی آن نمونه گیری کرد بعبارت دیگر یک تست کرا تقریبی انجام داده ایم . مثالی را در نظر بگیریم که در آن الل های 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 مبتلا (cg/y) با یک زن طبیعی که مطمئنا 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 دمیوز 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.

روش های محاسبه نقشه ژن ها:

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)

نقشه یابی با درگه گیری در **Mapping by in situ hybridization**

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 فلورسنت استفاده می شود در فرآیند درگه گیری در جا با فلورسنس کلو با رنگ فلورسنت 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 رنگ 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 صورتیکه کوچکی کروموزوم ها برای تفکیک PFGE کافی باشد می توان با هیبریداسیون از باندهای DNA روی ژل جهت تعیین مکان ژن های 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.

انتساب ژن ها به کروموزوم:

روش هیبریداسیون سلول بدنی به طور گسترده در تهیه نقشه ژنومی انسان به کار رفته است اما اصولاً می توان از آن در سیستم های حیوانی مختلف استفاده کرد در این روش از سلول های در حال رشد در محیط کشت استفاده می شود ویروسی بنام سندائتی ویژگی سودمندی دارد که تهیه نقشه ژنتیکی را امکان پذیر می سازد هر ویروس سندائتی دارای چندین نقطه اتصال است بدین ترتیب که می تواند به طور همزمان به دو سلول که به طور اتفاقی در مجاورت همدیگر

قرار می گیرد بچسبد معهذاً در مقایسه با یک سلول یک ویروس خیلی کوچکتر است بطوریکه دو سلولی که به ویروس چسبیده اند در واقع خیلی نزدیک بهم نگه داشته می شوند در حقیقت ممکن است غشاهای دو سلول ادغام گردند و ترکیب شوند. و یک سلول دو هسته ای هترو کاریون بوجود آید.

اگر کشت های تعلیقی از سلول های انسان و موش در حضور ویروس سندائتی که بوسیله نور ماورا بنفش غیر فعال شده با هم مخلوط شوند ویروس می تواند بعنوان واسطه برای الحاق سلولهای این گونه های مختلف عمل نماید زمانیکه سلول ها ترکیب شدند متعاقباً هسته ها ترکیب می شوند تا یک لاین سلولی تک هسته ای متشکل از هر دو دسته کروموزومی موش و انسان تشکیل شد از آنجائیکه کروموزم های انسان و موش از لحاظ تعداد و شکل با هم تفاوت های زیادی دارند در سلول های هیبرید می توان از این دو دسته را به راحتی از هم تشخیص داد با این وجود در دور بعدی تقسیمات سلولی برل یل ناشناخته کروموزوم های انسان به تدریج به طور تصادفی از هیبرید حذف می شوند شاید این فرآیند با پدیده هابلو شری شدن در قارچ آسپرژیلوس مشابهت داشته باشد.

با روشهایی می توان مانع از دست رفتن کروموزوم انسان شد در نتیجه تشکیل یک هیبرید جزئی پایدار را ترغیب نمود سلول های موش مورد استفاده از لحاظ برخی از فعالیت های بیوشیمیایی جهش یافته اند بنابراین اگر این سلول ها قادر به رشد گردند فعالیت بیوشیمیایی از دست رفته می بایست توسط ژنوم انسان تامین شده باشد این روش انتخابی موجب بقای سلول های هیبریدی می گردد 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 کروموزوم های انسان حامل الل نوع وحشی هستند که در ژنوم موش کمبود آن وجود دارد.

حال ژن های خاصی مورد بحث قرار می گیرد که عمل اجرای سیستم انتخابی را امکان پذیر می سازد. DNA دو سلول از طریق دنو یا از مسیر نجاتی که از اسکلت مولکولی موجود استفاده می کنند ساخته می شود روش انتخابی مستلزم استفاده از یک ماده شیمیایی به نام آمینو پترین است که مسیر سنتز جدید را متوقف می نماید و نستر DNA را به مسیر نجات منحصر می سازد در این سیستم دو آنزیم نجات دهنده به نحویکه واکنش زیر نشان داده شده است ضروری می باشد.

اسید تمیدلیک

اسید اینوسینیک

این سلولی الحاق یافته موش از لحاظ ژنتیکی قادر به ساختن تمیدین کیناز (TK) نیست زیرا از نظر الل tk⁻ خالص است در صورتیکه لاین سلولی انسان از نظر ژنتیکی قادر به ساخت HGPRT نیست زیرا در مکان ژنی دیگری برای الل hgprt خالص است بنابراین ژنوتیپ دولانین سلول الحاق یافته بصورت زیر می باشد.

چون هر کدام از لاین های سلولی از نظر یک آنزیم دچار کمبود هستند نه سلولهای موش و نه سلولهای انسان به تنهایی قادر به ساختن DNA نیستند در سلول های هیبرید tk⁺ دچار مکمل hgprt و لذا از این سلول ها می توانند هر دو آنزیم را بسازند بنابراین DNA ساخته شده و سلول ها می توانند تکثیر یابند اکثر کروموزم های انسان از کشت های سلولی هیبرید حذف شوند زیرا از دست رفتن آنها اثری بر توانایی رشد کشت ها ندارند اما یک هیتر کشت

برای ادامه رشد در محیط های حاوی هایپوزانین، آمینوپترین، نمیدین (محیط HAT) باید حداقل یکی از کروموزم های انسان که حامل ال TK باشد را محفوظ نگه دارد.

خوشبختانه می توان حذف تدریجی کروموزم های انسان از لاین های سلولی الحاق یافته را در زیر میکروسکوپ تعقیب نمود زیار کروموزمهای موش به آسانی از کروموزومهای انسان قابل تمایز می باشند بعلاوه رنگ آمیزی های کروموزومی از قبیل کونیا کربن و گمیسا الگوی باند شدن بین کروموزمها را آشکار می سازند 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 نسبتا 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 پروتئن 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.

نقشه یابی کروموزوم:

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 کروموزومها 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 کروموزوم آزاد شده با شد این اسپری از میان اشعه های لیزری همراه با تحریک بوسیله فلورسنت عبور داده می شود هر کروموزوم علامت فلورسنت خاص خود را که به صورت الکتورنیکی شناخته می شود تولید می کند و دو ظرف پتری حفره دار مسیر قطره محتوی کروموزوم دیگری مورد نیاز را بدخل یک لوله هدایت و آن را جمع آوری می کنند آنگاه نمونه ای از یک کروموزوم معین مورد مطالعه به سلول های موش اضافه می شود کروموزومهای انسان بوسیله سلول های جوئده موش احاطه گردیده و تمامی آنها با قطعاتی از آنها در هسته جوئده داخل می شود سب همبستگی بین کروموزومهای انسان یا قطعات آنها و نشانگر های انسانی بدست می آید.

هر قدر دو نشانگر روی یک کروموزوم بهم نزدیکتر باشند بیشتر با هم منتقل می شوند. روش دیگری است که انتقال ژن با ادغام در طی پرتو تابی (IFGT) نامیده می شود نوعی بسط روش

فوق ات که جهت تولید نقشه هایی با دقت و ظرافت بالاتر از نشانگرهای مولکولی در طول قطعه قطعه شدن کروموزوم پرتو تابی می شوند سپس سلول های پرتو شده با سلول های موش جهت تشکیل یک پانل از هیبریدهای مختلف آموزش داده می شوند. در این حالت هیبریدها ترتیبی از قطعات کروموزوم های انسان را دارا می شوند اگر چه اکثر قطعات درد اخل کروموزمهای موش ادغام شده اند اما کروموزمهای ناقص انسانی نیز یافت می شود ابتدا دوام انواع نشانگر های مولکولی در هیبریدها محاسبه می شوند.

مرحله بعدی محاسبه فراوانی با دوام با هم بودن جفت های نشانگرهای مولکولی انسان است فرض بر این است که فراوانی دوام توام نشانگرهای کاملا پیوسته بالا باشد زیرا احتمال اینکه شکستگی بوسیله پرتو تابی بین این مکانها رخ دهد کم است و فورنشانگرهای دور از هم و نشانگرهای روی کروموزوم های مختلف بایستی کمتر باشد تا فراوانی بالای دوام توام نشانگرد ر هر فرد حفظ گردد.

یکی از مزایای این روش اندازه نمونه است تعداد زیادی از هیبریدهای پرتو تابی شده را می تان به آسانی مورد آزمون قرار داد.

نو ترکیبی و اصلاح نژاد:

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 موناسیون و نو ترکیبی این دو روش هستند همانطور که قبلا به موتاسیون های اشاره شد موتاسیون ها در طبیعت بطور خود بخود حدود ۱ از هر 10^9 باکتری است که در پاساژهای مکرر در مورد باکتری ها در هر کلوی یک باکتری موتان بدت می آید از موتاسیون های القائی

نیز برای ایجاد موتاسیون و ایجاد سوش و نمونه های سازگارتر استفاده می شود که قبلا از عوامل القای موتاسیون 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 پروتوزئو 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 زئوسپوره های پنی سیلین را با اسپوره های سفالوسپورین مخلوط می کنند و کشت می دهند. این القا $2N$ کروموزومی است.

ب) القاء شبه جنسی: این روش القاح دو روش سوماتیک با $2n$ 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 سلیموم 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، پروتوزئومرها دیده می شود. این روش در مهندس ژنتیک کاربرد وسیعی دارد در این روش همخوانی قطعه های ژن مهم نیست چون عامل پذیرنده لول می باشد.

د) کانبوگاسیون: در کانبوگاسیون باید ۲ سلول بسیار نزدیک و همخوان باشند سلول دهنده باید دارای پلاسمیدی بنام پلاسمید کانبوگاتیو باشد اگر این پلاسمید را نداشته باشد

کابخوگاسیون انجام نمی گیرد پلاسید کابخو گاتیو علاوه بر ژن های ساختاری کلاستر هم دارد (۱۳-۱۴) ژن ساختمانی دارد. که به آن ژن tra می گویند که بین این ژن ها پیل های کانبجوگاتیو را در سلول دهنده ایجاد می کند که راس پیل ها کانبجوگاتیو به سلول گیرنده متصل می شود از این طریق پیل های کانبجوگاتیو پلاسید منتقل می شوند.

دربعضی موارد پلاسید کانبجوگاتیو بصورت اپی زدم در می آید. یعنی در کروموزوم ادغام می شوند وقتی جدا می شوند قطعه ای 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 پلاسید 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 ان کامل است فشار کامل نام دارد و ناژی که سرودم آن از فاژ است ولی ژنوم آن قطعه باکتری یا پلاسید 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-Ecali 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 کروموزومها ی 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 ۲n کروموزومی ایجاد می شود دارندمان این کار ۶۰٪ است.

در دروش 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 mellon 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 (اتحالی ژن بوسیله پلاسمیر) و (انتقال ژنتیکی توسط فاژ) و (انتقال ژن بوسیله مستقیم) که فقط قطعاتی از مجموعه ژنی را منتقل می کند و در پرتو پلاسم نیوژن تمام مجموعه ژنی منتقل می شود و به علاوه برای تبادل ماده ژنتیکی نیازی به حضور فاکتورهای باروری (f) است و میتوان یک تا چهار ژنوتیپ 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. auerofaciens* , *S. griseus* بدست آمده بود که اثر مهار کنندگی استرپتوماسین بطور قابل ملاحظه کاهش و راندمان تولید ۲٪ افزایش یافت.

تهیه پروپلاسم:

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 ساکروز و پروتوپلاسم را جدا می کنند. سپس با روش که قبلاً گفته شد پروتلاسم را ادغام می کند (شیمیایی و فیزیکی)

مزایای ادغام پروتوپلاسم:

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:

محدودیت ادغام پروتوپلاسم:

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.

روش Microzng action:

این روش میکروسکوپی نام دارد سلول را به داخل میکروسکوپ تزریق می نمایند سلول داخل مانیتور می آید. سپس هر ژنی که بخواهند داخل این سلول تزریق می نمایند این کار از طریق سرنگی تزریق می شود.

ی(مهندسی ژنتیک):

این روش عملیاتی است که می توانیم به نژادی دست یابیم که طبیعت بعد از قرن ها تکامل بدان دست نیافته است مهندسی ژنتیک قسمتی از اصلاح نژاد است.

اتصال قطعه ای DNA غریبه به کشیدن در یک سلول که در نسل های دیگر باز شود را مهندسی ژنتیک می گویند زمانیکه آندو نوکلئاز ها شناسایی شدند این علم پی ریزی شد در سال ۱۹۶۲ دانشمندان متوجه شدند که سلول ها آنزیم هایی دارند که باید فسفر و شکر را در

یک توالی خاص بشکنند یعنی DNA دو رشته ای را در یک نواحی خواص بشکنند.

آندونوکلئاز دو نوع هستند یکی محدود و دیگری، نامحدود نام دارند.

آندو نوکلئازهای محدود توالی خاصی را شناسایی می کنند و نامحدود ها تمام توالی ها را می شکنند و بصورت پرو آنزیم ساخته می شوند تا بحال بیش از ۳۰۰ نوع آندو نوکلئاز ساخته شده است.

آنزیم $ECOR_1$: یک آندو نوکلئاز است این آنزیم می تواند DNA را در توالی G-A-A-T-...T-C...C-T-T-A-A-۶

می شکنند و مقاوم به پنی سیلین است.

آنزیم های مورد نیاز مهندسی ژنتیک:

لیزوزیم (برای شکست دیواره باکتری) از بین بردن DNA زمانیکه بخواهیم RNA را خالص کنیم RNAase برای خالص کردن DNA آندونوکلئازهای محدود $ECOR_1$, HAEIII, BAMH, DNA لیگاز (مسئول ترمیم DNA پیوندهای کووالانسی بین شکر و فسفات)

DNA گیراز (سوپر کویل ها را باز می کند) فسفات از قلیایی (از انتهای ۵ درز غیره فسفات را برمی دارد ولی این دو رشته بهم وصل نمی شوند) ترمینال ترانسفر از (جهت اضافه کردن با پورین یا پیریمیدین به انتهای ۵ یا ۳ رشته)

آنزیم RT (زمانیکه بخواهند از Mrvd DNA بسازند)

پلیمراز (از باسیلوس ترمومیلوس اکرا یس گرفته میشود.)

دستگاههای مورد نیاز مهندسی ژنتیک

دستگاههای اسید آمینه آنالیزور DNA, RNA آنالیزور (از پروئین ها a.a اسید آمینه) می دهد و اسید های نوکلئیک . نوکلئوتید می دهد و غیره بر می دارد. ۲- دستگاههای سازنده

DNA, RNA

۳- PCR تکثیر DNA را انجام می دهد.

۴- SDS-PAG ژل الکتروفورز که DNA یا RNA یا پروئین را بر حسب وزن مولکولی اش اندازه گیری می کند.

۵- اولترانیریفوژ

۶- ایمنوبلوت

۷- ژن گان (رلگ ژن)

۸- الکتروپور (ادغام پروتوپلاسم در میدان الکتریکی)

۹- ماکرو اینجکشن (تزریق میکروسکوپی)

جفت شدن باکتریایی:

جفت شدن یعنی فرآیندی که با DNA سلول های باکتریایی از طریق تماس سلول به سلول انتقال یابد اولین بار در سال ۱۹۶۴ توسط کار آزمایشی ساده و ظریف جا شوالدوربرگ و دارد تاتوم با استفاده از دو نژاد از باکتری E.Cail که نیازهای غذائی متفاوتی داشتند پاسخ داده شد.

در جفت شدن همواره باکتری دهنده ژن است و دیگری گیرنده ژن می باشد این عامل باروی را (F) نامیدند.

نژاد دهنده همواره نر و نژاد گیرنده ماده نامیده می شود البته این نوع انتقال ژن تولید مثل جنسی نیست در انتقال ژن باکتریایی یک موجود اطلاعات ژنتیکی را از یک دهنده بدست می آورند. به عنوان گیرنده با آن اطلاعات تغییراتی را پیدا می کند در تولید مثل جنسی دو موجود برای تشکیل موجود سوم جدید به جلو مساوی دهنده اطلاعات ژنتیکی می باشند اما فقط در موارد نادری یکی از دهنده ها تغییر می یابند نر بودن یا قابلیت دهندگی خود یک حالت ارثی است که توسط یک عامل باروری (F) اعمال می شود ماده ها فاقد عامل F بوده و از این رو گیرنده هستند بنابراین ماده ها را با F- و ندها را با F+ نامگذاری کردند.

انتقال F در طی جفت شدن:

ژنوتیپ های نو ترکیب برای ژن های نشانگر در تلاقی های باکتریایی نسبتاً نادر هستند عامل R ، F ظاهراً در طی تماس فیزیکی جفت شدن به صورت موثری انتقال می یابد. به نظر می رسد که نوعی انتقال آلوده کننده از عامل F اتفاق می افتد. امروزه اطلاعات بیشتری در باره فرآیند جفت شدن و عامل F وجود دارد که نمونه ای از آن یک پلاسمید F ساخته شدن پیلی ها یعنی زائدی که تماس با دریافت کننده را آغاز می کنند هدایت می کنند و آن را نزدیک می کنند تا DNA از طریق منفذها به سلول دریافت کننده عبور کنند یکی از رشته های دابل DNA منتقل می شود سبب همانند سازی رشته مکمل را در دهنده و گیرنده بر می گرداند این همانند سازی سبب می شود که یک نسخه از F دهنده بماند و دیگری درگیرنده ظاهر می شود.

HFR یک نژاد نر F و یک سلول F منفی قسمتی از کروموزوم با F منتقل می شود شکستگی تصادفی قبل از انتقال کروموزوم مانع از انتقال است قطعه کروموزومی می تواند مجدداً با

کروموزوم دریافت کننده ترکیب شود پر واضح است که میزان پائین انتقال نشانگر کروموزومی که توسط لدربرگ، تاتوم در تلاقی F مقبت و F منفی مشاهده شد را می توان بوسیله وجود سلول Hfr نادر به جمعیت توضیح داد. هنگامیکه این سلول ها جدا سازی و خالص شوند در این صورت می توانند نشانگر های کروموزومی را با فراوانی زیاد منتقل کنند زیرا هر سلول یک Hfr است.

عامل R :

قابلیت بیماری زائی باکتریها در سال ۱۹۵۰ در بیمارستانهای ژاپن کشف شد اسهال خونی باکتریایی توسط باکتری های جنس شیژلا بوجود می آید ابتدا ثابت شد که این باکتری به دامنه وسیعی از آنتی بیوتیکها که برای کنترل بیماری به کار می روند حساس است و در بیمارستانهای ژاپن ها باکتری شیژی از بیماران از قبیل اسهال خونی جدا شده و ثابت شد که همزمان به بسیاری از داروها از قبیل پنی سیلین ، تتراسایکلین، سولفانیل آمیده ، استرپتوماسین و کلارمفیکل مقاوم است.

این منوتیپ مقاومت به چند دارو بصورت یک بسته ژنتیکی منفرد به ارث می رسد و می تواند از طریق انتقال تماسی نه تنها به سائز نژادها ی شیژی بلکه به باکتری های گونه های دیگر نیز سرایت می کند این تعداد برای یک باکتری بیماری زا فوق العاده مفید است و معنی آن برای علم ژنتیک وحشتناک است این خصوصیت از نقطه نظر ژنتیکی جالب توجه است ناقلی که حامل این مقاومت ها از سلولی به سلول دیگر است یک عنصر خود همانند ساز شبیه فاکتور F است و آنها فاکتور R نامیدند. از طریق جفت شدن سلول ها درست مثل فاکتور F ، E.Cal منتقل می شوند.

در واقع فاکتور های R اولین فاکتور های مشابه فاکتور F بودند که کشف شدند این عناصر که در سیتوپلاسم به حالت پلاسید وجود دارند ژن های مختلفی را در باکتریها حمل می کنند.

نو ترکیبی بین ژن های نشانگر بعد از انتقال :

تا اینجا تنها به فرآیند انتقال اطلاعات ژنتیکی بین افراد در یک تلاقی پرداخته شد این انتقال از طریق نو ترکیب حاصل از تلاقی حاصل می شود. با این وجود قبل از اینکه نو ترکیب پایداری ایجاد شود در ژن های انتقال یافته باید از طریق یک راه کار تبادلی در ژنوم گیرنده استقرار یابند اکنون برخی از خصوصیات ویژه این رویداد تبادل در نظر می گیرند.

در پروکاریوت ها تبادل ژنتیکی بین دو ژنوم به طور کامل صورت نمی گیرد بلکه به جای آن تبادل ژنتیکی بین یک ژنوم مربوط به F منفی موسوم به اندژنوت و یک ژنوم ناقص مربوط به دهنده به نام اگزوژنوت صورت می پذیرد آنچه حاصل می شود در حقیقت یک مروزیگوت یا پیلوئید ناقص است ژنتیک باکتریائی ژنتیک مروزیگوس می باشد.

در اینجا وقوع یک یا چند کراس اورم نبرد در ایجاد نو ترکیب های زنده چندان مفید نیست زیرا یک کروموزوم حلقوی شکسته می شود تا یک کروموزوم ناجور دیپلوئید ناقص خطی شکل بگیرد برای حفظ حلقه سالم باید تعداد کراسی اورها زوج باشد. منطقه تولید شده در چنین کراس اوری تنها بخشی از ژنوم را تشکیل می دهد که معمولا در طی رشد سلولی بعد ی از بین می رود بنابراین هر دو محصول متقابل نو ترکیبی باقی می مانند پس خاصیت منحصر به فرد تبادلی باکتریائی آن است که تبادل بصورت یکطرفه است و باید محصولات تبادل متقابل را در بیشتر موارد به فراموشی سپرد.

ژنتیک باکتریوفازها:

همانطور که قبلاً گفته شد باکتریوفازهای زیادی در انتقال ژن نقش مهمی ایفا می کنند بسیاری از باکتری ها نسبت به حمله باکتریوفازها که بطور تحت اللفظی باکتری خوار معنی می دهند حساس هستند یک فاز متشکل از یک کروموزوم اسید نوکلئیک (DNA, RNA) است که با پوششی از مولکول های پروئین احاطه شده است مجموعه نژادهای فازی که در آنها مطالعات زیادی صورت گرفته است بصورت T_1 , T_2 و غیره شناخته می شوند.

به هنگام آلودگی فاز به باکتری حمله می کند و ماده ژنتیکی خود را به داخل سیتوپلاسم باکتریایی تزریق می نماید. سپس اطلاعات ژنتیکی فاز از طریق متوقف نمودن ساخت اجزاء باکتریایی به کارگیری مواد ساخته شده باکتری در جهت ایجاد بیشتر اجزاء فاز دستگاه سلولی باکتری را در اختیار می گیرد. نهایتاً وقتی دیواره سلولی باکتریایی با پارگی باز شد نسل های فازی زیادی آزاد می گردند فرآیند پاره شدن و باز شدن را انهدام (لیز شدن) می گویند اما در حالی که فازها آن قدر کوچک هستند که تنها در زیر میکروسکوپ الکترونی قابل رویت می باشند چگونه می توان وراثت آنها را مطالعه نمود. در این حالت نمی توان کشت کلونی قابل مشاهده ای را تولید نمود اما با بهره گیری از چند خصوصیت فازها می توان تجسم قابل مشاهده ای از آنها را در باکتری های آلوده شده فراهم ساخت بعد از انهدام فازهای نتایجی باکتری های مجاور آلوده می سازند.

این یک پدیده انفجاری غائی است این پدیده یک افزایش به شکل تابع نمائی در تعداد سلول های مفهوم شده بوجود می آوریم پانزده ساعت پس از شروع آزمایشی از این قبیل اثر آن برای چشم غیر مسلح قابل رویت می شود. بدین ترتیب که ناحیه ای روشن یا پلاک روی چمن کرد باکتری ها در روی سطح محیط کشت جامد ظاهر می شود. بسته به ژنوم فاز این پلاک بزرگ

یا کوچک صاف یا موج و غیره هستند بنابراین ظاهر پلاک خصوصیتی از فاژ است که قابل تجزیه و تحلیل می باشد. فنوتیپ دیگری از فاژها که از نظر ژنتیکی قابل تجزیه می باشد دامنه میزبانی نام دارد زیرا فاژها از نظر طیف نژاد های باکتریائی که قادر به آلوده سازی و انهدام آن ها هستند با هم فرق دارند مثلا نژادهای خاصی از باکتری ها در برابر جذب یا تزریق فاژها ایمن می باشند.

فاژهای اتصال دهنده عمومی:

در سال ۱۹۶۵ آیکدا و تومیزا در برخی از آزمایشها روی فاژ ملایم p_1 دریافتند که وقتی سلول دهنده غیر لیروژن توسط p_1 منهدم می شود که کروموزوم باکتریائی به چند قطعه کوچک شکسته می شود گاهی ذرات فاژی در حال تشکیل اشتباهها قطعه از DNA باکتریایی را به جای DNA فاژی در سر فاژ قرار می دهند وقتی پرو فاژ p_1 تحریک می شوند نیز فرآیند مشابهی روی میدهد.

از آنجا پروئین های جداره ای فاژ قابلیت فاژ در حمله به سلول را تعیین می کنند فاژهای انتقال دهنده می توانند به سلول باکتریایی متصل می شوند و محتوای خود را به درون آن تزریق نمایند که در این صورت انتقال ژن های باکترهائی روی می دهد وقتی که یک فاژ انتقال دهنده محتوای خود را به درون گیرنده تزریق می نماید حالت فرو دیپلوئید ایجاد می شود که در آن ژن باکتریایی انتقال یافته و از طریق نو ترکیبی ادغام می گردد از آنجا که هر نشانگر میزبان قابل انتقال است این نوع تراز سانس را عمومی می نامند.

فاژهای p_1 ، p_2 هر دو متعلق به یک گروه فاژی هستند که ترارسانی عمومی نشان میدهند (یعنی در اصل آن ها هر کدام از ژن های میزبان را انتقال می دهند) p_{22} و سایر پروفاژها

احتمالا وارد کروموزوم میزبان می شوند ولی p_1 شبیه پلاسمید بزرگی آزاد باقی می ماند اما هر دو در طی انهدام بالیز ناقص انتقال می یابند.

ولیزونی :

در سال ۱۹۲۰ پیش از اینکه Ecali موجود مورد علاقه متخصصان ژنتیکی باشد در مطالعه آلودگی های فاژی Ecali نتایج جالبی بدست آمد چند نژاد باکتریایی یافت شده بودند که نسبت به آلودگی با فاژهای خاص مقاوم بودند اما این باکتری های مقاوم به هنگام مخلوط شدن در نژاد باکتریایی باعث انهدام باکتری های غیر مقاوم می شدند باکتری های مقاومی که انهدام سایر سلول ها را تحریک نمودند باکتری های لیزوژنتیک یا لیزوژن هنگامیکه باکتریهای غیر لیزوژن با فاژهای حاصل از نژاد لیدوژن آلوده شدند بخش کوچکی از سلول های آلوده شده منهدم شدند اما خودشان لیزوژن گردیدند.

ظاهرا باکتری های لیزوژن گاهی می توانستند فاژها را حمل کنند و از این رو در برابر عمل انهدام آنها مصون باقی می ماندند در ابتدا توجه اندکی به این پدیده شد اما بعد از چندین مطالعه به نظر رسید که باکتری های لیزوژن به سادگی با فاژهای خارجی که از طریق خالص سازی دقیق حذف شده اند آلوده می شوند با این وجود در اواسط سال های ۱۹۴۰ آندره لووف نژادهای لیزوژن با سلیمو مگاتریم را بررسی نمود و رفتا نژاد لیزوژنی را طی تقسیمات سلولی زیاد دنبال نمود وی با مشاهده دقیق کشت های خود هر جفت سلول دختری را بلافاصله بعد از تقسیم جدا نمود وی با مشاهده دقیق کشت های خود هر جفت سلول دختری را بلافاصله بعد از تقسیم جدا نمود.

یک لول را در یک محیط کشت نمود سلول دیگر را از نظر تقسیم مورد مشاهده قرار داد لوفوف به این شیوه ۱۹۰ کشت که نشان دهنده ۱۹ نسل بودند را مشاهده نمود و متوجه گردید که هر ۱۹ کشت لیزوژن بودند چون آزمون های محیط کشت در هیچ یک از مراحل این تقسیم ها فاژ آزادی را نشان ندادند. استنباط شد که رفتار لیزوژنی خصوصیتی است که در غیاب فاژ آزاد در این انهدام آزاد شده اند لوفوف قادر به پیشنهاد فرضیه ای بود که همه مشاهدات را توصیه کند بدین ترتیب که هر باکتری نژاد لیزوژن حاوی یک عامل را پروفاژ نامیدند زیرا گاهی بنظر می رید قادر به القاء فاژ آلوده کننده می باشد البته به عوامل گوناگون دیگری مثل نورماوراء بنفش مواد شیمیایی خاصی پروفاژ را فعال ساخته و انهدام را تحریک می کنند و فاژهای آلوده کننده را در بخش بزرگی از جمعیت باکتری نیتروژن آزاد می نماید.

باکتری لیزوژن حاوی یک پروفاژها است که سلول در برابر آلودگی اضافی یا تشدید حاصل از فاژهای آزاد حفظ می کند و در طی تقسیمات به سلول های دختری می رود در بخش کوچکی از سلول های لیزوژن پروفاژ تحریک یا فعال می شود تا فاژ آلوده کننده ایجاد نماید. این فرآیند توان حفاظت سلول را در برابر فاژها از بین می برد سپس سلول منهدم شده و فاژهای آلوده کننده را در محیط کشت آزاد می نماید بنابراین هر سلول غیر لیزوژن موجود در محیط کشت آلوده می شود.

فاژها به دو دسته تقسیم می شوند فاژهای بیماری زا که چرخه آلوده کننده ای دارند و همیشه منهدم کننده هستند برای این فاژها ، باکتریه لیزوژن وجود ندارد. (ممکن است جهتش یافته های باکتریایی مقاومی برای فاژهای بیماری زا وجود داشته باشند اما مقاومت آنها به خاطر لیزوژنی نیست.)

باکتریوفاژ:

ویروس ها یا توالی های خاص DNA که دارد سلول های باکتری می شوند و نقش قابل اطلاعات را بر عهده دارند باکتریوفاژ نام دارند.

یکی از پر مصرف ترین فاژها در مهندسی ژنتیک فاژ است. در دو طرف فاژ ۱۲۰ باز مکمل وجود دارد بنابراین حلقوی می شود و به چرخه لیتیک در سلول می رود. Ecali این فاژ را بخاطر توالی های مشترک بخوبی می پذیرد فاژ M_{13} ژنوم DNA تک رشته ای خطی است و مقاوم به آندو نوکلئازهای داخل سلولی چون آندونوکلیئازها دو رشته ای را از بین می برند این فاژ معتدل نام دارد. و به باکتری آسیب نمی رساند و بدون تخریب سلول تکثیر می کند بیرون می آید.

فاژ چارون (مخصوصا چارون ۱۰) نیز در مهندسی ژنتیک بسیار استفاده می شود در حقیقت همان فاژ است که ژن AC را به آن اضافه کرده اند و رنگی می شود.

کاسمید:

ادغام فاژ و پلاسمید را کاسمید می گویند قسمت سرودم فاژ در وسط پلاسمید را حمل می کنند. پلاسمید های مورد استفاده در مهندسی ژنتیک:

پلاسمید T_I (دیتو مرانید یوسینگ) پلاسمیدی طبیعی است که در برخی گونه های آکژباکتریوم ها دیده شده است. که خود از دو قسمت T_N که کوچک است و T_i ساخته شده و T_n با ساختن آندو نوکلئاز خودش را در توالی خاصی میبرد. T_n همچنین باعث سرطانی شدن سلول های گیاهی می شود امروزه از این پلاسمید برای گیاهان اصلاح شده استفاده می شود.

ژن Cryiv:

این ژن توکسین مندل رو کرم ساقه خوار ذرت است و سمی را سستر می کند که می تواند کرم ساقه خوار ذرت را از بین ببرد این ژن در باسیلوس تر نخستین وجود دارد.

پلاسید PBR-۳۲۲

این پلاسید در تمام پلایدها امروزی است در سال ۱۹۷۷ توسط بولیور رگنتز طراحی شد و در اتصال ۳ ژن که این ۳ ژن از ۳ پلاسید دیگر گرفته شده اند ساخته شده اند و ما در تمام پلاسیدها امروزی است.

بخش های PBR-۳۲۲

۱-ژن TCR ۰ آنزیم مقاوم به تتراسایکس را می سازد که از پلاسید PSC-۱۱۰ گرفته شده است در و ط این پلاسید ژن مقاوم به BamI₁ وجود دارد.

۲-ژن Amp-R (این ژن را از پلاسید RsF-۲۱۲۴ گرفته شده است.

۳-ژن واحد کپی سازی که از پلاسید PMB₁ جدا شده و دارای Ori آرام است.

پلاسید PAT :

این پلاسید دسته ای از پلاسیدهای مشتق از PBR-۳۲۲ است منتهی توالی های که در PBR-۳۲۲ اضافه است را از آن حذف کرده اند و کوچکتر از PBR-۳۲۲ ات و راحت تر به سلول میزبان انتقال می یابد و تکثیر آن نیز راحت تر است مشهورترین این پلاسید PAT-۱۵۳۰ است که برای حمل سوماترودتروفین و زنجیره های بلند به کار می رود.

پلاسید PUG :

این پلاسید بجای ژن مقاوم به تتراسایکس ژن LacZ از اپران لک را پلاید pbr-۳۲۲ دارد .

اتصال فاژها:

آلن کمپبل در سال ۱۹۶۲ پیشنهاد کرد که فاژ از طریق کراس اور متقابل بین کروموزوم حلقوی دار و کروموزوم حلقوی Ecali به کروموزوم باکتریایی می پیوندند کراس اور بین محل خاصی از موسوم به نقطه اتصال و محلی در کروموزوم باکتریایی که بین ژن های bio , gal قرار دارد روی می دهد زیرا در این مکان از کروموزوم Ecali ادغام می شود. یکی از جاذبه های پیشنهادی کمپبل آن است که اجازه می دهد که پیش بینی های متخصصان ژنتیک با استفاده از فاژ آزمون گردد برخی از این نکات عبارتند از:

۱- ادغام پروفاز بدخل کروموزوم Ecali فاصله ژنتیکی بین نشانگر های باکتریایی را افزایش می دهد در واقع مطالعات نشان می دهد که زمان ورود یا فواصل نو ترکیبی بین ژن های باکتریایی یا لیزوژنی افزایش می یابد.

۲- حذف بخش های باکتریایی و مجاور محل پروفاز حداقل در بعضی از موارد باعث حذف ژن های فاژی خواهد شد مطالعات آزمایشگاهی نیز این پیش بینی را تایید می کند.

پدیده لیزوژنی شیوه مفیدی برای فاژ ملایم است تا از خورده شدن در خارج از محل اصلی جلوگیری کند سلول های نیتروژنی می توانند فاژها را بدی سازند و به اطراف حمل نمایند.

نقشه یابی کروموزومی:

برخی از جزئیات نقشه های کروموزومی درباکتری ها از طریق ترکیب نمودن ترکیب نمودن روش های نقشه یابی قطع آمیزش، نقشه یابی نو ترکیبی: ترازشین، ترازرسانی بدست آمده اند امروزه نشانگر های ژنتیکی جدید در بخش به اندازه ۱۵-۱۰ دقیقه نقشه با استفاده از یک مجموعه از نژادهای Hfr که در نقاط مختلفی از کروموزوم انتقال را انجام می دهند یقین نقشه

می شوند این امر انتخاب نشانگرها در فاصله ای که برای ترارانی p_1 به کار می رود را ممکن می سازد تا سال ۱۹۶۳ نقشه E.coli موقعیت تقریباً ۱۰۰ ژن را به تفصیل در بر می گرفت پس از ۲۷ سال کار بیشتر نقشه آن در سال ۱۹۹۰ بیش از ۴۰۰ ژن را شامل می شد.

مروری بر انتقال ژن باکتریایی:

۱- انتقال ژن در باکتریها از طریق جفت شدگی، ترازیشن و ترارسانی ویروسی انجام می شود.
۲- انتقال نشانگرهای ژنتیکی از طریق انتقال امتزاجی DNA با نژادهای Hfr، ترازیشن بخشهایی از کروموزوم بخشنده و ترارسانی عمومی همگی یک خصوصیت مشترک مهم دارند هر یک از این فرآیندها یک قطعه DNA را به سلول گیرنده می برد آنگاه یک رویداد کراس اور مضاعف باید روی دهد تا این قطعه بداخل ژنوم گیرنده ادغام شود و در نتیجه به ارث برسد بخشهای ادغام نشده قادر به همانند ازی نبوده از بین می روند و از جمعیت سلول های دختری حذف می شوند.

۳- انتقال جفت شدگی عامل F که حامل ژن های باکتریایی است و ترارسانی خصوصی نشانگرهای ژنتیکی معین فرآیندهای مشابهی هستند که آنها یک مجموعه خاص و محدود از ژن ها باکتریایی در هر مورد بطور کارائی به سلول گیرنده وارد می شود این توارث به نوترکیبی معمول که در مورد وراثت قطعات DNA لازم است نیازی ندارد بعد از انتقال F عامل F پیرین در سیتو پلام باکتریایی به عنوان یک جسم مجزا همانند سازی می نماید. DNA فاژ در ترارسانی خصوص توسط نظام نو ترکیبی مخصوص آن فاژ در کروموزوم باکتریایی ادغام می شود، در هر دو حالت یک دیپلوئید جزئی و مرودوپلوئیدها فاصل می شود زیرا این فرآیند ها توارث ژن های انتقال یافته و همچنین ژن های مربوط به گیرنده را امکان پذیر می کند.

۴- از انتقال ژن برای تعیین نقشه کروموزومی نیز استفاده می شود ابتدا از تلاقی Hfr برای تعیین محل یک جهش در ناحیه ای از کروموزوم استفاده می گردد و سپس در توارسانی عمومی نقشه دقیق تری ایجاد می شود.

فصل:

کاربردهای مهندسی ژنتیک

علم مهندسی ژنتیک در ادغام علوم دیگر زیستی بویژه زیست سلولی و مولکولی و همچنین علوم شیمی، IT پزشکی کاربردهای وسیعی در روند اقتصادی بهداشتی بشر دارد و ما در این فصل به نتایج کشفیات اثر گذار در این روند به طور مختصر اشاره می کنیم.

بکرزائی: (PARTHENOGENESIS)

چنین فرآیندی که در آن بدون دخالت گامت نر یا جن نر می توان از جنس ماده موجودی به وجود آورد به طور طبیعی در تولید مثل حشرات، خزندگان و ماهی روی می دهد اما امکان آن در پستانداران غیر ممکن فرض می شد تا اینکه دانشمندان ژاپنی و کره ای با اصلاح برخی از ژن های موش ماده توانستند این کار را عملی کنند. (هر موجود برای زنده ماندن باید از هر دو والدین ژن دریافت کند که هر دسته از ژن ها رفتار متفاوتی دارند و وجود هر دو ژن ضروری است) آنها به این ترتیب موفق شدند موشی را که مرکب از مواد ژنتیکی موش ماده است بیافریند که مکانیسم آمیزش DNA در موش ماده بسیار پیچیده است که ما بدان نمی پردازیم بر حال این کار به دلیل مشکلات تکنیکی و اخلاقی برای تولید مثل انسان به کار نمی رود.

تولید سلول های پایه:

سلول های پایه از توانائی بالقوه برای تبدیل به سایر انواع بافت های بدن برخوردارند به همین دلیل معالجه بسیاری از بیماری ها از جمله معلولیت و بیماری های نظیر پارکینسون را نوید می دهد. در حال حاضر تنها راه تهیه سلول های پایه استخراج آن از جنین است این شیوه به نابودی جنین منجر می شود به همین دلیل با جنجال ها و مخالفت های زیادی روبروست محققین به دنبال فرآیندی هستند که سلول های بالغ را به سلول های نا بالغ یا همان پایه تبدیل کنند و پیشرفت تازه در این زمینه را در مولکول کوچکی بنام REVERSIN ملاحظه کردند این مولکول سبب می شود سلول های بالغ بدن دوباره به سلول های اولیه بدل می شوند آنها معتقدند که این پیشرفت می تواند تحقیقات در زمینه سلول پایه را عملی تر کند زیرا در عین حال از مسائل فنی و اخلاقی مرتبط با سلول های پایه جنینی پرهیز می شود. سلول های پایه نوید بخش دستاورد های بالقوه عظیمی برای بشر است چرا که از لحاظ نظری به پزشکان امکان می دهد سلول هایی را که بیمار در اثر سانحه یا بیماری از دست داده پرورش داده و دوباره جایگزین کنند.

برای مثال امکان استفاده بالقوه از سلول پایه برای پرورش سلول های مغز و نشان دادن آنها بجای سلولهایی که در اثر بیماری از دست رفته اند وجود دارد همین مساله در مورد سلول های لوزالمعده که در اثر دیابت نابود شده اند صادق است در این مورد باید سلول های پایه از بدن بیمار استخراج شده باشد چرا که در این صورت سیستم دفاعی بدن سلول های تازه را مورد تهاجم قرار نمی دهد ولی استخراج سلول های پایه از سلولهای بالغ بسیار دشوار است. استخراج این سلول ها از جنین انسان توسط گروههای زیادی در جهان که با سقط جنین یا استفاده از

جنین به هر شکل دیگری که نابودی آن را در پی داشته باشند مخالفند بهمین دلیل دستاورد تازه که می تواند سلول های بالغ را به نابالغ تبدیل کند عملی تر خواهد بود.

ژن درمانی:

در این روش با کمک نقشه های ژنتیکی ، دانشمندان امکان یافته اند روی معایب ژنتیکی که عامل اصلی برخی بیماری های انسانی است انگشت بگذارند در سال ۱۹۸۶ نخستین ژن عامل یک بیماری مربوط به زخم های عفونی (Granulomataus) که یک بیماری موروثی است به کمک یک تکنیک نقشه برداری ژنتیکی شناسایی شد از آن زمان تا کنون شکار چنان ژن توانسته اند ژن های مولد صدها و صدها بیماری موروثی را شناسایی کنند در همین حال موفقیت در زمینه کشف ژن های متعدد و عوامل زیست محیطی دخالت دارد. با این حال بسیاری از ژن ها که به رفتار انسان اثر دارند کشف شده اند و در این معالجات ژن ها ی معیوب با تکنیک های خاصی نمونه های سالم آن جایگزین می شوند.

امروزه از ویروس های بی ضرر تا کنون بیماری از آن گزارش نشده برای ژن درمانی استفاده می شود مثلا ویروس AAV وظیفه انتقال مستقیم ژن های درمان کننده را دارد. این ویروس با سوار کردن ژن بر روی آنها پس از تزریق به عضلات و جاهای خاص در درمان بیماریها مهم است. امروزه AAV بصورت کارخانه ای در درون نرونها برای تولید عامل رشد درمان کننده استفاده نمود البته روش های ژن درمانی دارای تاثیرات جانبی نیز هست.

برای مثال دانشمندان با پیدا کردن ژن Trim که تنها در غلبه بر ویروس Hiv موجود در بدن میمون های Rhesus موثر است سعی در درمان این بیماری دارند ژن های ضد ویروسی انسان یکی است و فقط بر روی ویروس های اسب کارگر و موش موثر است.

دانشمندان با دستکاری ژن ضد ویروس Trim با تغییر تنها بخشی از این ژن - طوری که به نمونه این ژن در بدن میمون شباهت پیدا کند در درمان بیماری همه گیر ایدز تلاش می کنند و راهی برای قرار دادن این ژن در بدن بیماران آلوده می یابند البته حتی اگر آنها موفق شوند خطرات زیادی به همراه خواهد داشت.

تعداد ژن های انسان:

بررسی جدیدی در مورد ژنوم انسان گویای آنست که تعداد ژن های انسان بسیار کمتر از تخمین های قبلی است یک کنسرسیون مرکب از دانشمندان بین المللی اعلام کرده اند ظاهراً نسان ها بین ۲۵-۲۰ هزار ژن دارند در حالیکه تخمینهای قبلی تعداد ژن های انسان را حدود یکصد هزار میدانست و هنوز فهرست کاملی از ژن های انسان و پروئین مربوطه به آنها را تهیه نشده است و در صورت تهیه این فهرست درمان امراض و بیماری های موروثی امکان پذیر خواهد شد.

در موجوداتی کوچک (از نظر ژنوم) بویژه میکرو ارگانیسم هایی که در آزمایشگاهها و تحقیقات کاربرد دارند تعداد ژن ها و پروئین های مرتبط با آن ها کشف شده. (Ecali)

فن آوری DNA در علوم زیستی

تولید واکسن های ویروسی :

محققان با استفاده از مهندسی ژنتیک موفق شده اند واکنش های ویروسی زیادی تولید نمایند از جمله واکسن های ویروسی هپاتیت، آنفولانزا، منژیت، و ... دانشمندان با شیوه های جدید سعی بر این دارند که تولید واکسن های واحدی برای گونه های مختلف یک بیماری نمایند واکن ژنتیکی ضد آلرژی نیز تولید شده با این تفاوت واکسن های ژنتیکی باید سیستم ایمنی را

تحریک کنند ولی واکنش ضد آلرژی عک این عمل را انجام می دهد و در این روش نمونه ای از گرده درخت گان را به روش مهندسی ژنتیک طراحی کرده اند و در بدن افراد مبتلا به آلرژی پادتن هایی تولید می کنند که از شدت واکنش سیستم دفاعی بدن می کاهد.

ژن درمانی: که بوسیله تکنیکهای مختلفی به درمان بیماران می پردازند رشد سریعی را در پی دارد RNA , SiRNA و باکتریوفاژها و ... همگی راههای ژن درمانی هستند البته این روش بسیار حساس و پرهزینه و خطراتی بدنبال دارد.

پزشکی قانونی:

در اواسط دهه ۸۰ شیوه انگشت نگاری با کمک DNA برای شناسایی افراد توسعه یافت از آن زمان تا کنون DNA به یک شاهد غیبی قابل اعتماد در پرونده های جنائی مختلف تبدیل شده است.

تولید پروئین هورمون ها و داروها:

با استفاده از مهندسی ژنتیک و کلون کردن توسط ژنوم میکرو ارگانسیم با مواد پروئین و هورمونی مانند انولین بیشتر شده و تحلیص شده و جانشین روش های سخت قدیمی گردیده مثلا در سال های پیش هورمون رشد از عصاره مغز گاو و خوک می گرفتند و به انسان تزریق می کردند ولی امروزه با ساختن پلاسمیدی مخصوص دکلو کردن در Ecali به راحتی آن را تهیه می کنند (ترتیب ژنوم انسولین از روی زنجیره های هورمون انسولین ساخته شده و بر ژنوم میکرو ارگانسیم سوار می شود)

همانند سازی ژنتیکی انسان (کلوسینگ)

البته این موضوع در سازمان ملل متحد دچار تبادل نظرات بسیاری گشت. کشورهای عضو از معاهده ای جهانی برای ممنوع کردن همانند سازی ژنتیکی انسان به طور گسترده حمایت می کنند این روش که به منظور و مقاصد درمانی و تولید مثل انجام می گیرد موضوع جنجال برانگیزی در فن آوری های ژنتیکی شده است. شیوه درمانی شامل همانند سازی جنین انسان و برداشت سلول های پایه از آنهاست در این شیوه جنین تحت تکنیک های خاصی به وجود می آید. و بیش از آنکه عمر آن ۱۴ روز برسد به هدف تولید مثل ممنوع می باشد اما بهر حال سلول های پایه که از جنین استخراج می شود از توان بالقوه برای کمک به کشف معالجات تازه برای بیماری های غیر قابل درمان مانند آلزایمر، دیابت و پارکینسون برخوردار هستند.

تکنیک های ژنومیکس و پرتئومیکس:

این تکنیک ها متمرکز بر روی ژن ها و پروئین ها هستند پیشرفت در زمینه این تکنیک ها مرهون روشهای HTS (High Throughput screening) و Ultra High

Throughput screening)uHTS

است در این روش انتخاب مواد کنترولی جدید صرفاً بر اساس معیار های ژنتیک همه جنبه های مورد نیاز در گسترش عوامل فعال را در بر نمی گیرد ولی بهر حال بازی دو طرفه بین ژن ها و پروئین ها در بنیادی ترین مرحله ممکن تحلیل می شود تا بتوان اهداف مرتبط را بهتر جدا کرد. در این روش ها بیومارکرهای جدید را کشف شده و فرآیند تکوین دارو را تغییر داده اند و تحلیل بهتر پروئین ها و تفسیر کامل تر داده ها را موجب می شود الگوهای پروئین برای ردیابی بیومارکرها در خون کاربرد زیادی دارد و باعث دسته بندی بیماری های مختلف به ویژه سرطان می شود.

بانک زیستی

بانک زیستی موسساتی هستند که DNA اشخاص بطور داوطلبانه در آنجا به روش های مختلف نگهداری می شود و اهداف گوناگونی دارد یکی از اهداف یک پروژه دراز مدت درصد بهبود روش های شناسایی و درمان بیماری هاست. تا کنون حدود نیم میلیون نمونه DNA برای تحقیقات آینده پزشکی جمع آوری شده است و بنا به چهار چوب های اخلاقی فروش این نمونه ها به مقاصد تجاری یا شخصی ممنوع بوده و دسترسی به اطلاعات فقط به منظور تحقیق علمی امکان پذیر است مصوباتی در چهارچوب سند رعایت اصول اخلاقی اعمال شده و هدف از تصویب آن آسوده ساختن خاطر کسانی است که از کاربردهای غیر قانونی نمونه های حساس ژنتیکی موجود در این بانک نگرانند.

اقتصاد:

مهندسی ژنتیک گیاهان زراعی: (بیو تکنولوژی سبز)

رشد سریع جمعیت جهان و افزایش تقاضا برای غذای بیشتر تهدید ی اجتماعی، سیاسی، اقتصادی را موجب خواهد شد و پایداری محیط زیست را به خطر خواهد انداخت لذا لازم است از فناوری مهندسی ژنتیک در کنار پیشرفت های مهم استفاده شود. تا تولید محصولات غذایی افزایش یابد بذره های اصلاح شده بویژه ذرت، برنج، مرغ ... ارزش اقتصادی برای بسیاری از کشورها دارد.

مهندسی ژنتیک مواد غذایی به دنبال بهبود طولانی کردن زمان نگهداری، افزایش میزان پروئین ها اصلاح کیفیت چرب افزایش تولید غلات و محصولات کشاورزی و غیره است. علف کش های

بیولوژیک نیز نقش مهمی را در افزایش بهره وری اقتصادی دارد و اولین بار در ایران دو گیاه برنج و پنبه ترا ریخته شد.

بیوتکنولوژی گیاهان، یک شاخه سریعاً در حال رشد از مجموعه علوم مدرن است این زمینه کاری عموماً با انتقال ژن های شناخته شده موثر به گونه های مهم گیاهان پر محصول و اقتصادی مرتبط می گردد. نتیجه این انتقال بهبود بهره وری کشت و تولید محصولات جدید بیونیک در گیاهان قبلی است.

امروزه بیوتکنولوژی گیاهان سه زمینه مهم کاری در بر می گیرد که عبارتند از:

۱- کشت بافت گیاهی ۲- مهندسی ژنتیک گیاهی ۳- کشت گیاهان با کمک مارکرهای

مولکول

در کشت گیاه کل یک گیاه (با استفاده از قسمتی از آن تولید می کنند و تولید موز در کنیا و سیب زمینی و مرکبات در ایرلند)

اما مهندسی ژنتیک عبارتست از انتقال انتخابی و تعدی ژن های مفید از یک ارگانیسم به دیگری و خلق مواد، گیاهان یا با خواص بهبود یافته بعنوان مثال هایی از گیاهان مهندسی ژنتیکی شده می توان به پنبه، ذرت، سیب زمینی شیرین- لوبیا ی سویا و ... اشاره کرد.

اما در روش کشت گیاهان به کمک مارکرهای مولکولی به منظور افزایش بازدهی گیاه از یک مارکرمولکولی که توالی کوتاهی از DNA است که با پیوندی قوی به منطقه ژنتیکی مورد نظر ما متصل می شود به طور مثال این منطقه ممکن است ناحیه مقاومت به بیماری (مانند ژن

مقاومت به ویروس) و یا خاصیتی جدید در گیاه (بی آبی ذرت) باشد.

کرموسایست گذاری غذا و کشاورزی (NCFA) بیوتکنولوژی را در کمک به کنترل بیماریها و آفات محصولات کشاورزی قابل سرمایه گذاری می کند و نتیجه آن افزایش ظرفیت تولید و کاهش هزینه های آن است.

مهندسی ژنتیک و محیط زیست:

بارکد گذاری DNA

این روش نو برای شناسائی کامل گونه های موجودات ورده های آن ها که ممکن است در اختلاف توالی فقط یک ژن باشد ابداع شده به عنوان مثال هنگام پهلوگیری یک کشتی در بندرگاه کارشناسان بازرسی می توانند از جریان آب خروجی از کشتی نمونه برداری کرده و با این فناوری بارکد گذاری DNA سریعاً وجود سوپه های نامطلوب در آنرا شناسائی و ردیابی کرد و در صورت گونه های مضر رودتر از همیشه اقدام به ایمنی کرد. این فرآیند حداقل چند روز زمان می برد حتی در جاهای دور افتاده نیز با استفاده از یک اسکنر DNA می توان گونه و رده موجودات را شناسائی کرد که شاخص یابی چون شکل اجزاء بدن حیوان و رنگ بال پرنده تکیه دارد.

در این روش بار کدگذاری DNA به سادگی تنها ۶۵۰ کاراکتر از توالی ژنتیکی یک ژن منفرد موسوم به Cytochrome oxidase رمزگشائی شده است نگفته برخی این ژن اولاً در همه گونه های گیاهان مختلف جانوران وجود دارد و دیگر اینکه از یک گونه به گونه دیگر شدت تغییر می کند در نتیجه از این ژن به عنوان مرجع مناسب برای مقایسه گونه ها استفاده می شود. بنابراین روش هر کدام از موجودات زنده دارای یک کد مشخص کننده منحصر به فرد می باشد.

بیش از دو دهه است که محققین از اطلاعات توالی های ژنتیکی حیوانات، جانداران برای توضیح نحوه ارتباط تکاملی آنها بهره می برند اما آنها تا کنون همیشه از تعدادی ژن متفاوت بدین منظور استفاده می کردند در حالیکه در روش بار کدگذاری تنها روی یک ژن تمرکز می شود بار کد گذاری DNA توانائی جداسازی تقریباً ۲۰۰۰ گونه حیاتی مختلف را داراست این روش بسیار کار را راحت می کند زیرا به عنوان مثال برای شناسائی سویه یک شفیره ملزم هستیم تا مرحله تبدیل به پروانه سپری شود. سپس پروانه بالغ را مورد بررسی قرار داد ولی با روش بار کدگذاری این امکان فراهم می شود، تا شفیره را فوراً در محل شناسائی کنند و کابوس دسته بندی تمام موجودات را از اذعان متخصصین تاکسونومی شیرین قابل دسترسی می کنند این روش نسبت به تاکسونومی دو مزیت دیگر نیز دارد اول اینکه روش فوق تنها با در اختیار داشتن قسمتی از باخت بدن یا پوسته خارجی موجود قادر به شناسائی گونه ایست دیگر اینکه اگر اسکنرهای بارکدکننده عرضه انبوه گردند بویله آماتورها نیز قابل استفاده خواهد بود زیر کار بسیار راحتی است در کل انی روش کفایت تنها یک ژن برای شناسائی همه گونه های حیات است.

حفاظت از حیات وحش بوسیله ژنتیک:

امروزه حفاظت از محیط زیست کار بسیار حساس و جدی میباشد و موجوداتی هستند که باید از انقراض آنها جلوگیری به عمل آورد مثلاً فیل ها، پانداها، افریقا دانشمندان با تهیه نقشه ژنتیکی این موجودات در حال انقراض و توزیع نشانگرهای ژنتیکی در نواحی مختلف جغرافیایی حفاظت شده از قاچاق و تخلفات غیر قانونی به شدت جلوگیری می کنند آنها حتی با این روش

نوع بوجود وزیستگاه جغرافیایی را محاسبه می کنند و از شکارهای غیر قانونی جلوگیری می کنند.

مهندسی ژنتیک و تنوع زیستی:

در این روش گونه های جدید بوجود می آیند و یا از یک گونه به گونه ای دیگر متولد می شود برای مثال محققین ژاپنی بافت های استخراج شده از جنس ماهی قزل آلا را جنین ماهی آزاد تزریق کردند بطوری که حاصل جفت گیری ماهی های آزاد پس از بلوغ ماهی قزل آلا بود. این روش می تواند در حفاظت از گونه های در معرض خطر مفید واقع شود. آن ها ابتدا سلول ابتدائی تخمک (Primordial germ cells) را از جنین قارچ کردند سپس این سلول ها را در داخل جنین ماهی دیگر قرار می دهند زمانیکه ماهی دوم بالغ د و جفتگیری کرد از برخی از تخم ها ماهی های اول حاصل می شوند.

:RNAi

تداخل RNA یا RNAi فرایند طبیعی سرکوب فعالیت ژن در درون یک سلول (که به Small interfering RNA یا SiRNA منتسب است) اکنون برای شناسایی و معتبر سازی اهداف تحقیقات به کار می رود و بعنوان یک دسته درمانی جدید بالقوه قدرتمند در دست توسعه است پس از پنجاه سالگی کشف مارپیچ DNA و دوران شکوفائی بیوتکنولوژی در سال های اول هزاره سوم شاید این موضوع کاربرد آتی و منطقی بیولوژی در انظار باشد .

از زمانی که تداخل RNA برای اولین بار در اواخر ۹۰ میلادی توصیف و تشریح گشت این فناوری بسرعت در آزمایشگاههای سراسر جهان مورد پذیرش واقع گشت. RNAi را می توان بعنوان بنیانی جدید برای دسته محصولات درمانی به کاربرد بیش از ۱۰٪ بازار داروئی جهان را

تسخیر نموده امروزه محصولات مرتبط RNAi شامل siRNA الیگونوکلوئوتیدهای RNA و وکتورهای DNA کد کننده siRNA است این روش در آزمایش گاههای دانشگاهی ابداع شده و اکنون یک ابزار اساسی کار شرکت های داروئی و بیوتکنولوژی است این فن آوری بوسیله siRNA اقدام به خاموش سازی ژن ها می کنند و تاثیر بر روی ژن های مورد نظری را دارد بدون آنکه بر سایر ژن ها تاثیر بگذارد.

در شکل های بعد ممانعت ویروس هیپاتیت B در موش بوسیله RNAi و نمایش ممانعت بوسیله siRNA مشاهده می شود که تولید پروئین نوکلئوکسپید در سلول های کبدی موش آلوده به هیپاتیت B با انتقال RNAi تا بیش از ۹۹٪ کاهش نشان می دهد.

(A) هیپاتویست های حاصل از کنترل آلوده که برای نمایش آنتی ژن های ویروس رنگ آمیزی شده اند.

(B) هیپاتویست های حاصل از موش که بوسیله RNAi فرآوری شده اند.