ترجمه فا

TarjomeFa.Com

ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

پیمایش ژنوم در یوکاریوت ها

چکیده

پیمایش ژنوم یک روش مولکولی برای شناسایی مستقیم توالی های نوکلئوتیدی از ژنوم های تخلیص شده است. تنها لازمه اصلی، قابلیت دسترسی به توالی های نوکلئوتیدی شناخته شده برای شروع می باشد. چندین روش پیمایش ژنوم در طی 20 سال گذشته ایجاد شده اند و پیشرفت های زیادی به نخستین راهبرد های اساسی افزوده شده اند که شامل استفاده از روش های توالی یابی نسل بعدی نیز می باشند. این مقاله مروری بر استفاده از راهبرد های پیمایش ژنوم در چندین بعد مطالعه ژنوم یوکاریوتی تاکید دارد. در بخش اول، تحلیل راهبرد های مختلف گزارش شده صورت می گیرد. ابعاد فنی دخیل در پیمایش ژنومی بسیار جذاب هستند زیرا آن ها ترکیبی از استعداد، ظرافت و هوش دانشمندان مختلف را نشان می دهند. کاربرد هایی که در آن پیمایش ژنوم را می توان مورد استفاده قرار داد به طور سیستماتیک در دومین بخش مقاله مروری بررسی شده و پتانسیل زیاد این روش را از جمله شناسایی ساده توالی های نوکلئوتیدی و نیز تحلیل مجموعه های بزرگی از موتانت های بدست آمده از افزایش دی ان ای با منشا ویروسی، ترانسپوزون ها و ا ساختار های دی ان ای انتقالی نشان می دهند. مقادیر زیادی از داده های بدست آمده نشان می دهند که پیمایش ژنوم با قابلیت کاربرد خود، تعداد زیاد راهبرد ها و پیشرفت های اخیر، شناسایی سریعی از توالی های شناخته شده را در چندین زمینه پژوهش ژنومی در اختیار می گذارند.

لغات کلیدی: برچسب زدن ژن، ژن درمانی، مهار ژن، پیمایش ژنوم، موتاژنز افزایشی، خانواده چند ژنی، توالی یابی نسل بعدی،T-DNA، عناصر قابل ترانسپوز، تلفیق ویروس

مقدمه

شناسایی توالی های نوکلئوتیدی ناشناخته که دارای مناطق DNA مشخص می باشند با تعدادی از روش های مبتنی بر PCR مختلف موسوم به پیمایش ژنو می تواند انجام شود.

در عصر فناوری توالی یابی DNA با بازده زیاد، وقتی که بیش از 1000 ژنوم به طور کامل توالی یابی شدند، توسعه راهبرد های پیمایش ژنوم می تواند تبدیل به یک فعالیت آزمایشگاهی قدیمی و از کار افتاده شود. با این وجود مقالاتی که کاربرد های روش های پیمایش ژنوم و بهبود راهبرد های مختلف را گزارش می کنند با روند ثابت و پیشرونده ای در حال انتشار می باشند. دلیل اصلی برای این موضوع، آسان بودن راهبرد های مختلف است که نیازی به تجهیزات گران قیمت و پرسنل های ماهر ندارد و افزایش کاربرد روش های پیمایش ژنوم در ژنوم های یوکاریوتی دلیل دیگر است. به علاوه در برخی از کاربرد های پیشرفته تر، راهبرد های پیمایش ژنوم با فناوری توالی یابی pyrosequencing ترکیب شده و تولید صد ها هزار توالی در هر آزمایش کرده و زمینه را برای پیمایش ژنوم هموار کرده اند.

مقالات مروری در خصوص پیمایش ژنوم زیاد نیستند.بعد از اولین مقاله نوشته شده توسط هنگن در 1995، که تعداد کمی از راهبرد ها مقایسه شدند، مطالعه جامعی بر روی راهبرد ها توسط های و همکاران(2) بیش از یک دهه پیش منتشر شدند. اخیرا دو مقاله مروری به توصیف راهبرد های پیمایش ژنوم و کاربرد آن ها اختصاص داده شده اند ولی محدود به میکروارگانیسم ها بوده اند.(3-4). هدف این مفاله ارایه اطلاعاتی با توصیف کاربرد ر.وش های پیمایش ژنوم برای ژنوم های یوکاریوتی است. گزارش های مختلفی را می توان یافت که در آن چنین فناوری ای به طور موفق استفاده شده و در بسیاری از موراد از فرایند های زمان بر ساخت و فیلتر کتابخانه های ژنومی بزرگ اجتناب می کند.

بخش نخست مروری جامع بر روش های پیمایش ژنوم موجود دارد و بر اساس راهبرد اصلی اتخاذ شده این روش ها را طبقه بندی می کند. بیشتر این روش ها را می توان به آسانی در هر آزمایشگاه بیولوژی مولکولی اجرا کرد. به علاوه، فهرستی از منابع تجاری(کیت ها و خدمات مشتری) ارایه می شوند. دومین بخش مقاله به بررسی کاربرد های مختلف پیمایش ژنوم می پردازد. زمینه های اصلی مورد نظر و مورد علاقه شناسایی شده و نتایج به دست آمده برای کاربرد های مختلف گزارش می شوند. به دلیل انتشار روش های پیمایش ژنومی، این روش را نمی توان کامل کرد. بهترین روش نشان دادن پتانسیل این روش ها می باشد.

روش های و منابع پیمایش ژنوم

روش های پیمایش ژنوم

روش های پیمایش ژنوم از نظر راهبرد های اتخاذ شده برای بدست آوردن سوبسترایی برای یک مرحله نهایی PCR متفاوت هستند که در آن یک پرایمر خاص برای توالی شناخته شده (پرایمر ویژه توالی) با یک پرایمر ایجاد شده با روش پیمایش خاص(پرایمر پیمایشی) جفت می شود.

در جدول 1، روش های اصلی پیمایش ژنوم و پیشرفت های مربوطه در این زمینه درج شده است. روش ها را می توان به سه گروه بر اساس شرایط خاص طبقه بندی کرد: روش های مبتنی بر آنزیم های محدود کننده، روش های مبتنی بر پرایمر و روش های مبتنی بر اکستنشن. روش های GW با استفاده از ترکیب دو راهبرد پایه بر اساس نخستین مرحله روش طبقه بندی می شوند. بیشتر روش های لیست شده در جدول 1 مرور شده و در این مقاله زیاد توصیف نمی شوند. تنها روش های جدید با روش های قبلی در این گزارش بررسی شده اند. این روش ها در جدول 1 به خوبی مشخص هستند. نمایش گرافیکی از راهبرد ها بر اساس روش های پیمایش ژنوم به طور شماتیک در شکل 1 گزارش شده اند.

روش های پیمایش ژنوم مبتنی بر محدودیت نیاز مند جذب اولیه دی ان ای ژنومی با آنزیم های محدود کننده می باشند که مکان آن ها در فاصله مناسبی از مرز بین توالی های مشخص و نامشخص قرار گرفته است. قطعات محدود شده سپس به اداپتر های طراحی شده خود سیرکوله و یا لیگات می شوند.

در نخستین حالت، زیر گروهی از روش های PCR معکوس، بدست می ایند.. یک روش اصلاحیه این روش موسوم به I-PCR گزارش شده است. در این رابطه، مولکول های محدود کننده دی ان ای ژنومی تحت تکثیر حلقوی با استفاده از هگزامر های نصادفی قرار گرفته و از خصوصیات جا به جایی رشته ای پلیمراز Phi29 استفاده میکند.

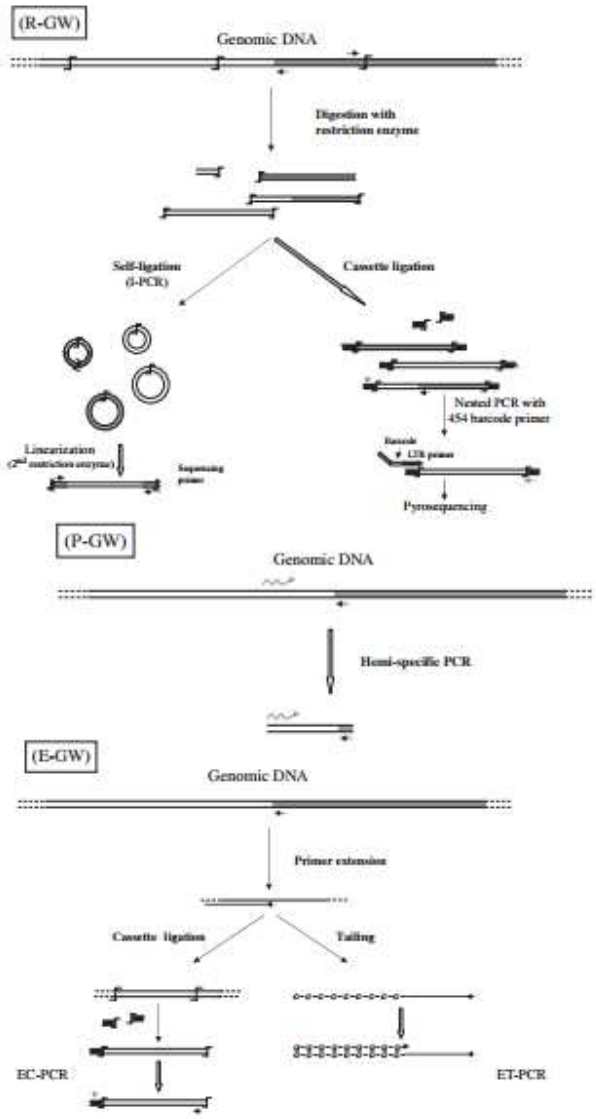
در حالت بعدی، طیف وسیعی از روش ها ارایه شده اند که از راهبرد نخست موسوم به PCR تک پرایمری بر گرفته می شوند. این روش ها بر اساس مطالعه تنوکا و فوجیشیما فهرست بندی شده اند که به صورت PCR کاست هستند و برای استفاده از دی ان ای های دو رشته ای متصل به لیگات به قطعات محدود کم کاربرد دارند. اصطلاح

PCR کاست به جای PCR لیگاسیون که برای نشان دادن روش های فوق استفاده می شود((7,21,22,28,44]،، بر این اساس استوار است که اصطلاح لیگاسیون از 1989 برای نشان دادن راهبرد های نخست پیمایش ژنوم استفاده شده است و در این جا بین روش های E-GW طبقه بندی شده است. وقتی کاست به قطعات محدود کننده دی ان ای ژنومی لیگات شد، تولید کتابخانه GW کرده و تکثیر PCR از ناحیه در بر گیرنده مرز بین توالی های معلوم و مجهول با استفاده از پرایمر توالی خاص و یک پرایمر ویژه کاست شروع می شود. یک مشکل اصلی در روش های مبتنی بر PCR کاست، وجود محصولات عمومی ناشی از پرایمر ویژه کاست است. برای غلبه بر این مسئله، یک سری روش ها ارایه شده اند که موسوم به PCR وتروکاست، PCR جذب و دیگر راهبرد های گزارش شده در زیر می باشد.

راهبرد موسوم به PCR انگشت نگاری (T-DNA) برای پیمایش ژنوم یک روش پلی مورفیسم طول قطعات محدود کننده است که برای مطالعه تعدادی از قطعات (T-DNA) Agrobacterium tumefaciens در گیاهان تراریخته استفاده شده است. قطعات تکثیر شده مربوط به T-DNA/ اتصالات دی ان ای گیاهی به دلیل وجود پرایمر های ویژه T-DNA برچسب زنی شده از ژل پلی آکریلامید رقیق شده، مجددا تکثیر شده و توالی یابی شده اند.

جدول 1-راهبرد های GW. روش های GW به صورت E-GWوR-GW, P-GW کاتالوگ بندی می شوند. در صورت قابلیت دسترسی، نام خاص روش گزارش می شوند. در غیر این صورت، نام نخست نویسنده ارایه می شود. روش ها در جعبه های خاکستری به طور مفصل در بخش روش های پیمایش ژنومی ارایه شده اند. ستون های P و E اشاره به تحلیل به ترتیب ژنوم های پروکاریوتی و یوکاریوتی دارند.

	Group	Sub-group	Name	References	P	E
1	R-GW	Inverted PCR	Inverted PCR	5		×
2			Long range inverted PCR	6		×
3			Bridged inverted PCR	7	×	
4			Rolling circle inverted PCR	8		×
5		Cassette PCR	Single-specific-primer PCR	9	×	
6			Fors *et al.*	10		×
7			Vectorette PCR	11		×
8			Cassette ligation	12		×
9			Capture PCR	13		×
10			Splinkerette PCR	14		×
11			Boomerang DNA amplification	1		×
12			Suppression PCR GW	15		×
13			Padegimas and Reichert	16		×
14			Step-down PCR	17		×
15			Simplified oligo-cassette	18	×	
16			Cottage *et al.*	19		×
17			T-DNA fingerprinting PCR	20		×
18			T-linker PCR	21		×
19			Versatile cassette	22	×	
20			Barcoding pyrosequencing	23,24		×
21			One-base excess adaptor ligation	25		×
22			Straight walk	26		×
23			Blocked DLA	27		×
24			Template-blocking PCR	28	×	×
25			TVL-PCR	29		×
26		Others	Panhandle PCR	30		×
27			Supported PCR	31		×
28			RAGE	32		×
29			Restriction site extension PCR	33		×
30	P-GW		Targeted gene-walking PCR	34		×
31			Restriction-site PCR	35		×
32			Restricted PCR (novel Alu PCR)	36		×
33			TAIL-PCR	37		×
34			Uneven PCR	38		×
35			Semi-random PCR	39	×	
36			Mishra *et al.*	40		×
37			UPW PCR	41,42		×
38			Lariat-dependent nested PCR	43		×
39			Site finding PCR	44		×
40			Touchdown PCR-based	45	×	
41			Walser *et al.*	46		×
42			Nested PCR-based	47	×	
43			Self-formed adaptor PCR	48	×	
44			Two-step gene walking PCR	49	×	
45			High-genome walking	50		×
46			SD-PCR	51	×	
47			SHP-PCR	52	×	
48	E-GW	EC-PCR	LM-PCR	53		×
49			LAM-PCR	54		×
50		ET-PCR	Long distance genome walking PCR	55		×
51			Leoni *et al.*	56,57		×
52		Others	Single-primer amplification	58		×
53			FLEA-PCR	59		×



شکل 1- راهبرد های اصلی پیمایش ژنوم. راهبرد ها ی E-GWوR-GW, P-GW به طور شماتیک نشان داده شده اند. مناطق خاکستری و سفید به ترتیب توالی های دی ان ای معلوم ومجهول می باشند. پیکان های مشکی افقی مربوط به پرایمر های خاص توالی می باشند: پیکان های خاکستری نشان دهنده پرایمر های ویژه کاست هستند. یک پیکان موج دار خاکستری پرایمر تصادفی را نشان می دهد. خط چین ها نشان دهنده ssDNA. سنتز شده درون شیشه ای می باشند. علامت های ⌉و⌈ نشان دهنده مکان های محدود کننده می باشند. پیکان های عمودی سفید مربوط به مرحله یکی مانده به آخر روش می باشد که بعد ازآن محصول بدست آمده در معرض PCR، کلونینگ و توالی یابی قرار می گیرند.

ارتباط یک روش PCR GW کاست با فناوری توالی یابی قوی معرفی شده توسط وانگ و همکاران (24)، اهمیت زیادی دارد زیرا امکان توالی یابی موازی هزاران هزار قطعات تکثیری را می دهد. با استفاده از یک راهبرد بارکد گذاری DNA نیز می توان به این مهم دست پیدا کرد. با استفاده از پرایمر های کاست با بارکد های مختلف، محققان اقدام به شناسایی بیش از 160000 سایت انتگراسیون برای بردار های لنتی ویرال و رترویرال در نمونه های بافت مختلف از موش کردند. رویکرد مشابهی برای تحلیل ترانسپوزون ذرت توسط لیو و همکاران (27) در تکثیر جذب-لیکاسیون ارایه شد. این روش از آداپتور تک رشته ای با پایانه 3 قابل الحاق به آورهنک-3 از قطعات محدود کننده ژنوم بر کرفته شده است. بعد از نخستین مرحله، قطعات کتابخانه در 30ترمینی با افزایش دی دزوکسی نوکلئوتید بلوک شده و با پرایمر های ویژه توالی و اداپتر تکثیر شد. در راهبرد DLA،MuClone برای شناسایی توالی های ژنی ترانسپوزون موتاتور ذرت با استفاده از مهار پرایمر های ژنی، پایین دست توالیCATGNspICATGNspI، به سه تگ نوکلئوتیدی شروع شونده با C یا T در نظر کرفته می شود. با ترکیب راهبردMuClone با فناوری توالی یابی، محققان به 965000 توالی دسترسی پیدا کردند.

در میان راهبرد های اخیر R-GW، روش پیمایش مستقیم با استفاده از لینکر دو رشته ای $3'\text{-}NH_2$ برای اجتناب از واکنش پر شوندگی با دی ان ای پلیمراز و جلوگیری از اکستشن پرایمر پیمایشی در چرخه اول PCR استفاده شده است. SsDNA تولید شده از پرایمر اصلی توالی، سوبسترایی برای تکثیر PCR در نظر گرفته می شود. اخیرا در روش PCR بلوکینگ، قطعات محدود کننده دی ان ای با افزایش د دزوکسی نوکلئوتید قبل از لیگاسیون با کاست دی ان ای بلوکه شده و این اطمینان را به ما می دهند که PCR را می توان از پرایمر توالی خاص شروع کرد. با در نظر گرفتن فعالیت لیگاسیون بر روی بردار $pCR^{®}4\text{-}TOPO^{®}$، ارکسکی و دیوس از (TVL-PCR) استفاده کردند که یک راهبرد پیشرفته بر گرفته از PCR – تی لینکر بوده و بر افزایش آنزیم لیگاز غلبه می کند.

تحت گروه R-GW، چهار روش دیگر را می توان ارایه کرد که در آن قطعات محدود کننده دی ان ای ژنومی به طور مستقیم به کاست دی ان ای دو رشته ای لیگات نمی شوند. در PCR، یک الیگونوکلئوتید تک رشته ای لیگات شده و موجب تکثیر PCR منطقه ناشناخته می شود.

روش PCR پشتیبانی شده، ترکیبی از هضم دی ان ای ژنومی با تکثیر خطی یک پرایمر ویژه توالی است. قطعه دی ان ای بیوتینیلات با انشعاب یک پرایمر ژن با استفاده از پلیمراز Taq DNA و بیو Dutp-11 که با قطعات محدود کننده دی ان ای دناتوره شده شروع می شود سنتز شد.مولکول تخلیص شده استرپتاودین به کاست دو رشته ای لیگات شده و امکان مونتاژ سوبسترای مناسب برای PCR وجود دارد.

روش تکثیر سریع پایانه های ژنومی در میان روش های R-GW منحصر به فرد است زیرا نیازی به یک مرحله لیگاسیون ندارد. در این روش، قطعات محدود کننده با ترانسفراز انتهایی قبل از تکثیر نهایی PCR، پلی ادنیلات شده و در حضور پرایمر های ویژه توالی و oligo-Dt انجام می شوند.

در PCR اکستنشن سایت محدود کننده، یک پرایمر پیمایشی با انتهای توالی 3 مربوط به مکان محدود کننده به مولکول با استفاده از پرایمر خاص ژنی بر روی قطعات دی ان ای ژنومی محدود شده می چسبد. انشعاب سریع ssDNA محدود شده امکان ایجاد ذخیره ای مناسب را برای تکثیر PCR می دهد.

روش P-GW با استفاده از پرایمر های پیمایشی طراحی شده حاوی توالی های تصادفی و دجنریت مشخص می شوند. این پرایمر ها باپرایمر های خاص توالی در تعدادی از راهبرد های مختلف PCR ترکیب می شوند. علاوه بر روش های فوق، برخی از راهبرد های دیگر نیز باید بررسی شوند.

روش PCR محدود شده برای شناسایی توالی دی ان ای انسان با عناصر تکراری استفاده شد.محققان کاربرد روش PCR را با معرفی در ترکیب واکنش با یک رونوشت از پرایمر آلو ناشی از حضور دزوکسی آدنوزین ارایه کردند که با پلیمراز دی ان ای قابل توسعه نیست. با یافتن یک نسبت مناسب بین پرایمر الو و رقیب آن، تکثیر ژن حساسیت و پروتین ریبوزومی SI7 حاصل شده است.

بهبود روش پیمایش سریع جهانی توسط میریک و ژیلبرت با معرفی جذب آگاراز در ژل برای ریکاوری کمی آمپلیکون گزارش شده است.

SD-PCR-PCR شین داگلانرو از حضور توالی های موسوم به شین داگلانرو در ژنوم های پروکاریوتی برای شناسایی بالادست توالی های ژن های خاص بهره می برد. این روش بر اساس کاربرد پرایمر های هگزامری بوده و

توالی های شین داگلارنو را در نظر می گیرد که با پرایمر های خاص ژن پروکاریوتی در واکنش تکثیر جفت می شوند.

روش پرایمر هیبرید متوالی SHP-PCR-PCR- منوط به استفاده از دو یا سه تکثیر PCR بر روی محصول اولین تکثیر می باشد که در آن یک پرایمر ژن خاص و یک پرایمر دجنریت استفاده می شود. تکثیر های PCR متوالی با ترکیب پرایمر های خاص توالی و پرایمر های پیمایشی هیبرید با مکمل انتهای $3'$ با یک توالی هدف از پرایمر دجنریت و یک انتهای $5'$ که تشکیل دهنده هدف برای پرایمر هیبرید بعدی است مورد استفاده قرار گرفت.

در میان روش های E-GW(جدول 1)، امکان تمییز بین روش هایی وجود دارد که در آن مرحله نهایی PCR بر روی حاصل لیگاسیون بین کاست DNA و DNA سنتز شده با تکثیر خطی یک پرایمر خاص و نیز روش هایی که در آن ها یک PCR نهایی دارای سوبسترای محصول واکنش $3'$ بر روی ssDNA وجود دارد انجام می شود.

PCR از طریق لیگاسیون یا پیوند (LM-PCR) بر اساس اکستنشن پرایمر الیگونوکلئوتید خاص بر روی دی ان ای با پیوند شیمیایی است. کاست دی ان ای دو رشته ای سپس به یک DNA متصل شده و سوبسترایی را برای PCR نهایی در اختیار می گذارد.PCR ناشی از تکثیر خطی از نظر راهبرد مورد استفاده برای بدست اوردن قطعه DNA دور شته ای برای پیوند با کاست دی ان ای متفاوت است. در این مورد یک پرایمر ویژه بیوتینیلات-5 بر روی DNA. ژنومی توسعه می یابد. بعد از جذب توسط سر استرپتادوین محصول اکستنشن، دومین رشته با پرایمینگ هکزا نوکلئوتید تصادفی سنتز می شود. DNA. دو رشته ای بدست آمده با یک آنزیم محدود کننده چهار نوکلئوتیدی هضم شده و به یک کاست DNA. مناسب متصل می شود. محصول لیگاسیون تحت تکثیر PCR قرار گرفته و محصولات آن با آنالیز الکتروفورز، انتخاب، رقیق، مجددا تکثیر شده و توالی یابی می شوند.

در روش های ET-PCR، تکثیر PCR نهایی از پرایمر پیمایشی با انتهای ویژه متصل به پرایمر خاص توالی استفاده می کند. ایده اصلی در PCR پیمایش ژنوم با مسافت طولانی است که در آن توالی های 3–4 kb از انشعاب پرایمر ها برای هکزامرین و ژن های کرک دار مالاریا و دروس فیلا بدست می ایند. اخیرا یک راهبرد نسبتا متفاوت توسط لونی و همکاران برای شناسایی هم زمان اعضای خانواده های چند ژنی Lhcb1 پروتین جذب نور در ژنوم اسفناج

ارایه کرده اند. این راهبرد که بر اساس بهینه سازی شرایط آزمایشی برای واکنش اکستنشن پرایمر است، موجب بهبود کسب اطلاعات چند گانه در خصوص اعضای مختلف خانواده چند ژنی با استفاده از پرایمر خاص و حفاظت شده می شوند.

دو روش دیگر E-GW را نمی توان به صورت راهبرد های EC-PCRوET-PCR در نظر گرفت. تکثیر تک پرایمری یک روش E-GW را بر اساس جذب مولکول ssDNA بیو تینلات بدست آمده از اکستنشن پرایمر توالی خاص و تکثیر متوالی PCR آن با یک پرایمر تو در تو معرفی می کند. همین پرایمر فوق باید ابتدا بر ssDNA توسعه یابد که امکان تشکیل سوبسترای دو رشته ای دی ان ای را به صورت قابل تکثیر با تک پرایمر می دهد. قطعات تکثیر بدست آمده با هیبریدیزاسیون تکثیر قبل از توالی یابی فیلتر یابی می شوند.

روش PCR نمایی توالی بر اساس استفاده از پرایمر پیمایشی با یک توالی فلانکینگ -5 و شش 3-3′ شش نوکلئوتیدی متصل با پرایمر ویژه توالی در تکثیر نهایی ssDNA PCR می باشد.

کیت های پیمایش ژنوم و سرویس های مشتری

یک روش جایگزین برای استفاده از روش های پیمایش ژنوم، تعدادی از کیت های تجاری از شرکت های مختلف قابل دسترس هستند. رایج ترین موارد کیت والکر ژنوم و سیستم ژنومی وکتورت می باشند. این روش ها منوط به مهار PCR GW و روش های وکتورت GW می باشند. کیت SpeedUp پیمایش دی ان ای بر اساس راهبرد E-GW می باشد که در آن الیگومر های کوتاه همراه با پرایمر های خاص توالی تحت شرایط بهینه در یک سری از PCR های تودر تو استفاده می شوند. محصول نهایی را می توان به طور مستقیم توالی یابی و یا کلون کرد. والکر کیت TOPO بر اساس راهبردTVL-PCR می باشد.

به علاوه، دو شرکت، سرویس GW مشتری را ارایه می دهد. سرویس پیمایش APA بر اساس اکستنشن پرایمر ویژه بیوتینلات و جذب آن بر روی بید های پارا مغناطیس استرپ تادیون است.SsDNA غیر متحرک سپس به پرایمر پیمایشی متصل شده و تشکیل سوبسترایی برای یک PCR متوالی می دهد. سرویس پیمایش ژنوم بر اساس PCR GW مهار می باشد(جدول 1).

حق امتیاز GW

توسعه بسیاری از روش های پیمایش ژنوم موجب ارایه اختراعات و ثبت امتیاز های زیادی شده است که هر کدام روش های جدیدی را از فرایند و کاربرد راهبرد پیمایش ژنوم برای حل مسائل ویژه ارایه کرده اند. مرور آن ها در این مقاله خالی از لطف نیست. بازیابی ثبت اختراعات با استفاده از پلاتفرم Orbit (http://www.orbit.com) صورت گرفت یک وب سایتی که دارای منابع تخصصی می باشد. جست و جو با برازینگ دیتابیسFAMPAT انجام شد که ثبت اختراعات را از بیش از 90 دفتر ملی پوشش داده و در خانواده های بر اساس نواوری و اختراع گروه بندی می کند. ثبت اختراعات با استفاده از نام روش های GW جمع اوری شده و به فرایند ها و کاربرد ها تقسیم می شوند. اطلاعات در خصوص ثبت اختراعات منفرد را می توان با شماره ثبت از پرتال Esp@cenet ((http://www.espacenet.com) بدست اورد.

جدول 2- منابع تجاری برای GW. نام های روش GW در جدول 1 نشان داده شده اند. پرایمر کنترل تابیدگی-پیمایشDW-ACP, DNA

Kit name	Customer service	GW technique	Company (website)
Genome Walker™ Kit		Suppression PCR GW	Clontech (http://www.clontech.com)
Vectorette™ Genomic Systems		Vectorette	Sigma Aldrich (http://www.sigmaaldrich.com)
TOPO™ Walker Kit		TVL-PCR	Invitrogen (http://www.invitrogen.com)
DNA Walking SeedUp Premix™ Kit		DW-ACP	Seegene (http://www.seegene.co.kr)
	Genome Walking Service	Suppression PCR GW	Evrogen (http://www.evrogen.com)
APAgene GOLD Genome Walking Kit	APA walking service	Bio-Primer extension/ligation UWP on ssDNA	Bio S&T (http://www.biost.com)

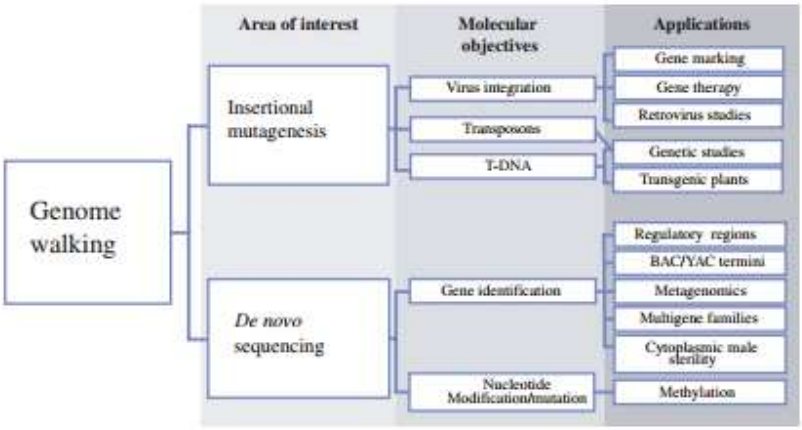
کاربرد های پیمایش ژنوم

پیمایش ژنوم بیشتر در مباحث مربوط به توالی های نوکلئوتیدی بحث می کند. آن ها را می توان به طورشماتیک در دو زمینه موتاژنز افزایشی فهرست بندی کرد که در آن انتگراسیون دی ان ای با منشا ویروسی، ترانسپوزون و T-دی ان ای مطالعه شده و توالی یابی جدید که در آن ابعاد مختلف ژن ها و توالی یابی ژنومی را می توان در نظر گرفت. در این زمینه ها، یک سری زمینه های دیگر را می توان شناسایی کرد که به صورت اهداف مولکولی خاص در

ستون سوم شکل 2 در نظر گرفت. به علاوه، اهداف مولکولی را می توان به زمینه های مختلفی مرتبط دانست. در بخش های زیر، کاربرد های خاص پیمایش ژن بر اساس طرح شکل 2 گزارش می شوند.

موتاژنز افزایشی

ژنوم های هر دو پروکاریوت ها و یوکاریوت ها اغلب محل افزایش دی ان ای ویروسی و عناصر ترانسپوزون می باشند. این رویداد های طبیعی به عنوان ابزاری برای مطالعات ژنتیکی در پزشکی و بیوتکنولژی مطرح بوده اند. به منظور گزارش در مورد نقش و توسعه فنون پیمایش ژن در زمینه موتاژنز افزایشی، ما این موضوع را بر اساس اهداف مولکولی مطالعه تقسیم کردیم که شناسایی مناطق افزایش دی ان ای با منشا ویروسی، ترانسپوزون و T-DNA را شامل می شود.



شکل 2- طبقه بندی کاربرد های پیمایش ژن. این طرح خلاصه ای از توسعه کاربرد های پیمایش ژن را نشان می دهد.

ادغام یا انتگراسیون ویروسی

تعداد زیادی از مطالعات بر روی پیمایش ژن برای شناسایی و بررسی مکان های افزایشی cDNAs رتروویروسی و یا ناقل های برگرفته از رتروویروس در ژنوم انسانی ایجاد شده و داده های ارزشمندی را برای درک مکانیسم های تکرار رتروویروس و پاتوژنز ویروسی در اختیار گذاشته اند و در طراحی ناقل های ناشی از رتروروس ایمن تر نیز نقش دارند. در این بخش توصیفی از پیمایش ژن در بررسی ناقل های رتروویروسی در ژنوم انسان قبل از بحث در

خصوص انتگراسیون cDNAs رتروویروسی ارایه می شود. رترو ویروسها دارای ژنوم RNA هستند که این توالی RNA ، در سلولهای آلوده بوسیله آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (Reverse transcriptase enzyme) خود ویروس، به DNA تبدیل می شود . نسخه DNA تولید شده از روی RNA ویروس ، شبه ویروس یا پروویروس (Provirus) نامیده می شود . پس از تولید ، این پروویروسها با DNA سلول ادغام می گردد. این ادغام فقط در برخی موارد به صورت اتفاقی صورت می گیرد . با اینکه فقط یک نسخه از ساختار ژنی مورد نظر را می توان در ویروس اولیه قرار داد ، با این حال از ناقلهای رتروویروسی می توان به عنوان ناقل برای انتقال ژن مورد نظر به سلول جنسی میزبان استفاده نمود.باید توجه داشت که سلولهای جنسی، غالباً از حمله رتروویروسها در امان هستند و لایه شفاف جنین مانع از دسترسی ویروس به سلولهای جنین می شود و برای انتقال ژن از این طریق حتماً باید قبلاً این لایه ، از رویان جدا شده باشد . در این روش از رویانهای 16-4 سلولی می توان استفاده نمود و برای تکمیل این جریان لازم است که سلول میزبان مرحله S چرخه تناسلی را طی کند . برای اینکه از رترو ویروس برای انتقال ژن استفاده کنیم لازم است بخش اعظمی از ژنهای ویروس را حذف کرده ، یک نسخه از RNA را که از روی DNA ساختار ژنی مورد نظر نسخه برداری شده است را در ژنوم ویروس الحاق کنیم .

در سال 1974 برای اولین بار نشان داده شد که ، بعد از تزریق ژنوم ویروس SV40 در داخل بلاستوسل (Blastocoel) بلاستوسیستهای موش ، وجود DNA این ویروس در سلولهای موشهای بالغ حاصل از این جنین ها ، به اثبات رسید . در این آزمایش از DNA ، MMP (Mo-Mulv-Provirus) استفاده شد که این DNA در ژنوم سلولها تثبیت شده و به نسل بعد منتقل گردید و از این طریق جمعیتهای مقاوم ایجاد گردید . (Jaenisch, 1976; Stuhlmann, Jähner and Jaenisch, 1981) برای استفاده از این پیش ویروس به عنوان حامل ، قسمتهای مختلف ژنوم ویروس همراه با توالی ژنی که باید انتقال یابد در غالب یک ساختار ژنی یکپارچه و قابل انتقال مجدداً جایگزین می شود . باید دقت شود LTR (دو توالی چند صد بازی که در هر دو انتهای بعضی از مولکولهای DNA بویژه DNA ژنومی رترو ویروسها یافت شده است و این توالی در هر یک از دو انتها مشابه هم هستند منتهی در بعضی موارد معکوس یکدیگرند) و منطقه psi سالم و دست نخورده باقی بماند . پوشش ویروس بوسیله یک پرو

ویروس ثانویه ایجاد می شود که علائم پوششی را از دست داده است . (Mann, Mulligan and Baltimore, 1983; Cone and Mulligan, 1984)

ژنوم نو ترکیب حاصل از ترکیب ژن مورد نظر و ژنوم رترو ویروس داخل پوشش پروویروس قرار می گیرند و برای انجام عمل انتقال ، سلولهای هدف بوسیله این رتروویروسهای نوترکیب آلوده می شوند . ژنوم رتروویروس به سلول تزریق شده و وارد هسته شده در برخی موارد با ژنوم اصلی سلول ادغام می شود . جنین های حاصل از این سلول های آلوده به ژنوم نوترکیب ، در داخل رحم حیوانات ماده قرار می گیرند . ژنوم حیوانات تولید شده از این جنینها ، بعد از تولد ، باید برای اثبات وجود ساختار ژنی مورد نظر مورد آزمایش قرار گیرد .

Putten و همکارانش (1985) ازطریق آلوده کردن جنینهای بدون زونا پلوسیدای موش با رترو ویروسهای ناقص نوترکیب شده ، موفق به تولید موشهای انتقال ژنی حامل یک ژن دی هیدروفولیک رودکتاز جهش یافته شدند . Rubenstein, Nicolas and Jacob (1986) توانستند ورود پرو ویروس را هنگامی که جنینهای فاقد پوشش بطور مشترک با سلولهای Psi2 کشت شدند را به اثبات برسانند . در آزمایشی از طریق آلوده کردن جنینهای قبل از کاشت داخل رحم ، بوسیله رترو ویروسهای نوترکیب با ژن کامل بتا گلوبین انسانی (b - globin)همراه با آغازگر (promoter) آن ، موشهای تولید شده ، ژن انتقال یافته را در سیستم هموپوئتیک (Hemopoetic system) خود نشان دادند.

تحلیل استفاده از حامل ها و ناقل های رتروویروسی موجب افزایش مطالعاتی بر روی ترکیب رترویروس ها در ژنوم انسان شده اند زیرا ترکیب Cdna پرو ویروسی به کروموزوم می توانند منجر به تاثیر نهفتگی و یا رونوشت فعال ژن های ویروسی شود. ژن خارجی به سلول موثرترین راه معرفی شده است. این سیستم شامل یک ناقل ویروسی نوترکیب و سلول های بسته بندی از دو بخش، به طور گسترده ای استفاده می شود بردار LNL6 Moloney ویروس سرطان خون موش ویروسی (MO-MLV) تبدیل شده است. ویروس ویروس RNA است، سلول های آلوده، که تولید RNA ژنومی DNA رشته به نسخه کروموزوم میزبان معکوس شد قبل از تشکیل این ویروس، اولین ویروسی رونویسی ژنوم ویروسی RNA مثبت رشته است. کل ژنوم از 5 'به 3' سفارش: تکرار 5 'ترمینال طولانی

(LTR)رمزگذاری یک پروتئین ساختاری ویروسی در رمزگذاری ژن polپروتئین ژن عق زدن(gag) ، کد این پروتئین کت و ژن پاکت و یک مزون 3'LTR 5'LTRو بسته بندی سیگنال بین ژن عق زدن .(gag) پروتئین های ویروسی و برنامه نویسی مناطق عق زدن(gag) ، پ، حذف کل پاکت، به جای ژن اگزوژن را به یک ناقل ویروسی است که حفظ LTR و سیگنال بسته بندی، یک ویروس تکثیر معیوب است. در همین حال، طراحی یک خط سلول بسته بندی، که شامل یک ژنوم ویروس یاور، سیگنال بسته بندی فاقد .MO-MLV هنگامی که بردار ویروسی به خط سلول بسته بندی، ژن بردار است به شکل یک ذره ویروس کامل بسته بندی شده بود، خطوط بسته بندی سلول بنابراین یک بردار ویروسی تولید رده های سلولی. تولید سلول های هدف با فرهنگ و یا یک خط سلولی که حاوی مجموعه ای از ویروس تولید بردار از سوپرناتانت خط همراه با سلول های هدف انکوبه شدند، انتقال ژن می تواند به طور موثر انجام می شود. روش ترانسفکشن بردار ویروسی استفاده از طیف گسترده ای است، می تواند انواع حیوانات، از جمله بدن انسان، از جمله انواع سلول آلوده، یکی می تواند تعداد زیادی از سلول، کارایی ترانسفکشن تا 100 ژن ترانسفکت شده و چند کپی از یک کپی آلوده می توان با دقت وارد ژنوم سلول های میزبان، یکپارچه سازی بالا یکپارچه، و می تواند به طور موثر ابراز طولانی تبدیل شود. در حال حاضر و یک دهه بعد از توالی یابی ژنوم انسان مشخص شده است بر خلاف آن چیزی که قبلا تصور می شد بیشتر ژنوم ناکارآمد (junk) نیست. در حقیقت کنسرسیوم پروژه ENCODE که از تعداد زیادی آزمایشگاه و پایگاه داده بهره می برد مشخص کرد که این نواحی غیر کد کننده خواستگاه هر چیزی، از جایگاه صفت بیماری گرفته تا سیگنال های تنظیمی مختلف را شامل می شود و همگی این اعمال از طریق انواع جدیدی از ژن هایی بر پایه RNA می باشند. بیش از 70 سال پیش برای اولین بار این موضوع ادعا شد که همه این junk ها به این صورت نیستند. باربارا مک کلینتاک اولین استفاده از این junk ها را کشف کرد (ژن های جهنده) که به عنوان عناصر قابل جابجایی شناخته شده اند. این ژن ها فقط به یک کار مشغول هستند، اینکه خودشان را تکثیر کرده و به طور تصادفی در ژنوم درج می کنند. به طور همزمان دو دانشمند دیگر (اریک دیویدسون و روی بریتن) پیشنهاد کردند که ژن های جهنده ممکن است در تنظیم سلول نقش داشته باشند. در واقع در یک مطالعه که در مجله زیست شناسی ژنوم منتشر شد، روین و کلی شواهد را بدست آوردند که

ژن های جهنده در زمان خاموش – روشن شدن ژن ها در سلول های بنیادی می توانند نقش داشته باشند. روین می گوید: ما به بررسی این موضوع پرداختیم که چطور ژن های جهنده با حمله به ژنوم موجب افزایش ژن های جدید در مناطق junk می شوند. کاملا مشخص است که هزاران ژن طویل از RNA غیر کد کننده (lincRNAs) وجود دارد که به احتمال زیاد الگوی جدیدی را برای بیماری و سلامت ارائه می دهد. نحوه تکامل این ژن ها هنوز یک معما باقی مانده است با این حال سر نخ های جدید از ژ ن های جهنده ای که 50 % ژنوم را تشکیل می دهد، به دست آمد است.

رین می گوید: من فکر می کنم که این ها را منشاء LincRNAs در نظر بگیرم. ژنوم انسان به طور مداوم با این عناصر قابل جابجای که می خواهند به جای جدیدی بروند درگیر هستند Kelly.اضافه کرد که در رساله دکتری من (جمع کردن ژنوم از قطعات توالی یابی شده (این ژن های تکراری مزاحم اصلی بودند که من را به این فکر فرو برد که این ها در حال انجام چه کاری در ژنوم هستند. در مطالعه منتشر شده توسط Rinn و Kelley، وابستگی قابل توجه ای از یک رده از رترو ویروس های آندوژنز (ERVs) پیدا شد که می خواهند بر روی LincRNA ها قرار گیرند. این مطالعه نه تنها نشان داد که ERV ها در نواحی LincRNA ها غنی هستند بلکه اغلب در نواحی شروع ژن قرار می گیرند تا رونویسی را تقویت کنند. بطرز جالبی شاید LincRNA های حاوی یک خانواده شناخته شده بنام HERVHبا بیان ژن در سلول های بنیادی در ارتباط باشند. به گفته Rinn این موضوع حاکی از این است که احتمالا جابجایی ERV در ژنوم موجب افزایش LincRNA های در سلول های بنیادی بخصوصی می شود. این نتایج، این سوال را مطرح می کند که چرا ترانسپوزون هایی که از ویروس ها مشتق شده اند بیان سلول های بنیادی ویژه ای را در پستانداران تنظیم می کنند؟ Rinn پیشنهاد کرد که این ترانسپوزون ها احتمالا روند تکاملی ژن های کد کننده RNA را فراهم می کنند و من آن را به عنوان کثیف کننده ژنوم در نظر می گیرم: همان طوری که سیستم ایمنی بچه با بازی کردن در خاک تقویت می شود ژنوم نیز با ترانسپوزون ها کثیف می شود که یک اثر مفیدی را در تولید ژن های LincRNA های جدید ایفا می کند . آنچه که مشخص است این است که ترانسپوزون ها کنترل بیان بافت ویژه ای از LincRNA ها را بر عهده دارد، همچنین بر روی تکامل و عملکرد LincRNA متاثر هستند Kelly.

اظهار داشت که این مطالعه فقط توانسته است سطح نقش های احتمالی ترانسپوزون ها را بر روی عملکرد LincRNAها خراش دهد. به این صورت بیش از 10000 ژن جهش یافته را می توان شناسایی کرد.

ترانسپوزون ها

موتاژنز افزایشی ترانسپوزون ابزاری اساسی برای بررسی کاربرد و عملکرد ژن از طریق فنوتیپ های جهش یافته و شناسایی ژن های جهش یافته در ژنوم های یوکاریوتی است. همراه با روش برچسب زنی کلاسیک ترانسپوزون، راهبرد های دیگر بر اساس موتاژنز افزایشی برای شناسایی ژن ها وجود دارند که فنوتیپ های قابل مشاهده ر ایجاد نمی کنند. در روش برچسب زنی فعال، توالی های فعال سازی قوی نظیر بهبود دهنده ویروس موزاییک گل کلم (CaMV) 35S به درون توالی های ترانسپوزون وارد شد. ژن های برچسب زده شده را می توان طوری بیان بالا کرد که ایجاد فنوتییپ های سودمند کنند. در مهار ژن و مهار بهبود دهنده، ساختار های ترانسپوزون حاوی یک ژن گزارش گر به سیگنال های رونوشتی سیس در مکان افزایش واکنش نشان می دهند. ژن میزبان با مشاهده الگوی بیان ژن گزارش گر و توالی یابی مکان های هدف شناسایی می شوند. سیستم های مختلف به دام اندازی توسط اسپرینگر بررسی شده اند.

در این سناریوی پیچیده، پیمایش ژن نقش مهمی در تحلیل رویداد های ترانسپوز ایفا کرده و داده های ارزشمندی را برای آنالیز ژنتیکی معکوس در اختیار می گذارد. نخستین کاربرد پیمایش ژن برای شناسایی مکان های ادغام ترانسپوزون در یوکاریوت ها را می توان توسط مطالعه هوی و همکاران یافت. در سال های بعد، مطالعه دیگر انجام شد که در آن پیمایش ژن نه تنها برای شناسایی ژن های ناک اوت استفاده شد بلکه برای تسهیل توصیف کاربرد پیمایش ژن برای مطالعه عناصر قابل ترانسپوز استفاده شد. این بخش به زیر بخش های گیاهان، بی مهرکان، مهره داران و مخمر ها تقسیم شدند.

گیاهان

غیر فعال سازی ژن توسط افزایش ترانسپوزون برای ژنومیک های کارکردی در گیاهان مختلف استفاده شده است. لازم به ذکر است که T-DNA از پلاسمید Ti از A. tumefaciens برای این منظور استفاده شده است. اگرچه

موتاژنز افزایشی T-DNA به طور جداگانه بررسی می شود، تفاوت بین گزارش های مربوط به آنالیز افزایش ترانسپوزون و یا T-DNA همیشه امکان پذیر نیست زیرا در بسیاری از موارد T-DNA به عنوان یک سوبسترا برای ترانسپوزون های مهندسی شده استفاده می شود. تحلیل برچسب زدنی ترانسپوزون و مطالعه سایت های افزایشی برای ترانسپوزون خاص در گیاهان در جدول 3 گزارش شده است.

در میان آنالیز های گزارش شده در جدول 3، مورد مهم راهبرد مبتنی بر I-PCR برای شناسایی ژن های جهش یافته در عناصر قابل ترانسپوز می باشد که I-PCR را با فیلتر متمایز برای شناسایی ژن های برچسب زنی شده در رابطه با عناصر قابل ترانسپوز بر اساس راهبرد gw کاست شناسایی می کند. در این روش پرایمر dTph1 با پرایمر کاست جفت شده و برای تکثیر سایت های افزایشی به کار می رود. قطعات تکثیر شده سپس از طریق سیستم ژل پلی آکریلامید با تفکیک پذیری بالا تجزیه تحلیل می شوند.

تحلیل های بزرگ مقیاس مکان های افزایشی با اصلاح راهبرد های پیمایش ژن انجام شده اند. از طریق PCR (TAIL-PCR) نامتقارن حرارتی و روش های مهار PCR GW بیش از 42000 مکان افزایش رترو ترانسپوزونTos17 در ژنوم برنج آنالیز شده اند. روش اتومات TAIL-PCR برای تحلیل موتانت های افزایشیAc/Ds و ترانسپوزون های Ac در دو رقم برنج ایجاد شد. راهبرد DLA GW مربوط به توالی یابی امکان شناسایی حدود 965000 توالی را با ترانسپوزون موتاتور ذرت داد. این آنالیز ها موجب توسعه دیتابیس های موتانت افزایشی شدند. در رابطه با rabidopsis thaliana، دیتابیس ATIDB ایجاد شده است که دارای اطلاعاتی در خصوص T-DNA می باشند. برای برنج، دیتابیسOryGenesDB ایجاد شد.

بی مهرگان

در میان بی مهرگان،Drosophila melanogaster یک ارگانیسم مدل بوده که بر روی آن مطالعات زیادی در خصوص ژنوم های کارکردی مبتنی بر ترانسپوزون انجام شده است. تحلیل موتاژنز افزایشی را می توان برای دیگر حشرات و متازواهای بی مهره دیگر نظیر حشرات Tribolium castaneum و کرم Caenorhabditis

elegans یافت. مروری بر کاربرد تحلیل GW برای مطالعه ترانسپوزون در میان این موجودات به ما امکان بررسی زیادی را در توسعه پیمایش ژن می دهد که در جدول 4 دیده می شود.

جدول 3- تحلیل ترانسپوزون در ژنوم های گیاهی توسط رویکرد های پیمایش ژن.. ترانسپوزون ها به ترتیب الفبا مرتب شده اند. اسامی رویکرد های پیمایش ژن و کیت ها در جداول 1 و 2 دیده می شوند.

Transposon	Plant	GW approach/kit	Note	References
Ac/Ds	Transgenic tobacco	I-PCR	T-DNA launch-pad	74
	A. thaliana			87
	Tomato		Enhancer trapping*	88
	Maize		"	89
	Lotus japonicus		T-DNA launch-pad	90
	A. thaliana		Activation tagging	91
		TAIL-PCR	Enhancer trapping	92
			Gene trapping	93–95
	Rice		High-throughput	96
			Gene trapping	97
	Barley		Gene trapping	98
	Transgenic tobacco cells	LM-PCR		99
dTph1	*Petunia hybrida*	I-PCR	See text	100
		Cassette PCR		101
En	*A. thaliana*	I-PCR		102,103
		TAIL-PCR		103
En/Spm-like	*Zingeria biebersteiniana*	DNA Walking SpeedUp kit		104
	Antirrhinum majus	Genome Walker kit		105
Mu	Maize	DLA GW	High-throughput	60
Spm		I-PCR		74
Tos17	Rice		"	106
		TAIL-PCR	High-throughput	107
		Suppression PCR		
Ty-1	Apple	Site finding PCR		108
		Genome Walker kit		109

در خصوص مگس سرکه، ابزار اصلی مطالعات ترانسپوزون افزایشی شامل عناصر P می باشد که در راهبرد های مختلف برچسب ژن، مهار بهبود دهنده و به دام اندازی ژن نقش دارند.I-PCR برای اولین بار به عنوان جایگزین روش موتاژنز مکانی انتخاب شده برای انتخاب لاین های تبدیل شده استفاده شد. با این روش، مطالعات زیادی انجام شده و سایت های ادغام عناصر را رد یابی کرده اند.

روش UFW GW برای شناسایی و مطالعه انتشار و تکامل عناصر قابل ترانسپوز درDarwinulidae استفاده شده است که خانواده استراکد های غیر دریایی است و از این طریق دو خانواده از رترونرانسپوزون های سایرینکس و دافته در Darwinula stevensoni مطالعه می شوند.

برای موتاژنز افزایشی در C. elegans، مطالعه ای به بررسی روش PCR وکتورت به عنوان راهبرد GW برای تهیه نقشه ترانسپوزونTc1 در ژنوم موتاتور پرداخت. همین روش با تحلیل الکتروفورز قطعات تکثیر شده نوع وحشی و لینه عای موتانت همراه بوده است. باند های افتراقی از ژل برش یافته و با توالی یابی نوکلئوتیدی تحلیل می شوند. توزیعات خانواده های ترانسپوزون(ITm, hAT, piggyBac, helitron, foldback) در چندین گونه روزن دار با استفاده از روش UFW تجزیه تحلیل شده است. در این موارد، مناطق تلومتریک غنی از عناصر قابل ترانسپوز می باشند در حالی که مناطق غنی از ژن عاری از ترانسپوز می باشند.

مهره داران

موتاژنز افزایشی ناشی از ترانسپوزون، که برای گیاهان و بی مهرگان توسعه یافته است، به طور گسترده ای در مهره داران به دلیل شناسایی هر دو سیستم های ترانسپوزون طبیعی و مصنوعی به کار برده شده اند. چندین روش GW برای توسعه و مطالعه این سیستم ها به کار گرفته شده است.

مقالات مروری اخیر بر روی راهبرد های موتاژنز افزایشی در مهره داران که کاربرد روش های پیمایش ژن گزارش شده است، توسط ایزاک و همکاران 144 و هکت و همکاران 145 برای تحلیل ترانسپوزونSleeping Beauty در سلول های انسانی با استفاده از عناصر قابل ترانسپوز در زنوپوس، مطالعه ترانسپوزون ها در خوک و فریدل و ساریتو (83) برای موتاژنز مهار ژن در موش نیز از جمله موارد دیگر است. یک دیتابیس خاص، حاوی توالی های افزایشی بدست آمده از I-PCR برای سیستم ترانسپوزpiggyBac در سلول های موش اخیرا ایجاد شده است.

مخمر

موتاژنز مخمر به مخمر (Saccharomyces cerevisiae) اعمال شده است. رویداد های ترانسپوزیشن ترانسپوزون مخمر Ty1 با استفاده از I-PCR تجزیه تحلیل شده و نشان می دهد که افزایش این عنصر به ندرت در مناطقORF دیده می شود. برای موتاژنز ترانسپوزون ژنوم مخمر، یک راهبرد موتاژنز ترانسپوزون ایجاد شد که در آن یک کتاب خانه ای از دی ان ای ژنوم مخمر موتاژنز شده با ترانسپوزون باکتریایی در اکولای تولید شد و آلل های جهش یافته به طور متعاقبا به مخمر برای تحلیل های کارکردی انتقال یافتند. کومار و سیندار یک پروتکل را

برای موتاژنز شاتل ارایه کردند که در آن PCR وکتورت یک راهبرد پیمایش ژن برای شناسایی مکان های افزایش به ژنوم مخمر ارایه کرد. گزارش ها در خصوص استفاده از PCR و یا I-PCR برای تحلیل موتانت های افزایشی بدست آمده از کتاب خانه های شاتل اخیرا منتشر شده است.

T-DNA

T-DNA از وکتورA. Tumefaciens یک عنصر سیالر مورد استفاده برای ترانسفورماسیون گیاهی با ژن های هترولوگ و یا برای آنالیز موتازنز افزایشی ژنوم گیاهی می باشد. در هر صورت، ایجاد T-DNA مهندسی شده در ژنوم میزبان یکی از زمینه های قدیمی پیمایش ژن است. در بحث زیر ، دو موضوع زیر به طور مجزا بررسی می شوند

T-DNA برای انتقال ژن

قبل از کارازمایی های میدانی گیاهان اصلاح شده ژنتیکی، مهم ترین کار شناسایی مکان های افزایش T-DNA در ژنوم میزبان و انتخاب کیاهان ترانسفورم شده حامل یک رونوشت T-DNA(لازم برای اجتناب از فرایند های خاموش سازی تراریخته که با افزایش T-DNA چند گانه فعال سازی می شود) می باشد. از این روی در برخی از موارد روش های پیمایش ژن، برای تعیین تعداد مکان های ادغام T-DNA بدون تحلیل تولالی یابی استفاده شدند. اسپرینتی و همکاران به تحلیل پیچیدگی الگوی ادغام T-DNA در ارابیدوپسیز با تحلیل الگوی PCR با استفاده از روش PCR GW مهار پرداختند. به طور مشابه، روش انگشت نگاری T-DNA برای تمایز بین لاین های تراریخته چند رونوشتی و ترانسفورمنت های تک رونوشتی بر اساس پلی مورفیسم های طول تکثیر شده قطعات دارای اتصالات ژنوم گیاهی/T-DNA استفاده شد.

جدول6، مطالعاتی را گزارش می کند که در آن روش های پیمایش ژن برای شناسایی مکان های ادغام T-DNA نوترکیب در کیاهان تراریخته به کار رفته است.

دویس و همکاران نخستین مقاله را بر روی شناسایی توالی مکان های افزایشی T-DNA در گیاهان تراریخته ارابیدوپسیز با استفاده از روش PCR GW منتشر کردند. همین روش متعاقبا توسط محققان مختلف استفاده شد. تحلیل مکان های انتگراسیون T-DNA در گیاهان موز با استفاده از نسخه اصلاح شده پروتوکل PCR GW صورت

گرفت. در نسخه جدید، کاست آداپتر با پایانه -5 غیر فسفوریلات شده رشته کوتاه برای آزاد سازی آن طی مرحله دناتوره سازی PCR در نظر گرفته شده و تنها رشته اداپتور به صورت متصل باقی ماند تا تکثیر های اضافی صورت نگیرد.

روش PCR تی لینکر برای مقایسه روش های ترانسفورماسیون بیولیستیک و T-DNA در گیاهان برنج و آرابیدوپسیز مورد استفاده قرار گرفته است. همان طور که انتظار می رفت، در نخستین مرحله، چندین رونوشت ژن در ژنوم یافت شد در حالی که در گیاهان تراریخته T-DNA، تحلیل پیمایش ژنی نشان داد که تعداد محدودی از افزایشات با مرز های وکتور راهنمایی می شود.

T-DNA برای موتاژنز افزایشی

چندین گزارش در خصوص استفاده از T-DNA برای موتاژنز افزایشی ژنوم با برچسب زنی ژنی و یا راهبرد های به دام اندازی ژنی وجود دارد. برای این موضوعات، تحلیل های پیمایش ژنی برای آرابیدوپسیز و ژنوم برنج استفاده شده است که در زیر بحث می شوند.

تحلیل بزرگ مقیاس افزایش T-DNA در ژنومArabidopsis با گروه های مختلف صورت گرفته است که نسخه های پر بازده ای از روش اصلی PCR GW ارایه کرده اند. نتایج توالی یابی در دیتابیس های زیر موجود است: http://genoplante-info.infobiogen.fr [178], http://www.gabi-kat.de/(http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress [176] and [177]).

راهبرد TAIL-PCR برای افزایشT-DNA توالی یابی با گروه های مختلف استفاده شده است. به خصوص این که، ساشیون و همکاران راهبرد TAIL-PCR GW را برای تحلیل 1000000 ترانسفورمنت T-DNA از گیاهان آرابید.پسیز ایجاد کردند. در این رابطه، مکان های افزایش T-DNA ، مقدار زیادی از مناطق پروموتور را نسبت به مناطق رونوشتی و مناطق اینترژنی نشان دادند. کتابخانه ای از مکان های شناسایی شده ایجاد شده و برای کاربران خارجی قابل دسترس هستند((http://www.tmri.org .) تحلیل سایت های افزایش T-DNA با استفاده از PCR معکوس و روش های PCR GW انجام شده و قطعات با طول بیشتر از KB6 ایجاد شده است.

موتاژنز های افزایشی بزرگ مقیاس T-DNA بر روی برنج انجام شده است. تحلیل هزاران مکان افزایشی با استفاده از I-PCR و راهبرد های مهار PCR GW صورت گرفته است. اخیرا تحلیل بزرک مقیاس افزایش T-DNA با استفاده ازTAIL-PCR در 63000 گیاه ترا ریخته صورت گرفته است. در همه موارد قطعات افزایشی در همه 12 کروموزوم توزیع یافته اند. اطلاعاتی بر روی لاین های تبدیل شده برنج در مجموعه SHIP جمع آوری شده و می توان آن ها را در http://ship.plantsignal.cn یافت.

ژنوم آرابیدوپسیز یک زمینه اصلی کاری برای بسیاری از آنالیز های T-DNA به دام اندازی ژن بوده است. نخستین گزارش در خصوص تولید و تحلیل مجموعه لاین های مهار انهنسر آرابیدوپسیز به 1999 بر می گردد. در این رابطه TAIL-PCR وI-PCR برای تحلیل توالی های موتانت های گل آذین استفاده شدند. پروتکل های مشابه هنوز نیز امروزه استفاده می شوند. پروتکل مصل برای مهار پروموتور و تحلیل مناطق T-DNA توسط TAIL-PCR را می اوان در مقاله بانیلوان و کالیوس یافت. PCR مهار برای فیلتر یک مجموعه T-DNA/uidA مهار ژن از 10000 لاین ارابیدوپسیز تراژنی برای شناسایی فعالیت GUS طی جوانه زنی بذر استفاده شده است. کاربرد های دیگر روش های پیمایش ژن در مهار ژن در آرابیدوپسیز را می توان در مقاله رمروی رادمونی و همکاران یافت.

در برنج، مطالعات مهار ژن T-DNA از روش TAIL-PCR برای تحلیل ساختار های حاوی عنصر قابل ترانسپوز Ac/Ds و ژن گزارش گر uidA استفاده کرده اند. از آن زمان به بعد، مطالعات مختلف مهار ژن در برنج با این روش توالی یابی همراه بوده است. توصیف جامع دستاورد های مهار ژن در برنج از جمله استفاده از روش های پیمایش ژن را می توان در مقاله ان و همکاران (197) یافت.

تحلیل مجموعه های بزرگ به دام اندازی ژن T-DNA در برنج با استفاده از روشPCR GW و اخیرا با-TAIL PCR انجام شده است. در همه این موارد، دیتابیس های خاصی ایجاد شده اند:OTL (Oryza Tag Line)، TRIM/http://urgi.versailles.inra.fr/OryzaTagLine، http://trim.sinica.edu.tw، RMD(http://rmd.ncpgr.cn).

TAIL-PCR به عنوان یک روش پیمایش ژن برای تحلیل به دام اندازی ژن در ژنوم جو و موز انتخاب شده است.

توالی یابی جدید

کاربردپایه پیمایش جدید، شناسایی توالی های نوکلئوتیدی در روند مطالعه ژن ها و ژنوم ها می باشد. هدف اصلی مطالعه و تعیین توالی های ناشناخته و یا شناسایی تغییرات نوکلئوتیدی و موتاسیون هاست.

شناسایی توالی های ناشناخته

با بررسی منابع می توان دریافت که مطالعات زیادی به شناسایی مناطق تنظیم کننده اختصاص داده شده است در حالی که تعداد کمی از گزارش ها مربوط به استفاده از پیمایش ژن در شناسایی ژن ، توالی یابی کلون های BACو YAC، نر عقیمی سیتوپلاسمی، و خانواده های چند ژنی می باشند. جدول 7 مطالعات انجام شده توسط پیمایش ژن را برای تحلیل مناطق تنظیم کننده نشان می دهد در حالی که دیگر کاربرد ها در جدول 8 دیده می شوند. به علاوه لازم به ذکر است که کاربرد پیمایش ژن در تحلیل موتاژنز حتی اکر این موضوع خارج از حیطه این مقاله باشد، اطلاعات کلیدی در اختیار می کذارد.

سیبرت و همکاران روش مشهور PCR GW را برای پیمایش مناطق کد کننده TPA انسان یا فعال کننده پلاسموژن نوع بافی و ژن های ترانسفرین برای فواصل ارزشمند ارایه کردند. این روش یکی از رایج ترین روش ها می باشد.

پادیماس و ریچرت اقدام به ایزوله سازی مناطق پروموتور از سه ژن پروکسیداز ذرت و بهبود راهبرد اسپینکرت با معرفی اداپتور های تری بلوک و حذف دی ان ای ژنومی غیر پیوندی با هضمExoIII کردند.

شناسایی مناطق تنظیمی خانواده های چند زنی را می توان با روش های مختلف انجام داد. لئونی و همکاران از راهبرد ET-GW استفاده کردند که در آن مناطق فوق العاده حفاظت شده خانواده چند ژنی برای طراحی پرایمر های رایج به عنوان پرایمر های ویژه ژنی استفاده می شوند. به این طریق، شناسایی هم زمان عناصر تنظیمی کد گذاری خانواده های چند ژنی اسفناج برای ایزوفرم های Lhcb1 پروتین جذب نور امکان پذیر می شود. به علاوه، اعضای ژنی جدید همین خانواده را می توان با روش فوق شناسایی کرد. در دومین مورد، روش TVL-PCR GW به کار برده شده برای مناطق تنظیمی ژن های توت فرنگی SUPERMAN، برای شناسایی اعضای چند گانه خانواده

زن با پرایمر های بر اساس توالی های حفاظت شده به صورت مکان های پرایمینگ استفاده شد. لازم به ذکر است که کیت پیمایش ژن برای تحلیل کلون نیشکر BAC حاوی چند رونوشت از ژن نی شکر DIRIGENT به کار برده شده است.

تحلیل موتاسیون ها و تغییرات نوکلئوتیدی

کاربرد پیمایش ژن برای تحلیل تغییرات و موتاسیون های نوکلئوتیدی بر اساس راهبردLM-PCR می باشد. در واقع، اگرچه روش LM-PCR به صورت روش انگشت نگاری استفاده شده است، به عنوان یک روش پیمایش ژن در نظر گرفته شده است. پریفر و همکاران 241 کاربرد آن را برای توالی یابی ژنوم و آنالیز متیلاسیون از کیناز فسفو گلیسرات ارایه کردند. نسخه اتومات از LM-PCR قابل مصرف برای تحلیل پیمایش ژن از متیللاسیون دی ان ای، آسیب دی ان ای و رد پای دی ان ای پروتین توسعه یافته است. اخیرا این روش توسعه یافته است و برای تهیه نقشه خسارت دی ان ای در سرطان به کار گرفته شده است. کاربرد LM-PCR برای تحلیل آسیب دی ان ای میتوکندری ناشی از مواد شیمیایی و افزایش سن گزارش شده است(245-246).

نقد روش های پیمایش ژن

استفاده جامع از روش پیمایش ژن به دلیل وجود روش های مختلف و متغیر های زیاد در ارزیابی ها سخت است. با این وجود برخی از نقد ها بر این روش وارد است.

جدول 7- مناطق تنظیم کننده شناسایی شده در یوکاریوت ها با روش های پیمایش زن. از آن جا که بیش از 200 از 200 مقاله در منابع در این خصوص یافت می شوند، که به استفاده از کیت های تجاری پرداخته اند، تنها مقالات مربوط به توسعه روش های پیمایش ژن گزارش می شوند. تحلیل ها به طور زمانی مرتب شده اند.

Gene	Organism	GW approach/kit	Note	References
Po	Shark	Cassette PCR		10
TPA	Man	Suppression PCR		15
Transferrin				
At23	Arabidopsis	RAGE-GW		32
PR-10	Parsley			
Peroxidase	Maize	Modified splinkerette	See text	16
Sucrose phosphate synthase	Banana	Single primer amplification		58
Actin	Sugarcane			
S15 ribosomal protein	*Dunaliella tertiolecta*			
Several cDNAs	*Brassica juncea*	Mishra *et al.*		40
	Pennisetum glaucum			
Gibberellin 20-oxidase	Rice	T-linker PCR		21
Squalene synthase	*Ganoderma lucidum*	Self-formed adaptor PCR		48
Ascorbate peroxidaseHsp70 Hsp10	*P. glaucum*	High-throughput genome walking		50
Gst	*Salicornia brachiata*			
Lhcb1 family	Spinach	Leoni *et al.*		56,57
LRDEF	Lily	Straight walk		26
OgGSTZ2	Rice			
SuRB	Tobacco			
PGK1	*Pichia ciferrii*	Template blocking PCR		28
SUPERMAN-like	Strawberry	TVL-PCR		29

جدول8-ژن های شناسایی شده در یوکاریوت ها با روش های پیمایش ژن. بیشتر داده ها با استفاده کیت پیمایش ژن و یا روش های دیگر حاصل می شوند.

Species	Gene	Application	References
Animals			
Drosophila melanogaster	*Sup 4*	BAC/YAC termini	207
Homo sapiens	*FLEB14-14*	BAC/YAC termini	208
	Scyb11	BAC/YAC termini	209
	HPRT	Gene sequencing	210
	LRP1B	Gene sequencing	211
	ELF3	Gene sequencing	212
	Dystrophin	Gene sequencing	213
Macropus eugenii	*LTB, TNF* and *LTA*	BAC/YAC termini	214
Schistosoma mansoni	*SmHox1 SmHox4* and *SmHox4*	BAC/YAC termini	215
Salmo salar	*Hox* genes	BAC/YAC termini	216
Pogona vitticeps	Z and W chromosome fragment	Gene sequencing	217
Fungi			
Latimeria menadbensis	*Hox*	Gene sequencing	218
Penicillium pinophilum	Endo-β-1,4-glucanase gene 5	Gene sequencing	219
Phoma betae	Aphidicolan-16β-ol synthase	Gene sequencing	220
Phomopsis amygdali	*PbGGs, ACS, PbP450-1, PbP450-2, PbTP, PbTF*	Gene sequencing	220
	PaDC1 and *PaDC2*	Gene sequencing	221
	Diterpene hydrocarbon phomopsene	Gene sequencing	222
Pucciniomycotina	*RHA1, RHA2* and *RHA3*	Gene sequencing	223
Plants			
Allium cepa	*Orf725*	CMS	224
Capsicum annuum	*Rf* flanking region	CMS	225
Cicer arientinum	*Pi-ta-2* and *xa5*	Gene sequencing	226
Coffea arabica; C. canephora	*ManS1* and *GMGT1*	Gene sequencing	227
Malus domestica	*Mal D3* genes	Gene sequencing	228
	MdAGP1, MdAGP2 and *MdAGP3* genes	Gene sequencing	229
Oryza sativa	Slender glume	BAC/YAC termini	230
	OsPE	Gene sequencing	231
Spinacia oleracea	*Lhcb1*	Multigene family	56
Sugar beet	Restorer-of-fertility	BAC/YAC termini/CMS	232
Sugarcane	*DIRIGENT*	Multigene family	206
Taxus media	Geranyl geranyl diphosphate	Gene sequencing	233
Triticum aestivum L	*LMWGS* genes	BAC/YAC termini	234
		BAC/YAC termini	235
Protozoa			
Cryptobia salmositica	Adenosylmethionone synthetase	Gene sequencing	236
	Cathepsin L-like cysteine proteinase	Gene sequencing	237
	MSP-1	Gene sequencing	238
Neospora caninum	*NcSAG4*	Gene sequencing	239
	NcBSR4	Gene sequencing	240

نخستین مسئله این است که آیا توالی یابی منفرد و چندگانه لازم هستن یا نه؟ در رابطه با مورد اول باید فرض کرد که بیش تر روش ها باید نتایج رضایت بخش داشته باشند. این مسئله برای شناسایی مناطق تنظیم کننده ژن بسیار اهمیت دارد. که حداقل 12 روش در این زمینه به کار برده شده است. بر عکس، در شناسایی توالی های چندگانه تنها تعداد محدودی از روش ها به طور موفق به کار گرفته شده اند(I-PCR، وکتورت، اسپلینکرت، مهار،-TAIL PCR) که به عنوان نخستین گزینه در طراحی آزمایشات پیمایش ژن مطرح هستند.

در هر صورت، برخی از تفاوت ها در میان راهبرد های پیمایش ژن وجود دارند و سه پارامتر را می توان برای ارزیابی بحرانی آن ها در نظر گرفت : تخصصی بودن، حساسیت و کارایی. در مورد تخصصی بودن، باید گفت که عمدتا بستکی به پرایمر ژن ویژه در روش پیمایش ژن دارد. I-PCR از دو پرایمر استفاده کرده و باید به عنوان روشی خاص در نظر کرفته شود. با این وجود همه روش های دیگر از پرایمر های خاص جفت شده با پرایمر پیمایشی خاص اداپتور استفاده کرده و برخی از روش ها از پرایمر های تصادفی استفاده کرده و کم تر تخصصی هستند. باید از روش های PCR کاست استفاده کرد که از سنتز محصولاتPCR غیر خاص محافظت می کنند. روشDLA GW بلوک شده به این نکته می پردازد و نشان می دهد که بلوک اکستنشن ادپتور در نخستین سیکل از تکثیر نهایی موجب افزایش خاص بودن محصولات RPC از 44 تا 100 درصد می شوند.

DLA بلوک شده با PCR اسپلینکرت از نظر حساسیت مقایسه شد. حساسیت بیشتر نخسین روش با افزایش شدت نسبی باند های الکتروفروتیک محصولات تکثیر اثبات شد. در آزمایش فیلتر برای شناسایی عناصر P برای مگس سرکه، اگرت نسبت های مختلف مگس های حامل ترانسپوزون و شاهد را ترکیب کرد. آن ها نشان دادند که PCR وکورت حساس تر از I-PCR در شناسایی عناصر P تراژنی مهم است و باعث شناسایی افزایش ویژه در نسبت 1 : 6000–10 000 شد.

با این حال باید گفت که برخی از پیشرفت ها موجب بهبود حساسیت کلی پیمایش های ژنی شده است. این مورد در خصوص بیوتینلاسوین اداپتور ها و پرایمر ها صدق می کند. نیلسن نشان داد که هنگام استفاده از تخلیص فاز

جامد قطعات، مقدار پیمایش ژن حساسیت بالایی پیدا می کند و قادر به شناسایی دو رونوشت از توالی هدف در پیش زمینه دی ان ای 25 ng است.

اخیرا سه کیت تجاری (کیت پیمایش ژنوم APAgene GOLD،) کیت 2 تسریع پیمایش دی ان ای(Seegene) و سیستم وکتورت جهانی(سیگما) و روش مهارPCR GW از نظر شناسایی مناطق فلانکینگ T-DNA در تصاویر تراژنی مقایسه شده اند. در این آنالیز دو روش بر اساس توسعه پرایمر های خاص ژنی و تکثیر PCR با پرایمر ها موفقیت بیشتری از روش PCR دو کاسته نشان دادند که تعداد کم تری از مناطق فلانکینگ داشت(158).

در رابطه با کارایی، برخی از راهبرد ها باید برای برای افزایش توان قرائت نسبت به 3KB برای تک پیمایش مثلا LD-GW PCR [55]،PCR مهار، I-PCR طویل وTAIL-PCR ارایه شوند. نکته مهم که باید در نظر گرفته شود، امکان تعمیم تحلیل های پر بازده است. و برای روش PCR مهار [107,172–177 TAIL-PCR ,] I-PCR ,[96,107,182,199][72,88]، پیمایش ژن با بازده بالا(248) و242] LM-PCR]، پیمایش مستقیم(26) و PCR توسعه مناطق محدود کننده(33) امکان پذیر است.

نتیجه گیری

پیمایش ژنی دارای طیف وسیعی از راهبرد های آسان برای شناسایی توالی های نوکلئوتیدی ژنوم، که برای تحلیل های موتاژنز افزایشی و توالی یابی جدید مفید است می باشد. تنها لازمه اصلی، قابلیت دسترسی به توالی های نوکلئوتیدی شناخته شده برای شروع می باشد. چندین روش پیمایش ژنوم در طی 20 سال گذشته ایجاد شده اند و پیشرفت های زیادی به نخستین راهبرد های اساسی افزوده شده اند که شامل استفاده از روش های توالی یابی نسل بعدی نیز می باشند. بیشتر راهبرد های پیمایش ژن و پیشرفت ها در روند روش های توالی یابی جدید مشاهده شده اند.

انعطاف پذیری زیاد راهبرد های پیمایش ژن موجب شده است تا کاربرد آن در بسیاری از آزمایش گاه های تحقیقاتی بالا رود. به علاوه امکان ترکیب روش های پیمایش ژن با روش های توالی یابی نسل بعدی موجب افزایش کاربرد آن با روش های امروزی بیولوژیی مولکولی وجود دارد.

ترجمه فا
TarjomeFa.Com

این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

✔ لیست مقالات ترجمه شده

✔ لیست مقالات ترجمه شده رایگان

✔ لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی