

## اصول و تکنیک‌های به دام‌اندازی ژن‌ها و آخرین پیشرفت‌های این متد

لادن یاری<sup>۱</sup>، کامران قائدی<sup>۲\*</sup>

۱- دانشجوی دوره دکتری تخصصی ژنتیک مرکز ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری  
۲- استادیار ژنتیک، بخش سلولی و ملکولی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم، دانشگاه  
اصفهان

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: kamranhaedi@royaninstitute.org  
(تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۴/۲۷)

### چکیده

راهکار تله‌گذاری برای ژن نوعی راهبرد مهندسی ایجاد جهش‌های ژنتیکی است که در ژن‌های خاصی از سلول صورت می‌گیرد و می‌توان آن را نوعی جهش هدفمند نامید و راهکاری است برای ایجاد جهش در سیستم‌های آزمایشگاهی که این جهش می‌تواند منجر به حذف کامل عملکرد ژن یا تغییر بیان آن شود و در نتیجه به سهولت می‌توان عملکرد ژن را بررسی کرد. همچنین این روش به صورت متدی مشابه جهت تصحیح جهش‌های پاتوژن و احیا فنوتیپ‌های نرمال و به‌عنوان پتانسیل‌های درمانی کاربرد دارد. مراحلی که در روش تله‌گذاری ژن صورت می‌گیرد، شامل کلون کردن و بررسی بیان ژن و تجزیه و تحلیل فنوتیپ ایجاد شده مرتبط با ژن هدف است. راهکار به دام-اندازی ژن‌ها عمدتاً از طریق پدیده نوترکیبی همولوگ صورت می‌گیرد و ژن کلون شده مورد نظر باید مشخصاً از نظر توالی، مشابه ژن هدف درون ژنوم باشد تا امکان انتقال به سلول مناسب را داشته باشد. البته نوع حامل مورد کاربرد جهت انتقال یا تغییر جایگاه ویژه هم از اهمیت بالایی بهره‌مند است. در نهایت شواهد وقایع نوترکیبی را می‌توان با راهکارایی مختلف نظیر RT-PCR و RACE-PCR غربال کرد که در این-صورت باید یک آغازگر اختصاصی برای ژن نشانه و آغازگر اختصاصی دیگری هم برای توالی موجود در ژن معرفی گردد.

### مقدمه

با توجه به گستردگی اطلاعات راجع به توالی DNA که در Gene Bank و به‌طور عمومی از طریق Data Baseها در دسترس است، تلاش دانشمندان معطوف به بررسی عملکرد این توالی‌هاست. اگر چه در این میانه تکنیک‌های بیوانفورماتیک به پیشگویی عملکرد برخی از توالی‌ها می‌پردازد، اما محدودیت‌هایی در این بین وجود دارد اولاً این تکنولوژی بر اساس عملکرد نرم افزاری است که دارای الگویی عددی است و در نتیجه خود محدودیت‌هایی را در پی دارد و ثانیاً پیشگویی وقایع درون موجود زنده بسیار دشوار است به‌طور مثال وجود برش متغیر در ژن‌ها و پروتئین‌ها نتایج قابل پیش‌بینی را محدود می‌سازد. نهایتاً بهترین قضاوت از عملکرد ژنی بر پایه آزمایشات و بررسی‌های بیولوژیکی است و در نتیجه امروزه آن را منطقی‌ترین و معتبرترین راهبرد در نظر می‌گیرند (۳،۲۹).

### واژه‌های کلیدی

تله‌گذاری ژنی،  
حامل،  
ژن خارجی،  
نو ترکیبی همولوگ،  
RACE – PCR  
RT – PCR

چهار راهبرد اصلی در اعمال جهش عبارتند از:

- ۱- جهش‌های خودبخودی
- ۲- القاء‌کننده‌های فیزیکی
- ۳- القاء‌کننده‌های شیمیایی
- ۴- تکنیک‌های بیولوژیکی

جهش‌های خودبخودی نرخ رخداد کمی دارند و تنها زمانی‌که فنوتیپ واضحی از خود بروز بدهند قابل بررسی هستند. القاء جهش توسط پرتوایکس نرخى حدود ۲۰۰-۱۰۰ برابر جهش‌های خودبخودی دارد اما مشکل اینجاست که چون موجب بازآرایی-های کروموزومی<sup>۱</sup> می‌شوند، در نتیجه امکان جهش در بیش از یک ژن وجود دارد و از این رو برای بررسی جهش در عملکرد یک ژن مفید نیستند. جهش‌زاهای شیمیایی مثل ENU (اتیل نیتروز اوره) برای ایجاد جهش‌های نقطه‌ای در لایه‌ی زایا در سلول‌های بنیادی جنینی موشی (mESC) به کار می‌روند که عمدتاً ایجاد جهش‌هایی می‌کنند که منجر به حذف یا کسب عملکرد<sup>۲</sup> می‌شود (۱،۲،۳).

روش "Transgene" اولین بار در سال ۱۹۷۶ با موفقیت در سلول‌های لایه زایای<sup>۳</sup> موش برای ایجاد جهش به کار رفت و از آن پس پایه اصلی تحقیقات بیولوژیکی روی عملکرد ژنوم شد. در ابتدا این متدها با القاء جهش توسط ترزوویروس‌ها عمومیت داشت که در نسل اول فرزندان موزاییک ایجاد می‌شدند و جانداران هموزیگوت در ژن مورد بررسی یک جهش داشتند و فقط بعد از دو نسل امکان بررسی عملکرد ژن بود که این‌گونه متدها جهت آزمایشات گسترده و فراوان ناکارآمد و بسیار پر زحمت بودند، در نتیجه روشی جدید وارد عمل شد که آن را "Gene targeting /Gene trapping" تله‌گذاری ژن نامیدند که با پیشرفت این راهکار، امروزه جهش را می‌توان در مکان‌های خاص ژنی از طریق نوترکیبی همولوگ القاء کرد. در این روش لازم است از قبل قطعات ژنوم را با طول مناسب برش داده و حامل‌های هدف‌گیری مناسب را طراحی کرد، که در نهایت با بروز ژن گزارشگر می‌توان ژن به دام افتاده را ردیابی کرد. در این

روش الحاق حامل به کروموزوم‌های میزبان با تکیه بر فعالیت کروماتینی است و ژن‌های معرفی شده معمولاً درون توالی‌های کروماتینی شل، جایی که محل‌هایی فعال از نظر رونویسی وجود دارند، وارد می‌شوند. به عبارت دیگر، سلول‌ها در موقعیت‌های فیزیولوژیکی مختلف، الگوهای متفاوتی از فعالیت کروماتینی دارند و در نتیجه نقاط حساس مختلفی را برای دخول قطعات ژنی معرفی شده در هر مرحله ارائه می‌دهد (۸،۹).

به‌طور کلی، تکنیک به دام‌اندازی ژن فقط روشی برای کلون کردن ژن نیست، بلکه روشی موثر در درک عملکرد ژن و الگوی بیان آن است.

ساختار کلی حاملان سیستم به دام‌اندازی ژن نوعی حامل ژنومی (DNA vector) که تشکیل یافته از واحدهای بیانی ناقص به‌صورت ژن گزارشگر و همراه با ژن مارکر انتخابی است و ژنی وارد شده به حامل تنها زمانی که درون ژن عملکردی (بیان شونده) میزبان و به‌صورت مشابه با ساختار توالی آن (ORF)<sup>۴</sup> وارد شوند، فعال می‌شوند (۲۶). انواع حامل‌ها را بر اساس نیاز و ساختار عناصر ژنتیکی عناصر هدف طراحی می‌کنند، که شامل سه نوع مختلف می‌باشند:

الف- حامل‌هایی که توالی فزاینده<sup>۵</sup> را به دام می‌اندازند. این حامل‌ها، دارای ژن گزارشگری هستند که توسط آغازگر تقلیل یافته‌ای در ناحیه بالادست و ژن انتخابگری کنترل می‌شود. ژن گزارشگر با این آغازگر تقلیل یافته نمی‌تواند بروز یابد و فقط زمانی که این حامل به درون کروموزوم میزبان وارد شود و تحت توالی فزاینده ی ژن میزبان قرار بگیرد به سمت بیان شدن هدایت می‌شود (۱۲). نکته اینجاست که باید یک توالی فزاینده در نزدیکی محل دخول باشد و معمولاً این توالی‌ها را می‌توان در بالادست یا پایین دست آغازگر، در میان توالی‌های رمزگردان یا توالی‌های غیر رمزگردان یافت و در نتیجه به دام‌اندازی ژن و جایگیری از این طریق سخت است (۱۳).

ب- حامل‌های به دام اندازنده توالی‌های ساختاری<sup>۶</sup>

<sup>4</sup> Open Reading Frame

<sup>5</sup> Enhancer

<sup>6</sup> Structural(trap vectors)

<sup>1</sup> Chromosomal rearrangements

<sup>2</sup> Gain or loss of function

<sup>3</sup> Germ line

وقتی این حامل به درون نواحی رمزگردان وارد می‌شود هر دو ساختار خواندن (ORF) با هم هماهنگ می‌شوند و ژن پروتئین الحاقی تحت کنترل آغازگر ژن مجاور بیان می‌شود. در این روش هم نرخ جهش‌زایی پایین است (۲۵).

عناصر ژنتیکی متغیر دخیل در حامل‌های به دام‌اندازی ژن

دخول قطعات ژنومی (DNA) خطی مستعد به ایجاد کپی‌های متعدد، کونکاتامر و حذف‌های مختلف است و در نتیجه در تجزیه و تحلیل ژن به دام افتاده اختلال ایجاد می‌کنند، برای غلبه بر این موانع برخی عناصر ژنتیکی در جهت مهندسی حامل‌هایی با عملکرد آسان‌تر به کار رفته‌اند که شامل:

۱- حامل‌های دام گستر ترروویروسی<sup>۵</sup>

۲- حامل‌های دام گستر ترانسپوزونی<sup>۶</sup> هستند.

از جمله حامل‌های دام گستر ترروویروسی حامل‌های ROSA هستند که بر پایه ویروس Mo\_Muc LV به‌عنوان ساختار پایه هستند و ایجاد جهش را از طریق آلودگی ترروویروسی میزبان و دخول در کروموزوم‌های آن صورت می‌دهند. به‌علت وجود پروتئین (env) در پوشش ویروس، این ویروس‌ها اختصاصیت گونه‌ای داریم که عملکرد آلوده‌سازی را مشکل و محدود به گونه می‌کند، که برای رفع این مشکل پروتئین env با VSV\_G جایگزین شده (این ترکیب شامل شش اسیدآمینه و به‌صورت صناعی می‌باشد) که در این حالت قدرت آلوده‌سازی و اتصال به سلول‌های متنوعی را می‌یابد (۲۲).

حامل‌های دام گستر ترانسپوزونی از جدیدترین ابزارهای تحقیقات بیولوژیکی هستند و قدرت بالایی در جهش‌زایی دارند. نقص این دسته حامل‌ها در وابستگی‌های گونه‌ای‌شان است که کاربردشان را محدود می‌کند و در نتیجه لازم است برای هر ارگانیسم، ترانسپوزون مناسب آن تهیه شود. البته خوشبختانه ژنوم اغلب ارگانیسم‌ها دارای تعداد فراوانی ترانسپوزون برای انتخاب‌اند و به علاوه انواع ترانسپوزون‌های تغییر یافته همانند پلی شکاف میان گونه‌ها را پر کرده و مانند رابط عمل می‌کنند و امکان آلوده‌سازی گونه‌های مختلف را فراهم آورده‌اند (۳۳) (شکل ۲).

این دسته حامل‌ها دارای ژن گزارشگر بدون آغازگری هستند و بگونه‌ای طراحی شده‌اند که ساختار ژن هدف را به دام می‌اندازند و به‌طور کلی شامل دو زیر مجموعه هستند:

۱- حامل‌های به دام‌اندازنده نواحی غیر رمزگردان<sup>۱</sup>

۲- حامل‌های به دام‌اندازنده نواحی رمزگردان<sup>۲</sup>

حامل‌هایی که درون نواحی ایترونی وارد می‌شوند، دارای یک محل پذیرنده‌ی برش (SA)<sup>۳</sup> هستند که در سمت ۵' ژن گزارشگر فاقد آغازگر فرار دارد، در نتیجه mRNA الحاقی از طریق برش رونوشت میان ژن گزارشگر و ناحیه ۵' توالی رمزدهی میزبان جدا می‌شود، زمانی که الحاق در ساختار خواندنی مشابه ژن میزبان باشد، موجب بیان درست ژن گزارشگر می‌شوند و به‌علاوه در این حاملان، ژن‌هایی ارجح‌تر هستند که دارای توالی‌های ایترونی بلندتری هستند.

حاملی که به درون آگزون وارد می‌شود، برای کلون کردن هدفدار توالی‌های رمزدهی است و نیازی به سایت پذیرنده‌ی برش در mRNA جهت ایجاد پروتئین الحاقی را ندارد. احتمال دخول این حامل‌ها به توالی‌های رمزگردان برای بیان ژن گزارشگر به‌صورت عملکردی و دارای فعالیت حدود یک سوم موارد وقایع دخول است، که برای بهینه‌سازی عملکرد این حامل‌ها، انستیتوی Sanger سه نوع حامل مطابق با سه نوع ساختار خواندن با نام‌های ۱ و ۲ و ۳ طراحی کرده است، که در آن‌ها به‌ترتیب صفر، ۱ و ۲ باز اضافی در بالا دست ساختار خواندن اضافه می‌گردد و با این- کار میزان از دست رفتن ژن‌های به دام افتاده به علت داشتن ساختار خواندن اشتباه و در نتیجه بیان غلط ژن گزارشگر به حداقل میزان ممکن رسیده است.

ج- حاملان به دام‌اندازنده آغازگرها<sup>۴</sup>

این قبیل حامل‌ها دارای ژن گزارشگر بدون آغازگری همراه با ژن مارکر قابل انتخاب هستند و از جمله حامل‌های به دام‌اندازنده نواحی رمزگردان در ژن هستند، که گاهی ژن گزارشگر و ژن نشانه مشابه هستند.

<sup>1</sup> Intron (trap vectors)

<sup>2</sup> Exon (trap vectors)

<sup>3</sup> Splicing acceptor

<sup>4</sup> Promoter trap vectors

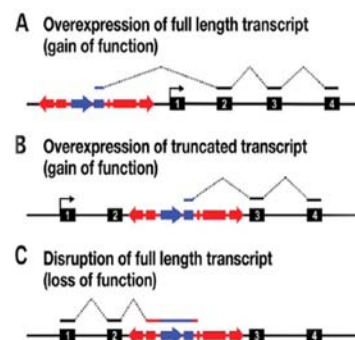
<sup>5</sup> Retroviral trap vectors

<sup>6</sup> Transposon trap vectors



شکل ۱- راهکار به دام‌اندازی ژن‌ها غالباً از طریق پدیده نوترکیبی همولوگ صورت می‌گیرد، لذا ژن کلون شده مورد نظر باید واجد توالی مشابه ژن هدف گرفته شده باشد و به‌علاوه برای بررسی صحت رخداد و تشخیص نوترکیبی همولوگ دلخواه، حامل مورد کاربرد دارای یک ژن نشانه (Marker Gene) است که امکان شناسایی و جدا-سازی سلول‌های حاوی توالی معرفی شده را به ما می‌دهد. جهش را می‌توان در مکان‌های خاص ژنی از طریق نوترکیبی همولوگ القاء کرد در این شکل دو حالت متداول بهره‌گیری از این تکنیک آمده است، سمت راست حالتی است که در آن توالی خاص و واجد ژن نشانه به درون ژن از طریق توالی همولوگ وارد و می‌تواند عمل ژن مورد نظر را کاملاً حذف کند، سمت چپ با عملکردی متفاوت اما با نتیجه یکسان توالی مشابه را درون ژن وارد و عمل آن را مختل می‌کند از این حالت زمانی که می‌خواهند بدانند اختلال در ناحیه‌ای خاص از توالی ژن چه نقشی در عملکرد ژن دارد بهره می‌برند(۳).

استراتژی‌های بهینه سازی حامل‌های دام گستر ژنی در این مسیر، دانشمندان استراتژی‌های مختلفی را در نظر گرفتند، به‌طور مثال در حامل‌های اولیه عموماً ژن آنزیم بتا گالاکتوزیداز (*lacZ*) را به‌عنوان گزارشگر و ژن مقاومت به نئومایسین *neo* را به‌عنوان مارکر انتخابی به‌کار می‌گرفتند، سپس ژن گزارشگر جدید (*geo*) وارد عمل شد که حاصل الحاق ژن‌های *lacZ* و *neo* است (شکل ۳). امروزه غالباً از پروتئین GFP<sup>۱</sup> و سایر ژن‌های از این طیف به‌عنوان گزارشگر بهره می‌برند که حساسیت بالایی دارند و کارایی بالایی در بررسی عملکرد سلول‌های زنده دارند و در برخی تحقیقات هم از توالی‌های IRES<sup>۲</sup> استفاده کردند که موجب ترجمه همزمان ژن هدف و ژن گزارشگر به‌صورت دی‌سیسترونی می‌شود، که این خود پیشرفتی شگرف در زمینه تشخیص عملکرد ژنی است (۳۷). وارد کردن توالی IRES در میان توالی‌های SA و ژن گزارشگر موجب می‌شود که رونوشت برداری از ژن معرفی شده تحت کنترل آغازگر میزبان حتی با دخول حامل در ناحیه غیر کدکننده میسر گردد. دخول IERS میان ژن گزارشگر *lacZ* و مارکر انتخابی *neo* امکان افزایش کلون‌های حاوی *lacZ* را که مقاومت به نئومایسین یا داروی انتخابی G418 دارند می‌دهند که در این‌حالت به این‌حامل‌ها "IRES - Geo"



شکل ۲- روندهایی که از طریق آن‌ها ترانسپوزون‌ها ایجاد جهش در سلول‌ها را القاء می‌کنند(۳۵).

ساده‌ترین روش برای تحقق این عمل حذف ژن اختصاصی ترانسپوزاز از حامل است، که پروتئین این آنزیم در محیط آزمایشگاهی (*in vitro*) توسط سلول‌های میزبان ایجاد می‌شود تا جهش‌های ایجاد شده، پایدار شوند. از جمله حاملان ترانسپوزونی می‌توان به انواعی نظیر:

عناصر ترانسپوزونی Ac/Ds در گیاه (*Arabidopsis*) و عناصر ترانسپوزون‌های Piggy-Bac در حشرات نظیر (۶،۱۵،۲۳) *Drosophila melanogaster* که به‌علاوه در بررسی عملکرد ژن-های پستانداران و سلول‌های بنیادی جنینی در موش هم ترانسپوزون‌های Piggy-Bac نقش بسزائی داشته‌اند (۱۰) و در نهایت می‌توان به عناصر ترانسپوزونی Tol<sub>2</sub> در *Zebra fish* (۱۶،۲۴) اشاره کرد.

<sup>1</sup> Green fluorescent protein

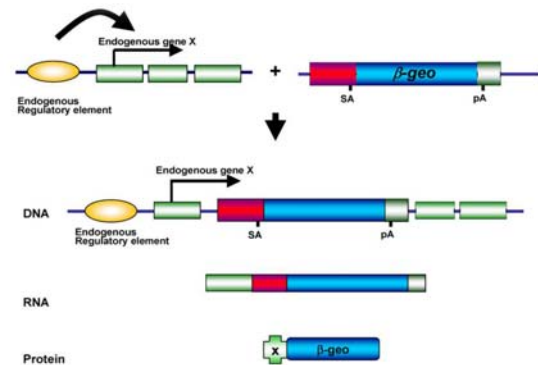
<sup>2</sup> Internal Ribosome Entry Site

Motif Trap vectors هدف این حامل‌ها برخی موتیف‌های اختصاصی هستند که به ساختارهای ویژه‌ای در سلول اتصال می‌یابند. این حامل‌ها در ساختارشان ژن گزارشگر بدون آغازگر و مارکر انتخابی دارند، زمانی که ژن گزارشگری مثل *GFP* در ساختار خواندن ژن به دام افتاده وارد شود، موجب می‌شود پروتئین حاصله فلورسانت سبز ساطع بکند، که بر حسب هدایت توسط موتیف، این پروتئین در بخش خاصی از ساختار سلول وارد و محل دخول از طریق بازتابش‌های فلورسانت سبز (*GFP*) قابل بررسی و پیگیری است (۳۶، ۳۷، ۳۸).

۲- Secretory trap vectors براساس روند دسته‌بندی پروتئین‌ها در سلول<sup>۲</sup> و پدیده‌ای که طی آن آنزیم بتا گالاکتوزیداز ( $\beta$ -gal) در شبکه آندوپلاسمی غیر فعال است طراحی شده است (۳۲). این دسته حامل‌ها به‌طور مؤثری ژن‌های پروتئین‌های ترشحی و سرتاسری را به دام می‌اندازند. این دسته حامل‌ها جایگاه SA همراهی دومین  $TM^3$  و ژن  $\beta$ -geo که دارای سیگنال پلی آدنیلای سیون هستند، می‌باشد.

پروتئین‌های ترشحی دارای سیگنال ترشحی ( $SS^4$ ) در انتهای آمینی خود هستند، اگر ژن به دام افتاده سیگنال SS را نداشته باشد و درون شبکه آندوپلاسمی توسط سیگنال  $TM$  متوقف شده باشد، در نتیجه هیچ‌گونه فعالیت  $\beta$ -gal در سیتوپلاسم قابل تشخیص نخواهد بود (شکل ۴). در بررسی رشد در سلول‌های ESC مشخص شد که برخی از این سلول‌ها دارای جهش‌هایی خود به خودی در لایه‌زایی خود هستند و زاده‌های غیر کایمری ایجاد می‌شوند، زمانی که مورد بررسی قرار گرفتند مشخص شد یک سوم از شصت موتانت حاصله دچار کشته‌گی مغلوب<sup>۵</sup> می‌شوند و این‌گونه استنباط می‌شود که ژن‌های به دام افتاده در این مسیر احتمالاً متعلق به گروه پروتئین‌های ترشحی هستند و یا در انتقال پیام<sup>۶</sup> در مراحل مختلف زندگی جنین موش و دوران بعد از جنینی موثرند (۲۸).

می‌گویند که کارایی‌شان تقریباً پانزده برابر حامل‌های کلاسیک *geo* است (۳۰).



شکل ۳- طراحی حاملان با ژن‌های نشانه ویژه که الحاقی از دو یا چند ژن هستند.  $\beta$ -geo نمونه‌ای از این ژن‌های نشانه است و تلفیق ژن‌های  $\beta$  گالاکتوزیداز و نوومایسین است.

طراحی برخی حامل‌های *GFP* به گونه‌ای است که چندین کدون ابتدایی از آن‌ها حذف شده و تنها در صورت الحاق صحیح در ساختار خواندن ژن بیان می‌شوند و به‌علاوه اضافه کردن توالی رابطی نظیر (GGGSGGG) در ابتدای ژن *GFP*، که عمده‌دچار حذف در کدون‌های ابتدایی شده است، ژن هدف آن را انعطاف پذیرتر می‌کند و احتمالاً موجب تاخوردگی صحیح پروتئین الحاقی *GFP* می‌شود (۱۸).

عموماً حامل‌های رتروویروسی به انتهای ۵' از ژن اتصال می‌یابند، اما اختصاصیت توالی‌ها در انتهای ۵' عمدتاً به اندازه‌ی انتهای ۳' نیست (۲۱)، در نتیجه برخی محققان حاملانی را طراحی کردند که دارای توالی پذیرنده‌ی برش (SD)<sup>۱</sup> هستند و به انتهای ۳' ژن گزارشگر اتصال می‌یابند که موجب می‌شود رونوشت هم‌زمان ژن هدف که پایین دست ژن گزارشگر است و به‌صورت یک نسخه-اند، جدا شوند. و در نتیجه زمانی که دو ژن در یک ساختار خواندن، هم‌زمان موجود باشند توالی پائین دست DNA‌های به دام افتاده را می‌توان در الحاق با mRNA ژن گزارشگر تشخیص و انتخاب کرد.

طراحی و کاربردهای حاملان جدید

با وجود کارایی‌های فراوان حامل‌های به دام‌اندازی ژنی آن‌ها به‌طور تصادفی ژن‌ها را به دام می‌انداختند از این رو حامل‌های اختصاصی ایجاد شدند، که انواعی از آن‌ها شامل موارد زیر است؛

<sup>۱</sup> Splice donor

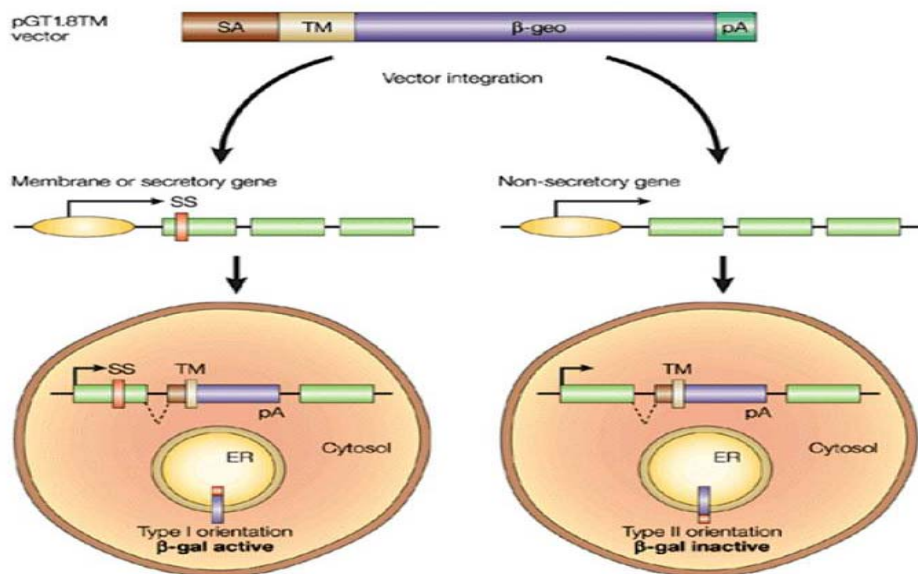
<sup>۲</sup> Cell protein sorting

<sup>۳</sup> Transmembrane

<sup>۴</sup> Secretory signal

<sup>۵</sup> Recessive lethal

<sup>۶</sup> Signal transduction



شکل ۴- نمونه‌ای از Secretory Trap vectors، این دسته حاملان براساس روند دسته‌بندی و جای‌گیری پروتئین‌ها در سلول و پدیده‌ای که طی آن آنزیم بتاگالاکتوزیداز ( $\beta$ -gal) در شبکه آندوپلاسمی غیر فعال است طراحی شده است. این دسته حامل‌ها به‌طور مؤثری ژن‌های پروتئین‌های ترشچی و سرتاسری را به دام می‌اندازند. این دسته حامل‌ها جایگاه SA (Splice Acceptor) در همراهی دمن TM (Trans Membrane) و ژن  $\beta$ -geo که دارای سیگنال پلی آدنیلایسیون هستند، می‌باشد. پروتئین‌های ترشچی دارای سیگنال ترشچی (SS) در انتهای دمن آمینی خود هستند، اگر ژن به دام افتاده سیگنال SS را نداشته باشد و درون شبکه آندوپلاسمی توسط سیگنال TM متوقف شده باشد، در نتیجه هیچ‌گونه فعالیت بتاگالاکتوزیداز در سیتوپلاسم قابل تشخیص نخواهد بود (۳۲).

فورم شده تخلیص و بعد توسط آنزیم *EcoRI* هضم آنزیمی می‌شود که در نتیجه حامل‌هایی که قطعه ژن به دام افتاده را حمل می‌کنند، جدا می‌شوند. قطعه به‌صورت خود بخودی به پلاسمید حلقوی که حاوی ژن مقاومت به *amp* و ناحیه *ori* هست، اتصال می‌یابد، سپس سلول‌هایی که توسط *EcoRI* و با این پلاسمیدها ترانس فورم شده‌اند توسط مقاومت به *amp* غربال می‌شوند و در نتیجه کلونی‌های دارای این پلاسمید نجات می‌یابند (به‌همین علت این حامل‌ها را "حاملان ناجی پلاسمید" می‌نامند) سپس توالی ژن به دام افتاده قابل بررسی و جداسازی است (۳۱). به‌طور مشابه این روش با موفقیت در حامل U3Hygro برای به دام‌اندازی ژن تیروزین کیناز در سلول‌های CHO به کار رفته است (۷).

۴- Micro array- coupled gene trap امروزه که به عنوان متدی فراگیر در بررسی عملکرد ژن‌ها به‌طور وسیع جهش‌های دلخواه تصادفی به کار می‌روند، طراحی چیپ‌های (chips) ژنی به عنوان ابزاری برای پیاده‌سازی این روش‌ها، بسیار متداول شده است. در بررسی ژن‌هایی از سلول‌های ESC دارای جهش‌هایی دلخواه را تکثیر می‌دهند، همچنین برای تهیه کتابخانه cDNA یا

در نتیجه می‌توان جهش‌زایی را به‌صورت به دام‌اندازی ژن‌های ترشچی برای تجزیه عملکردی به‌صورت گسترده در ژنوم در راه-های انتقال پیام به کار گرفت.

۳- Plasmid rescue Vectors از جمله حامل‌های به دام انداز آغازگر هستند که بر پایه حامل‌های رتروویروسی شاتل به نام U3NeoSv1 طراحی شوند. این دسته حامل‌ها فاقد جایگاه SA هستند، اما ژن بدون آغازگر *neo* را در هر جفت LTR<sup>۱</sup>شان که در ناحیه U3 حامل قرار دارد، دارند. به‌علاوه این حامل‌ها همچنین دارای ژن *amp* (مقاومت به آمپی سیلین) و نقطه آغاز (Ori site) مخصوص همانندسازی در پلاسمید هستند. زمانی که حامل سلول‌ها را آلوده می‌کند و به ناحیه‌ای ناشناخته‌ای درون ژن میزبان وارد می‌شود، آغازگر ژن مورد بررسی بیان ژن مقاومت به نئومایسین را موجب می‌شود. مقاومت به Neo برای تشخیص سلول‌های ترانس فورم شده که آغازگر را به دام انداخته‌اند، به کار می‌رود. در مرحله بعدی، DNA کروموزومی سلول‌های ترانس

<sup>۱</sup> Locus terminal region

های مختلف برای ایجاد موجودات ترانس ژن برای هرمدل ارگانیسمی کار را آسان‌تر کرده است، به‌طور مثال؛ سلول‌های ESC برای دست‌کاری‌های ژنتیکی در موش و یا تخم‌های بارور شده برای ایجاد ترانس ژن‌ها در *Zebra fish* و به‌همین ترتیب در هر موجود متفاوت هست و در نتیجه کارایی تکنیک به دام‌اندازی ژن در آن‌ها قابل قیاس نیست.

مشکل دیگر این است که این عملیات‌های به ظاهر ساده، بسیار پیچیده و هزینه‌بر و گاه با کارایی پایین هستند، به‌طور مثال انجام تکنیک‌های آلوده‌سازی از طریق متدهای Transfection یا Electroporation در سلول‌های بنیادی و به دنبال آن غربالگری کلون‌ها بسیار زمان‌بر بوده و موجب تعویق و انسداد در پیشرفت مراحل این راه‌کار است. از این‌رو برای ارتقاء تکنیک تله‌گذاری ژن‌ها باید این موانع برطرف شوند زیرا که این راه‌کار، واجد کارایی و قدرت بسیار بالا در تجزیه و شناسایی ژن‌ها است و به علاوه در الحاق ضروری و اجتناب ناپذیر آن با تکنولوژی بیوانفورماتیک، امکان بررسی اطلاعات ژنتیکی سریع‌تر و بهینه‌تر می‌شود.

#### منابع

- Primrose S B and Twyman R M (2006) Principles of Gene Manipulation and Genomics. pp: 318-342. Wiley and Blackwell Science. UK, 672 pp.
- Primrose S B and Twyman R M (2004) Genomics: Applications in Human Biology. pp: 55-57. Wiley and Blackwell Science. UK, 216 pp.
- Strachan T and Andrew P R (2004) Human Molecular Genetics 3. pp: 588 -602. Garland Science Publishing (Tylor & Francis Group) London and New York, 710 pp.
- Ivics Z, Kaufman CD, Zayed H, Mishey C, Walisko O and Izsvak Z(2004) The Sleeping Beauty Transposable Element: Evolution, Regulation and Genetic Applications. Current Issues in Molecular Biology, 6(1):43-55.
- Parinov S, Kondrichin I, Korzh V and Emelyanov A(2004) To12 Transposon Mediated Enhancer Trap to Identify Developmentally Regulated Zebrafish Genes in vivo. Developmental Dynamics, 231(2):449-59.
- Handler A M and Harrell R A(1999) Germline Transformation of Drosophila melanogaster with the piggy Bac Transposon Vector. Insect Molecular Biology. 8(4):449-57.
- Chang W, Hubbard SC, Friedel C and Ruley HE(1993) Enrichment of Insertional Mutants Following Retrovirus Gene Trap Selection. Virology, 193(2):737-47.
- Li YY and Zhang JP (2006) Genetrapping Techniques and Current Progress. Acta Genetica Sinitica, 33(3):189-98.
- Tang H, Araki K and Yamamura K (2006) Cloning & Expression Analysis of a Murine Novel Gene, Ayu17-449. Acta Genetica Sinitica, 33(5):413-19.
- Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y and Xu T(2005) Efficient Transposition of the piggyBac (PB) Transposon in Mammalian Cells and Mice. The Cell. Aug12;122(3):473-83.
- Tateossian H, Powles N, Dickinson R, Ficker M, Maconochie M(2004) Determination of Downstream Targets of FGF Signalling using Gene Trap and cDNA Subtractive Approaches. Experimental Cell research, 292(1):101-14.
- Balciunas D, Davidson AE, Sivasubbu S, Hermanson SB, Welle Z and Ekker SC(2004) Enhancer Trapping in Zebra Fish using Sleeping Beauty Transposone. Genomics, 5(1):62-69.
- Awazu S, Sasaki A, Matsuoka T, Satoh N and Sasakura Y(2004) An Enhancer Trap in the Ascidian ciona intestinalis Identifies Enhancers of its Musashi orthologous Gene. Developmental Biology, 275(2):459-72.
- Kuromori T, Hirayama T, Kiyosue Y, Takaba H, Mizukado, Sakurai T, Akiyama K, Kamiya A, Ito T and

Microarray کاربرد دارند. از طریق این متدها و با کمک چپ-های طراحی شده، دسته‌جات سلولی دارای جهش در PDGF (Platelet-driven Growth Factor) تشخیص و جداسازی شدند (۱۹).

مشکلات عملکرد تله‌گذاری برای ژن و دورنمای آن با این‌که می‌دانیم عملکرد اصلی راه‌کار به دام‌اندازی ژن، بررسی عملکرد ژن‌ها و ایجاد آسان مقادیر فراوان جهش است، اما هنوز نقائصی و مشکلات فراوانی وجود دارند؛ برخی از عملیات‌های به دام‌اندازی ژن متناسب برای گونه‌های سلولی‌اند و نه برای یک موجود زنده کامل هر نوع حامل حساسیت‌ها و تمایلات خاص برای واکنش با DNA دارد و گاهاً درونمایه‌شان را به‌طور ناکامل توزیع می‌کند و در نتیجه برخی ژن‌های مستعد (مناسب) هدف-گیری نمی‌شوند و در نتیجه تشخیص داده نمی‌شوند. برخی جنین‌های جهش یافته قبل رسیدن به مرحله تولد می‌میرند، که در نتیجه کار ما برای کشف و تعیین هویت این جهش‌ها بسیار سخت‌تر می‌شود. کتابخانه‌های Gene trap توسط این تکنیک هدف‌گیری ژن به‌آسانی تهیه می‌شوند و اگر چه جداسازی ژن‌های به دام افتاده خسته‌کننده و بسیار مشکل است اما طراحی پروتکل-

- Shinozaki K( 2004 ) A Collection of 11800 Single-copy Ds Transposon Insertion Lines in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 37(6):897-905.
15. Thibault ST, Singer MA, Miyazaki WY, Milash B, Dompe NA, Singh CM, Buchholz R, Demsky M, Fawcett R, Francis-Lang HL, Ryner L, Cheung LM, Chong A, Erickson C, Fisher WW, Greer K, Hartouni SR, Howie E, Jakkula L, Joo D, Killpack K, Laufer A, Mazzotta J, Smith RD, Stevens LM, Stuber C, Tan LR, Ventura R, Woo A, Zakrajsek I, Zhao L, Chen F, Swimmer C, Kopczyński C, Duyk G, Winberg ML and Margolis J(2004) A Complementary Transposon Tool Kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggy Bac. *Nature Genetics*, 36(3):283-87.
  16. Kawakami K, Takeda H, Kawakami N, Kobayashi M, Matsuda N and Mishina M(2004) A Transposon-mediated Gene Trap Approach Identifies Developmentally Regulated Genes in Zebrafish. *Developmental Cell Research*, 7(1):133-44.
  17. Liu G, Aronovich EL, Cui Z, Whitley CB and Hackett PB(2004) Excision of Sleeping Beauty Transposons: Parameters and Applications to Gene Therapy. *The Journal of Gene Medicine*, 6(5):574-83.
  18. Bradley PJ, Li N and Boothroyd JC(2004) A GFP-based Motif- trap Reveals a Novel Mechanism of Targeting for the Toxoplasma ROP4 Protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 137(1):111-20.
  19. Chen WV, Delrow J, Corrin PD, Frazier JP and Soriano P(2004) Identification and Validation of PDGF Transcriptional Targets by Microarray-coupled Gene-trap Mutagenesis. *Nature Genetics*, 36(3):304-12.
  20. Takeda K, Saito T, Tanaka T, Morio T, Maeda M, Tanaka Y and Ochiai H (2003) A Novel Genetrap Method Using Terminator REMI and 3' Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) in *Dictyostelium*. Elsevier, 312:321-33.
  21. Wu X, Li Y, Crise B and Burgess SM(2003) Transcription Start Regions in the Human Genome are Favored Targets for MLV Integration. *Science*. Jun 13;300(5626):1749-51.
  22. Chen WV, Soriano P(2003) Gene Trap Mutagenesis in Embryonic Stem Cells. *Methods In Enzymology*, 365:367-86.
  23. Hacker U, Nystedt S, Barmchi MP, Horn C and Wimmer EA(2003) A piggyBac-based Insertional Mutagenesis in the Presence of Stably Integrated P-elements in *Drosophila*. *PNAS*, 100(13):7720-25.
  24. Hamlet MR, Yergeau DA, Kuliyeve E, Takeda M, Taira M, Kawakami K and Mead PE(2006) Tol2 Transposon-Mediated Transgenesis in *Xenopus Tropicalis*. *Genesis*, 44(9):438-45.
  25. Aoki S, Kondo T and Ishiura M(2002) A Promoter-trap Vector for Clock-controlled Genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Microbial Methods*, 49(3):265-74.
  26. Medico E, Gambarotta G, Gentile A, Comoglio PM and Soriano P(2001) A Gene Trap Vector System for Identifying Transcriptionally Responsive Genes. *Nature Biotechnology*, 19(6):579-82.
  27. Fischer SE, Wienholds E and Plasterk RH(2001) Regulated Transposition of a Fish Transposon in the Mouse Germ line. *PNAS*, 98(12):6759-64.
  28. Mitchell KJ, Pinson KI, Kelly OG, Brennan J, Zupicich J, Scherz P, Leighton PA, Goodrich LV, Lu X, Avery BJ, Tate P, Dill K, Pangilinan E, Wakenight P, Tessier-Lavigne M and Skarnes WC(2001) Functional Analysis of Secreted and Transmembrane Proteins Critical to Mouse Development. *Nature Genetics*, 28(3):241-49.
  29. Lako M and Hole N(2000) Searching The Unknown with Genetrapping. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2(5):1-11.
  30. Bonaldo P, Chowdhury K, Stoykova A, Torres M and Gruss P(1998) Efficient Gene Trap Screening for Novel Developmental Genes using IRES beta geo Vector and in vitro Preselection. *Experimental Cell Research*, 244(1):125-36.
  31. Hicks GG, Shi EG, Li XM, Li CH, Pawlak M and Ruley HE(1997) Functional Genomics in Mice by Tagged Sequence Mutagenesis. *Nature Genetics*, 16(4):338-44.
  32. Skarnes WC, Moss JE, Hurlley SM and Beddington RS (1995) Capturing Genes Encoding Membrane and Secreted Proteins Important for Mouse Development. *PNAS*, 92(14):6592-96.
  33. Hehl R and Baker B(1990) Properties of the Maize Transposable Element Activator in Transgenic Tobacco plants: A Versatile Inter-species Genetic Tool. *Plant Cell*, 2(8):709-21.
  34. Bellen HJ, O'Kane CJ, Wilson C, Grossniklaus U, Pearson RK and Gehring WJ(1989) P-element-mediated Enhancer Detection: A Versatile Method to Study Development in *Drosophila*. *Genes and Development*, 3(9):1288-300.
  35. Available: <http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/genetrap>
  36. Tanhaei S, Ghaedi K, Karbalaei KH, Razavi SH, Ostadsharif M, Nazari-jahantigh M, Rabeei F, Nematollahi M and Baharvand H(2009) Mouse Peroxisomal Protein cDNA Cloning and Characterization of its Intracellular Localization. *Yakhteh Medical Journal*, 11(2):196-203.
  37. Ostadsharif M, Ghaedi K, Nasr Esfahani MH, Tanhaei S, Karbalaei KH, Parivar K and Baharvand H(2009) Cytosolic Localization of Mouse Peroxisomal Protein/ $\Delta$ SKI Fused with Enhanced Green Fluorescent Protein into Chinese Hamster Ovary-K1 and P19 Cells. *Yakhteh Medical Journal*, 11(2):154-59.
  38. Ghaedi K, Kawai A, Okumoto K, Tamura S, Shimozawa N, Suzuki Y, Kondo N and Fujiki Y (1999) Isolation and characterization of novel peroxisome biogenesis-defective chinese hamster ovary cell mutants using green fluorescent protein. *Experimental Cell Research* 248: 489-497.