

اصول و تکنیک‌های به دام اندازی ژن‌ها و آخرین پیشرفت‌های این متدها

لادن یاری^۱، کامران قائدی^{۲*}

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: kamranghaedi@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 متدهای مشابه جهت تصحیح جهش‌های پاتوژن و احیا فنوتیپ‌های نرمال و به عنوان 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 عمدها 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 مورد کاربرد جهت انتقال یا تغییر جایگاه ویژه هم از اهمیت بالایی بهره‌مند است. در نهایت شواهد واقعی نوترکیبی را می‌توان با راهکارایی مختلف نظیر RACE-PCR و RT-PCR و آغازگر اختصاصی دیگری هم برای توالی موجود در ژن معرفی کرد.

واژه‌های کلیدی

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

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 واقعی 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).

روش الحاق حامل به کروموزوم‌های میزبان با تکیه بر فعالیت کروماتینی است و ژن‌های معرفی شده معمولاً درون توالی‌های کروماتینی شل، جائی 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).

به طور کلی، تکنیک به دام اندازی 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 دام اندازی ژن نوعی حامل ژنومی (DNA vector) که تشکیل یافته از واحدهای بیانی ناقص به صورت 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 به صورت مشابه با ساختار توالی آن (ORF)^۴ 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 فراینده^۵ را به دام می‌اندازند. این حامل‌ها، دارای ژن گزارشگری هستند که توسط آغازگر تقلیل یافته‌ای در ناحیه بالادرست 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 فراینده ی ژن میزبان قرار بگیرد به سمت بیان شدن هدایت می‌شود (۱۲). نکته اینجاست که باید یک توالی فراینده در نزدیکی محل دخول باشد و معمولاً این توالی‌ها را می‌توان در بالادرست یا پایین دست آغازگر، در میان توالی‌های رمزگردان یا توالی‌های غیر رمزگردان یافت و در نتیجه به دام اندازی ژن و جایگیری از این طریق سخت است (۱۳).

ب- حامل‌های به دام اندازند توالی‌های ساختاری^۶

چهار راهبرد اصلی در اعمال جهش عبارتند از:

- ۱- جهش‌های خودبخودی
- ۲- القاء کننده‌های فیزیکی
- ۳- القاء کننده‌های شیمیابی
- ۴- تکنیک‌های بیولوژیکی

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

روش "Transgene" اولین بار در سال ۱۹۷۶ با موفقیت در سلول‌های لایه زایای^۳ 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 رتروویروس‌ها عمومیت داشت که در نسل اول فرزندان موzaیک 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"^۴ 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

⁴ Open Reading Frame

⁵ Enhancer

⁶ Structural(trap vectors)

¹ Chromosomal rearrangements

² Gain or loss of function

³ Germ line

وقتی این حامل به درون نواحی رمزگردن 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 جهش زایی پایین است (۲۵).

عناصر ژنتیکی متغیر دخیل در حامل‌های به دام اندازی 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 رتروویروسی^۵
- ۲- حامل‌های دام گستر ترانسپوزونی^۶ هستند.

از جمله حامل‌های دام گستر رتروویروسی حامل‌های ROSA هستند که بر پایه ویروس Mo_Muc LV به عنوان ساختار پایه هستند و ایجاد جهش را از طریق آلدگی رتروویروسی می‌زبان و دخول در کروموزوم‌های آن صورت می‌دهند. به علت وجود پروتئین (env) در پوشش ویروس، این ویروس‌ها اختصاصیت گونه‌ای داریم که عملکرد آلدوسازی 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 به صورت صناعی می‌باشد) که در این حالت قدرت آلدوسازی و اتصال به سلول‌های متنوعی را می‌یابد (۲۲).

حامل‌های دام گستر ترانسپوزونی از جدیدترین ابزارهای تحقیقات بیولوژیکی هستند و قدرت بالایی در جهش زایی دارند. نقص این دسته حامل‌ها در واستگی‌های 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 آلدوسازی 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 دام اندازنده نواحی غیر رمز گرдан^۱

۲- حامل‌های به دام اندازنده نواحی رمز گردان^۲

حامل‌هایی که درون نواحی ایترونی وارد می‌شوند، دارای یک محل پذیرنده‌ی برش (SA)^۳ هستند که در سمت^۴ ژن گزارشگر فاقد آغازگر فرار دارد، در نتیجه mRNA می‌الحاقی از طریق برش رونوشت میان ژن گزارشگر و ناحیه^۵ توالی رمزدهی می‌زبان جدا می‌شود، زمانی‌که الحاق در ساختار خواندنی مشابه ژن می‌زبان باشد، موجب بیان درست ژن گزارشگر می‌شوند و به علاوه در این حاملان، ژن‌هایی ارجح‌تر هستند که دارای توالی‌های ایترونی بلندتری هستند.

حاملی که به درون اگزون 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 به صورت عملکردی و دارای فعالیت حدود یک سوم موارد وقایع دخول است، که برای بهینه‌سازی عملکرد این حامل‌ها، انتیتیوی Sanger سه نوع حامل مطابق با سه نوع ساختار خواندن با نام‌های ۲ و ۱ و صفر طراحی کرده است، که در آن‌ها به ترتیب صفر، ۱ و ۲ باز اضافی در بالا دست ساختار خواندن اضافه می‌گردد و با این‌کار 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 دام اندازنده آغازگرها^۶

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

¹ Intron (trap vectors)

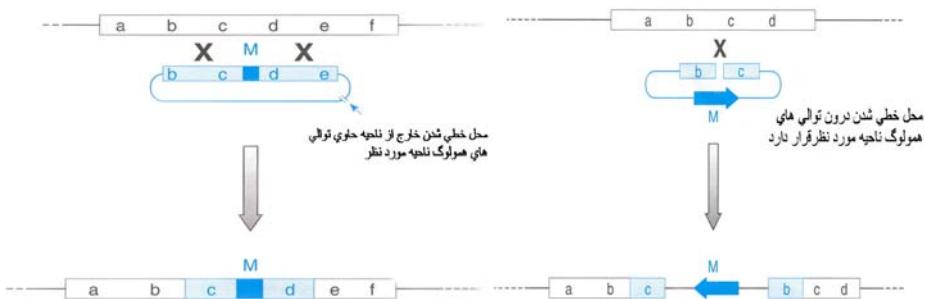
² Exon (trap vectors)

³ Splicing acceptor

⁴ Promoter trap vectors

⁵ Retroviral trap vectors

⁶ Transposon trap vectors

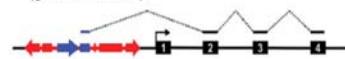


شکل ۱- راهکار به داماندازی ژن‌ها غالباً از طریق پدیده نوترکیبی همولوگ صورت می‌گیرد، لذا ژن کلون شده مورد نظر باید واجد توالی مشابه ژن هدف گرفته شده باشد و به علاوه برای بررسی صحت رخداد و تشخیص نوترکیبی همولوگ دلخواه، حامل مورد کاربرد دارای یک ژن نشانه (Marker Gene) است که امکان شناسایی و جذاسازی سلول‌های حاوی توالی معرفی شده را به ما می‌دهد. جهش را می‌توان در مکان‌های خاص ژن از طریق نوترکیبی همولوگ القاء کرد در این شکل دو متد اول 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 مختلف می‌کند از این حالت زمانی که می‌خواهند بدانند اختلال در ناحیه‌ای خاص از توالی ژن چه نقشی در عملکرد ژن دارد بهره می‌برند(۳).

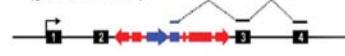
استراتژی‌های بهینه سازی حامل‌های دام گسترش‌زنی

در این مسیر، دانشمندان استراتژی‌های مختلفی را در نظر گرفتند، به طور مثال در حامل‌های اولیه عموماً ژن آنزیم بتا گالاکتوزیداز (lacZ) را به عنوان گزارشگر و ژن مقاومت به نئومایسین neo را به عنوان مارکر انتخابی به کار می‌گرفتند، سپس ژن گزارشگر جدید (geo) وارد عمل شد که حاصل الحق ژن‌های lacZ و neo است (شکل ۳). امروزه غالباً از پروتئین GFP¹ و سایر ژن‌های از این طیف به عنوان گزارشگر بهره می‌برند که حساسیت بالایی دارند و کارایی بالایی در بررسی عملکرد سلول‌های زنده دارند و در برخی تحقیقات هم از توالی‌های IRES² استفاده کردند که موجب ترجمه همزمان ژن هدف و ژن گزارشگر به صورت دی سسیترونی 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 این حالت به این حامل‌ها "IRES - Geo"

A Overexpression of full length transcript (gain of function)



B Overexpression of truncated transcript (gain of function)



C Disruption of full length transcript (loss of function)



شکل ۲- روندایی 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 نظری:

عناصر ترانسپوزونی Ac/Ds در گیاه (۱۴) و عناصر P و ترانسپوزون‌های Piggy-Bac در حشراتی نظیر (۶، ۱۵، ۲۳) که به علاوه در بررسی عملکرد ژن‌های پستانداران و سلول‌های بنیادی جینی در موش هم ترانسپوزون‌های Piggy-Bac نقش بسزائی داشته‌اند (۱۰) و در نهایت می‌توان به عناصر ترانسپوزونی *Tol₂* در (۱۶، ۲۴) *Zebra fish* اشاره کرد.

¹ Green fluorescent protein

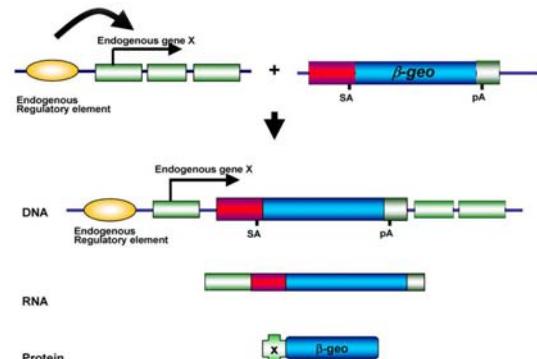
² Internal Ribosome Entry Site

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، زمانی‌که ژن گزارشگری مثل *GFP* در ساختار خواندن ژن به دام افتاده وارد شود، موجب می‌شود پروتئین حاصله فلورسانس سبز ساعت بکند، که بر حسب هدایت توسط موتیف، این پروتئین در بخش خاصی از ساختار سلول وارد و محل دخول از طریق بازتابش‌های فلورسانس سبز (*GFP*) قابل بررسی و پیگیری است (۳۶، ۳۷، ۳۸).

Secretory trap vectors براحتی روند دسته‌بندی پروتئین‌ها در سلول^۲ و پدیده‌ای که طی آن آنزیم بتا گالاکتوزیداز (*gal* – β -gal) در شبکه آندوپلاسمی غیر فعال است طراحی شده است (۳۲). این دسته حامل‌ها به طور مؤثری ژن‌های پروتئین‌های ترشحی و سرتاسری را به دام می‌اندازند. این دسته حامل‌ها جایگاه SA در همراهی دومین^۳ TM و ژن β -geo^۴ که دارای سیگنال پلی آدنیلا سیون هستند، می‌باشد.

پروتئین‌های ترشحی دارای سیگنال ترشحی (SS)^۵ 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 *gal* – β 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 لایه‌زایای خود هستند و زاده‌های غیر کایمیری ایجاد می‌شوند، زمانی‌که مورد بررسی قرار گرفتند مشخص شد یک سوم از شصت موتانت حاصله دچار کشنده‌گی مغلوب^۶ می‌شوند و این گونه استنباط می‌شود که ژن‌های به دام افتاده در این مسیر احتمالاً متعلق به گروه پروتئین‌های ترشحی هستند و یا در انتقال پیام^۷ در مراحل مختلف زندگی جنین موش و دوران بعد از جنینی موثرند (۲۸).

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



شکل ۳- طراحی حاملان با ژن‌های نشانه ویژه که الحاقی از دو یا چند ژن β -geo^۸ نمونه‌ای از این ژن‌های نشانه است و تلفیق ژن‌های گالاکتوزیداز و نومایسین 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 به علاوه اضافه کردن توالی رابطی نظیر (GGGSGGGGS) در ابتدای ژن *GFP*، که عمدتاً دچار حذف در کدون‌های ابتدائی شده است، ژن هدف آن را انعطاف پذیرتر می‌کند و احتمالاً موجب تاخور دگری صحیح پروتئین الحاقی *GFP* می‌شود (۱۸).

عموماً حامل‌های رتروویروسی به انتهای^۹ ۵ از ژن اتصال می‌یابند، اما اختصاصیت توالی‌ها در انتهای^{۱۰} ۵ عمدتاً به اندازه‌ی انتهای ۳' نیست (۲۱)، در نتیجه برخی محققان حاملانی را طراحی کردند که دارای توالی پذیرنده‌ی برش (SD)^۱ هستند و به انتهای ۳' ژن گزارشگر اتصال می‌یابند که موجب می‌شود رونوشت هم‌زمان ژن هدف که پایین دست ژن گزارشگر است و به صورت یک نسخه- اnde، جدا شوند. و در نتیجه زمانی‌که دو ژن در یک ساختار خواندن، هم‌زمان موجود باشند توالی پائین دست DNA‌های به دام افتاده را می‌توان در الحاق با mRNA‌ی ژن گزارشگر تشخیص و انتخاب کرد.

طراحی و کاربردهای حاملان جدید با وجود کارایی‌های فراوان حامل‌های به دام انداز ژنی آن‌ها به طور تصادفی ژن‌ها را به دام می‌انداختند از این رو حامل‌های اختصاصی ایجاد شدند، که انواعی از آن‌ها شامل موارد زیر است؛

¹ Splice donor

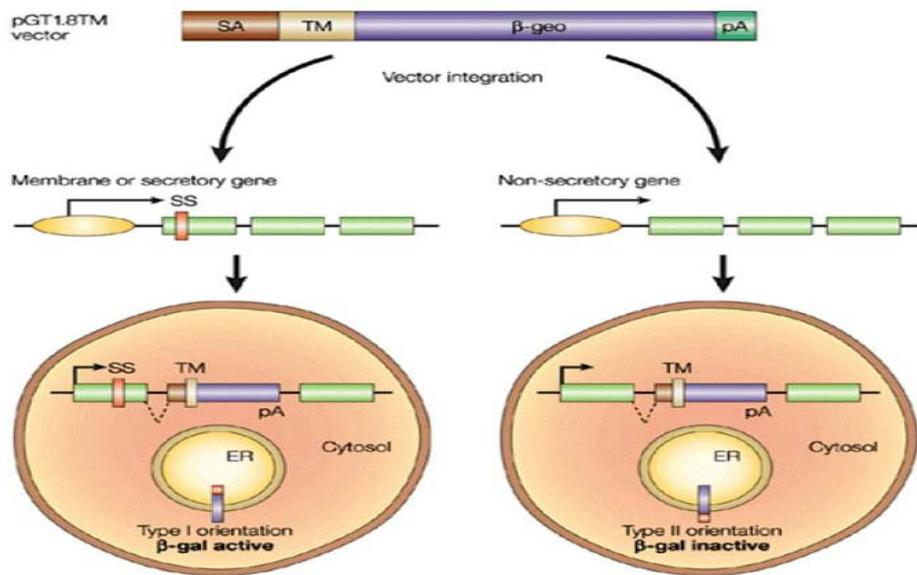
² Cell protein sorting

³ Transmembrane

⁴ Secretory signal

⁵ Recessive lethal

⁶ 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 (β -gal) در شبکه آندوپلاسمی غیر فعال است طراحی شده است. این دسته حامل‌ها به طور مؤثری ژن‌های پروتئین‌های ترشحی و سرتاسری را به دام می‌اندازند. این دسته حامل‌ها جایگاه Splice Acceptor (SA) در همراهی دمن Trans Membrane (TM) و ژن β -geo که دارای سیگنال پلی آدنیلاسیون هستند، می‌باشد. پروتئین‌های ترشحی دارای سیگنال ترشحی (SS) در انتهای دمن آمیختی 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 بنا گالاکتوزیداز در سیتوپلاسم قابل تشخیص نخواهد بود (۳۲).

فorm 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 به صورت 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 (به همین علت این حامل‌ها را "حاملان ناجی پلاسمید" می‌نامند) سپس توالی ژن به دام افتاده قابل بررسی و جداسازی است (۳۱). به طور مشابه این روش با موفقیت در حامل U3Hygro برای به دام اندازی ژن تیروزین کنیاز در سلول‌های CHO به کار رفته است (۷).

Micro array- coupled gene trap امروزه که به عنوان متدهای فراگیر در بررسی عملکرد ژن‌ها به طور وسیع جهش‌های دلخواه تصادفی به کار می‌روند، طراحی چیپ‌های (chips) ژنی به عنوان ابزاری برای پیاده سازی 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 به صورت به دام اندازی ژن‌های ترشحی برای تجزیه عملکردی به صورت گسترده در ژنوم در راه‌های انتقال پیام به کار گرفت.

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 شان که در ناحیه U3 حامل قرار دارد، دارند. به علاوه 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 آلوود می‌کند و به ناحیه‌ای ناشناخته‌ای درون ژن میزبان وارد می‌شود، آغازگر ژن مورد بررسی بیان ژن مقاومت به نیومایسین 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

¹ Locus terminal region

های مختلف برای ایجاد موجودات ترانس ژن برای هر مدل ارگانیسمی کار را آسان‌تر کرده است، به طور مثال؛ سلول‌های ESC برای دست‌کاری‌های ژنتیکی در موش و یا تخم‌های بارور شده برای ایجاد ترانس ژن‌ها در *Zebra fish* و به همین 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 کارآیی پایین هستند، به طور مثال انجام تکنیک‌های آلدوهسازی 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 الحق 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 Izsavak 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.

Microarray کاربرد دارد. از طریق این متدها و با کمک چیپ-های طراحی شده، دسته‌جات سلولی دارای جهش در PDGF (Platelet-derived 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 نفائصی و مشکلات فراوانی وجود دارند؛ برخی از عملیات‌های به دام‌اندازی ژن مناسب برای گونه‌های سلولی‌اند و نه برای یک موجود زنده کامل هر نوع حامل حساسیت‌ها و تمایلات خاص برای واکنش با DNA دارد و گاه‌ها درونمایه‌شان را به طور 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 افتد خسته‌کننده و بسیار مشکل است اما طراحی پروتکل-

- Li YY and Zhang JP (2006) Genetrapping Techniques and Current Progress. Acta Genetica Sinistica, 33(3):189-98.
- Tang H, Araki K and Yamamura K (2006) Cloning & Expression Analysis of a Murine Novel Gene, Ayu17-449. Acta Genetica Sinistica, 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

- Shinozaki K(2004) A Collection of 11800 Single-copy Ds Transposon Insertion Lines in *Arabidopsis*. The Plant Jurnal, 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, Kopczynski 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 Genetrap 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 Favoured 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, Kuliyev 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, Hurtley 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/ΔSKI 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.