سرفصل‌ها

I ـ مبانی کلون‌سازی ژن و آنالیز DNA

فصل ۱ چرا کلون‌سازی ژن و آنالیز DNA مهم است؟ ۱۹
فصل ۲ حامل‌های کلون‌سازی ژن: پلاسمیدها و باکتریوفاژها ۳۳
فصل ۳ خالص‌سازی DNA از سلول‌های زنده ۴۹
فصل ۴ دستکاری DNA خالص شده ۷۵
فصل ۵ وارد کردن DNA به سلول‌های زنده ۱۱۱
فصل ۶ حامل‌های کلون‌سازی *E. coli* ۱۳۳
فصل ۷ حامل‌های کلون‌سازی برای یوکاریوت‌ها ۱۵۷
فصل ۸ چگونه از یک ژن خاص کلون به‌دست بیاوریم ۱۸۷
فصل ۹ واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۲۱۵

II ـ کاربردهای کلون‌سازی ژن و آنالیز DNA در تحقیقات

فصل ۱۰ توالی‌یابی ژن‌ها و ژنوم‌ها ۲۳۷
فصل ۱۱ مطالعهٔ بیان و عملکرد ژن ۲۶۳
فصل ۱۲ مطالعهٔ ژنوم ۲۹۳

III ـ کاربردهای کلون‌سازی ژن و آنالیز DNA در بیوتکنولوژی

فصل ۱۳ تولید پروتئین از ژن‌های کلون‌شده ۳۱۷
فصل ۱۴ کلون‌سازی ژن‌ها و آنالیز DNA در پزشکی ۳۴۳
فصل ۱۵ کلون‌سازی ژن‌ها و آنالیز DNA در کشاورزی ۳۶۷
فصل ۱۶ کلون‌سازی ژن‌ها و آنالیز DNA درعلوم جنایی و باستان شناسی ۳۹۱

واژه‌نامه ۴۱۱

فهرست مطالب

I : مبانی کلون‌سازی ژن و آنالیز DNA

فصل اول: چرا کلون‌سازی ژن و آنالیز DNA مهم است؟

۱-۱ توسعه ابتدایی علم ژنتیک ۱۹
۱-۲ پیدایش کلون‌سازی ژن و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۲۰
۱-۳ کلون‌سازی ژن چیست؟ ۲۱
۱-۴ PCR چیست؟ ۲۳
۱-۵ چرا کلون‌سازی ژن و PCR این قدر اهمیت دارند؟ ۲۵
۱-۵-۱ بدست آوردن نمونه خالصی از ژن با کلون‌سازی ۲۵
۱-۵-۲ از PCR نیز می‌توان برای خالص‌سازی ژن استفاده کرد ۲۸
۱-۶ چگونه می‌توانید از این کتاب استفاده کنید؟ ۳۰

فصل دوم: حامل‌های کلون‌سازی ژن: پلاسمیدها و باکتریوفاژها

۲-۱ پلاسمیدها ۳۳
۲-۱-۱ اندازه و تعداد نسخه ۳۶
۲-۱-۲ انتقال پذیری و سازگاری ۳۷
۲-۱-۳ گروه بندی پلاسمیدها ۳۸
۲-۱-۴ پلاسمیدها در موجوداتی غیر از باکتری‌ها ۳۹
۲-۲ باکتریوفاژها ۳۹
۲-۲-۱ چرخه آلوده کنندگی فاژ ۴۰
۲-۲-۲ فاژهای لیزوژن ۴۰
سازماندهی ژنی در مولکول DNA فاژ λ ۴۳
اشکال خطی و حلقوی DNA فاژ λ ۴۳
M13– یک فاژ رشته‌ای ۴۶
۲-۲-۳ ویروس‌ها به عنوان حامل کلون‌سازی برای سایر موجودات ۴۸

فصل سوم: خالص‌سازی DNA از سلول‌های زنده

۳-۱ تهیه کل DNA سلول ۵۰
۳-۱-۱ کشت دادن و برداشت باکتری‌ها ۵۰
۳-۱-۲ تهیه عصاره سلولی ۵۲
۳-۱-۳ خالص‌سازی DNA از عصاره سلولی ۵۴
خارج کردن آلودگی‌ها با استفاده از حلال‌های آلی و هضم آنزیمی ۵۵
استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی برای تخلیص DNA از عصاره سلولی ۵۶
۳-۱-۴ تغلیظ نمونه‌های DNA ۵۷
۳-۱-۵ اندازه‌گیری غلظت DNA ۵۸
۳-۱-۶ سایر روش‌ها برای تهیه کل DNA سلول ۵۸

۳-۲ تهیه DNA پلاسمیدی ۶۰
۳-۲-۱ جداسازی براساس اندازه ۶۲
۳-۲-۲ جداسازی براساس ساختار فضایی ۶۴
دناتوره کردن قلیایی ۶۵
سانتریفوژ در شیب چگالی اتیدیوم بروماید- سزیم کلرید ۶۵
۳-۲-۳ تکثیر پلاسمید ۶۸
۳-۳ تهیه DNA باکتریوفاژ ۶۸
۳-۳-۱ کشت باکتری‌ها برای تهیه مقادیر زیاد فاژ لامبدا ۶۹
۳-۳-۲ تهیه فاژهای لامبدا غیر لیزوژن ۷۰
۳-۳-۳ جمع آوری فاژها از کشت آلوده ۷۱
۳-۳-۴ تهیهٔ DNA خالص از ذرات فاژ لامبدا ۷۲
۳-۳-۵ خالص‌سازی DNA فاژ M13 مشکلات کمی دارد ۷۳

فصل چهارم: دستکاری DNA خالص شده

۴-۱ آنزیم‌های مورد استفاده برای دستکاری DNA ۷۶
۴-۱-۱ نوکلئازها ۷۷
۴-۱-۲ لیگازها ۷۹
۴-۱-۳ پلی‌مرازها ۷۹
۴-۱-۴ آنزیم‌های تغییر دهنده DNA ۸۱
۴-۲ آنزیم‌هایی برای بریدن DNA- اندونوکلئازهای محدودگر ۸۲
۴-۲-۱ کشف و عملکرد اندونوکلئازهای محدودگر ۸۴
۴-۲-۲ اندونوکلئازهای محدودگر نوع II ، DNA را در توالی‌های نوکلئوتیدی خاصی برش می‌دهند ۸۵
۴-۲-۳ انتهاهای تراز و چسبنده ۸۷
۴-۲-۴ فراوانی توالی‌های شناسایی در یک مولکول DNA ۸۸
۴-۲-۵ انجام واکنش برش با آنزیم‌های محدودگر در آزمایشگاه ۸۹
۴-۲-۶ بررسی نتیجه برش با اندونوکلئاز محدودگر ۹۱
جداسازی مولکول‌ها با ژل الکتروفورز ۹۱
آشکار سازی مولکول‌های DNA روی ژل آگارز ۹۲
۴-۲-۷ تخمین اندازه مولکول‌های DNA ۹۳
۴-۲-۸ نقشه برداری محل‌های برش آنزیم‌های محدودگر متفاوت روی یک مولکول DNA ۹۵
۴-۲-۹ روش‌های ژل الکتروفورز خاص برای جداسازی مولکول‌های بزرگ‌تر ۸۶
۴-۳ متصل کردن مولکول‌های DNA به یکدیگر ۹۹
۴-۳-۱ نحوه عمل DNA لیگاز ۱۰۰
۴-۳-۲ انتهاهای چسبنده کارایی اتصال را افزایش می‌دهند ۱۰۰
۴-۳-۳ قرار دادن انتهاهای چسبنده روی مولکول با انتهای تراز ۱۰۱
اتصال‌دهنده‌ها ۱۰۱
سازگارکننده‌ها ۱۰۱
ایجاد انتهاهای چسبنده با افزودن هموپلیمر ۱۰۶
۴-۳-۴ اتصال انتهای صاف به‌وسیلهٔ DNA توپوایزومراز ۱۰۸

فصل پنجم: وارد کردن DNA به سلول‌های زنده

۵-۱ ترانسفورم کردن- برداشت DNA توسط سلول‌های باکتریایی ۱۱۴
۵-۱-۱ توانایی همهٔ گونه‌های باکتریایی در برداشت DNA یکسان نیست ۱۱۴
۵-۱-۲ تهیهٔ سلول‌های *E. coli* مستعد ۱۱۵
۵-۱-۳ انتخاب سلول‌های ترانسفورم‌شده ۱۱۵
۵-۲ شناسایی سلول‌های حاوی DNA نوترکیب ۱۱۷
۵-۲-۱ انتخاب DNA نوترکیب با pBR322- غیرفعال‌سازی الحاقی یک ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک ۱۱۸
۵-۲-۲ غیرفعال‌سازی الحاقی همیشه مستلزم ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک نیست ۱۱۹
۵-۳ وارد کردن DNA فاژ به سلول‌های باکتریایی ۱۲۳
۵-۳-۱ ترانس‌فکشن ۱۲۳
۵-۳-۲ بسته‌بندی حامل‌های کلون سازی λ در *in vitro* ۱۲۳
۵-۳-۳ آلوده‌سازی فاژ با تشکیل پلاک روی محیط کشت آگاردار مشخص می‌گردد ۱۲۴
۵-۴ شناسایی فاژهای نوترکیب ۱۲۶
۵-۴-۱ غیرفعال‌سازی الحاقی ژن 'lacZ موجود در حامل فاژی ۱۲۶
۵-۴-۲ غیر فعال‌سازی الحاقی ژن cI فاژ λ ۱۲۷
۵-۴-۳ انتخاب با استفاده از فنوتیپ Spi ۱۲۷
۵-۴-۴ انتخاب بر اساس اندازهٔ ژنوم λ ۱۲۷
۵-۵ وارد کردن DNA به سلول‌های غیر باکتریایی ۱۲۸
۵-۵-۱ ترانسفورم کردن سلول‌های خاص ۱۲۹
۵-۵-۲ ترانسفورم کردن موجودات کامل ۱۳۱

فصل ششم: حامل‌های کلون‌سازی *E. coli*

۶-۱ حامل‌های کلون‌سازی براساس پلاسمیدهای *E. coli* ۱۳۴
۶-۱-۱ نام‌گذاری حامل‌های پلاسمیدی کلون‌سازی ۱۳۴
۶-۱-۲ خصوصیات مفید pBR322 ..... ۱۳۵
۶-۱-۳ شجره‌نامهٔ pBR322 ..... ۱۳۶
۶-۱-۴ حامل‌های پلاسمیدی پیچیده‌تر برای کلون‌سازی در *E. coli* ۱۳۶
pUC8 پلاسمیدی با شاخص انتخاب Lac ۱۳۸
pGEM3Z ـ رونوشت‌برداری DNA کلون‌شده در *in vitro* ۱۴۰
۶-۲ حامل‌های کلون‌سازی براساس باکتریوفاژ M13 ..... ۱۴۱
۶-۲-۱ چگونگی ساخت حامل کلون‌سازی فاژی ۱۴۲
۶-۲-۲ حامل‌های دورگهٔ پلاسمید-M13 ..... ۱۴۲
۶-۳ حامل‌های کلون‌سازی بر اساس باکتریوفاژ λ ۱۴۵
۶-۳-۱ بخش‌هایی از ژنوم فاژ λ را بدون تأثیر بر حیات آن می‌توان حذف کرد ۱۴۶
۶-۳-۲ برای جداسازی λ تغییر یافتهٔ فاقد محل‌های شناسایی ویژه، از انتخاب طبیعی می‌توان استفاده کرد ۱۴۷
۶-۳-۳ حامل‌های الحاقی و جایگزینی ۱۴۸
حامل‌های الحاقی ۱۴۸
حامل‌های جایگزینی ۱۴۹

۶-۳-۴ چگونگی کلون‌سازی با استفاده از حامل‌های الحاقی یا جایگزینی λ ۱۵۰
۶-۳-۵ قطعات بسیار بزرگ DNA را می‌توان با استفاده از کاسمید کلون کرد ۱۵۱
۶-۴ فاژ λ و دیگر حامل‌های با ظرفیت بالا، ساخت کتابخانه‌های ژنی را ممکن می‌سازند ۱۵۲
۶-۵ حامل‌هایی برای دیگر باکتری‌ها ۱۵۵

فصل هفتم: حامل‌های کلون‌سازی برای یوکاریوت‌ها

۷-۱ حامل‌هایی برای مخمر و دیگر قارچ‌ها ۱۵۷
۷-۱-۱ شاخص‌های انتخاب برای پلاسمید 2 µm ۱۵۸
۷-۱-۲ حامل‌های بر اساس پلاسمید 2 µm– پلاسمیدهای اپی‌زومی مخمر ۱۵۹
۷-۱-۳ YEp ممکن است وارد DNA کروموزومی مخمر شود ۱۶۱
۷-۱-۴ انواع دیگر حامل‌های کلون‌سازی مخمر ۱۶۱
۷-۱-۵ کروموزوم‌های مصنوعی می‌توانند برای کلون‌سازی قطعات بزرگ DNA در مخمر استفاده شوند ۱۶۴
ساختار و روش استفاده از یک حامل YAC ۱۶۵
موارد کاربرد حامل‌های YAC ۱۶۶
۷-۱-۶ حامل‌هایی برای مخمرها و قارچ‌های دیگر ۱۶۷
۷-۲ حامل‌های کلون‌سازی برای گیاهان عالی ۱۶۷
۷-۲-۱ آگروباکتریوم تومه‌فاشینس– کوچک‌ترین مهندس ژنتیک طبیعت ۱۶۸
استفاده از پلاسمید Ti برای وارد کردن ژن‌های جدید به سلول گیاهی ۱۶۹
تولید گیاهان ترانسفورم‌شده با پلاسمید Ti ۱۷۱
پلاسمید Ri ۱۷۴
محدودیت‌های کلون‌سازی با پلاسمیدهایاآگروباکتریوم ۱۷۴
۷-۲-۲ کلون‌سازی ژن‌ها در گیاهان با انتقال مستقیم ژن ۱۷۵
انتقال مستقیم ژن به درون هسته ۱۷۵
انتقال ژن‌ها به ژنوم کلروپلاست ۱۷۶
۷-۲-۳ تلاش‌هایی برای استفاده از ویروس‌های گیاهی به عنوان حامل‌های کلون‌سازی ۱۷۷
حامل‌های کالیموویروسی ۱۷۸
حامل‌های جمینی‌ویروسی ۱۷۸
۷-۳ حامل‌های کلون‌سازی در جانوران ۱۷۹
۷-۳-۱ حامل‌های کلون‌سازی در حشرات ۱۸۰
عناصر P به عنوان حامل‌های کلون‌سازی برای دروزوفیلا ۱۸۰
حامل‌های کلون‌سازی براساس ویروس‌های حشرات ۱۸۲
۷-۳-۲ کلون‌سازی در پستانداران ۱۸۲
ویروس‌ها به عنوان حامل‌های کلون‌سازی برای پستانداران ۱۸۳
کلون‌سازی ژن بدون حامل ۱۸۴

فصل هشتم: چگونه از یک ژن خاص کلون به‌دست بیاوریم

۸-۱ مشکل انتخاب ۱۸۷
۸-۱-۱ دو روش اساسی برای به‌دست آوردن کلون نوترکیب دلخواه وجود دارد ۱۸۸

۸-۲ انتخاب مستقیم ۱۸۹
۸-۲-۱ شاخص‌های رهایی‌بخش ۱، محدودهٔ استفاده از روش انتخاب مستقیم را گسترش می‌دهند ۱۹۱
۸-۲-۲ محدوده و محدودیت‌های شاخص رهایی‌بخش ۱۹۲
۸-۳ شناسایی یک کلون از کتابخانهٔ ژنی ۱۹۳
۸-۳-۱ کتابخانه‌های ژنی ۱۹۳
۸-۳-۲ تمام ژن‌ها در یک زمان بیان نمی‌شوند ۱۹۴
۸-۳-۳ mRNA را می‌توان به صورت DNA مکمل کلون کرد ۱۹۵
۸-۴ روش‌هایی برای شناسایی کلون‌ها ۱۹۵
۸-۴-۱ رشته‌های اسید نوکلئیک مکمل با یکدیگر هیبرید می‌شوند ۱۹۶
۸-۴-۲ هیبرید شدن جستجوگر در کلونی و پلاک ۱۹۶
نشاندار کردن با نشانگرهای رادیواکتیو ۱۹۷
روش‌های نشاندار کردن غیررادیواکتیو ۲۰۰
۸-۴-۳ مثال‌هایی از استفادهٔ عملی روش هیبرید کردن جستجوگر ۲۰۱
جستجو براساس فراوانی برای بررسی یک کتابخانهٔ cDNA ۲۰۱
جستجوگرهای الیگونوکلئوتیدی برای ژن‌هایی که محصول ترجمهٔ آن‌ها مشخص شده است ۲۰۲
جستجوی هترولوگ اجازهٔ شناسایی ژن‌های وابسته را می‌دهد ۲۰۶
هیبریداسیون سانترن امکان شناسائی قطعهٔ محدودگر محتوی ژن خاص را فراهم می‌آورد ۲۰۸
۸-۴-۴ روش‌های شناسایی براساس تشخیص محصول ترجمهٔ ژن کلون‌شده ۲۱۰
برای روش‌های تشخیصی ایمونولوژیکی آنتی‌بادی‌ها مورد نیازند ۲۱۱
استفاده از آنتی‌بادی خالص‌شده برای شناسایی پروتئین در کلونی‌های نوترکیب ۲۱۱
مشکل بیان ژن ۲۱۳

فصل نهم: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

۹-۱ نگاهی کلی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۲۱۶
۹-۲ PCR با جزئیات بیشتر ۲۱۹
۹-۲-۱ طراحی پرایمر برای PCR ۲۱۹
۹-۲-۲ تعیین دمای صحیح برای استفاده در PCR ۲۲۱
۹-۳ پس از PCR: مطالعهٔ محصولات PCR ۲۲۳
۹-۳-۱ ژل الکتروفورز محصولات PCR ۲۲۴
۹-۳-۲ کلون‌سازی محصولات PCR ۲۲۵
۹-۳-۳ مشکلات ناشی از میزان اشتباهات آنزیم Taq پلی‌مراز ۲۲۷
۹-۴ با Real-time PCR می‌توان مقدار مواد آغازگر واکنش را برآورد کرد ۲۲۹
۹-۴-۱ انجام آزمایش PCR کمی ۲۲۹
۹-۴-۲ با Real-time PCR می‌توان مقدار RNA را هم برآورد کرد ۲۳۲

II : کاربردهای کلون‌سازی ژن و آنالیز DNA در تحقیقات

فصل دهم: توالی‌یابی ژن‌ها و ژنوم‌ها

۱۰-۱ شناخت روش‌های توالی‌یابی DNA ۲۳۸
۱۰-۱-۱ توالی‌یابی DNA به روش خاتمهٔ زنجیره ۲۳۸
توالی‌یابی به روش خاتمهٔ زنجیره نیاز به یک DNA الگوی تک‌رشته‌ای دارد ۲۴۲
پرایمر می‌تواند ناحیه‌ای از DNA الگو را که قرار است مورد توالی‌یابی قرار گیرد، مشخص کند ۲۴۳

۱۰-۱-۲ پایروسکانسینگ ۲۴۵
پایروسکانسینگ با تشخیص پالس‌های شیمیولومینساتس کار می‌کند ۲۴۵
پایروسکانسینگ همزمان و گسترده ۲۴۶
۱۰-۲ چگونگی توالی‌یابی ژنوم ۲۴۷
۱۰-۲-۱ روش ضربتی برای توالی‌یابی ژنوم ۲۴۹
پروژهٔ توالی‌یابی ژنوم هموفیلوس آنفلوانزا ۲۵۰
مشکلات موجود در کلون کردن ضربتی ۲۵۲
۱۰-۲-۲ روش کلون کانتیگ ۲۵۳
چیدمان کلون کانتیگ با گام‌زنی کروموزوم ۲۵۳
روش‌های سریع برای چیدمان کلون کانتیگ ۲۵۴
چیدمان کلون کانتیگ از طریق آنالیز وجود توالی برچسب‌خورده ۲۵۵
۱۰-۲-۳ استفاده از نقشه برای کمک به چیدمان توالی ۲۵۷
نقشه‌های ژنتیکی ۲۵۷
نقشه‌های فیزیکی .....
اهمیت نقشه در چیدمان توالی ۲۶۰

فصل یازدهم: مطالعهٔ بیان و عملکرد ژن

۱۱-۱ مطالعهٔ رونوشت RNA یک ژن ۲۶۵
۱۱-۱-۱ تعیین حضور رونوشت و مشخص کردن توالی نوکلئوتیدی آن ۲۶۵
۱۱-۱-۲ نقشه‌برداری رونوشت با هیبریداسیون بین ژن و RNA ۲۶۶
۱۱-۱-۳ آنالیز رونوشت با گسترش دادن پرایمر ۲۶۸
۱۱-۱-۳ آنالیز رونوشت با PCR ۲۷۰
۱۱-۲ مطالعهٔ تنظیم بیان ژن ۲۷۱
۱۱-۲-۱ تعیین محل‌های اتصال پروتئین روی مولکول DNA ۲۷۳
تأخیر حرکتی کمپلکس‌های DNA ـ پروتئین در ژل ۲۷۳
روش ردپا با آنزیم DNaseI ۲۷۴
سنجش تداخل ناشی از تغییر ۲۷۵
۱۱-۲-۲ تعیین توالی‌های کنترلی به‌وسیلهٔ آنالیز حذفی ۲۷۸
ژن‌های گزارشگر ۲۷۹
روش انجام آنالیز حذفی ۲۸۰
۱۱-۳ تشخیص و مطالعهٔ محصول ترجمهٔ یک ژن کلون‌شده ۲۸۱
۱۱-۳-۱ HRT و HART می‌توانند محصول ترجمهٔ یک ژن کلون‌شده را تشخیص دهند ۲۸۲
۱۱-۳-۲ ارزیابی پروتئین‌ها به‌وسیلهٔ جهش‌زایی *in vitro* ۲۸۴
روش‌های مختلف جهش‌زایی *in vitro* .....
استفاده از الیگونوکلئوتید برای ایجاد جهش نقطه‌ای در ژن کلون‌شده ۲۸۶
روش‌های دیگر ایجاد جهش نقطه‌ای در ژن کلون‌شده ۲۸۹
قابلیت جهش‌زایی *in vitro* ۲۹۰

فصل دوازدهم: مطالعهٔ ژنوم

۱۲-۱ تفسیر ژنوم ۲۹۴
۱۲-۱-۱ شناسایی ژن‌ها در توالی ژنوم ۲۹۴

جستجوی چارچوب‌های خواندن باز ۲۹۴
تشخیص محل ژن با کمک جستجوی همولوژی ۲۹۸
مقایسهٔ توالی ژنوم‌های مرتبط ۲۹۹
۱۲-۱-۲ تعیین عملکرد یک ژن ناشناخته ۳۰۰
تعیین عملکرد ژن با روش آنالیز تجربی، نیازمند رویکرد معکوس به ژنتیک است ۳۰۱
۱۲-۲ مطالعات ترانس‌کریپتوم و پروتئوم ۳۰۳
۱۲-۲-۱ مطالعهٔ ترانسکریپتوم ۳۰۴
مطالعهٔ ترانسکریپتوم با آنالیز توالی ۳۰۴
مطالعهٔ ترانسکریپتوم به‌وسیلهٔ آنالیز تراشه یا ریزآرایه ۳۰۵
۱۲-۲-۲ مطالعهٔ پروتئوم ۳۰۷
جداسازی پروتئین‌ها در یک پروتئوم ۳۰۸
شناسایی پروتئین‌های منفرد بعد از جداسازی ۳۰۹
۱۲-۲-۳ مطالعهٔ میان‌کنش‌های پروتئین ـ پروتئین ۳۱۰
نمایش فاژی ۳۱۱
سیستم هیبرید دوگانه در مخمر ۳۱۲

III : کاربردهای کلون‌سازی ژن و آنالیز DNA در بیوتکنولوژی

فصل سیزدهم: تولید پروتئین از ژن‌های کلون‌شده

۱۳-۱ عامل‌های مخصوص بیان ژن‌های خارجی در *E. coli* ۳۱۹
۱۳-۱-۱ پروموتر جزء حیاتی یک حامل بیانی است ۳۲۲
انتخاب پروموتر باید با دقت صورت گیرد ۳۲۲
مثال‌هایی از پروموترهای استفاده‌شده در حامل‌های بیانی ۳۲۴
۱۳-۱-۲ کاست‌ها و فیوژن‌های ژنی ۳۲۶
۱۳-۲ مشکلات معمول تولید پروتئین نوترکیب در E. coli ۳۲۸
۱۳-۲-۱ مشکلات ناشی از توالی ژن بیگانه ۳۲۸
۱۳-۲-۲ مشکلات ناشی از *E. coli* ۳۳۰
۱۳-۳ تولید پروتئین نوترکیب با سلول‌های یوکاریوتی ۳۳۲
۱۳-۳-۱ پروتئین نوترکیب از مخمر و قارچ‌های رشته‌ای ۳۳۳
ساکارومیسس سرویزیه میزبانی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب ۳۳۳
دیگر مخمرها و قارچ‌ها ۳۳۴
۱۳-۳-۲ استفاده از سلول‌های جانوری برای تولید پروتئین‌های نوترکیب ۳۳۶
تولید پروتئین در سلول‌های پستانداران ۳۳۶
تولید پروتئین در سلول‌های حشرات ۳۳۷
۱۳-۳-۳ فارمینگ ـ پروتئین نوترکیب حاصل از حیوانات و گیاهان زنده ۳۳۸
فارمینگ در جانوران ۳۳۸
پروتئین‌های نوترکیب حاصل از گیاهان ۳۴۰
جنبه‌های اخلاقی فارمینگ ۳۴۱

فصل چهاردهم: کلون‌سازی ژن‌ها و آنالیز DNA در پزشکی

۱۴-۱ تولید داروهای نوترکیب ۳۴۳
۱۴-۱-۱ انسولین نوترکیب ۳۴۴
ساخت و بیان ژن‌های مصنوعی انسولین ۳۴۵
۱۴-۱-۲ سنتز هورمون‌های رشد انسان در *E. coli* ۳۴۷
۱۴-۱-۳ فاکتور VIII نوترکیب ۳۴۸
۱۴-۱-۴ ساخت دیگر پروتئین‌های انسانی نوترکیب ۳۵۱
۱۴-۱-۵ واکسن‌های نوترکیب ۳۵۱
واکسن‌های تولیدی به صورت پروتئین‌های نوترکیب ۳۵۲
واکسن‌های نوترکیب در گیاهان ترانس‌ژن ۳۵۴
واکسن‌های ویروسی زندهٔ نوترکیب ۳۵۵
۱۴-۲ شناسایی ژن‌های مسئول بیماری‌های انسان ۳۵۶
۱۴-۲-۱ چگونه ژن یک بیماری ژنتیکی را شناسایی می‌کنند؟ ۳۵۸
شناسایی جایگاه تقریبی ژن در ژنوم انسان ۳۵۸
شناسایی کاندیدهایی برای ژن بیماری ۳۶۱
۱۴-۳ ژن درمانی ۳۶۲
۱۴-۳-۱ ژن درمانی بیماری‌های ارثی ۳۶۲
۱۴-۳-۲ ژن درمانی و سرطان ۳۶۳
۱۴-۳-۳ ملاحظات اخلاقی ژن درمانی ۳۶۵

فصل پانزدهم: کلون‌سازی ژن‌ها و آنالیز DNA در کشاورزی

۱۵-۱ افزودن ژن‌ها برای مهندسی ژنتیک گیاهان ۳۶۸
۱۵-۱-۱ گیاهانی که حشره‌کش موردنیاز خود را می‌سازند ۳۶۸
دلتا ـ اندوتوکسین‌های باسیلوس تورینژینسیس ۳۶۹
کلون‌سازی ژن دلتا ـ اندوتوکسین در ذرت ۳۷۰
کلون‌سازی ژن‌های دلتا- اندوتوکسین در کلروپلاست ۳۷۳
مبارزه با مقاومت حشرات به گیاهان زراعی تولیدکنندهٔ دلتا- اندوتوکسین ۳۷۴
۱۵-۱-۲ گیاهان مقاوم در برابر علف‌کش‌ها ۳۷۶
گیاهان زراعی "Roundup ready" ۳۷۶
نسل جدید گیاهان زراعی مقاوم در برابر گلی‌فوزات ۳۷۸
۱۵-۱-۳ دیگر پروژه‌های افزودن ژن ۳۷۹
۱۵-۲ حذف ژن‌ها ۳۸۰
۱۵-۲-۱ RNA آنتی‌سنس و مهندسی برای رسیدن میوهٔ گوجه فرنگی ۳۸۱
استفاده از RNA آنتی‌سنس برای غیرفعال کردن ژن پلی‌گالاکتوروناز ۳۸۱
استفاده از RNA آنتی‌سنس برای مهار ساخته شدن اتیلن ۳۸۳
۱۵-۲-۲ مثال‌های دیگری از کاربرد RNA آنتی‌سنس در مهندسی ژنتیک گیاهان ۳۸۴
۱۵-۳ مشکلات گیاهان مهندسی‌شده ۳۸۵
۱۵-۳-۱ نکات ایمنی در رابطه با شاخص انتخاب ۳۸۵
۱۵-۳-۲ تکنولوژی خاتمه‌گر ۳۸۶
۱۵-۳-۳ امکان بروز اثرات مضر در محیط زیست ۳۸۷

فصل شانزدهم: کلون‌سازی ژن‌ها و آنالیز DNA درعلوم جنایی و باستان شناسی

۱۶-۱ آنالیز DNA برای شناسایی متهمین ۳۹۲

۱۶-۱-۱ انگشت‌نگاری ژنتیکی از طریق هیبرید کردن با DNA جستجوگر ۳۹۳

۱۶-۱-۲ پروفایلینگ DNA با PCR توالی‌های تکراری کوتاه ۳۹۳

۱۶-۲ مطالعهٔ روابط فامیلی با پروفایلینگ DNA ۳۹۶

۱۶-۲-۱ افراد خویشاوند پروفایل DNA مشابهی دارند ۳۹۶

۱۶-۲-۲ پروفایلینگ DNA و بقایای رومانوف‌ها ۳۹۶

آنالیز STR روی استخوان‌های رومانف‌ها ۳۹۶

DNA میتوکندریائی جهت بررسی ارتباط استخوان‌های رومانوف‌ها با خویشاوندان زندهٔ آن‌ها استفاده شد ۳۹۸

کودک گم‌شده ۳۹۹

۱۶-۳ تعیین جنسیت با آنالیز DNA ۴۰۰

۱۶-۳-۱ انجام PCR روی توالی‌های ویژهٔ کروموزوم Y ۴۰۱

۱۶-۳-۲ PCR ژن آملوژنین ۴۰۲

۱۶-۴ آرکئوژنتیک- استفاده از DNA برای مطالعهٔ پیشینهٔ تاریخی انسان ۴۰۳

۱۶-۴-۱ منشأ انسان امروزی ۴۰۳

آنالیز DNA تئوری تکامل چند ناحیه‌ای ۴۰۴

آنالیز DNA نشان می‌دهد که نئاندرتال‌ها جد اروپایی‌های امروزی نیستند ۴۰۵

۱۶-۴-۲ برای مطالعهٔ مهاجرت‌های انسان ما قبل تاریخ نیز می‌توان از DNA استفاده کرد ۴۰۷

گسترش کشاورزی در اروپا ۴۰۷

استفاده از DNA میتوکندریایی برای مطالعهٔ مهاجرت‌های گذشته در اروپا ۴۰۸

۱

چرا کلون‌سازی ژن و آنالیز DNA مهم است؟

رئوس مطالب

- توسعه ابتدایی علم ژنتیک
- پیدایش کلون‌سازی ژن و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز
- کلون‌سازی ژن چیست؟
- PCR چیست؟
- چرا کلون‌سازی ژن و PCR این قدر اهمیت دارند؟
- چگونه می‌توانید از این کتاب استفاده کنید؟

اواسط قرن نوزدهم، *گریگورمندل*[1] قوانینی را برای توصیف وراثت صفات زیستی تنظیم کرد. فرض اساسی این قوانین آن است که هر صفت قابل توارث جاندار توسط عاملی به نام ژن کنترل می‌شود که ذره‌ای فیزیکی است و در جایی از سلول یافت می‌شود. کشف دوباره قوانین مندل در سال ۱۹۰۰، تولد **علم ژنتیک** را نشان می‌دهد، علمی که به فهم نقش و عملکرد دقیق ژن‌ها کمک می‌کند.

۱-۱ توسعه ابتدایی علم ژنتیک

این علم در سی سال ابتدای حیاتش با سرعت حیرت‌آوری رشد کرد. این عقیده که ژن‌ها روی **کروموزوم‌ها** قرار دارند در سال ۱۹۰۳ توسط *ساتن*[2] پیشنهاد شد و پیشتوانه تجربی آن را *مورگان*[3] در

---

1 - Gregor Mendel
2 - W. Sutton
3 - T. H. Morgan

سال ۱۹۱۰ فراهم کرد. سپس او و همکارانش روش‌هایی را برای **نقشه‌برداری ژن**[1] ابداع کردند و تا سال ۱۹۲۲ بررسی کاملی را از موقعیت نسبی بیش از ۲۰۰۰ ژن روی چهار کروموزوم مگس سرکه[2] انجام دادند.

علی‌رغم این مطالعات ژنتیکی درخشان، تا دهه ۱۹۴۰ هیچ درک واقعی از ماهیت مولکولی ژن وجود نداشت. در واقع بعد از کارهای *آوری*[3]، *مک لود*[4] و *مک کارتی*[5] در سال ۱۹۴۴ و *هرشی*[6] و *چیس*[7] در سال ۱۹۵۲ بود که همه پذیرفتند دئوکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA) همان مادهٔ ژنتیکی است. تا آن زمان تا حد زیادی عقیده بر این بود که ژن‌ها از پروتئین ساخته شده‌اند. کشف نقش DNA، محرکی قوی برای تحقیقات ژنتیک بود. تعداد زیادی از زیست‌شناسان معروف (*دلبروک*[8]، *شارگاف*[9]، *کریک*[10] و *مونود*[11] از با نفوذترین آن‌ها بودند) در دومین دوره پیشرفت علم ژنتیک سهیم بودند. درطی ۱۴ سال یعنی بین سال‌های ۱۹۵۲ تا ۱۹۶۶ ساختار DNA روشن گردید، رمز ژنتیکی گشوده شد و فرآیندهای نسخه‌برداری وترجمه توصیف گردیدند.

۱-۲ پیدایش کلون‌سازی ژن و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

این سال‌های سرشار از فعالیت و اکتشاف، با یک رکود دنبال شد، دوره‌ای که زیست‌شناسان مولکولی (عنوانی که نسل جدید ژنتیک‌دانان برای خود برگزیدند) دریافتند که در حقیقت روش‌های تجربی اواخر دهه ۱۹۶۰، آن قدر کارآمد نیستندکه بتوان با آن‌ها ژن‌ها را با جزئیات بیشتری مطالعه کرد.

سپس، در سال‌های ۱۹۷۳-۱۹۷۱ تحقیقات ژنتیک به گذشته درخشان خود بازگشت که در آن برهه از زمان، انقلابی در زیست‌شناسی تجربی به‌وجود آمد. یک روش کاملاً جدید ابداع شد که کارهای غیرممکن در گذشته را، اگرچه با سختی ولی با موفقیت، قابل طراحی و انجام‌پذیر کرد. این روش‌ها را **فن‌آوری DNA نوترکیب**[12] یا **مهندسی ژنتیک**[13] نامیدند که به علت داشتن فرآیند **کلون‌سازی ژن** در دل خود، دوره درخشان دیگری را برای علم ژنتیک رقم زدند.

---

1 - Gene mapping
2 - *Drosophila melanogaster*
3 - Avery
4 - MacLeod
5 - McCarty
6 - Hershey
7 - Chase
8 - Delbruck
9 - Chargaff
10 - Crick
11 - Monod
12 - Recombinant DNA technology
13 - Genetic engineering

این تحولات به ابداع روش‌های سریع توالی‌یابی[1] DNA که تعیین ساختمان ژن‌ها را میسر می‌ساخت، منجر شد و در اواخر قرن بیستم با پروژه‌های توالی‌یابی ژنوم‌های بزرگ، مثل پروژه ژنوم انسان که در سال ۲۰۰۰ کامل شد، به اوج خود رسید. این تحولات امکان توسعه روش‌هایی را برای مطالعهٔ تنظیم ژن‌ها فراهم کرد و برای زیست‌شناسان مولکولی این فرصت را ایجاد نمود تا بدانند اشتباهات در تنظیم ژن چگونه به بیماری‌های انسان مانند سرطان منجر می‌شود. این تحولات همچنین بذر بیوتکنولوژی نوین را افشاندند، رویکردی که ژن‌ها را برای تولید پروتئین‌ها و سایرترکیبات مورد نیاز در پزشکی و فرآیندهای صنعتی به کار گرفت.

در خلال دهه ۱۹۸۰، هنگامی که هیجان ناشی از انقلاب کلون‌سازی ژن در بالاترین سطح خود بود، پیدایش روشی با همان تازگی و تحول‌آفرینی در کنار آن غیرممکن بنظر می‌رسید. گفته می‌شود که در سال ۱۹۸۵ *کری مولیس*[2] شب هنگام در طی رانندگی کنار ساحل کالیفرنیا **واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)** را ابداع کرد. آنچه به ذهنش خطور کرد، روشی ساده و حساس بود که به عنوان یک مکمل مناسب برای کلون‌سازی ژن به شمار می‌رود. بسیاری از اعمالی که انجام دادن آن‌ها با روش کلون‌سازی ژن به‌تنهایی امکان‌پذیر ولی بسیار سخت بود، با PCR آسان گشت. PCR دامنه آنالیز DNA را گسترده‌تر کرد و به کاربردهای جدیدی از یافته‌های زیست‌شناسی مولکولی در بخش‌های خارج از محدودهٔ پزشکی، کشاورزی و بیوتکنولوژی منجر شد. ژنتیک در باستان‌شناسی، اکولوژی مولکولی و پزشکی قانونی برپایه DNA، تنها سه زمینه جدیدی هستند که مستقیماً در نتیجه ابداع PCR امکان‌پذیر شده‌اند. همچنین PCR، زیست‌شناسان مولکولی را قادر ساخت تا به پرسش‌هایی راجع به تکامل انسان و اهمیت تغییرات محیطی بر بیوسفر پاسخ دهند و ابزاری بسیار قوی را برای مقابله با جرم و جنایت در اختیار آن‌ها قرار داد. چهل سال از ظهور کلون‌سازی ژن می‌گذرد، اما ما هنوز بر این چرخ گردنده پیش می‌تازیم و هیچ پایانی بر این هیجان متصور نیست.

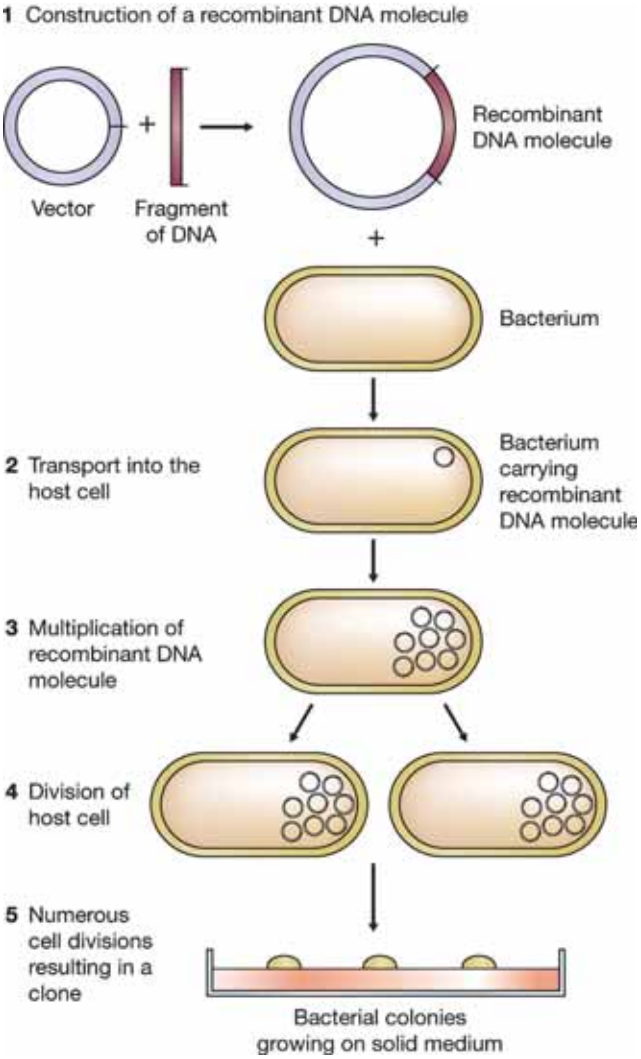
۱-۳ کلون‌سازی ژن چیست؟

کلون‌سازی ژن دقیقاً به چه معنی است؟ ساده‌ترین راه برای پاسخ دادن به این پرسش پیگیری مراحل اصلی در طی آزمایشات کلون‌سازی ژن است (شکل ۱-۱):

(۱) قطعه‌ای از DNA، شامل ژنی که کلون خواهد شد، درون یک مولکول DNA حلقوی به نام حامل[3] وارد می‌شود تا یک **مولکول DNA نوترکیب** را ایجاد کند.

---

1 - Sequencing
2 - Kary Mullis
3 - Vector



شکل ۱- ۱ *مراحل اصلی کلون‌سازی ژن.*

(۲) حامل، ژن را به درون سلول میزبان منتقل می‌کند؛ سلول میزبان معمولاً باکتری است، اگرچه می‌توان از سلول‌های زنده دیگر نیز استفاده کرد.

(۳) درون سلول میزبان، حامل تکثیر می‌یابد و نسخه‌های مشابه فراوانی از خود و از ژنی که حمل می‌کند، تولید می‌نماید.

(۴) هنگامی که سلول میزبان تقسیم می‌شود، نسخه‌هایی از مولکول DNA نوترکیب به نسل بعدی منتقل شده و تکثیر بیشتر حامل صورت می‌پذیرد.

(۵) پس از تعداد زیادی تقسیمات سلولی، یک جمعیت یا یک کلون از سلول‌های همسان میزبان