دانشگاه تربیت مدرس

نشانگرهای ملکولی

Molecular Markers

مجموعه مقالات تحقیقی و سمینارهای پایان ترم ـ درس نشانگرهای مولکولی

کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی ـ دانشگاه تربیت مدرس

شامل:

- ✓ نقشه‌های فیزیکی Physical Mapping
- ✓ مکانهای ژنی صفات کمی Quantitative trait loci (QTL)
- ✓ پی.سی.آر رونوشت بردار معکوس (RT-PCR/RNA-PCR)
- ✓ Simple Sequence Repeats MicroSatellite (SSRs)
- ✓ چندشکلی تک نوکلئوتیدی Single nucleotide polymorphisms
- ✓ Sequence Tagged Site (STS)
- ✓ فناوری ریزآرایه (microarray)
- ✓ Diversity Array Technology (DArT) (1)
- ✓ Diversity Array Technology (DArT) (2)

Agrisoft.ir
http://agrisoft.ir

agrisoft.ir

به نام خدا

فهرست مقالات

نقشه‌های فیزیکی Physical Mapping ۳

مکانهای ژنی صفات کمی Quantitative trait loci (QTL) ۱۹

پی.سی.آر رونوشت بردار معکوس (RT-PCR/RNA-PCR) ۲۶

Simple Sequence Repeats MicroSatellite (SSRs) ۳۶

چندشکلی تک نوکلئوتیدی Single nucleotide polymorphisms ۵۱

Sequence Tagged Site (STS) ۶۱

فناوری ریزآرایه (microarray) ۶۵

Diversity Array Technology (DArT) (1) ۷۱

Diversity Array Technology (DArT) (2) ۷۶

Agrisoft.ir

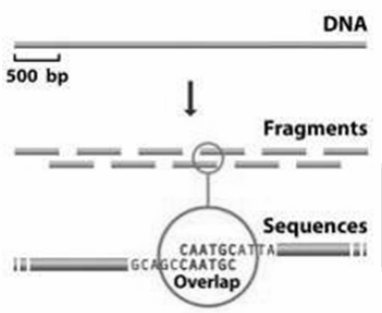
• **تذکر:** مطالب این جزوه، مربوط به سیمنار پایان ترم دانشجویان کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی می‌باشد که بهترین آنها انتخاب شده تا به عنوان یک منبع فارسی مورد استفاده دانشجویان دانشگاههای دیگر و همچنین ورودی‌های سالهای بعد قرار گیرد. لذا صحت و درستی آنها به عهده گروه اگریسافت نمی‌باشد.

نقشه‌های فیزیکی
Physical Mapping

رضا فریدی

مقدمه

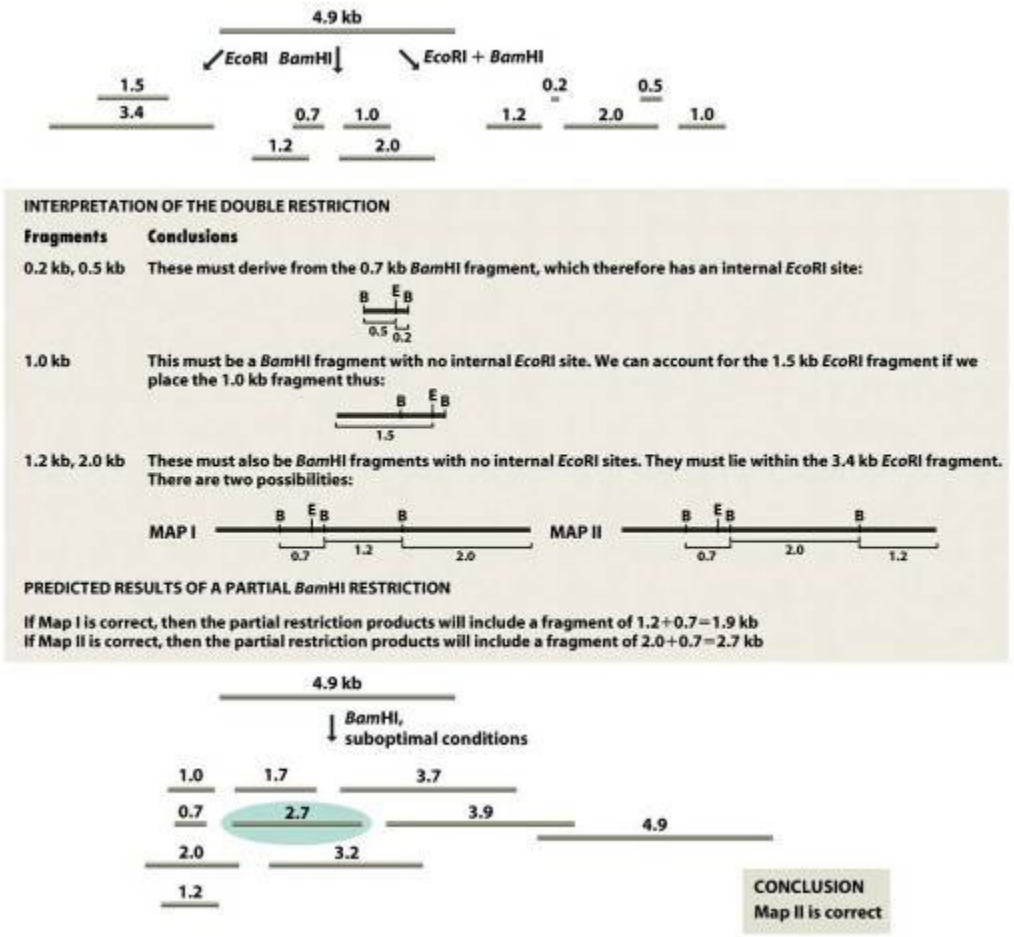
در توالی‌یابی ژنوم، تعیین توالی DNA در اولویت است ولی بیش از ۷۵۰ باز را در یک آزمایش نمی‌توان تعیین نمود. به همین دلیل از روش Shotgun استفاده می‌شود. یعنی یافتن توالی یک ملکول DNA بلند، تنها با کنار هم قرار دادن توالی قطعات کوچکتر امکانپذیر است. به این صورت که ملکول مورد نظر به قطعات کوچکتر شکسته شود و پس از توالی‌یابی هر قطعه و شناسایی قسمت‌های همپوشانی قطعات مختلف، توالی قطعهٔ بلند اولیه به دست می‌آید. این روش راهکار استاندارد جهت توالی‌یابی ژنوم پروکاریوت‌ها می‌باشد. همچنین در آنالیز مناطق تکراری ژنوم دچار اشتباه می‌شود. این محدودیتها سبب می‌شود که نتوان از روش شات‌گان در توالی‌یابی ژنوم یوکاریوتها (به دلیل وجود ملکول DNA بزرگ و توالی تکراری در ژنوم) استفاده کرد.



برای رفع این مشکلات به منظور توالی‌یابی ژنوم لازم است که ابتدا با استفاده از نقشه ژنومی (MAP) محل ژنها یا برخی مشخصات راهنما در ژنوم مشخص شود و بعد توالی‌یابی ژنوم با کمک یکی از دو روش **شات‌گان**[1] **سراسر ژنومی** و یا **کانتیگ کلونی**[2] انجام شود. روش کانتیگ کلونی اگرچه وقتگیر است ولی توالی‌های بدست آمده از صحت بالاتر و خطای کمتری نسبت به شات‌گان سراسر ژنومی برخوردار است.

1 . Shotgun
2 . Clon contig

محل‌های شناسایی برای آنزیم دوم ولی بریده نشده) است که می‌تواند به همراه محصولات ایجاد در شرایط **محدوده شده کامل**[1] اطلاعات بیشتری را به منظور تعیین ترتیب قطعات محدود شده فراهم نماید.

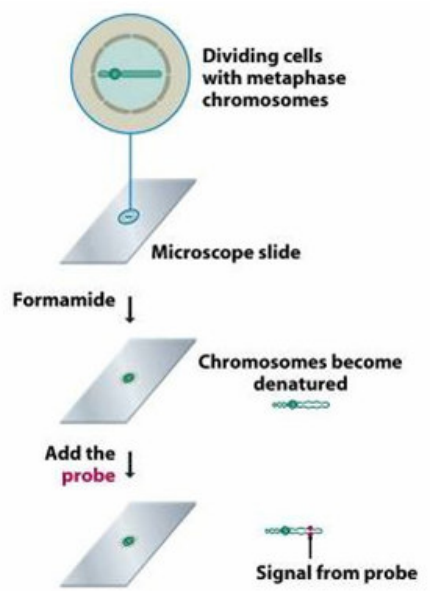


معمولاً استفاده از روش محدود شده نسبی اطلاعات لازم را برای تکمیل نقشه فراهم می‌کند ولی اگر تعداد جایگاه محدود شده زیاد باشد، به علت ازدیاد تعداد قطعات برش خورده، انجام آنالیز مشکل می‌گردد که می‌توان با اتصال یک ماده رادیواکتیو یا سایر مارکرها به دو انتهای ملکول DNA ی اولیه قبل از انجام روش محدود شده نسبی تعداد قطعات جهت آنالیز را کاهش داد. به این صورت که پس از الکتروفورز ژل آگارز، اندازه قطعات قابل مشاهده کمک می‌کند تا محل برش نسبت به دو انتهای ملکول اولیه مشخص شود.

اگر تعداد جایگاه‌های برش آنزیم مورد نظر کم باشد، تهیه نقشه محدود شده به سهولت انجام می‌گیرد ولی اگر تعداد جایگاه‌های برش آنزیمی افزایش یابد، قطعات حاصل از هضم‌های تک آنزیمی، دو آنزیمی و محدود شده نسبی زیاد شده، مقایسه و مرتب کردن آنها دشوار می‌گردد. به طوری که بر روی ژل آگارز باندهای منفرد به یکدیگر متصل شده و احتمال اشتباه در شمارش قطعات به وجود می‌آید. همچنین اگر قطعات مختلف دارای اندازه‌های مشابه باشند، حتی در صورت

1 . Complete restriction

که در آن جا هیبریدیزاسیون اتفاق می‌افتد، نشانگر محل پروب روی نقشه است. ابتدا باید DNA کروموزوم مورد نظر بصورت تک رشته‌ای درآید؛ چون پروب فقط در حالت تک رشته‌ای می‌تواند با ملکول هبیرید شود. روش استاندارد برای دناتوره کردن DNAی کروموزومی بدون تخریب موفولوژی آن، خشک کردن نمونه روی لام میکروسکوپ و سپس تیمار آن با فرمامید است.



در این روش، دو ویژگی **حساسیت** و **قدرت تفکیک** باید مدنظر قرار گیرد، ابتدا از مواد رادیواکتیو برای نشاندار کردن پروب استفاده می‌شد که این دو ویژگی را بصورت همزمان نداشت؛ چون هرچه انرژی تشعشعی مورد استفاده افزایش یابد حساسیت افزایش ولی قدرت تفکیک کاهش می‌یابد. به همین دلیل از اواخر سال‌های دهۀ ۱۹۸۰ از نشانگرهای DNA فلوئورسنت غیر رادیواکتیو استفاده شد؛ چون این نشانگرها حساسیت و قدرت تفکیک را همزمان ایجاد می‌کنند.

یکی از مزایای روش FISH این است که قطعات کلون شده علاوه بر استفاده به عنوان مارکر جهت هیبریدیزاسیون برای تهیه نقشه فیزیکی، برای تعیین توالی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد، پس می‌توان مستقیماً رابطه بین نقشه ژنومی و توالی DNA را بررسی نمود.

در ابتدا از روش FISH برای کروموزوم‌های متافازی استفاده می‌شد، این کروموزوم‌ها شدیداً متراکم هستند و هر کروموزوم با توجه به محل سانترومر و الگوی نواربندی ایجاد شده در آن پس از رنگ‌آمیزی، شکل منحصر به فردی پیدا می‌کند. در کروموزوم‌های متافازی با کمک FISH، سیگنال فلوئورسنت به دست آمده از محل مورد نظر نسبت به میزان سیگنال فلوئورسنت به دست آمده در انتهای بازوی کوتاه کروموزوم سنجیده می‌شود (عدد FLpter). ضعف این روش در متراکم بودن کروموزوم‌های متافازی است که منجر به کم شدن قدرت تفکیک نقشه به دست آمده می‌شود. در این روش

کتابخانه کلونی در مقایسه با هیبرید تشعشعی، دارای یک امتیاز مهم برای نقشه‌های STS می‌باشد، و آن اینکه هر کلـون می‌تواند DNA ی مورد نیاز تعیین توالی را نیز تأمین کند. داده‌های بدست آمده از آنالیز STS که از روی آن نقـشه فیزیکـی تهیه می‌شود، می‌تواند برای مشخص کردن کلون‌های حاوی قطعات همپوشان نیز استفاده شود. به این ترتیب با تعیین تـوالی قطعات همپوشان کانتیگ کلونی[1] ساخته می‌شود. با چیدن کنارِ همِ کلون‌های همپوشان، اطلاعات اولیه جهت تعیـین تـوالی DNAهای ممتد و بلند فراهم می‌شود و در نهایت داده‌های STS می‌تواند این توالی را بـا نقـشه فیزیکـی بـه خـوبی مـرتبط سازد.

منابع مورد استفاده:

1. Terry A. Brown، Genom3، 750 pp.، Garland Science، 2006، ISBN 0-8153-4138-5 £41.99 (paperback)
2. Aaron Bensimon، Single DNA molecule analysis: Applications of molecular combing BRIEFINGS IN FUNCTIONAL GENOMICS AND PROTEOMICS. VOL 1. NO 4. 385–396. JANUARY 2003
3. Matthias Redenbach، Cloning and Physical Mapping of the EcoRI Fragments of the Giant Linear Plasmid SCP1، November 1997/Accepted 10 March 1998، http://jb.asm.org/cgi/content/short/180/10/2796
4. S.S. Adawy et al.، Physical mapping of knob-related sequences in some maize determined by FISH (fluorescent in situ hybridization) and fiber-FISH، Arab J. Biotech.، Vol. 5، No.(2) July (2002) : 237-248.
5. http://www.pasteur.fr/recherche/unites/biophyadn/e-mapping.html#references

1 . Clone contig

مکانهای ژنی صفات کمی

Quantitative trait loci (QTL)

صبوری

مقدمه

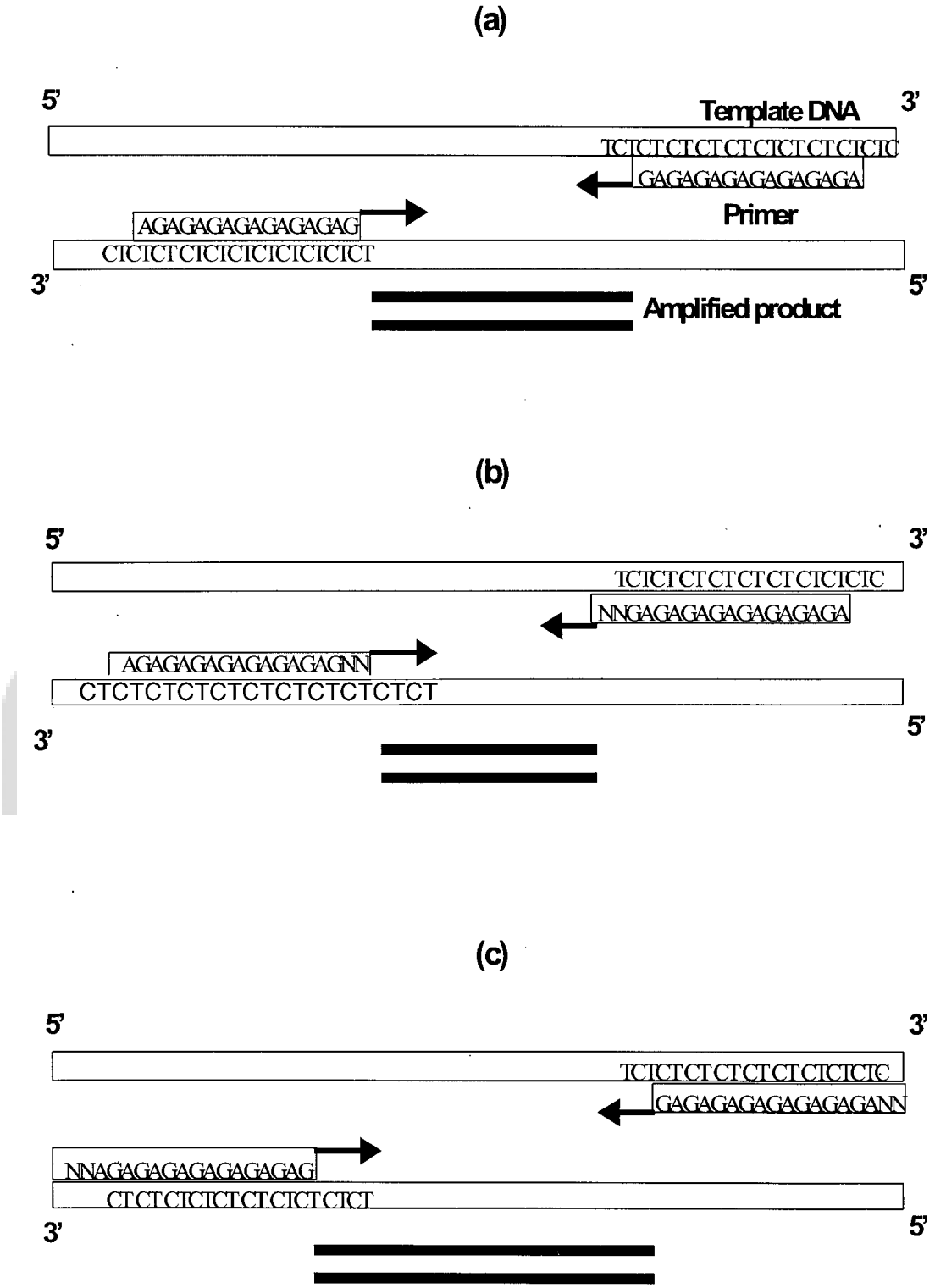
به مکانهای ژنی و یا بلوکهای ژنی که صفت کمی را در موجود زنده کنترل می‌کنند، اطلاق می‌شود (دادلی ۱۹۹۳) یک صفت کمی عبارت است از صفتی که دارای توزیع پیوسته بوده و قابل اندازه گیری است، این صفات اغلب با تعداد زیادی ژن کنترل می‌شوند و هر یک از این ژنها دارای اثرات کوچکی می‌باشند، (لیو ۱۹۹۸، دادلی ۱۹۹۳، فالکونر ۱۹۹۶، راسل و همکاران ۱۹۹۰).

بنابراین به هر ناحیه از ژنوم که بخشی از واریانس ژنتیکی مشاهده شده در فنوتیپ را توجیه کند، یک QTL گفته می‌شود.

تقسیم بندی صفات کمی و کیفی

صفات کمی	صفات کیفی
۱- فنوتیپ‌های مختلف به طور پیوسته و به صورت یک طیف قابل انداره گیری هستند ماند: ارتفاع بوته	۱-دسته‌های فتوتیپی جدا از هم و در گروههای گسسته قرار دارند مثل گل سفید و گل قرمز
۲- کنترل پلی ژن (چند ژنی) که اثر هر ژن به قدری ناچیز است که قابل تشخیص نیست، لذا محیط اثر زیادی روی آن دارد.	۲- توسط تعداد اندکی ژن (یک یا دوژن) کنترل می‌شوند هر ژن اثر زیاد و قابل تشخیص و محیط رویشان تاثیر کمی دارد.
۳- با یک جمعیت و انواع آمیزیش‌های ممکن سروکار داریم.	۳- با تلاقی‌های منفرد و نتایج حاصل از آن سرو کار داریم.
۴- با تحلیل آماری و پارامترهای جمعیت مثل میانگین، انحراف معیار و غیره سروکار داریم.	۴- با شمارش تعداد نتایج و بررسی نسبت‌ها سروکار داریم.

پرایمرها ممکن است لنگری باشد یعنی اینکه معمولاً از انتهای ´۳ و یا ´۵ با ۱-۴ باز محدود شده باشد که تا پهلوی توالی‌ها ادامه می‌یابند.



(شکل ۱) a- نمائی شماتیک از PCR تک پرایمری با پرایمر Reverse=$(AG)_8$،Forward ، b- لنگری از '3، b- لنگری از '5

sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. Theor Appl Genet 100: 1050–1060.

Hussain، A.J.، V. Gupta، J. Ali، P.K. Ranjekar & E.A. Siddiq، 2000. Physiological characterization، genetics and molecular mapping of a new source of temperature sensitive genetic male sterility in rice. Fourth International Rice Genetics Symposium، 22–27

October 2000، IRRI، Philippines، Abstracts p. 95. Joshi، S.P.، V.S. Gupta، R.K. Aggarwal، P.K. Ranjekar & D.S. Brar، 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza.* Theor Appl Genet 100: 1311–1320.

Kantety، R.V.، X.P. Zeng، J.L. Bennetzen & B.E. Zehr، 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. Molecular Breeding 1: 365–373.

Kojima،T.، T. Nagaoka، K. Noda & Y. Ogihara، 1998. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. Theor Appl Genet 96: 37–45.

Lanham، P.G. & R.M. Brennan، 1998. Characterization of the genetic resources of redcurrant (*Ribes rubrum*: subg. *Ribesia*) using anchored microsatellite markers. Theor Appl Genet 96: 917–921.

Levin، I.N.، E. Gilboa، S. Yeselson، Shen & A..A. Schaffer، 2000. *Fgr*، a major locus that modulates the fructose to glucose ratio in mature tomato fruits. Theor Appl Genet 100: 256–262.

Levinson، G. & G.A. Gutman، 1987. Slipped strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. Mol Biol Evol 4: 203–221.

Lu، J.، M.R. Knox، M.J. Ambrose، J.K.M. Brown & T.H.N. Ellis،1996. Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP- and PCR-based methods. Theor Appl Genet 93: 1103–1111.

Martin، J.P. & M.D. Sanchez-Yelamo، 2000. Genetic relationships among species of the genus *Diplotaxis* (Brassicaceae) using inter-simple sequence repeat markers. Theor Appl Genet 101: 1234–1241

چندشکلی تک نوکلئوتیدی

Single nucleotide polymorphisms (SNP)

ک. ابوکاظمی

مقدمه:

انسان‌ها همیشه برای دستیابی به غذای مطلوبتر به دنبال فرم‌های مختلف انواع محصولات بوده‌اند و در گذشته طی روش‌های اصلاح نباتات سنتی واریته‌های جدیدی را بوجود آورده‌اند.

در روش اصلاح سنتی بین گیاهان تلاقی صورت میگیرد که در نتیجه تلاقی جنسی به صورت طبیعی و در طی ترکیب تصادفی ژن ها، صفات جدیدی تولید می‌شوند که ممکن است برخی از آن‌ها ناخواسته باشند. در روش سنتی نحوهٔ انتخاب و ارزیابی نتاج هم بسیار مهم است.

اصلاح نباتات سنتی معایب زیادی را به همراه دارد که از جملهٔ آنها میتوان به مواردی چون هزینه زیاد، زمان بر بودن و محدودیت در تلاقی بین دو خانواده اشاره کرد.

با کشف DNAو در پی آن کشف مارکرهای مولکولی تحول عظیمی دراصلاح وطبقه بندی گیاهان حاصل شد. همچنین به کمک این ابزار سرعت و دقت دستیابی به صفات مطلوب زراعی به طرز چشمگیری افزایش یافت. با این حال هر کدام از نشانگرهای مولکولی معایبی را با خود به همراه داشتند.

مثلاً نشانگر RFLP به عنوان اولین نسل از نشانگرهای مبتنی بر دورگ گیری معایبی چون، پر هزینه بودن، زمان بر و زحمت فراوان را با خود به همراه داشت. نشانگر AFLP هم معایبی مثل پیچیدگی روش کار و تجزیه و تحلیل آن و غالب بودن را در خود دارد. همچنین در نشانگری چون RAPD ، تکرار پذیری کم، غالب بودن،مشکل بودن تجزیه و تحلیل و در نشانگر SSR، تکرار پذیری کم، پیچیدگی و هزینه بر بودن روش از جمله معایب آنها بشمار می‌رود. به همین دلایل نشانگرهای مولکولی نوظهوری مثل روش‌های SNP به تدریج محبوبیت بیشتری پیدا می‌کنند.

چندشکلی تک نوکلئوتیدی Single nucleotide polymorphisms (SNP)

SNP در اختصار به صورت چندشکلی تک نوکلئوتیدی تعریف می‌شود و اصطلاحاً آن را snips تلفظ می‌کنند. در واقع وقتی که یک تک نوکلئوتید G،T،A یا C در توالی DNA بین اعضای یک گونه و یا حتی دو جفت کروموزوم در یک فرد متفاوت باشد، SNP رخ می‌دهد.

۲) Differential Hybridization

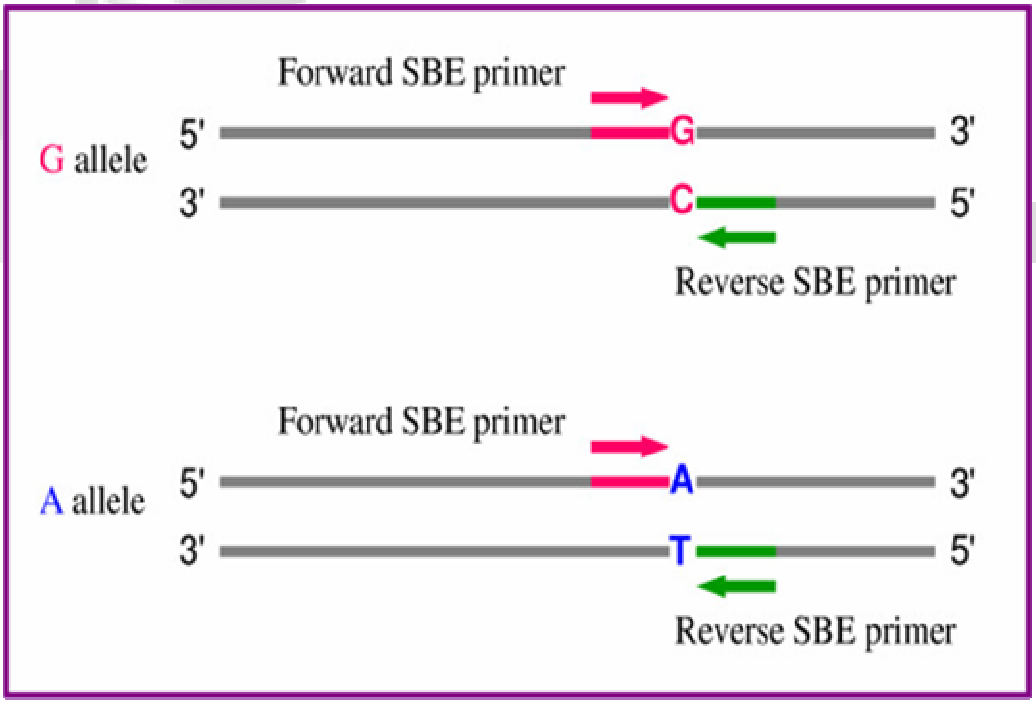
مراحل کار در اختصار به صورت زیر است:

- استفاده از یک الیگونوکلئوتید نشاندار ویژه (پروب)
- دورگ گیری
- در صورت وجود جفت نشدگی اتصال سست صورت میگیرد که در نهایت به روشهای مختلفی SNP موجود شناسایی می‌شود.

۳) Single Base Extension یا Mini Sequencing

مراحل انجام روش به طور خلاصه به قرار زیر است:

- استفاده از یک آغازگرجفت شونده با بالادست SNP
- گسترش رشته توسط پلیمراز با حضور ddNTP
- شناسایی SNP



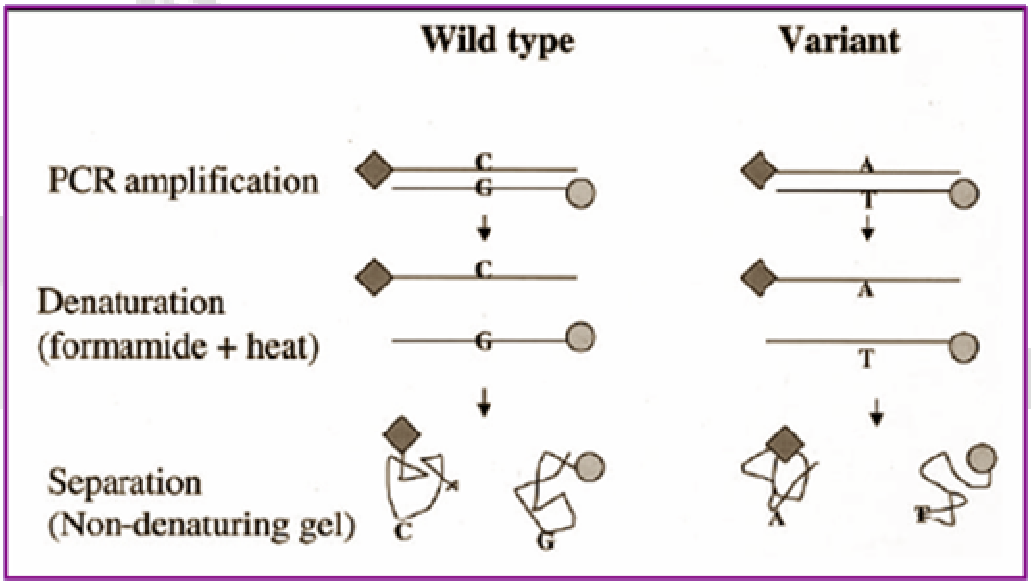
پرایمرها را برای تکثیر قسمتی از آن مکان در موجودات مختلف بکار می‌برند. محصولات تکثیر شده را تحت تـأثیر آنـزیم محـدودگر قرار می‌دهند تا RFLPها را شناسایی کنند. (Konieczny and Ausubel,1993; Lyamichev et al.,1993)

استفاده از نشانگرهایCAPSبرای آشکار سازی SNP به کمک PCRو آنزیمهای محدودگر مورد بهره برداری قرار گرفتـه است. (Jarvis et al.,1994; Michaelis and Amasino,1998)

تفاوت فرم فضایی رشته‌های منفرد

single-strand conformation polymorphism **(Orita et al., 1989)**

در این روش ابتدا قسمتی از DNA که در آن انتظار چندشکلی می‌رود بوسیلهٔ PCR تکثیـر مـی‌شـود. محـصولات PCR واسرشته شده واین قطعات در موجودات مختلف به واسطهٔ تفاوت تک نوکلئوتیدی که دارند شکل فضایی متفاوتی را به خـود می‌گیرند که در نهایت به طور متفاوت روی ژل پلی اکریل آمید حرکت کرده و جداسازی می‌شوند.



نتیجه و چشم انداز آینده

گسترش و کاربرد نشانگرها این امید را می‌دهد که در نهایت این روابط منجر به بهبودی و پیشرفت غلات می‌شود.

SNPها منابع مهم و ضروری نشانگرهای چندشکلی برای مطالعهٔ همبستگی صفات زراعی هستند.

نشانگرهای مبتنی بر SNPشایستهٔ انتخاب هستند. زیرا به راحتی از طریق اطلاعات توالی یابی پیـشرفت و توسـعه پیـدا می‌کنند و بسیار تکرار پذیرند. Rafalski (2002).

پیش بینی شده است که افزایش دانش ما از فهم کارکرد ژنومیکس، ESTها و SNPها مـی‌توانـد کاربردهـای مهمـی در اصلاح نباتات، زراعت و تحقیقات اکوسیستم بویژه در پیشرفت کشورها داشته باشد.

منابع

1) Kwadwo Owusu Ayeh (2008).Expressed sequence tags (ESTs) and single nucleotide polymorphisms (SNPs) : Emerging molecular marker
tools for improving agronomic traits in plant
biotechnology. African Journal of Biotechnology Vol. 7 (4)، pp. 331-341.

2) K. McNally1* R. Bruskiewich1 D. Mackill1 D. Weigel2 K. Frazer3 K. Childs4 R. Buell4 J. Leach5 H.
Leung(2007). The OryzaSNP Project – SNP Discovery in Diverse Rice. Molecular Plant Breeding، 2007، Vol.5، No.2، 246-247

3) Prof. David Archer.Prof. Malcolm Bennett.Prof. Ian Connerton. Dr. Sean May.Prof. Gregory Tucker.Use of SNP-DNA analysis in authenticating Basmati rice. The university of Nottingham.

4) Baldo، A.M. and J. Labate. 2003. Polymorphism prediction. ISMB 2003، Brisbane، Australia.

5) *George Tauchen* and *A. Ronald Gallant.* SNP: A Program for Nonparametric Time Series Analysis. Version 8.4. User's Guide.
No 95-26، Working Papers from Duke University، Department of Economics

6) Fragment Analysis Research Group. Single Base Extension: A Method for Detecting Multiple Single Nucleotide Polymorphisms.

agrisoft.ir

Diversity Array Technology (DArT) (1)

ن. ویشلقی

مقدمه:

روش‌های موجود برای انگشت نگاری ژنتیکی از جمله RFLP و AFLP و PSSR و S.N.P محدودیت‌هایی دارند از جمله:

۱) برای پوش کل ژنوم نیاز به شناسایی تعداد بسیار زیادی نشانگر چند شکل می‌باشد. با روش‌های موجود این کار مرحله به مرحله صورت گرفته و وقتگیر است.

۲) بیشتر نشانگرهای فوق بر اطلاعات ژنوم استوار می‌باشند و بهترین نتایج را برای جاندارانی می‌دهند که اطلاعات ژنوم آنها در دسترس باشد. بنابراین برای گیاهانی مانند برنج این روش‌ها می‌توانند به به صورت گسترده به کار برده شوند، اما برای گیاهانی با اطلاعات محدود کاربرد چندانی ندارند.

۳) وقتی نشانگری شناسایی می‌شود هزینه استفاده از آن زیاد می‌گردد و سرعت کار نیز کم می‌شود بیشتر این سیستم‌ها مبتنی بر ژل بوده و نشانگرها تک به تک رتبه بندی می‌شوند.

به منظور حل مشکلات ذکر شده و کاهش هزینه‌های تعیین ژنوتیپ برای عموم گیاهان، فناوری تنوع آرایه‌ها توسط کیلیان، مدیر بخش ژنومیکس کامبیا ابداع شد.

فناوری آرایه تنوع یا دارت یک روش جدید تعیین ژنوتیپ است که بدون نیاز به ردیف یابی و با هزینه کم می‌تواند به طور وسیع به کار گرفته شود. انگشت نگاری ژنتیکی یک جاندار می‌تواند در موارد زیر بسیار مفید باشد:

- شناسایی دقیق یک موجود و درجه خویشاوندی آن با سایر افراد
- شناسایی مناطق ژنومی پیوسته با صفات فنوتیپی مورد علاقه
- نقشه‌یابی دقیق ژن‌های خاص به منظور جداسازی ژن‌ها
- ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود
- ایجاد ارقام جدید
- تسهیل در ترکیب ژرم پلاسم‌های دور