مهندس مصطفی حق پناه
کارشناس مجتمع تحقیقات کاربردی و تولید بذر
شرکت توسعه کشت دانه های روغنی

نشانگرهای مولکولی

نشانگرهای DNA

نشانگرهای DNA تفاوت افراد را درسطح مولکول DNA نشان می‌دهند ودارای چند شکلی بالا، توزیع تصادفی در ژنوم، عدم تأثیرپذیری ازعوامل محیطی، خنثی بودن از نظر فنوتیپی، فراوانی زیاد، غیر وابسته بودن به مرحله رشد، بافت، اندام و قابل ارزیابی بودن درهر مرحله رشدی می‌باشند.

امروزه طیف وسیعی از نشانگرهای DNA هستند که در انتخاب آنها باید معیارهایی مانند محل ژنومی آنها (رمزکننده، غیررمزکننده)، توزیع نسبی آنها در ژنوم (نشانگرهایی با محل ژنومی معین) در نظر گرفته شوند.

نشانگرهایی از قبیل RFLP، RAPD، SSR، AFLP و ... به طور وسیعی درمطالعات تنوع ژنتیکی استفاده می‌شوند.

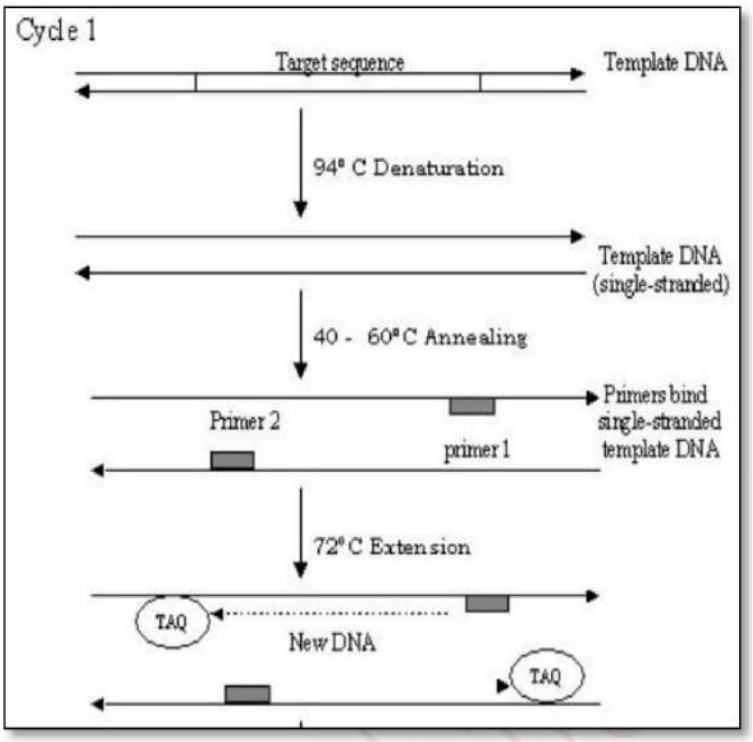
واکنش زنجیره‌ایی پلی‌مرازPCR

واکنش زنجیره‌ایی پلی‌مراز (PCR) قطعات خاصی از مولکول DNA را با استفاده از آنزیم Tag polymerase و تغییرات دمایی در سه مرحله اصلی واکنش تکثیر می‌کند(شکل ۱):

۱. مرحله جدا سازی دورشته (حدود ۹۵ درجه سانتی‌گراد)

۲.مرحله اتصال آغازگر (بسته به پرایمرها ۶۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد)

۳. مرحله بسط آغازگر (۷۲ درجه سانتی‌گراد).



شکل ۱. واکنش زنجیره‌ایی پلی‌مراز PCR

انواع نشانگرهای DNA

نشانگرهای DNA بر اساس نظر پوشندرا و همکاران به چهار گروه تقسیم می‌شوند.

(i) نشانگرهای مبتنی بر هیبریداسیون

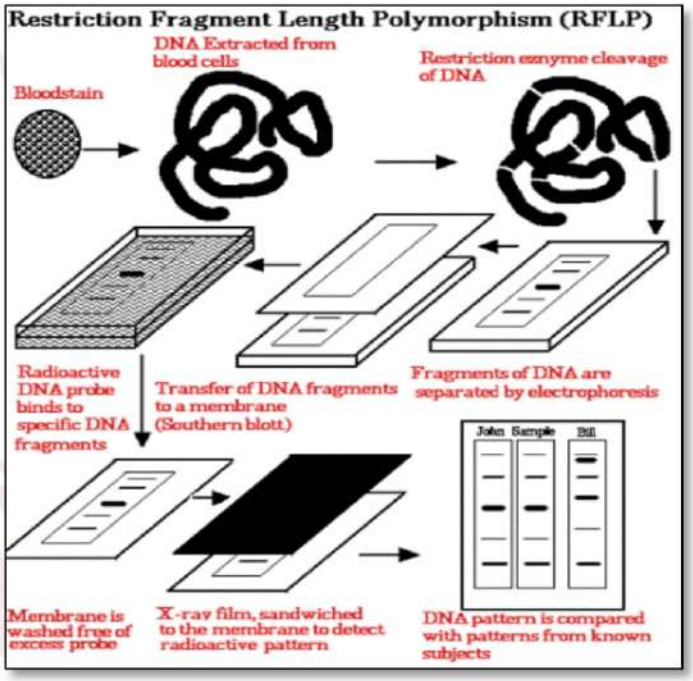
(ii) نشانگرهای مبتنی بر PCR

(iii) نشانگرهای مبتنی بر هیبریداسیون و PCR

(iv) نشانگرهای مبتنی بر توالی یابی (SNPs) و تراشه DNA

(i) نشانگرهای مبتنی بر هیبریداسیون

نشانگرهای مبتنی بر هیبریداسیون بدون استفاده از روش PCR تولید می‌شوند که بارزترین این دسته از نشانگرها چند شکلی طولی قطعات انحصاری RFLP می‌باشد (شکل ۲).



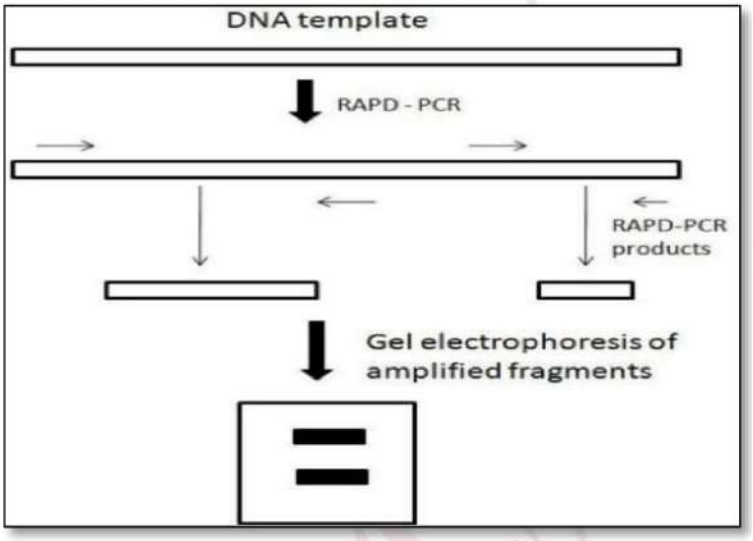
شکل ۲. نشانگر RFLP

(ii) نشانگرهای مبتنی بر PCR

این گروه از نشانگرها از توالی الیگونوکلئوتیدی به عنوان آغازگر برای تکثیر قطعه خاصی از DNA استفاده می‌کنند. در این دسته از نشانگرهای مولکولی با بهره‌گیری از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قطعه مورد نظر به تعداد بسیار زیادی که امکان ظهور آن بر روی ژل وجود داشته باشد تکثیر می‌شود. روش‌های مختلف در این گروه در طول و توالی آغازگرها، سختی شرایط PCR و روش‌های جداسازی قطعات از همدیگر متفاوت می‌باشند.

PCR با استفاده از یک آغازگر

در این روش از یک توالی تصادفی یا اختیاری برای تکثیر یک قطعه خاص استفاده می‌نمایند به طوری که این توالی در دو محل از ژنوم هم به عنوان آغازگر رفت و هم به عنوان آغازگر برگشت عمل می‌کند. انواع روش‌های مبتنی بر آغازگرها عموماً در طول آغازگرها با هم متفاوت هستند به نحوی که AP-PCR از حدود ۲۰ نوکلئوتید، RAPD از حدود ۱۰ نوکلئوتید و DAF از حدود ۶تا ۸ نوکلئوتید برخوردار می‌باشند (شکل ۳).



شکل ۳. مراحل تکثیر نشانگر RAPD

PCR با استفاده از یک جفت آغازگر

این نوع نشانگرها انواع مختلف دارند که برخی از آنها عبارتند از، توالی نشان‌مند کننده نقاط یا STS که اصولا یک توالی کوتاه و منحصر به فرد از DNA ژنومی به طول ۲۰۰ تا ۳۰۰ نوکلئوتید بوده که توالی مشابه آن در هیچ جای دیگر ژنوم یافت نمی‌شود طراحی آغازگرهای STS معمولا از مکان نشانگرهای RAPD و RFLP منشاء می‌یابد.

نواحی تکثیر شده با توالی مشخص یا SCARs، نمونه‌ایی دیگر از این نوع نشانگرها می باشد که آغازگرهای این نشانگر از روی

مکان‌های ژنی موجود در پروفایل‌های AP-PCR، RAPD، DAF، AFLP، SAMPL و... شناسایی و ساخته می‌شود.

چند شکلی طولی قطعات تکثیری AFLP

چند شکلی طولی قطعات تکثیری یا AFLP، در واقع تلفیقی از روش PCR و RFLP بوده که با استفاده از واکنش زنجیره‌ایی پلی‌مراز به تکثیر انتخابی قطعات هضمی DNA می‌پردازد و شامل مراحل هضم DNA، اتصال آداپتور به DNA، تکثیر پیش انتخابی و تکثیر انتخابی می‌باشد.

ریز ماهواره‌ها

ریز ماهواره‌ها یا توالی تکراری ساده (SSRs) در واقع تکرارهای پیاپی از واحدهای منو، دی، تری و تترا نوکلئوتیدی نظیر(TC)n، (TAT)n، (GATA)n، (A)n می‌باشند که از فراوانی و چند شکلی بالایی در ژنوم یوکاریوت‌ها برخوردار بوده شناسایی و تشخیص آنها بوسیله طراحی آغازگرهای احاطه کننده این نواحی صورت می‌گیرد.

تکنولوژی چند شکلی فضایی رشته‌ای منفرد SSCP

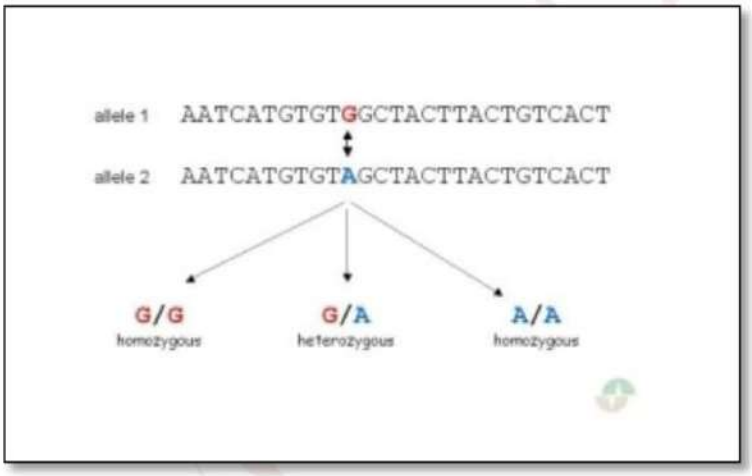
تکنولوژی چند شکلی فضایی رشته‌ای منفرد یا SSCP جهت تشخیص چندشکلی‌های محصول PCR که در یک یا چند نوکلئوتید نسبت به هم متفاوتند به کار می‌رود که نمایان سازی این تفاوت‌ها از طریق تک‌رشته‌سازی محصول PCR و حفظ ساختمان ثانویه و فرم فضایی آن در حین الکتروفورز صورت می‌گیرد.

(iii) نشانگرهای مبتنی بر هیبریداسیون و PCR

در این روش از محصول PCR نشانگر PARD/MP-RAPD به عنوان کاوشگر استفاده می‌گردد به نحوی که بعد از انجام PCR از محصول در مراحل الکتروفورز، لکه گذاری و هیبریداسیون با P32 یا SSR های نشان‌مند صورت می‌گیرد. این روش به نام‌های دیگری نظیر RAMPO، RAHM، RAMs نیز نام گذاری گردیده است.

(iv) نشانگرهای مبتنی بر توالی‌یابی (SNPs) و تراشه DNA

چند شکلی تک نوکلئوتیدی یا SNP تنوع ناشی از جهش حذف یا اضافه در یک نوکلئوتید می‌باشد (شکل ۴). تشخیص فراورده‌های SNP معمولا به سه روش، مبتنی بر ژل، غیر مبتنی بر ژل (DASH ,OLA, DNAchip) و روش‌های غیر مبتنی بر PCR صورت می‌گیرند.



چند شکلی تک نوکلئوتیدی SNP

منبع:

Gupt, p. and k.Prasad. (2002). Molecular markers: principle and methodology. Pp: 9-54.