دانشکده علوم
گروه زیستشناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد
رشته زیست شناسی گرایش علوم سلولی ملکولی

عنوان

مطالعه فیلوژنتیکی و الگوی بیان ژن *CEL II* در گیاه کرفس بومی ایران

اساتید راهنما:
جناب آقای دکتر احمد رضا بهرامی، جناب آقای دکتر جعفر ذوالعلی

اساتید مشاور:
سرکار خانم دکتر مریم مقدم متین
جناب آقای دکتر امین میرشمسی

تحقیق و تألیف
آتنا حلمی لائین

تابستان ۱۳۹۱

سپاس بی کران پروردگار یکتا را

که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد

و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود

و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

تقدیم با بوسه بر دستان پدرم:

به او که نمی دانم از بزرگی اش بگویم یا سخاوت، سکوت و مهربانی اش

او که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی، ایستادگی را تجربه نمایم.

و تقدیم به:

مادرم، دریای بی کران فداکاری و عشق

که وجودم برایش همه رنج بود

و وجودش برایم همه مهر

آنکه آفتاب مهرش در آستانه قلبم،

همچنان پابرجاست و هرگز غروب نخواهد کرد.

تقدیم به برادرم:

که همواره در طول تحصیل متحمل زحماتم بود

و تکیه گاه من در مواجهه با مشکلات

و تقدیم به همسر مهربانم:

که با قلبی آکنده از عشق و معرفت محیطی

امنیت و آرامش و آسایش برای من فراهم آورده

همو که حس تعهد و مسئولیت را در زندگی‌مان تلالویی خدایی

داده است و وجودش مایه دلگرمی من بوده و هست

با تقدیر و تشکر شایسته از استاد فرهیخته و فرزانه

جناب آقای دکتر بهرامی که با نکته های دلاویز و گفته های بلند، صحیفه های سخن را علم پرور نموده و همواره راهنما و راه گشای من در اتمام این پایان نامه بوده اند.

و از جناب آقای دکتر جعفر ذوالعلی که در طول انجام پایان نامه به اینجانب کمک نمودند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

با سپاس از اساتید گرامی سرکار خانم دکتر مقدم متین و دکتر میر شمسی که با قبول مشاورت این پروژه، از راهنمایی هایشان بهره مند بوده ام.

از جناب آقای دکتر مشرقی و سرکار خانم دکتر جلال به پاس نظرات بسیار سازنده ای که در اختیار این جانب نهادند بسیار سپاسگذارم.

و از تمامی دوستانم در آزمایشگاه بیولوژی مولکولی و آزمایشگاه مرکزی پژوهشکده فناوری زیستی

به ویژه خانم ها صادق پور، محمودی، حسن زاده، بهنام، صبور ملکی، صفاریان و همه دوستانم در آزمایشگاه بیوتکنولوژی، و آقایان حداد، بوذرپور و صادقی کمال تشکر و آرزوی کامیابی و سعادت را دارم.

چکیده :
اعضای خانواده اندونوکلئاز SI، نوکلئازهای اختصاصی تک-رشته‌ای با قابلیت هضم DNA هترودوپلکس می‌باشند. یکی از اعضای این خانواده با نام CEL II به ویژه گیاه کرفس دیده می‌شود که قادر است DNA هترودوپلکس را در قطعات DNA با کارایی مطلوب در شرایط آزمایشگاهی برش دهد و موارد کاربردی متعددی در ژنتیک، بیوتکنولوژی و تشخیص مولکولی ژن‌های معیوب دارد. با وجود مطالعات متعدد در خصوص کاربردهای بیوتکنولوژیک این گروه از آنزیم‌ها، اهمیت عمکردی آنها در *in vivo* و نقش آنها در رشد و تمایز مورد مطالعه دقیق قرار نگرفته است. لذا نخستین گام در جهت تبیین نقش کلیدی این آنزیم‌ها مطالعه الگوی بیان ژن آن‌ها در بافت‌های مختلف از یک طرف و همچنین مطالعه روند تکاملی تغییرات ساختاری ژن‌های مربوطه از طرف دیگر است. لذا در مطالعه حاضر به منظور تبیین نقش بیولوژیک آنزیم CEL II، ۱) نسبت به همسانه‌سازی ژن *CEL II* از گیاه کرفس اقدام کرده و ماهیت مولکولی آن از جهت نسبت حفظ شدگی ساختاری در طی تکامل بررسی شد. ۲) مطالعات بیوانفورماتیک به منظور روشن شدن محل فعالیت درون سلولی انجام گرفت. ۳) الگوی بیان ژن به منظور تعیین جایگاه فعالیت آن مورد آزمایش قرار گرفت. بدین منظور بیان ژن *CEL II* در بافت‌های مختلف گیاه کرفس، با استفاده از تکنیک RT-PCR به طور نیمه کمی مورد بررسی قرار گرفت.
پس از استخراج DNA ژنومی و تکثیر قطعه ژن *ITS*، ژن مورد نظر برای تعیین توالی ارسال شد همچنین پس از استخراج RNA، سنتز cDNA و تکثیر قطعه *CEL II* و تهیه پلاسمید pTZ57R/T، واکنش اتصال و انتقال پلاسمید به سلول-های مستعد پذیرش پلاسمید انجام شد. به منظور تایید صحت همسانه سازی، سازه ژنتیکی حاصل برای توالی‌یابی ارسال شد. همچنین جهت بررسی بیان آنزیم CEL II در بافت‌های مختلف گیاه کرفس از روش RT-PCR نیمه کمی استفاده شد و به منظور متوازن کردن میزان RNA وارد شده به واکنش ها، از آغازگرهای عمومی یوبی کوئیتین استفاده گردید.
با بررسی نتایج به دست آمده از تعیین توالی ژن *ITS* و همردیفی آن با توالی ثبت شده در NCBI (ژن بانک FJ986043.1) تفاوت حدود ۹ درصدی بین آن‌ها مشاهده شد. نکته قابل ملاحظه این که بررسی نتایج تعیین توالی ژن *CEL II* و همردیفی آن با توالی گزارش شده، نشان‌دهنده همردیفی ۱۰۰% آن‌ها بود.
مطالعه الگوی بیان ژن *CEL II* در بافت‌های ساقه، برگ، دمبرگ و گل که به منظور تعیین محل دقیق فعالیت بیان ژن مربوطه انجام گرفت نشان داد که اگرچه این ژن در تمام

بافت‌های مورد مطالعه بیان می‌شود، اما میزان بیان آن در برگ حداکثر و در ساقه حداقل می‌باشد.

کلمات کلیدی: آنزیم CEL II، هترودوپلکس، پلاسمید pTZ57R/T، RT-PCR نیمه کمی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: کلیات

مقدمه ۲
۱-۱ نوکلئازهای اختصاصی DNA تک رشته‌ای..... ۴
۱-۲ نقش نوکلئازها در مولکول‌های زیستی ۸
۱-۳ کاربردهای نوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته..... ۱۰
۱-۴ معرفی و تاریخچه کاربردهای تحقیقاتی آنزیم CEL I ۱۱
۱-۴-۱ معرفی آنزیم CEL I و فعالیت اندونوکلئازی آن ۱۱
۱-۴-۲ تاریخچه تحقیقات کاربردی CEL I ۱۵
۱-۵ نوکلئاز CEL II ۱۸
۱-۵-۱ نوکلئازهای مشابه آنزیم CEL II..... ۱۹
۱-۵-۲ تاریخچه روش‌های دسترسی، تولید و کار بر روی آنزیم CEL I و CEL II .. ۲۱
۱-۶-روش‌های بررسی بیان ژن ۲۳
۱-۶-۱ روش‌های بررسی بیان ژن در سطح RNA..... ۲۴
۱-۶-۱-۱ روش تشخیص نیمه کمی با استفاده از RT-PCR ۲۴
۱-۶-۱-۲ روش تشخیص کمی با استفاده از Real – time RT-PCR ۲۶
۱-۶-۱-۳ نورترن بلات و تکنیک‌های مرتبط ۲۷
۱-۶-۱-۴ فن‌آوری ریزآرایه‌ها ۲۸
۱-۶-۲ روش‌های بررسی بیان ژن در سطح پروتئین..... ۲۹
۱-۶-۲-۱ تکنیک الایزا ۳۱
۱-۶-۲-۲ تکنیک تفکیک SDS-PAGE و وسترن بلات..... ۳۱
۱-۷ همسانه سازی محصولات PCR..... ۳۳
۱-۸ هدف تحقیق ۳۴

فصل دوم: مواد وروش ها

۲-۱ تجهیزات و مواد مورد استفاده ۳۶
۲-۱-۱ تجهیزات مورد استفاده ۳۷
۲-۱-۲ مواد و وسایل مورد استفاده ۳۸
۲-۲ روند کلی پژوهش..... ۳۸
۲-۲-۱ استریل کردن مواد و وسایل ۳۸
۲-۳ مواد گیاهی..... ۳۸
۲-۴ استخراج DNA ژنومي ۳۹
۲-۴-۱ مواد مورد نیاز..... ۳۹

۲-۴-۲ مراحل استخراج DNA ژنومی ۳۹
۲-۵ تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۴۱
۲-۵-۱ آماده سازی مواد و محلول‌های الکتروفورز ۴۱
۲-۵-۱-۱ تهیه محلول EDTA (۰/۵ مولار، pH=۸) ۴۱
۲-۵-۱-۲ تهیه بافر الکتروفورز TBE (۵X) ۴۱
۲-۵-۱-۳ تهیه ژل آگارز ۱% ۴۲
۲-۶ انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) ۴۲
۲-۶-۱ مواد مورد نیاز ۴۲
۲-۶-۲ آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌اي پلی مراز ۴۲
۲-۶-۳ مراحل انجام واکنش زنجیره‌اي پلی مراز (PCR) ۴۳
۲-۶-۴ الکتروفورز محصولات PCR ۴۵
۲-۶-۵ تعیین توالي قطعه تکثیر شده با آغازگرهای ITS ۴۵
۲-۷ استخراج RNA کل ۴۶
۲-۷-۱ مواد مورد نیاز ۴۶
۲-۷-۲ آماده سازی مواد و وسایل ۴۶
۲-۷-۳ تهیه آب عاری از RNase ۴۶
۲-۷-۴ آماده‌سازی نمونه ۴۷
۲-۷-۵ مراحل استخراج RNA کل ۴۷
۲-۷-۶ الکتروفورز نمونه‌های RNA استخراج شده ۴۸
۲-۸ انجام واکنش رونویسی معکوس (سنتز cDNA) ۴۹
۲-۸-۱ مواد مورد نیاز ۴۹
۲-۸-۲ مراحل سنتز cDNA ۴۹
۲-۸-۳ انجام واکنش زنجیره‌اي پلی مراز (PCR) ۵۰
۲-۸-۴ الکتروفورز محصولات PCR ۵۰
۲-۹ همسانه سازی قطعه هدف در باکتری *E. coli* سویه DH5α ۵۰
۲-۹-۱ تهیه محیط کشت باکتریایی ۵۰
۲-۹-۲ تهیه پلیت LAIX (L.B/Ampicillin / IPTG / X-Cal) ۵۱
۲-۹-۳ پیوند قطعه هدف و ناقل (واکنش Ligation) ۵۲
۲-۹-۴ تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد پذیرش پلاسمید ۵۳
۲-۹-۵ انتقال پلاسمیدها به سلول های *E.coli* مستعد پذیرش (Transformation) ۵۴
۲-۹-۵-۱ بررسی کلنی‌های آبی ـ سفید ۵۵
۲-۹-۶ تایید صحت همسانه سازی ۵۶
۲-۹-۶-۱ واکنش کلنیPCR ۵۶
۲-۹-۷ استخراج پلاسمید نوترکیب ۵۶
۲ -۹-۷-۱ تعیین کیفیت و کمیت پلاسمید نوترکیب استخراج شده ۵۸
۲-۹-۷-۲ تأیید صحت قطعه کلون شده ۵۸
۲-۹-۷-۳ تعیین توالی ۵۸
۲-۹-۸ بررسی قرابت اندونوکلئازهای خانواده SI بر اساس ساختار ژنتیکی ۵۹
۲-۹-۹ بررسی قرابت اندونوکلئازهای خانواده SI بر اساس ساختار پروتئینی ۶۰
۲-۱۰ بررسی الگوی بیان ژن CEL II در بافت‌های مختلف کرفس ۶۰
۲-۱۰-۱ آماده‌سازی نمونه ۶۰

۲-۱۰-۲ استخراج RNA کل ۶۰
۲-۱۰-۲-۱ تعیین کیفیت و کمیت RNA های استخراج شده ۶۰
۲-۱۰-۳ انجام واکنش رونویسی معکوس (سنتز cDNA) ۶۱
۲-۱۰-۳-۱ مراحل سنتز cDNA..... ۶۱
۲-۱۰-۴ انجام واکنش زنجیره اي پلی مراز(PCR) ۶۱
۲-۱۰-۴-۱ متوازن کردن میزان RNA وارد شده به واکنشها ۶۱
۲-۱۰-۴-۲ انجام واکنش زنجیره اي پلی مراز با آغازگرهای اختصاصی CEL II ۶۲
۲-۱۰-۴-۳ الکتروفورز محصولات PCR..... ۶۲

فصل سوم: نتایج

۳-۱ استخراج DNA ۶۴
۳-۲ انجام واکنش PCR بر روی DNA ژنومی با آغازگرهای عمومی ITS .. ۶۵
۳-۳تعیین توالي قطعه ژن تکثیر شده *ITS* ۶۶
۳-۳-۱ بررسی صحت تعیین توالي ۶۶
۳-۴ نتایج بررسی قرابت اندونوکلئازهای خانواده SI بر اساس ساختار ژنتیکی..... ۶۸
۳-۵ نتایج بررسی قرابت اندونوکلئازهای خانواده SI بر اساس ساختار پروتئینی..... ۶۸
۳-۶ نتایج حاصل از واکنش PCR بر روی DNA ژنومی با آغازگرهای اختصاصی CEL II ۷۱
۳-۷ نتایج حاصل از تعیین کیفیت نمونه RNA استخراج شده ۷۱
۳-۸ نتایج الکتروفورز محصول PCR با cDNA رمز کننده آنزیم CEL II .. ۷۲
۳-۹ تهیه سلول‌های مستعد برای پذیرش پلاسمید و ترانسفورماسیون ۷۳
۳-۱۰ تایید همسانه‌سازی ژن ۷۴
۳-۱۱ تایید قطعه کلون شده ۷۵
۳-۱۲ استخراج پلاسمید ۷۶
۳-۱۳ تعیین توالی قطعه همسانه شده در پلاسمید pTZ57R/T..... ۷۷
۳-۱۴ بررسی صحت تعیین توالی ۷۷
۳-۱۴-۱ بررسی توان ترشحی آنزیم CEL II..... ۷۹
۳-۱۵ بررسی الگوی بیان ژن *CEL II* در بافت‌های مختلف کرفس..... ۸۰
۳-۱۵-۱ استخراج RNA کل ۸۰
۳-۱۶ تعیین کیفیت و کمیت RNAs استخراج شده ۸۰
۳-۱۷ مقایسه بیان mRNA رمزکننده ژن *CEL II* در بافت‌های مختلف ۸۱
۳-۱۷-۱ متوازن کردن میزان RNA وارد شده به واکنشها ۸۱
۳-۱۸ انجام واکنش زنجیره اي پلی مراز با آغازگرهای اختصاصی CEL II . ۸۳

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴-۱ بحث و نتیجه‌گیری ۸۵
۴-۱-۱ روند تکاملي تغییرات مولکولي آنزیم CEL II..... ۸۷
۴-۱-۱-۱ اهمیت بیولوژی آنزیم CEL II با توجه به میزان حفظ شدگی آن ۸۸
۴-۱-۱-۲ اهمیت فیزیولوژیک آنزیم CEL II ۸۹
۴-۲ پیشنهادات..... ۹۴

فصل پنجم:

منابع ۹۷

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱- ۱: توالی کامل mRNA رمز کننده آنزیم اندونوکلئاز CEL I..... ۱۴
شکل ۱-۲: ساختمان اولیه پروتئین آنزیمی CEL I..... ۱۴.
شکل ۲-۱: نقشه پلاسمید pTZ57R/T و مکان‌هاي برشي آن..... ۵۳
شکل ۳-۱: الکتروفورز ژل ۰/۸% آگارز مربوط به استخراج DNA ژنومی..... ۶۴
شکل ۳-۲: باند حاصل از محصول PCR بر روی DNA ژنومی کرفس با آغازگرهای ITS..... ۶۵
شکل۳-۳: نتیجه تعیین توالی بخشی از *ITS* مربوط به کرفس مورد استفاده با آغازگر رفت..... ۶۶
شکل ۳-۴: نتیجه همردیفی توالی *ITS*..... ۶۷
شکل ۳-۵ : درخت فیلوژنتیکی توالی *ITS* برای ۶۷
شکل ۳-۶ : درخت فیلوژنتیکی توالی‌هاي نوکلئوتیدی اندونوکلئازهای خانواده SI..... ۶۹
شکل ۳-۷ : درخت فیلوژنتیکی توالی‌هاي پروتئینی اندونوکلئازهای خانواده SI..... ۷۰
شکل۳-۸: باند حاصل از محصول PCR بر روی DNA ژنومی..... ۷۱
شکل ۳-۹: باندهای حاصل از الکتروفورز RNA کل استخراج شده از بافت‌های کرفس..... ۷۲
شکل۳-۱۰: الکتروفورز ژل۱ % آگارز محصول حاصل از تکثیر ژن *CEL II*..... ۷۳
شکل ۳-۱۱: پلیت حاوی باکتری‌های *E. coli* دارای پلاسمید نوترکیب..... ۷۴
شکل ۳-۱۲: کشت خطی از باکتری‌های *E. coli* دارای پلاسمید نوترکیب (کلنی سفید)..... ۷۵

شکل ۳-۱۳: باند حاصل از محصول PCR حاصل از Clony PCR..... ۷۶
شکل ۳-۱۴: سازه ژنتیکی حاوی cDNA رمزکننده آنزیم CEL II..... ۷۶
شکل ۳-۱۵: نتیجه بخشی از تعیین توالي قطعه تکثیر شده از سازه ژنتیکی pTZ57R/T::CEL I..... ۷۸
شکل ۳-۱۶ : نتیجه همردیفی توالی برگشت با *CEL II* گزارش شده ۷۸
شکل ۳-۱۷: بررسی توان ترشحی آنزیم CEL II..... ۷۹
شکل ۳-۱۸: باند تکثیر یافته یوبی‌کوئیتین ۸۱
شکل ۳-۱۹: توازن باند تکثیر یافته یوبی-کوئیتین..... ۸۲
شکل ۳-۲۰: باند تکثیر یافته با آغازگرهای نامناسب یوبی-کوئیتین..... ۸۲
شکل ۳-۲۱: مقایسه میزان بیان ژن *CEL II* در بافت‌های ساقه، برگ، دمبرگ، گل گیاه کرفس..... ۸۳

فهرست جداول

عنوان

صفحه

جدول ۲-۱: مشخصات آغازگرهای استفاده شده در پروژه ۴۳
جدول ۲-۲: مخلوط واکنش‌گرهای مورد استفاده در واکنش PCR ۴۴
جدول ۲-۳: برنامه زمانی و دمایی PCR برای تکثیر قطعه *ITS* ۴۴
جدول ۲-۴: برنامه زمانی و دمایی PCR برای تکثیر ژن *CEL II* ۴۵
جدول۳-۱: نتایج حاصل از Nanodrop نمونه‌های RNA ۸۰

فصل اول

کلیات

مقدمه

جهش‌های نقطه‌ای (SNP)[1] و آشکارسازی آن‌ها در ژنتیک و پزشکی از جنبه‌های مختلف حائز اهمیت است. SNP یک فرآیند

[1] single nucleotide polymorphism

نرمال و طبیعی است و به صورت تصادفی اتفاق افتاده و قادر به ایجاد تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های طبیعی می باشد. احتمالاً SNPs مسئول تنوع بین افراد، تکامل ژنومی، صفات خانوادگی بسیار رایج مانند موی مجعد، تفاوت‌های درون فردی در پاسخ به داروها و بیماری‌های معمول و پیچیده مانند دیابت، چاقی، فشار خون و اختلالات روانی باشند. ممکن است SNPs بر فعالیت پروموتور(بیان ژن)، ساختار mRNA، پایداری و موقعیت سلولی mRNAs و یا پروتئین‌ها تاثیر بگذارند و به همین‌خاطر موجب بیماری شوند. بنابراین تشخیص تغییرات بی‌شمار در ژن‌ها و بررسی اثرات آن‌ها منجر به فهم بهتر تأثیر این تغییرات بر عملکرد ژن و سلامتی می‌گردد (Komar, 2003).

برای مثالSNP در ناحیه ژن *HERC2* مجاور ژن *OCA2* که تولید کننده‌ی پروتئین ملانین می‌باشد، باعث تغییر در رنگ چشم می‌شود (Bryner, 2008). گروهی از محققان عقیده دارند که اثر متفاوت دارو بر روی افراد مختلف و همچنین آسیب‌پذیری متفاوت افراد در شرایط یکسان نسبت به یک بیماری می‌تواند تحت تاثیر SNP ایجاد شود.

SNP همچنین باعث ایجاد بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های قلبی و انواع سرطان‌ها می شود و طی تحقیقاتی مشخص شده که حتی در متاستاز سلول‌های سرطان پستان نیز نقش دارد (Rae *et al.*, 2008). این آگاهی‌ها می‌تواند نقطه شروعی برای توسعه‌ی نشانگرهای جدید و مفید SNP جهت استفاده در آزمایش‌های پزشکی و داروها برای اختلالات رایج باشد و انقلابی در رشته پزشکی در آینده خواهد بود.

از این‌رو، روش‌های متعددی برای آشکارسازی این جهش‌ها در ژنوم موجودات ابداع گردیده است. تعیین‌توالی، آزمون Taq-man، Real time PCR، آزمون اتصال الیگونوکلئوتید، چیپ‌های

DNA و ریزآرایه‌ها، روش‌های متعددی هستند که هر یک با توانایی‌های خاص خود برای آشکارسازی جهش‌های تک-نوکلئوتیدی در توالی‌های ژنومی مورد استفاده قرار می‌گیرند. با این وجود، نکته حائز اهمیت، وجود روشی است که علاوه بر توانایی به کارگیری در زمینه‌های تحقیقاتی مختلف، کم هزینه و نیازمند به امکانات آزمایشگاهی کمتر بوده و بتوان آن را به طور گسترده برای غربال کردن ژنوم‌ها مورد استفاده قرار داد. اگرچه روش‌های متعددی به منظور آشکارسازی جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی وجود دارد، اما هیچ یک از آن‌ها از توانایی‌های ذکر شده به صورت توأم برخوردار نمی‌باشند (Gupta *et al.*, 2001).

جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی جایگاه‌هایی از ژنوم‌ها هستند که در آن‌ها یک نوکلئوتید با نوکلئوتید دیگر تعویض گردیده است. هرگاه این تغییر در یک مکان رمز کننده ژنومی رخ دهد و باعث تغییر در عملکرد آن مکان ژنی گردد، بسته به اهمیت مکان ژنی که دچار جهش شده است، عوارضی همچون نقص یا مرگ موجود را در پی خواهد داشت. با این حال، چنین تغییری ممکن است به دلیل وقوع در منطقه غیر رمزکننده ژنوم و یا در صورتی‌که باعث از بین رفتن عمل فراورده ژن نگردد، در مناطق رمز کننده ژنوم حفظ شود. این پدیده در جمعیت‌های مختلف موجودات و از جمله گیاهان در طی تکامل بارها رخ داده و اساس چند شکلی تک‌نوکلئوتیدی در جمعیت‌های مختلف موجودات است (Syvanen, 2001).

یکی از روش‌های شناسایی جهش‌های تک‌نوکلنوتیدی روش‌های مبتنی بر واکنش‌های آنزیمی است که از جمله پرکاربردترین آن‌ها روش هضم آنزیمی DNA هترودوپلکس می‌باشد.

روش هضم آنزیمی DNA هترودوپلکس، یکی از متداول‌ترین روش‌های مورد استفاده در شناسایی جهش‌های نقطه‌ای در

قطعات ژنومی است. در حال حاضر، محققان از این روش برای تشخیص جهش‌های تک نوکلئوتیدی و درج و حذف‌های کوچک در جنبه های مختلف بیولوژی مولکولی و ژنتیک پزشکی شامل توصیف آلل‌های جهش یافته مرتبط با بیماری‌های لاعلاج نظیر سرطان (Vogiatzakis *et al.*, 2007)، تفسیر وقایع مولکولی عامل ناهنجاری‌های ژنتیکی (Shi *et al.*, 2007)، شناسایی ژن‌های کنترل کننده صفات، اصلاح مبتنی بر نشانگرهای مولکولی (Brady and Provart, 2007) تعیین تنوع ژنتیکی و مطالعات فیلوژنتیکی (Comai *et al.*, 2004; Sokurenko *et al.*, 2001) و پروژه های TILLING استفاده می‌نمایند (Comai and Henikoff, 2006). اساس استفاده از این روش به کارگیری نوکلئازهای اختصاصی تک رشته DNA می‌باشد.

۱-۱ نوکلئازهای اختصاصی DNA تک‌رشته‌ای

نوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته آنزیم های چندکاره ای هستند که در تمام موجودات زنده وجود دارند. توانایی عملکرد اختصاصی این آنزیم ها بر روی اسیدهای نوکلئیک تک رشته ای و همچنین مناطق تک‌رشته ای در اسیدهای نوکلئیک دورشته ای منجر به کاربرد گسترده آن‌ها در تحقیقات مرتبط با اسیدهای نوکلئیک شده است.

نوکلئازها با اسیدهای نوکلئیک وارد واکنش شده و پیوندهای فسفودی‌استر را هیدرولیز می‌نمایند. بعضی از آنزیم های نوکلئاز در داخل سلول و برخی دیگر در خارج از سلول و در فضای بین سلولی یافت می‌شوند. در داخل سلول این آنزیم ها نقش‌های مهمی را در فرایندهای نوترکیبی، همانندسازی، هضم آنزیمی و ترمیم DNA ایفا می‌نمایند. انواع خارج سلولی نیز با هضم DNA آزاد، نوکلئوتیدهای آزاد شده را به چرخه سوخت و ساز سلولی وارد می‌کنند. انواع بسیار مختلفی از آنزیم های نوکلئاز

در سیستم‌های زنده شناسایی شده‌اند که براساس خصوصیاتی از قبیل هیدرولیز DNA یا RNA، فعالیت اگزونوکلئازی یا اندونوکلئازی، جهت هضم مولکول اسید نوکلئیک، ماهیت پیوند هیدرولیز شده، و عمل اختصاصی بر روی مولکول تک‌رشته‌ای یا دو رشته‌ای، گروه‌بندی می‌شوند (Marti and Fleck, 2004 Desai and Shankar, 2003;).

نوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته که به نوکلئازهای خانواده SI نیز معروف می‌باشند، بطور اختصاصی مولکول‌های اسید نوکلئیک تک‌رشته‌ای و همچنین نواحی تک‌رشته‌ای موضعی در مولکول‌های دو رشته‌ای را هدف قرار می‌دهند (Shishido and Ando, 1985). این نوکلئازها از منابع بسیار متعددی شامل میکروارگانیزم‌ها، گیاهان و جانوران جداسازی شده‌اند. بسیاری از این آنزیم‌ها داخل سلولی بوده و تعداد قابل توجهی از آن ها نیز نظیر نوکلئاز SI از *Aspergillus oryzae* (Vogt, 1980)، نوکلئاز PI از *Penicillium citrinum* (Fujimoto *et al.*, 1974)، نوکلئاز مانگبین از گیاه *Vigna radiate* (Laskowski, 1980)، و نوکلئاز CEL I و CEL II از گیاه کرفس (Oleykowski *et al.*, 1998)، خارج سلولی می‌باشند. در گیاهان، این نوکلئازها تقریباً از تمام اندامک‌های سلولی جداسازی شده‌اند. نوکلئازهای اختصاصی تک‌رشته منشاء گرفته از گیاهان نیز در دو گروه داخل سلولی و خارج سلولی قرار می‌گیرند. برخی خصوصیات مولکولی و کارکردی این نوکلئازها به قرار زیر است:

ـ pH ایزوالکتریک این نوکلئازها در محدوده ۱۰/۲ ـ ۴ قرار دارد. نوکلئازهای PI، SI، و BAL31 پروتئین‌های اسیدی با pH ایزوالکتریک ۴/۵ ، ۴/۳ و ۴/۲ می‌باشند، در حالی که نوکلئاز SP از اسفناج یک پروتئین بازی با pH ایزوالکتریک ۷/۷ است (Strickland *et al.*, 1991).

ـ تعداد قابل توجهی از این نوکلئازها از ماهیت گلیکوپروتئین برخوردارند و مقدار کربوهیدرات آن‌ها از ۲۹ ـ ۱۵ درصد وزن مولکول را شامل می‌شود.

ـ pH بهینه برای فعالیت نوکلئازی این آنزیم‌ها در محدوده ۹ـ ۴ قرار دارد که این موضوع برای فعالیت یک نوکلئاز، یک معیار بسیار مهم در تعیین پتانسیل آن آنزیم به عنوان یک ابزار اندازه گیری است. برخی از پرکاربردترین آنزیم‌های اختصاصی تک‌رشته نظیر نوکلئازهای SI، PI، و مانگ‌بین در محدوده pH اسیدی ۵ - ۴ از فعالیت مطلوب برخوردارند. pH بهینه اسیدی از دیدگاه کاربردی یک عدم مزیت محسوب می‌شود، زیرا pH پایین باعث دپوریناسیون قابل ملاحظه DNA می‌شود. در مقابل، بعضی از این آنزیم‌ها مانند نوکلئازی که از *Aspergillus sojae* استخراج می‌شود در محدوده pH بازی ۱۰ ـ ۹ از فعالیت مطلوب برخوردارند. بعضی آنزیم‌ها نظیر BAL31 نیز از pHهای بهینه مختلفی برای فعالیت هیدرولیزی DNA تک‌رشته و DNA دورشته برخودارند (Desai and Shankar, 2003).

ـ وزن مولکولی این نوکلئازها در محدوده ۱۴۰ ـ ۵/۵ کیلودالتون است. اما اغلب آن‌ها از وزن مولکولی ۸۵ ـ ۲۹ کیلودالتون برخوردارند. به عنوان مثال نوکلئازهای SI، PI، و مانگ‌بین به ترتیب از وزن مولکولی ۳۲، ۴۴ و ۳۹ کیلودالتون برخوردارند.

ـ ثبات گرمایی آن‌ها در حد متوسط بوده و دمای بهینه برای فعالیت آن‌ها در محدوده ۷۰ ـ ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دارد. وجود درصد بالایی از اسیدهای آمینه آبدوست، نقش اصلی را در ثبات گرمایی این نوکلئازها ایفا می‌نمایند.