جایگزینی ژنِ نشانه‌گیری شده

«قسمت دوم»

ترجمه:
دکتر محمدرضا نوری دلویی -
آذین نوروزی

مقدمه (خلاصه قسمت اول):

ژنوم یا دستورالعمل خارق‌العاده آدمی در بردارنده اکثر خصوصیات فیزیکی و بسیاری از ویژگیهای رفتاری هر فرد بوده که جایگاه تک تک افراد را در میان آدمیان متمایز می‌سازد. این برنامه کار در انسان (و موش) دارای ۳ میلیارد نوکلئوتید است.

فرایند یا روشی که توسط آن (و برای یافتن پاسخ به سئوالهای دقیقی که در مورد عمل یا اعمال ژن مطرح است) یک سری تغییرات کنترل شده و اختصاصی در درون ردیف نوکلئوتیدی یک ژن دلبخواه (انتخاب شده) صورت می‌گیرد، نشانه‌گیری ژنی نامیده می‌شود. با این روش می‌توان در پستانداران بصیرتها و اطلاعات ارزشمندی پیرامون مکانیسمهای مسئول اعمال پیچیده و برنامه‌های مولکولی که فرایندهایی مانند رشد، توسعه، تمایز و تکوین و یا پس از مراحل تکوین را تحت سلطه خود دارند، به دست آورد. از جمله با ایجاد جهش خاص در ژن و تغییر در عمل (یا اعمال) آن می‌تواند، از نقش ژن یا ژنهایی که از آن اطلاعی در دست نیست، آگاهیهای جدید، دقیق و سودمندی به دست آورد.

از آنجا که حدود ۹۹ درصد یا حتی بیشتر ژنهای موجود در موش با انسان یکسان بوده و اعمال کاملاً مشابهی انجام می‌دهند، بیشتر نتایجی که از تجارب نشانه‌گیری ژنی در موش فراهم آمده است، می‌تواند برای انسان مفید باشد. در واقع، توانایی پژوهشگران در ایجاد هرنوع جهش مورد نظر در هر ژن شناخته شده روی حیوانات الگو (مانند موش)، مطالعه زیست شناسی ملکولی پستانداران را دچار تحول اساسی کرده است.

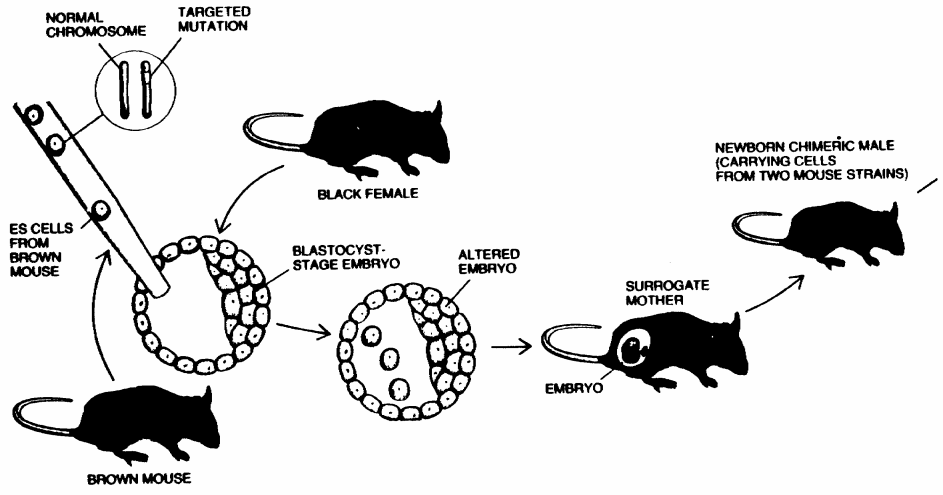
استفاده از این تکنولوژی روشن نموده است که نه تنها می‌توان از چگونگی مراحل توسعه و تکوین جنین انسان نیز پرده برداشت بلکه راههای شکل‌گیری سیستم ایمنی و مبارزه با عفونت را هم آموخت.

روش نشانه‌گیری ژنی می‌تواند اسراری مانند چگونگی عمل مغز در انسان، فرایند پیچیده یادگیری و همچنین نحوه پیدایش بیماری توسط نواقص ژنی را در سطح ملکولی

به طور دقیق تبیین و تفسیر کند. برای حصول به هدف اخیر، هم اکنون الگوی موش واجد اختلالات فراوان انسانی مانند فیبروکیستیک، سرطان و تصلب شرائین - عامل اصلی سکته و حمله‌های قلبی - در دست بررسی دقیق است. از سال ۱۹۸۹ تاکنون بیش از ۲۵۰ سویه موش حامل نواقص انتخاب شده ژنتیکی تولید شده و پژوهشهای بعمل آمده بصیرتهای گرانبهایی را به بار داده است.

پژوهشهای فزاینده پیرامون روش نشانه‌گیری ژنی، گسترش دانش حاصل از طرح ژنوم (Genome Project) را تضمین می‌کند. هدف طرح عظیم ژنوم که به تعبیر بسیاری از دانشمندان علوم زیستی بزرگترین پروژه زیست شناشی ملکولی قرن حاضر به حساب می‌آید، تعیین ردیف کامل نوکلئوتیدی تمام ژنهای موجود در ژنومهای موش و انسان (حدود ۲۰۰ هزار ژن در هر کدام) است که علیرغم پیشرفتهای شگرف کنونی، هنوز از وظایف و اعمال درصد اندکی از این ژنها، باخبریم. طبیعتاً، اطلاعاتی که در این خصوص تا پایان قرن میلادی حاضر ارائه خواهد شد، چهره پزشکی را به نحوی خیره کننده و اساسی دگرگون خواهد نمود. در آینده نزدیک مطالعه تعداد زیادی از بیماریهایی که به دلایل علمی و فنی، هنوز انسان نتوانسته است به پژوهش پیرامون آن بپردازد توسط روش نشانه‌گیری ژنی امکانپذیر خواهد بود بویژه که بیش از ۵۰۰۰ بیماری و اختلال انسانی به نواقص ژنتیکی نسبت داده می‌شوند. با

مراحل انجام روش جایگزینی ژن نشانه‌گیری شده در موش:

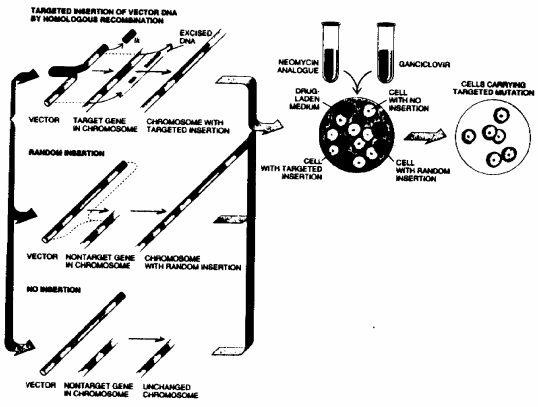


شناسایی ژنها و جهشهای مربوط به بیماریهای ژنتیکی در انسان، پژوهشگران قادر هستند دقیقاً همان جهشها را در موش ایجاد کنند و در نتیجه، الگوهای موشی می‌توانند پیگیری دقیق جزئیات حوادثی را که از اختلال در عمل یک ژن تا ظهور یک بیماری را رهبری می‌کند، ممکن سازد. با شناسایی عمل (یا اعمال) یکایک ژنهای موجود در ژنوم آدمی، در امر حیاتی پیشگیری، درمان و از بین بردن اساسی معلولیتهایی که پایه ژنتیکی دارند، قدمهای بلندی برداشته خواهد شد. مسلم است که فهم عمیق‌تر آسیب‌شناسی ملکولی یک بیماری باید بتواند ابداع درمانهای مؤثر را ممکن سازد.

ژن درمانی یا درمان ژنتیکی با اصلاح ژن، روش نوینی در مباره با بیماریهای ژنتیکی و توارثی است که اولین آزمایش آن روی یک دختربچه چهارساله که مبتلا به نقص آنزیمی ارثی بود، در سال ۱۹۹۰ با موفقیت انجام شد. این روش، به عنوان تحولی بی‌سابقه، همراه با کشفهای مشابه دیگر، سیمای دانش پزشکی را به گونه‌ای بنیادین دگرگون ساخته است. ژن درمانی در بسیاری از قلمروها سرانجام یک روش تکمیلی درمانی یا حتی جایگزین برای دارو درمانی خواهد بود، و می‌توان انتظار داشت که در یک دوره طولانی‌تر، روشی عمده و اصلی در پزشکی به حساب آید. یقیناً روش نشانه‌گیری ژنی نیز بعد تازه‌ای به ژن درمانی بخشیده است.

در آینده‌ای نزدیک روش نشانه‌گیری ژنی، درک پژوهشگران را در خصوص اعمال ژنها (و از جمله آنزیمها) به طور همه جانبه افزایش خواهد داد. این روش در مسیر مطالعه ژنتیک پستانداران و اینکه چگونه با میانجیگری ژنها، فرآیندهای متنوع زیستی انجام می‌یابند، راه جدیدی را پیش روی پژوهشگران نهاده است. بویژه وقتی به عدم موفقیت قابل توجه روشهای کلاسیک ژنتیک برای مطالعه موجودات پیچیده‌ای مانند پستانداران توجه کنیم، روش نشانه‌گیری ژنی ضرورت و اهمیت مضاعف می‌یابد.

نوری دلویی



ژنهای Homeotic:

نویسنده مقاله در آزمایشگاه خود، اعمال ژنهای homeotic یا به اختصار Hox را مورد مطالعه و جستجو قرار می‌دهد. این ژنها با عمل خود بعنوان کلیدهای اصلی، استقرار در محل مناسب و نیز شکل‌گیری صحیح قسمتهای مختلف بدن مانند دستها و پاها، اندامها و قسمتهای سر را تضمین می‌کنند. مطالعه ژنهای homeotic در مگس سرکه، شواهد مهمی در مورد فعالیتهای آنها ارائه کرده است. برای مثال، مگس سرکه ملانوگاستر تنها هشت ژن Hox دارد در حالی که موش و انسان هر کدام ۳۸ عدد از این ژن را دارا هستند. تصور بر آن است که بسط و توسعه خانواده Hox، از طریق تأمین سیستم اضافی مورد نیاز برای یک بدن پیچیده‌تر، در روند پیشرفت تکامل زیستی غیرمهره‌داران به مهره‌داران نقش مهمی ایفا کرده است. این سؤال مطرح است که نقش دقیق این ۳۸ ژن چیست؟

قبل از اینکه روش نشانه‌گیری ژنی قابلیت اجرایی پیدا کند، هیچ راهی برای پاسخ به این گونه سؤالات وجود نداشت. دلیل این امر روشن بود زیرا هیچ پژوهشگری موش یا انسانی را نمی‌شناخت که در یکی از ۳۸ ژن Hox خود دارای جهش باشد. نویسنده مقاله و همکاران او هم اینک تلاشی سیستماتیک را برای تعیین فعالیت و عمل تک تک ژنهای Hox آغاز کرده‌اند. پس از این مرحله از پژوهش آنان سعی خواهند کرد برای این سوال مهم نیز پاسخی بیابند که چگونه این ژنها شبکه‌ای مرتبط به‌هم(برهم کنش ور) را به منظور رهبری شکل‌گیری بدن آدمی، سازماندهی می‌کنند؟

برخی از نتایج اولیه پژوهشهای بالا نشان دهنده آن است که اختلال و گسیختگی در ژن HoxA-3 به نواقص متعدد منجر می‌شود. موشهایی که از ژن مورد بحث دو نسخه جهش یافته‌راداراهستنددر اثراختلالات قلبی - عروقی که حاصل رشد نارس و غیرکامل قلب و رگهای خونی است، به هنگام تولد می‌میرند. وجود انحرافات فراوان در بافتهای دیگر، شامل تیموس و پاراتیروئید، غده تیروئید، استخوان و غضروفِ قسمت تحتانی سر و بافت همبند، عضله و غضروف گلو از دیگر فنوتیپها و خصوصیات این موشها به هنگام تولد است.

علی‌رغم تنوع ناهنجاریهای بالا، همگی یک وجه اشتراک عجیبی را نشان می‌دهند: بافتهای واجد فنوتیپ غیرطبیعی، همگی از سلولهایی که در ابتدا در یک منطقهٔ باریک واقع در قسمت فوقانی جنین در حال تکوین متمرکز شده بودند، منشا گرفته‌اند. برای مثال، سلولهای اولیه قلب، قبل از اینکه این عضو محل خلفی‌تر خود را در قفسه سینه بدست بیاورد، در این قسمت قرار دارند. بنابراین، چنین به نظر می‌رسد که وظیفه ژن HoxA-3، نظارت بر ساخته شدن بافتها و اندامهای زیادی است که از این منطقه باریک منشا گرفته‌اند.

به طرز دور از انتظار، اختلال ایجاد شده از طریق تخریب یا غیرفعال کردن ژن HoxA-3 موش که شرح آن در بالا ذکر شد، درست مانند فنوتیپی است که در اثر یک بیماری ارثی انسان

معروف به سندروم دی ژورژ ظاهر می‌شود. تجزیه و تحلیل کروموزومی مبتلایان به این سندروم نشان می‌دهد که ژن HoxA-3 آنان طبیعی است. در واقع، اختلال ژنتیکی در کروموزومی دیگر، غیر از کروموزومی که ژن HoxA-3 مسئول این سندروم با تداخل با فرایند فعال شدن ژن HoxA-3 یا از راه مداخله با حوادثی که توسط ژن HoxA-3 تحریک و القا می‌شوند، نقش خود را ایفا می‌کند. همچنین، هم اینک یک مدل موش از این بیماری در دسترس بوده و ممکن است در نهایت اطلاعاتی را در مورد درمان این سندروم ارائه کند. این یافته غیر منتظره اما ارزشمند، بار دیگر اهمیت پژوهشهای علوم پایه را مورد تائید قرار می‌دهد: یافته‌هایی که از روی کنجکاوی پژوهشگران متولد می‌شوند، اغلب به کاربردهای بسیار عملی - سودمند - منجر می‌گردند.

مانند زیست‌شناسان تکوینی، ایمتی‌شناسان نیز از روش نشانه‌گیری ژنی بهره برده‌اند. آنها اکنون، این فن را برای آشکار ساختن وظایف هریک از حدود بیش از ۵۰ ژن که مراحل توسعه و عمل دو گروه سلولهای دفاعی بسیار مهم بدن، سلولهای T و B، را تحت تاثیر قرار می‌دهند، بکار گرفته‌اند.

سرطان شناسان نیز در مورد فن نشانه‌گیری ژنی - و کاربردهای آن - در تب و تاب به سر می‌برند. اغلب مواقع این پژوهشگران می‌دانند که وقوع جهش در یک ژن ویژه و در یک یا چند نوع تومور امری متداول است. اما آنها از عمل طبیعی این ژن چیزی نمی‌دانند. کشف این نقش با استفاده از تکنولوژی تخریب یا غیرفعال سازی ژن مورد نظر می‌تواند از چگونگی ایجاد بدخیمی توسط شکل جهش یافته ژن در سطح وسیعی پرده‌برداری می‌کند.

ژن بازدارنده (مهارکننده) تومور p53 یک مورد را از آنچه اشاره شد، ارائه می‌کند. ژنهای بازدارنده تومور به ژنهایی اطلاق می‌شود که شکل غیرطبیعی (جهش یافته) آنها در پیدایش و گسترش سرطان نقش دارد. شاید در ۸۰ درصد همه سرطانهای انسان جهشهای ژن p53 نشان می‌دهد که محصول این ژن در وضعیت طبیعی احتمالاً بعنوان یک محافظ و نگهبان عمل می‌کند. یعنی تا زمانی که سلولهای سالم هر نوع DNA معیوب و صدمه دیده را که در آنها وجود دارد تعمیر و مرمت نکنند، از تقسیم آنها جلوگیری می‌کند. چنین صدمه‌ای اغلب در سلولها نتیجه حمله‌های مکرر عوامل محیطی است که موجود در معرض آنها قرار می‌گیرند. از دست دادن ژنهای p53 فعال (طبیعی)، این نقش حفاظتی را از بین برده و اجازه می‌دهد DNA صدمه دیده به سلولهای دختر انتقال یافته و در تشکیل سرطانها شرکت کند.

در آینده مطالعه تعداد زیادی از بیماریهای دیگر نیز توسط روش نشانه‌گیری ژنی امکانپذیر خواهد بود. بیش از ۵۰۰۰ بیماری انسانی به نواقص ژنتیکی نسبت داده می‌شوند. با شناسایی ژنها و جهشهای مربوط به بیماریهای ژنتیکی، پژوهشگران می‌توانند

دقیقاً همان جهشها را در موش ایجاد کنند. الگوهای موشی می‌توانند پی‌گیری دقیق جزئیات حوادثی را که از اختلال در عمل یک ژن تا ظهور یک بیماری را رهبری می‌کنند، ممکن سازند. فهم عمیقتر آسیب‌شناسی ملکولی یک بیماری، باید بتواند ابداع درمانهای مؤثر را ممکن سازد. از میان مدلهایی که هم اکنون با ایجاد دستکاری ژنتیکی، در حال تولید هستند، موشهایی می‌باشند که در ژن مربوط به فیبروزکیستیک جهشهای مختلفی دارند.

مطالعات پیرامون بیماری تصلب شرائین، که عامل اصلی سکته‌ها و حمله‌های قلبی است، نیز در حال بهره‌گیری از روش نشانه‌گیری ژنی است. برعکسِ فیبروزکیستیک، تصلب شرائین توسط جهشهایی در یک ژن منفرد ایجاد نمی‌شود، بلکه نقص در تعدادی ژن همراه با نقش عوامل محیطی، تولید پلاک را در شریانها تحریک می‌کند. با این وجود، الگوهای موشی امیدبخشی توسط تغییر ژنهایی که در فرآیند تری‌گلیسریدها و کلسترول دخالت دارند نیز تهیه شده است. همچنین، هم‌اینک ژنهای ظاهراً مسئول در (پیدایش و) توسعه فشار خون در حال شناسایی هستند، نویسنده مقاله پیش‌بینی می‌کند که برای این بیماری نیز، مدلهای موشی جهت استفاده از روش نشانه‌گیری ژنی تولید خواهند شد.

با افزایش آگاهی و شناخت از سهم ژنتیک در پیدایش بیماریها، تمایل و رغبت پژوهشگران به تصحیح کردن این نواقص توسط ژن درمانی نیز افزایش خواهد یافت.

در حال حاضر، روشهای ژن درمانی بر ادغام تصادفی ژنهای سالم به درون کروموزومها به منظور جبران نقص نسخهٔ صدمه دیده استوار است. اما - چنانچه قابل انتظار نیز هست - تاثیرگذاری ژن ادغام شده اغلب به اندازه‌ای که در موضع اصلی خود در کروموزوم قرار دارد، نمی‌باشد. در اصل، نشانه‌گیری ژنی می‌تواند راه حلی برای این مشکل ارائه کند. اما قبل از اینکه بتوان از آن برای تصحیح ژن معیوب در بافت بیمار استفاده کرد، پژوهشگران ممکن است نیازمند آن باشند که کشتهایی از سلولهای قادر به شرکت در تشکیل آن بافت در بزرگسالان را بوجود آورند. این گونه سلولها، که مانند سلولهای ES مطالعات مورد بحث این مقاله، سلولهای بنیادین مغز استخوان نامیده می‌شوند، در مغز استخوان، کبد، ششها، پوست، روده‌ها و سایر بافتها وجود دارند. اما، پژوهش در مورد راههای جداسازی و کشت این سلولها هنوز دوران طفولیت خود را می‌گذارند.

قبل از اینکه پژوهشگران بر مشکلات فنی برای کاربرد وسیع روشهای ذکر شده در این مقاله در امر ژن درمانی فائق آیند، نشانه‌گیری ژنی کاربرد متداولی در مطالعه زیست شناسی عصب پستانداران پیدا خواهد کرد. پیش از این، موشهایی که جهشهای نشانه‌گیری شده‌ای قدرت یادگیری آنها را تغییر داده باشد، تولید شده‌اند. با افزایش شناسایی تعداد ژنهای ویژه عصبی، سرعت پژوهش در این زمینه نیز

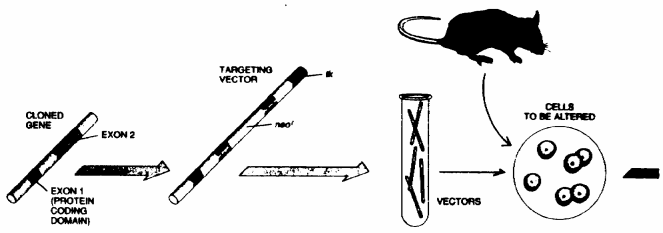
مطمئناً تشدید خواهد یافت.

پیشرفتهای بیشتری در تکنولوژی نشانه‌گیری ژنی انتظار می‌رود. اما تابحال نیز این روش، فرصتهای ارزشمندی برای دستکاری و تغییر ژنوم پستانداران به روشهای گوناگون بوجود آورده است که حتی چند سال پیش غیرقابل تصور بود. برای مساعدت و کمک قابل توجه به روشن شدن مکانیسمهای مسئول فرآیندهای پیچیده‌ای مانند مراحل رشد و تکوین و یادگیری در پستانداران، پژوهشگران باید از هر ذره از هوش - خدادادی - خود حداکثر استفاده ر ا بعمل آورند و بدقت تصمیم گیرند که چه ژنهایی را تغییر داده و آنها را طوری مورد جرح و تعدیل قرار دهند که پاسخهای پرباری به همراه داشته باشد. نشانه‌گیری ژنی طیف وسیعی از امکانات را برای دستکاریهای ژنتیکی باز می‌کند که محدودیتهای آن را تنها حدود خلاقیتهای مجموع تصورات و اندیشه‌های انسان تعیین خواهد کرد.

۱- تهیه ناقل نشانه‌گیری (نوار طویل) با ایجاد تغییر در نسخه‌هایی از ژن مورد نظر (اولین نوار سمت چپ) در لوله آزمایش ژنهای نشان داده شده در شکل، با وارد ساختن ژن Neo^r به یک منطقه رمز کننده یک پروتئین غیرفعال شده‌اند. ژن Neo^r در مراحل بعدی به عنوان یک نشانگر (marker) عمل خواهد کرد تا نشان دهد که DNA ناقل در کروموزوم وارد شده است. ناقل همچنین به نحوی دستکاری شده است که یک نشانگر دوم (ژن tk تب خال) را نیز در یک انتهای خود داشته باشد. نشانگرهای ذکر شده استاندارد می‌باشند. اما

موش تازه متولد شده (بالا، چپ) دارای جهش نشانه‌گیری شده در هر دو نسخه از یک ژن بنام HoxA-3 می‌باشد. در نتیجه، بدن آن نسبت به نوزاد طبیعی (دومین تصویر از طرف چپ) انحنای بیشتری دارد. مطالعه نمونه‌های بافتی از موش جهش یافته (وسط، راسط) و موش طبیعی (راست) نشان می‌دهد که چنین جهش یافته‌هایی همچنین فاقد تیموس بوده و غده تیروئید بسیار کوچکی دارند. این مشاهدات و سایر اختلالات نشان می‌دهد که ژن HoxA-3 برای تکوین بافتها و اندامهایی که از نوار باریکی از سلولها که در جنینهای جوان وجود دارد (نوار سیاه شده در شکل نقاشی شده)، منشا می‌گیرند، ضروری است.

مراحل انجام روش جایگزینی ژنِ نشانه‌گیری شده در سلولهای کشت شده:



نشانگرهای دیگر نیز می‌توانند استفاده شوند.

۲- وارد کردن ناقل کامل شده واجد دو نشانگر به درون سلولهای جدا شده از یک جنین موش.

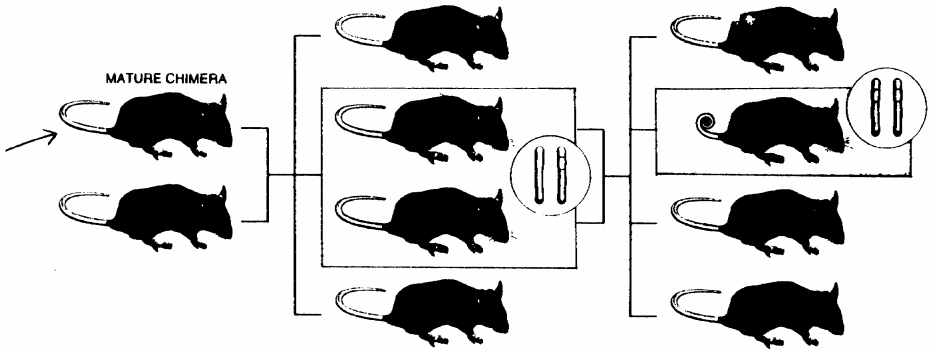
۳- رخ دادن نوترکیبی هم شناخت مشروط به انجام درست همه مراحل ذکر شده (بالا): ناقل پهلو به پهلوی ژن طبیعی (هدف) روی یک کروموزوم در یک سلول، به نحوی که مناطق یکسان در یک خط و در طول هم باشند، قرار می‌گیرد. سپس این مناطق روی ناقل (همراه با DNAای که بین آنها واقع است) به استثنای نشانگر موجود در انتها، با ژن اصلی جایگزین می‌شود. لازم به ذکر است که در تعداد زیادی از سلولها، ناقل کامل (همراه با نشانگر دوم) یا به طور تصادفی خود را در یک کروموزوم جای می‌دهد (وسط) یا مرکز در کروموزوم وارد نمی‌شود (پایین).

۴- برای جداسازی سلولهای حامل جهش نشانه‌گیری شده، همه سلولها در یک محیط حاوی داروهای انتخاب شده که در این شکل یک مشابه نئومایسین (G418) و همچنین گانسیکلویر می‌باشد، قرار می‌گیرند. G418 برای سلولها کشنده است مگر اینکه حامل یک ژن Neo^r فعال باشند، بنابراین، سلولهایی را که هیچ ادغامی از DNA ناقل نداشته باشند از بین می‌برد. در عین حال، گانسیکلویر هر سلولی را که حاوی ژن tk باشد می‌کشد، از این رو سلولهایی را که ناقل به صورت تصادفی وارد آنها شده است، حذف می‌کند. در نتیجه، تنها سلولهایی که زنده مانده و تکثیر می‌یابند در واقع آنهایی هستند که ادغام نشانه‌گیری شده را دارا باشند.

۱- استخراج سلولهای معروف به سلولهای بنیادی مغز استخوان جنینی (ES) از یک سویه قهوه‌ای موش و ایجاد تغییر در آنها (توسط فرایند توصیف شده در شکل قبل) به طرزی که در یکی از کروموزومها (inset) یک جهش نشانه‌گیری شده را حمل نمایند. سلولهای ES، سپس، به داخل جنینهای جوان که یک نمونه از آنها در شکل نشان داده شده است، وارد می‌شوند. پژوهشگران تمایل دارند از رنگ پوست بدن نوزادان آینده، به عنوان یک راهنما برای تشخیص اینکه آیا سلولهای ES در داخل جنین به حیات خود ادامه داده‌اند یا خیر، استفاده کنند. بنابراین، آنها معمولاً سلولهای ES را به داخل جنینهایی وارد می‌سازند که در

فقدان این سلولها پوستی کاملاً سیاه رنگ بدست می‌آورند. چنین جنینهایی از سویه سیاه (پایین) و فاقد ژن آگوتی بدست می‌آیند. حضور ژن آگوتی در سلولها حتی به صورت یک نسخه منفرد، پوستی قهوه‌ای رنگ ایجاد می‌کند.

۲- جنینهای حاوی سلولهای ES، در مادران جانشین به بلوغ می‌رسند. سپس، از نظر رنگ پوست مورد آزمون قرار می‌گیرند. فنوتیپ موشهای قهوه‌ای رنگ مورد آزمون بیشتر قرار می‌گیرند. طبیعتاً اگر حیوان از اسپرم تولیدشده از سلولهای ES بوجود آمده باشد -که بنابراین شانس داشتن جهش انتخاب شده را داشته است - رنگ پوستش قهوه‌ای می‌شود. آزمون مستقیم ژنهای موشهای قهوه‌ای روشن می‌کند کدام یک از این حیوانات (درون مربع) جهش نشانه‌گیری شده را به ارث برده‌اند.



سایه‌های قهوه‌ای، با زمینه سیاه نشان دهنده آن است که سلولهای ES به حیات خود ادامه داده و در حیوان تکثیر پیدا کرده‌اند (چنین افرادی دورگه یا کایمرا نامیده می‌شوند زیرا سلولهایی دارند که از دو سویه مختلف موش مشتق شده‌اند). رنگ سیاه کامل، برعکس، بیانگر این خواهد بود که سلولهای ES از بین رفته‌اند.

۳- انجام آمیزش بین نرهای دورگه با ماده‌های سیاه رنگ (فاقد آگوتی) و بدنبال آن غربال (سوا) کردن نوزادان به منظور یافتن جهش نشانه‌گیری شده در ژن مورد نظر. سپس، موشهای سیاه رنگ حذف گردیده و

۴- آمیزش بین نرها و ماده‌های حامل جهش به منظور ایجاد موشهایی که در سلولهای خود دارای دو نسخه از ژن نشانه (Inset) واجد جهش انتخاب شده و بنابراین فاقد ژن فعال باشند. چنین حیواناتی (داخل مستطیل) توسط تجزیه و تحلیل مستقیم DNA آنها با اطمینان کامل، شناسایی می‌شوند، سپس برای یافتن ناهنجاریهای فیزیکی و رفتاری به طور دقیق مورد ارزیابی قرار می‌گیرند.

منابع:

Capecchi, M. Targeted Gene Replacement, Scientific Am., March; 34-41, 1994.