✿✿ بسم الله الرحمن الرحیم ✿✿

آزمایشگاه ژنتیک مولکولی

دو بخش در آزمایشگاه ژنتیک وجود دارد:

۱-بخش سیتوژنتیک

۲-بخش مولکولی

در این قسمت تصمیم داریم به بخش مولکولی بپردازیم.

ماده وراثتی چند منشا می تواند داشته باشد:

۱-باکتریوفاژ یا ویروسی

۲-پلازمید

۳-ژنومیک (مثل انسان، جانوران،باکتری)

*پلازمید ها عناصری هستند که در برخی از باکتری ها یا پروکاریوت های پست حضور دارند.

*ماده وراثتی در باکتریوفاژ ها می تواندDNA یا حتی در مواردیRNA نیز باشد.

*در آزمایشگاه ژنتیک ما معمولا با DNA ژنومیک سر و کار داریم ولی در آزمایشگاه های تحقیقاتی با هر سه یعنی ژنومیک،پلازمید و باکتریوفاژ سر و کار داریم.

*ژنومیک می تواند منشا باکتریایی داشته باشد و زمانی که قرار باشد DNA را از باکتری جدا کنیم، بایستی در ابتدا باکتری را در یک محیط کشت مناسب، کشت دهیم.

*محیط کشت میتواند دارای ترکیبات شناخته شده(مشخص یا معین) و ترکیبات ناشناخته شده(نا مشخص یا نا معین) باشد.

*محیط کشت شناخته شده مثل محیط کشت «m9 » و محیط کشت ناشناخته شده مثل محیط کشت« لوریابرتانی » که دارای ترکیبات نامشخص و ناشناخته است.

چه زمانی از محیط کشت معین و چه زمانی از محیط کشت نامعین استفاده می کنیم؟

اگر قرار باشد رشد باکتری کنترل شده انجام گیرد بهتر است از محیط کشت معین استفاده کنیم ولی در صورتی که تنها هدف ما استخراج DNA باشد دیگر نیازی به استفاده از محیط کشت معین نیست و می توانیم از محیط کشت نامعین استفاده کنیم.

*هر باکتری دارای یک دمای مشخص است و معمولا باکتری ها بین دمای 35 تا 38 درجه رشد مناسبی دارند.

اگر قرار باشد باکتری رشد مناسب داشته باشد و تقسیم شود بایستی اکسیژن رسانی داشته باشد.

به همین خاطر ما از انکوباتور های شیکردار استفاده می کنیم و این باعث میشود تا هوا دهی برای باکتری مناسب باشد.

در صورتی که هوا دهی و محیط کشت مناسب باشد باکتری E.Coli در هر 20دقیقه یکبار همانندسازی می کند.

2بار،4بار،8بار،16بار و....

اگر قرار باشد ما از باکتری استفاده کنیم باید به یک مقداری رسیده باشد و بعد از آن استفاده کنیم .حدوداً به مقداری برابر با 2تا3×10 به توان 9 سلول

و چون نمی توانیم تعداد باکتری ها را با چشم شناسایی کنیم از دستگاه اسپکتروفتومتری استفاده می کنیم.

در صورتی که از محیط کشت لوریابرتانی استفاده کرده باشید ، هر یک جذب نوری که دستگاه به ما می دهد معادل 0.8×10 به توان 9 سلول می باشد که با استفاده از تناسب می توانیم به جواب برسیم.

زمانی که عدد جذب نور 3 باشد خوب است و در این زمان نی توانیم استخراج را انجام دهیم.

راحت ترین و در دسترس ترین روش برای جداسازی استفاده از سانتریفیوژ است.

بعضی ها بر این باورند که دور 8000/ 3 دقیقه یا دور 1000 /10 دقیقه مناسب است ولی بسته به نوع کاری که می خواهیم انجام دهیم متفاوت است.

نکته: بهتر است **دور سانتریفیوژ کم** و **زمان بیشتری** به آن بدهیم تا **آسیب کمتری** به سلول برسد.

زمانی که سانتریفیوژ می کنیم باکتری ها رسوب می کنند در این مرحله می خواهیم DNA باکتری را از داخل سیتوپلاسم جدا کنیم. پس بایستی دیواره را تخریب کرده و ماده وراثتی را استخراج کنیم.

*** دو راه برای از بین بردن دیواره وجود دارد:**

۱- روش فیزیکی

۲- روش شیمیایی

راه فیزیکی با روش مکانیکی مثلا فرض کنید نمونه را در دمای **ازت مایع**(۱۹۶-) قرار داده و بعد وارد دمای محیط می کنیم.همین سرما و گرما سبب لیز سلول میشود.

نکته: به خاطر در دسترس نبودن ازت از روش های شیمیایی استفاده می کنیم.

نکته: بسته به نوع باکتری(گرم مثبت یا گرم منفی) از مواد مختلف استفاده می کنیم.

برای مثال در باکتری E.Coli از مخلوط دو ماده لیزوزیم یا EDTA (**ماده ضد انعقاد**) استفاده می کنیم.

در صورتی که هیچکدوم رو نداشتید می توانید از سفیده تخم مرغ😐😐😐😐😐😐😐، اشک چشم و یا بزاق استفاده کنید.

زمانی که دیواره از بین رفت، ماده وراثتی بیرون ریخته میشود که بایستی محافظت شود. EDTA کار حفاظت را انجام میدهد و نمی گذارد آنزیم های موجود در سلول آن را تخریب کنند.

اما تنها نمی توان به لیزوزیم و EDTA اکتفا کرد چرا که در دیواره چربی نیز وجود دارد.

در صورتی که یک ماده شوینده (دترجنت) اضافه کنیم ، چربی موجود در غشا از بین میرود و سلول لیز میشود.

در مرحله بعد باید عصاره سلولی را تفکیک کنیم. برای جداسازی مواد می توانیم از سانتریفیوژ استفاده کنیم. که بقایای سلولی رسوب کرده و DNA/RNA/ protein روی محلول قرار می گیرند.

در مرحله بعد باید DNA را جداسازی کنیم . برای جداسازی می توانیم از کروماتوگرافی (chromatography) یا RNA eas (که RNA را از بین میبرد) یا پروتئین آز کا(که پروتئین را از بین میبرد) استفاده کنیم.

اما چون RNA eas و کروماتوگرافی در دسترس نیستند از یکسری ترکیبات دیگر برای جداسازیDNA/RNA/Protein استفاده می کنیم.

«استخراجDNA»

یک روش این هست که فنل و کلروفرم را به نسبت 1:1 استفاده کرده و سانتریفیوژ می کنیم تا پروتئین ها رسوب دهد. حالا محلول ما حاوی DNA & RNA می باشد.

خود فنل کمک میکند تا RNA از DNA جدا شود ولی بطور کامل این اتفاق نمی‌افتد.

در صورتی که بخواهیم RNA را به طور کامل از بین ببریم حتما بایستی از RNA زیاد با نوکلئاز استفاده کنیم تا RNA بطور کامل از بین رود.

می توانیم از اتانول سرد (۲۰-) به همراه استات سدیم نیز استفاده کنیم تا DNA رسوب کند.

✿✿✿✿✿✿✿✿✿✿

#جلسه بعد

سنتز CDNA یا complementary DNA یا DNA مکمل

اگر قرار باشد که در آزمایشگاه با استفاده از RNA تکثیر یا واکنش زنجیره‌ای پلیمراز را انجام دهیم به هیچ عنوان نمی توانیم کار را انجام دهیم.

چرا که در واکنش PCR یا polymerase chain reaction حتماً باید الگو از جنس DNA باشد.

در نتیجه وقتی RNA در اختیار داریم نمی توانیم استفاده کنیم، پس چه کار کنیم؟

می توانیم در آزمایشگاه این RNA را تبدیل به DNA کنیم.

به DNA ای که از روی RNA ساخته میشه CDNA می گوییم و بعد از آن می توانیم در واکنش pcr استفاده کنیم .

برای این اتفاق، در آزمایشگاه از آنزیم ریورس ترنس کریپتاز یا RT استفاده می کنیم که معمولاً منشا ویروسی دارد مثل ویروس MLV,HIV, AAM

این آنزیم ریورس ترنس کریپتاز، رشته ی الگوی آن RNA است و از روی RNA، مولکولDNA می سازد.

قرار است در آزمایشگاه سنتز انجام شود و CDNA بسازیم به همین دلیل باید یک حالت بافری داشته باشیم پس بافر نیاز داریم و چون قرار است که DNA بسازیم به پیش سازها
ATP،وTTP،وCTPو،GTP نیاز داریم (نوکلئوتید ها) و پرایمر

می دانیم که برای همانندسازی احتیاج به پرایمر داریم که پرایمر در واکنش سنتز CDNA هجده تا نوکلئوتیدها تیمین یا توالی های شش نوکلئوتیدی مختلف که رندوم هگزامر (Random hexamer)گفته می شود و یا پرایمرهای اختصاصی هستند.

در واکنش سنتز CDNA سه نوع پرایمر داریم:

بسته به آن روشی که داریم انجام می دهیم به اینکه پرایمر الیگو دی تی(Oligo dT)استفاده میکنیم یا رندم هگزامر (Random hexamer)و یا پرایمرهای اختصاصی، پروسه ی فعالیت متفاوت می شود.

وقتی CDNA را ساختیم طی پروسه و پروتکلی که وجود دارد باید آنها را در منفی ۷۰ نگهداری کنیم تا در مرحله بعدی کار از آن استفاده کنیم.

✿✿✿✿✿✿✿✿✿✿✿

#جلسه بعد

پس از اینکه ما RNA یا DNA را جدا کردیم باید ببینیم این RNA یاDNA چقدر است (مقدار این ها با چشم قابل مشاهده نیست)

و یا خلوص آن چه میزان است است زیرا همراه DNA و RNA ممکن است انواع پروتئین یا موادی که از آنها استفاده کردیم در استخراج، وجود داشته باشد و یا چربی وجود داشته باشد.

برای مقدار RNA و DNA و همچنین خلوص می‌توانیم از اسپکتروفتومتر یا از نانو دراپ استفاده کنیم

اگر از اسپکتروفتومتر استفاده کنیم باید اولاً نمونه را با حلال (معمولاً آب مقطر دوبار تقطیری یا آب مقطر تزریقی) مخلوط میکنیم. مثلا ۱۰ میکرومتر از نمونه را با ۹۹۰ میکرومتر آب مقطر تزریقی مخلوط میکنیم و داخل کوت میریزیم و در داخل محفظه یا جایگاه آن اسپکتروفتومتر قرار می‌دهیم و در سه طول موج ۲۳۰ و ۲۶۰ و ۲۸۰ جذب نوری یا اپتیکال دنسیتی یا OD را می خوانیم.

ممکن است ما DNA دو رشته ای یا دابل استرند داشته باشیم یا اینکه تک رشته ای یا سینگل استرند داشته باشیم ممکن است الیگونوکلئوتید و یا RNA داشته باشیم.

برای اینکه مقدار را بخوانیم، اگر DNA دو رشته ای جدا کرده باشیم هر OD ای که دستگاه به ما داد ضرب در عدد ثابت ۵۰ ضرب در فاکتور رقت می کنیم.

اگر سینگل استرند بود هر OD که دستگاه به ما داد ضرب در عدد ۳۳ ضرب در فاکتور رقت میکنیم

و اگر اولیگونوکلئوتید بود عدد ۲۰ تا ۳۰ (فرقی نمی کند) بعضی می گویند ۲۵ را ضرب در OD دستگاه ضرب در فاکتور رقت میکنیم

و اگر RNA بود OD دستگاه ضرب در ۴۰ ضرب در فاکتور رقت می کنیم

این شد مقدار نمونه ای که استخراج کردیم

اما همراه نمونه ممکن است نا خالصی هم باشد این نا خالصی را دو دسته می کنیم یک دسته پروتئینی و یک دسته غیر پروتئینی

برای نا خالصی پروتئینی: جذب نوری ۲۶۰ را بر روی جذب نوری ۲۸۰ نانومتر تقسیم می‌کنیم که این دو عدد را دستگاه به می دهد.

اگر حاصل این عبارت بین ۸/۱ تا ۲ بود می‌گوییم که ناخالصی پروتئین ندارد ولی اگر حاصل این عبارت کمتر از ۸/۱ باشد، ناخالصی پروتئینی دارد.

برای اینکه ببینیم ناخالصی غیر پروتئینی وجود دارد یا خیر باید جذب نوری ۲۶۰ را بر جذب نوری ۲۳۰ نانومتر تقسیم کنیم اگر حاصل بین ۲ تا ۲/۲ باشد، نمونه استخراج شده آلودگی غیر پروتئینی ندارد و اگر کمتر از این مقدار بود ناخالصی غیر پروتئینی خواهد داشت.

و به این ترتیب مقدار DNA و RNA یا DNA تک رشته‌ای یا دو رشته‌ای یا الیگونوکلئوتید و همچنین مقدار ناخالصی را مشخص کنیم.

✿✿✿✿✿✿✿✿

#جلسه بعد

PCR

هدف از انجام pcr، تکثیر یک قطعه ی ژن از مجموعه ژنوم یک موجود هست. به عنوان مثال انسان حدود ۲۵۰۰۰ ژن دارد حالا میخواهیم یک ژن از این تعداد را pcr کنیم.

واکنش pcr الهام گرفته از روش همانند سازی در موجودات هست. برای اینکه همانند سازی اتفاق بیفتد باید ژنوم ماده وراثتی باشد و از روی اون همانند سازی انجام شود و در نهایت به سلول های دختری منتقل شود. ما هم در واکنش pcr به ماده وراثتی نیاز داریم . این ماده وراثتی در موجودات یا از جنس DNA یا RNA هست. ولی در pcr الگوی ما DNA هست. و اگر RNA داشته باشیم حتما باید قبل از انجام واکنش آن را به DNA تبدیل کنیم. در بدن موجودات برای اینکه همانند سازی انجام شود باید دو رشته DNA از هم باز شوند حالا آنزیم های مختلف همراه با عوامل فیزیکی موجب

می‌شوند که این اتفاق بیفتد اما ما در آزمایشگاه این آنزیم هارا در دسترس نداریم برای همین از حرارت یا سود ۴ نرمال استفاده میکنیم. که از حرارت حدود ۹۳ تا ۹۷ درجه استفاده میشود تا DNA ی دو رشته ای به تک رشته ای تبدیل بشود.

چون در pcr از حرارت استفاده میکنیم پس باید از آنزیم های مقاوم به حرارت استفاده بشود. امروزه از آنزیم تک پلیمراز برای این کار استفاده میشود که اپتیمم فعالیتش در دمای ۷۲ درجه هست.

این آنزیم ها برای اینکه کار بکنند به کوفاکتور نیاز دارند.

این فاکتور ها شامل یون های دوظرفیتی مثل منزیم دوبار مثبت هستند. که آنزیم تک پلیمراز هم به منیزیم نیاز دارد.

ما برای انجام واکنش کلرید منیزیم را به نمونه خود اضافه میکنیم تا آنزیم بتواند به درستی کار کند. علاوه بر این ها dNTPs هم باید به عنوان پیش ساخت اضافه کنیم. برای اینکه ژن مورد هدف خود را انتخاب کنیم با استفاده از نرم افزارها، پرایمرهارو میتوانیم طراحی کنیم که مخصوص ژن هدف باشد.

پرایمرها از جنس DNA هستند، بین ۱۵ تا ۳۰ نوکلئوتید طراحی میشوند و به طور میانگین بین ۱۹ تا ۲۰ نوکلئوتید سایز مناسب برای پرایمرهاست. پرایمر به ناحیه مکمل خودش متصل میشه بعد از اون آنزیم های همانند سازی کننده باید به قسمت ۳' OH پرایمر متصل شوند و از روی رشته الگو شروع کنن به ساخت.

اگر پرایمر نباشد آنزیم نمی‌تواند کار خود را انجام دهد. در حین انجام واکنش اگر از ترکیبات بافری استفاده نکنیم، تغییرات شدید PH خواهیم داشت که این تغییرات جلوی انجام واکنش رو می‌گیرند.

برای همین از بافر استفاده میکنیم. برای اینکه واکنش انجام شود به گرما هم نیاز داریم که اوایل از چندتا از بنماری استفاده میکردند، ولی امروزه از دستگاه ترموسایکلر استفاده میکنند که دما و زمان را برای ما فراهم میکند.

برای اینکه یک pcr نرمال اتفاق بیفتد باید ۷مرحله کاری و به دستگاه ترموسایکلر بدیم.

مرحله اول وا سرشت اولیه هست، که یعنی ژنوم کاملا تک رشته ای شود که مثلا برای انسان برای این کار ۳ تا ۵ دقیقه دمای ۹۵ درجه نیاز هست که کل ژنوم انسان تک رشته ای شوند.

هرچه درصد گوانین سیتوزین بیشتر باشه یا هرچه اندازه ژنوم بیشتر بشه زمان بیشتری برای این مرحله نیاز هست.

دومین مرحله وا سرشت ثانویه هست، که در آن محصول pcr تک رشته ای میشود. pcr های عادی حداکثر ۳۰۰۰ جفت باز میتوانند تکثیر پیدا کنند. که اگر بیشتر از این تعداد بشود بهش **long pcr** میگویند.

زمان مرحله دوم معمولا ۳۰ تا ۴۰ ثانیه هست .

مرحله سوم اتصال پرایمر هست که در این مرحله دما را پایین می آوریم تا پرایمر به مکمل خود متصل شود که این بهینه سازی میخواد . هر پرایمری دمای بهینه خاص خود را دارد. در مرحله بعدی دما را به ۷۲ درجه می رسانیم برای کار آنزیم تک پلیمراز که به آن مرحله سنتز میگن.

مرحله چهارم سنتز هست، بعد از اون وا سرشت اولیه و اتصال پرایمر و سنتز باید چندبار اتفاق بیفتد تا ما میلیون ها کپی از این ژن داشته باشیم.

تعداد سیکل معمولا ۲۸ تا ۴۰ تا هست. خب هرچی این سیکل میره بالاتر، کارایی آنزیم کم میشه در دمای ۹۳ و ۹۵ درجه کارایی آنزیم کم میشه.

بعد از این مراحل، مرحله سنتز نهایی آنزیم ناقصی های خود را اصلاح می‌کند. خب محصول pcr در آخر DNA هست که در دمای آزمایشگاه خراب میشه .

مرحله بعد نگهداری هست که دستگاه را در دمای ثابت مثلا ۱۰ تا ۲۵ درجه نگه داریم تا بیایم محصول را از دستگاه برداریم و ببریم به مرحله بعدی .

بعد از اتمام تمامی مراحل باید باید محصول را ببریم مرحله بعدی تا ببینیم واکنش درست انجام شده یا نه. بعد از انجام آزمایش نمونه را در فریزر میذاریم تا ۱سال می تواند برایمان بماند تا مرحله بعدی کار و انجام بدیم.

پس ۷ تا مرحله

۱_ واسرشت اولیه

۲_ واسرشت ثانویه

۳_ اتصال پرایمر

۴_ سنتز

۵_ تعداد سیکل

۶_ سنتز نهایی

۷_ نگهداری

✿✿✿✿✿✿

#جلسه بعد

الکتروفورز

در PCR قطعه ای از ژن را تکثیر کردیم ، و با چشم نمی‌تونیم ببینیم ، چون ازین قطعه های ژنی هست با ۴۵۳ جفت باز

از کجا باید بدونیم قطعه تجزیه پیدا کرد یا نکرد؟ یا ما DNA را جدا کردیم از کجابدونیم DNA داریم، یا RNA جدا کردیم از کجا بدونیم RNA داریم یا نه؟

چون با چشم معمولی که نمی‌توانیم ببینیم

یکی از روش هایی که میتوانیم محصول PCR رو ببینیم یا DNA یا RNA استخراج شده رو ببینیم، الکتروفورز است.

تعریف عامیانه الکتروفورز: جداسازی قطعات باردار، بر روی یک بستر با استفاده از جریان الکتریسیته

پس اگر قرار باشه الکتروفورز انجام بدیم نیاز داریم به یک ذره ی باردار، DNA تشکیل شده از نوکلئوتید ها و نوکلئوتید ها تشکیل شده اند از قند، بازهای آلی نیتروژن دار، فسفات، و به خاطر این فسفات بار الکتریکی منفی دارند .

پس DNA و RNA به خاطر وجود فسفات بار الکتریکی منفی دارند، پس تا اینجا اولین شرط الکتروفورز رو داشتند.

این باید جدا بشه روی بستر ، بستر برای DNA و RNA می‌تونه از جنس آگارز باشه

یعنی اگارز می‌تواند به صورت صنعتی در آزمایشگاه از جلبک جدا بشه و قابل خریداری است.

آگارز به صورت یک پودر است و باید بتوانیم آن را به صورت ژل دربیاریم (مثل ژله هایی که توی خونه درست میکنیم) و حالا برای درست کردن ژل آگارز نیاز به یک بافر داریم، سه جور بافر داریم تریس بورات (TBE) ، تریس استات (TAE) و تریس فسفات .

که تریس بورات ترکیبی از تریس اسید بوریک و EDTA است .

تریس استات ترکیبی از اسید استیک و EDTA

و تریس فسفات ترکیبی از تریس فسفات و EDTA است .

که معمولا بیشتر از تریس بورات استفاده می‌کنند .

به این صورت که : مقدار مناسبی از اگارز را وزن کرده و داخل تریس بورات اضافه می‌کنیم چون به راحتی حل نمی شود ، از حرارت استفاده می‌کنیم تا پودر آگارز کاملا حل شود . وقتی که حل شد اجازه می‌دهیم سرد شوند و حدودا وقتی دما به ۴۰ درجه رسید باید یه رنگ بهش اضافه بشه حالا رنگ های مختلف مثل سیف استین safe stain یا رنگ های مجاز یا ایمن یا اتیدیوم بروماید یا رنگ سرطان زا ، می‌توانیم استفاده کنیم .

این رنگ ها می‌توانند بین نوکلئوتید ها قرار بگیرند و intercalate هستند، پس اگر DNA یا RNA باشد، می توانند بین نوکلئوتیدهایش قرار بگیرند .

رنگ را به ژل اضافه می‌کنیم وقتی ژل به ۴۰ درجه رسید اونو تخلیه می‌کنیم داخل ظروف یا قاب‌ها که به آنها اصطلاحا **تِری** گفته می‌شود در نزدیک به یک انتهاش یک شانه قرار می‌دهیم ، محلول ژلمان را داخل آن میریزیم و اجازه می‌دهیم تا کاملا سفت شود در شرایط آزمایشگاه ، وقتی محلول سفت شد ، شانه رو خارج می‌کنیم، زبانه های شانه در ژل ایجاد چاه یا چاهک می‌کنند که باید نمونه هارو داخل اون‌ها اضافه کنیم .

حالا تری را داخل تانک الکتروفورز قرار می‌دهیم و نمونه هارو داخل چاهک ها اضافه می‌کنیم، در یکی از چاهک ها محلول استاندار، مارکر یا لَدر اضافه میکنیم که این محلول تجاری هست (یعنی خریداری میشود) و به عنوان خط کش عمل میکنه و با آن سایزهای خطها یا باندهایی که ایجاد می‌شود، مشخص هستند.

سایزهای ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ یا ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰،... یا ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و... حالا بستگی داره به مارکر تجاری که می‌خریم.

بعد از اضافه شدن نمونه ها به داخل چاهک، جریان الکتریسیته را برقرار می‌کنیم.

چاهک ها باید سمت قطب **منفی** باشند زیرا DNA یا RNA بار منفی دارند و میرند به سمت قطب مثبت و اگر ما چاهک هارو جابه جا بذاریم، نمونه ها میان توی تانکر الکتروفورز و از بین میرن.

پس چاهک ها حتما باید سمت قطب منفی باشند، تا پس از برقراری جریان های الکتریسیته، بیان به سمت قطب مثبت و به اندازه‌ی ۳۰ دقیقه تا یک ساعت زمان می‌دهیم تا تفکیک انجام شود و این رنگ هایی که بهش گفتیم سیف استین یا ایمن یا اتیدیوم بروماید برن بین نوکلئوتید ها.

اگر قرار باشد آن‌ها را ببینیم باید نور UV به این ژل بتابانیم .

بعد از سپری شدن زمان ژل را از تانک درمیاریم و داخل دستگاهی به نام ترانس ایلومیناتور.

این دستگاه نور UV را به ژل می‌تاباند و اگر DNA یا RNA وجود داشته باشد بسته به آن سیف استین یا رنگی که داریم نور مناسبی را ساتع میکند،

مثلا اگر اتیدیوم بروماید بزنیم DNA یا RNA به رنگ قرمز درمیاد

یا اگر سایبر گرین بزنیم به رنگ سبز درمیاد.

و بسته به رنگ مورد استفاده متفاوت است.

و با خط کش مقایسه میکنیم یعنی همان لدر یا مارکر. اگر آن سایز مناسب ما باشد ، میگیم قطعه هست و اگر سایز مناسب نباشه می‌گیم قطعه مورد نظر وجود ندارد و تکثیر پیدا نکرده است.

✿✿✿✿✿✿✿

#جلسه بعد

روش های استخراج DNA از خون:

۱.فنول کلروفرم

2.نمکی

3.با استفاده از کیت های تجاری

استفاده از گلبولهای سفید برای استخراج ماده وراثتی.

انواع ضدانعقادی:

۱.سیترات

2.هپارین

EDTA .3

استفاده از **سیترات و EDTA رایج تر** است.

اولین اقدام در روش نمکی حذف گلبولهای قرمز با کمک اب مقطر تا لیز شوند و از بین روند و فقط گلبولهای سفید بمانند.

استفاده از ترکیبات دیگر :لیز پروتئین با Tris_Hcl و تنظیمph2.ساکارز ایجاد تورژسانس یا هیپرتونی mgcl2.3 تنظیم غلظت یونی 4.از بین بردن فسفولیپیدهای غشا با Triton

با کمک این روش ها گلبول قرمز لیز شده و مواد سانتریوفیوژ میشه.گلبولهای سفید رسوب میکنه. و بعد شستشو انجام شده و ماده صورتی به دست میاد که حاوی گلبولهای سفید است به دست میاد حالا از محلول لیز کننده گلبول سفید استفاده میکنیم 1.استفاده از لیزکننده EDTA (مهار یونهای 2 ظرفیتی) محافظت از ماده وراثت در برابر انزیم ها

2.سیترات سدیم برای تنظیم غلظت یونی 3

.تنظیم ph با Tris_Hcl.

در باکتری ها از لیز کننده دترجنت استفاده میشه.

استفاده از سدیم دو دسیل سولفات برای از بین بردن پروتیین های غشا.

استفاده از پروتئیناز k برای از بین بردن پروتیین ها

برای رسوب پروتیین و جداسازی شان از نمک 6 مولار.

استفاده از اتانول خالص برای اینکه ماده وراثتی را به طور خالص داشته باشیم.

خون و لیز کننده ها را قاطی کرده و سانتریفیوژ و رسوب صورتی به دست میاریم.بعد بافر لیزکننده گلبول سفید سدیم دسیل و پروتئیناز k را روی مواد ریخته و چند دقیقه زمان میدهیم برحسب دماهای مختلف. سپس از نمک 6 مولار و کلروفرم استفاده میکنیم که نمک باعث رسوب پروتیین ها میشه و کلروفوم باعث لیز چربی و اومدن ماده وراثتی به فاز ابی بعد سانترفیوژ داریم جداسازی ماده ابی که همان ماده وراثتی است.

زدن اتانول که باعث دیدن کلاف dna میشه.و بعد سانتریفیوژ و در نهایت با اتانول 70 درصد شتشو داده که بعد از تبخیر اتانول ما نمونه رو در آب مقطر حل میکنیم و آن را در فریزر در دمای ۲۰_ درجه باید نگهداریم.

کیت ها:

۲۰۰ میکرولیتر خون را در میکروتیوب میریزیم و ۲۰ تا هم پروتئیناز k اضافه میکنیم بعد بافر تجزیه کننده اضافه میکنیم بعد ۱۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه میذاریم بعد ۲۰۰ میکرولیتر اتانول اضافه میکنیم.

این کیت ها دارای ستونهایی هستن که به این ستون ها پک هایی متصل شده که حاوی ناقل هستن که بهشون rna یا dna میچسبه ولی بقیه مواد از ستون رد میشن. بعد از این سانتریفیوژ شست و شو هم انجام میدیم و بعد از آن یک بافری اضافه میکنیم به نام AE تا DNA و RNA از پک جدا میشه و در آخر نمونه ماده وراثتی خواهد بود.

✿✿✿

#جلسه بعد

استخراج RNA

در صورتی که بخواهیم میزان بیان یک ژن را بسنجیم باید ازRNA استفاده کنیم.

راحت ترین و در دسترس ترین نمونه ای که می توانیم استفاده کنیم نمونه خون است ولی برای سنجش و بیان ژن ها باید اون بافت و سلول مورد نظر را داشته باشیم.

مثلا اگر قرار باشه بیان یک ژن را بسنجیم باید سلول و بافت مناسب را داشته باشیم.

پروتکل استخراج RNA تقریبا برای همه یکسان است.

همانطور که می دانیم خون از گلبول قرمز،گلبول سفید و پلاکت ها تشکیل شده است.

گلبول های قرمز RNA آن ها از نوع RNA پایدار هست، به همین خاطر به گلبول های سفید نیاز داریم.

اگر از خون استفاده می کنیم اولین کار این هست که گلبول هارا لیز کنیم(مشابه استخراجDNA).

بیشتر آزمایشگاه ها از ماده ای به نام ترایزول (لیز کننده) استفاده می کنند.

نکته:(برای اینکه بافت ها خوب لیز شوند تا RNA خارج شود می توانیم از شرایط سرما و گرما نیز استفاده کنیم.)

بعد از استفاده از ترایزول حدودا ۵ تا ۱۰ دقیقه زمان نیاز داریم تا سلول ها کاملا لیز شوند و RNA خارج شود.

#برای اینکه RNA را از فاز آبی جدا کنیم باید از کلروفرم استفاده کنیم(کمک به لیز چربی ها)

در مرحله بعد محلول را به شدت مخلوط و سانتریفیوژ می کنیم.

(((نکته مهم: سانتریفیوژ بایستی حتما یخچال دار باشد؛ چرا که اگر یخچال دار نباشد در محلول آبی ما می تواندDNA نیز حضور پیدا کند.)))

بعد از سانتریفیوژ محلول رویی را جدا کرده و برای اینکه بتوانیم RNA را رسوب دهیم، به آن ایزوپروپانول سرد اضافه می کنیم.

در صورتی که مقدار نمونه کم باشد به مدت ۲۴ ساعت می توانیم آن را در دمای (۲۰-) نگه داری کنیم تا رسوب RNA ما بهتر شود.

مرحله بعد شست و شو با اتانول ۷۰ درصد سرد میباشد.

بعد از تبخیر اتانول نمونه را در آب مقطر حل کرده و آن را در در دمای (۷۰-) برای مرحله بعد نگه داری می کنیم.

برای استخراجRNA کیت های مختلفی وجود دارد:

یمی از آن ها کیت شرکت جنرال است. در صورتی که بخواهیم از این کیت استفاده کنیم باید نمونه را اول در ازت به طور کامل له و پودر کرده یا به آن محلول لیز کننده اضافه کنیم و آن را لیز کنیم.

یک دقیقه آخر ویس رو حوصله نداشتم بنویسم دیگه....😐😐

استخراج DNA از خون محیطی

جهت استخراج DNA از گلبول های سفید، روش های گوناگونی وجود دارد که از آن جمله می توان به روش های فنل_کلروفرم، جوشاندن، salting out و کیت های تجاری اشاره کرد.

۱- استخراج DNA به روش salting out یا نمکی

مواد و محلول هاي مورد نياز براي استخراج DNA

محلول لیزکننده گلبول قرمز(بافر I یا بافر R)

گلبول های قرمز دارای حلقه های پروتوپورفرین هستند و این حلقه ها مهارکننده PCR به شمار می آیند، به این منظور باید گلبول های قرمز از سیستم حذف شوند. با استفاده از محلول لیزکننده گلبول های قرمز(جدول ۱) گلبول های قرمز لیز شده و گلبول های سفید در ته لوله رسوب می کنند.

جدول ۱ ترکیبات محلول I استخراج DNA محلول لیزکننده گلبول قرمز با آب مقطر به حجم ۱۰۰ ml میرسانیم

مواد	میزان	غلظت	عملکرد
Tris-Hcl pH: 7. 5	۱ml	۱ مولار	تنظیم PH و لیز کننده پروتیین
Sacarose	۱۱ گرم	0. 32M	هیپرتونیک و ایجاد تورژسانس و ترکیدن سلول
MgCl2	۰,۵ ml	۱مولار	تنظیم غلظت یونی و ایجاد حالت بهینه
Triton X-100	۱۱ml	٪۱	از بین برنده ی فسفولیپیدهای غشایی و لیزکننده پروتیین

محلول لیز کننده ی دوم (بافر II یا بافر W)

آنزیم های مختلفی در سلول وجود دارد که می توانند DNA را تجزیه کنند. مهمترین آسیب از جانب دزاکسی ریبونوکلئازها می باشد که اتصالات فسفودی استر را هیدرولیز می کنند. یون های Mn2+ و Mg2+ کوفاکتور این نوکلئازها هستند، لذا با افزودن EDTA به محلول استخراج DNA می توان با شلات کردن این یون ها عمل مخرب این آنزیم ها را مهار کرد. از سوی دیگر یون های فلزی دوظرفیتی می توانند با گروه های آنیونی فسفات روی DNA ایجاد نمک کنند. Mg2+ می تواند واسطه اتصال پروتئین ها و اسید های نوکلئیک به یکدیگر باشد. وجود EDTA مانع بروز این گونه مشکلات می گردد. محلول حاوی EDTA به میزان مناسبی دارای املاح است و محیط مناسبی برای محلول بودن DNA می باشد. DNAدر محلول های نمکی پایدارتر و محلول تر است. pH محیط نیز باید قلیایی و ملایم و درحدود ۸ باشد، زیرا در این pH میزان بار مثبت هیستون ها کاهش یافته و در نتیجه واکنش های الکترواستاتیک بین DNA و هیستون ها کاهش یافته و همچنین فعالیت نوکلئاز ها در این pH کمتر می گردد. از سوی دیگر pH نسبتا بالا در جهت دناتوره کردن پروتئین نیز عمل می کند (Elles 2004) .این مواد را با ۹۶ سی سی آب مقطر به حجم ۱۰۰ میرسانیم.

جدول ۲ : ترکیبات محلول II استخراج DNA (محلول لیزکننده گلبول سفید) .

مواد	غلظت	میزان	عملکرد
EDTA	۰,۵mM(pH=8)	۲ ml	کلات کردن MgCl2 و یون های دو ظرفیتی
Tris-HCl	۱ مولار (PH=8)	۱ ml	تنظیم PH
سدیم سیترات	۱ مولار	۱ ml	تنظیم غلظت یونی

محلول EDTA

EDTA یون های فلزی دو ظرفیتی لازم برای فعالیت DNase را به خود جذب کرده و مهار می کند و با فراهم آوردن pH مناسب دآمیناسیون بازها را به حداقل میرساند(Elles 2004). در واقع باعث ناپایداری غشا سلول و کاهش فعالیت های آنزیم ها میشود. برای تهیه ی EDTA ی ۰,۵ مولار بر اساس فرمول مولاریته × حجم بر حسب لیتر × وزن مولکولی ، ۱۸٦,٦ گرم از پودر EDTA را در ۱ لیتر آب مقطر استریل حل کرده و سپس با NAOH به PH ۸ میرسانیم که با PHسنج اندازه گیری میکنیم. PH=8 برای حل شدن EDTAلازم است بنابراین باید قبل از به حجم رساندن، PH به عدد ۸ رسانده شود (اگر از ۸ بیشتر شده باشد با اضافه کردن اسید به ۸ میرسانیم .)

SDS 20 %(سدیم دو دسیل سولفات)

به طور طبیعی DNA در سلول ها به صورت کمپلکس DNA و پروتئین می باشد. پروتئین ها و لیپیدهای سلول نیز باید از اسید نوکلئیک جدا شوند. معمولا از مواد دترژنت برای از بین بردن واکنش های یونی بین هیستون های با بار مثبت و DNA با بار منفی استفاده می شود. رایج ترین دترژنت آنیونی SDS می باشد که به پروتئین ها متصل شده و به آن ها مقدار زیادی خاصیت آنیونی می دهد. در نتیجه واکنش های یونی کمتری بین هیستون ها و DNA ایجاد می شود. نقش دیگر SDS دناتوره کردن دزاکسی ریبونوکلئازها و سایر پروتئین ها است (Elles 2004). SDS همچنین به فسفولیپید های غشا متصل میشود. برای تهیه ی SDS ۲۰٪ ، ۲۰ گرم از پودر SDS را با ۱۰۰ سی سی آب مقطر مخلوط میکنیم و در دمای محیط قرار میدهیم .

PTK (پروتئیناز K)

جهت از بین بردن بهتر پروتئین ها می توان از پروتئیناز K که یک پروتئیناز عمومی است در حضورSDS استفاده نمود. این آنزیم فعالیت بالایی داشته و قادر به هضم پروتئین های بزرگ است.

NaCl

NaCl ٦ مو لار به پروتئین های اضافی متصل شده و موجب رسوب پروتئین ها می شود. برای تهیه ی ۵۰ سی سی Nacl ٦ مو لار ، طبق فرمول مولاریته ضرب در حجم بر حسب لیتر ضرب در وزن ملکولی مقدار گرمی که از Nacl لازم داریم به دست می آید. (٦ × $\frac{50}{1000}$ × 58.4 = ۱۷,۵ گرم) که ۱۷,۵ گرم از Nacl را با ترازوی دیجیتال وزن کرده و ۵۰ سی سی آب مقطر استریل به آن اضافه میکنیم.

اتانول ۱۰۰ ٪(C2H5OH)

افزودن الکل سبب کاهش قطبیت محیط آبی شده ، به توده ای شدن رشته های محلول DNA و آب گیری آن ، تجمع و رسوب آن ها کمک می کند.

بافر Tris-EDTA(TE)

این دو ماده در تنظیم PH مناسب کمک میکنند و رسوب DNA را در این بافر یا آب مقطر دو بار تقطیر استریل حل مینمایند. مقدار ۱۰ ml از Tris-HCL (1M) را با حدود ۲ ml از EDTA(0.5M) مخلوط میکنیم و حجم نهایی محلول را با آب مقطر به ۱ لیتر میرسانیم .

جدول ۳ : ترکیبات بافر Tris-EDTA(TE) (Elles 2004)

مـو ا د	غـلـظـت
EDTA	1 mM(pH=8)
Tris-HCl	10 mM(pH=7. 6)

محلول (Tris-HCL (۱ M, PH= 7.4-8

۱۲۱,۱٤ گرم از Tris-HCL در داخل آب مقطر استریل حل میکنیم و با استفاده از HCL ، PH به عدد ۷,٤ تا ۸ میرسانیم. این محلول برای تهیه ی بافرTES با نسبت زیر با هم ترکیب میشوند: حدودml ۳۰ از (NACL (5M و حدود ۲۰ml از (EDTA(0.5M و ml ۱۰ از (Tris-HCL(1M را با هم مخلوط میکنیم و با استفاده از آب مقطر حجم نهایی محلول را بهml ۱۰۰ میرسانیم و PH محلول را با استفاده از (HCL(1M به عدد ۷,٤ تا ۸ میرسانیم

آب مقطر دو بار تقطیر شده و استریل

می توان از آب مقطر تزریقی استفاده کرد.

روش کـار

(قبل از انجام کار باید بافر ۱ و ۲ و مواد مورد نیاز برای استخراج را آماده کنیم .)

۱- ۵۰۰ لاندا خون محیطی حاوی ماده ضد انعقاد EDTA را جهت لیز کردن گلبول قرمز درون ویال ml ۲ به آهستگی منتقل میکنیم. ۱۰۰۰ لاندا از بافر ۱ به ویال خون اضافه میکنیم که با اضافه شدن آن حجم خون و بافر درون ویال به ۱و نیم سی سی رسیده است ، به مدت ٤ دقیقه با دور rpm ۸۰۰۰ سانتریفیوژ میکنیم.

۲- مایع رویی را به آهستگی دور میریزیم و به رسوب ۱۵۰۰ لاندا از بافر ۱ اضافه و پیپتینگ انجام میدهیم تا رسوب با بافر میکس شود و سانتریفیوژ به مدت ٤ دقیقه با ۸۰۰۰ rpm دور انجام میدهیم. این مرحله رو با ۱۰۰۰ لاندا بافر ۱ و سانتریفیوژ نهایت تا ٤ بار میتوان تکرار کرد تا به رسوب سفید رنگ رسید.

۳- به رسوب حاصل ۳۵۰ لاندا بافر ۲ اضافه میکنیم بعد از پیپتینگ ،۷۰ لاندا SDS ۲۰٪ و ۲۰ لاندا پروتیینار K اضافه میکنیم و به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در دمای اتاق یا ۱۰ دقیقه درون هیتر یا انکوباتور با دمای ٦٥ قرار میدهیم.

٤- بعد از این مدت ۱۰۰ لاندا نمک ٦ مولار و ٦٥٠ لاندا کلروفرم را اضافه میکنیم و به خوبی ۳۰ تا ٤۰ ثانیه شیک میکنیم تا محلول شیری رنگی به دست آید. سانتریفیوژ به مدت ٤ دقیقه با rpm ۸۰۰۰ دور قرار میدهیم.

۵- نهایت سه فاز تشکیل میشود که به آهستگی محلول رویی را که حاوی DNA میباشد با سمپلر کشیده و به ویال استریل جدید منتقل میکنیم با rpm ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ میکنیم.

٦- محلول رویی را مجدد به ویال استریل جدید منتقل کرده (برای کاستن آلودگی) و ۷۰۰ لاندا اتانول مطلق اضافه میکنیم محلول را به آهستگی تکان میدهیم تا کلاف DNA مشاهده شود و به مدت ۲ دقیقه با rpm ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ می کنیم .

۷- محلول رویی را دور میریزیم و به رسوب اتانول ۷۰٪ به میزان ۷۰۰ لاندا اضافه و دوباره به مدت ۲ دقیقه با rpm ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ می کنیم .

۸- محلول رویی را کاملاً خالی میکنیم و در دمای اتاق یا انکوباتور قرار میدهیم تا خشک شود و هیچ الکلی باقی نماند و کاملاً تبخیر شود. در نهایت ۵۰ لاندا آب مقطر دو بار تقطیر شده استریل به رسوب DNA اضافه میکنیم تا در آن حل شود و آن را در فریزر با دمای ۲۰- نگهداری میکنیم.

۲-استخراج DNA با استفاده از کیت های تجاری

استخراج DNA با استفاده از کیت DNA Gene ALL

۱- مقدار ۲۰µl پروتیینیاز K با غلظت ۲۰mg/ml به میکروتیوب اضافه می شود.
۲- اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر نمونه خون
۳- مقدار ۲۰۰µl از بافر BL به نمونه اضافه شد و سپس نمونه را ورتکس کرده و ۱۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه قرار داده شد قرار می گیرد.
۴- مقدار ۲۰۰µl اتانول خالص به نمونه اضافه شد و سپس نمونه ورتکس می شود.
۵- محتویات نمونه داخل ستون استخراج اضافه می شود.
۶- نمونه با دور ۱۰۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ می شود.
۷- محلول زیر ستون دور ریخته می شود.
۸- به ستون ۶۰۰µl بافر BW اضافه می شود.
۹- نمونه با دور ۱۰۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ می شود.
۱۰- محلول زیر ستون دور ریخته می شود.
۱۱- به نمونه ۷۰۰µl بافر TW اضافه می شود.
۱۲- نمونه با دور ۱۰۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ می شود.
۱۳- محلول زیر ستون دور ریخته می شود.

۱۴- بدون آنکه ماده ای اضافه شود نمونه با دور ۱۳۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ می شود.

۱۵- ستون درون یک میکروتیوب ۱,۵ میلی لیتری استریل قرار می دهیم.

۱۶- به ستون ۲۰۰µl بافر AE اضافه شده و دو دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار می گیرد.

۱۷- نمونه با دور ۱۰۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ می شود.

۱۸- ستون دور انداخته شده و محلول موجود در میکروتیوب ۱,۵ میلی لیتری حاوی DNA خواهد بود که در منفی ۲۰ درجه نگهداری می شود.

استخراج DNA از سلول های زنده

۱- DNA ی ژنومیک

۲- DNAی پلاسمیدی

۳- DNA باکتریوفاژی

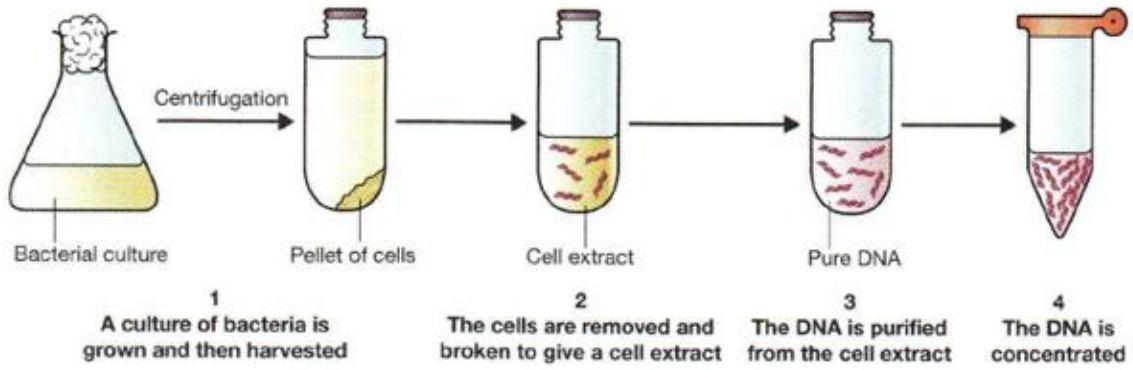
یک مهندس ژنتیک در مراحل مختلف، دست کم به تهیه سه نوع DNA متفاوت احتیاج دارد. ابتدا **کل DNA** سلول به عنوان منبع تهیه ژن برای کلون‌سازی مورد نیاز است. کل DNA سلول ممکن است از باکتری‌ها، گیاهان، سلول‌های حیوانی یا هر موجود دیگری که مورد مطالعه باشد، تهیه شود. کل DNA سلول، شامل **DNA ژنومی** سلول به همراه دیگر مولکول‌های DNA، مانند پلاسمیدها، است که در سلول وجود دارند.

نوع دوم DNA مورد نیاز، DNA پلاسمیدی خالص است. تهیه DNA پلاسمیدی از محیط کشت باکتری‌ها همان مراحل اصلی خالص‌سازی کل DNA سلول را لازم دارد، با این تفاوت عمده که در بعضی از مراحل، بایستی DNA پلاسمید از توده اصلی DNA کروموزومی موجود در سلول جدا شود.

سرانجام، اگر حامل‌های کلون‌سازی فاژی استفاده شوند، DNA آن‌ها مورد نیاز خواهد بود. معمولاً برای تهیه DNA فاژ، از ذرات فاژی بجای سلول آلوده استفاده می‌شود، بنابراین هیچ مشکلی از نظر آلودگی با DNA باکتری وجود ندارد. به هر حال روش‌های ویژه‌ای برای حذف پوشش فاژ، مورد نیاز است. یک استثنا، فرم دو رشته‌ای همانندساز M13 است که با روشی مشابه با روش تهیه پلاسمید باکتریایی از سلول‌های *E. coli* تهیه می‌شود.

الف- استخراج DNA از باکتری :

روش تهیه کل DNA از کشت سلول‌های باکتریایی را می‌توان به چهار مرحله تقسیم کرد (شکل ۳- ۱):



شکل ۳- ۱ مراحل اصلی تهیهٔ کل DNA سلول از کشت باکتریایی.

(۱) باکتری‌ها کشت داده شده و سپس **برداشت** می‌شوند.
(۲) سلول‌ها شکسته شده و اجزای آن‌ها آزاد می‌شوند.
(۳) **عصارهٔ سلولی** به منظور حذف همه اجزای آن بجز DNA، تیمار می‌شود.
(۴) محلول DNA بدست آمده تغلیظ می‌شود.

کشت و برداشت باکتری

به طور معمول از محیط کشت مایع استفاده می شود.این ممحیط کشت به دو دسته تقسیم می شوند :

- محیط کشت معین : تمام ترکیبات آن مشخص است مانند محیط کشت M9
- محیط کشت نامعین یا پیچیده : ترکیبات آن به صورت کامل شناسایی نشده است مانند محیط کشت لوریا برتانی براث

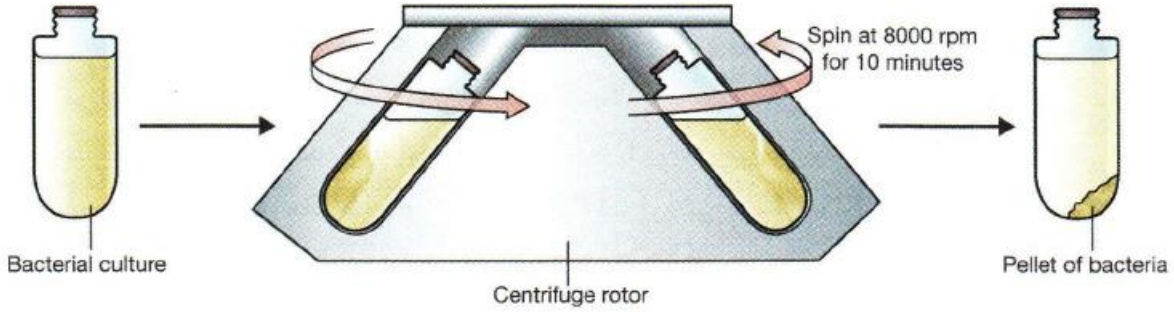
جدول ۳- ۱ ترکیب دو محیط معمول برای رشد کشت‌های باکتریایی.

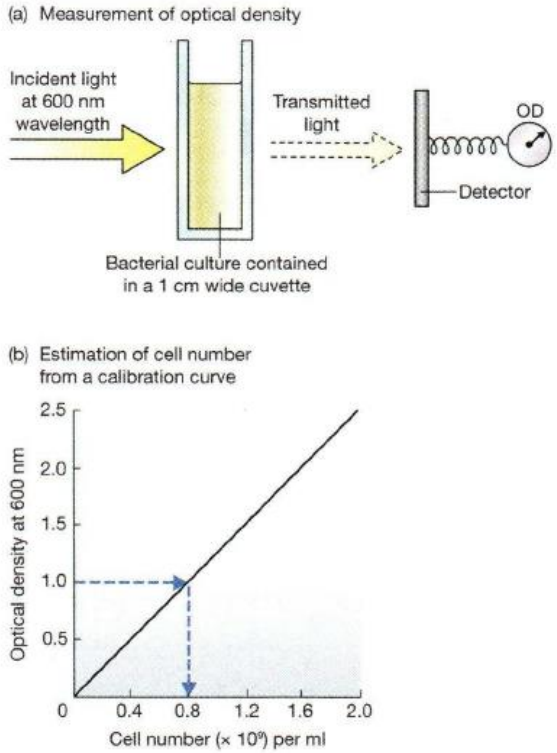
محیط	اجزاء	g/l از محیط
محیط M9	Na_2HPO_4	۶
	KH_2PO_4	۳
	NaCl	۰/۵
	NH_4Cl	۱
	$MgSO_4$	۰/۵
	گلوکز	۲
	CaCl	۰/۰۱۵
محیط LB (محیط لوریا ـ برتانی)	تریپتون	۱۰
	عصاره مخمر	۵
	NaCl	۱۰

زمانی که لازم است رشد باکتری تحت شرایط کنترل شده‌ای انجام پذیرد، بایستی از محیط کشت معین استفاده کرد. بنابراین، هنگامی که کشت فقط به عنوان منبع تهیهٔ DNA مورد استفاده قرار می‌گیرد، این محیط کشت لازم نیست و در این شرایط، محیط کشت پیچیده مناسب است.

E. coli کشت شده در محیط LB که در ۳۷°C و سرعت شیکر ۱۵۰ تا ۲۵۰ دور در دقیقه هوادهی می‌شوند، هر ۲۰ دقیقه یک بار تقسیم می‌شوند تا تعداد باکتری‌ها در محیط کشت، به حداکثر $۲-۳ \times ۱۰^{۹}$ سلول در میلی‌لیتر برسد. رشد باکتری‌ها در محیط کشت را می‌توان با اندازه‌گیری چگالی نوری(OD) در ۶۰۰ نانومتر سنجید. در این طول موج، هر واحد OD معادل حدود $۰/۸ \times ۱۰^{۹}$ سلول در میلی‌لیتر است.

برای بدست آوردن عصاره سلولی، باید باکتری‌ها را در کم‌ترین حجم ممکن جمع آوری نمود. جمع‌آوری سلول‌ها با سانتریفوژ انجام می‌شود. سانتریفوژ با سرعت کم، سلول‌ها را در ته لوله جمع می‌کند، بنابراین می‌توان محیط کشت رویی را دور ریخت. با این روش، باکتری‌های یک محیط کشت ۱۰۰۰ میلی‌لیتری با OD بالا را می‌توان در حجم ۱۰ میلی‌لیتر یا کمتر، مجدداً به صورت سوسپانسیون (معلق) درآورد.





تخمین تعداد سلول‌های باکتریایی با اندازه‌گیری چگالی نوری (OD). (a) یک نمونه از کشت، در کووت شیشه‌ای قرار داده شده و نور با طول موج ۶۰۰ نانومتر از آن عبور داده می‌شود. مقدار نور عبور کرده از کشت، اندازه‌گیری شده و OD (که جذب نوری هم نامیده می‌شود) محاسبه می‌گردد.

1 OD unit = Log10 (شدت نور عبور کرده) / (شدت نور تابیده شده)

این کار با اسپکتروفومتر انجام می‌شود. (b) از روی منحنی استاندارد، برحسب OD خوانده شده، تعداد سلول محاسبه می‌شود. این منحنی، براساس مقادیر OD چندین کشت با چگالی سلولی مشخص رسم می‌شود. برای E. coli یک واحد OD معادل $۰/۸ \times ۱۰^{۸}$ سلول در میلی‌لیتر است.

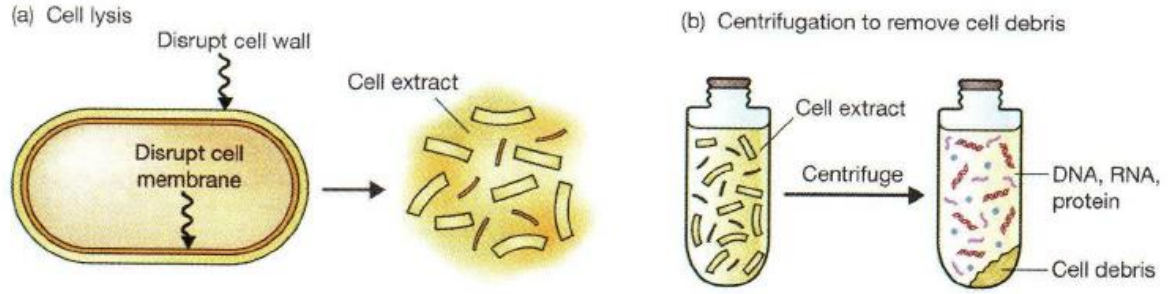
تهیه عصاره سلولی

سلول‌های باکتری توسط غشای پلاسمایی احاطه شده‌اند و دیواره سلولی محکمی آن‌ها را احاطه می‌کند. در بعضی از باکتری‌ها از جمله *E. coli*، خود دیوارهٔ سلول توسط غشای خارجی دیگری احاطه می‌شود. برای آزاد کردنِ اجزای سلول، تمام این سدها باید شکسته شوند.

روش‌هایی که برای شکستن سلول‌ها بکار می‌روند، به دو روش فیزیکی و شیمیایی تقسیم می‌شوند. در روش‌های فیزیکی، سلول‌ها را با نیروهای مکانیکی می‌شکنند و در روش‌های شیمیایی، سلول‌ها در اثر مجاورت با مواد شیمیاییِ مؤثر بر یکپارچگی سدهای سلولی، شکسته می‌شوند. وقتی هدف تهیه DNA باشد، استفاده از روش‌های شیمیایی بیشتر متداول است.

تجزیه شیمیایی نیازمند یک عامل شیمیایی حمله‌کننده به دیواره سلولی و یک عامل پاره‌کنندهٔ غشای سلولی است مواد شیمیایی مورد استفاده به نوع باکتری بستگی دارد، ولی در مورد *E. coli* و گونه‌های نزدیک، تضعیف دیواره سلولی با لیزوزیم، اتیلن دی آمین تترا استات (EDTA) و یا مخلوطی از هر دو انجام می‌شود. **لیزوزیم** آنزیمی است که در سفیده تخم مرغ و درترشحاتی مانند اشک و بزاق وجود دارد و ترکیبات پلی‌مری تامین‌کنندهٔ یکپارچگی دیواره سلولی را هضم می‌کند. از سوی دیگر، EDTA، یون‌های منیزیم لازم برای حفظ ساختار کلی پوشش سلول را حذف می‌کند و همچنین آنزیم‌های تجزیه کننده DNA را مهار می‌نماید. در برخی شرایط، تضعیف دیواره سلولی با لیزوزیم یا EDTA، برای تجزیه سلول کافی است، اما به طور معمول یک ماده شوینده[1] مانند سدیم دودسیل سولفات (SDS) هم اضافه می‌شود. شوینده‌ها با حذف مولکول‌های چربی به فرآیند تجزیه کمک می‌کنند و باعث متلاشی شدن غشاهای سلول می‌شوند.

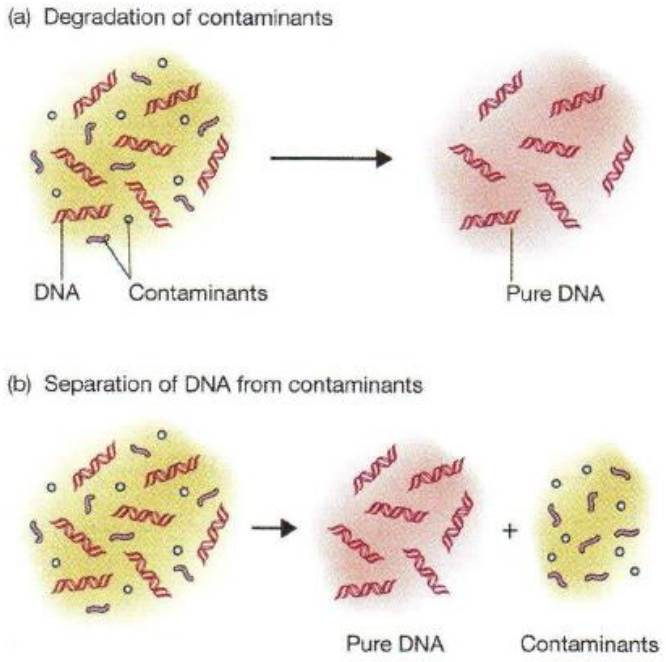
پس از تجزیه سلول‌ها، مرحله آخر در تهیه عصاره سلولی خارج کردن بقایای سلولی غیرمحلول است. اجزایی مانند دیواره سلولی نیمه هضم شده را می‌توان با سانتریفوژ رسوب داد تا از عصاره سلول، مایع رویی شفافی بر جای بماند.



تهیه عصاره سلولی: (a) تجزیه سلول. (b) سانتریفوژ کردن عصاره سلولی برای حذف بقایای غیر محلول.

خالص سازی DNA از عصاره سلولی

عصاره سلولی علاوه بر DNA، حاوی مقدار قابل توجهی پروتئین و RNA است. روش‌های متعددی را می‌توان برای خالص‌سازی DNA از این مخلوط بکار برد. یک روش، مجاورت نمونه با عواملی است که باعث تجزیه آلودگی‌ها شده و محلول خالصی از DNA برجای می‌گذارند . روش دیگر برای جداسازی اجزای مخلوط و خارج کردن DNA از پروتئین‌ها و RNA موجود در عصاره سلولی، استفاده از **کروماتوگرافی تعویض یونی**[۲] است

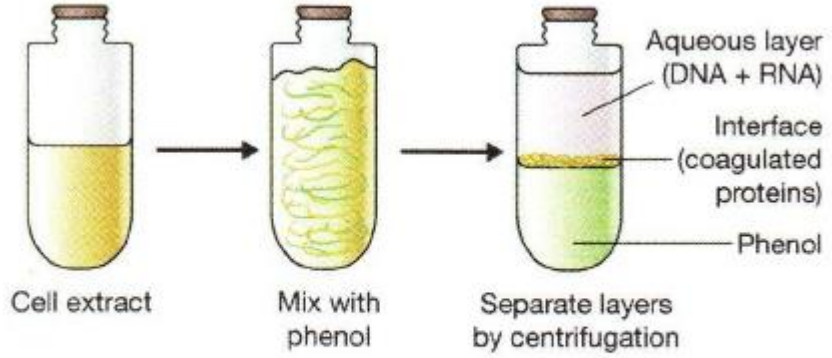


دو روش برای خالص‌سازی DNA (a) تیمار کردن مخلوط با عواملی که ناخالصی‌ها را تخریب می‌کنند و محلول خالص DNA را بر جای می‌گذارند. (b) تفکیک مخلوط به قسمت‌های مختلفی که یکی از آن‌ها، DNA خالص است.

خارج کردن آلودگی‌ها با استفاده از حلال‌های آلی و هضم آنزیمی

روش استاندارد برای عاری کردن عصاره سلولی از پروتئین، افزودن فنل یا مخلوط فنل و کلروفرم به نسبت ۱:۱ است. این حلال‌های آلی، پروتئین‌ها را رسوب می‌دهند، اما اسیدهای نوکلئیک (DNA و RNA) را در محلول آبی باقی می‌گذارند. نتیجه این است که اگر عصاره سلولی به آرامی با حلال مخلوط شود و سپس لایه‌ها با سانتریفوژ از هم جدا شوند، مولکول‌های پروتئینیِ رسوب کرده، به صورت لخته سفید رنگی بین لایه آبی و آلی باقی می‌مانند . محلول آبیِ حاوی اسیدهای نوکلئیک، با پیپت قابل جداسازی است.

در بعضی از عصاره‌های سلولی، محتوای پروتئینی آن قدر زیاد است که یک بار استخراج با فنل برای خالص‌سازی کامل اسیدهای نوکلئیک کافی نیست. این مشکل با انجام چند استخراج متوالی با فنل قابل حل است، اما این کار چندان مطلوب نیست، زیرا هر بار عمل مخلوط و سانتریفوژ کردن، منجر به شکستن مقداری از مولکول‌های DNA می‌شود. راه حل این مشکل، تیمار عصاره سلولی با یک پروتئاز مانند پروناز یا پروتئیناز K، قبل از استخراج با فنل است. این آنزیم‌ها پلی‌پپتیدها را به واحدهای کوچک‌تری می‌شکنند که با فنل راحت‌تر جدا می‌شوند.

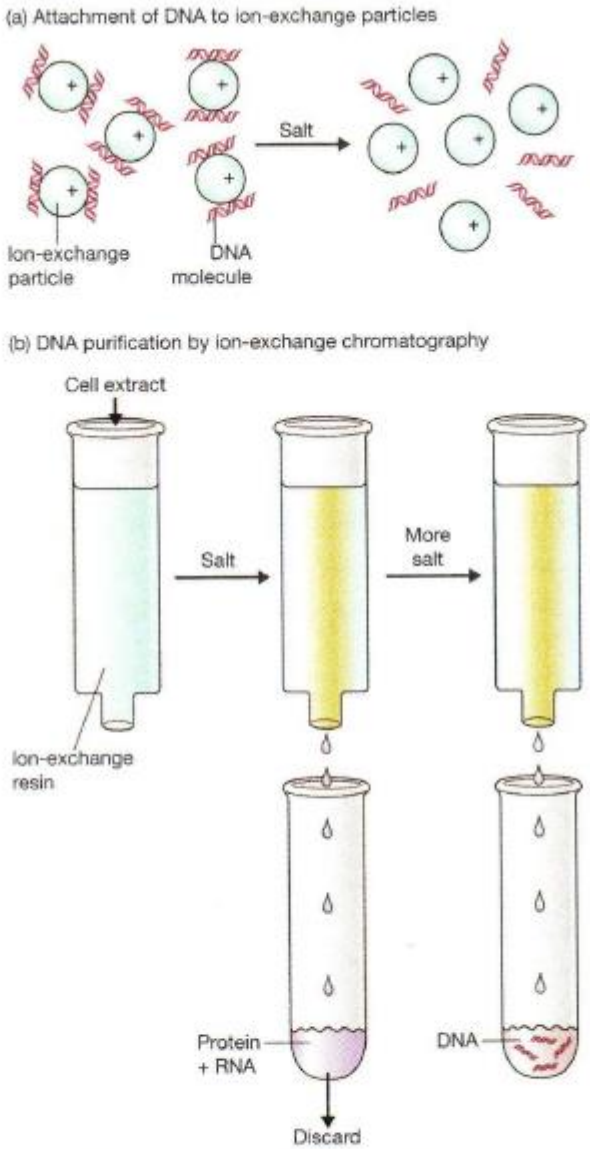


خارج کردن ناخالصی‌های پروتئینی توسط استخراج با فنل.

بعضی از مولکول‌های RNA به ویژه **RNAهای پیامبر (mRNA)** در اثر مجاورت با فنل جدا می‌شوند، ولی اغلب آن‌ها همراه با DNA در فاز آبی باقی می‌مانند. تنها راه مؤثر برای خارج کردن RNA، استفاده از آنزیم **ریبونوکلئاز** است که به سرعت این مولکول‌ها را به واحدهای ریبونوکلئوتیدی می‌شکند.

استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی برای تخلیص DNA از عصاره سلولی

بیوشیمی‌دانان برای جداسازی مخلوطی از مواد شیمیایی به اجزای آن‌ها، روش‌های مختلفی را براساس اختلاف بار الکتریکی مواد طراحی کرده‌اند. یکی از این روش‌ها کروماتوگرافی تعویض یونی است که مولکول‌ها را براساس میزان قدرت اتصال آن‌ها به ذرات باردار موجود در ماتریکس یا رزین کروماتوگرافی، از هم جدا می‌کند. DNA و RNA همانند بعضی از پروتئین‌ها بار منفی دارند و به رزین دارای بار مثبت متصل می‌شوند. پیوندهای الکتریکی با نمک از بین می‌روند و خارج کردن مولکول‌هایی که محکم‌تر متصل شده‌اند، احتیاج به غلظت‌های بالاتری از نمک دارد. با افزایش تدریجی غلظت نمک، اتصال انواع مختلف مولکول‌ها را یکی پس از دیگری می‌توان از بین برد.



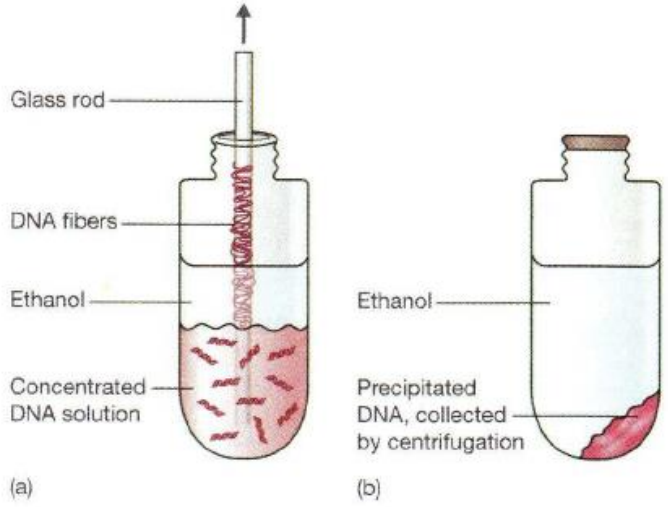
خالص‌سازی DNA توسط کروماتوگرافی تعویض یونی. (a) چسبیدن DNA به ذرات تعویض یونی. (b) DNA توسط کروماتوگرافی ستونی خالص می‌شود. محلول‌های عبور داده شده از ستون، توسط جریان جاذبه‌ای (گرانشی) یا به روش ستون‌های چرخشی که ستون تحت سانتریفوژ با سرعت پایین قرار داده می‌شود، جمع آوری می‌گردند.

تغلیظ نمونه DNA

اغلب، یک بار استخراج با حلال آلی، محلول غلیظی از DNA را به دست می‌دهد که نیازی به تغلیظ بیشتر ندارد. سایر روش‌های خالص‌سازی، غالباً محلول‌های رقیقی را تولید می‌کنند که در این موارد، به کار بردن روش‌هایی برای تغلیظ DNA از اهمیت بالایی برخوردار است.

متداول‌ترین روش تغلیظ، **رسوب‌دهی با اتانول** است. اتانول مطلق در حضور نمک (به گفته صحیح‌تر، کاتیون‌های تک ظرفیتی مثل Na^+) و درجه برودت $-20°C$ یا کمتر، به طور مؤثری باعث رسوب اسیدهای نوکلئیک پلی‌مری می‌شود. در محلول غلیظی از DNA، اتانول به صورت لایه‌ای روی نمونه قرار می‌گیرد و باعث رسوب مولکول‌ها در سطح بین دو فاز می‌شود. یک راهکار جالب، فرو بردن یک میلهٔ شیشه‌ای از میان اتانول به درون محلول DNA است. وقتی میله بیرون کشیده می‌شود، مولکول‌های DNA چسبیده به آن را می‌توان به صورت الیاف بلندی از محلول خارج کرد

راه دیگر، مخلوط کردن اتانول با محلول رقیق DNA و جدا کردن رسوب حاصل با سانتریفوژ است که سپس می‌توان DNA حاصل را در حجم مناسب آب، دوباره حل کرد. رسوبدهی با اتانول این مزیت را نیز دارد که زنجیره‌های کوچک و منومرهای اسیدهای نوکلئیک را در محلول باقی می‌گذارد. ریبونوکلئوتیدهای تولید شده در اثر تیمار با ریبونوکلئاز، در این مرحله حذف می‌شوند.



جمع آوری DNA توسط رسوب گذاری با اتانول. (a) اتانول مطلق، بالای محلول غلیظ DNA قرار می‌گیرد. رشته‌های DNA را می‌توان با یک میله شیشه‌ای بیرون کشید. (b) برای محلول‌های با غلظت کمتر، اتانول (با نسبت ۲/۵ حجم اتانول مطلق به ۱ حجم محلول DNA) اضافه می‌کنند و DNA راسب شده، با سانتریفوژ جمع آوری می‌گردد.

استخراج RNA

برای جداسازی گلبول‌های سفید ما به حدود ۳ سی‌سی خون حاوی ماده ضدانعقاد EDTA و همچنین RBClysis جهت لیز کردن گلبول‌های قرمز نیاز داریم.

۱-استخراج RNA با استفاده از ترایزول

RBCLysis با استفاده از مواد جدول زیر ساخته می‌شد.

ماده	مقدار (برای غلظت x ۱۰)
کلرید آمونیوم (NH Cl)	۱۵۵ μm (۲/۲۹ g)
کربنات پتاسیم $KHCo_3$	۱۰ μm (۱ gr)
ماده ضد انعقاد EDTA	۰/۱ μm (۰/۵ gr)
فالکون ۵۰	۲ عدد
فیلتر	۱ عدد
سرنگ	۱ عدد

روش ساخت RBC Lysis

برای ساختن استوک اولیه از RBC Lysis ابتدا مواد موردنیاز را وزن کرده و در ارلن ریخته وبا هم مخلوط کرده و سپس 100 cc آب مقطر با استوانه مدرج آب برداشته و به مواد درون ارلن اضافه و سپس مواد و آب با هم مخلوط می‌شد. سپس ارلن حاوی مواد به زیر هود لامینار برده می‌شد. زیر

هود و وسایل را بـا الکـل اسـتریل کـرده و سـپس یـک سـرنگ برداشـته و یـک فیلتـر در جـای سـر سـوزن سـرنگ متصـل مـی‌شـد و از اسـتوک اولیـه RBC Lysis کشـیده و روی فـالکون قـرار داده تـا مـواد از فیلتـر وارد فالکون ۵۰ شود. قطـر صـافی فیلتـر ۲۲ میکـرون اسـت یعنـی مـواد بزرگتـر از ۲۲ میکـرون از آن عبـور نمی‌کند. با اتوکلاو یا آون خشک یا فیلتـر اسـتوک را اسـتریلیزه کـرده (چـون بـا گرمـا مـواد خـراب مـی‌شـد مـا از فیلتـر اسـتفاده کـردیم کـه مـدت بیشـتری بمانـد) و سـپس فـالکون حـاوی RBC lysis در یخچـال ٤ درجه سانتیگراد نگهداری مـی‌شـد. غلظـت RBC Lysis سـاخته شـده 10x بـود کـه بـرای هـر بـار مصـرف 10 cc از آن را برداشـته و درون اسـتوانه مـدرج ریختـه و بـا آب مقطـر بـه حجـم ۱۰۰ سـی‌سـی رسـانده می‌شـد تـا بـه RBC Lysis بـا غلظـت 1x تبـدیل شـود. و سـپس هـر ۵۰ سـی‌سـی، درون یـک فـالکون ۵۰ منتقل می‌شد.

10 cc RBC Lysis (10x) + 90 cc H_2O_2 100cc (1x RBC Lysis)

پـس از سـاختن RBC Lysis 1x، مقـدار ۱ تـا ۲ سـی‌سـی از CBC را بـا سـمپلر ۱۰۰۰ جـدا کـرده و درون لوله آزمایش ریختـه و سـپس بـه مقـدار ۳ الـی ۵ برابـر بـه آن RBC Lysis اضـافه مـی‌شـد و بـا تکـان‌هـای آرام مخلـوط کـرده و بـه مـدت ۵ دقیقـه در حـرارت آزمایشـگاه زیـر هـود لامینـار قـرار داده و پـس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ با دور ٤۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه صورت می‌گرفت.

پـس از سـانتریفیوژ، محلـول رویـی را دور ریختـه، دگـر رسـوب صـورتی کـم رنـگ بـود دیگـر نیـازی بـه اضافه کردن RBC Lysis و تکرار مرحلـه قبـل نبـود ولـی تـا زمانیکـه رسـوب صـورتی کـم رنـگ نمـی‌شـد مرحله اول باید تکرار می‌شـد تـا رسـوب صـورتی کـم رنـگ یـا سـفید در تـه لولـه بـاقی مـی‌مانـد. پـس از مشـاهده رسـوب مـوردنظر کـه گلبـول سـفید بـود، بـه نمونـه بـافر PBS (phosphatic Buffer solution)

که یک بافر نگهدارنده است، به مقدار ۳ تا ۵ برابر نمونه، ریخته می‌شد که گلبول‌های سفید را نگه دارد و بدون اینکه در محیط آزمایشگاه نگه داشته شود سانتریفیوژ با همان دور ٤٠٠٠ به مدت ۵ دقیقه انجام می‌گرفت. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی دور ریخته می‌شد و درب لوله با پارافیلم فیکس می‌شد و نمونه WBC برای مدت ۲ تا ۳ هفته به فریزر ۲۰- و پس از آن به ۷۰ – درجه سانتیگراد منت می‌شد.

طریقه ساخت بافر PBS:

ماده	مقدار (1 h)
KCl	2 gr
$KH_2 Po_4$	2/4 gr
NaCl	80 gr
Na_2HPo_4	14.4
H_2O_2	1000 cc
HCl و NaOH	به مقدار لازم

PBS یک بافر نگه‌دارنده است که از تغییرات ناگهانی PH جلوگیری می‌کند در واقع یک سرم فیزیولوژیک است. PBS به علت هم غلظت و هم نوع بودن با مواد بیولوژیکی بدن و نیز غیر سمی بودن آن برای سلول کاربردهای بسیاری دارد. PBS را می‌توان در دمای اتاق نگهداری کرد امّا نگهداشتن در یک جای سرد ممانعت از رشد باکتری را تخمین می‌کند حتی اگر محلول ضد عفونی

نشده باشد و برای مدت طولانی نگهداری شود. برای ضد عفونی کردن PBS از اتوکلاو (۲۰ دقیقه، حرارت ۱۲۱ درجه سلسیوس) استفاده می‌شود.

برای ساختن PBS ابتدا 100 cc آب مقطر با استوانه مدرج اندازه گرفته و در درون ارلن ریخته شد سپس مواد لازم را تک‌تک با ترازوی سه صفر وزن کرده و به ارلن اضافه شد سپس حجم مواد را به 950 cc رسانیده و با دستگاه PH متر، PH آن اندازه‌گیری شده و اگر PH اسیدی بود با اضافه کردن باز (NaOH)، PH را به ۷,٤ رسانده می‌شد و اگر PH بازی بود، با اضافه کردن اسید (HCl)، PH به ۷,٤ رسانده می‌شد. پس از تنظیم PH (PH= 7.4) 50 cc آب مقطر مجدد به ارلن اضافه شده و حجم نهایی بافر به 1000 cc می‌رسید. سپس با پارافیلم درب ارلن فیکس شده و برای ضد عفونی کردن در اتوکلاو قرار داده می‌شد و سپس به یخچال ٤ درجه سانتیگراد منتقل می‌شد.

استخراج RNA از گلبول سفید

مواد	مقدار مواد (برای یک نمونه)	وسایل لازم
ترایزول	(میکرولیتر) μl ۱۰۰۰– ۸۰۰	سمپلر ۱۰۰– سمپلر ۱۰۰۰
کلروفرم	۲۰۰ μl	سرسمپلر آبی و زرد
ایزوپروپانول	۵۰۰ μl – ۱۰۰۰ μl	میکروتیوپ ۱/۵ استریل
اتانول ۷۰ یا ۸۰ درجه سانتیگراد	۱۰۰۰ μl	سانتریفیوژ یخچال دار
آب مقطر دو بار تقطیر	۵۰ μl – ۷۰ μl	هود استخراج مجهز به uv
گلبول سفید استخراج شده	–	گاز استریل یا دستهای کاغذی

		دستکش

برای شروع کار ابتدا همه وسایل موردنیاز که در جدول بالا ذکر شده است زیر هود قرار داده و uv دستگاه را روشن شد تا وسایل و محیط زیر هود استریل شود. پس نمونه‌ها از فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد خارج شده و به زیر هود منتقل شد.

۱) مقدار ۸۰۰ میکرولیتر ترایزول با سمپلر ۱۰۰۰ و سرسمپلر آبی اتوکلاو شده برداشته و روی نمونه ریخته و چند بار تیپاژ شد و سپس با همان سمپلر به درون میکروتیوپ ۱/۵ میکرولیتری اتوکلاو شده، منتقل شد.

۲) به مدت حداقل ۵ دقیقه در زیر هود در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا سلول‌ها لیز شود.

۳) بعد از ۵ دقیقه، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه اضافه شد و نمونه به مدت ۱۵ ثانیه به شدت مخلوط شد.

٤) پس از مخلوط شدن به مدت ۳ دقیقه در حرارت آزمایشگاه زیر هود قرار داده شد.

۵) پس از ۳ دقیقه، نمونه‌ها برای سانتریفیوژ با دور RPM ۱۳۰۰۰ و زمان ۱۵ دقیقه و دمای ٤ درجه سانتیگراد، به سانتریفیوژ یخچال‌دار منتقل شدند.

٦) پس از سانتریفیوژ، محلول رویی داخل میکروتیوپ جدید استریل اضافه شد و رسوب اوت شد.

۷) ۸۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول (یا اتانول خالص و سرد) به محلول رویی اضافه شد و ۳ الی ۵ بار به آرامی مخلوط شد.

۸) میکروتیوپ‌ها (نمونه‌ها) به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۲۰ – درجه سانتیگراد قرار داده شد.

۹) پس از ۲٤ ساعت، نمونه‌ها از ۲۰- درجه خارج شده و به سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور ۱۳۰۰۰RPM و زمان ۱۵ دقیقه و دمای ٤ درجه سانتیگراد منتقل شده و سانتریفیوژ انجام شد.

۱۰) پس از سانتریفیوژ، محلول رویی دور ریخته شد.

۱۱) به رسوب درون میکروتیوپ ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول سرد ۷۰ درجه اضافه شد و ۳ الی ۵ بار به ارامی مخلوط شد.

۱۲) سپس نمونه با دور RPM ۱۰۰۰۰، زمان ۱۰ دقیقه و دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد.

۱۳) پس از سانتریفیوژ محلول رویی دور ریخته شد و میکروتیوپ‌ها به صورت برعکس روی یک لایه گاز استریل زیر هود قرار داده شد تا اتانول تبخیر شود.

۱٤) پس از تبخیر کامل اتانول، مقدار ۷۰-۵۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده‌ی استریل با سمپلر ۱۰۰ و سر سمپلر زرد، به نمونه‌ها اضافه شد.

۱۵) نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵- ۵۰ درجه سانتیگراد درون دستگاه آون که از قبل روشن شده بود قرار داده شد.

۱٦) پس از خارج کردن نمونه‌ها از آون، نمونه‌ها در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد برای انجام مراحل بعدی نگهداری شد.

۲-استخراج RNA از بافت ها توسط کیت GeneAll :

- ✓ ابتدا در داخل هاون بافت مورد نظر و ازت مایع ریخته و آن را به صورت مکانیکی با دسته هاون له کرده تا به صورت پودر در بیاید.
- ✓ پودر حاصله را در داخل یک میکروتیوب 1.5cc استریل ریخته و سپس به آن مقدار ٤٠٠µl از محلول لیز کننده سلول و ۱۰ µl بتامرکاپتو اتانول را به ویال محتوی بافت پودر شده اضافه شده و ویال به آرامی سر و ته شد و به مدت ۱۰ دقیقه زیرهود در دمای اتاق قرارداده شد تا غشای سلول ها لیز شوند. اضافه کردن این محلول لیزکننده باعث تخریب غشاء سلولی و رها شدن محتویات سلولها و آزاد شدن RNA سلولی و همچنین مهار آنزیم Rnase می شود.
- ✓ محتویات این ویال به ستون دارای فیلتر ، در ستون استخراج RNA منتقل شد و سپس به مدت۱دقیقه، میکروتیوب با دورRPM۱۱۰۰۰ سانتریفوژشد. مایعات رد شده از فیلترکه درکف تیوب جمع آوری تجمع یافته بود ،کاملا دور ریخته شد.
- ✓ ٤٠٠ µl از محلول GW1 به فیلتر اضافه گردید و سپس سانترفیوژ با دورRPM ۱۱۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه انجام شد و مایع تجمع یافته در تیوب جمع آوری ،دور ریخته شد.
- ✓ ۷۵۰µl از بافر RNW به فیلتر اضافه گردید و سپس سانترفیوژ با دورRPM ۱۱۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه انجام شد و مایع تجمع یافته در تیوب جمع آوری ،دور ریخته شد.
- ✓ مجدداً سانترفیوژ با دورRPM ۱۱۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه انجام شد و بار دیگر مایع تجمع یافته در تیوب جمع آوری ،دور ریخته شد.
- ✓ ستون استخراج، به میکروتیوب ۱,۵میلی لیتر استریل و عاری ازRNase منتقل گردید. مقدار ۳۰میکرولیتر ، آب عاری ازRNase داخل ستون ریخته

شد.

لازم به ذکرمی باشد که در این مرحله باید دقت شودکه سرِسمپلرتا حد ممکن به فیلتر واقع در ستون نزدیک شود تا آب به طور دقیق به مرکز فیلتر وارد شود. ۱دقیقه زمان داده شد تا فیلتربه طورکامل از آب اشباع شود. سانترفیوژ با دورRPM ۱۱۰۰۰به مدت ۱ دقیقه انجام شد تا RNA متصل شده به فیلتر به طورکامل شسته شده و از فیلتر جدا ودرکف میکروتیوب ۱,۵میلی لیتر تجمع یابد.

مایع تجمع یافته در ته ویال، تنها حاوی RNA بوده و پس ازبستن درب ویال ، با استفاده از پارافیلم درب ویال را مسدود کرده و ویال به فریزر۷۰- منتقل گردید.

آشکارسازی و تجزیه و تحلیل محصول PCR

PCR ، تقلیدی از عمل همانند سازی، واما درشرایط In-Vitro است. محصول PCR یا آمپلیکون شامل قطعه ای از DNA میان دو پرایمر و تکثیر شده توسط پرایمر جلویی و عقبی است و دارای طول مشخصی است. بعد از تکثیر محصول، بایستی بروشی آن را شناسایی نمود. راههای مختلفی جهت تجزیه وتحلیل محصول PCR ، بسته به نوع اطلاعات مورد نیاز وجود دارد.

۱) حضور یا عدم حضور سکانس DNA هدف

۲) طول قطعهٔ تکثیرشده

۳) بررسی میزان یا مقدار محصول PCR جهت مشخص نمودن DNA یا RNA اولیه

٤) تجزیه وتحلیل سکانس، بوسیلهٔ پروبها یا بوسیلهٔ تعیین ترادف مستقیم محصول

در برخی روشهای PCR، طول محصول از قبل مشخص نیست لذا باید به روش قدم زدن کروموزومی یا RACE-PCR (تکثیر سریع انتهاهای مکمل DNA) اطلاعاتی را از قبل به دست آورد و سپس بر اساس این اطلاعات ناقص،PCR را انجام داد.

چهار روش اصلی درشناسایی و تائید محصول PCR عبارتند از (Persing2003) :

۱- الکتروفورز در ژل آگاروز یا پلی آکریل آمید

۲- هضم آنزیمی محصول وسپس الکتروفورز

۳- هیبریدیزاسیون

٤- تعیین ترادف

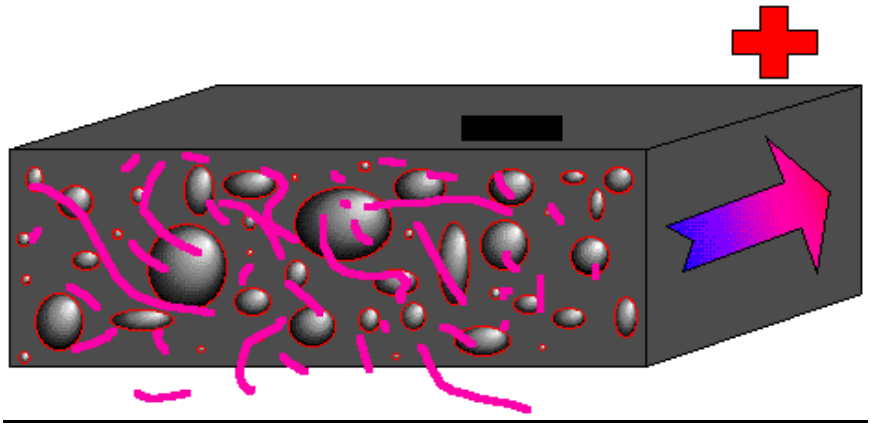
الکتروفورز

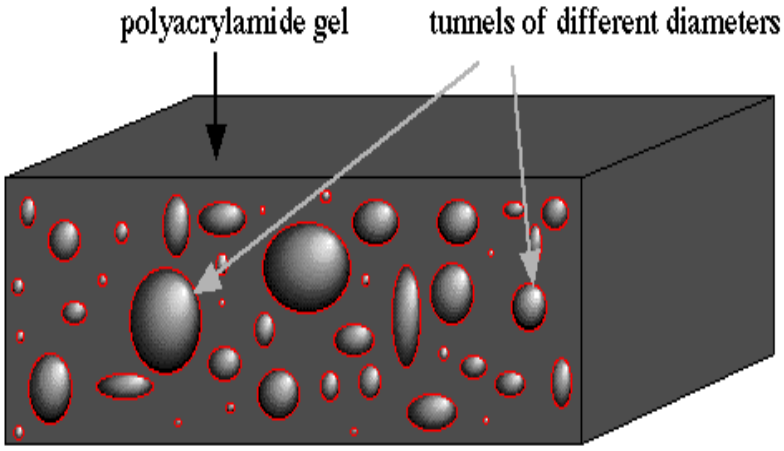
محصول PCR به طور معمول کوچکتر از ۱۰Kbp ، ومعمول Kbp ۳-۰/۲ است. روش معمول جهت مشخص کردن و دیدن محصول PCR ، الکتروفورز آن در آگاروز یا ژل پلی آکریل آمید و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید می باشد.

اتیدیوم بروماید یک رنگ فلوئورسنس است و توانایی وارد شدن در DNA دو رشته ای را دارد. بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، ژل بر روی دستگاه ترانس ایلومینیتور گذاشته و باندهای DNA،آشکار میشود. میتوان از ژل عکس تهیه نمود. در ژل سایز مارکر و همین طور کنترل مثبت و منفی PCR نیز الکتروفورز میگردد تا بتوان هم اندازه دقیق محصول و هم صحت انجام آزمایش را اثبات نمود.

جهت دیدن محصول PCR در ژل باید از آگاروزهای استاندارد (DNA-grade) استفاده نمود. با این حال، ژلهای آگاروز با قدرت تفکیک بالا (مثل FMCBioproductsNusieve) توانایی جداسازی و مشاهده قطعات ۱۰ bP-۲ KbP را دارند و جهت تفکیک بیشتر محصولات کوچک PCR، میتوان از آنها استفاده نمود. برای محصولات کوچک از نظر اندازه، یا تفکیک بین محصولات کوچک و نزدیک از لحاظ اندازه، از ژل پلی آکریل آمید استفاده می‌شود.

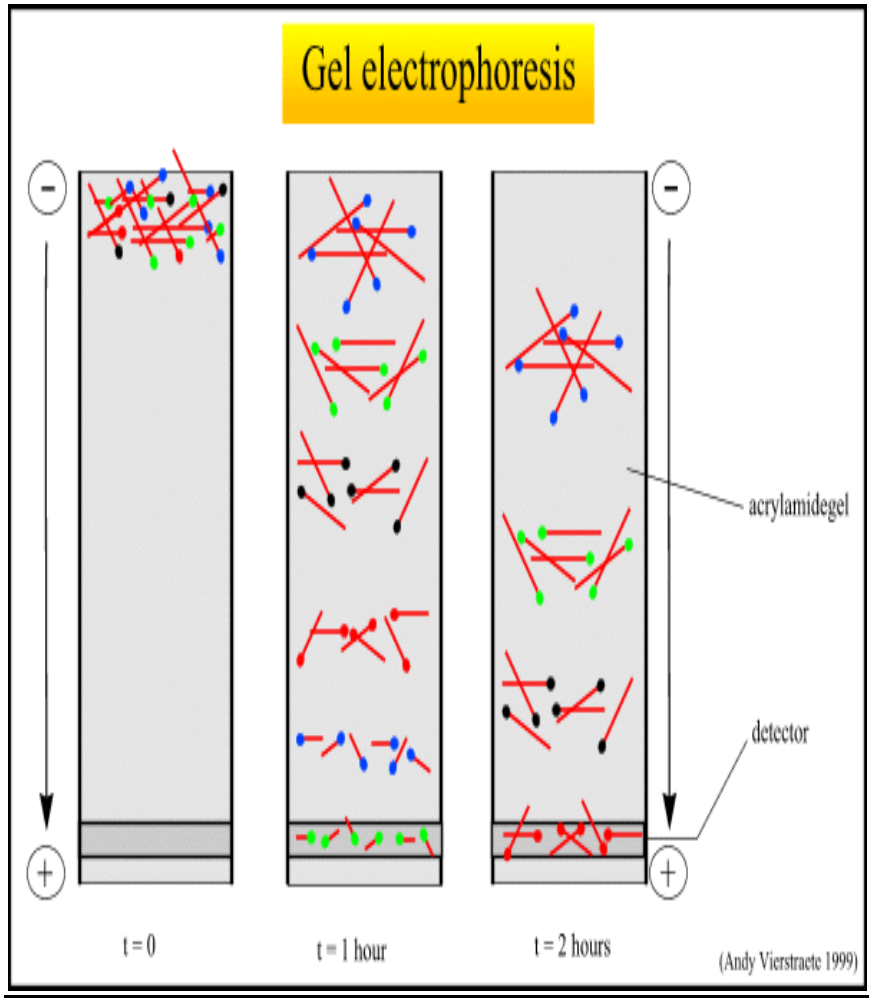
ساده ترین روش جهت تائید وشناسایی محصول PCR، کاربردتکنیک الکتروفورز است. حرکت ذرات باردار دریک محیط مایع یا نیمه جامد، تحت تاثیر یک پتانسیل الکتریکی (جریان برق) را الکتروفورز گویند. این تکنیک عمدتا برای جدا سازی پلی نوکلئوتیدها(DNA,RNA) و پروتئین ها بکار گرفته می شود(شکل ۱).





شکل ۱. الکتروفورزیس

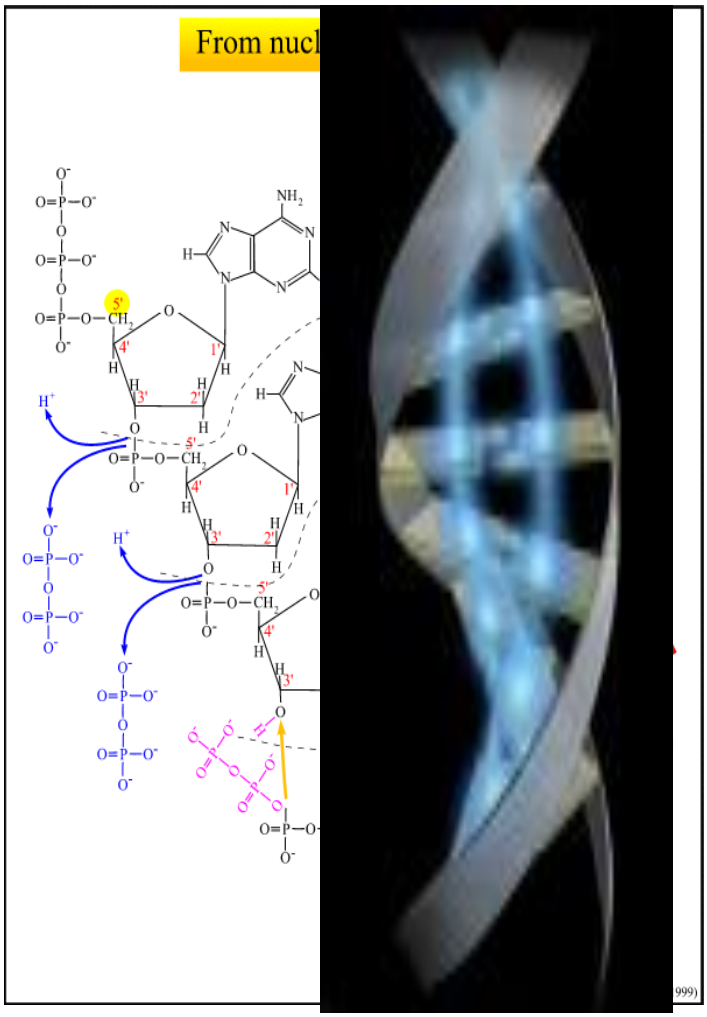
اصول زیربنایی الکتروفورز بسیار ساده است. اگر دو الکترود را درمحلول حاوی یک الکترولیت و سوسپانسیون از ماکرومولکولها با بارهای متفاوت قرار دهیم میدان الکتریکی ایجاد شده توسط این دو الکترود به ماکرومولکولها، نیروی متفاوتی درامـتداد میدان وارد می نماید. مقدار نیروی وارد شده به هر ماکرومولکول، نسبت مستقیم با مقدار بار الکتریکی آن واختلاف پتانسیل الکتریکی بین دو الکترود دارد. ماکرومولکولهای مختلف مانند اسید های نوکلئیک، دریک میدان الکتریکی باشدت میدانی ثابت، دارای سرعتهای حدی مختلفی هستند یعنی علاوه بر بارالکتریکی ذرات، فاکتورهای متعدد دیگری مانند اندازه، شکل ، جریان الکتریکی و ماهیت ومقاومت محیطی که اسیدهای نوکلئیک درآن الکتروفورز می شود در میزان حرکت آنها موثر می باشد(شکل ۲).



شکل۲. الکتروفورز اسیدهای نوکلئیک در ژل.

شارژ الکتریکی

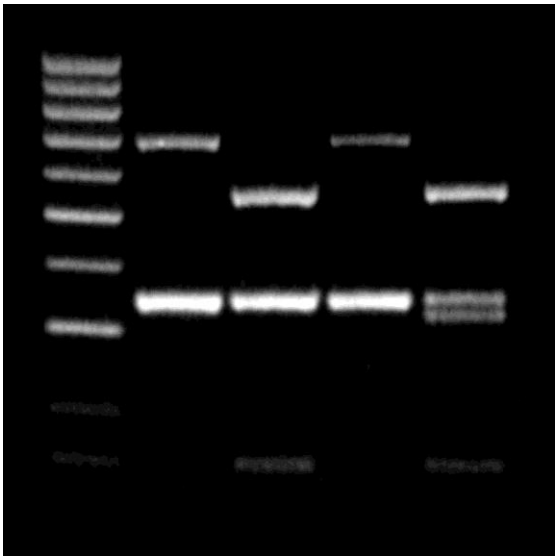
واحدهای سازنده مولکولهایی مانند DNAوRNA بدلیل غنی بودن از فسفات، دارای شارژ الکتریکی منفی می باشند ولذا دریک میدان الکتریکی، براساس شارژ حرکت می نمایند (شکل۳).

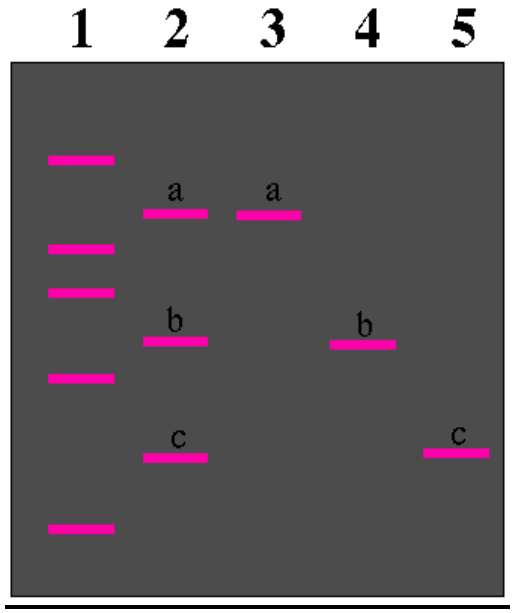


شکل ۳. نوکلئوتیدها یا واحدهای سازنده مولکول DNA

سایز یا اندازه

فاکتوردوم تاثیرگذار درحرکت مولکولهای اسید نوکلئیک دریک میدان الکتریکی،اندازۀ قطعات DNA و RNA است. به نوعی که قطعات DNA بزرگتر به کندی، وقطعات DNA کوچکتر سریعتر حرکت می نمایند(تصویر ٤).





شکل ٤- میزان حرکت پلی نوکلئوتیدها در الکتروفورز وابسته به اندازه آنها هم می باشد.

شکل

فاکتورمهم سوم که درمیزان حرکت الکتروفورتیک قطعات DNA تاثیر می گذارد، شکل مولکولهای DNA است. بطور مثال پلاسمیدها که قطعات DNA دو رشته ای مار پیچ حلقوی وتاخورده ای در باکتریها می باشند به سه فرمDNA دو رشته ای حلقوی کاملا تا خورده CCC ، حلقه باز شده OC و خطی L ،قابل مشاهده شدن می باشند. بدین معنی که وقتی پلاسمیدی از یک باکتری، مثلا به روش قلیایی استخراج شود ودر ژل آگاروز الکتروفورز گردد عموما سه باند CCC (DNA دو رشته ای حلقوی تاخورده و کوچک، با سرعت بیشتر) ، OC (مولکول دورشته ای حلقوی بازشده ازطریق یک Nick، که با سرعت کمتری بدلیل باز شدن از شبکه های بین ژل آگاروز یا آکریل آمید حرکت می نماید)، و L (مولکول DNA دورشته ای خطی شده، که دارای حرکت کندتری عموما نسبت به فرم OC است) قابل مشاهده شدن در ژل می باشد.

ماهیت محیط الکتروفورز

فاکتورمهم چهارم وتاثیرگذار درالکتروفورز، مسئله ساپورت وبسترالکتروفورز است. برخـی بستر ها، مانند کاغذو استات سلولز، مواد را صرفا براساس بارالکتریکی از هم جدا می نمایند. برخی بستر ها، مانند ژل آگاروز

وژل پلی آکریل آمید، ماکرومولکولها را برحسب وزن مولکولی وشارژ الکتریکی از هم جدا می نمایند. الکتروفورز DNA را می توان درژل آگاروز، پلی آکریل آمید یا ژل آگاروز / پلی آکریل آمید انجام داد.

الکتروفورز DNA درژل آگاروز

آگاروز یک پلی ساکارید است که از واحدهای تکرار شونده آرابینوز دی ساکارید تشکیل شده است. هنگامی که پودر آگاروز در اثر حرارت در بافر خود به حالت ژل در می آید در واقع شکل مولکولهای پلیمر، از حالت حلقوی نامنظم به شکل مولکولهای مارپیچی دوتایی، در می آیند. این پدیده یک شبکه از منافذ با قطر ۱۰۰ الی ۳۰۰ نانومتر تولید می نماید که اندازه این منافذ به عوامل متفاوتی بستگی دارد. غلظت بالاتر آگاروز منافذ ریزتر به وجود می آورد که قدرت تفکیک اندازه DNA که می تواند با آن بررسی شود را کاهش می دهد.

آگاروز را می توان برای جداکردن قطعات DNA بین ۱۰ (ژل6%) الی ۸۰۰۰۰۰ (ژل یک دهم درصد) جفت باز بکاربرد. هرچند که کاربا ژل کمتراز ۰/۷ ٪ بسیار مشکل وجابجایی آن به سختی انجام می شود وبرای قطعات بالای ۵۰kbp-۴۰ هم بهتراست از تکنیک پالس فیلد ژل الکتروفورزیس استفاده شود (جدول ۱).

جدول (۱): طیف جداسازی DNA خطی در ژل آگاروز.

Agarose concentration (%)	Effective separation range for linear DNA molecules
0.3	5-50 kb
0.6	1-23 kb
0.8	800 bp-10 kb
1.0	400 bp-8 kb
1.2	300 bp-7 kb
1.5	200 bp-4 kb
2.0	100 bp-3 kb
3.0	100 bp-1 kb
4.0	50-500 bp
5.0	10-500 bp
6.0	10-100 bp

سرعت حرکت DNA نسبت مستقیم با ولتاژ مورد استفاده دارد که البته این نسبت خطی نیست. ژلها معمولا در میدان الکتریکی V/cm ۱۰-٤ ،الکتروفورز میشوند. توجه داشته باشید که منظور از سانتیمتر، فاصله میان دو الکترود ژل است. برای جدا سازی قطعات بزرگتر باید شدت میدان الکتریکی را کاهش و زمان الکتروفورز را افزایش داد (شدت میدان الکتریکی را می توان تا ۱V/cm کاهش داد). اگر شدت میدان الکتریکی زیادتر از معمول به کار گرفته شود ژل آگاروز تخریب شده و باندهای DNA به صـــورت منـتشردیده خواهند شد. معمولا الکتروفورز دردمای آزمایشگاه انجام می گیرد. درولتاژهای بالا ممکن است حرارت افزایش یابد واین امرباعث می شود که بندها،حالت کشیده پیدا کنند. برای یک ولتاژ ثابت می توان با کاهش غلظت بافر، شدت جریان را کم کردوبه این ترتیب گرمای کمتری ایجاد می شود. میزان ولتاژ مورد استفاده، بستگی به اندازهٔ قطعات، زمان و درجهٔ تفکیک بندها دارد. عموما قطعات بزرگ با کاهش ولتاژ و افزایش زمان الکتروفورز بهتراز هم تفکیک می شوند. قطعات کوچکتر سریعتر در ژل پراکنده می شوند بنابراین بهتراست که با ولتاژ بالا وزمان کمترکارکرد.

غلظت و طول ژل ، هردو برروی تفکیک بندها اثردارند. هرچه قطعات بیشتربرروی ژل حرکت کنند، تفکیک بین آنها بیشتراست. با این حال با افزایش طول ژل باید زمان راهم زیاد کردویا ولتاژ را افزایش داد که به ترتیب باعث پراکندگی قطعات کوچک درژل شده وبندها خوب از هم جدا نمی شوند. عموما جدا شدن بندها درژلهای غلیظ تر بهترانجام می شود اما قطعات بزرگ درچنین ژلهایی آهسته حرکت می کنند. باید درنهایت تعادلی بین طول ژل، غلظت ژل ، ولتاژ وزمان ایجاد کرد.

با استفاده از مارکر استاندارد، اندازه مورد نظر محصول PCR، قابل بررسی و ارزیابی است. مارکرهای DNA در اندازه های مختلف به طور تجارتی قابل تهیه می باشند. معمولا از قطعات حاصل از هضم DNA ویروسی یا پلاسمیدی توسط آنزیم های محدود کننده (RE)، استفاده می شود. طول این قطعات مشخص است وباید براساس نوع کار وDNA ، مارکرهای مناسبی استفاده شود که طول قطعهٔ مورد نظر در محدوده وطول قطعات مارکر باشد.

رنگ آمیزی ژل آگاروز می تواند بعد از اتمام الکتروفورز با انتقال آن به تانک حاوی رنگ اتیدیوم بروماید با غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر انجام گیرد.

اتیدیوم بروماید در داخل رشته های DNA جایگزین می شود و با نور UV، که بوسیلهٔ دستگاه ترانس ایلومینیتورایجاد می شود رنگفلورسنت در محلی که باندهای DNA قرار دارند دیده می شود. رنگ اتیدیوم بروماید را می توان هنگام الکتروفورز به بافر تانک نیز اضافه نمود. در این حالت به دلیل اینکه اتیدیوم بروماید بار مثبت پیدا میکند برخلاف جهت حرکت DNA به سمت کاتد خواهد رفت و با توجه به این که مولکولهای آن در رشته های DNA کاملا جایگزین می شود در حرکت DNA به سمت آند ایجاد ممانعت کرده و آن را کند مینماید. این وضعیت بویژه هنگام الکتروفورز DNA پلاسمیدی قابل توجه است زیرا الگوی باندهای پلاسمیدی هنگامی که در مجاور اتیدیوم بروماید الکتروفورز انجام می شود و بدون آن کاملا متفاوت است. در DNA پلاسمیدی سه حالت DNA خطی، حلقوی و سوپر کویل وجود دارد که در حالت عادی سوپرکویل بعلت این که اندازه کوچکتری دارد سریعتر حرکت میکند در حالیکه در مجاور اتیدیوم بروماید بدلیل جذب بیشتر این ماده به داخل خود حرکت آن کندتر می شود و تفکیک سه نوع DNA با ژل آگاروز با الگوی کمی متفاوت دیده میشود.

بررسی کمی DNA و RNA :

با استفاده از اسپکتروفتومتر و یا نانودراپ انجام می شود.

پس از استخراج RNA و DNA باید مقدار و خلوص آنها را مشخص کرد.

۱- اسپکتروفتومتر :

ابتدا مقدار ۱۰ میکرولیتر نمونه استخراج شده را با ۹۹۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط می شود و سپس جذب نوری (Optical Density = OD) نمونه را در طول موج های۲۳۰ و ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده می شود.

dsDNA concentration = 50 μg/mL × OD_{260} × dilution factor

ssDNA concentration = 33 μg/mL × OD_{260} × dilution factor

oligoneucleotide concentration = 20-30 μg/mL × OD_{260} × dilution factor

RNA concentration = 40 μg/mL × OD_{260} × dilution factor

همراه نمونه استخراج شده ممکن است ناخالصی پروتیینی و غیر پروتیینی باشد.

ناخالصی پروتیینی :

ابتدا OD260nm را بر OD280nm تقسیم می کنیم و اگر حاصل این عبارت ۲-۱٫۸ باشد می توان گفت که نمونه استخراج شده آلودگی پروتیینی ندارد و اگر کمتر از آن باشد ناخالصی پروتیینی دارد.

ناخالصی غیر پروتیینی :

ابتدا OD260nm را بر OD230nm تقسیم می کنیم و اگر حاصل این عبارت ۲٫۲-۲ باشد می توان گفت که نمونه استخراج شده آلودگی غیرپروتیینی ندارد و اگر کمتر از آن باشد ناخالصی غیرپروتیینی دارد.

سنتز cDNA :

در واکنش PCR نمی توان از RNA به عنوان الگو استفاده کرد و به همین دلیل ابتدا باید از روی RNA بتوان DNA ساخت و سپس از آن استفاده کرد و به DNAیی که از روی RNA ساخته می شود DNAی مکمل یا cDNA یا Complementary DNA گفته می شود.

رای ساخت و سنتز cDNA از آنزیم رونوشت معکوس یا Reverse Transcriptase (RT) استفاده می شود که از روی رشته RNA می تواند DNA بسازد.

رشته DNA مکمل یا cDNA، رشته هایی از جنس DNA بوده که در طی واکنشی به نام نسخه برداری معکوس یا reverse transcriptionاز روی رشته های RNA ، به طور خاص mRNA ، ساخته می شوند و چون توالی آن ها مکمل mRNA می باشد به آن Complementry DNA یا cDNA گفته می‌شود.

از cDNA برای کلون کردن ژن در سلول‌ها، ساختن کتابخانه cDNA و یا به عنوان پروب در آنالیز ژن‌ها استفاده می‌شود. یکی از مهم‌ترین کاربردهای cDNA، بررسی سطح بیان ژن ها به صورت کمی می باشد.

بررسی تغییرات بیان ژن ها در یک سلول یا بافت در دو سطح RNA و پروتئین قابل بررسی و اندازه گیری می باشد. در هر زمان یا شرایطی، محتوای RNA و به طور خاص mRNA های یک سلول یا بافت بیانگر ژن هایی است که در آن سلول یا بافت بیان می شوند. بنابراین با اندازه گیری میزان بیان mRNA ها به روش هایی مانند RT-PCR یا Real Time PCR می توان به بررسی تغییرات بیان ژن در هر سلول یا بافتی اقدام نمود. به این منظور لازم است محتوای mRNA سلول یا بافت مورد نظر به وسیله روش های استخراج RNA به دست آید، اما در واکنشPCR ، آنزیم DNA پلیمراز به الگویی از جنس DNA نیاز دارد بنابراین mRNA ها نمی توانند مستقیما به عنوان الگوی واکنش PCR مورد استفاده قرار گیرند. در نتیجه در طی واکنش توسط آنزیم های نسخه بردار معکوس (Reverse transcriptase) از رشته های mRNA ، رشته DNA مکمل (cDNA) ساخته می شود.

واکنش سنتز cDNA شامل مواد زیر می باشد:

- بافر RT مخصوص آنزیم نسخه بردار معکوس
- آنزیم RT که معمولا از آنزیم های نسخه بردار معکوس با منشا ویروسی استفاده می گردد نظیر MMLV، AMV و HIV-1
- چهار نوع نوکلئوتید
- پرایمرهای مخصوص سنتز cDNA که معمولا شامل دو نوع پرایمر عمومی Olio dT و random hexamer و یا پرایمر اختصاصی طراحی شده برای mRNA هدف (specific primer) می باشند.

رشته های cDNA در محدوده دمایی مناسب برای فعالیت آنزیم های RT یعنی ۳۷ الی ۵۰ درجه سانتی گراد ساخته می شوند که پس از آن غیر فعال سازی آنزیم در دمای حدود ۷۵ الی ۹۵ درجه سانتی گراد صورت می گیرد cDNA .های ساخته شده در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد به مدت طولانی قابل نگهداری می باشند.

واکنش زنجیره ای پلیمراز(Polymerase Chain Reaction = PCR)

تا حدود دو دهه پیش، تولید میلیونها کپی از یک ترادف اسید نوکلئیک در آزمایشگاه و یا همانند سازی از یک ترادف اسید نوکلئیک در لوله آزمایش، افسانه ای بیش نبود. اولین گزارش درباره توضیح اجزای اساسی و لازم برای تولید کپی های متعدد از یک ترادف اسید نوکلئیک در آزمایشگاه در سال ۱۹۷۱ توسط کلپ وهمکارانش ارائه شد.

از قرار معلوم، کار این دانشمند دارای نتیجه چندان مثبتی نبود و بنابراین این مفهوم تا مدتها در تحقیقات و نوشته ها پنهان ماند. سرانجام در سال ۱۹۸۳ دانشمندان آمریکایی موفق به تولید میلیونها کپی از اسید نوکلئیک در آزمایشگاه شدند و این فرآیند را واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) نامیدند. کری مولیس ابداع کننده PCR در سال ۱۹۹۳ جایزه نوبل شیمی را به دلیل تحقیقاتش دریافت نمود.

در واکنش زنجیره ای پلیمراز، مولکول هدف (DNA یا RNA) به طور آنزیماتیک به تعداد زیادی همانند سازی می گردد تا میزانی که بتوان محصول را با روشهایی مثل الکتروفورز در ژل آشکار نمود.

اولین و شاید بتوان گفت مهمترین و بهترین سیستمی که در آن مولکول هدف افزایش تعداد می یابد، تکنیک PCR می باشد. PCR از نظر اصول عملی، تشابه زیادی به همانند سازی DNA دارد و در واقع برگرفته از آن است. در این تکنیک اصول همانندسازی DNA در داخل سلول تقلید و تکرار می شود.

تکنیک PCR شامل سیکلهای تکرار شده‌ای است که در آن به کمک یک سری پرایمر، و با کمک آنزیم از روی یک DNA الگو، عمل همانند سازی انجام می‌گیرد. پرایمرها، مکمل بخشهایی از دو رشته DNA هدف می باشند. پرایمرها زمانی که دو رشته DNA بوسیله حرارت، واسرشت شود با کاهش دما در مرحله بعد به سکانسهای خاص مکمل خود می‌چسبند.

عناصر لازم جهت همانند سازی اسیدهای نوکلئیک در شرایط آزمایشگاه یا داخل لوله، همانهایی هستند که در عمل همانند سازی در داخل سلول و بطور طبیعی، مورد استفاده واقع می گردد یعنی:

۱) DNA یا RNA الگو

۲) پرایمرها یا قطعات کوچک DNA جهت تکثیر

۳) چهار باز سازنده DNA یا dNTPs (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)

٤) آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت مثل Taq-DNA Polymerase

٥) وجود شرایط بافری مناسب و یون Mg^{2+}

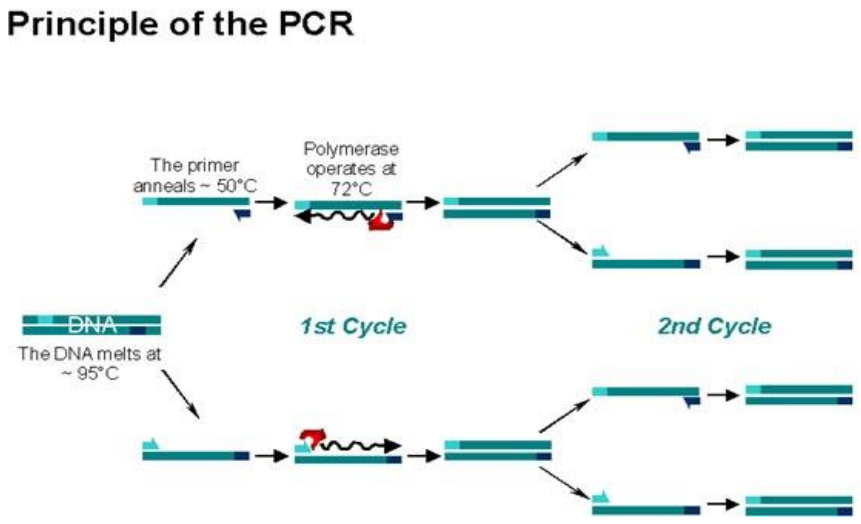
بطور کلی هر سیکل PCR شامل سه مرحله می‌باشد :

١) مرحله باز شدن یا واسرشت شدن دو رشته

٢) چسبیدن پرایمرها به هدف

٣) ساخت رشته مکمل هدف

سه مرحله فوق بطور اتوماتیک در دستگاهی بنام ترموسایکلر که قابل برنامه ریزی می‌باشد صورت می‌گیرد.



یک پروتکل تیپیک PCR شامل ٤٠-٢٥ سیکل حرارتی است. از نظر تئوری، در هر سیکل، تعداد سکانسهای هدف دو برابر می‌شود. بنابراین تکرار سیکلهای حرارتی باعث افزایش سکانس هدف با شکل تصاعدی می‌گردد (جدول٢) .

فرآورده‌های حاصل را می توان از طریق بررسی اندازه، هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدود کننده، تعیین ترادف و هیبریدیزاسیون ، روشهای کروماتوگرافی مانند HPLC ، وارد شدن رنگهایی مانند اتیدیوم بروماید یاسایبر گرین یک در داخل DNA دو رشته ای ، بطور دقیق تعیین هویت کرد.

جدول(۲):تعدادمولکولهای سنتزشده درمورد یک الگوی DNA دورشته‌ای درتکنیکPCR

Cycle number	**Products present at the end of this cycle**		Cycle	**Products present at the end of this cycle**	
	Short products	**Long products**	**Number**	**Short products**	**Long Products**
1	0	2	21	7339944	42
2	2	4	22	14679972	44
3	12	6	23	29360032	46
4	36	8	24	58720160	48
5	88	10	25	117440420	50
6	196	12	26	234880944	52
7	416	14	27	469761996	54
8	860	16	28	939524104	56
9	1752	18	29	1879048324	58
10	3540	20	30	3758096768	60
11	7120	22	31	7516193660	62
12	14284	24	32	15032387448	64
13	28616	26	33	30064775028	66
14	57284	28	34	60129550192	68
15	117626	30	35	120259100524	70
16	229308	32	36	240518201192	72
17	458680	34	37	481036402532	74
18	917428	36	38	962072805216	76
19	1834928	38	39	1924145610588	78
20	3669932	40	40	3848291221336	80

سیکلهای PCR

همانطور که بیان شد واکنش زنجیره ای پلیمراز شامل یک سری سیکلهای تکرار شده می باشد.یک سیکل یا دوره PCR شامل مرحله واسرشت در حرارت بطور معمول۹۵-۹۳ درجه سانتیگراد، مرحله اتصال در حرارت حدود ۷۰-۵۰ °C ، و مرحله طویل سازیدر حرارت ۷۰°C می باشد. به طور خلاصه دو رشته DNA هدف و همچنین پرایمرها و ساختمان ثانویه آنها در مرحله واسرشت از یکدیگر جدا می شوند و در مرحله اتصال با کاهش دما پرایمرها به سکانس هدف اتصال پیدا می کنند. در مرحله ساخت یا طویل سازی در دمای بهینه فعالیت آنزیم Taq-DNAPolymerase که ۷۲ °C است، سنتز زنجیره مکمل انجام می گیرد. تنظیم حرارت در دماهای مورد نظر و زمان و همچنین تعداد سیکل که معمولا بین ۲۵ تا ٤٠ سیکل است با استفاده از دستگاه PCR یا ترموسایکلر انجام می شود.

به طور معمول دمای ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه برای این مرحله در نظر گرفته می شود. در برخی موارد دمای ۹۷ °C یا بالاتر به مدت ۱۵-۱۰ ثانیه نیز مورد استفاده قرار می گیرد که در موارد بررسی DNA هدف با GC بالا است. در حقیقت زمان ۲-۱ ثانیه برای جدا شدن رشته های DNA از یکدیگر کافی است اما با درنظر گرفتن زمان مرده برای انتقال دما به داخل و تمام نقاط لوله واکنش و اطمینان از جدایی کامل رشته های DNA، زمان بیشتری را در نظر می گیرند. چنانچه زمان یا دمای کافی در این مرحله در نظر گرفته نشود، باز نشدن کامل رشته های DNA باعث کاهش کارایی واکنش شده و از طرف دیگر تولید محصولات غیر اختصاصی را افزایش می دهد.

اگر در مرحله واسرشت، دما بسیار بالا و یا زمان آن طولانی باشد موجب از دست رفتن و غیر فعال شدن مواد موجود در واکنش شده و فعالیت آنزیم را کاهش می دهد. نیمه عمر آنزیم Taq-DNA-Polymeraseدر ۹۷/۵ درجه سانتیگراد ۵ تا ٦ دقیقه، در ۹۵ درجه سانتیگراد ٤٠ دقیقه و در ۹۲/۵ درجه سانتیگراد ۱۳۰ دقیقه می باشد.

اتصال پرایمرها به ملکول DNA هدف یا محصولات PCR در مرحله اتصال انجام می گیرد که بلافاصله بعد از مرحله واسرشت است. با کاهش دما از مرحله واسرشت به تدریج، بیشتر مولکولهای DNA تک رشته، مکمل های خود را پیدا می کنند و با یکدیگر اتصال می یابند. در این مرحله بیشتر پرایمرها به سکانسهای مکمل خود

می چسبند و به علت این که تغییر دما از زیاد به کم انجام می شود ابتدا اتصال اختصاصی اتفاق می افتد و سپس با کاهش بیشتر دما تعداد اتصالات غیر اختصاصی افزایش می یابد.

به علت فعالیت آنزیم Taq DNA polymerase در یک طیف گسترده دما از ۲۰ تا ۸۵ درجه سانتیگراد، در واقع مرحله ساخت بلافاصله بعد از اتصال پرایمر به مکمل خود آغاز می شود. هر چه GC پرایمر، غلظت و طول آن بیشتر باشد دما و زمان در نظر گرفته شده در این مرحله بیشتر خواهد بود که در مورد هر جفت پرایمر و هر سیستم PCR باید به طور اختصاصی محاسبه شود. معمولا زمان۲۰-۵ ثانیه و دمای ^{o}C ۷۲-۵۵ در این مرحله، نتیجه خوبی می دهد. بالاتر بودن دمای اتصال بویژه در سیکلهای اولیه (۵ سیکل ابتدائی) باعث افزایش اختصاصیت واکنش می شود.

مرحله چسبیدن پرایمر، یک مرحله حساس و مهم جهت بهینه نمودن ویژگی PCR است. دمای چسبیدن پرایمر به هدف از طریق دستی یا توسط نرم افزارهای کامپیوتری محاسبه شده و به عنوان دمای آغازین چسبیدن در آزمایشهای اولیه بکار می‌رود؛ با این وجود، دمای چسبیدن مناسب پرایمرها باید بطور تجربی به دست آید.

در تکنیک های تکثیر اسید نوکلئیک، DNA مورد شناسایی می تواند هم مربوط به ارگانیسم زنده و هم غیر زنده باشد. در عین حال در این روشها RNA را هم می توان بوسیله روش تغییر یافته PCR و بنام RT-PCR و یا از تکنیکهای دیگری مانند تکثیر بر پایه سکانس اسید نوکلئیک (NASBA) ، مورد هدف قرار داد که می تواند عفونتهای مایکوپلاسما پنومونیه فعال را شناسایی نماید.

انتخاب آنزیم

ورود DNA پلیمرازهای مقاوم به حرارت در تکنیک PCR یکی از پیشرفتهای مهم در هر چه قابل دسترس شدن این روش در آزمایشگاههای کلینیکی بوده است. DNA پلیمرازها آنزیمهای کاتالیز کننده سنتز زنجیره پلی نوکلئوتیدی از مونومرهای داکسی نوکلـئوزیدتری فسفات، با استفاده از یک الگوی DNA می‌باشند. برای سنتز DNA توسط این آنزیمها همیشه از 5′-P به 3′-OH است. DNA پلیمراز جهت پلیمریزاسیون، برخلاف RNA پلیمراز نیاز به یک DNA کوتاه آغازین به نام پرایمر دارد.

:TaqDNAPolymeras

این آنزیم از پرمصرف ترین DNA پلیمرازهای مقاوم حرارت در PCR است. منبع Taq، باکتری ترموس اکواتیکوس، یک باکتری حرارت دوست است که اولین بار از چشمه آب گرم واقع در پارک ملی سنگ زرد جدا گردید. در درجه حرارت پلیمریزاسیون بهینه (^{o}C ۸۰-۷۰)، این آنزیم قادر است بین ۳۵ الی ۱۰۰ نوکلئوتید در ثانیه سنتز کند.

داکسی نوکلـئوزیدتری فسفات (dNTPs)

یک PCR بطور طبیعی با غلظت حدود ۱۰۰ میکرومول از dNTP انجام می‌شود اگر چه در غلظتهای پایین‌تر dNTP یعنی ۱۰۰-۱۰ میکرومول ، آنزیم Taq دارای صحت بالاتری است با این وجود، غلظت بهینه dNTP ها بستگی دارد به:

-غلظت $Mgcl_2$

-سختی واکنش

-غلظت پرایمر

-طول محصول تکثیر شونده

-تعداد سیکلهای PCR

بافرها و $MgCl_2$

بافرهای متعددی جهت PCR قابل دسترس است. معمولترین بافر مورد استفاده برای Taq و Amplitaq که به شکل 10X ارائه می‌گردد عبارت است از :

* 100 mM Tris-HCl , PH=8.3
* 500mMKCl
* 15 mM MgCl2
* 0.1% (W/V) gelatin

اجزاء بافر مورد استفاده در مورد سایر پلیمرازهای مقاوم حرارت متفاوت است، معذالک اکثر تولید کنندگان، بافر 10X را همراه با آنزیم مربوطه ارائه می‌نمایند.

غلظت نهائی $MgCl_2$ در مخلوط واکنش می تواند متغیر باشد. معمولاً این میزان ۵-۰/۵ mM (متناسب با نوع کار) است. یون Mg^{2+} قادر است با dNTPs یک کمپلکس محلولی تشکیل دهد که برای داخل کردن dNTP ها ضروری است. این یون همچنین فعالیت پلیمرازی را تحریک می کند و دمای ذوب T_MDNA و واکنش متقابل پرایمر/الگو را افزایش می‌دهد. غلظت $MgCl_2$ دارای اثرات عمیقی بر روی ویژگی و محصول PCR می‌باشد. غلظت ۱/۵-۱ mM از $MgCl_2$ معمولاً یک غلظت بهینه است اما در برخی موارد، مقادیر متفاوت Mg^{2+} ممکن است مورد نیاز باشد. بطور معمول، مقدار کم $MgCl_2$ منجر به محصول کم و Mg^{2+} اضافی منجر به جمع شدن محصول غیر اختصاصی می‌گردد.

الگو

DNAهای الگو معمولاً بوسیله محققین وتکنیسین ها تهیه می‌گردد. با این حال، تعداد زیادی از DNAهای ژنومیک، کتابخانه‌های ژنومی(باکتریوفاژلامبدا،کاسمید یا وکتورهای YAC)، کتابخانه‌های cDNA، RNA تام، RNAهای پلی+(A) بطور مثال mRNAهای پلی آدنیله شده و cDNA ها، از منابع مختلف تجاری قابل دسترسند. همچنین DNA و RNA تعداد زیادی از گیاهان و حتی جانوران بطور تجاری قابل دسترس می‌باشند. الگو در PCR ، RNA یا DNA تک یا دو رشته‌ای است. اگر الگو RNA است میتوان از RNAتام یا RNA پلی+(A) جهت سنتز cDNA، قبل از PCR استفاده نمود.

پرایمرها

در اکثر PCRها، پرایمرها برای مکمل بودن بطور دقیق با DNA الگو، طراحی می‌شوند. برای طراحی پرایمر (چه به شکل دستی و یا بوسیله برنامه‌های کامپیوتری نظیر Oligo، PRIMe,DNAsis) یک سری اصول اولیه و ساده در نظر گرفته می‌شود. بطور معمول پرایمرهای مورد استفاده در PCR، اندازه‌ای بین ۲۰ الی ۳۰ نوکلئوتید دارند که منتج به استفاده از دمای چسبیدن بالا در تکثیر شده (سختی زیاد) و در عین حال از لحاظ آماری، تعداد محلهای چسبیدن برای پرایمر حتی در بزرگترین DNA های الگو هم فوق‌العاده کاهش می یابد و حتی به صفر می‌رسد. استفاده از پرایمرهای بزرگتر از ۳۰ نوکلئوتید موجب افزایش ویژگی نمی‌شود. یک پرایمر

تا آنجایی که ممکن است باید تعداد مساوی از هر چهار باز را داشته و مناطق غنی از پلی پورین یا پلی پیریمیدین و موتیفهای تکراری نداشته باشد. سکانس پرایمر نباید موجب ایجاد ساختمان ثانویه در آن گردد. پرایمرهای جلویی و عقبی نباید به هم بچسبند. بخصوص در ناحیه $3'$ پرایمرها، نباید سکانسهای مکمل وجود داشته باشد تا باعث دایمرپرایمری شود.

برخی از روش های PCR

تغییرات متعددی در روش متداول PCR برای افزایش استفاده از آن در روش‌های تشخیصی پزشکی و سایر کاربردهای ژنتیکی ایجاد شده است.

1- Real-Time PCR یا PCR quantitative (PCR کمی)
2- PCR معکوس یا Reverse-Transcriptase PCR (RT-PCR)
3- Multiplex PCR یا PCR چندگانه
4- PCR تودر تو یا Nested PCR
5- High Fidelity PCR

6- سریع PCRیا Fast PCR
7- Hot start PCR
8- GC-Rich PCR
9- دوربرد PCR
10- PCR دیجیتال

کاربردهای مختلف انواع تکنیک‌هایPCR

هر کدام از تکنیک‌های PCR که در بالا معرفی شد، در زمینه‌های مختلف پزشکی و زیست شناسی کاربردهای متعددی دارند. در زیر به برخی از این کاربردها اشاره می‌شود:

۱- شناسایی و شناخت ویژگی‌های عوامل عفونی یا پاتوژن‌ها
۲- تشخیص مستقیم میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌های بیماران
۳- شناسایی میکروارگانیسم‌های رشد یافته در محیط کشت
٤- تشخیص مقاومت ضد میکروبی
٥- بررسی ارتباط‌های بین پاتوژن‌های مختلف
٦- انگشت نگاری ژنتیکی (Genetic fingerprinting) ؛ از این روش در آزمایشات پزشکی قانونی و آزمایش‌های تعیین والدین استفاده می‌شود.

۷- تشخیص جهش(بررسی بیماری‌های ژنتیکی)
۸- شناسایی جهش‌های ژنتیکی (تشخیص بیماری‌های ژنتیکی)
۹- کلونینگ ژن
۱۰- تعیین توالی به وسیلهPCR

برخی روش های متداول PCR

- Real Time PCR

این نوع از PCR به عنوان PCR زمان واقعی و همچنین PCR کمی شناخته می‌شود.

Real-Time PCR نوعی از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ا ستاندارد ا ست که در آن تکثیر و اندازه‌گیری میزان DNA هدف به طور همزمان تو سط د ستگاه Real-Time PCR با ا ستفاده از ترمو سیکلرهای ت شخیص دهنده فلور سانس انجام می شود .رنگ‌های فلور سنت به طور خاص به DNA مورد نظر متصل می شوند و هم زمان با طی روند چرخه‌های PCR به دلیل اتصال به پروب‌های فلور سانس شنا سایی می شوند. در واقع میزان فلورسانس تولید شده متناسب با مقدار DNA تولید شده در واکنش PCR است.

اگرچه مدل‌های مختلفی از دستگاه و روش‌های Real-Time PCR در آزمایشگاه‌ها موجود است اما همه آن‌ها ویژگی‌های مشترکی دارند:

همه این دستگاه‌ها یک بستر استاندارد از چرخه‌های دمایی دارند که در کنار آن یک منبع نوری برای تحریک وجود دارد (معمولاً یک لامپ لیزری یا تنگستن).علاوه بر این، یک دوربین برای تشخیص پرتوهای فلورسانس و رایانه و نرم افزار برای پردازش داده‌های حاصل از انجام چرخه‌های PCR در این دستگاه‌ها وجود دارد. بسته به نوع منبع تحریک موجود و فیلترهای تشخیصی، ممکن است در Real-Time PCR از انواع متفاوتی از رنگ‌های فلورسنت استفاده شود.

دو گونه از رنگ‌های فلورسانسی که به طور متداول در Real-Time PCR مورد استفاده قرار می‌گیرند، شامل موارد زیر هستند:

سایبر گرین یا (SYBR green) : این ترکیب، رنگ فلورسانسی است که به DNA دو رشته متصل می‌شود، اما قادر به اتصال به DNA تک رشته‌ای نیست. زمانی که سایبر گرین به DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود از خود فلورسانس منتشر می‌کند که توسط حسگرهای دستگاه Real-Time PCRقابل شناسایی است.
پروبTaqMan : این پروب از انواع پروب های هیدرولیزی است. در دو انتهای خود دارای دو مولکول فلورفور و خاموش کننده است و در صورت اتصال به DNA دو رشته‌ای می‌تواند از خود فلورسانس نشر دهد که با حسگرهای دستگاه قابل تشخیص هستند.

- PCR معکوس (Reverse Transcriptase)

این تکنیک از PCR برای تکثیر رشته‌های RNA هدف به کار می‌رود. در روش RT-PCR به جای آنزیم Taq پلیمراز از آنزیم رونوشت بردار RNA یعنی آنزیم رونوشت بردار معکوس یا Reverse Transcriptase استفاده می‌شود.

آنزیم رونوشت بردار معکوس می‌تواند RNA را به عنوان الگو قرار داده و از روی آن cDNA بسازد.این مولکول‌های DNA اکنون می‌توانند به عنوان الگوهای واکنش PCR استفاده شوند.

آنزیم‌های رونوشت بردار معکوس از خانواده‌ای از ویروس‌ها به نام رتروویروس استخراج می‌شوند. رتروویروس‌ها دارای ژنومی از جنس RNA هستند؛ به همین دلیل از آنزیم رونوشت بردار معکوس برای همانندسازی و تکثیر ژنوم خود استفاده می‌کنند.تکنیک RT-PCR در بسیاری از تحقیقات پزشکی برای شناسایی ویروس‌هایی با ژنومRNA ، تشخیص rRNA میکروارگانیسم‌های مختلف و سنجش بیان ژن به کار گرفته می‌شود.

- PCR چندگانه

Multiplex PCR نوعی از تکنیک PCR است که در آن بیش از یک توالی هدف با استفاده از چندین مجموعه از پرایمرها در مخلوط واکنش PCR تکثیر می‌شوند PCR چندگانه امکان تکثیر چندین بخش از یک ژن را به صورت هم زمان فراهم می‌کند.

تکنیک PCR چندگانه یک روش، سریع و مقرون به صرفه برای آنالیزهای ژنتیکی است که باید بارها و بارها تکرار شوند .اگرچه تکنیک Multiplex PCR فواید زیادی دارد، بهینه سازی آن به همان اندازه چالش برانگیز

است. از آن جایی که در این روش از چندین پرایمر برای اهداف مختلف استفاده می‌شود، ممکن است این پرایمرها با هم تعامل داشته و به یکدیگر متصل شوند.

- Nested PCR

تکنیک Nested PCR برای اصلاح روش PCR متداول ایجاد شده است؛ به طوری که در این تکنیک دقت، حساسیت و اختصاصیت واکنش افزایش می‌یابد. تکنیک Nested PCR شامل استفاده از دو مجموعه پرایمر است که برای یک رشته هدف واحد طراحی شده‌اند و دو واکنش PCR پی در پی، رشته هدف را تکثیر می‌کنند. مجموعه اول پرایمرها برای ردیابی توالی‌های بالادست رشته هدف و مجموعه پرایمرهای دوم برای شناسایی توالی‌های پایین دست رشته هدف سنتز شده‌اند. در این حالت مجموعه دوم پرایمرها نسبت به مجموعه اول داخلی هستند؛ به همین دلیل است که به این تکنیک Nestedیا PCR تو در تو می‌گویند. مجموعه اول پرایمرها را پرایمرهای خارجی نیز می‌نامند. پرایمرهای خارجی بخش‌های بزرگی از ژن مورد نظر را تکثیر می‌کنند. بخش‌های کوچکی از ژن‌های تکثیر شده در دور اول با پرایمرهای خارجی، به عنوان الگو برای دور دوم PCR با ستفاده از پرایمرهای مجموعه دوم یا پرایمرهای داخلی (پرایمرهای تو در تو) مورد استفاده قرار می‌گیرند.