جلسه اول ازمایشگاه ژنتیک مولکولی

در ازمایشگاه های استاندارد همه کار ها بر اساس SOP است و برای هر چیزی نیاز ان مهم است که دارید یا خیر ولی پروتکل ها کلی تر است یعنی ریز مشخصات را مشخص می کند و طبق ان باید پیش رفت و کیفیت ها و نتایج یکسان می شود

اهمیت درس ازمایشگاه ژنتیک مولکولی برای این است که کشت باکتری ها را اموزش ببینید و استخراج پلازمید و DNA و انواع کار های عملی مهم را یاد گرفت

این ژنتیک مولکولی برای این به وجود امده که تحت مواد ژنتیکی نباشیم یعنی حتی بیماری های ارثی را هم بتوان درمان کرد یا اثراتش را ضعیف تر کرد

مثلا یک بیمار یک ژن معیوب دارد یا پروتئین خاصی نمی سازد ما می اییم با اصلاح توالی های یا یک پروتئین که تولید نمی شود را به ان تزریق و جزئیات را بررسی می کنند یا مثلا تولید زیاد یک پروتئین خاص را با تولید یک پروتئین دیگر که می سازند اثراتش را کم کنند

در جامعه یک بیمار و بیماری وجود دارند که علت ان را نمی دانند ، انها می توانند با بررسی پروتئین ها فرد بیمار و فرد سالم ان را تشخیص دهند

پروتئوم ، به مجموعه پروتئین های که در یک سلول است و تولید می شود می گویند و اگر ان سلول را در بیاوریم پروتئین ها را و پروتئین ها را بررسی کنیم با هم به ان پروتئومیکس می گویند

۲ چیز در ارتباط با پروتئین ها مهم است

۱.سایز پروتئین ها است

۲. بار سطحی که پروتئین دارد

که سایز سلولی را می توان با الکتروفورز استفاده کرد برای DNA و پروتئین ها

الکتروفورز، یک ژلی می سازیم مثل ارگاروز با یک اب جوش حل می شود و وقتی سرد می شود شبکه تشکیل می شود و مثل یک رشته توری عمل می کند و قطعه DNA بزرگ خیلی کند حرکت می کند و قطعه DNA خیلی کوچک سریع تر حرکت دارد در ان شبکه که این روش برای الکتروفورز DNA است

برای الکتروفورز پروتئین ان ژل را با موادی می ریزیم و ترکیب شیمیایی در می اید که ابتدا مونومر و بعد پلیمر می شود و بعد وقتی که پروتئین های ان افراد سالم و بیمار را وقتی می بریم در ان برای فرد سالم تشکیل باند می دهد پروتئین و برای فرد بیمار یک باند نقطه می بینید و این ژل ۲ بعدی است و بعد اینجا ان پروتئین مشخص می شود که عامل بیماری فرد است از ان باند نقطه ای که فرد بیمار احتمالا این پروتئین را نمی سازد و بعد ژل را ذوب و پروتئین را شناسایی می کنند و با سکانس کردن ان و بعد به یک پایگاه داده های پروتئین می دهند اطلاعات را و ان سایت و پایگاه شباهت ان پروتئین را در انسان و سایر موجودات برای ما در می اورد و برای ما علت و اثر بیماری مشخص و بعد می توان درمان کرد

مثلا در ژن یک مو یک ژن دارد و یک توالی ۴ تکه در همه انسان ها یکی هستند و این ها در موجودات حفاظت شده و واژه کانزرواتیو یعنی در موجودات مختلف ان تکه ها را دارند که این نواحی حفاظت شده می توان منشا ژن ها را فهمید

در ژنتیک مولکولی ، در بدن موجودات زنده برای تولید پروتئین باید ابتدا DNA رونویسی شود و بعد RNA ساخته شده در ریبوزوم ها ترجمه شود تا پروتئین به وجود اید

اما برای ساخت پروتئین مصنوعی ۲ روش وجود دارد

۱.به صورت شیمیایی پروتئین بسازید که در این روش سنتز شیمیایی توی ستون های رزین ها اسید امینه اول قرار دارد و بعد بشویید وفعال و ری اکتیو کردن اسید امینه بعدی را بگذارید و هی این کار را تکرار کرد و در این روش و هیچ روشی فرایند ۱۰۰ درصد بازده ندارد و در این روش ممکن است یک اسید امینه با یک اسید امینه واکنش دهد ولی با دیگری خیر و کلا این روش برای ان پروتئین های که حدود ۲۰ اسید امینه دارند خوب جواب می دهد و برای تعداد بالاتر جواب گو نیست و برای دارو پروتئینی جواب نمی دهد ولی برای پپتید جواب می دهد

۲.استفاده از سلول برای کار ، سلول از انزیم استفاده می کند و برای ساخت پروتئین خاص یک توالی خاص در DNA تا برای ساخت پروتئین نیاز است ان پروتئین خاص یک ژن ویژه (شاید پروتئین معیوب فرد بیمار باشد)مشخص به نام GOI در یک سلول است که اون قرار است برامون این را تولید کند

در سلول ها انزیم و پروتئین ها بعد فعالیت یک سری تغیرات پس از ترجمه انها یعنی اضافه شدن بعضی از قند ها باید اضافه شود تا انزیم حساسیتش به ان سوبسترا هایش کم نشود و ضعیف نشود

برای انتقال GOI باید ان را به یکی از این سلول ها منتقل کنیم

۱. باکتری E.COLI

۲. سلول مخمری

۳.سلول هک انسان هک(HUMAN KIDNEY)

۴.سلول جانوری C.H.O

و به خاطر کلی مزایایی که دارد از E.COLI استفاده می کنیم یعنی هم تکثیر سریع ان پروتئین خاص نسبت به سلول های دیگر و هم هزینه ارزان کشت و خیلی مزایا دیگر

سلول e.coli یک سلول باکتری است که هم ژنوم کامل باکتریی دارد و هم ژنوم های کمکی مثل پلازمید که ژنوم پلازمید ها حلقوی و مستقل از ژنوم باکتری تکثیر می شوند و پلازمید ها به باکتری در رقابت با سایر باکتری های دیگر در طبیعت کمک می کند مثلا ان باکتری که ژن مقاومت به یک عامل محیطی دارد باکتری را نگه می دارد که ژن مقاومت در ان پلازمید یک ژن نشانگر است به نام SMSAMP مثلا ژن مقاومت به انتی بیوتیک در این جا است گه به کمک نشانگر مشخص می شود

برای همانند سازی پلازمید یک نقطه ori site وجود دارد و یک جا هم برای گذاشتن ان ژن خاص ساخت پروتئین وجود داردکه ناحیه MCS است در انجا ان GOI را می گذارند و بعد باید به وسیله انزیم های لیگاز ان قسمت کلا بسته شود و الان در اصطلاح علمی یک سازه ساخته شد

۲ عامل برای انجام کار با پلازمید است

۱.کلونیک وکتور و همین ORI SITE هی باکتری تکثیر شود و هی اینجوری کولن انجام شود

یعنی پروموتور ها جایی اند که rRNA تشخیص می دهد که یک ژن های مشخصه اند که RNA پلیمراز و توالی های خاص مثل ATCG که عوامل تنظیمی هم تاثیر دارند که پروموتر قوی تر یا ضعیف تر باشد که هرچه پروموتر قوی تر باشد پروتئین بیشتری ساخته می شود

۲. روش اکسپرژن EXPRESSION بیان شدن

اما ساخت پروتئین برای سلول ها پر هزینه است و برای ساخت انها ۲ نوع بیان وجود دارد

۱. بیان ثابت

۲.بیان القایی

در بیان القایی در سلول مخمری یک پلازمیدی که الکل اکسیداز است و وقتی به ان قند نرسد الکل هم مصرف می کند ما برای استارت پروموتر اول قند می دهیم و بعد از ان الکلی مثل متانول می ریزیم و بعد ان برای ما پشت سر هم پروتئین می سازد

حالا که بخواهیم GOI را در ناحیه MCS وارد کنیم به

۱. شوک حرارتی نیاز است

۲. بمباران ژنی

۳.پالس های الکتریک

۴.مواد شیمیایی DNA سطح منفی وشانس انتقال GOI

در این روش ها با به وجود امدن یک ذره غشا باز شده GOI وارد می شود

شوک حرارتی روی سلول های جانوری جواب نمی دهد

جلسه ۲ آزمایشگاه ژنتیک مولکولی

ما می توانیم در پلازمید وکتور ، ژن های مورد نیاز خود را درون ان بگذاریم تا برایمان تکثیر پروتئین کند در محیط آزمایشگاه

که ori site نقطه همانند سازی پلازمید است که این ژن های پلازمید مستقل از ژنوم میزبان تکثیر می شود و همین پلازمید است که با داشتن یک ژن مقاومت از بقیه متمایز می شود

ان قسمتی که ژن که باید بگذاریم ناحیه MCS است که بعد باید پروموتور و RNA پلی مراز اینگونه از ان ژن پروتئین می سازد و این پروتئین ساخته شده در سیتوپلاسم باقی می ماند و اینگونه با پروتئین های دیگر سلول قاطی می شود و برای خالص سازی شود این پروتئین مطلوب که ۲ راه دارد

۱. راه اول این که این سلول را لیز کنند و بعد با سانتروفیوژ ان پروتئین مورد نظر را جدا کنند و این راه کمی طولانی است و همراه با خطا

۲. راه دوم این است که کاری کنیم پروتئینی که توسط پلازمید ساخته می شود به بیرون از سیتوپلاسم ترشح شود یعنی به وسیله یکسری توالی اسید امینه مشخصه مثالش هم الفا فاکتور است که اینجوری پروتئین ساخته شده به بیرون سلول ترشح می کند و پروتئین هایی که این توالی را دارند بعد راحت می توان جدا کرد و مورد استفاده قرار یعنی راحت در سانترفیوژ می گذاریم و از ان سوپ بالایی را تخلیص می کنیم و این جوری می توانیم از پروتئین استفاده کنیم

اما STOCK سلولی 👈 که از این رسوب های سلولی را می توان استوک کرد یعنی ما در آزمایشگاه ها یک سری مستر سل (MASTER CELL BANK)بانک داریم که بانک سلولی اصلی که ژن مورد نظر را دارد و ما می دانیم در فرآیند انتقال این ها آلودگی ها را ندارد و مثلا از این ۱۰۰ ویال یا همان مستر سل بانک را از همه نظر بررسی می کنیم اول بعد یکی را می اوریم و رکینک سل بانک درست می کنیم و اینجوری از یک دانه به ۱۰۰ تا دیگه ساخته شده است و ما هم برای ازمایش خود استفاده می کنیم و این پروسه را پیش می بریم و با تمام شدن یکی از یک مستر سل بانک دیگر ، رکینک سل بانک و با این کار می توان کلی مستر سل بانک ساخت.

در سلول های جانوری برای تخلیص پروتئین ، هر چه به جزء پروتئین ناخالص است و وقتی در صنعت بخواهیم پروتئین درست کنیم روش های ازمایشگاهی جواب گو نیست ولی در روش های ازمایشگاهی با رسوب و سانترفیوژ می توان پروتئین مورد نظر را استخراج کرد یعنی سلول ها را می شکنند با لیز سلولی ، یعنی با کشت دادن یک ترکیب در همه سلول ها و بعد با رسوب دادن انها و بعد باید از سوپ بالایی استفاده کرد و بعد در دپس فیلتر و فیلتر کپسولی که هی رفته رفته باریک تر می شود که باید تا اندازه ۰.۲ میکرومتر برسد و یک (دپیک من) اینجوری تمام می شود

برای محیط کشت e coli باید LB باشد یعنی یک محیط کشت برای هر سلول منبع کربن و نیروژن و اب چون همه سلول ها در محیط ابی هستند و عناصر و همچنین تریس المنت ها ضروری هستند

اما موادی که نیاز داریم به ترتیب

۱۰ گرم باکتری ترپتوم

۱۵ گرم آگار

۵ گرم اساره مخمر

۱۰ گرم NACL

۱ لیتر اب

ابتدا همه این مواد را وزن و در ۸۰۰ لیتر اب حل کرد و باید PH اب را روی ۷ تنظیم کنیم با NAOH و HCL و همان طور که روی یک دستگاه هم می خورد بعد به حجم ۱۰۰۰ سی سی می رسانیم با اب و بعد در اتوکلاو در مدت زمان ۱۵ دقیقه می گذاریم و اگار در اینجا و در اتو کلاو حل می شود و همزمان برای محیط کشت مایع می توانیم فالکون های ۵۰ را ۵ تا ۶ تاش را در اتوکلاو قرار داد و باید وقتی در اتوکلاو می گذاریم درش را شل کنیم که هوا وارد شود و بعد که که سرد شد برای کشت مایع الکل کشی و UV و فن را در زیر هود باز می کنیم بعد به هر فالکون را تا حجم یک پنجم تا یک سوم (ماکزیمم) است می ریزیم و نباید بیشتر ریخت چون ممکن است رشد خوبی نداشته باشد و حتما باید همان حجم باشد چون برای تنفس سلولی O2 باید حل شود و بعد محیط کشت ها را در شیکر انکوباتور۳۷ می گذاریم تا رشد کنند

و در محیط کشت های جامد این پلیت ها باید در زیر هود و در انجا باز کرد و برای کشت محیط جامد بعد که ان ماده ۱۰۰۰ سی سی را از اتوکلاو در اوردیم باید سرد و بعد باید ۶ امل ریخت روی پلیت و بعد یک ذره درش را باز می کنیم که حرارت که دارد این بخار اب الودگی ایجاد نکند و در زیر بنچ و زیر هود باید با فیلدوپلاتین محیط کشت ها را خط خطی کرد و درست کرد و بعد هم در شیکر انکوباتور ۳۷ گذاشت تا نتیجه را بعدا ببینم چه می شود

چند نکته مهم

پلیت های محیط کشت دارای ژن امپلیسین هستند که همه باکتری ها را به جزء باکتری مورد نظر که که مقاومت دارد را می کشد و از بین می برد

اگار هم برای کشت های جامد فقط استفاده می شود و حل نمی شود و در ان زمان که در اتوکلاو است می تواند حل شود و برای محیط های کشت پلیت نباید گذاشت که خیلی ان سرد شود تا اگار ها حل نشده باشند

نقشه کلی ازمایشگاه ژنتیک مولکولی از یک دید کلی

ما می اییم ابتدا یک پلازمید یک باکتری را خارج می کنیم و ژن GOI خود را در MCS می گذاریم یا از الکتروفورز استفاده می کنیم یا روش دایجست که سانتروفیوژ می کنیم و بعد که در الکتروفورز ۲ تا پیوند می دهند ان پیوند که پایین تر است یعنی با سرعت بیشتری در ژل حرکت کرده و کوچکتر است و از ان استفاده می کنیم و بعد پلازمید خودمان را به باکتری اضافه می کنیم و به وسیله محیط کشت جامد می اییم چند کلونی درست می کنیم که بعد چند روز هر کلونی را در یک مستر سل بانک می گذاریم یعنی مثلا ۱۲ تا ناحیه یک پلیت خاص که همه ناحیه ها از یک باکتری اند ولی هر ناحیه فرق دارد و بعد که رشد کردند یک قسمت را بر می داریم و محیط کشت مایع درست می کنیم از ان باکتری و بعد می ایم سانتروفیوژ می کنیم و در ژل الکتروفورز و بعد باید ان پروتئین را ببینم که خودمان درست کردیم

کل این ازمایشگاه اینگونه خواهد بود که در جلسات بعد بیشتر اشنا خواهیم شد موفق باشید

سوال ازمایشگاه ژنتیک مولکولی جلسه ۲

مواد لازم برای محیط کشت LB چیست و هر کدام دقیقا چه نقشی دارند؟

این محیط کشت شامل این ۴ جزء به علاوه یک لیتر اب است که این ۴ جزء عبارت اند از

۱. ۱۰ گرم تریپتون برای باکتری

۲. شامل ۱۵ گرم اگار

۳. شامل ۵ گرم عصاره مخمر

۴. شامل ۱۰ گرم nacl

اما نقش های این ۴ جزء را ببینیم

نقش اگار

افزودن آگار به براث LB، ژلی برای رشد باکتری‌ها ایجاد می‌کند، و بنابراین برای کشت‌های باکتری روی ظروف پتری استفاده می‌شود یک محیط کشت مرجع میکروبی برای کشت باکتری E. coli است.

آگار (لنوکس) برای کشت غیرانتخابی سویه‌های E. coli جهت کلونینگ، تکثیر پلاسمید و تولید پروتئین‌های نوترکیب مناسب است

نقش عصاره مخمر

عصاره مخمر جهت کشت باکتری ها ، آماده سازی و بهینه می گردد و یک محرک عالی جهت رشد باکتری ها در نظر گرفته می شود و به طور معمول در غلظت های ۰.۳ تا ۰.۵ درصد استفاده می شود.عصاره مخمر فراهم کننده ویتامین ها، نیتروژن، آمینواسیدها و کربن در محیط های کشت سلول و میکروبی می باشد.

عمده ترکیبات موثره در عصاره مخمر شامل ویتامین‌های گروه B شامل تیامین B1، ریبوفلاوین B2، نیاسین B3، پانتوتنیک اسید B5، پیریدوکسین B6، فولیک اسید یا فولات B9 و بیوتین H است. به همین دلیل عصاره مخمر بعنوان بهترین منبع ویتامین های طبیعی، توجه زیادی را به خود جلب نموده است.

عصاره مخمر همچنین شامل مواد معدنی (حدود ۱۴ نوع مواد معدنی) به ویژه کروم، فسفر و سلنیوم یافت می شود. روی، آهن، مس، منیزیوم، منگنز و پتاسیم از دیگر مواد معدنی موجود در این ماده ارزشمند می باشد.

نقش تریپتون

تریپتون برای تأمین اسیدهای آمینه ضروری برای باکتری‌های در حال رشد استفاده می‌شود، در حالی که عصاره مخمر برای تهیه مجموعه‌ای از ترکیبات آلی مفید برای رشد باکتری‌ها استفاده می‌شود.

نقش سدیم کلراید NACL

این LB-Growth Mediumبدون کلرید سدیم در سیستم‌های بیان پروتئین استفاده می‌شود که در آن از کلرید سدیم برای القای پروتئین استفاده می‌شود. این محیط به طور گسترده برای نگهداری و انتشار DNA پلاسمید و برای رشد سویه های نوترکیب حاوی ناقل بیان پروتئین استفاده می شود.

پایان سوال جلسه ۲ ازمایشگاه ژنتیک مولکولی

احمدرضا فلاحتی برای استاد پور یعقوبی

۹۹۱۳۱۷۹۰۴۴

جلسه ۳ ازمایشگاه ژنتیک مولکولی

استخراج پلاسمید

در محیط کشت که حاوی اب و عصاره مخمر ، منبع نیتروژن و .... است فرصت می دهیم تا سلول رشد و تعداد ان افزایش بیابد و وقتی سلول به میزان کافی و مناسب رسیدند و DNA کافی داشتیم حالا برای استخراج DNA هر چیزی به جز پلاسمید ناخالصی محسوب می شود و اولین ناخالصی باید باکتری ها را از محیط کشت بر داریم که با استفاده از سانتروفیوژ و نه به وسیله فیلتر کردن و در یک ارلن ان باکتری های جدا شده را از محیط کشت را قرار می دهیم ابتدا و بعد سانتروفیوژ می کنیم که یکسری سلول ها ته نشین می شوند و سلول های باکتری می مانند و باید محیط کشت را دور ریخت و بعد حالا نوبت این است که سلول ها بشکنیم تا پلاسمید بیرون بیاید و بعد درون یک بافر حل می کنیم و بعد پاپیت می کنیم تا رسوب دوباره بیاید بعد فقط باکتری های دست نخورده که حالا باید این سلول ها را لیز کنیم که به دو روش فیزیکی و شیمیایی انجام می شود که در ادامه توضیح داده شده و این فرایند اینگونه انجام می دهند

پلاسمید ها ممکن ژن مقاومت داشته باشند یا ژن حذف کردن یک ماده داشته باشند که به ان باکتری یک برتری بدهد و این پلاسمید برای باکتری هزینه دار است و اگر کارایی نداشته باشد باکتری ان را حذف می کند

ما ۲ مدل فیلتراسیون داریم

1. فیلتراسیون نرمال دِان : که وقتی یک ماده را فیلتر می کنیم بخشی از ان ماده می ماند و بخش های خاصی از ان ماده رد می شوند

2.فیلتراسیون مماسی : فیلتری که مایع از بالا بیاید و از روی ان رد شود و ان قسمت های ماده که بزرگتر هستند رد نمی شوند و ان قسمت های کوچک در این نوع فیلتراسیون رد می شوند که به نام (CFF) است

در مقیاس بالا سانترفیوژ برای کار های صنعتی بزرگ به کار نمی رود و از این روش ها فیلتراسیون مماسی استفاده خیلی خوبی می شود

چرا از اب برای حل کردن باکتری ها استفاده نشده و از بافر استفاده شده است؟

برای اینکه وقتی در مراحل بعدی که DNA را در شرایط مناسب نگه داریم لازم است که کنترل شده باشد و هرگز نباید اب ریخت و حتما باید بافر استفاده شود

دو روش برای لیز سلولی داریم

روش فیزیکی : از یک سری Glass bit یا گلس بیت هایی از جنس شیشه استفاده که انها را پودر می کنند و دائم اسید پاش می کنند و می شویند تا تفاوت ایجاد کنند و بعد به سلول ها استفاده می کند و بعد توسط یک دستگاه spin vortex که یک همزن شدید است قرار می دهند ، همچنین از سونی کیشین هم که از امواج اورتاسون است استفاده می شود

روش شیمیایی : باید بیایند از سدیم هیدروکسید (naoh) + STS استفاده کنند تا دیواره سلولی را از بین برود و پلاسمید دوباره باید سانتروفیوژ کرد تا بقیه ناخالصی ها هم بروند و بعد سانتروفیوژ پلاسمید می اید بالا و بقیه ناخالصی ها ته نشین می شوند

در سلول ها RNA و DNA و پروتئین داریم و RNA کار ازمایشگاهی با ان اسان نیست چون ناپایدار است و دلیل ان به خاطر قند ریبوز ان و ان گروه OH در کربن شماره ۲ قند ان است که ان را بسیار واکنش پذیر می کند و همچنین یک دلیل سیر تکاملی هم دارد یعنی بدن ما از ویروس های RNA ای حراس دارد و باعث از بین بردن وسیع حیات می شوند و هر سری که نسل بعدی این ویروس را تشکیل بدهد دستخوش تغیرات می شود و برای تکامل ما و زنده ماندن ما باید یک انزیم RNAase که RNA را حذف کند وجود داشته باشد که این انزیم در پوست بیشتر و باعث حذف RNA می شود

پروتئین ، ارتباط ساختار و عملکرد مهم است و باید همیشه به صورت تاخورده باشند یا پروتئین های مثل چاپرون ها با حفظ تاخوردگی و کمک به تاخوردگی پروتئین ها می کند و naoh پروتئین ها را از حالت تاخوردن باز می کند و باعث رسوب انها می شود ولی برخلاف این ۲ DNA پایدار است و باقی می ماند

در PCR تکثیر انتخابی یک قطعه انجام می شود یعنی یکسری پرایمر های به دستگاه می دهند که از جنس RNA نیستند و از جنس DNA هستند و از انزیم های پلی مراز خاصی استفاده می کنند که مقاوم به حرارت باشند یعنی از یک ارکی باکتری به نام ترموس اکواتیکوسکه این باکتری را از چشمه های اب گرم می گیرند از انزیم ان استفاده می شود یعنی انزیم های هلیکاز ۲ DNA رشته ای را باز و باعث تشکیل حباب های همانند سازی می شوند که برای اینکار به دستگاه دما های مختلف در زمان های مختلف داده می شود یعنی اول به دستگاه دما ۹۵ درجه در ۳۰ ثانیه داده می شود تا دو رشته DNA باز شوند و ان پرایمر قرار گیرند و بعد دما ۶۰ درجه در ۳۰ ثانیه تا رشته به هم نزدیک شوند و بعد دمای ۷۲ درجه در یک دقیقه می دهند و بعد برای تعداد ان قطعه خاص برنامه ریزی می کنند و بعد خارج می کنند یا ان را در دمای ۴ درجه نگه می دارند

وقتی شرایط بازی قرار دهیم DNA ها باز می شوند PH=12/5و اگر دوباره شرایط را اسیدی کنیم یعنی شرایط خنثی ۲ رشته در مقابل هم قرار می گیرند و بعد سانتروفیوژ می کنیم پلاسمید ها هست و DNA و بقیه ناخالصی ها رسوب می کنند و بعد شستو و بعد بافر و بعد پلاسمید از DNA جدا می شود و ما الان فقط پلاسمید خواهیم داشت

نکته DNA ژنوم باکتری خطی و DNA پلاسمید ها حلقوی است

روش رسوب ، با استفاده از فنل کلروفوم که در یخچال است می تواند DNA ما را رسوب دهد یعنی فنل باعث DENATURE شدن پروتئین و کلروفوم هم ترکیبات ارگانیک را باعث می شود بعد رسوب ، فنل در پایین جمع و در قسمت های بالا DNA و RNA که با سمپلر ان را برداشته و استفاده می کنیم ((استخراج DNA))

بعد ان را در دستگاه اسپکتوفتومتر قرار می دهند تا هم کیفیت و هم غلظت DNA را بسنجند

که DNA در ۲۶۰ نانومتر جذب حداکثری دارد

و پروتئین در ۲۸۰ نانومتر جذب حداکثری دارد به خاطر ۳ اسید امینه حلقه دار و مخصوصا تریپتوفان

و اگر جذب ۱ را DNA نشان دهد نماینگر ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر DNA است و نسبت جذبی 260/280 ان هم باید بین ۱/۶ تا ۱/۸ باشد که اگر بیشتر باشد نشان دهنده الودگی به RNA است

پایان جلسه ۳

به نام خدا

نام و نام خانوادگی : احمدرضا فلاحتی

نام درس : ازمایشگاه ژنتیک مولکولی

پرسش جلسه ۳

چرا DNA در ۲۶۰ نانومتر جذب دارد و پروتئین ها در ۲۸۰ نانومتر دارند ؟

علت اصلی جذب این DNA و پروتئین بر می گردد به حلقه های اروماتیکی که دارند یعنی DNA شامل باز های است که پورین هاش ۲ حلقه اروماتیک دارند و پیریمیدن ها یک حلقه که چون این حلقه کربنی هستند در ۲۶۰ نانو متر DNA جذب دارد و اگر مقدار گوانیدین بیشتر شود ممکن جذب ان تا ۲۸۰ هم برود

اما علت اصلی جذب پروتئین ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر بر می گردد به امینو اسید های اروماتیکی یا حلقه دار انها یعنی فنیل الانین و تیروزین و تریپتوفان که نقش تریپتوفان بیشتر است در این جذب به خاطر که یک ساختار به نام ایندول می سازد و جذب در ۲۸۰ نانومتر را ممکن می سازد

اسیدهای نوکلئیک به دلیل ساختار رزونانسی بازهای پورین و پیریمیدین، نور ماوراء بنفش را با طول موج 260 نانومتر به شدت جذب می کنند

اسیدهای نوکلئیک (DNA یا RNA) حاوی پیوندهای دوگانه مزدوج در حلقه‌های پورین و پیریمیدین خود هستند که پیک جذب خاصی در طول موج 260 نانومتر دارند.

پیک در طول موج های پایین تر به دلیل جذب پپتید و قسمت های کربوکسیلیک اسید در ترکیبات ایجاد می شود.

جلسه ۴ ازمایشگاه ژنتیک مولکولی

برای dna ما با ۲ روش می توانیم کیفیت و کمیت را بررسی کنیم

روش کیفی : روش الکتروفورز ژل اگاروز ، که ترکیبی به نام اگاروز که ما این را یک مقداری وزن می کنیم بسته به این که می خواهیم ژلمون چند درصد باشد ، ژل غلیظ یا رقیق باشد و بعد توی بافر مورد نظر روی حرارت که بگذاریم این کامل محلول می شود و اجازه بدهیم که دوباره سرد بشود این ژل شکل خودش را می گیرد و بعد این پلیمرها در هم تنیده می شوند و بعد شکلی مثل تور با خلال و فورج که درش وجود دارد تشکیل می شود ، هر چه قدر پودر اولیه را بیشتر بریزیم که غلیظ تر بشود این خلال و فورج تنگ تر و کوچک تر می شود و اگر کم بریزیم این ها بزرگتر می شود ، بعد که ژل را ساختیم می گذاریم روی تانکی که مربوط به دستگاه الکتروفورز است

الکتروفورز یعنی حرکت تحت جریان الکتریکی

و DNA بارش منفی است به علت گروه های فسفاتی که دارد و اگر این را در میدان الکتریکی بگذاریم که یک طرف منفی باشد و یک طرف مثبت ، به سمت مثبت حرکت می کند

اگر یک قطعه DNA که اندازه اش ۱۰۰ جفت باز و یکی که ۵۰۰ جفت باز دارد ، سرعت حرکت ها با هم متفاوت است چون قطعه کوچکتر راحت تر از خلال و فورج عبور می کند

اگر در الکتروفورز ۲ باند ببینیم که یکی پایین و یکی بالا بود می فهمیم پایینی قطعه کوچکتر DNA و بالایی بزرگتر است

هنگام ران کردن ژل الکتروفورز هم نیاز به یک راهنما داریم برای فهمیدن که کدام قطعه کوچک یا بزرگ که این مواد هم را DNA LADDER می نامند که یک ویال است حاوی قطعات مختلفی از DNA است که داخلش قطعات 1000 و 700 و 500 و 300 و 200 و 100 تایی دارد و در واقع قطعه هایی که اندازه اش مشخص است را در یک ویالی ریختن که وقتی نمونه را در چارک ۱ RUN کنیم باید به یکی از چارک ها را به DNA LADDER اختصاص بدهیم

روش دوم که روش کمی است با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر است که یک نور می تابد به نمونه یک بخشی از این جذب می شود

نوری که به یک ماده می خورد ۴ حالت برایش پیش می اید ۱.جذب شود ، ۲.منعکس شود ، ۳.عبور کند ، ۴.پراکنده شود

هر ماده در طول موج مشخصی نور را جذب می کند که ما یک لاندا MAX داریم ، که برای DNA در ۲۶۰ نانو متر اگر نمودار طیف جذبی ان را در مقابل طول موج بکشیم در ۲۶۰ نانومتر لاندا MAX دارد و بیشترین جذب در این عدد است

در اسپکتوفوتومتر ، جذب را به ما می دهد یعنی A و ما باید این را تبدیل کنیم به غلظت DNA یا C یعنی از طریق این فرمول A=E.L.C

که E ((علامت اپسیلون مدنظر است نه این پس قاطی نکنید لطفا)) ، ضریب خاموشی است و برای هر ماده ای ضریب خاموشی منحصر به فرد خودش را دارد که این ضریب برای DNA دو رشته حدود 0.02 و برای پروتئین ها حدود 1.5 است و برای پروتئین ها بسته به توالی که دارند فرق دارد این و باید ان را از منابع یا سرچ یا پایگاه های داده به دست اورد

و L که قطر کوت است که همه را ۱ سانتی متر می گیرند که در فرمول تاثیر نداشته باشد

در الکتروفورز ما اندازه DNA را می توانیم بفهمیم که چگونه است ولی در اسپکتوفوتو متر ما فقط مقدار غلظت را می فهمیم

نسبت ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر یک DNA دو رشته ای باید در حدود 1.8 باشد اگر زیر این عدد بود نشان گر که در ترکیب الودگی پروتیئن دارید یا الودگی مواد الی که یا خوب شستوشو نداده ایم که روی جذب اثر دارد و اگر هم این نسبت بالای 1.8 باشد نشانگر این است که شما الودگی RNA دارید یا قطعات شکسته زیادی از DNA دارید که این هم نشانگر که RNA را خوب پاک نکردید و هر چه میزان شکست های DNA بیشتر باشد جذب را بالا می برد

چرا غلظت DNA را باید بفهمیم ؟

علت ان این است در بعضی از کار های علمی با داشتن مقدار می توانیم نسبت های یک کار خاص را انجام بدهیم برای مثال ، مثلا به ما گفته اند که نسبت DNA به یک ماده در یک کار خاص باید ۳ به ۱ باشد در اینجا است که غلظت اهمیت پیدا می کند و ما باید حتما ان مقدار غلظت را بدنیم تا بتوانیم کار علمی را درست انجام دهیم

پایان