



دانشگاه گیلان
۱۳۵۳_۱۹۷۴

چاپ اول

روش‌های کاربردی زیست‌شناسی مولکولی

کتاب راهنما در کلاس آزمایشگاه

ویرایش چهارم

تألیف: سوزان کارسون هیثر بی. میلر دی. اسکات ویترو
ترجمه: ملیسا سی. سروچی

دکتر مجیدرضا خوش خلق

دانشیار دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان

مهدیه رهبر

دانشجوی دکتری شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان

مرکز نشر دانشگاه گیلان

روش‌های کاربردی زیست‌شناسی مولکولی:
کتاب راهنما در کلاس آزمایشگاه

Molecular Biology Techniques

A Classroom Laboratory Manual

Fourth Edition

By:

Susan Carson Heather B. Miller D. Scott Witherow Melissa C. Srougi

Translated by:

Majidreza Khoshkholgh, Ph. D

Mahdieh Rahbar, Ph. D Student

University of Guilan Press

کتاب پیش‌رو با رویکردی آموزشی-پژوهشی، به تشریح گام‌به‌گام روش‌های زیست‌شناسی مولکولی می‌پردازد؛ از استخراج و کلون‌سازی ژن‌های هدف گرفته تا بیان، خالص‌سازی و تحلیل کمی و کیفی پروتئین‌های نوترکیب. در کنار مباحث پایه، مفاهیمی چون توالی‌یابی DNA، آنالیز mRNA و کاربرد تکنیک‌های پیشرفته‌ای نظیر CRISPR و RNAi نیز مورد بررسی قرار گرفته‌اند. این راهنما با تأکید بر طراحی و اجرای دقیق آزمایش‌ها، ابزار ارزشمندی برای دانشجویان، پژوهشگران و مدرسان حوزه زیست‌فناوری، ژنتیک مولکولی و علوم زیستی کاربردی به شمار می‌آید.

تألیف: سوزان کارسون، هیثر بی. میلر، دی. اسکات ویترو، ملیسا سی. سروچی.
ترجمه: دکتر مجیدرضا خوش خلق، مهدیه رهبر



ISBN: 978-600-153-326-6



روش‌های کاربردی زیست‌شناسی مولکولی

کتاب راهنما در کلاس آزمایشگاه

ویرایش چهارم

تألیف:

سوزان کارسون هیثر بی. میلر دی. اسکات ویشرو ملیسا سی. سروجی

ترجمه:

دکتر مجیدرضا خوش‌خلق

دانشیار دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان

مهدیه رهبر

دانشجوی دکتری شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان

مرکز نشر دانشگاه گیلان

۱۴۰۳



دانشگاه گیلان
۱۳۵۳-۱۹۷۴

شابک: ۹۷۸-۶۰۰-۱۵۳-۳۲۶-۶

عنوان و نام پدیدآور	روش‌های کاربردی زیست‌شناسی مولکولی/تالیف سوزان کارسون... [و دیگران]
	: ترجمه مجیدرضا خوش‌خلق، مهدیه رهبر؛ ویراستار علمی فاطمه صفری؛
	ویراستار ادبی بهاره هوشیار.
مشخصات نشر	رشت: دانشگاه گیلان، ۱۴۰۳.
مشخصات ظاهری	۵۱۰ص.
شابک	978-600-153-326-6
وضعیت فهرست نویسی	فیپا
یادداشت	عنوان اصلی: Molecular biology techniques : a classroom laboratory manual ,Fourth edition, [2019].
یادداشت	تالیف سوزان کارسون، هیثر بی. میلر، دی. اسکات ویترو، ملیسا سی. سروجی.
موضوع	زیست‌شناسی مولکولی -- دستنامه‌های آزمایشگاهی Molecular biology-- Laboratory manuals
شناسه افزوده	کارسون، سوزان
شناسه افزوده	Carson, Sue(Susan):
شناسه افزوده	خوش‌خلق، مجیدرضا، ۱۳۴۴-، مترجم
شناسه افزوده	صفری، فاطمه، ۱۳۵۵-، ویراستار
شناسه افزوده	دانشگاه گیلان
رده بندی کنگره	QH۵۰۶:
رده بندی دیویی	۵۷۲/۸۰۷۸:
شماره کتابشناسی ملی	۹۹۴۳۳۱۱:

مرکز نشر دانشگاه گیلان

عنوان کتاب	: روش‌های کاربردی زیست‌شناسی مولکولی
مؤلفان	: سوزان کارسون، هیثر بی. میلر، دی. اسکات ویترو، ملیسا سی. سروجی
مترجمان	: دکتر مجیدرضا خوش‌خلق، مهدیه رهبر
ویراستار علمی	: دکتر فاطمه صفری
ویراستار ادبی	: بهاره هوشیار
نوبت چاپ	: اول، ۱۴۰۳
ناشر	: مرکز نشر دانشگاه گیلان
شمارگان	: ۱۰۰۰ جلد
* هرگونه چاپ و تکثیر صرفاً در اختیار مرکز نشر دانشگاه گیلان است.	

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
درباره نویسندگان	ث
سخن مترجمان	ج
پیشگفتار	خ
قابل توجه مربیان	ذ
نام گذاری	س
مقدمه	ص
فرآیندهای آزمایشگاهی	ط
شیوه‌نامه‌های روندی متداول	غ
ایمنی آزمایشگاه	ف
نکات مفید کلی هنگام کار در آزمایشگاه	ک
بخش اول: دست کاری DNA	۱
کلاس آزمایشگاه: جلسه اول	۱۱
کلاس آزمایشگاه: جلسه دوم	۲۳
کلاس آزمایشگاه: جلسه سوم	۴۱
کلاس آزمایشگاه: جلسه چهارم	۵۹
کلاس آزمایشگاه: جلسه پنجم	۶۳
بخش دوم: غربالگری سلول‌های ترادیسی شده	۷۳
کلاس آزمایشگاه: جلسه ششم	۷۷
کلاس آزمایشگاه: جلسه ششم-الف	۷۸
کلاس آزمایشگاه: جلسه ششم-ب	۸۲
کلاس آزمایشگاه: جلسه ششم-پ	۸۶
کلاس آزمایشگاه: جلسه ششم-ج	۹۰
کلاس آزمایشگاه: جلسه هفتم	۹۳

کلاس آزمایشگاه: جلسه هفتم-الف	۹۴
کلاس آزمایشگاه: جلسه هفتم-ب	۹۷
کلاس آزمایشگاه: جلسه هفتم-پ	۹۹
کلاس آزمایشگاه: جلسه هفتم-ت	۱۰۱
کلاس آزمایشگاه: جلسه هشتم	۱۰۹
بخش سوم: بیان، تشخیص و خالص سازی پروتئین های نو ترکیب از باکتری	۱۲۱
کلاس آزمایشگاه: جلسه نهم	۱۲۷
کلاس آزمایشگاه: جلسه نهم-الف	۱۲۸
کلاس آزمایشگاه: جلسه نهم-ب	۱۲۹
کلاس آزمایشگاه: جلسه دهم	۱۴۱
کلاس آزمایشگاه: جلسه یازدهم	۱۴۹
کلاس آزمایشگاه: جلسه یازدهم-الف	۱۵۰
کلاس آزمایشگاه: جلسه یازدهم-ب	۱۵۱
کلاس آزمایشگاه: جلسه دوازدهم	۱۶۳
کلاس آزمایشگاه: جلسه دوازدهم-الف	۱۶۴
کلاس آزمایشگاه: جلسه دوازدهم-ب	۱۷۷
بخش چهارم: بررسی سطوح mRNA	۱۷۹
کلاس آزمایشگاه: جلسه سیزدهم	۱۸۵
کلاس آزمایشگاه: جلسه سیزدهم-الف	۱۸۶
کلاس آزمایشگاه: جلسه سیزدهم-ب	۱۸۷
کلاس آزمایشگاه: جلسه چهاردهم	۱۹۹
کلاس آزمایشگاه: جلسه پانزدهم	۲۲۳
کلاس آزمایشگاه: جلسه شانزدهم	۲۳۳
کلاس آزمایشگاه: جلسه هفدهم	۲۳۹

۲۴۵.....	بخش پنجم: اصلاح بیان زن
۲۴۹.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه هجدهم
۲۶۳.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه نوزدهم
۲۶۴.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه نوزدهم-الف
۲۷۱.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه نوزدهم-ب
۲۷۸.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه نوزدهم-پ
۲۸۲.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه بیستم
۲۹۵.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و یکم
۲۹۶.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و یکم-الف
۲۹۷.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و یکم-ب
۳۰۱.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و دوم
۳۰۷.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و سوم
۳۰۹.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و سوم-الف
۳۱۷.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و سوم-ب
۳۲۳.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و سوم-پ
۳۲۷.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و چهارم
۳۳۱.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و پنجم
۳۵۱.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و ششم
۳۵۷.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و هفتم
۳۵۸.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و هفتم-الف
۳۶۰.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و هفتم-ب
۳۶۵.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و هشتم
۳۶۶.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و هشتم-الف
۳۷۳.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و هشتم-ب
۳۷۷.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و نهم

۳۸۵.....	کلاس آزمایشگاه: جلسه سی ام
۳۹۵.....	پیوست
۴۷۷.....	فهرست نمایه

درباره نویسندگان

دکتر سوزان کارسون^۱، استاد زیست‌شناسی گیاهی و میکروبی بوده و برنامه‌های غنا دانشگاهی و توسعه هیئت علمی را در زمینه افزایش مهارت‌های تفکر انتقادی و خلاقیت دانشجویان در دانشگاه ایالتی کارولینای شمالی رهبری می‌کند. او از دانشگاه رانگرز (نیوبرانزویک، نیوجرسی)^۲ با مدرک کارشناسی زیست‌فناوری و از دانشگاه کارولینای شمالی (چپل هیل، NC)^۳ با مدرک دکترای میکروبیولوژی دانش آموخته شده است. حوزه تخصص علمی او در مطالعه مکانیسم‌های مولکولی باکتری‌های بیماری‌زا است. دکتر کارسون قبل از سمت فعلی خود، بیش از ۱۰ سال را به عنوان هماهنگ کننده دانشگاه، در تولید برنامه‌های درسی زیست‌فناوری ایالتی NC گذراند. فعالیت علمی او در طی ۱۸ سال گذشته مبتنی بر آموزش زیست‌شناسی در سطوح دانشگاهی و تقویت قدرت تفکر و خلاقیت دانشجویان بوده است. او جوایز متعددی را برای تدریس برتر و نوآوری دریافت کرده و یکی از اعضای اتحادیه آموزش علوم هوارد هیوز^۴ است، که یادگیری هدایت‌شده با تحقیق و تحقیقات معتبر را در آزمایشگاه کلاسی در مقطع کارشناسی ترویج و اجرا می‌کند. او دو کتابچه راهنمای آزمایشگاه زیست‌شناسی مولکولی را به رشته تحریر درآورده و مقالات متعددی را در زمینه دوره آموزشی و توسعه برنامه درسی منتشر کرده است. او بیش از ۱۰۰ دانشجوی کارشناسی را در طرح‌های تحقیقاتی راهنمایی کرده و محقق اصلی و مدیر برنامه تجربی تحقیقات سیستم‌های گیاهی مولکولی یکپارچه برای دانشجویان (REU)^۵ با بودجه بنیاد ملی علوم (NSF)^۶ است. او در شورای رهبری NSF BIO REU خدمت کرده و در هیئت مدیره انجمن زنبورداری و یک انتمی^۷ خدمت کرده است.

دکتر هیتر بی. میلر^۸، استادیار بیوشیمی در دانشگاه‌های پوینت (NC)^۹ است. او از دانشگاه کلاریون پنسیلوانیا (کلاریون، PA) با مدرک کارشناسی زیست‌شناسی مولکولی/زیست‌فناوری و از دانشگاه دوک (دورهام، NC)^{۱۰} با مدرک دکترای در ژنتیک مولکولی و میکروبیولوژی دانش آموخته شده است. او یک موقعیت پسا دکترا در ژنتیک مولکولی و میکروبیولوژی را در دانشگاه

1. Dr. Susan. Carson

2. Rutgers. University. (New. Brunswick., NJ)

3. University. of. North. Carolina. (Chapel. Hill., NC)

4. Howard. Hughes. Science. Education. Alliance

5. Research. Experience. for. Undergraduates. (REU)

6. National. Science. Foundation. (NSF)

7. Wake. County. Beekeeping. Association

8. Dr. Heather. B. Miller

9. High. Point. University. (High. Point., NC)

10. Duke. University. (Durham., NC)

ایالتی کارولینای شمالی به پایان رساند. حوزه تخصص علمی او زیست شناسی RNA است. تحقیقات او بر بیان ژن HIV-1 و MRSA متمرکز شده است. او چندین دوره بیوشیمی و زیست فناوری را توسعه و تدریس کرده است و همچنین چندین مقاله علمی را با حمایت بورس تحصیلی تدریس و یادگیری، منتشر و ارائه کرده است.

دکتر دی. اسکات ویترو^۱ دانشیار بیوشیمی در دانشگاه تامپا (تامپا، فلوریدا)^۲ است. او از دانشگاه رولینز (وینتر پارک، FL)^۳ با مدرک کارشناسی در شیمی و از دانشگاه میامی (میامی، FL)^۴ با مدرک دکترا در فارماکولوژی مولکولی و سلولی دانش اموخته شد. تحقیقات او در درجه اول بر تنظیم فرآیندهای انتقال سیگنال با پروتئین G^۵ و در درجه دوم، آموزش و تربیت دانشجویان در رشته بیوشیمی متمرکز شده است. او توسط انجمن بیوشیمی و زیست شناسی مولکولی آمریکا به عنوان همکار آموزشی به دلیل تلاش های فراوان در زمینه های آموزش و ارزیابی، مورد تحسین قرار گرفته شده است.

دکتر ملیسا سی. روجی^۶ استادیار بیوشیمی در دانشگاه های پوینت (NC) است. او از دانشگاه تولدو (تولدو، OH)^۷ با مدرک کارشناسی در زیست شناسی و از دانشگاه کیس وسترن رزرو (کلوند، OH)^۸ با مدرک دکترا در فارماکولوژی دانش اموخته شد. زمینه های علمی تخصصی او در بررسی عوامل آزمایشگاهی شیمی درمانی سرطان و مکانیسم های مقاومت شیمی درمانی است. او به طور فعال در آزمایشگاه خود، دانشجویان کارشناسی را آموزش می دهد. او آزمایشگاه سیار دانشگاه های پوینت را برای ساده کردن دسترسی به علم برای جامعه غیرمتخصص تأسیس کرده و هدایت می کند. علاوه بر این، او انواع دوره های مختلف علمی در سطوح دانشگاهی را توسعه و تدریس کرده است و همچنین چندین مقاله علمی را با حمایت بورس تحصیلی تدریس و یادگیری، منتشر و ارائه کرده است.

1. Dr. D. Scott. Witherow

2. University. of. Tampa. (Tampa,. FL)

3. Rollins. College. (Winter. Park,. FL)

4. University. of. Miami. (Miami,. FL)

5. Regulation. of. G-proteinmediated. signal. transduction. processes

6. Dr. Melissa. C. Srougi

7. University. of. Toledo. (Toledo,. OH)

8. Case. Western. Reserve. University. (Cleveland,. OH)

سخن مترجمان

یکی از مهم‌ترین چالش‌های اجرای طرح‌های علمی در علوم زیستی، اجرای دقیق فرآیندهای آزمایشگاهی است تا خطاهای احتمالی به حداقل برسند. با وجود استفاده از فناوری‌های زیستی نوین در مطالعات، بسیاری از روش‌های آزمایشگاهی همچنان به شکل سنتی انجام می‌شوند یا تغییرات جزئی می‌یابند. بنابراین، مطالعه مبانی نظری و تسلط بر روش‌های آزمایشگاهی برای انجام دقیق طرح‌ها، از اهمیت بالایی برخوردار است. هنگام مطرح کردن یک طرح پژوهشی، مطالعه دقیق نظریه‌ها، چارچوب‌ها، مدل‌ها، متغیرها، همبستگی‌ها، روش‌های آماری و یا مفاهیمی که در پایه ریزی طرح‌های تحقیقاتی مشابه مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند، قدم اول شروع تحقیق است که تحت عنوان مبانی نظری شناخته می‌شود. روش‌های آزمایشگاهی شامل شناخت نحوه آماده‌سازی و استفاده از یک موجود زنده یا بخش‌های مختلف آن پس از اعمال شرایط تعریف شده در طرح، همچنین تسلط و شناخت کافی نسبت مواد و تجهیزات موجود در آزمایشگاه می‌باشد. در کتاب حاضر، سعی شده تا دانشجویان را به فراگیری مبانی نظری و روش‌های آزمایشگاهی ترغیب کند و در نهایت، توانایی‌های علمی آن‌ها را به‌صورت قابل توجهی ارتقاء دهد. در راهنمای حاضر، آموزش‌های نظری و عملی به‌صورت بیان مسائل و روش‌های ساده در فصول اول و تشریح مبانی و مسائل نوین در فصول آخر، مطرح شده است.

هر جلسه از کتاب با یک مقدمه در مورد موضوع جلسه آزمایشگاه آغاز شده و سپس، مبانی و روش‌های عملی مورد استفاده به‌صورت دقیق توضیح داده و تمرینات آزمایشگاهی نیز به صورت مرحله به مرحله آورده شده‌اند. دانشجویان می‌توانند با استفاده از این کتاب با روش‌های آزمایشگاهی مختلفی همانند کشت باکتری، استخراج DNA، استخراج RNA، خالص‌سازی پروتئین، تولید و استخراج پروتئین‌های نو ترکیب، انواع الکتروفورز و رنگ‌آمیزی، واکنش‌های PCR و حتی روش‌های مدرنی همانند کشت سلول‌های پستانداران، توالی‌یابی و تراز بیان ژن با استفاده از روش‌های مختلف همانند RNAi و CRISPR آشنا شده و تسلط کافی پیدا کنند.

توجه شود که مواد مصرفی موجود در این کتاب با توجه به برنامه‌های کلاسی دانشگاه ایالتی کارولینای شمالی ارائه شده است. اما بیان این نکته حائز اهمیت است که با توجه به ثابت بودن روش‌های آزمایشگاهی، عدم دسترسی به مواد مذکور در این راهنما نمی‌تواند به یک عامل محدود کننده در انجام طرح‌های آزمایشگاهی تبدیل شود. با جایگزینی مواد مصرفی تولید داخل و رجوع به شیوه‌نامه نحوه استفاده از آن‌ها، می‌توان طرح‌های علمی را بدون هیچ‌گونه محدودیتی به اتمام رساند.

مترجمان مشتاقانه پذیرای هر گونه نظرات، پیشنهادات و انتقادات محققان و استادان محترم برای بهبود چاپ‌های بعدی کتاب هستند. همچنین لازم است از مرکز نشر حوزه پژوهش و فناوری دانشگاه گیلان و تمامی دوستان و همکارانی که ما را در تهیه و پیشبرد این کتاب یاری و تشویق نموده‌اند، به‌ویژه سرکار خانم دکتر فاطمه صفری برای ویراستاری علمی و سرکار خانم بهار هوشیار برای ویراستاری ادبی این کتاب، مراتب تقدیر و تشکر خود را به جای آوریم.

مجیدرضا خوش‌خلق

مهندس مهدیه رهبر

پیشگفتار

فناوری DNA نو ترکیب بسیاری از جنبه‌های زندگی ما را تحت تأثیر قرار می‌دهد که از جمله اثرات آن می‌توان به تولید فرآورده‌های مقاوم به خشکی، سوخت‌های زیستی، داروها و موجودات اصلاح‌شده ژنتیکی اشاره کرد. زیست‌فناوری در طول تاریخ خود و به‌منظور تولید فرآورده‌های پروتئینی پربازده و یا تولید ژن‌ها و در نهایت تولید ژن‌های ترکیبی، به‌صورت معنی‌داری به قابلیت کلون کردن DNA (تولید DNA مشابه از رشته مورد نظر-م) متکی بوده است. باکتری اشرشیا کولی (*Escherichia coli*) و یا سایر میزبان‌ها به‌عنوان کارخانه‌های سلولی برای تولید مقادیر زیادی از پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. به‌عنوان مثال، انسولین انسانی یکی از فرآورده‌های نو ترکیبی است که با استفاده از بسیاری از روش‌های مشابهی تولید شده که در این کتاب ذکر می‌شود.

در طی هشت سالی که از انتشار سومین ویرایش این کتاب می‌گذرد، تحقیقات زیست‌شناسی مولکولی و ابزارهای آن دستخوش دگرگونی‌های اساسی شده و همچنان در حال تکامل هستند. اصلاح و یا تراز بیان ژن به‌عنوان یک نقطهٔ اتکا در بسیاری از آزمایشگاه‌ها تبدیل شده است؛ به‌ویژه روش‌های RNAi و CRISPR انقلابی را در مطالعهٔ عملکرد ژن‌ها و همچنین طرح روش‌های درمان انتخابی در بسیاری از بیماری‌ها ایجاد کرده است. با در نظر گرفتن این‌که چنین فناوری‌هایی در حال تبدیل‌شدن به سنگ بنای تمامی جنبه‌های پزشکی و زیست‌فناوری هستند، پژوهشگران می‌توانند با فراگیری بخش‌های نظری و عملی، آن را به بخش‌های کاربردی منتقل و در مطالعات از آن بهره‌جویی کنند؛ بنابراین، کتابچهٔ راهنما آزمایشگاه جامع، شامل جلسات آزمایشگاهی و کشت سلول‌های پستانداران، RNAi و CRISPR است و می‌تواند به‌عنوان یک طرح مستقل و یا یک ترم طولانی پیشرفته و یا حتی به‌صورت یک تدریس دو ترمی مورد استفاده قرار گیرد.

در طول هشت سال آینده ما چه چیزهایی را فرا خواهیم گرفت؟ پژوهشگران شرکت‌کننده در این دوره در خط مقدم فراگیری یافته‌های جدید قرار دارند، اما چه چیزی در پیش رو قرار دارد؟ ما نمی‌توانیم صبر کنیم تا بفهمیم!!!

قابل توجه مربیان

این کتاب راهنما در آزمایشگاه، در اصل بر پایه برنامه درسی ارائه شده دانشگاه ایالتی کارولینای شمالی و بر طبق برنامه توسعه زیست فناوری گردآوری شده است. در دهه گذشته، پیشرفت‌های قابل توجهی در شاخه زیست فناوری مولکولی ایجاد شده که نحوه ایجاد فرضیه توسط دانشمندان را نیز تغییر داده است. با وجود تمامی این پیشرفت‌ها، بسیاری از روش‌های رایج همچنان ثابت باقی مانده‌اند. در ویرایش چهارم، ما بخش‌های جدیدی را اضافه کردیم که به روش‌های جدیدتر اختصاص یافته است. از جمله این روش‌ها می‌توان به فناوری CRISPR اشاره کرد که در مجله Science چاپ سال ۲۰۱۵ عنوان «کشف شگفت‌انگیز» را به خود اختصاص داد. جلسات آزمایشگاهی شرح داده شده در این راهنما برای آماده سازی پژوهشگران برای دوره‌های تخصصی تر در سطح بالای بیوشیمی و زیست‌شناسی مولکولی و برای طرح‌های تحقیقاتی مستقل در پایه‌های کارشناسی، کارشناسی ارشد و دکتری طراحی شده است.

دوره معمول این راهنما حداقل ۴ ساعت آزمایشگاه در طول هفته به همراه چندین جلسه آزمایشگاهی موقت (نزدیک به ۳۰ دقیقه) در طول ترم است. ما پیشنهاد می‌کنیم این برنامه آموزشی به ۱ تا ۴ قسمت تقسیم شود، زیرا پژوهشگران برای چندین مورد از تمرین‌های آزمایشگاهی باید کشت‌های تلقیحی و یا فعالیت‌های کوتاه دیگری را انجام دهند. برگزاری کلاس‌های کشت سلولی (بخش ۵: اصلاح و تراز بیان ژن) بیش از یکبار در طول هفته پیشنهاد می‌شود. نگهداری سلول‌ها نیاز به حفظ و نگهداری دقیقی دارد و برگزاری کلاس‌های آزمایشگاهی موقت در طول ترم پیشنهاد می‌شود. لازم به تذکر است که بخش‌هایی از مراحل آزمایشگاهی باید در زمان‌های خاصی انجام شود که این امر نیازمند برگزاری کلاس‌های موقت و یا حضور مربی و یا دستیار آموزشی است.

پژوهشگرانی که از پیش آموزش‌های ابتدایی را دیده‌اند، به گذراندن ۴ ساعت آموزش در هفته نیازی ندارند. به علاوه، زمان انکوباسیون تعدادی از آزمایش‌ها بسیار زیاد است که گنجاندن آن‌ها در برنامه‌های آموزشی منطقی نیست. در این موارد، مراحل کار در شیوه‌نامه‌های کلی گنجانده می‌شود و مربی، بخش معینی از آزمایش را برای کلاس انجام می‌دهد (به عنوان مثال، القا وصل شدن پروتئین با استفاده از IPTG به چندین مرحله آزمایشگاهی نیاز دارد و ۴-۲ ساعت زمان را به خود اختصاص می‌دهد). به همین دلیل، پیشنهاد می‌شود که دوره آزمایشگاه به زمان بعد از ظهر مוקول شود تا مربی بتواند به جای نیمه‌های شب، انکوباسیون را صبح انجام دهد.

نسخه‌های پیشین این کتاب در طیف گسترده‌ای از مؤسسات و سطوح مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. هدف از تهیه این نسخه از کتاب، طراحی آزمایش‌های مقدماتی برای پژوهشگران

زیست‌شناسی / بیوشیمی و افزودن تعدادی از روش‌های جایگزین پیشرفته در نسخه جدید است. این بخش‌ها در اکثر مواقع برای دانش‌آموختگان سطح بالاتر از کارشناسی و یا دانش‌آموختگان پایه‌های کارشناسی ارشد و دکتری مورد استفاده واقع خواهد شد که به تعداد زیادی از روش‌های آزمایشگاهی تسلط کامل داشته باشند. این روش‌های جدید شامل استفاده از شیوه‌های جدیدی همانند کلون کردن ژن مورد نظر به یک وسترن بلات بوده که می‌توان آن را به‌صورت نیمه‌کمی آماده‌سازی کرد؛ بنابراین نسبت به کلون کردن ژن مورد نظر روش جایگزین جدیدتری خواهد بود. این روش‌های جایگزین جدید را می‌توان در فصل‌های یک تا ۳ مشاهده نمود.

بخش‌های یک تا ۳ شامل یک دوره ۱۲ هفته‌ای برای فراگیری روش‌های آزمایشگاه زیست‌شناسی مولکولی و بیوشیمی مقدماتی است. این آزمایش‌ها شامل کلون کردن cDNA پروتئین فلورسنت سبز بهبود یافته^۱ (*egfp*) با استفاده از PCR و پیوند آن به یک وکتور بیانی باکتریایی (بخش اول: دست‌کاری DNA)؛ غربالگری کلون‌های مثبت (بخش دوم: غربالگری تغییر یافته‌ها)؛ بیان، خالص‌سازی و تعیین کمیت پروتئین نوترکیب (بخش سوم: بیان، شناسایی و خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب از باکتری) هستند. تجزیه و تحلیل کمی‌سازی mRNA در بخش چهارم توضیح داده شده است که این بخش را می‌توان در طی دو الی سه جلسه آزمایشگاهی اضافی برگزار کرد. در یک دوره معمول ۱۵ هفته‌ای، تمامی قسمت‌های موجود در بخش چهارم را می‌توان جای داد، هرچند که بسیاری از مربیان بیشترین تمرکز خود را فقط بر ۱۲ جلسه ابتدایی آزمایشگاه می‌گذارند و سایر بخش‌ها را در کلاس‌های درس ارائه می‌کنند. بخش پنجم که در ویرایش جدید کتاب به آن افزوده شده، مربوط به اصلاح و تراز بیان ژن‌ها است و روی کنترل بیان ژن در سلول‌های پستانداران تمرکز می‌کند. این بخش آموزشی به‌صورتی طراحی شده که نه تنها پیش‌زمینه‌هایی از دانش نظری و عملی کشت سلول‌های پستانداران را در اختیار پژوهشگران قرار می‌دهد، بلکه در مورد چگونگی دگرگون کردن بیان ژن در این سیستم مدل با استفاده از روش‌های الحاق موقتی، RNAi و CRISPR نیز اطلاعاتی را در اختیار پژوهشگران می‌گذارد. این آزمایش‌ها بهتر است در یک دوره مجزا قرار داده شود. مهم‌ترین نکته‌ای که باید به آن توجه کنید این است که تمام جلسات آزمایشگاهی که در این راهنما بیان شده است، برای اجرا در یک ترم طراحی نشده‌اند. با این حال، در طول دو ترم، بسته به نیازهای درسی خاص شما، روش‌های مختلفی برای انجام تمام آزمایش‌ها قابل ارائه خواهد بود.

در سرتاسر متن، نکاتی مرتبط با صرفه‌جویی در زمان و هزینه را ذکر کرده‌ایم. این پیشنهادها برای کمک به مربیان در استفاده عاقلانه از منابع خود گنجانده شده است.

1. Enhanced, green, fluorescent, protein. (*egfp*)

در آماده‌سازی دانشجویان برای کارهای احتمالی آزمایشگاهی پس از دانش‌آموختگی، معرفی یک دفترچه یادداشت آزمایشگاهی مجازی (الکترونیکی) به‌جای یک دفترچه یادداشت معمولی با صحافی ممکن است مفید واقع شود. بر طبق بررسی‌های ما، این روش مزیت‌های زیادی دارد. به‌عنوان مثال، مربی می‌تواند به‌صورت تمام‌وقت به یادداشت‌های دانشجویهای خود دسترسی داشته باشد. برای دانشجوی، دفترچه آزمایشگاه مجازی، فرد را قادر می‌سازد تا به‌جای چاپ، برش و چسباندن در یک دفترچه یادداشت صحافی‌شده، به‌سادگی تصاویر ژل یا لکه را به صفحات گسترده اکسل و موارد دیگر بارگذاری کند. آن‌ها همچنین می‌توانند به‌سرعت جدول‌ها، بازبینی‌ها (چک لیست‌ها) و شیوه‌نامه‌ها را ایجاد کنند. این دفترچه‌ها مشکل ناخوانایی دست خط و گم‌شدن دفترچه‌ها را برطرف می‌کند. علاوه بر این، برخی ابزارهای شبیه‌سازی اولیگو، طراحی sgRNA و تجزیه و تحلیل توالی را در خود جای‌داده‌اند. ورودی‌ها همچنان قابل چاپ هستند. Benchling (<http://www.benchling.com>) یکی از نسخه‌هایی از دفترچه‌های مجازی است که به‌صورت رایگان در دسترس است. LabArchives نیز در عین محبوبیت (<http://www.labarchives.com>) هزینه‌هایی را برای استفاده کاربران در بر دارد.

برای مربیانی که قصد انجام آزمایش‌های شرح داده شده در بخش پنجم را دارند، به آزمایشگاهی با سطح ایمنی زیستی درجه ۲ (BSL-2) برای کار با سلول‌های HEK293 نیاز دارند. قبل از شرکت در این آزمایش‌ها، مطمئن شدن از وجود تأییدیه‌های لازم از سازمان ایمنی زیستی به‌طور اکید پیشنهاد می‌شود. شیوه‌نامه‌های BSL-2 را می‌توان از طریق مراکز کنترل و پیشگیری از بیماری (<http://www.cdc.gov/biosafety/publications>) مورد بررسی قرار داد.

پیشنهاد ما استفاده از باکتری *Escherichia coli* تجاری مناسب برای استفاده در این دوره است. در صورتی که بودجه شما امکان این عمل را در اختیار شما قرار نمی‌دهد، می‌توان از سلول‌های خانگی استفاده کرد که باید آن‌ها را پس از تولید در فریزر -۸۰ درجه نگهداری کرد. روش‌های تهیه سلول‌های شایسته در بخش پیوست قرار داده شده است.

تمام پادتن‌های شرح داده شده در این راهنما به‌صورت تجاری در دسترس هستند. پلازمیدهای pEGFP-N1 و pBIT بدون هیچ هزینه و برای هدف‌های آموزشی تحت نظر دکتر اسکات ویشرو در اختیار مراکز آموزشی عالی قرار می‌گیرند. می‌توان از طریق آدرس switherow@ut.edu و درج عبارت pBIT برای درخواست پلازمید با دکتر ویشرو در تماس بود. پلازمیدهای pET-41a، pLentiCRISPR-E و pLentiCRISPR-EGFP به‌صورت تجاری در دسترس است و باید آن‌ها را خریداری کرد. تیره‌های سلولی HEK293 و همچنین HEK293 که ژن *gfp* را به‌صورت پایدار

بیان می‌کنند، برای اصلاح و تراز بیان ژن در بخش پنجم مورد نیاز است که می‌توان آن را به‌صورت تجاری تهیه کرد.

نام‌گذاری

در منابع علمی، روند نام‌گذاری و ایجاد اختصار برای ژن پروتئین فلورسنت سبز بهیودیافته و ژن‌های آن در بهترین حالت به‌صورت ناسازگار و در بدترین حالت گیج‌کننده بوده است. در این کتاب، از واژه *egfp* برای آدرس دادن ژن (DNA و یا mRNA) و واژه EGFP برای آدرس دادن فرآورده‌های ژنی آن استفاده شده است. به همین شکل، از واژه *gst* برای ژن گلووتاتیون-اس-ترانسفراز^۱ و از واژه GST برای بیان فرآورده‌های ژنی آن استفاده شده است. ژن‌های باکتریایی مورد بحث در این راهنما برحسب نام‌گذاری استاندارد باکتری‌ها، نام‌گذاری می‌شوند؛ ژن با حروف کوچک و فرآورده‌های ژنی با حرف اول بزرگ و بدون حالت ایتالیک نام‌گذاری می‌شود. به‌عنوان مثال، ژن سرکوب‌کننده اوپران *lac* به‌صورت *lacI* و فرآورده ژنی آن به‌صورت LacI نوشته خواهد شد.

1. Glutathione-S-transferase

مقدمه

بخش‌های یک، دو و سه این راهنما فرآیند ساخت یک پروتئین ترکیبی در نتیجه وصل شدن ژن‌های دو موجود مختلف را شرح می‌دهد؛ یک ژن از باکتری *E. coli* (*gst*) و ژن بهیود یافته مشتق شده از پروتئین فلورسنت سبز عروس دریایی ویکتوریا¹ (*egfp*). بیان ژن ترکیبی سبب تولید یک پروتئین منفرد در باکتری شده که به علت مشخص بودن بخش GST در پروتئین ترکیبی (الحاقی) به راحتی قابل خالص سازی است. پروتئین خالص شده را می توان با استفاده از فلورسنت مشاهده و کمی سازی نمود.

بخش چهارم فراتر از سطح پروتئین ها حرکت کرده و با استفاده از رونوشت برداری معکوس با PCR (RT-PCR) پا به مطالعه در سطوح mRNA می گذارد. سطوح mRNA را می توان در نتیجه و یا عدم وجود مولکول های القا کننده کمی سازی و مورد مقایسه قرار داد.

در بخش پنجم، از سیستم باکتریایی خارج و وارد بحث کشت سلول های پستانداران خواهیم شد. در این بخش از راهنما، EGFP به صورت پیوسته در تیره های سلولی پستانداران مطالعه شده و فرآیند اصلاح و تراز بیان ژن با استفاده دو روش مختلف RNAi و CRISPR مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

به طور خلاصه، بخش های مختلف این راهنما به صورتی طراحی شده است که روش های نظری، چهارچوب های طرح کلی آزمایش و روش های مورد نیاز برای تجزیه و تحلیل داده های آزمایش های بیوشیمیایی و زیست شناسی رایج در بسیاری از آزمایشگاه های تحقیقاتی را ارائه دهد.

1. *Aequorea victoria*

فرآیندهای آزمایشگاهی

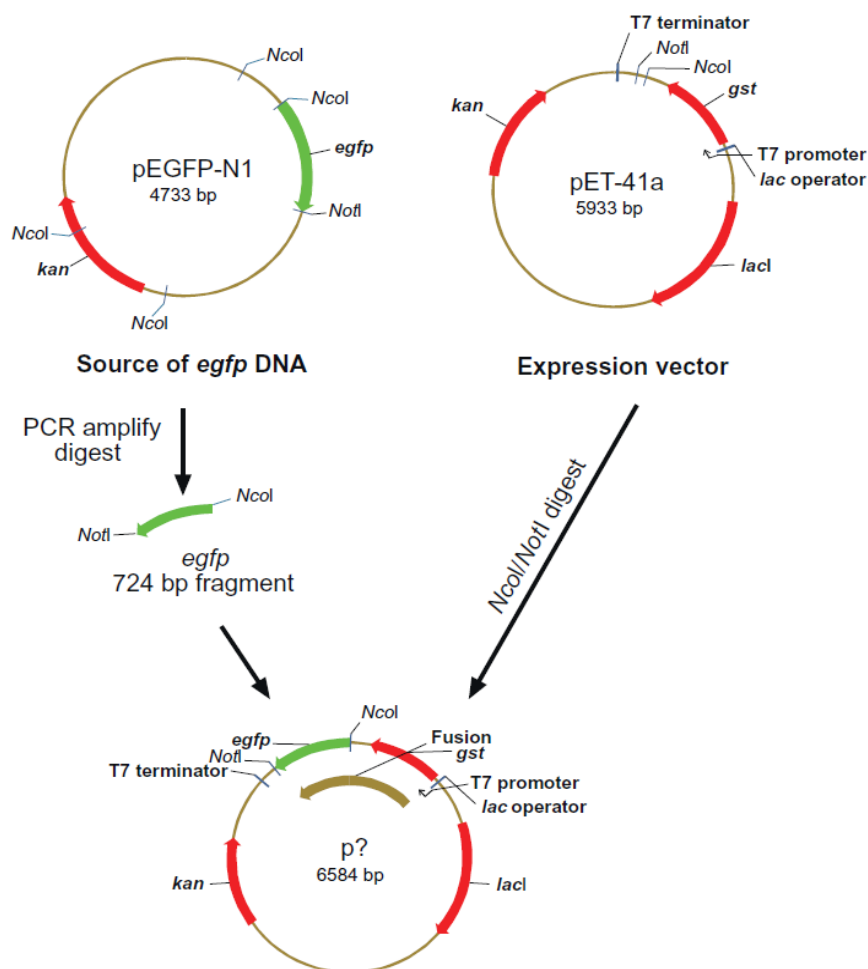
بخش اول: دست کاری DNA

(برای توضیحات نموداری به شکل ۱- مراجعه شود)

- استخراج DNA پلازمید از کشت‌های باکتریایی حاوی وکتور بیانی pET-41a باکتری *E. coli*.
- استفاده از آنزیم‌های محدودکننده برای برش وکتور pET-41a.
- استفاده از PCR برای تکثیر ژن الحاقی (*egfp* DNA) از عروس دریایی) از pEGFP-N1 و حذف محدودکننده برای تولید انتهای چسبنده.
- استفاده از آنزیم DNA لیگاز برای وصل شدن وکتور و DNA به یکدیگر.
- وارد کردن DNA ترکیبی به *E. coli*.

بخش دوم: غربالگری سلول‌های نو ترکیب

- تأیید کلون‌های مثبت حاوی ژن *gst::egfp* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز.
- استخراج DNA از نو ترکیب‌ها و هضم آن‌ها با استفاده از آنزیم محدودکننده به‌منظور تأیید بیشتر حضور DNA الحاقی *gst::egfp*.
- تأیید کلون‌های مثبت حاوی EGFP با استفاده از خاصیت فلورسانس.
- تأیید عدم رخداد خطاهای تک نوکلئوتیدی در ژن *egfp* در طی کلون کردن با PCR توسط توالی‌یابی.



شکل-۱: فرآیند تولید کلون.

بخش سوم: بیان، شناسایی و خالص سازی پروتئین های نو ترکیب از باکتری

- استفاده از ژل الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) و تجزیه و تحلیل وسترن بلات به منظور تأیید بیان پروتئین نو ترکیب.
- تهیه یک محیط کشت در مقیاس بزرگ با ایزوپروپیل- β -D-تیوگالاکتوپیرانوسید (IPTG) برای کشت باکتری های نو ترکیب و به منظور تولید مقادیر زیادی از پروتئین های الحاقی.

- خالص سازی پروتئین الحاقی در یک بستر ستونی پیوستگی.
- کمی سازی پروتئین در نتیجه شست و شوی ستون ها.
- استفاده از SDS-PAGE برای خالص سازی ستون ها به منظور بررسی خلوص و میزان تخریب.

بخش چهارم: تجزیه و تحلیل سطوح mRNA

- خالص سازی RNA کل از کلون باکتریایی مثبت.
- انجام رونوشت برداری معکوس با واکنش زنجیره ای پلی مراز (RT-PCR) به منظور تعیین کمیت mRNA بعد از القا با IPTG و یا لاکتوز.

بخش پنجم: اصلاح و یا تراز بیان ژن

- انتقال موقتی EGFP به سلول های HEK293 تیره پستانداران.
- تولید سلول های HEK293 با قابلیت بیان پایدار EGFP.
- بیان کاهش یافته ژن *egfp* با استفاده از RNAi و یا CRISPR.
- خاموش کردن بیان یک ژن انسانی با استفاده از CRISPR.

شیوه نامه های کاربردی متداول

- **معرف ها:** معرفی تمامی معرف ها (واکنش گر ها) و مواد مصرفی در یک زمان برای هر شخصی می تواند مشکل باشد؛ بنابراین، برای فراگیری تمامی این موارد صبر و همکاری نمایید. در صورت تمام شدن یک ماده معرف یا آنزیم، بهتر است از مربی و یا تکنسین برای دریافت بیشتر ماده کمک بگیرید.
- **آنزیم ها:** آنزیم ها بیشتر وقت ها گران قیمت هستند و ممکن است در اثر قرار گیری در معرض دمای اتاق و یا آلودگی خاصیت خود را از دست دهند. برای برداشتن هر آنزیم همواره از یک سر سمپلر^۱ تازه و استریل استفاده کنید. آنزیم ها را در یخ قرار داده و هرگز آن ها را در دمای اتاق، در رک میکروسانتریفوژ^۲ قرار ندهید. همیشه آنزیم ها را به عنوان آخرین جز به واکنش خود اضافه کنید. افزودن آنزیم به محلول های بافر نشده می تواند سبب غیر فعال شدن آن شود.

1. Pipette. tip

2. Microcentrifuge. rack

- **سر سمپلر:** شما با سه مدل سرسمپلر با اندازه‌های P10, P20/P200 و P1000 بر حسب نوع فعالیت، سروکار خواهید داشت. پس از تمام شدن این ابزار، مربی خود را آگاه سازید.
- **تجهیزات:** بهتر است که قبل از استفاده از تجهیزات آزمایشگاهی، شیوه درست استفاده از آن را بیاموزید. در صورت وجود هرگونه شک، به جای یک دانشجوی، از مربی در خواست راهنمایی کنید. علاوه بر تعمیرات پر هزینه، استفاده نادرست از این تجهیزات می‌تواند بسیار خطرناک باشد. در صورتی که تجهیزات به هر نحوی آسیب دید، به‌منظور تعمیر مجدد، گزارش دهید.
- **ایمنی آزمایشگاه:** بهتر است که تمام شیوه‌نامه‌های ایمنی آزمایشگاه ارائه شده توسط مربیان خود را رعایت کنید. فهرستی از قوانین ایمنی عمومی آزمایشگاه ارائه شده است، اما با قوانین خاص موسسه و دوره شما جایگزین می‌شود.

ایمنی آزمایشگاه

خطرات احتمالی پیش رو در طول تمرین‌های آزمایشگاهی شامل قرارگیری در معرض ترکیبات سمی و تابش اشعه ماوراءبنفش (UV) است. اقدامات احتیاطی خاصی باید به هنگام کار با تولید DNA نو ترکیب صورت بپذیرد. برای اطمینان از امنیت و رفاه دانشجویان در قسمت پشتیبانی، اجرا قوانین زیر به‌شدت پیشنهاد می‌شود.

- ۱- خوردن و آشامیدن در آزمایشگاه ممنوع است و هیچ‌گونه مواد غذایی نباید وارد آزمایشگاه شود.
- ۲- استفاده از عینک محافظ در تمامی لحظات حضور در آزمایشگاه ضروری است.
- ۳- هنگام حضور در آزمایشگاه لباس مخصوص آزمایشگاهی بلند پیشنهاد می‌شود.
- ۴- استفاده از صندل و سایر کفش‌های جلوباز در آزمایشگاه به‌شدت ممنوع است.
- ۵- همیشه هنگام استفاده از مواد خطرناک و تحریک‌کننده از دستکش استفاده کنید. همواره قبل از ترک آزمایشگاه دستکش‌های خود را دور انداخته و به‌منظور جلوگیری از آلوده کردن تجهیزات آزمایشگاهی و غیره، دستکش‌های خود را به‌صورت پیوسته تعویض کنید.
- ۶- موی بلند باید همیشه در پشت سر بسته شود و به‌منظور جلوگیری از خطرات ناشی از شعله‌های آتش، کشت‌های استریل و مواد شیمیایی خطرناک، از پوشیدن لباس‌های گشاد اجتناب کنید.

- ۷- لوله و سایر تجهیزاتی که برای رشد میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شوند را در ظرف‌هایی با علامت «مخاطره زیستی»^۱ قرار بدهید تا برای فرآیند اتوکلاو فرستاده شوند. محیط‌های کشت مایع حاوی میکروارگانیسم‌ها در ظرف‌های معینی که دارای وایتکس است و بیشتر به عنوان گورستان باکتری‌ها شناخته می‌شود، جمع‌آوری شود.
- ۸- شیشه‌ها را فقط در جعبه‌های مشخص شده برای قرارگیری شیشه قرار دهید. در ظرف‌های اتوکلاو نشده با علامت مخاطره زیستی، شیشه و یا هر جسم تیز دیگری را قرار ندهید.
- ۹- نیمکت آزمایشگاه خود را عاری از به هم ریختگی‌های غیر ضروری نگه دارید. برای نگهداری وسایل شخصی و لوازم اضافی از کابینت و کشو استفاده کنید. در پایان روز، نیمکت شما باید تمیز باشد و تجهیزات شما در جای خود قرار داده شود.
- ۱۰- هنگام استفاده از دستگاه همگن‌ساز فراصوت، از محافظ گوش استفاده کنید.
- ۱۱- در صورت استفاده از دستگاه ترانس‌ایلومیناتور^۲ و در صورتی که دستگاه در کابینت محافظ خود قرار ندارد، همیشه از محافظ UV صورت استفاده کنید. عینک محافظ در برابر UV از شما حفاظت نمی‌کند. سعی نکنید ژل خود را روی ترانس‌ایلومیناتور تجزیه و تحلیل کنید. در صورت استفاده از یک تصویربردار دیجیتال، ژل خود را روی صفحه نمایش تجزیه و تحلیل کنید و در صورت عدم دسترسی به آن، از ژل خود عکس گرفته و سپس آن را تجزیه و تحلیل کنید.
- ۱۲- دستان خود را پیش از ترک آزمایشگاه به صورت کامل شست‌وشو دهید.
- ۱۳- تمام نشی‌ها باید به سرعت از بین رود. در صورت ریختن یک ماده شیمیایی یا مایع بالقوه خطرناک حاوی میکروارگانیسم‌های زنده به مربی اطلاع دهید.
- ۱۴- هرگونه نشت، بریدگی، سوختگی و یا سایر آسیب دیدگی‌ها را به یک مربی ارجاع دهید.
- ۱۵- از محل کیسول خاموش‌سازی آتش، محلول شست‌وشو چشم، دوش اضطراری و خروج اضطراری آگاهی پیدا کنید.
- ۱۶- در صورتی که شما در کار کردن با منبع برق و یا جریان ژل برق مشکل داشتید، به مربی اطلاع دهید. در صورت مشاهده برق‌گرفتگی یک شخص، سعی کنید با استفاده از یک جسم نارسانا همانند یک ظرف پلاستیکی، جریان را قطع کنید؛ در غیر این صورت شما نیز ممکن است دچار برق‌گرفتگی شوید.

1. BIOHAZARD
2. Transilluminator

۱۷- قبل از ترک آزمایشگاه، تمامی تجهیزات و ابزارهای آزمایشگاهی را در موقعیت مناسب خود قرار بدهید، سپس مطمئن شوید تمامی تجهیزات الکتریکی خاموش شده و همچنین مشعل‌های گاز خاموش هستند.

۱۸- ورود حیوانات خانگی به آزمایشگاه ممنوع است.

۱۹- مواد شیمیایی خطرناک را تنها در ظروف مخصوص خود تخلیه کرده و از ریختن آن در سینک خودداری نمایید.

۲۰- تجدید ایمنی‌زایی نسبت به کزاز به‌شدت پیشنهاد می‌شود.

۲۱- در صورت کارکردن تیره‌های سلولی HEK293 (بخش پنجم)، توجه داشته باشید که این سلول‌ها به انطباق با فرآیند ایمنی زیستی سطح-۲ (BSL-2) نیاز دارند (<https://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/>). این بدان معنی است که مواد مورد استفاده در این آزمایش خطرات متوسطی را برای افرادی که از آنها استفاده می‌کنند دارد و باید در یک محیط حاوی BSL-2 تأیید شده مورد استفاده قرار گیرند.

نکات مفید کلی هنگام کار در آزمایشگاه

۱- هنگام استفاده از آب در آزمایشگاه، شما باید در حد امکان از آب دیونیزه استفاده کنید. برای کاربردهای خاص، حتی استفاده از آبی که با دقت بیشتری تصفیه شده باشد نیاز است. آب استریل (آب دیونیزه شده‌ای که اتوکلاو شده) برای بسیاری از آزمایش‌های مطرح‌شده در این راهنما به‌منظور به حداقل رساندن آلودگی باکتریایی نیاز است. بعلاوه، هنگام کار کردن با مولکول RNA، استفاده از آب مخصوص بدون RNase (بدون هسته) در بیشتر وقت‌ها موارد ضروری است. تحت هیچ شرایطی نباید از آب لوله‌کشی معمولی استفاده کرد.

۲- هنگام استفاده از سمپلر (پایپت)، برای برداشتن هر نمونه به حتم از یک سرسمپلر مجزا استفاده کنید، زیرا مقادیر بسیار اندکی از مایع هنگام برداشت نمونه در سرسمپلر باقی خواهد ماند. در صورت استفاده از یک سری استفاده‌شده به یک نمونه دیگر، احتمال بروز آلودگی وجود خواهد داشت.

۳- از مخلوط کردن مناسب نمونه‌ها اطمینان حاصل کنید. یکی از دلایل عمده شکست آزمایش‌ها، مخلوط نکردن مناسب نمونه‌ها است. در بسیاری از موارد، استفاده از یک ورتکس به این منظور می‌تواند مفید واقع شود. در سایر موارد، نیروی ورتکس بسیار زیاد

بوده که می‌تواند برای نمونه‌های شما مشکل‌ساز شود. به‌عنوان مثال، هنگام خالص‌سازی DNA پلازمید از باکتری، ورتکس کردن نمونه بعد از هضم می‌تواند سبب برش نامطلوب DNA پلازمید شود. در این موارد، ترکیب کردن ملایم‌تر نمونه‌ها نتیجه بهتری خواهد داشت.

۴- هنگام رشد باکتری‌ها در محیط کشت در دمای 37°C و در طول شب، توجه شود که طول مدت رشد در محیط باید در حدود ۱۶ ساعت باشد. انکوباسیون طولانی‌تر سبب تشکیل کلونی‌های ماهواره‌ای شده که اندازه کوچک‌تری دارد و پلازمید مورد نظر در اطراف کلونی اصلی را نخواهد داشت. در صورت نیاز به زمان انکوباسیون بیشتر، رشد در درجه حرارت‌های پایین‌تر برای مدت‌زمان طولانی‌تر می‌تواند مفید واقع شود. رشدی که به‌صورت معمول در دمای 37°C و مدت‌زمان ۱۶ ساعت حاصل می‌شود را می‌توان در مدت‌زمان ۴۸-۷۲ ساعت در دمای اتاق برداشت نمود. این مراحل در شیوه‌نامه‌های مربوط به نکات صرفه‌جویی در زمان ذکر شده است.

۵- هنگام تشکیل کلونی‌های باکتریایی، ظروف حاوی باکتری باید در انکوباتور باکتریایی فاقد درپوش و برعکس شوند (سمت درب به سمت پایین). هنگام نگهداری طولانی‌مدت در یخچال، ظروف (پلیت-منظور پتری دیش) باید در پارافیلیم پیچیده و به‌صورت برعکس قرار داده شوند تا از تجمع متراکم در سطح جلوگیری شود.

۶- برای بارگذاری ژل آگارز باید از سر سمپلرهای رایج (P10, P20/200) استفاده شود. برای بارگذاری ژل SDS-PAGE پروتئین، استفاده از سری‌های بارگذاری نازک ژل امری رایج است. به‌علاوه، هنگام بارگذاری نمونه‌های خود در چاهک‌های ژل، پیستون سمپلر را تا انتها فشار ندهید. انجام این کار سبب کشیده شده هوا به داخل چاهک شده و در نهایت باعث ایجاد مشکل در جابه‌جایی نمونه در چاهک می‌شود. بسیار بهتر است اگر حجم بسیار اندکی ($>1\mu\text{L}$) از نمونه را در سری باقی بگذارید تا اینکه سبب از دست رفتن آن شوید. سری‌های رایج برای بارگذاری در ژل SDS-PAGE نیز می‌تواند مورد استفاده واقع شود، اما باید توجه شود که سری درست در بالای چاهک قرار داده شود و بین دو صفحه واقع نشود، زیرا سری ممکن است سبب جدا شدن صفحه‌ها از یکدیگر شود. محل کار خود را با اتانول ۷۰ درصد ضد عفونی کرده و پیش از شروع و پایان کار، محل را به‌طور کامل پاک کنید. این امر به‌خصوص هنگام کار با باکتری، میزان آلودگی را به کمترین حد می‌رساند. در صورت کار با سلول‌های پستانداران، استفاده از هود کشت سلولی یک ضرورت محسوب می‌شود.

بخش اول
دست کاری DNA

هدف از این بخش آزمایشگاه، پیوند یک ژن از عروس دریایی به یک ژن باکتریایی و بیان یک پروتئین از توالی DNA هیبرید (دورگه) است؛ اما هدف از این کار چیست؟ تغییر ترتیب توالی‌های ژنتیکی یا کلون کردن ژن، یک ابزار قدرتمند برای درک فرآیندهای زیست‌شناسی و برنامه‌های زیست‌فناوری است. با استفاده از ابزارهای بنیادین توسعه‌یافته برای باکتری *Escherichia coli* می‌توان در مورد سایر موجودات پیچیده‌تر، بحث‌هایی را مطرح کرد.

دانشمندان کشف کرده‌اند که *E. coli* هم برای اهداف تولید DNA نو ترکیب و هم به‌عنوان یک توالی مرجع شناخته شده برای انتقال مستقیم و ترجمه DNA بیگانه به پروتئین می‌تواند بسیار مفید واقع شود. با توجه به سرعت خیره‌کننده تولید داده‌های مرتبط با توالی‌های ژنتیکی، عامل محدودکننده توالی‌یابی DNA نیست، بلکه درک ضعیف ما نسبت به عملکرد فرآورده‌های این توالی‌ها است.

از نقطه نظر زیست‌فناوری، کلون کردن یک ژن کد شونده که عمل خالص‌سازی پیچیده‌ای دارد، در *E. coli* می‌تواند یک مزیت قابل توجه باشد، زیرا فرآیند خالص‌سازی با هزینه کمتر و همچنین درجه خلوص بالاتری (در بیشتر وقت‌ها اوقات منطقی‌تر خواهد بود اگر یک ژن انسانی نیز در فرآیند تولید قرار گیرد) انجام خواهد شد. اولین پروتئین نو ترکیبی که تولید و تجاری‌سازی شد، انسولین انسانی بوده که در اوایل دهه ۱۹۸۰ تولید و برای افراد دیابتی بسیاری مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از مهارت‌های بنیادینی که شما در این کلاس فرا خواهید گرفت، قادر خواهید بود تا ژن پروتئین نو ترکیب را کلون، بیان و خالص‌سازی کنید. با استفاده از این مهارت‌ها می‌توانید عملکرد هر پروتئینی را که ژن آن شناسایی شده، بررسی کنید و همچنین پیش‌زمینه‌های مفهومی مورد نیاز برای روش‌های پیشرفته‌تر را بیاموزید.

اکنون از سلول‌های میزبان دیگری برای کلون کردن DNA و بیان پروتئین‌های نو ترکیب همانند باکتری‌های متعلق به جنس *Bacillus*، همچنین میزبان‌های یوکاریوتی همانند بسیاری از مخمرها و قارچ‌ها، گیاهان، کشت سلول حشرات، کشت سلول پستانداران و حتی یک پستاندار زنده کامل استفاده می‌شود. بسیاری از روش‌های تولید DNA نو ترکیب در این دوره قابل استفاده برای کلون کردن در سایر میزبان‌ها هستند.

ژنی که در این دوره اقدام به کلون و بیان کردن آن می‌شود، ژن پروتئین فلورسنت سبز *egfp* است. پروتئین EGFP یک‌سویه پروتئین فلورسنت سبز با نور بهبود یافته از عروس دریایی *Aequorea victoria* است. ژن کد کننده پروتئین فلورسنت سبز (سویه‌های آن همانند ژن *egfp*) به‌صورت گسترده‌ای به‌عنوان ژن گزارشگر^۱ و یا نشانگر^۲ مورد استفاده قرار می‌گیرد. ژن گزارشگر

1. Reporter. gene
2. Marker

عبارت از ژنی است که برای ردیابی بیان پروتئین مورد استفاده واقع می‌شود. در صورت وجود بیان فنوتیپی (تظاهر)، امکان مطالعه فعالیت و یا تعیین محل در محیط‌های مختلف، بافت‌های متفاوت و یا مراحل مختلف نمو پروتئین مورد نظر بسیار راحت‌تر خواهد بود. سازه DNA نوترکیب به گونه‌ای ساخته شده است که ژن گزارشگر به یک ناحیه از پروموتور مورد نظر بپیوندد و سازه به سلول و یا موجود میزبان منتقل و یا یکپارچه شود. از EGFP همچنین می‌توان برای علامت‌گذاری (برچسب زدن) سایر پروتئین‌ها و از طریق تولید سازه‌های DNA نوترکیب که توانایی بیان پروتئین‌های الحاقی فلورسنت را دارد مورد استفاده قرار داد تا آن‌ها را داخل سلول‌های زنده و یا موجودات ردیابی کرد. در این طرح، از *egfp* به عنوان یک ژن گزارشگر استفاده نمی‌شود، بلکه از آن به عنوان یک ژن مناسب برای اهداف کلون کردن و ارزیابی آن استفاده خواهد شد و از این طریق روش‌های اساسی دست‌کاری DNA نوترکیب و بیان پروتئین فراگرفته خواهد شد.

منبع

Yang T, Cheng L, Kain SR. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res* 1996;24(22):4592_4.

گزینه‌های جایگزین پیشرفته در بخش اول

آزمایش‌های طراحی‌شده در این راهنما به‌ویژه بخش نخست (دست‌کاری DNA)، بخش دوم (غربالگری تغییر یافته‌ها) و بخش سوم (بیان، خالص‌سازی و تجزیه و تحلیل پروتئین‌های نو ترکیب از باکتری) برای دوره‌های مقدماتی زیست‌شناسی مولکولی و یا بیوشیمی طراحی شده‌اند. بر اساس بازخوردهای نسخه‌های قبلی این راهنما، ما در این نسخه پیشنهادهایی را برای کلاس‌های پیشرفته و تحت عنوان جایگزین‌های پیشرفته¹ (AAs)، در اول هر بخش قرار داده‌ایم. این جایگزین‌ها، به‌گونه‌ای طراحی شده‌اند که راه‌های منحصربه‌فردی را برای دانشجویان ارائه دهند تا در طراحی مشابه، بدون پیروی از روش‌های گام‌به‌گامی که در این کتاب توضیح داده شده است، حرکت کنند. دانشجویانی که با روش‌های بنیادین (PCR، هضم با محدودکننده، خالص‌سازی پروتئین) آشنایی داشته‌اند می‌توانند از این روش‌های پیشرفته برای تولید یک طرح تحقیقاتی مستقل استفاده کنند. با در نظر گرفتن تغییراتی که اعمال می‌شود، مدت‌زمان تکمیل آزمایش‌ها نیز ممکن است به‌صورت قابل توجهی تغییر کند؛ بنابراین، پیشنهاد می‌شود که مربیان در برنامه‌ریزی‌های خود با احتیاط عمل کنند و مراقب اجرا منطقی هر یک از این تغییرات باشند. بخش‌های چهارم (تجزیه و تحلیل سطوح mRNA) و پنجم (تراز و اصلاح بیان ژن) شامل قسمت‌های جایگزین پیشرفته در اول فصل نمی‌شوند، زیرا آن‌ها بخش‌های پیشرفته‌اند و همچنین تا حدودی به‌صورت انعطاف‌پذیر طراحی شده‌اند.

جایگزین‌های پیشرفته، پیشنهادهای گسترده‌ای را در اختیار قرار داده که می‌توانند طراحی آزمایش را به‌صورت کامل (یک ژن به غیر از *egfp* را کلون کند) و یا توالی آزمایش‌های ذکر شده در کتاب را تغییر دهند (به‌عنوان مثال، یکی از مراحل غربالگری را حذف کند). برخی از پیشنهادهای تحت عنوان افزوده‌ها بیان شده درحالی‌که برخی دیگر حاصل از اقتباس از آزمایش‌های خاصی بوده که پیشتر توضیح داده شده است (به‌عنوان مثال: تجزیه و تحلیل نیمه کمی ژل؛ استفاده از پروتئاز برای جدا کردن GST از EGFP).

جایگزین‌های پیشرفته: قسمت اول - دست‌کاری DNA

هدف از این بخش کلون کردن یک ژن *egfp* در یک وکتور بیانی با توانایی بیان یک پروتئین الحاقی با یک برچسب (ژن گزارشگر) به‌منظور ساده کردن فرآیند خالص‌سازی است. دانشجویان و مربیان پیشرفته که به دنبال تنوع در کلاس بوده، ممکن است طرح انتخابی خود را تغییر دهند، درحالی‌که همچنان موضوع کلی دوره را حفظ خواهند کرد (کلون، غربالگری، خالص‌سازی). در این

1. Advanced. Alternatives

بخش پیشنهادهایی ارائه شده که امکان برگزاری آن توسط دانشجویان باتجربه‌تر و یا مربیان در کلاس‌های کوچک‌تر امکان‌پذیر خواهد بود. به‌صورت خاص، تعدادی از تغییرات پیشنهادی در این بخش (دست‌کاری DNA) در سراسر طرح به کار گرفته خواهد شد. نظرات تجربی به‌طور کلی نشان می‌دهد که چگونه این روش جایگزین بر آزمایش‌های پایین‌دستی در دوره تأثیر می‌گذارد.

۱-۱ کلون *egfp* با آغازگرهای مختلف

دانشجویان می‌توانند به‌جای استفاده از آغازگرهای طراحی و بحث شده در این متن، از آغازگرهایی که خود طراحی کرده استفاده کنند. آغازگرها ارزان‌قیمت هستند و امکان سفارش آن برای هر آزمایشگاه و یا دانشجو امکان‌پذیر خواهد بود. دانشجویان می‌توانند تجربه طراحی و سفارش آغازگرها و همچنین حل کردن و تعیین رقت مناسب آن‌ها برای استفاده در طرح‌های خود را بیاموزند. شیوه‌نامه‌های کلی برای طراحی آغازگر در جلسه ۲۵ آزمایشگاه، بخش CRISPR پیشرفته گنجانده شده است. یکی از نکته‌های قبل توجه در طراحی آغازگرها برای فرآیند کلون این است که نوکلئوتیدهای معرفی شده برای کلون کردن (محل‌های محدود شونده و ۳-۴ نوکلئوتید اضافه در انتهای ۵' محل محدود شونده) در محاسبه دمای ذوب آغازگر^۱ (T_M) و یا دمای وصل شدن^۲ در واکنش PCR، نباید نادیده گرفته شوند. به‌عنوان یک مربی و به‌منظور کاهش تعداد آنزیم‌های مورد نیاز برای کاربردهای پایین‌دست (در زیست‌شناسی مولکولی و ژنتیک، اصطلاح بالادست و پایین‌دست برای اشاره به جایگاه نسبی در DNA و RNA به کار می‌رود. هر رشته DNA یا RNA دارای یک پایانه ۵' و یک پایانه ۳' است که این دو از روی جایگاه کربن روی حلقه دی‌اکسی ریبوز یا ریبوز آن‌ها نام‌گذاری شده‌اند. بسته به جایگاه، بالادست بخشی است که در نزدیکی پایانه ۵' و نیز پایین‌دست بخشی است که در نزدیکی پایانه ۳' است. از آنجایی که DNA دو رشته‌ای است و جهت هر رشته وارونه جهت رشته دیگر است، بالادست و پایین‌دست در هر کدام از این رشته‌ها به ترتیب پایین‌دست و بالادست در رشته دیگر به شمار می‌آید-م)، می‌توان محل‌های محدود شونده را انتخاب کرد.

سایر مواد مورد نیاز

آغازگر PCR طراحی شده توسط دانشجویان؛ آنزیم‌های محدودکننده مورد استفاده (NotI و NcoI) می‌تواند تفاوت داشته باشد.

1. Primer. Melting. Temperature. (T_M)
2. Annealing

فرآیند آزمایشی

آزمایش‌های پایین‌دستی می‌تواند مشابه باشد (در صورتی که NcoI و NotI هنوز برای کلون کردن استفاده می‌شود). آغازگرها باید نزدیک به یک هفته قبل طراحی و سفارش داده شوند.

۱-۲ کلون کردن *egfp* بدون PCR

با توجه به اینکه کلون کردن با استفاده PCR بیشتر وقت‌ها سریع‌ترین و مؤثرترین روش برای انتقال یک توالی از یک وکتور به دیگری است، در برخی موارد، فرآیند ساب‌کلونینگ^۱ (در زیست‌شناسی مولکولی، ساب‌کلونینگ تکنیکی است که برای انتقال یک توالی ویژه DNA از یک وکتور والدی به یک وکتور مقصد استفاده می‌شود) (ساب‌کلونینگ نباید با روش شبیه‌سازی مولکولی molecular cloning که یک تکنیک مرتبط است، اشتباه گرفته شود-م) را می‌توان به راحتی و بدون استفاده از PCR و تنها با استفاده از یک هضم (ناحیه) محدودکننده هر دو وکتور و الحاق (ژن مورد نظر) انجام داد. در مورد pEGFP-N1 و pET-41a، این امر را می‌توان با هضم دو وکتور با استفاده از NcoI و NotI، خالص‌سازی قطعات از ژل آگارز پس از بستن ژل انجام داد. اطلاعات مربوط به خالص‌سازی ژل در در جلسه ۲۵ آزمایشگاه، بخش CRISPR پیشرفته گنجانده شده است.

سایر مواد مورد نیاز

مقادیر کافی از pEGFP-N1 (۱ µg در هر گروه)؛ کیت خالص‌سازی DNA از ژل (توسط بسیاری از شرکت‌ها فروخته می‌شود).

فرآیند آزمایشی

وکتورها باید در یک جلسه آزمایشگاهی خالص‌سازی و هضم شوند. این جلسه باید برای خالص‌سازی ترکیبات هضم شده از ژل آگارز با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA از ژل اختصاص داده شود. فرآیند وصل شدن و انتقال (ژن) می‌تواند هفته بعد انجام شود. به طور کلی، این فرآیند باید کمتر از یک هفته طول بکشد؛ در نتیجه دانشجویان همچنان فرصت انجام PCR با استفاده از شیوه‌نامه موجود در بخش دوم را خواهند داشت.

1. Subcloning

۳-۱ کلون یک ژن به غیر از *egfp*

آزمایش‌های استاندارد در این راهنما همگی پیرامون کلون کردن و بیان ژن *egfp* قرار دارد. دلیل انتخاب این ژن به توانایی بسیار سریع و ساده سنجش عملکردی فلورسنت بازمی‌گردد. با این حال، بسیاری از ژن‌ها به این راحتی عمل نمی‌کنند. شیوه‌نامه ارائه‌شده در این راهنما را می‌توان با هر ژنی اجرا نمود. در صورتی که یک مربی و یا دانشجو ژن یا پروتئین خاصی را تحت عنوان یک طرح تحقیقاتی مطالعه می‌کند، می‌تواند با استفاده از ترتیب مراحل ذکر شده در این کتاب اقدام به تولید و خالص‌سازی پروتئین ترکیبی مورد نظر خود کند. در صورت وجود cDNA در یک وکتور دیگر، آزمایش راحت‌تر خواهد شد. RNA را می‌توان از سلول‌ها خالص‌سازی کرده و cDNA را می‌توان با استفاده از کیت‌های تجاری موجود سنتز نمود و سپس آن‌ها را توسط PCR تکثیر و با یک pET-41a کلون کرد. جزئیات این روش در بخش چهارم موجود است.

آزمایش‌های پایین‌دست که با پروتئین‌های الحاقی سر و کار داشته‌اند، باید تنظیم و پادتن‌های خاصی برای آزمایش‌های وسترن بلات خریداری شوند، زیرا سنجش‌های عملکردی با فلورسنت دیگر کارایی لازم را ندارند. با وجود سادگی بیشتر، این آزمایش‌ها تجربه‌های تحقیقاتی منطقی‌تری را برای دانشجویان فراهم می‌سازند (از جمله احتمال بالا وجود خطا در شرایط آزمایشگاهی بیان ژن و به‌منظور به حداکثر رساندن بیان پروتئین الحاقی محلول). دانشجویانی که توانایی کلون، بیان و خالص‌سازی ژن یک پروتئین را کسب می‌کنند، می‌توانند با ترکیب این آزمایش‌ها و به‌صورت مستقل، داده‌هایی را برای مطالعه عملکرد پروتئین‌ها تولید و منتشر کنند.

فرآیند آزمایشی

شیوه‌نامه آزمایشی می‌تواند در تمامی بخش‌های مرتبط با کلون کردن ثابت باقی بماند. تغییرات تنها می‌تواند در انتهای دوره غربالگری و تجزیه و تحلیل فرآیند خالص‌سازی صورت پذیرد که از مزیت خاصیت فلورسنت EGFP بهره می‌برد. برای غربالگری، دانشجویان باید به سایر آزمایش‌ها (تجزیه و تحلیل Miniprep، داده‌های توالی‌یابی و نتایج PCR) رجوع کنند تا نتایج کلون کردن را تأیید نمایند. تجزیه و تحلیل خالص‌سازی، تنها در صورت تهیه چاهک‌ها روی ژل SDS-PAGE امکان پذیر است.

۴-۱ الکتروفورز نیمه‌کمی ژل آگارز

هنگام انجام یک آزمایش، کسب حداکثر میزان داده از آن امری منطقی محسوب می‌شود. نکته اصلی استفاده از الکتروفورز ژل آگارز، به تفکیک باندهای DNA به‌منظور مشاهده سایز قطعات باز می‌گردد. هنگام بارگذاری حجم دقیقی از نمونه‌ها در چاهک‌های ژل، می‌توان داده‌هایی اضافه بر

سازمان را دریافت کرد. آزمایش‌های نیمه کمی به‌طور دقیق همان نکته مورد نظر است. آن‌ها داده‌هایی کمی را تولید می‌کنند اما دقت آن به‌اندازه نمونه‌هایی که با اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری می‌شوند، نیست. با این حال، با دستیابی به یک تقریب نزدیک از DNA در نمونه خود، می‌توانید به‌دقت اسپکتروفتومتری نمونه‌های خود را اندازه‌گیری کنید. در مواردی که چندین قطعه DNA در یک نمونه قرار دارد، غلظت تک تک قطعات را می‌توان برآورد کرد، درحالی‌که یک اسپکتروفتومتر تنها قادر به تعیین غلظت کل نوکلئیک‌اسید موجود در نمونه خواهد بود. بسیاری از سیستم‌های مستندساز ژل و تصاویر، دارای نرم‌افزارهایی هستند که سبب ساده کردن فرآیند کمی‌سازی می‌شوند. در صورتی شما به چنین دستگاهی دسترسی دارید، شیوه‌نامه مرتبط به آن را مطالعه کنید. حتی بدون دستگاه، می‌توان یک تخمین کلی از غلظت DNA یک نمونه را به دست آورد. ابتدا یک DNA ladder (خط‌کش) باید به‌منظور تعیین جرم هرکدام از باندها استفاده شود. یک DNA ladder با اندازه ۱ kb از NEB (شماره کاتالوگ N3232) برای این امر مفید واقع می‌شود، اما خط‌کشی‌های استاندارد با محدوده جرم‌های گسترده‌تری نیز برای انجام محاسبات دقیق‌تر موجود هستند (مانند DNA ladder با حجم بالا از Invitrogen با شماره کاتالوگ 10496016). با بارگذاری مقادیر مشخصی از خط‌کش، جرم تک تک باندهای موجود در ژل را می‌توان با توجه به نوع خط‌کش تعیین کرد. نمونه‌های خود را با باندهای موجود در خط‌کش مقایسه کنید (برای اطمینان از داشتن جرم DNA قابل مقایسه با باندهای موجود در خط‌کش، بارگذاری حجم‌های مختلف از نمونه مفید واقع خواهد شد). در صورتی که باند شما شدت (روشنایی) مشابهی را با یک باند موجود در خط‌کش داشته باشد، آن‌ها دارای جرم مشابهی هستند. اگر باند شما به نسبت یک باند در خط‌کش دو برابر بیشتر روشن است، می‌توان گفت که جرم نمونه شما دو برابر بیشتر است. در صورت امکان، بهتر است که شدت باند خود با باند موجود در یک خط‌کش دیگر را که اندازه‌ای مشابه دارد مقایسه کنید. به‌عنوان مثال، در صورتی که قطعه شما ۰/۹ kb جرم دارد، بهتر است آن را به‌جای مقایسه با باندهای ۰/۱ kb یا ۱۰ kb، با قطعه ۱ kb در خط‌کش مقایسه کنید، زیرا اندازه باند می‌تواند بر میزان رنگ‌پذیری توسط رنگ (دای) در GelRed¹ تأثیر بگذارد. هنگامی که جرم باند خود را برآورد کردید، می‌توانید غلظت را با تقسیم حجم نمونه خود به دست آورید. به یاد داشته باشید، حجم DNA نمونه شما همان حجمی نیست که در ژل بارگذاری کردید. نمونه بارگذاری شده در ژل همچنین شامل بافر بارگذاری DNA است که نیازی نیست آن را در محاسبه غلظت DNA حساب کنید. برای مثال، اگر شما ۱۰ μL از DNA نمونه را با ۲ μL بافر بارگذاری نوع 63DNA ترکیب کنید و سپس ۱۰ μL از ترکیب را روی ژل بارگذاری کنید،

1. GelRed. dye

حجم DNA برابر خواهد بود با $8/3 \mu\text{L}$. این روش کلی الکتروفورز نیمه‌کمی را می‌توان در شیوه‌نامه‌های دیگر همانند SDS-PAGE نیز به کار برد که در ادامه کتاب مورد بحث قرار خواهد گرفت.

سایر مواد مورد نیاز

DNA ladder با حجم بالا (با کاتالوگ 10496016). DNA ladder با اندازه ۱ kb (با کاتالوگ N3232) نیز می‌تواند مورد استفاده واقع شود، اما محدوده جرمی گسترده‌ای را شامل نمی‌شود.

کلاس آزمایشگاه: جلسه اول

جهت‌گیری: کار کردن با سمپلرها

هدف: از هفته آینده، شما روی یک طرح آزمایشگاهی کار خواهید کرد که کل ترم را پوشش خواهد داد. پیش از آغاز ماجراجویی، آشنایی با فضای آزمایشگاه و تسلط بر تجهیزات مورد استفاده در آزمایشگاه مولکولی-بیوشیمی امری ضروری محسوب می‌شود؛ سمپلرها (مایکروپایپت). در صورتی که مربی شما هنوز جهت‌گیری خاصی را در این مورد انجام نداده باشد، امروز این کار را انجام خواهد داد.

۱- فهرست تجهیزات

آشنایی با محیط کار و تجهیزات آزمایشگاهی پیش از آغاز آزمایش بسیار مهم است. در صورتی که فضای آزمایشگاهی شما به صورت مشترک و در سایر بازه‌های زمانی با کلاس‌های آزمایشگاهی دیگر قرار داشته باشد، بسیاری از تجهیزات را می‌توان به صورت اشتراکی استفاده کرد. با این حال، مواد معینی همانند بافرها و تجهیزات یک‌بارمصرف استریل نباید بین گروه‌های مختلف آزمایشگاهی به اشتراک گذاشته شود. برای شناسایی معرف‌ها و تجهیزات، قفسه‌ها و سایر بخش‌ها را نگاه کنید. فهرست ارائه شده در بخش زیر را بررسی کنید و در صورتی که چیزی از قلم افتاده است، مربی خود را آگاه سازید. مواردی که تحت عنوان «به ازای هر گروه» بوده را نباید در روزهای مختلف آزمایشگاهی بین دانشجویان مختلف به اشتراک گذاشت. این موارد را با حروف اول و روز آزمایشگاه خود برچسب بزنید.

- یک منبع تأمین برق
- یک دستگاه مینی ژل DNA افقی برای ژل آگارز
- چهار عدد سمپلر: P10، P20، P200 و P1000
- یک بسته سرسمپلر ۱۰۰۰ µL استریل به ازای هر گروه
- یک بسته سرسمپلر ۲۰۰ µL استریل به ازای هر گروه
- یک بسته سرسمپلر ۱۰ µL استریل به ازای هر گروه
- یک سطل یخ (خنک‌کننده یا جعبه یونولیتی برای یخ)
- یک بسته دستمال مرطوب (Kimberly-Clark, Roswell, GA)
- یک رک یونولیتی ۱۵ mL و ۵۰ mL برای لوله‌های آزمایش
- یک بسته لوله آزمایش درپوش دار (۷۰×۱۰۰ mm) برای کشت باکتری در شب

- ☐ یک رک لوله آزمایش برای لوله‌های درپوش دار
- ☐ یک بسته ویال میکروسانتریفوژ ۱/۷ mL اتوکلاو شده برای هر گروه
- ☐ یک بسته پایپت یک‌بارمصرف ۱۰ mL
- ☐ پمپ پایپت پلاستیکی یا الکترونیکی
- ☐ یک استوانه مدرج ۵۰ mL
- ☐ یک استوانه مدرج ۵۰۰ mL
- ☐ یک بشر مدرج ۲ لیتری
- ☐ دو بشر یک لیتری به ازای هر گروه، یکی برای آب دیونیزه شده و یکی برای بافر ۱× تریس / بورات / EDTA (TBE)
- ☐ یک بطری ۲۵۰ یا ۵۰۰ میلی‌لیتری پیرکس در نارنجی یا ارلن برای ذوب کردن آگارز به ازای هر گروه
- ☐ یک دستکش حرارتی برای جابه‌جایی آگارز ماکروویو شده
- ☐ برچسب علامت‌گذاری
- ☐ ماژیک با جوهر ثابت
- ☐ یک بطری پلاستیکی فشاری برای الکل ۷۰ درصد
- ☐ یک بطری پلاستیکی فشاری برای آب دیونیزه
- ☐ پایه یک حلقه با گیره
- ☐ یک جفت انبرک با انتهای صاف
- ☐ دو جفت عینک ایمنی
- ☐ یک بسته کیسه فریزر برای هر گروه
- ☐ یک دستگاه ژل پلی‌آکریل‌آمید مینی برای پروتئین
- ☐ دستگاه مینی-ترانس بلات برای پروتئین
- ☐ میکسر و ورتکس
- ☐ میکروسانتریفوژ
- ☐ چراغ بنزن
- ☐ حمام خشک (هیت بلاک)
- ☐ زمان‌سنج
- ☐ پارافیلیم
- ☐ دو ظرف زباله. یکی برای مخاطره زیستی و دیگری غیر مخاطره‌آمیز

۲ - نمونه‌برداری با سمپلر (Micropipetting)

سمپلرها (مایکروپایپت‌ها) ابزارهایی برای اندازه‌گیری حجم‌هایی بسیار اندک از مایعات است که به‌ویژه در برنامه‌های دست‌کاری مولکولی بسیار کاربردی هستند. در این دوره از چهار سمپلر متفاوت استفاده خواهد شد. هر سمپلر دقت اندازه‌گیری مختص به خود را دارد که در جدول زیر نمایش داده شده است. دقت نوع سمپلر مورد استفاده در هر آزمایشگاه ممکن است از لحاظ اندازه‌گیری مقداری متفاوت باشد. به شیوه‌نامه سازنده دستگاه توجه شود.

سمپلر	محدوده حجم (μL)
P10	۰/۵-۱۰
P20	۲-۲۰
P200	۲۰-۲۰۰
P1000	۲۰۰-۱۰۰۰

در ابتدای کار، تنظیم حجم مورد نظر با سمپلرها می‌تواند اندکی مشکل باشد. به همین منظور، برای افراد نوآموز استفاده از P10 و P200 می‌تواند گیج‌کننده باشد، زیرا به‌طور معمول از سر سمپلرهای مشابهی برای آن‌ها استفاده می‌شود؛ بنابراین، قبل از روند برداشت محلول، باید نسبت به انتخاب صحیح سمپلر توجه لازم صورت پذیرد. بسیاری از دانشجویان به‌صورت تصادفی به‌جای $2\ \mu\text{L}$ حجم $20\ \mu\text{L}$ و یا برعکس را اندازه‌گیری می‌کنند.

هنگام استفاده از سمپلرها، همیشه باید ارقام مشخص (اعداد مشخص قابل تنظیم روی دستگاه) را مد نظر قرار داد. عدد صحیح این اعداد به‌وسیله اعدادی قابل مشاهده است (در اکثر برندهای سمپلرها دیده می‌شود). با در نظر گرفتن وجود اختلاف بین برند سمپلرها، بیشتر شیوه‌نامه‌ها بدون توجه به عدد دقیق روی دستگاه، به حجم مورد نظر ارجاع می‌دهند. شما همیشه باید دستگاه خود را با استفاده از ظرفیت اعداد موجود در سمپلر، روی حجم دقیق تنظیم کنید. برای مثال، در صورتی که یک شیوه‌نامه حجم $5\ \mu\text{L}$ را از شما بخواهد، شما باید از طریق محاسبه اعداد موجود در دستگاه، حجم دقیق $5\ \mu\text{L}$ را تنظیم کرده و محلول خود را بردارید.

با استفاده از شکل ۱-۱ و شیوه‌نامه‌های زیر می‌توانید سمپلرهای خود را طوری تنظیم کنید که از بابت برداشت حجم مورد نیاز خود اطمینان حاصل نمایید. هنگام استفاده از سمپلرها، این روش‌ها را انجام دهید.

۱- حجم مورد نظر خود را با گرفتن سمپلر در یک دست و چرخاندن صفحه اعداد با یک دست دیگر تنظیم کنید. صفحه اعداد را از پایین‌ترین (۰۰۰) و بالاترین (۱۰، ۲۰، ۲۰۰ یا

۱۰۰۰) حجم مشخص شده روی دستگاه نچرخانید. با تمرین کردن، با این اعداد آشنا شوید.

۲- یک سری را به قسمت انتهایی سمپلر متصل کنید. برای اطمینان از وصل شدن، سری را با اندکی فشار متصل کنید.

۳- پیستون را تا اولین نقطه توقف فشار دهید. این قسمت سبب جایگزینی حجم معینی از هوا می‌شود که با عدد روی دستگاه تنظیم شده است.

۴- سری را تا عمق ۲-۵ میلی‌متر از مایعی که قرار است خارج شود، فرو کنید. فرو بردن بیشتر سری باعث چسبیدن مایع به قسمت بیرونی سری شده که این امر سبب بروز خطا در اندازه‌گیری خواهد شد.

P20 for 2–20 μ L aliquots

2
0
0

0.02 mL = 20 μ L

1
5
5

0.0155 mL = 15.5 μ L

0
2
5

0.0025 mL = 2.5 μ L**P10 for 0.5–10 μ L aliquots**

1
0
0

0.01 mL = 10 μ L

0
5
5

0.0055 mL = 5.5 μ L

0
0
5

0.0005 mL = 0.5 μ L**تنظیمات سمپلرها****P1000 for 200–1000 μ L aliquots**

1
0
0

1 mL = 1000 μ L

0
5
0

0.5 mL = 500 μ L

0
2
0

0.2 mL = 200 μ L**P200 for 20–200 μ L aliquots**

2
0
0

0.2 mL = 200 μ L

1
5
0

0.15 mL = 150 μ L

0
3
2

0.032 mL = 32 μ L

شکل ۱-۱: صفحه تنظیم سمپلر

۵- اجازه دهید تا پیستون به آرامی به جایگاه اولیه خود بازگردد. در صورتی که پیستون به صورت ناگهانی به عقب بازگردد، در نتیجه اسپری شدن مایع^۱ (پخش شدن ذرات آب در نتیجه فشار هوا-م) سبب آلوده شدن مخزن سمپلر و محلول شما خواهد شد.

۶- قبل از خارج کردن سری از محلول، یک ثانیه صبر کنید تا مایع به صورت کامل وارد سری سمپلر شود. سریع خارج کردن سری از محلول ممکن است سبب ورود مقداری هوا به محلول و ایجاد خطا شود. سپس بررسی کنید که هیچ‌گونه حباب هوا وجود نداشته و مقدار مایع برداشت شده با مقدار مورد نظر مطابقت دارد. حجم $1 \mu\text{L}$ برداشت شده را به صورت دقیق و با یک چشم بررسی کنید، زیرا سخت‌ترین قسمت برداشتن همین حجم محلول است.

۷- سری را در مقابل دیواره جانبی ویال گیرنده و در نزدیکی مایع و یا کف ویال قرار دهید. با فشار دادن پیستون تا اولین نقطه توقف، محتویات آن را به آرامی خارج کنید. مایع باقی‌مانده را می‌توان با فشار دادن پیستون تا دومین نقطه توقف، از سری خارج کرد. از عدم وجود مایع در قسمت سری اطمینان حاصل کنید. در صورتی که مقدار اندکی مایع در سری باقی ماند، سری را دوباره در ویال گیرنده وارد و مقداری مایع را دوباره به سری وارد کنید تا با مایع باقی‌مانده ترکیب شده و سپس محتویات آن را به آرامی خارج کنید.

۸- سری را با فشار دادن دکمه مخصوص خود دور بریزید.

۹- هنگام برداشت آنزیم‌ها و یا تهیه محلول‌های استوک از سری‌های جدید استفاده کنید زیرا احتمال بروز آلودگی وجود دارد. هنگام برداشت حجم‌های حساس، مانند تهیه رقت‌های خاص همیشه از یک سری جدید استفاده کنید، زیرا ممکن است تا ۱۰ درصد از حجم مایع قبلی در سری باقی بماند.

۱۰- کار با حجم‌های کوچک به صبر و دقت کافی نیاز دارد. بهترین کار برای افزودن $1 \mu\text{L}$ به ویال گیرنده، برداشتن ویال و مطمئن شدن از دیدن قطره محلول در گوشه آن است. در مورد آنزیم‌ها، در صورتی که آن‌ها به صورت مستقیم در محلول پراکنده شود، حلقه‌های شلیرن^۲ (رگه‌های نواری شکل یا ناهمگونی‌های نوری در یک ماده شفاف که با چشم انسان قابل دیدن نیست-م) باید از سطح مشترک آب-گلیسرول قابل مشاهده باشد.

1. Aerosols

2. Schlieren, rings

۳- تمرین‌های آزمایشگاهی

هدف از این تمرین کوتاه، آموزش استفاده از سمپلرها است. هر دانشجو رقت‌های مختلفی از پروتئین آلبومین سرم گاوی^۱ (BSA) را تهیه و سپس نتایج خود را از طریق روش ظاهر سازی با استفاده وصل شدن رنگ به پروتئین، با سایر دانشجویان مقایسه می‌کند.

الف. خودآزمایی کار با سمپلر

پیش از ادامه، هر دانشجو باید مهارت‌های خود را در کار با سمپلرها محک بزند. با در نظر گرفتن اینکه یک میلی‌لیتر آب، وزنی معادل با یک گرم دارد، دانشجو می‌تواند این مهارت خود را با اضافه کردن آب به یک ظرف توزین نمونه و ترازو صفر شده بسنجد. برای شروع، یک ظرف توزین نمونه را روی یک ترازو دقیق قرار داده و آن را صفر کنید. سپس، حجم مناسبی از آب را با استفاده از سمپلر روی ظرف بریزید و سپس نتیجه خود را ثبت کنید. شما می‌توانید مقیاس اندازه‌گیری بین نمونه‌های مختلف را صفر کنید. تا زمانی که حداقل یک مجموعه از خودآزمایی را تکمیل نکرده باشید، این عمل را ادامه دهید. زمانی می‌توان از مرحله خودآزمایی عبور کرد که از انتخاب سمپلر صحیح برای برداشت حجم مورد نظر و انتخاب شیوه‌نامه صحیح، اطمینان حاصل کرد. در صورتی که خودآزمایی شما در محدوده‌های وزنی مناسب قرار نمی‌گیرد، برای تصحیح هر کدام از مراحل طی شده و یا تست کالیبره بودن سمپلر، به مربی خود مراجعه کنید. هر دانشجو دست‌کم باید یک مجموعه از خودآزمایی‌ها را انجام دهد؛ انتخاب و تنظیم سمپلر به‌صورت مستقل.

1. Protein. Bovine. Serum. Albumin. (BSA)

خودآزمایی-۱

حجم اندازه‌گیری (μL)	وزن به گرم (در ۵ درصد)
۷	۰/۰۰۷۰ (۰/۰۰۶۷-۰/۰۰۷۳)
۳۳/۵	۰/۰۳۳۵ (۰/۰۳۱۸-۰/۰۳۵۲)
۲۶۷/۵	۰/۲۶۷۵ (۰/۲۵۴۱-۰/۲۸۰۹)

خودآزمایی-۲

حجم اندازه‌گیری (μL)	وزن به گرم (در ۵ درصد)
۹	۰/۰۰۹۰ (۰/۰۰۸۶-۰/۰۰۹۵)
۲۶/۵	۰/۰۲۶۵ (۰/۰۲۵۲-۰/۰۲۷۸)
۲۴۸/۵	۰/۳۴۸۵ (۰/۳۳۱۱-۰/۳۶۵۹)

خودآزمایی-۳

حجم اندازه‌گیری (μL)	وزن به گرم (در ۵ درصد)
۸	۰/۰۰۸۰ (۰/۰۰۷۶-۰/۰۰۸۴)
۴۳/۵	۰/۰۴۳۵ (۰/۰۴۱۳-۰/۰۴۵۷)
۳۶۴/۵	۰/۳۶۴۵ (۰/۳۴۶۳-۰/۳۸۲۷)

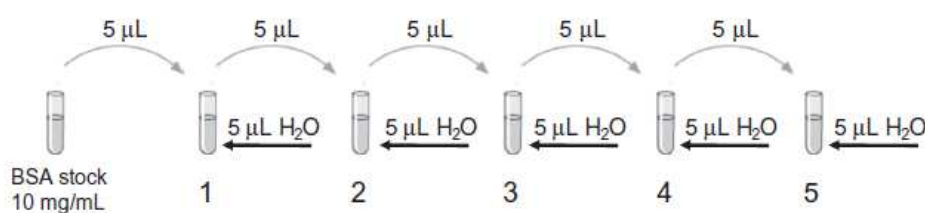
خودآزمایی-۴

حجم اندازه‌گیری (μL)	وزن به گرم (در ۵ درصد)
۶	۰/۰۰۶۰ (۰/۰۰۵۷-۰/۰۰۶۳)
۳۲/۴	۰/۰۳۲۴ (۰/۰۳۰۸-۰/۰۳۴۰)
۲۴۶/۵	۰/۲۴۶۵ (۰/۲۳۴۲-۰/۲۵۸۸)

ب. تهیه رقت‌های مختلف از پروتئین آلبومین سرم گاوی

به شما ویالی با ۱۰ μL و غلظت ۱۰ mg/mL BSA داده خواهد شد. برحسب شیوه‌نامه ارائه شده در زیر و شکل ۱-۲، پنج رقت استاندارد از BSA را در ۵ ویال مختلف تهیه کنید. برای محلول هر رقت، از یک سرسمپلر جدید استفاده کنید. هرکدام از افراد شرکت‌کننده در آزمایشگاه، باید یک سری از رقت‌ها را ایجاد کنند.

ویال	رقت	غلظت پروتئین (mg/mL)
۱	۵ μ L از استوک (۱۰ mg/mL) + ۵ μ L dH ₂ O محلول ۲:۱	۵
۲	۵ μ L از ویال ۱ + ۵ μ L dH ₂ O محلول ۲:۱	۲/۵۰
۳	۵ μ L از ویال ۲ + ۵ μ L dH ₂ O محلول ۲:۱	۱/۲۵
۴	۵ μ L از ویال ۳ + ۵ μ L dH ₂ O محلول ۲:۱	۰/۶۳
۵	۵ μ L از ویال ۴ + ۵ μ L dH ₂ O محلول ۲:۱	۰/۳۱



شکل ۱-۲: نحوه تهیه رقت‌های مختلف از BSA

پ. انجام تست نیتروسلولز نقطه‌ای

Ponceau Red رنگی است که به‌صورت کمی (مقدار معین) به یک پروتئین متصل می‌شود. شما با استفاده از یک سمپلر، مقادیری اندک از رقت‌های مختلف BSA را به یک غشا نیتروسلولز اضافه و سپس آن را رنگ‌آمیزی کنید. این امر به شما این امکان را می‌دهد تا مقادیر نسبی پروتئین را در هر نمونه ببینید و بازخورد بصری را در مورد روش کار با سمپلر/رقیق‌سازی خود ارائه دهید.

۱- یک تکه نیتروسلولز تهیه کنید (همیشه هنگام کار با نیتروسلولز از دستکش استفاده کنید). نیتروسلولز را روی یک تکه کاغذ ۳ میلی‌متری (Whatman, Clifton, NJ) قرار بدهید و بخشی از نیتروسلولز را با هم‌گروهی خود تقسیم کنید.

۲- مقدار ۲ μ L از H₂O دیونیزه (dH₂O شاهد) و هرکدام از نمونه‌های رقت BSA را روی کاغذ لکه‌گذاری کنید. یک هم‌گروهی باید ردیف بالایی نمونه‌ها و دیگری قسمت پایینی را لکه‌گذاری کند. لکه‌گذاری در حجم ۲ μ L بهتر است با نگه‌داشتن سری سمپلر درست در قسمت بالای کاغذ انجام شود. مایع را طوری خارج کنید که در انتهای سری یک قطره ایجاد شود. قطره را روی کاغذ لمس کنید که مایع از طریق خاصیت موئینگی درون کاغذ

کشیده شود. احتیاط: مراقب باشید که هنگام اضافه کردن قطره‌ها، فاصله کافی بین نقطه‌ها وجود داشته باشد تا با هم مخلوط نشوند.

۳- بعد از خشک شدن کامل نقطه‌ها، غشا نیتروسلولوزی را با قرار دادن در یک پتری دیش مربعی و اضافه کردن مقادیر کافی از محلول رنگ Ponceau Red تا جایی که روی غشا را بپوشاند، رنگ‌آمیزی کنید.

۴- رنگ را بشویید (در یک ظرف مخصوص با برچسب استفاده برای رنگ Ponceau Red) و غشا را سه بار با dH_2O شست‌وشو دهید. به قدری آب اضافه کنید که روی غشا پوشیده شود و سپس با استفاده از دستگاه شیکر به آرامی آن را تکان دهید. بعد از ۵ دقیقه dH_2O تازه را اضافه کرده و دوباره به آرامی آن را تکان دهید. توجه: رنگ Ponceau Red را می‌توان چندین بار استفاده کرد، اما در نهایت با رقیق شدن خاصیت خود را از دست می‌دهد.

۵- نیتروسلولوز را روی کاغذ ۳ میلی‌متری قرار دهید تا خشک شود. شدت رنگ هر نقطه را مقایسه کنید. در صورتی که شدت رنگ شما با هم‌گروهی خود متفاوت است، این عمل نیاز به تمرین و تکرار دارد.

پرسش‌های مباحثه‌ای

۱. کاربردهای زیست‌فناوری در زندگی واقعی چیست؟ مهم‌ترین پروتئین و موجودات نو ترکیبی که امروزه استفاده می‌شوند، چه هستند؟
۲. هدف شما از شرکت در این کلاس‌ها چیست؟ امیدوارید چه چیزی آموخته باشید و چگونه می‌توانید شغل یا پژوهش‌های خود را در آینده گسترش دهید؟

کلاس آزمایشگاه: جلسه دوم

خالص سازی و هضم DNA پلازمید (وکتور)

هدف: امروز شما قادر خواهید شد تا DNA پلازمید را استخراج کنید. pET-41a یک وکتور بیانی بوده که شما می‌توانید با استفاده از آن ژن *egfp* را در آن قرار دهید و کلون کنید (جلسه بعدی کلاس). شما فرآیند خالص سازی پلازمید را با کیت QIAprep Spin Miniprep انجام خواهید داد. این شیوه‌نامه با روند تجزیه قلیایی (هضم) سلول باکتری به منظور تفکیک DNA پلازمید از DNA کروموزومی آغاز و به وسیله جذب سیلیکایی به منظور حذف پروتئین‌های سلولی و دیگر ضایعات سلولی و با هدف افزایش درصد خالص سازی ادامه می‌یابد. شما سپس می‌توانید DNA را از نظر کمیت و هضم برآورد کنید.

۱- مقدمه

باکتری *Escherichia coli* در زیست‌شناسی مولکولی تحت عنوان کارخانه سلولی به منظور تولید مقادیر بسیار زیادی از DNA نو ترکیب شناخته می‌شود. امروز شما می‌توانید DNA پلازمید را از باکتری *E. coli* برای دست‌کاری‌های آزمایشگاهی استخراج کنید. هنگامی که DNA پلازمید به باکتری منتقل شود، نسخه‌های مشابهی از پلازمید تولید خواهد شد؛ بنابراین، سلول‌های باکتری حاوی ترکیبی پیچیده از DNA پلازمید، DNA کروموزومی میزبان، پروتئین‌ها، غشاها و دیواره‌های سلولی خواهند بود. ترفندهای مورد استفاده در این بخش به منظور خالص سازی DNA پلازمید خالص و تفکیک آن از DNA کروموزومی و سایر ترکیبات سلولی است.

الف. هضم قلیایی

رایج‌ترین روش مورد استفاده برای تفکیک DNA پلازمید از DNA کروموزومی، روش هضم یا هضم قلیایی^۱ است که توسط Birnboim و Doly ابداع شده است. آن‌ها از ماهیت سوپر کویل^۲ (ابر مارپیچ) و اندازه کمابیش کوچک DNA پلازمید به منظور تفکیک آن از DNA کروموزومی استفاده کردند.

1. Alkaline. lysis
2. Supercoiled

در ابتدا، سلول‌ها توسط ماده شوینده سدیم دوسیل سولفات (SDS) در شرایط قلیایی شکسته می‌شوند. تحت این شرایط، DNA کروموزومی و پلازمیدی آزاد و تجزیه می‌شود (پیوندهای هیدروژنی شکسته می‌شود و DNA به حالت تک‌ رشته‌ای درمی‌آید). در صورتی که DNA تجزیه شده برای طولانی مدت در شرایط قلیایی نگهداری نشود و در صورت وجود رشته‌های مکمل، امکان جوش خوردن رشته‌ها در pH خنثی ممکن خواهد بود. با توجه به ساختار سوپر کویل DNA در سلول باکتری، دو نیمه DNA پلازمید در طول تیمار در شرایط قلیایی تا حدودی درهم تنیده و برای پیوستن دوباره به هم (بازگشت به ساختار طبیعی) در کنار یکدیگر قرار داده می‌شوند. به علت اندازه بسیار بزرگ DNA کروموزومی، پروتئین‌ها و لیپیدهای سلولی به آن متصل باقی می‌مانند و در طی مرحله خنثی‌سازی و در نتیجه افزودن پتاسیم استات، به همراه پروتئین و لیپیدهای تجزیه شده ته‌نشین خواهد شد.

DNA کروموزومی رسوب یافته و سایر ناخالصی‌ها در نتیجه فیلتراسیون و یا سانتریفوژ حذف خواهند شد. همچنین RNA در مرحله هضم قلیایی در نتیجه اضافه کردن RNase به بافر تعلیق مجدد تجزیه خواهد شد. DNA پلازمید دو رشته‌ای را سپس می‌توان توسط اتانول رسوب داد و یا تا سطح بالاتری توسط کروماتوگرافی تبادل آنیونی و یا قرار دادن نمونه روی غشا سیلیکایی خالص‌سازی کرد.

ب. جذب سیلیکایی

بسیاری از ترکیبات سلولی همانند DNA کروموزومی و پروتئین‌های نامحلول، در نتیجه هضم قلیایی، سپس مرحله فیلتراسیون/ سانتریفوژ حذف خواهند شد؛ با این حال، بسیاری از پروتئین‌های سلولی و متابولیت‌ها همچنان باقی خواهند ماند؛ بنابراین، برای دستیابی به خلوص بالاتر، شما باید DNA پلازمید را با درجه بیشتری خالص‌سازی کنید. برای رسیدن به این امر می‌توانید از فرآیند جذب انتخابی با غشا سیلیکا (سیلیکون) استفاده کنید. DNA پلازمید تحت شرایط نمکی غلیظ بهینه می‌شود و به صورت انتخابی توسط غشا سیلیکایی جذب خواهد شد. ناخالصی‌ها شسته شده و سپس DNA پلازمیدی خالص، تحت شرایط نمکی رقیق، شسته خواهد شد.

ب. تعیین کمیت DNA

کمیت DNA در نتیجه خوانش میزان جذب اشعه فرابنفش (UV) حجم معینی از نمونه در طول موج ۲۶۰ nm تعیین می‌شود. میانگین ضریب برافکنی^۱ (میزان جذب نور در یک محیط)

1. Extinction. coefficient

DNA دو رشته‌ای^۱ (dsDNA) خالص برابر است با $50 \mu\text{g/mL}$. این بدان معنی است که هر واحد از A260 dsDNA، معادل $1 \mu\text{g}$ از DNA در هر میلی‌لیتر است. برای ارزیابی خلوص یک نمونه DNA، نسبت جذب در طول موج 260 nm به 280 nm محاسبه می‌گردد. اگر نسبت $260/280$ dsDNA برابر با $1/8$ باشد، خلوص DNA در بهترین حالت خود قرار دارد. در صورتی که نسبت بالاتر باشد، احتمال وجود آلودگی با RNA وجود خواهد داشت، با این حال احتمال جذب نور UV توسط بافرهای رسوب‌یافته در این فرآیند نیز می‌تواند نور UV را جذب کند. در صورتی که نسبت پایین‌تر باشد، احتمال وجود آلودگی با پروتئین مطرح می‌شود. از نسبت $230/260$ نیز می‌توان برای ارزیابی میزان خلوص نمونه استفاده کرد. مقدار بهینه نسبت $230/260$ در محدوده $2-2/2$ قرار دارد. نسبت‌های پایین‌تر به‌طور معمول در نتیجه وجود گوانیدین^۲ اضافه (مخصوص هنگام استفاده از کیت‌های خالص‌سازی ستونی) است.

۲- مقدمه‌ای بر وکتورهای بیانی

در کل، وکتورهای مرتبط با کلون کردن، پلازمیدهایی هستند که بیشتر برای تکثیر DNA استفاده می‌شوند. آن‌ها در تعداد بالا در *E. coli* تکثیر می‌شوند و حاوی یک سایت کلون چندگانه^۳ با مکان‌های محدود شونده هستند که برای الحاق یک قطعه DNA استفاده می‌شود. یک نشانگر قابل انتخاب همانند یک ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک، برای انتخاب باکتری‌های حاوی پلازمید و اطمینان از بقای پلازمید، به آن می‌پیوندد. یک نشانگر با قابلیت غربالگری همانند بتا-گالاکتوزیداز نیز بیشتر وقت‌ها به آن اضافه می‌گردد. با استفاده از بتا-گالاکتوزیداز و ایجاد رنگ‌های آبی و سفید هنگام غربالگری، می‌توان از دریافت و یا عدم دریافت پلازمید توسط باکتری اطمینان حاصل کرد.

وکتور بیانی، نوعی خاص از وکتور کلونینگ است. این وکتورها برای رونویسی و ترجمه پروتئین مرتبط با ژن کلون شده طراحی شده‌اند. برخی از ویژگی‌های این وکتورها همانند داشتن سایت کلونینگ چندگانه و نشانگرهای قابل انتخاب با وکتورهایی که تنها برای تکثیر DNA استفاده می‌شوند، مشابه است، اما آن‌ها به‌طور معمول به تعداد کمتری در سلول‌ها ظاهر می‌شوند و به ندرت شامل نشانگر غربالگری رنگی هستند. آن‌ها در عوض دارای تعدادی ویژگی مهم دیگر همانند داشتن یک پروموتور، محل وصل شدن ریبوزوم^۴ (RBS)، کدون آغاز ATG و بیشتر وقت‌ها (نه همیشه) یک برچسب (تگ) الحاقی برای شناسایی در مرحله خالص‌سازی هستند.

1. Double. -stranded. DNA

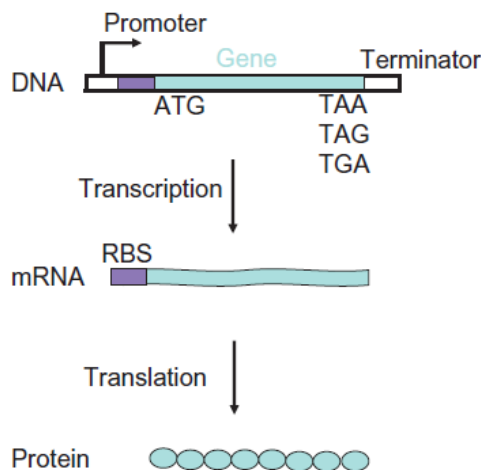
2. Guanidine

3. Polylinker

4. Ribosome. Binding. Site. (RBS)

الف. مبانی بیان ژن

به‌منظور درک عملکرد وکتورهای بیانی، یادآوری قاعده اصلی زیست‌شناسی مولکولی امری ضروری است (شکل ۱-۲). برای بیان شدن یک ژن، ابتدا باید به یک RNA پیام‌بر (mRNA) ترجمه شده و سپس به یک پروتئین ترجمه شود.

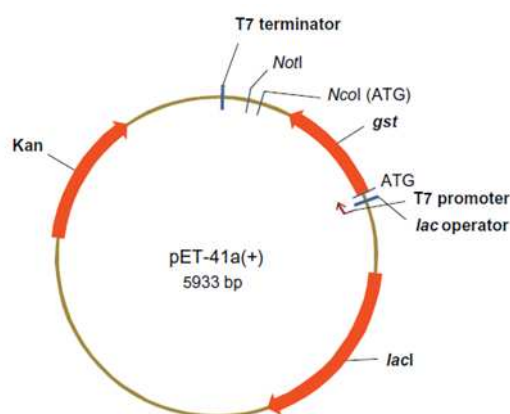


شکل ۱-۲: قاعده اصلی زیست‌شناسی مولکولی. DNA در ابتدا به mRNA رونویسی و سپس به پروتئین ترجمه می‌گردد. آنزیم RNA پلی‌مراز به پروموتور یک ژن روی DNA متصل شده و آن را به mRNA رونویسی می‌کند. با همکاری ریبوزوم و tRNA، رشته mRNA جدید به پروتئین ترجمه می‌شود. mRNA: RNA پیام‌بر؛ tRNA: RNA ناقل.

در ساده‌ترین مثال، RNA پلی‌مراز به پروموتور یک ژن متصل می‌شود و سپس با رونویسی mRNA را تولید می‌کند. رونویسی در توالی پایان دهنده، به پایان می‌رسد. سپس ریبوزوم در RBS به mRNA متصل می‌شود و سپس در طول mRNA حرکت می‌کند. همگام با حرکت ریبوزوم، RNA ناقل که مسئول رمزگشایی mRNA است، به‌صورت اختصاصی آمینواسیدها را به زنجیره پلی‌پپتیدی در حال ساخت اضافه می‌کند. کدون آغاز ترجمه که بیشتر وقت‌ها توسط ATG کدگذاری می‌شود، اولین آمینواسید (به‌طور معمول متیونین) را کد می‌کند و کدون پایان ترجمه (TAG، TAA یا TGA) به فرآیند ترجمه خاتمه می‌دهد (توجه شود که کدهای سه‌تایی به توجه شکل ۱-۲، بر روی رشته DNA واقع شده است-م).

ب. وکتورهای بیانی

وکتور بیانی که شما می‌توانید در طرح خود استفاده کنید عبارت است از pET-41a (شکل ۲-۲). این وکتور شامل ژن مقاومت به کانامایسین^۱ به‌عنوان نشانگر قابل انتخاب و ژن گلوتامین-اس-ترانسفراز^۲ (*gst*) به‌عنوان یک برچسب الحاقی است. مکان‌های کلونینگ چندگانه در قسمت پایین دست (۳') ژن *gst* قرار دارد و بعد از این ژن هیچ‌گونه کدون پایان و یا سیگنال اتمام وجود ندارد؛ بنابراین، وقتی ژن مورد نظر (*egfp*) در مکان‌های کلونینگ چندگانه قرار بگیرد، این ژن به‌عنوان یک پروتئین الحاقی با *gst* بیان می‌شود که نتیجه آن تولید پروتئین الحاقی GST::EGFP خواهد بود. در مورد نحوه تولید این پروتئین الحاقی و با تکیه بر خالص‌سازی پروتئین EGFP در اواخر ترم توضیحاتی ارائه خواهد شد.



شکل ۲-۲: مشخصات کلی وکتور pET-41a.

بیان ژن *gst* و در نتیجه ژن الحاقی در وکتور، تحت کنترل پروموتور T7 قرار دارد که با استفاده از ایزوپروپیل-بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوسید^۳ (IPTG) فعال می‌گردد. در حالت طبیعی، پروموتور با استفاده لاکتوز فعال می‌شود و IPTG با توجه به خواص القایی، از لاکتوز تقلید می‌کند، اما توسط آنزیم بتا-گالاکتوزیداز باکتری *E. coli* جدا نمی‌شود. وکتور pET-41a از دو ویژگی ابران لک یعنی اپراتور *lac* و ژن *lacI* برای تنظیم رونویسی و القا پذیری استفاده می‌کند. در این وکتور، اپراتور *lac* در مجاورت پروموتور T7 قرار دارد. ژن *lacI* یک رپرسور^۴ (سد سنتز mRNA از روی ابران) را کد

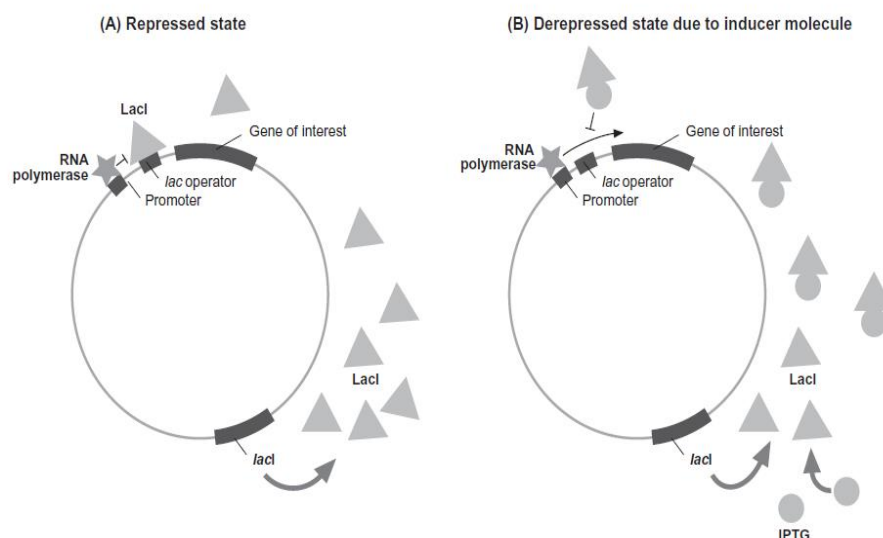
1. Kanamycin

2. Glutathione-S-transferase. gene. (*gst*)

3. Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside. (IPTG)

4. Repressor

می‌کند و دائماً بیان می‌شود؛ بنابراین پروتئین رپرسور LacI همواره وجود خواهد داشت. LacI با وصل شدن به اپراتور *lac* و در غیاب القاکننده، مانع از شروع فعالیت رونویسی آنزیم RNA پلی‌مراز از پروموتور T7 خواهد شد. هنگام اضافه شدن مولکول القاکننده IPTG، این ماده با LacI ترکیب می‌شود که این عمل LacI را از اپراتور *lac* جدا می‌کند و بنابراین فعالیت رونویسی آنزیم RNA پلی‌مراز از T7 آغاز خواهد شد. این فرآیند مانع‌زدایی^۱ (فعال شدن) از پروموتور نام دارد (شکل ۲-۳).



شکل ۲-۳: توقف فعالیت پروموتور با LacI و فعال شدن آن با IPTG. (A) وضعیت غیرفعال پروموتور. (B) وضعیت فعال پروموتور در نتیجه وجود مولکول القاکننده IPTG.

پ. جهت‌گیری و چارچوب خوانش

هنگام کلون کردن ژن مورد نظر با یک وکتور بیانی، جهت‌گیری مناسب و قرارگیری صحیح در چارچوب خوانش با توجه به نقطه آغاز ترجمه (کدون آغاز AUG که توسط وکتور کدگذاری می‌شود) بسیار مهم است.

1. Derepression

ت. جهت‌گیری

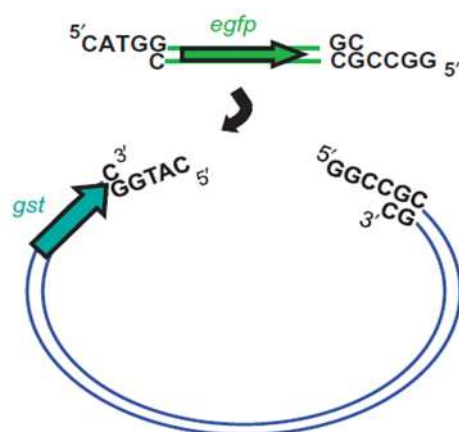
برای اطمینان از قرارگیری ژن مورد نظر در جهت مناسب خود، می‌توان از روش کلونینگ جهت‌دار^۱ که تحت عنوان کلونینگ اجباری نیز شناخته می‌شود، استفاده کرد (شکل ۲-۴). در این روش، جایگاه پلی‌لینکر (همان جایگاه کلونینگ چندگانه) وکتور با دو آنزیم اندونوکلاز محدود کننده مختلف هضم می‌شود که در نتیجه این امر انتهای چسبنده ناسازگار (چهار انتهای چسبنده) ایجاد می‌شود و قطعه کوچک پر کننده^۲ بین دو مکان محدود کننده حذف می‌گردد. سپس، ژن مورد نظر شما با همان دو آنزیم اندونوکلاز محدود کننده بریده و سپس به وکتور متصل می‌شود. کلون کردن با استفاده از این روش به جای کلون کردن با یک اندونوکلاز محدود کننده دارای دو مزیت است:

۱- تولید انتهای چسبنده ناسازگار مانع از وصل شدن مجدد وکتور (به خود) بدون درگیری با ژن مورد نظر می‌گردد (اگرچه، در صورتی که قطعه پرکننده حذف نشود، می‌توان آن را به جای ژن مورد نظر به قسمت بزرگ‌تر وکتور متصل کرد).

۲- جهت‌گیری ژن مورد نظر در یک جهت القا می‌گردد: یعنی انتها ۵' ژن می‌تواند تنها با انتهای یکی از بخش‌های بریده شده وکتور پیوند برقرار کند. به دلیل اینکه توالی وکتور و ژن مورد نظر مشخص است، می‌توان اطمینان حاصل کرد که ژن پروتئین القائی به‌درستی رونویسی و ترجمه می‌شود.

وکتور بریده شده با دو آنزیم محدود کننده NcoI و NotI دارای توالی تشخیص در طول جایگاه کلونینگ چندگانه است. سپس، ژن *egfp* حاصل از PCR با استفاده از همان دو آنزیم محدود کننده (NcoI در ۵' و NotI در ۳') هضم می‌شود و سپس به وکتور بیانی متصل خواهد شد. توجه کنید که رشته‌های واتسون و کریک غیر موازی هستند. اگر NcoI تنها آنزیم مورد استفاده برای برش ژن *egfp* و وکتور pET-41a باشد، ژن مورد نظر قابلیت وصل شدن به وکتور در هر جهت از وکتور را خواهد داشت. در این صورت، تنها ۵۰ درصد از باکتری‌ها تراریخت ممکن است حاوی ژن *egfp* در جهت درست خود باشند. تنها رونویسی از DNA در جهت درست باعث تولید mRNA صحیح و توالی‌های آمینواسیدی صحیح می‌شود. DNA تنها می‌تواند در جهت ۵' ← ۳' رونویسی شود و توالی در قسمت پایین رشته جهت ۵' ← ۳'، با توالی موجود در بالای رشته متفاوت است.

1. Directional. cloning
2. Stuffer. fragment



شکل ۲-۴: یک مثال از کلونینگ اجباری با اندونوکلازهای NcoI-HF و NotI-HF. ژن الحاقی تنها در یک جهت می‌تواند در وکتور قرار بگیرد.

ج: چارچوب خوانش

موقعیت چارچوب خوانش با توجه به نقطه آغاز ترجمه باید حفظ شود تا فرآیند بیان شدن به‌درستی انجام شود. در وکتور pET-41a، فرآیند وصل شدن DNA خارجی با *gst* باید در چارچوب خوانش به‌درستی صورت گیرد تا پپتیدهای پروتئین ژن الحاقی با GST نیز به‌درستی انجام شود. بیشتر وکتورهای بیانی در خانواده‌های سه عضوی طراحی شده‌اند. به‌صورت معمول، تمامی وکتورهای بیانی در یک خانواده مشابه هستند، به غیر از محل چارچوب‌های خوانش مرتبط با جایگاه‌های کلونینگ چندگانه آن‌ها. برای مثال، برای یک محل محدود شونده معین، وکتور اول ممکن است که ژن الحاقی را در چارچوب خوانش +۱ نسبت به موقعیت *gst*، دومی در موقعیت +۲ و سومی در موقعیت +۳ قرار دهد. تنها یکی از این وکتورهای ژن مورد نظر در موقعیت صحیح چارچوب خوانش قرار داده می‌شود و دو وکتور دیگر موقعیت‌های غیر صحیح را دریافت خواهند کرد.

pET-41a و بسیاری از وکتورهای بیانی دیگر دارای یک ساختار اضافه در جایگاه کلونینگ چندگانه هستند که عبارت است از جایگاه محدود شونده NcoI. توالی تشخیص NcoI از نقطه‌نظر وجود توالی ATG، به‌عنوان کدون آغاز برای بیشتر پروتئین‌ها و برای بسیاری از روش‌ها ابزار مفیدی واقع می‌شود. توالی کامل شناسایی NcoI عبارت است از CCATGG. توالی تشخیص NcoI در pET-41a به صورتی قرار گرفته است که ATG توالی آن با کدون آغاز ATG ژن *gst* در یک چارچوب قرار دارد؛ بنابراین، اگر ژن مورد نظر شما با یک ATG که بخشی از جایگاه NcoI

بوده شروع شود، سپس وکتور و انتهای ۵' ژن مورد نظر شما می‌تواند توسط NcoI بریده شود؛ بنابراین، ژن مورد نظر به‌صورت خودکار در موقعیت صحیح چارچوب خوانش و به‌منظور ترجمه قرار می‌گیرد. توجه کنید که ATG ژن مورد نظر به علت وصل شدن به وکتور، نمی‌تواند به‌عنوان کدون آغاز عمل کند و تنها متیونین را رمزگذاری می‌کند. کدون آغاز ATG ژن *gst* (تگ) موجود در pET-41a، هنوز برای مشخص کردن ترجمه پروتئین الحاقی مورد استفاده واقع می‌شود. خوشبختانه، ژن *egfp* که شما در وکتور pET-41a کلون می‌کنید، دارای کدون آغاز ATG در توالی تشخیص NcoI است؛ بنابراین، وکتور و انتهای ۵' ژن مورد نظر می‌تواند با NcoI بریده شوند و سپس با اطمینان از اینکه ژن مورد نظر به‌صورت صحیح در چارچوب خوانش قرار می‌گیرد، به‌هم متصل شوند.

طرحی شماتیک از ناحیه کلونینگ چندگانه خانواده وکتور بیانی pET-41 در زیر ارائه شده است.

pET-41a: ATG...*gst*...CC/C-ATG-GGA-TAT-CGG-G/GA-TCC-GAA-TTC
Met Pro Met Gly Tyr Arg Gly Ser Glu Phe

pET-41b: ATG...*gst*...CC/C-ATG-GAT-ATC-GGG/-GAT-CCG-AAT-TC
Met Pro Met Asp Ile Gly Asp Pro Asn

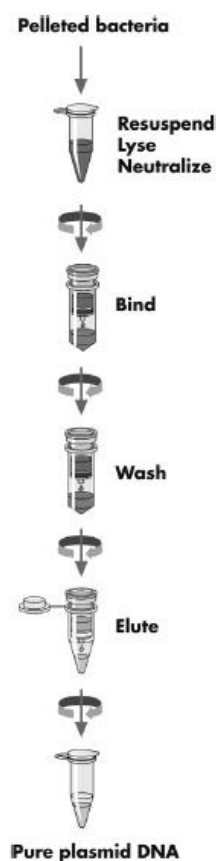
pET-41c: ATG...*gst*...CC/C-ATG-GCG-ATA-TCG-GG/G-ATC-CGA-ATT-C
Met Pro Met Ala Ile Ser Gly Ile Arg Ile

توجه کنید که جایگاه NcoI در تمامی وکتورها در چارچوب‌های خوانش یکسان قرار دارد، اما حذف و اضافه شدن یک جفت باز منفرد در قسمت پایین‌دست جایگاه NcoI، توالی اسیدآمینه را تغییر می‌دهد و جایگاه‌های محدود شونده پایین‌دستی در چارچوب‌های خوانش مختلف را تغییر می‌دهد. جایگاه آنزیم محدود کننده *Bam*HI تحت عنوان یک مکان مرجع شناخته می‌شود. مکان محدود شونده برای NcoI عبارت است از C/CATGG و برای *Bam*HI عبارت است از G/GATCC.

۳- تمرین‌های آزمایشگاهی

الف. راهنمای هضم قلیایی و جذب سیلیکایی

راهنمای مطرح‌شده در این بخش، با مقداری اصلاح از کتابچه راهنما QIAGEN QIAprep Miniprep Kit (June 2015) اقتباس شده است. کلیات این روش در شکل ۲-۵ ارائه شده است.



شکل ۲-۵: کلیات هضم قلیایی و جذب سیلیکایی با کیت QIAprep Miniprep. کپی‌رایت QIAGEN Corporation (2015) با کسب اجازه.

قابل توجه مربیان: تعداد بسیار زیادی کیت برای خالص‌سازی DNA وجود دارد. در صورت انتخاب کیت متفاوت با این راهنما، شیوه‌نامه‌های ارائه شده برای پلازمید با تعداد نسخه پایین را استفاده کنید. قبل از استفاده از کیت، راهنمای تهیه معرف‌ها در کیت را به‌خوبی مطالعه کنید.

۱- دو روز پیش از جلسه آزمایشگاه، مربی یک کلونی منفرد از سویه NovaBlue باکتری *E. coli* (سویه‌های DH5α یا endA⁻ K-12) که حاوی پلازمید pET-41a است را از یک

محیط کشت تازه رگه‌دار شده، حاوی لوریا-برتانی^۱ (LB) / کانامایسین، جدا می‌کند. صبح قبل از جلسه آزمایشگاه، یک محیط کشت آغازگر LB حاوی کانامایسین (۵-۲ میلی‌لیتر) تلقیح و به مدت ۸ ساعت در دمای ۳۷°C و با تکان شدید (حدود ۳۰۰ rpm) انکوبه می‌گردد.

توجه: برای ایجاد هوادهی کافی به محیط کشت از لوله آزمایش یا فلاسک با حجم حداقل چهار برابر از محیط کشت، تهیه شود.

توجه: برای کلاس‌های کوچک‌تر می‌توان از کشت‌های منفرد یک‌روزه (۵-۳ میلی‌لیتر) برای هر دانشجو استفاده کرد. این محیط‌های کشت را می‌توان به صورت مستقیم برای مرحله ۳ استفاده کرد.

۲- عصر قبل از آزمایشگاه، مربی کشت‌های آغازگر ۱ به ۵۰۰ و ۱ به ۱۰۰۰ را در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط انتخابی حاوی LB / کانامایسین رقیق‌سازی می‌کند. برای این کار لازم است که از یک ظرف یا فلاسک با حجم حداقل چهار برابر محیط کشت استفاده شود. تراکم سلولی محیط کشت باید به حجم تقریبی $10^9 \times 3-4$ سلول در هر میلی‌لیتر برسد که به‌طور معمول مرتبط است با وزن ترسیب (ترسیب یا پلتینگ عبارت است فرآیند رسوب باکتری با استفاده از سانتریفوژ) مرطوب که به‌طور تقریبی برابر است با ۳ g/l محیط کشت.

۳- میزان ۵-۱/۵ mL از محیط کشت را از یک ویال میکروسانتریفوژ به دست آورید. پیشنهاد می‌شود برای تولید مقادیر کافی از پلازمید pET-41a خالص‌سازی شده، از حدود ۵ mL از این ماده استفاده کنید. شما حتی می‌توانید ۱- میزان ۵ mL را بین چند ویال میکروسانتریفوژ تقسیم و یا ۲- یک ویال را پر کنید، همان‌طور که در مرحله ۴ ذکر شد آن را سانتریفوژ کنید و سپس بعد از برداشت سوپرناتانت (مواد شناور روی ویال پس از سانتریفوژ)، مقداری بیشتری از محیط کشت را به ترسیب آن اضافه کنید. این عمل را تا زمان ترسیب تمامی ۵ mL محیط کشت ادامه دهید.

۴- سلول‌های باکتریایی را توسط سانتریفوژ $8000 \text{ rpm} \times (6800 \times \text{g})$ و پس از مدت ۳ دقیقه جدا کنید. تمامی بخش‌های سوپرناتانت را با استفاده از سمپلر کردن محیط حد واسط به ظرف مایعات ضایع که حاوی وایتکس ۱۰ درصد است، دور بریزید (توجه: در صورتی که قصد توقف فرآیند و ادامه آن را در زمانی دیگر دارید، ترسیب‌های باکتریایی را در دمای ۲۰°C فریز کنید).

1. Luria-Bertani. (LB)

ب: تعیین کمیت DNA

در قدم بعد، کمیت DNA پلازمید مورد بررسی قرار خواهد گرفت. بر مبنای وجود تجهیزات موجود در آزمایشگاه، می‌توانید از یک نانودراپ^۱ و یا اسپکتروفوتومتر استاندارد^۲ استفاده کنید. در صورت استفاده از اسپکتروفوتومتر، مربی می‌تواند اصلاحاتی را بر مبنای مدل دستگاه و اندازه کووت انجام دهد. شیوه‌نامه هر دو در زیر آورده شده است.

– گزینه اول: استفاده از نانودراپ

در این مورد از یک نانودراپ استفاده می‌شود. در صورت وجود نانودراپ، استفاده از آن به علت سادگی و نیاز به کمترین میزان از DNA، ترجیح داده می‌شود. به علت وجود مدل‌های مختلفی از این دستگاه، به منظور استفاده از آن شیوه‌نامه‌های مربوطه را با مربی خود به صورت دقیق بررسی کنید.

به صورت خلاصه، شما باید از بافر EB به منظور صفر کردن دستگاه استفاده کنید و غلظت dsDNA را ثبت و همچنین نسبت A_{260}/A_{280} را به منظور تعیین میزان خلوص نمونه خود محاسبه کنید. ویال DNA خالص‌سازی شده خود را تحت عنوان «pET-41a بریده نشده» همراه تاریخ و غلظت (با واحد $\text{ng}/\mu\text{L}$) علامت بزنید و سپس نمونه را روی یخ نگهداری کنید (مابقی نمونه را در فریزر نگهداری کنید).

– گزینه دوم: استفاده از اسپکتروفوتومتر استاندارد

در این روش به منظور تعیین کمیت DNA از یک اسپکتروفوتومتر استاندارد UV/Vis^۳ (طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش) که قابلیت جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر را داشته باشد، استفاده می‌شود؛ از جمله این دستگاه‌های می‌توان به GeneQuant apparatus از شرکت Amersham Biosciences اشاره کرد. در بیشتر این ابزارها می‌توان از کووت‌های یک‌بار مصرف عبور دهنده اشعه UV که مقادیر کوچک‌تر از μL ۵۰ را در خود جای می‌دهند، استفاده کرد.

قابل توجه مربیان: در صورت استفاده از این روش و به منظور اطمینان یافتن از کمتر بودن مقدار A_{260} از ۱/۰، ممکن است که به کاهش میزان غلظت نمونه اولیه نیاز پیدا شود.

-
1. Nanodrop
 2. Standard. spectrophotometer
 3. Ultraviolet–visible. spectroscopy

- ۱- دستگاه اسپکتروفوتومتر را ۱۵ دقیقه پیش از استفاده روشن کنید.
- ۲- مقدار ۵۰ μL از بافر EB را در یک در کووت UV قرار بدهید و دستگاه را صفر کنید. بسیار دقت کنید که اثر انگشت شما روی قسمت‌های شفاف کووت قرار نگیرد. در صورت بروز این مورد، آن را به‌خوبی تمیز کنید.
- ۳- در یک کووت UV یک‌بار مصرف دیگر، میزان جذب نوری حجم ۵۰ μL از DNA خود را طول‌موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر ثبت کنید.
- ۴- غلظت را محاسبه و سپس میزان خلوص نمونه اصلی خود را برآورد کنید.
برای برآورد غلظت DNA خود از معادله $\text{DNA (ng/}\mu\text{L)} = (A_{260}) \times (50 \text{ ng/}\mu\text{L})$ استفاده کنید. در صورتی که DNA استخراجی اصلی خود را پیش از اندازه‌گیری با کووت رقیق کرده‌اید، آن را در محاسبه نهایی غلظت لحاظ کنید.
- برای تعیین خلوص DNA خود، از نسبت A_{260}/A_{280} استفاده کنید.
- ۵- غلظت و میزان خلوص DNA را محاسبه و یادداشت کنید. در صورتی که این نسبت از ۱/۸ تفاوت معنی‌داری داشت، به مربی خود اطلاع دهید.
- ۶- ویال DNA خالص‌سازی شده خود را تحت عنوان «pET-41a بریده نشده» به همراه تاریخ و غلظت (با واحد ng/μL) علامت بزنید و سپس نمونه را روی یخ نگهداری کنید (بقیه نمونه را در فریزر نگهداری کنید).

پ: هضم محدود شونده وکتور بیانی pET-41a، وکتور الحاق پروتئین GST

هدف: در این بخش شما وکتور پلازمید pET-41a را به‌منظور پذیرش ژن *egfp* که در هفته‌های بعدی کلون خواهید کرد، آماده می‌کنید. برای انجام این عمل، شما وکتور pET-41a را به‌صورت هم‌زمان با استفاده از دو اندونوکلاز محدود شونده NcoI و NotI هضم خواهید کرد. این امر شما را قادر خواهد ساخت که ژن *egfp* را در وکتور در یک جهت انتخابی کلون کنید و از ترجمه صحیح پروتئین الحاقی GST::EGFP اطمینان حاصل کنید.

هضم با آنزیم‌های محدود کننده

فعالیت محدود شونده آنزیم به‌صورت میزان آنزیم مورد نیاز (برآورد شده با واحد U) که مقدار ۱ μg از DNA (به‌طور معمول DNA لامبادا) را در مدت یک ساعت و در دمای بهینه مورد نیاز برای فعالیت آنزیم (به‌طور معمول ۳۷°C) به‌صورت کامل شکاف می‌دهد، تعریف می‌شود. بافرها به‌طور معمول در غلظت‌های ده برابری (۱۰×) برای آنزیم‌های محدود شونده استفاده می‌شوند. شیوه‌نامه کلی هضم با استفاده از آنزیم‌های محدود شونده به‌صورت زیر است:

- میزان مقدار DNA مورد نیاز برای شکاف تعیین.
- حداقل پنج برابر بیشتر از میزان آنزیم مورد نیاز استفاده شود.
- میزان حجم آنزیم بیش از ۱۰ درصد از حجم نهایی نباشد.
- بافر ۱۰× باید به غلظت نهایی ۱× رقیق شود.
- آنزیم‌ها باید در مرحله آخر واکنش اضافه شوند.

شیوه‌نامه کلی آزمایشگاه‌های نیواینگلند (NEB) برای انجام هضم محدود شونده در جدول زیر ارائه شده است:

ماده مصرفی	مقدار نهایی/غلظت
DNA	۱ µg
بافر ۱۰ ×	۱×
آب	برای رساندن حجم نهایی به ۵۰ µl
آنزیم (های) محدود کننده	حداقل ۵ U به ازای هر µg از DNA
دمای انکوباسیون: وابسته به آنزیم (در بیشتر موارد ۳۷°C)	

برخی از آنزیم‌های تحت شرایط غیر بهینه، شکاف را در محل دوم ایجاد کرده که سبب تولید فرآورده‌ای با عنوان فعالیت ستاره‌ای^۱ می‌شوند. با این حال، بسیاری از آنزیم‌ها با میزان صحت عملکرد بالا^۲ (HF) تولید می‌شود که میزان فعالیت ستاره‌ای را به کمترین حد و یا صفر می‌رساند. بعلاوه، این نسخه از آنزیم‌ها با سرعت بیشتری عمل می‌کنند و فعالیت محدود کنندگی را در مدت ۱۵-۵ دقیقه انجام می‌دهند. هنگام وجود نسخه‌های HF از آنزیم‌ها، استفاده از آن‌ها ترجیح داده می‌شود.

همگام با بهبود فناوری تولید شرکت‌ها، شیوه‌های ارائه شده پیشین به سرعت جایگزین خواهند شد. بعلاوه، شرکت‌های مختلف شرایط واکنشی مختلفی را برای آنزیم‌های معین خود مهیا کرده‌اند. بهترین روش برای به کسب اطمینان از عملکرد درست واکنش اجرایی، مشاهده شیوه‌نامه^۳ استفاده از آنزیم خریداری شده و یا مراجعه به درگاه آنلاین شرکت مورد نظر برای آگاهی از شرایط واکنش است. فعالیت آنزیم تا حد بسیار زیادی به بافر بستگی دارد. هنگام انجام دادن یک هضم مضاعف^۳ (برش یک پلازمید در یک واکنش به‌صورت هم‌زمان با استفاده از دو آنزیم محدود کننده)، یکی از ملاحظات بسیار مهم، فعال کردن هر دو آنزیم در یک بافر است. در صورتی که هر دو آنزیم در یک بافر فعال نشوند، پلازمید به‌طور معمول با استفاده از یک آنزیم بریده می‌شود، با استفاده ستون

1. Star. activity
2. High. fidelity. (HF)
3. Double. digest

چرخشی خالص‌سازی و سپس با استفاده از آنزیم دوم هضم می‌گردد. پیشنهاد ما استفاده از آنزیم‌های NEB است، با این حال، استفاده از آنزیم شرکت‌های دیگر نیز مورد تأیید است.

آماده‌سازی هضم وکتور pET-41a با NcoI و NotI

توجه: تمامی شیوه‌نامه‌های هضم محدود شونده بسیار مشابه است اما ممکن است بین تولیدکنندگان کمی متفاوت باشد و این امر حتی زمانی که یک سازنده معین معرف‌های خود را به‌روزرسانی کند نیز صحت دارد. به همین دلیل، به حتم پیشنهاد می‌شود که شیوه‌نامه‌ها پیش از شروع کار تأیید شود. شیوه‌نامه زیر برای آنزیم‌های شرکت NEB آورده شده است:

۱- شیوه‌نامه آنزیم‌های محدود کننده خود را بر اساس شرکت تولیدی آن (NEB، Fermentas و غیره) جستجو کنید. این کار را می‌توان به‌صورت آنلاین یا با برگه فرآورده‌ای که همراه با آنزیم‌ها ارائه می‌شود انجام داد. به‌عنوان مثال، با رفتن به NEB.com و جستجوی NcoI-HF، در اطلاعات فرآورده آنزیم که شرایط واکنش زیر را بیان می‌کند: بفرش (CutSmart) $1\times$ در دمای انکوباسیون 37°C ، به‌محض تأیید روش، می‌توانید برش خود را بر مبنای آن انجام دهید.

۲- در دفترچه یادداشت آزمایشگاهی خود، یک جدول (مشابه جدول ۱-۲) که شامل تمام موادی است که قرار است در واکنش اضافه کنید برای واکنش هضمی خود ایجاد کنید. این یک تمرین بسیار مفید است و به شما امکان می‌دهد هنگام اضافه کردن مواد، آن‌ها را بررسی کنید. در صورت وجود تعداد زیادی از واکنش‌ها که در آن‌ها به وجود انواع مختلفی از معرف‌ها نیاز است، بررسی نوع معرف‌ها (واکنش‌گر) هنگام اضافه شدن می‌تواند از اشتباهات آزمایشگاهی جلوگیری کند.

جدول ۱-۲: تنظیم واکنش هضم محدود کننده وکتور pET-41a

معرف‌ها	غلظت اولیه	مقدار نهایی / غلظت	حجم (μL)
pET-41a DNA		۱۰۰۰ ng	
CutSmart Buffer	$10\times$	$1\times$	۵
آب استریل	N/A	N/A	
NcoI-HF		۱۰ U	
NotI-HF		۱۰ U	

در این مورد، معرف‌ها بسیار ساده هستند: DNA، بافر، آب و آنزیم‌های NcoI-HF و NotI-HF. به یاد داشته باشید، آنزیم‌ها همیشه در آخر به واکنش‌های آنزیمی اضافه می‌شوند! جدول شما

در دفترچه یادداشت آزمایشگاهی شما باید مانند جدول ۲-۱ باشد که در آن جاهای خالی با مقادیر مناسب پر شود. می‌توان به‌طور خلاصه به هر یک از اجزاء به‌صورت جداگانه نگاه کرد.

DNA: در واکنش هضمی، مقدار $1 \mu\text{g}$ از pET-41a را همان‌طور که پیشنهاد شده است استفاده کنید. در کاربردهای دیگر، ممکن است به مقادیر بیشتر یا کمتر از DNA نیاز باشد، اما $1 \mu\text{g}$ میکروگرم (1000 ng) برای این روش کافی است. برای تعیین حجم DNA پلازمید لازم برای افزودن به واکنش هضمی، از معادله زیر استفاده شود:

$$(\text{ng}/\mu\text{L}) \text{ غلظت} / (1000 \text{ ng}) = \text{مقدار مورد نیاز} (\mu\text{L}) \text{ حجم افزایشی}$$

بافر $10\times$: بافرهای $10\times$ بسیار زیادی در شرکت NEB وجود داشته که این امر در مورد شرکت‌های دیگر نیز صادق است. رایج‌ترین بافر مورد استفاده NEB، بافر برشی CutSmart است که برای هر دو آنزیم NcoIHF و NotI-HF پیشنهاد و به‌عنوان یک محلول استوک $10\times$ عرضه می‌شود. غلظت نهایی باید به $1\times$ برسد. از این امر می‌توان نتیجه گرفت که برای هر $10 \mu\text{L}$ محلول نهایی، به $1 \mu\text{L}$ از بافر $10\times$ نیاز است. هنگامی که واکنش هضمی شما به حجم نهایی $50 \mu\text{L}$ برسد، در این صورت شما به $5 \mu\text{L}$ از بافر CutSmart Buffer $10\times$ نیاز خواهید داشت.

آب: شما آب استریل را اضافه می‌کنید تا حجم نهایی خود را به مقدار دلخواه برسانید، در این مورد $50 \mu\text{L}$ میکرولیتر. شما هنوز نمی‌توانید این حجم را تعیین کنید، زیرا باید مقدار آنزیم‌ها و DNA را که به واکنش اضافه می‌شود محاسبه کنید.

آنزیم (های) محدود کننده: در جدول خود باید دو ردیف مختلف داشته باشید، یکی برای هر آنزیم (NcoI-HF و NotI-HF). پیشنهاد می‌شود حداقل $5 \text{ U}/\mu\text{g}$ از DNA را اضافه کنید. در واکنش امروز خود، باید 10 U (واحد) از هر آنزیم را به واکنش اضافه کنید. غلظت آنزیم‌های محدود کننده به‌طور معمول به‌صورت U/mL یا $\text{U}/\mu\text{L}$ ارائه می‌شود. برای یافتن غلظت آنزیمی مورد استفاده، به داخل فرآورده یا روی لوله آنزیم نگاه کنید. به‌عنوان مثال اگر غلظت آنزیم NcoI-HF برابر با $20000 \text{ U}/\text{mL}$ بود، در این صورت شما به $0.5 \mu\text{L}$ از آنزیم نیاز خواهید داشت $\{ (1000 \mu\text{L}/1 \text{ mL}) \times (1 \text{ mL}/20000 \text{ U}) \times 10 \text{ U} \}$. اضافه کردن بیش از حد آنزیم، به‌ویژه اگر حجم نهایی آنزیم‌های ترکیبی بیشتر از 10 U درصد واکنش کلی باشد، می‌تواند به ایجاد فعالیت ستاره‌ای در نتیجه وجود آنزیم‌های زیادی منجر شود. در صورتی که آنزیم‌های NcoI-HF و NotI-HF با غلظت‌های U/mL 20000 عرضه شود، مقدار $0.5 \mu\text{L}$ از هر آنزیم حجم آنزیم‌ها را به $1 \mu\text{L}$ می‌رساند که تنها 2 درصد از حجم کل واکنش را تشکیل می‌دهد.

اکنون که محاسبه کردید که چه مقدار آنزیم و DNA باید به واکنش اضافه کنید، می‌توانید به عقب بازگشته و حجم آب لازم برای رساندن واکنش به ۵۰ میکرولیتر را محاسبه کنید. دلیل دیگر وجود آنزیم‌های محدود کننده به‌عنوان آخرین معرف در جدول، یادآوری این موضوع است که همیشه باید آن‌ها را در آخر به واکنش اضافه کنید!

۳- اکنون که جدول شما آماده شده است، می‌توانید واکنش‌های هضمی را انجام دهید. یک ویال را با حروف اول خود، "pET NcoI/ NotI digest" و تاریخ، برچسب بزنید تا بتوانید در مراحل بعدی آن را شناسایی کنید. برچسب زدن لوله‌ها بسیار مهم است! مقادیر مورد نیاز را همان‌گونه که در جدول شما توضیح داده شده است پایت کنید و هر جزء را که اضافه می‌شود بررسی کنید. به یاد داشته باشید که همیشه آنزیم‌ها را در آخر اضافه کنید!

۴- ویال خود را با ضربه زدن به‌خوبی مخلوط کنید تا مطمئن شوید که آنزیم‌ها به‌خوبی در محلول مخلوط شده‌اند؛ سپس به مدت ۲,۵ ثانیه سانتریفیوژ کنید تا محتویات به ته لوله برسد.

۵- ویال خود را در یک قفسه (رک) میکرو سانتریفیوژ در انکوباتور 37°C (حمام آب) برای مدت‌زمان پیشنهاد شده قرار دهید. برای آنزیم‌های NcoI-HF و NotI-HF، ۱۵ دقیقه پیشنهاد می‌شود. این امر برای کامل شدن هضم بسیار مهم است؛ بنابراین همیشه طولانی‌ترین زمان پیشنهاد شده را انتخاب کنید. پس از اتمام هضم، نمونه خود را در جعبه فریزر خود ذخیره کنید و در دمای -22°C درجه سانتی‌گراد همراه با ویال حاوی باقیمانده پلازمید برش نخورده خود قرار دهید. شما در آینده از هر دو وکتور هضم شده و برش نخورده خود استفاده خواهید کرد؛ بنابراین بسیار مهم است که آن‌ها را در دمای -22°C درجه سانتی‌گراد ذخیره کنید. همچنین مطمئن شوید که هر دو دارای برچسب هستند تا بتوانید آن‌ها را از یکدیگر تفکیک کنید.

منبع

1. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 1979; 7: 1513.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- اگر بعد از خالص‌سازی پلازمید و انجام خوانش جذب، نسبت A_{260}/A_{280} کمتر از $1/8$ بود، چگونه می‌توانید نمونه را بیشتر خالص کنید تا از آلودگی پروتئینی خلاص شوید؟ آیا همیشه داشتن DNA به‌طور کامل خالص ضروری است؟
- ۲- چرا pH را برای واسرشته‌سازی کردن پلازمید و DNA کروموزومی در طول هضم قلیایی، به جای استفاده از دماهای بالاتر، افزایش می‌دهید، آیا این امر DNA را نیز واسرشته می‌کند؟

کلاس آزمایشگاه: جلسه سوم

تکمیل آماده سازی وکتور و تکثیر ژن *egfp* با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)

۱- مقدمه

ژن *egfp* (ژن بیان کننده پروتئین فلورسنت سبز بهبود یافته) در آینده، در ابتدا تکثیر و سپس بیان خواهد شد. پروتئین فلورسنت سبز (GFP) یک پروتئین طبیعی است که در گونه ای از عروس دریایی فلورسنت به نام *Aequorea victoria* یافت می شود. تفاوت بین خاصیت فلورسانس GFP و GFP افزایش یافته (EGFP) در این است که EGFP نور فلورسنت GFP را هنگام قرارگیری در معرض با نور ماوراءبنفش یا آبی، ۳۵ برابر بیشتر ساطع می کند و بسیار روشن تر است. افزایش فلورسانس با ایجاد جهش در توالی اسید نوکلئیک حاصل شد که منجر به تغییر کوچکی در ترکیب اسید آمینه در ناحیه کروموفور پروتئین شد: Thr←Ser65 و Leu←Phe64. برای کلون کردن ژن *egfp*، از روش واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) استفاده خواهد شد.

کلون کردن با PCR، تنها یکی از روش های گوناگون مبتنی بر PCR است. در این کتاب راهنما، ما از واکنش PCR در چهار آزمایش استفاده خواهیم کرد: کلون کردن با PCR، غربالگری کلون های مثبت با anchored PCR، رونوشت برداری معکوس کمی (real-time PCR) ^۱ و PCR رونوشت برداری معکوس نیمه کمی ^۲. بسیاری دیگر از شیوه های مبتنی بر PCR همانند جهش زایی هدایت یافته مکانی ^۳ مبتنی بر PCR نیز وجود دارد که می تواند در تحقیقات شما مورد استفاده واقع شود.

پیش از ادامه، باید با PCR و کلون کردن مبتنی بر PCR آشنا باشید.

واکنش زنجیره ای پلی مرز چیست؟

به منظور درک کلون کردن با PCR که در این جلسه آزمایشگاهی مطرح است، درک کلی چارچوب این روش مورد نیاز است. PCR برای اولین بار توسط Kary Mullis در سال ۱۹۸۳ توسعه یافته و بسیاری از روش ها را در زیست شناسی مولکولی ساده کرده و امکان توسعه شیوه های جدید بی شماری را ممکن ساخته است.

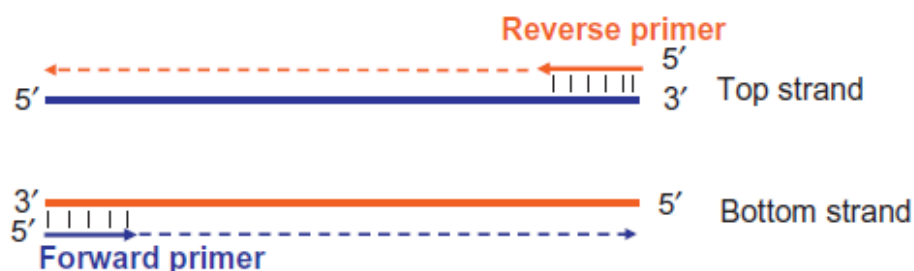
-
1. Quantitative. (Real-time). Reverse-transcription. PCR
 2. Semi-quantitative. Reverse-transcription. PCR
 3. Site-directed. mutagenesis

PCR یک فرآیند لگاریتمی است که در آن توالی‌های DNA تکثیر می‌شوند. در این واکنش از یک DNA پلیمرز مقاوم در برابر حرارت و در چرخه‌های تکراری وصل شدن آغازگر، سنتز DNA و تفکیک DNA دو رشته‌ای که هر کدام از آن‌ها به‌عنوان رشته الگوهای جدید عمل می‌کنند، استفاده می‌شود. از لحاظ نظری، در صورتی که میزان معرف‌ها (واکنش‌گرها) به‌عنوان عامل محدود کننده عمل نکند و آنزیم فعالیت‌های خود را تا انتهای واکنش حفظ کند، تکثیر DNA الگو در یک واکنش PCR برابر است با 2^n که در آن n برابر است با تعداد چرخه‌های واکنش. بعد از انجام ۳۰ چرخه PCR از یک رشته، امکان تولید 1×10^9 رشته DNA جدید وجود خواهد داشت.

یک برنامه معمولی گرما چرخشی (ترموسایکلینگ) PCR شامل مراحل زیر است (دما و زمان دقیق بسته به پلیمرز مورد استفاده متفاوت است):

- ۱- واسرشته شدن مولکول DNA (95°C) ~ 1 دقیقه
 - ۲- وصل شدن آغازگر به رشته الگو (بر اساس دمای ذوب آغازگرها؛ $\sim 60^\circ\text{C}$ برای یک آغازگر معمولی با طول ۲۰ نوکلئوتید (۲۰-mer) ~ 1 دقیقه
 - ۳- طویل شدن DNA (72°C) ~ 1 دقیقه/ کیلوباز
 - ۴- تکرار مراحل ۱-۳ ~ 30 دقیقه
- اسیدهای نوکلئیک کوتاه به‌طور معمول تحت عنوان اولیگونوکلئوتیدها^۱ یا به‌اختصار اولیگو^۲ نامیده می‌شوند. در واکنش PCR، آغازگرهای DNA اولیگوهای با توالی کوتاه و تکرار شده‌ای هستند که به انتهای رشته تکثیر شونده می‌چسبند و در جهت مخالف آن قرار می‌گیرند. به عبارت دیگر، آغازگرها باید به ناحیه‌ای از DNA که باید تکثیر شوند، پهلویی کنند؛ به صورتی که یک رشته به رشته سنس^۳ و دیگری به رشته آنتی‌سنس^۴ متصل می‌شود (شکل ۱-۳). وجود هر دو آغازگر برای تکثیر نمایی رشته‌ها مورد نیاز است. آغازگرها به‌صورت شیمیایی و روی ابزاری به نام سنتز کننده اولیگونوکلئوتید^۵، سنتز می‌شوند. دمای وصل شدن آغازگرها را می‌توان از فرمول دمای ذوب (T_m) مولکول‌های DNA کوتاه‌تر از ۵۰ جفت باز، برآورد کرد:
- $$T_m = (2)(\text{تعداد جفت AT}) + (4)(\text{تعداد جفت GC})$$

1. Oligonucleotides
 2. Oligos
 3. Sense. strand
 4. Antisense. strand
 5. Oligonucleotide. synthesizer



شکل ۳-۱: جهت‌گیری آغازگرهای PCR به نسبت رشته DNA مورد نظر.

آغازگر رفت (forward) به انتهای ۳' رشته پایین متصل می‌شود. هنگام حرکت آغازگر رفت، یک نسخه از رشته بالایی ایجاد می‌شود. آغازگر برگشت به انتهای ۳' رشته بالایی متصل می‌شود. به هنگام حرکت آغازگر برگشت، یک نسخه از رشته پایین ایجاد می‌شود. در صورتی که رشته بالا معادل رشته سنس باشد، آغازگر بازگشت با وجود وصل شدن به انتهای ۳' رشته آنتی‌سنس، یک نسخه از رشته سنس ایجاد می‌کند. به صورت قراردادی، توالی یک ژن به یک رشته مشابه mRNA اشاره می‌کند. رشته الگوی مورد استفاده توسط RNA پلی‌مراز در زمان رونویسی، رشته آنتی‌سنس یک ژن است. این قرارداد درک مفهوم حوزه‌های توالی و ارتباط آن‌ها با موتیف‌های پروتئینی را ساده‌تر می‌کند.

آنزیم DNA پلی‌مراز مقاوم در برابر حرارت که در بیشتر موارد استفاده قرار می‌گیرد، *Taq* DNA پلی‌مراز است که از باکتری گرمادوست *Thermus aquaticus* (که در چشمه‌های آب گرم پارک ملی یلوستون و در دمای ۷۵°C رشد می‌کند) جدا سازی شده است. در آزمایش‌های این کتاب، از یک DNA پلی‌مراز مقاوم در برابر حرارت دیگر به نام *Vent* که از *Thermococcus* *litoralis* جدا سازی شده است، استفاده خواهد شد. *Vent* بیشتر وقت‌ها در زمانی استفاده می‌شود که میزان دقت بسیار بالایی مورد نیاز باشد زیرا این آنزیم دارای فعالیت اگزونوکلاز ۳'←۵' (فعالیت تصحیح^۱) است.

معرف‌های مورد نیاز برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز عبارت‌اند از:

- DNA الگو
- آغازگر برگشت
- آغازگر رفت
- دی‌دئوکسی‌نوکلئوتید تری‌فسفات‌ها (dGTP, dTTP, dCTP, dATP)

● DNA پلی‌مراز پایدار در برابر حرارت

● بافر

● منیزیم (برای فعالیت آنزیم مورد نیاز است و بیشتر وقت‌ها در بافر وجود دارد)

برای بررسی عالی و کامل واکنش‌های PCR، به وبگاه زیر مراجعه کنید:

www.dnalc.org/shockwave/pcranwhole.html

چرا کلون کردن با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز؟

کلون کردن با استفاده از راهکارهای مبتنی بر PCR تا حد زیادی جایگزین کلون کردن سنتی در بیشتر برنامه‌های مطالعاتی شده است. در برنامه‌های کلون‌سازی سنتی، DNA مورد نیاز برای کلون کردن از یک مولکول DNA بزرگ‌تر و با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده جدا و سپس قطعه DNA مورد نظر از ژل آگارز خالص می‌شود. سپس قطعه خالص شده را می‌توان به وکتور مورد نظر متصل کرد.

کلون کردن با روش PCR نسبت به روش سنتی مزایای زیادی دارد که عبارت‌اند از:

۱- به دانستن جایگاه‌های محدود شونده که توسط آغازگرها پهلوزینی شده، نیازی نیست. در

کلون کردن با PCR، جایگاه‌های محدود شونده را می‌توان به‌صورت مهندسی در

آغازگرهای PCR برای ایجاد جایگاه‌های محدود شونده ایجاد کرد و یا از اوورهاینگ‌های^۱

(یک رشته از نوکلئوتیدهای جفت نشده در انتهای یک مولکول DNA) مناسب برای

فرآیند کلون کردن استفاده کرد.

۲- در روش کلون کردن سنتی در صورتی که مولکول DNA مورد نظر شما از یک مولکول

DNA بسیار بزرگ (یک ژنوم) جدا شود، نمی‌توان به‌سادگی قطعه DNA مورد نظر خود

را با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز جدا و سپس خالص‌سازی کرد، زیرا قطعات بسیار زیاد

دیگری نیز با اندازه‌های یکسان یا مشابه وجود خواهند داشت.

۳- فرآیند PCR سریع است.

عیب اصلی کلون کردن با PCR در مقایسه با روش سنتی، نرخ بالای خطای PCR نسبت به

تکثیر و تکرار در شرایط *in vivo* است؛ بنابراین، احتمال وجود خطا در ژن کلون شده بالاتر خواهد

بود. برای غلبه بر این موضوع از دو راهکار می‌توان استفاده کرد:

۱- استفاده از یک DNA پلی‌مراز با خاصیت تصحیح‌کنندگی (همانند پلی‌مراز VENT).

۲- دنبال کردن کلون‌های مثبت فرضی به‌منظور بررسی خطاهایی از توالی یابی که می‌تواند بر

روی توالی اسیدآمینه پروتئین نوترکیب تأثیر بگذارد.

1. Overhangs

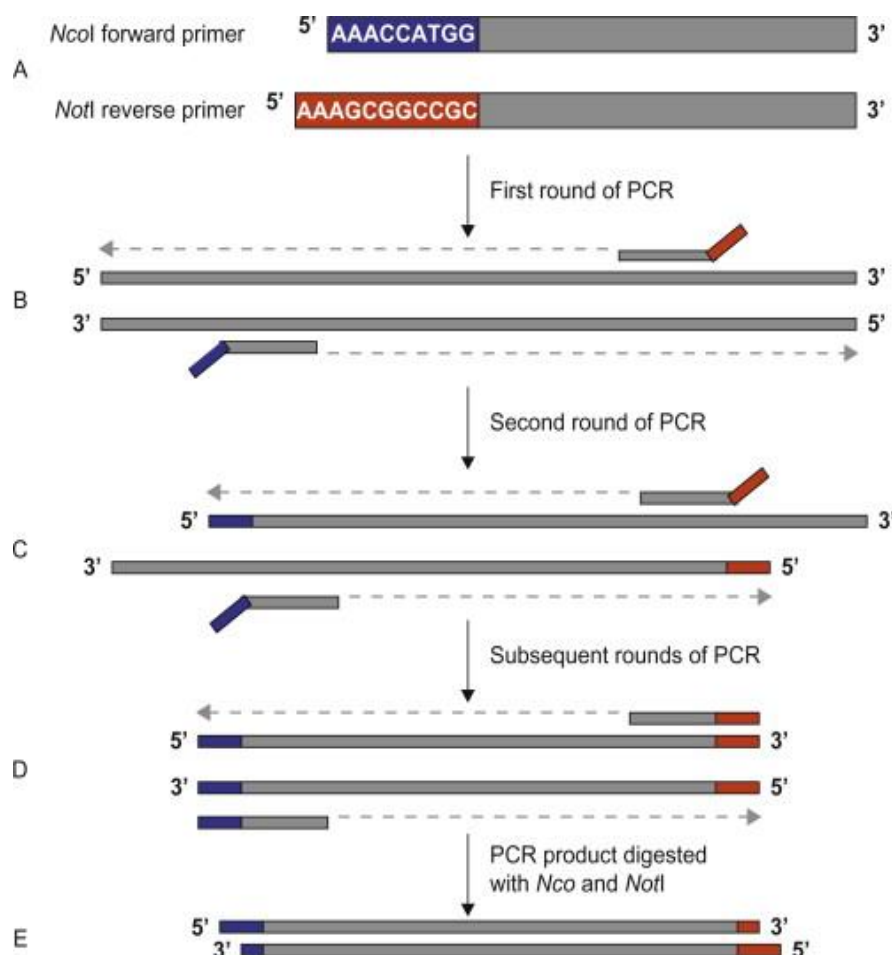
روش‌های متعددی برای کلون کردن فرآورده‌های PCR وجود دارد. دو روش رایج مورد استفاده، کلون کردن TA و کلون کردن با ادغام جایگاه‌های محدود شونده به آغازگرها است.

کلون کردن TA

یکی از روش‌های رایج مورد استفاده یعنی کلون کردن TA، از یک اوورهنگ-A جفت نشده استفاده می‌کند که در انتهای ۳' فرآورده PCR و در واکنش‌هایی که از DNA پلیمراز غیر تصحیح کننده استفاده می‌شود، ایجاد می‌شود. این واکنش‌های PCR را می‌توان به یک وکتور که توسط یک آنزیم ایجاد کننده انتهای صاف بریده می‌شود و سپس می‌توان آن را به منظور دستیابی به یک اوورهنگ-T اصلاح و استفاده کرد. نقطه ضعف این روش در این است که DNA پلیمرازهایی که عملکرد تصحیح را انجام داده‌اند (بنابراین، نرخ خطای کمتری دارند)، در این واکنش‌ها یک اوورهنگ-A را ایجاد نمی‌کنند. (منظور از اوورهنگ-A یک رشته مولکول نوکلئیک اسید با نوکلئوتید انتهایی A (آدنین) و اوورهنگ-T یک رشته مولکول نوکلئیک اسید با نوکلئوتید انتهایی T (تیمین) است-م).

کلون کردن با ادغام مکان‌های محدود شونده به آغازگرها

روش کلون سازی مورد استفاده در این راهنما شامل مهندسی کردن جایگاه‌های محدود کننده به آغازگرهای PCR خواهد بود؛ بنابراین، جایگاه‌های محدود شونده در فرآورده‌های PCR که کلون خواهند شد، گنجانده می‌شوند. شکل ۲-۳ نشان دهنده یک واکنش PCR است که در آن جایگاه‌های محدود شونده به صورت مهندسی در آغازگرها گنجانده شده‌اند.



شکل ۳-۲: گنجاندن جایگاه‌های محدود شونده به یک فرآورده PCR از طریق مهندسی کردن آن‌ها به آغازگرهای رفت و برگشت. (A) آغازگرها را با جایگاه‌های محدود کننده مهندسی شده و نوکلئوتیدهای اضافی لازم برای هضم فرآورده PCR را با جزئیات نشان می‌دهد. (B) و (C) نشان دهنده دو مرحله اول PCR است. توجه داشته باشید که بخش‌های مهندسی شده آغازگرها مکمل رشته الگو نیستند و متصل نمی‌شوند. در (D) مراحل سوم و بعدی واکنش PCR نشان داده شده است. توجه شود که آغازگرها به‌طور کامل به رشته الگو تازه سنتز شده متصل می‌شوند. (E) نشان دهنده DNA هضم شده با انتهای ۵' چسبیده است.

جایگاه‌های محدود شونده توسط DNA الگو کد نمی‌شوند؛ بنابراین توجه کنید که این جایگاه‌ها به رشته الگو متصل نمی‌شوند. به همین دلیل، هنگام در نظر گرفتن دمای وصل شدن در واکنش PCR، دمای ذوب T_m مرتبط با بخش غیر مکمل به آغازگر را اضافه نخواهیم کرد. توجه شود که نیاز است تعدادی نوکلئوتید اضافی در ۵' مکان محدود شونده هر آغازگر اضافه کنیم. دلیل این امر

به هضم کردن فرآورده PCR در مرحله بعد و الحاق آن به وکتور خواهد بود. توجه شود که بیشتر اندونوکلازهای محدود کننده توانایی برش جایگاه‌های محدود شونده که در بخش‌های انتهایی مولکول DNA قرار گرفته‌اند را ندارند. بعد از ارزیابی کردن به دست آوردن یک فرآورده PCR با اندازه مورد نظر، فرآورده PCR را با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده NcoI-HF و NotI-HF هضم می‌کنیم تا انتهای چسبنده سازگار با وکتور بیانی pET-41a هضم شده داشته باشیم و سپس برای مرحله وصل شدن یا لیگاسیون اقدام خواهیم کرد (در جلسه‌های بعدی).

کلون کردن ژن سنتزی

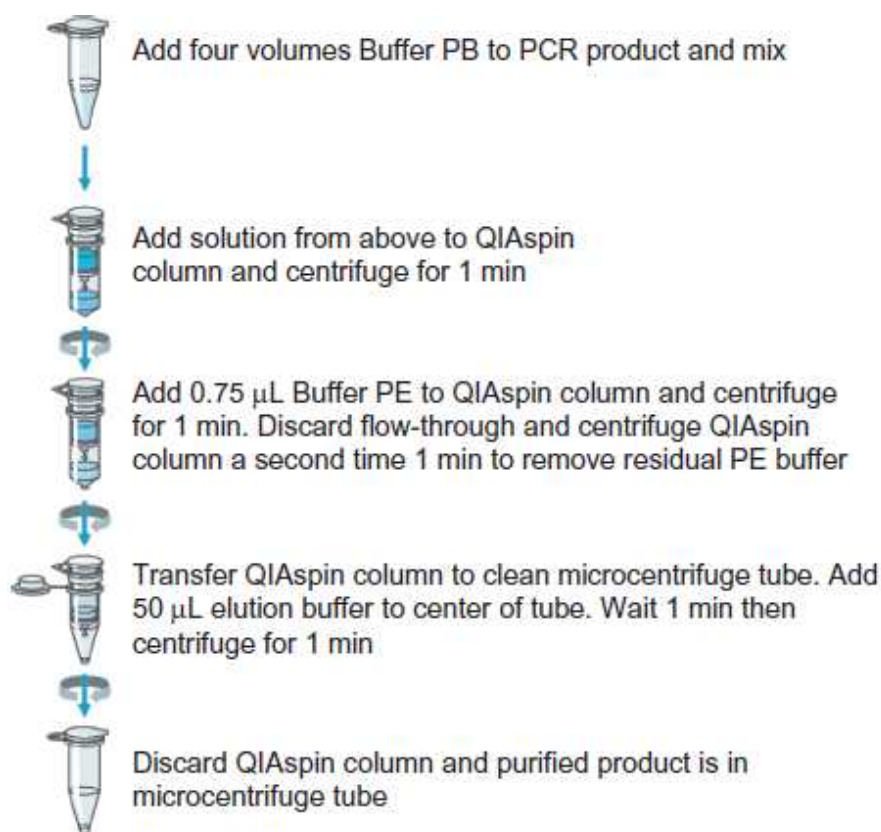
در این روش، کل توالی DNA که قرار است در وکتور وارد شود، به صورت *de novo* ایجاد می‌شود. استفاده از این روش، این مزیت را دارد که توالی ژن را می‌توان به راحتی تغییر داد تا تفاوت‌های استفاده از کدون‌های مختلف بین ارگانیسم مبدأ ژن و میزبان نو ترکیب را مورد بررسی قرار داد. همچنین می‌توان از آن برای ایجاد جهش‌های هدایت یافته مکانی استفاده کرد.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

الف. خالص‌سازی وکتور هضم شده pET-41a

هدف: در این مرحله، آنزیم‌های محدود کننده، نمک‌ها و سایر ناخالصی‌ها از وکتور هضم شده pET-41a شما حذف خواهد شد. وکتوری که در جلسه آزمایشگاه قبلی با NcoI-HF و NotI-HF هضم کردید، در جلسه آزمایشگاهی بعدی برای وصل شدن با DNA الحاقی (*egfp*) استفاده خواهد شد. فرآیند لیگاسیون به غلظت نمک حساس است و بنابراین حذف نمک‌های موجود در بافر هضمی محدود کننده، امری مهم است.

به همین منظور، از شیوه‌نامه کیت خالص‌سازی QIAGEN QIAquick PCR برای حذف آنزیم‌ها و نمک‌ها استفاده خواهد شد (شکل ۳-۳). در این مرحله از ستون چرخشی که براساس اصل جذب سیلیس کار می‌کند (درست مانند ستونی که پیشتر در طول خالص‌سازی پلازمید در مقیاس کوچک استفاده می‌شد)، استفاده می‌شود. از سویی، این عمل را می‌توان با استفاده از روش ترسیب با اتانول و یا ایزوپروپانول نیز انجام داد، اما استفاده از روش QIAquick به دلیل سریع و کارآمدتر بودن (نمونه کمتری مورد استفاده واقع خواهد شد) به نسبت ترسیب الکلی، ترجیح داده می‌شود.



شکل ۳-۳: چارچوب استفاده از QIAquick spin برای خالص‌سازی PCR. فرآورده شرکت *QIAGEN*، استفاده شده با کسب اجازه.

شیوه‌نامه: شیوه‌نامه ارائه شده توسط راهنما و ارائه شده توسط شرکت، اصلاح شده است (QIAquick Spin Handbook April 2015).

توجه: تمامی مراحل سانتریفوژ در سرعت تقریبی ۱۳,۰۰۰ rpm و در یک میکروسانتریفوژ متعارف انجام شود. ویال‌های خود را با سایر گروه‌ها در حالت تراز شده در دستگاه قرار دهید. مطمئن شوید که قبل از شروع، اتانول به بافر PE افزوده شده است.

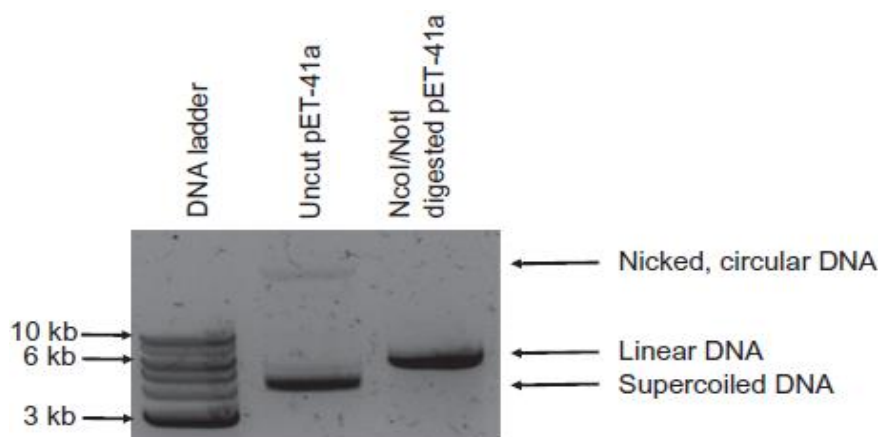
۱- مقدار ۲۵۰ μ L بافر PB را به وکتور هضم شده با NcoI-HF/NotI-HF اضافه و آن را مخلوط کنید.

۲- یک ستون چرخشی QIAquick را در یک ویال جمع‌آوری کننده ۲ mL قرار دهید.

- ۳- برای وصل شدن به DNA، کل نمونه را در ستون QIAquick قرار دهید و به مدت ۳۰ ثانیه سانتیفریوژ کنید.
- ۴- مایع ته‌نشین شده از طریق ستون چرخشی را دور بریزید و ستون QIAquick را در یک ویال جمع‌آوری کننده مشابه قرار دهید.
- ۵- به‌منظور شست‌وشو، مقدار ۰/۷۵ mL بافر PE را به ستون QIAquick اضافه و سپس به مدت ۳۰ ثانیه سانتیفریوژ کنید.
- ۶- مایع ته‌نشین شده از طریق ستون چرخشی را دور بریزید و ستون QIAquick را در یک ویال جمع‌آوری کننده مشابه قرار دهید. به مدت یک دقیقه دیگر سانتیفریوژ کنید.
- ۷- ستون QIAquick را در یک ویال میکروسانتیفریوژ استریل ۱/۵ mL قرار دهید.
- ۸- برای شویش DNA، مقدار ۵۰ μ L از بافر EB را به مرکز غشا QIAquick اضافه کرده، به مدت یک دقیقه صبر کنید و سپس به مدت ۱ دقیقه سانتیفریوژ کنید.
- ۹- ویال حاوی DNA خالص‌سازی شده را با علامت «وکتور خالص‌سازی شده pET41a» و زمان آن برچسب بزنید.
- ۱۰- غلظت نمونه را با استفاده از نانودراپ و یا اسپکتروفوتومتر برآورد کنید (به بخش‌های قبل مراجعه کنید).

ب. الکتروفورز ژل آگارز

الکتروفورز ژل آگارز با این فرض کار می‌کند که تمام DNA دارای بار منفی است. هنگامی که DNA به قطب دارای بار منفی (کاتد) در میدان الکتریکی اضافه می‌شود به سمت قطب دارای بار مثبت (آند) حرکت می‌کند. به دلیل اندازه منافذ ماتریس آگارز، مولکول‌های DNA بزرگ با سرعت کمتری نسبت به مولکول‌های کوچک‌تر در ماتریس مهاجرت می‌کنند. اگر قبل از اینکه باندها از انتهای ژل خارج شوند میدان الکتریکی متوقف شود، باندهای متمایز مرتب شده بر اساس اندازه قابل مشاهده هستند. در مرحله بعد، شما وکتور هضم شده و خالص شده خود را روی یک ژل آگارز جدا تفکیک کنید تا ببینید آیا فرآیند برش DNA کامل شده است یا خیر؟ DNA خطی پس از هضم توسط آنزیم محدود کننده به‌عنوان یک باند واحد با اندازه قابل پیش‌بینی روی ژل آگارز مهاجرت می‌کند. از سوی دیگر، DNA پلازمید دایره‌ای می‌تواند به‌صورت باندهای متعدد ظاهر شود و به دلیل ساختار ثانویه آن، با سرعت مشابهی با DNA خطی مهاجرت نمی‌کند. هنگام تجزیه و تحلیل DNA دایره‌ای روی ژل آگارز، بیشتر وقت‌ها تا چهار باند مختلف را مشاهده خواهید کرد (شکل ۳-۴).



شکل ۳-۴: الکتروفورز ژل آگارز وکتور pET-41a پیش و پس از برش با NcoI-HF و NotI-HF.

توجه داشته باشید که DNA تکرشته‌ای، دایره‌ای و خطی در باند pET-41a برش نخورده مشاهده نمی‌شود، زیرا هیچ‌کدام از گونه‌ها به‌طور معمول پس از خالص‌سازی پلازمید وجود ندارند، زیرا هیچ‌کدام از آن‌ها به‌طور معمول در فرآیند خالص‌سازی پلازمید دیده نمی‌شود. همان‌طور که انتظار می‌رود، DNA خطی تنها باند موجود پس از هضم NcoI و NotI است. روی این ژل همچنین به نظر می‌رسد که ساختار DNA ابر مارپیچ هم وجود دارد که چه‌بسا نشان‌دهنده پلازمید با درجه متفاوتی از ساختار ابر مارپیچ است.

- DNA ابر مارپیچ: این شکل، حالت طبیعی و درون‌زاد DNA است. این باند پس از خالص‌سازی پلازمید، باید باند اولیه از نظر شدت باشد. DNA ابر مارپیچ با وجود داشتن تعداد جفت بازهای یکسان، سریع‌تر از DNA خطی مهاجرت می‌کند، زیرا ساختار ثانویه متراکم آن مقاومت کمتری در حرکت از طریق آگارز دارد.
- DNA حلقوی شکسته شده: این فرم به‌طور معمول بالاترین باند را روی ژل تشکیل می‌دهد و کندتر از DNA خطی مهاجرت می‌کند. DNA شکسته شده در نتیجه شکستگی تکرشته‌ای در DNA ایجاد شده است که بیشتر وقت‌ها در طول فرآیند خالص‌سازی رخ می‌دهد. شکستن تکرشته‌ای باعث از بین رفتن ساختار ابر مارپیچ شده و باعث می‌شود که DNA به دایره بزرگ‌تری تبدیل شود و هنگام مهاجرت از طریق منافذ آگارز مقاومت بیشتری داشته باشد.
- DNA خطی: این فرآورده‌ای است که انتظار می‌رود پس از هضم با آنزیم محدود کننده مشاهده کنید. این حالت در نتیجه استفاده از یک آنزیم برای ایجاد شکاف در هر دو رشته DNA ایجاد می‌شود. با این حال، این حالت همچنین می‌تواند در فرآیند تجزیه و تحلیل

DNA پلازمید هضم نشده نیز مشاهده شود. اگر در طول فرآیند خالص‌سازی هر دو رشته DNA در یک مکان بریده شوند، DNA خطی حاصل خواهد شد که می‌تواند ناشی از آلودگی نوکلئازی نمونه یا در اثر برخورد شدید در طول فرآیند خالص‌سازی باشد. اگر باندی را در نمونه DNA برش نخورده خود مشاهده کردید که بین DNA های شکسته شده وجود داشت، در این صورت DNA دایره‌ای و ابر ماریپیج با اندازه مورد انتظار با DNA خطی شما (همان‌طور که توسط خط‌کش DNA تعیین می‌شود) وجود خواهد داشت که چه‌بسا در نتیجه این امر تشکیل شده است.

● DNA خطی تک‌رشته‌ای: این شکل از DNA گاهی اوقات در خلال خالص‌سازی پلازمید و در نتیجه هضم قلیایی ایجاد می‌شود. در طول این روش، سطوح بالای pH، پیوندهای هیدروژنی بین جفت بازهای DNA در رشته‌های مخالف را از بین می‌برد. خنثی‌سازی حالت قلیایی به پیوندهای هیدروژنی اجازه اصلاح می‌دهد. گاهی اوقات، به‌خصوص اگر شرایط قلیایی برای مدت طولانی ادامه داشته باشد، DNA به‌طور دائم دناتوره می‌شود و نمی‌تواند دوباره متصل شود. نتیجه این امر DNA حلقوی تک‌رشته‌ای است که سریع‌تر از DNA ابر ماریپیج روی ژل آگارز حرکت می‌کند. در بیشتر موارد، این باند را روی ژل خود مشاهده نخواهید کرد.

در این تمرین، شما ظاهر DNA خطی (هضم و خالص‌شده) را با نمونه هضم نشده مقایسه خواهید کرد. اگر نمونه شما به‌طور کامل هضم نشده باشد، به‌جای یک باند، دو یا چند باند وجود خواهد داشت. مطمئن شوید که DNA حلقوی در نمونه هضم شده مشاهده نمی‌کنید. در این صورت مطمئن خواهید شد که DNA به‌صورت کامل هضم شده است. در صورت مشاهده دو یا چندین باند، با مربی خود مشورت کنید.

اتیدیوم بروماید (EtBr) به‌طور معمول برای مشاهده DNA روی ژل استفاده می‌شود. EtBr به باندهای DNA دو رشته‌ای نفوذ می‌کند و پس از قرار گرفتن در معرض اشعه ماوراءبنفش، نور فلورسانس نارنجی/ صورتی از خود بازتاب می‌کند. با این حال، در صورت ورود EtBr به سلول‌ها، این ماده می‌تواند با نفوذ به DNA سبب تشکیل دایمرهای تیمیدین^۱، ایجاد جهش و در نهایت باعث ایجاد سرطان خواهد شد. فرآورده GelRed مولکول DNA را به روش مشابهی با EtBr تشخیص می‌دهد، اما با این حال، این ماده قادر به عبور از غشاء سلولی نیست و بنابراین سلامتی را تهدید نمی‌کند. هر ویال GelRed، حاوی ۱۰,۰۰۰× رنگ نوکلئیک‌اسید خواهد بود. توجه: ویال

1. Thymidine, dimers

باید در یک محیط تاریک و فاقد نور نگهداری شود. شما باید از این استوک در طول یک ترم استفاده کنید.

۱- برای تهیه ژل آگارز ۱ درصد، مقدار یک گرم از آگارز را به ۱۰۰ mL بافر 1 × TBE و در یک ارلن ۲۵۰ mL و یا بطری شیشه‌ای اضافه کنید. بطری را به مدت ۳۰ ثانیه در مایکروویو و در حالتی که درب بطری شل باشد، قرار دهید. به‌دقت مراقب ظرف خود باشید تا از حباب زدن محلول خود جلوگیری کنید. بطری را به‌صورتی بچرخانید تا آگارز به‌طور کامل در بافر حل شود. از دستکش مخصوص به‌منظور چرخاندن بطری استفاده کنید و هرگز ظرف را نزدیک صورت خود نچرخانید.

هشدار: هنگام استفاده از مایکروویو هرگز محلول آگارز را بدون مراقبت رها نکنید. محلول باید به‌صورت دوره‌ای در طول فرآیند گرمایش چرخانده شود تا از گرم شدن بیش‌ازحد منطقه‌ای جلوگیری شود. همیشه هنگام گرم کردن آگارز از دستکش‌های مخصوص و یا اتوکلاو استفاده کنید.

۲- نزدیک به ۳۰ mL از آگارز ذوب شده خود را در یک لوله آزمایش مخروطی ۵۰ mL یک‌بارمصرف بریزید. لازم نیست حجم به‌طور دقیق اندازه‌گیری شود.

۳- شانه را در سینی ژل قرار دهید و دستگاه را همان‌گونه که مربی توضیح داده است، مونتاژ کنید.

۴- مقدار ۳ μL از GelRed (×۱۰,۰۰۰) را به ۳۰ mL از آگارز اضافه کنید و بدون ایجاد کردن حباب، آن‌ها را ترکیب کنید. در نهایت محلول را در محفظه ژل بریزید. قبل از ریختن ژل، اجازه دهید آگارز کمی خنک شود، زیرا بخار آگارز داغ می‌تواند دستگاه ژل را خراب کند. اجازه دهید آگارز باقیمانده در بطری ببندد و سپس درب آن را محکم ببندید. در صورت استفاده از ارلن، می‌توانید دهانه را با پارافیلیم ببوشانید. از این آگارز می‌توان در جلسه‌های بعدی و از طریق ذوب مجدد آن در ماکروویو استفاده کرد.

۵- هنگام بسته شدن ژل، نمونه‌های خود را آماده کنید.

برای آماده‌سازی نمونه‌های زیر، رنگ دای^۱ را به کل نمونه اصلی اضافه نکنید: در صورت انجام، نمی‌توان از آن برای کلون کردن استفاده کرد.

برای تهیه نمونه‌های خود، DNA، آب و رنگ دای را باید با هم مخلوط کنید. فرمول‌های گوناگونی برای استفاده از رنگ دای برای الکتروفورز ژل آگارز وجود دارد. این محلول‌ها می‌توانند غلظت ۲×، ۶× و ۱۰× را داشته باشند. با استفاده از معادله $C_1V_1=C_2V_2$ که در

1. Loading. dye

شیمی عمومی فراگرفته‌اید، می‌توانید حجم صحیح رنگ دای را برای افزودن به واکنش خود محاسبه کنید.

$$C_1V_1=C_2V_2$$

در این فرمول، C_1 برابر است با غلظت و V_1 حجم مجهول رنگ دای. C_2 برابر است با $1 \times$ و V_2 برابر است با حجم نهایی. به‌صورت راحت‌تر « $\times$ » می‌تواند به‌عنوان نقطه قوت راه‌حل در نظر گرفته شود. به‌عنوان مثال، محلول رنگ دای $A2 \times$ دو برابر غلیظ‌تر است و باید به نسبت ۱:۱ (رنگ دای: مخلوط DNA/آب) رقیق شود. محلول رنگ دای $6 \times$ باید به‌صورت ۵:۱ رقیق شود (۱ قسمت رنگ دای: ۵ قسمت DNA/آب). محلول دای $10 \times$ باید به‌صورت ۹:۱ رقیق شود (۱ قسمت رنگ دای، ۹ قسمت DNA/آب).

۶- به‌منظور آماده کردن نمونه DNA هضم و خالص‌سازی شده برای بارگذاری آن روی ژل، آن‌ها در یک ویال مجزا ترکیب کنید:

___ μL از وکتور pET-41a هضم شده با NcoI/NotI (برابر با ۵۰ ng)

___ μL از رنگ دای

___ μL آب مقطر استریل (برای رساندن حجم کل به ۱۰ μL)

مواد را با هم ترکیب و سپس به مدت ۲ دقیقه سانتیفریوژ کنید (و یا به محتوی موجود در کف ویال ضربه بزنید).

۷- برای آماده‌سازی DNA بریده نشده و به‌منظور بارگذاری آن در ژل، آن‌ها را در یک ویال مجزا ترکیب کنید:

___ μL وکتور pET-41a بریده نشده (برابر با ۵۰ ng) (حجم باقی‌مانده را برای

جلسه‌های بعدی آزمایشگاه در فریزر نگهداری کنید)

___ μL رنگ دای

___ μL آب مقطر استریل (برای رساندن حجم کل به ۱۰ μL در صورت نیاز) مواد را با

هم ترکیب و سپس به مدت ۲ دقیقه سانتیفریوژ کنید (به محتوی موجود در کف ویال ضربه بزنید).

۸- هنگام بسته شدن کامل ژل، مقدار ۱۶۰ mL بافر TBE $1 \times$ را روی ژل بریزید (مقدار کافی بافر ریخته تا روی ژل را بپوشاند) و سپس شانه را خارج کنید.

۹- نمونه‌ها را روی ژل بر طبق این روش بارگذاری کنید: چاهک ۱: خالی، چاهک ۲: ۱۵۰ ng

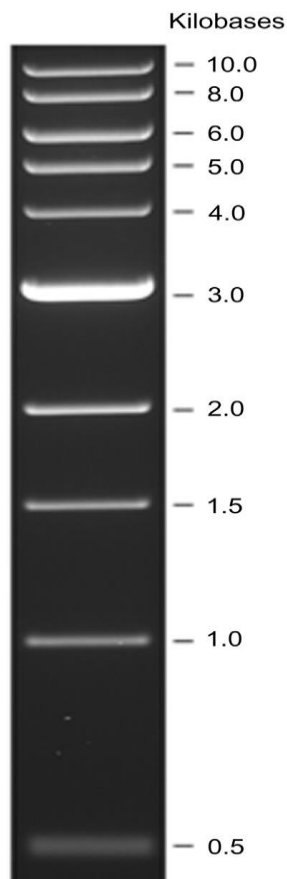
خط‌کش DNA ۱ کیلوباز (kb) شرکت NEB پیش‌ترکیب‌شده با رنگ دای (Cat#

N0468)، چاهک ۳: ۱۰ μL وکتور pET-41a هضم‌شده با NcoI/NotI، چاهک ۴: خالی،

چاهک ۵: ۱۰ μL وکتور pET-41a برش نخورده.

خط‌کش DNA ۱ کیلوباز (kb) شرکت NEB عبارت است از یک نشانگر مولکولی برای برآورد اندازه DNA. اندازه باندهای ظاهر شده نزدیک به ۱۰، ۸، ۶، ۵، ۴، ۳، ۲، ۱/۵ و ۰/۵ کیلوباز است (شکل ۳-۵).

۱۰- بعد از بارگذاری نمونه‌ها، دستگاه را بسته و سیم‌ها را به منبع ولتاژ متصل کنید. ژل DNA را در ولتاژ تقریبی ۸۵ V و یا ولتاژ مناسب دستگاه مورد استفاده، اجرا کنید (۱۰ V/cm).



شکل ۳-۵: خط‌کش DNA ۱ کیلوباز (kb) شرکت NEB (شماره کاتالوگ N3232). توجه کنید که باند ۳ kb نسبت به باندهای هم‌جوار، روشن‌تر است.

در زمانی که ژل در حال اجرا شدن است، به بخش پ بروید (PCR ژن *egfp*). هنگامی که رنگ آبی دای (بروموفنول) به بخش انتهایی ژل رسید، جریان را قطع کنید و ژل را روی ترانسیلومیاتور UV قرار دهید. در صورت امکان قرار گرفتن در معرض مستقیم اشعه ماوراءبنفش، از عینک محافظ UV استفاده کنید. از ژل عکس بگیرید و آن را بررسی کنید. مربی به شما کمک می‌کند تا تعیین

کنید که آیا برش پلازمید شما تکمیل شده است یا خیر؟ باید یک باند DNA واحد در باند نمونه DNA برش خورده شما وجود داشته باشد و اندازه آن باید کمی متفاوت از DNA برش نخورده باشد.

پ. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ژن *egfp*

هدف: وکتور pEGFP-N1 حاوی ژن *egfp* است. آغازگرهای PCR مورد استفاده در این آزمایش به صورتی مهندسی شده است که مکان‌های محدود کننده در آن‌ها گنجانده شده باشند؛ بنابراین، در صورتی که واکنش PCR شما کامل شد، شما می‌توانید فرآورده PCR را به صورتی هضم کنید که دارای انتهای چسبنده و برای کلون کردن آماده باشد.

آغازگر رفت (5'-AAACCATGGTGAGCAAGGGCGA-3') (*egfpNco*)، یک مکان محدود شونده NcoI در انتهای ۵' فرآورده PCR و آغازگر برگشت (*egfpNot*) (5'-AAAGCGGCCGCTTTACTTGTACA-3') یک مکان محدود شونده NotI در انتهای 3' فرآورده PCR شما ایجاد خواهد کرد.

شیوه‌نامه PCR

پیش از پایت کردن مواد PCR، یک جدول را در دفترچه یادداشت آزمایشگاهی خود با عنوان‌های اجزای تشکیل‌دهنده، غلظت استوک، غلظت نهایی و حجم مورد نیاز برای پایت کردن، ایجاد کنید (جدول ۱-۳). توجه: شما باید جدول خود را بر اساس غلظت استوک معرف‌های معین خود تکمیل کنید. هنگامی که جدول شما کامل شد، معرف‌ها را به ترتیب ذکر شده در جدول پایت کنید.

جدول ۱-۳: راه‌اندازی PCR

حجم پایت (μL)	غلظت نهایی/حجم	غلظت استوک	ماده مصرفی
تا رسیدن به حجم نهایی ۵۰ μL			
۵	۱×	۱۰×	ThermoPol بافر
	۲۰۰ μM از هر dNTP		dNTPs
	۰/۲۵ μM		آغازگر <i>egfpNco</i>
	۰/۲۵ μM		آغازگر <i>egfpNot</i>
	۱۰۰ ng		پلازمید pEGFP-N1
	۱ U		پلی‌مراز VENT

ویال‌ها را در ابتدا چندین مرتبه تکان دهید و مخلوط کنید و سپس به انتهای ویال‌ها ضربه بزنید.

میکروتیوب‌ها را داخل دستگاه ترموسایکلر قرار دهید و سپس طبق شیوه‌نامه ارائه شده (جدول ۳-۲) دستگاه را اجرا کنید.

جدول ۳-۲: برنامه PCR.

زمان	درجه حرارت	
۲ دقیقه	۹۵°C	واسرشتگی
۳۰ ثانیه	۹۵°C	واسرشتگی
۳۰ ثانیه	۶۰°C	وصل شدن
۱ دقیقه	۷۲°C	طویل شدن
		تکرار مراحل ۲-۴ (۳۰ بار)
۵ دقیقه	۷۲°C	طویل شدن
به صورت نامحدود	۴°C	توقف

مربی ویال‌های حاوی واکنش‌های PCR شما را به منظور استفاده در جلسه بعدی آزمایشگاه در فریزر ۲۰°C- نگاه‌داری خواهد کرد.

منابع

1. Yang T, Cheng L, Kain SR. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res* 1996;24(22):4592_4.
2. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990;262(4):56_65.
3. Dolan DNA Learning Center: Biology Animation Library, Cold Spring Harbor Laboratory. <https://www.dnalc.org/resources/animations/pcr.html>.
4. QIAGENs QIAquick Spin Handbook. [https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id53987caa6-ef28-4abd-927ed5759d986658&lang5en](https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id53987caa6-ef28-4abd-927ed5759d986658&lang5en;).; April 2015.

پرسش‌های مباحثه‌ای

۱- اگر دمای وصل شدن را بالاتر یا پایین‌تر از دمای ذوب محاسبه‌شده قرار دهیم، بازدهی واکنش PCR چقدر خواهد بود؟ دمای بالاتر یا پایین‌تر چگونه بر قابلیت وصل شدن آغازگرها و کیفیت و کمیت نهایی فرآورده‌های تأثیر می‌گذارد؟ یک ژل حاصل‌شده از این فرآورده‌های PCR در مقایسه با فرآورده‌های PCR به‌دست‌آمده در دمای وصل شدن بهینه چگونه به نظر خواهد بود؟

۲- پژوهشگران بیشتر از نحوه استفاده از *Taq DNA* پلیمراز آشنا هستند، اما در این آزمایشگاه، ما از یک *DNA* پلیمراز مقاوم در برابر حرارت دیگر استفاده کردیم. این آنزیم چیست و چرا به جای *Taq DNA* پلیمراز از آن استفاده می‌کنیم؟

۳- چرا *DNA* پلازمید حلقوی می‌تواند چندین باند مختلف را روی ژل آگارز ایجاد کند؟ چرا این *DNA* نمی‌تواند با داشتن اندازه ظاهری مشابه با *DNA* خطی و با همان طول روی ژل حرکت کند؟

۴- یک خط‌کش *DNA* دیگر از شرکت NEB (Cat #N3200L) با حجم $500 \mu\text{L}$ و غلظت $1000 \mu\text{g/mL}$ و پیش‌مخلوط نشده با بافر دای $6\times$ ارائه شده است. در صورتی که شما به 150 ng از این خط‌کش نیاز داشته باشید، چگونه محلول را آماده می‌کنید و چه حجمی از محلول را روی ژل آگارز خود قرار می‌دهید؟

کلاس آزمایشگاه: جلسه چهارم

آماده سازی الحاق DNA (*egfp*) حاصل شده از PCR

هدف: امروز شما موفقیت آمیز بودن واکنش PCR خود را تأیید و سپس فرآورده PCR حاوی ژن *egfp* را به منظور تولید انتهای چسبنده مربوط به NcoI/NotI هضم می کنید تا از این راه بتوان از آن ها برای فرآیند لیگاسیون در هفته بعدی استفاده کرد. پیش از آغاز این جلسه، شکل ۲-۳ را مرور کنید.

۱- مقدمه

ژن *egfp* با استفاده از آغازگرهای حاوی جایگاه های محدود شونده برای NcoI و NotI که به صورت مهندسی در انتهای آن ها واقع شده بود (با تعدادی نوکلئوتید اضافی)، تکثیر شد. در حال حاضر، ژن *egfp* حاصل شده از واکنش PCR، هنوز دارای انتهای صاف است. DNA باید با آنزیم های محدود کننده هضم شود تا انتهای چسبناک برای فرآیند کلون سازی ایجاد شود. به همین منظور، ابتدا فرآورده PCR برای حذف نمک ها و سایر آلاینده هایی که ممکن است بر هضم محدود کننده تأثیر بگذارد، خالص سازی می شود. سپس، ژن *egfp* فرآورده PCR، به طور هم زمان با NcoI-HF و NotI-HF هضم می شود تا انتهای چسبنده مناسب برای وصل شدن به وکتور pET-41a در آن ها ایجاد شود. این امر امکان کلون کردن ژن *egfp* را در وکتور و در یک جهت فراهم و ترجمه صحیح پروتئین الحاقی GST::EGFP را تضمین می کند. در نهایت، ژن هضم شده *egfp* فرآورده PCR یک بار دیگر خالص می شود تا نمک ها و آنزیم هایی که می توانند با فرآیند لیگاسیون (که در هفته آینده انجام می شود) تداخل داشته باشند، حذف شوند.

۲- تمرین های آزمایشگاهی

الف. استفاده از ستون چرخشی (اسپین) به منظور خالص سازی فرآورده PCR

۱- میزان ۵ μL از نمونه PCR خود را جدا کنید و در یک ویال جدا با برچسب «نمونه PCR اصلی» قرار دهید.

۲- با باقی مانده فرآورده PCR، از کیت خالص سازی PCR شرکت QIAGEN QIAquick به منظور حذف نمک ها، آنزیم و نوکلئوتیدهای آزاد موجود در محیط واکنش استفاده کنید.

ب. تعیین کمیت ژن *egfp* خالص‌سازی شده حاصل از PCR

از نانودراپ برای تعیین غلظت ژن *egfp* فرآورده PCR هضم نشده خود پس از خالص‌سازی استفاده کنید. در صورت در دسترس نبودن نانودراپ، یکراست وارد مرحله هضم محدود شونده شوید (بخش پ) و از $25 \mu\text{L}$ از ژن *egfp* فرآورده PCR، در واکنش هضمی خود استفاده کنید.

پ. هضم محدود کننده ژن *egfp* فرآورده PCR

توجه: همان‌گونه که در جلسه دوم کلاس آزمایشگاه توضیح داده شد، شیوه‌نامه‌های خالص‌سازی و هضم DNA پلازمید (وکتور) و هضم با آنزیم‌های محدود کننده همگی مشابه است، اما بین تولیدکنندگان اندکی متفاوت است (حتی زمانی که سازنده معرف‌های خود را به‌روز می‌کند). به همین دلیل، به‌طور اکید پیشنهاد می‌شود که شیوه‌نامه را پیش از شروع تأیید کنید.

۱- همانند جدول ۴-۱، یک جدول در دفترچه یادداشت آزمایشگاه خود برای هضم محدود کننده ایجاد کنید.

جدول ۴-۱: تنظیم واکنش هضم فرآورده PCR با آنزیم محدود کننده

حجم (μL)	مقدار نهایی / غلظت	غلظت اولیه	معرف‌ها
	۱۰۰۰ ng		ژن <i>egfp</i> خالص‌سازی شده فرآورده PCR
۵	۱×	۱۰×	CutSmart Buffer
	N/A	N/A	آب استریل
	۱۰U		NcoI-HF
	۱۰U		NotI-HF

۲- در یک ویال میکروسانتریفیوژ با برچسب "*egfp* digest"، معرف‌های فهرست شده در جدول را به ترتیب اضافه کنید (آنزیم‌ها در آخر!). ویال‌های حاوی آنزیم، DNA، بافر و غیره را پیش از استفاده به مدت بسیار اندک (نزدیک به دو ثانیه) سانتریفیوژ کنید. اطمینان حاصل کنید که بافرهای ذخیره شده در فریزر -20°C ، پیش از استفاده به‌خوبی ذوب و ورتکس شده باشند.

۳- به مدت ۲-۵ ثانیه، محتویات ویال‌ها را ورتکس و اسپین کنید و سپس آن‌ها را در یک رک مناسب و در نهایت آن‌ها را در یک انکوباتور و یا حمام آب با دمای 37°C (به مدت ۱۵ دقیقه) قرار دهید.

۴- هنگام انجام شدن فعالیت هضم، ژل آگارز و نمونه‌های DNA خود را برای تجزیه و تحلیل ژل، حاضر کنید (بخش ج).

ت. حذف آنزیم‌ها و پاک کردن DNA هضم شده با استفاده ستون چرخشی

ژن *egfp* شما اکنون دارای انتهای چسبنده برای کلون کردن است. فرآیند لیگاسیون به غلظت نمک‌ها بسیار حساس هستند؛ بنابراین حذف نمک‌های مورد استفاده در بافر هضم محدود کننده بسیار مهم است. شیوه‌نامه کیت خالص‌سازی PCR شرکت QIAGEN QIAquick را بار دیگر روی فرآورده‌های PCR هضم شده خود اجرا و سپس غلظت را برآورد کنید و میزان خلوص را با استفاده از نانودراپ تخمین بزنید. اگر نانودراپ در دسترس نبود، مقدار ۵-۱۰ μL از فرآورده PCR هضم شده خالص‌شده خود را در کنار خط‌کش ۱ kb روی ژل آگارز اجرا کنید. این ویال را با عنوان «ژن *egfp* هضم و خالص‌سازی شده» به همراه غلظت آن برجسب بزنید و در جعبه فریزر خود و در کنار وکتور pET-41a و تا پس از آغاز مرحله ج نگهداری کنید.

ج. بررسی واکنش PCR و خالص‌سازی روی یک ژل آگارز

تجزیه و تحلیل نمونه‌های خود روی ژل آگارز به شما این امکان را می‌دهد تا تشخیص دهید که آیا ژن *egfp* با ۷۲۴ جفت باز را با موفقیت تکثیر و خالص‌سازی کرده‌اید یا خیر. تأیید این اطلاعات قبل از لیگاسیون DNA مهم است.

شیوه‌نامه (مرور جلسه سوم آزمایشگاه)

۱- ژل آگارز ۱ درصد را همان‌گونه که پیش از این در جلسه سوم کلاس آزمایشگاه توضیح داده شد را در مخزن ژل دستگاه بریزید.

۲- نمونه «PCR اصلی» خود (بخش الف) را برای بارگذاری در ژل از طریق افزودن ۲ μL از PCR اصلی به همراه ۸ μL آب، آماده و سپس مقدار کافی از رنگ دای را اضافه کنید.

۳- مقدار ۱۰۰ ng از نمونه «ژن *egfp* هضم و خالص‌سازی شده» خود (بخش ت) را به‌منظور بارگذاری در ژل آماده کنید. حجم این نمونه که حاوی ۱۰۰ ng از DNA است را با استفاده از غلظت DNA تعیین‌شده از داده‌های نانودراپ خود محاسبه کنید. حجم واکنش را با استفاده از آب مقطر استریل به ۲۰ μL برسانید (در صورتی که مقدار نمونه شما کافی نباشد، می‌توانید حجم را به ۱۰ μL برسانید) و در نهایت، حجم مناسب از رنگ دای را اضافه کنید. در صورت در دسترس نبودن نانودراپ، به‌طور معمول میزان ۵-۱۰ μL از «ژن *egfp* هضم و خالص‌سازی شده» به‌منظور بارگذاری کافی است.

۴- ژل خود را طبق دستور زیر بارگذاری کنید:

چاهک ۱: مقدار ۱۵۰ ng خط‌کش DNA شرکت NEB (۱ kb) از پیش ترکیب‌شده با رنگ دای

چاهک ۳: مقدار ۱۰ μL از نمونه «PCR اصلی» رقیق شده

چاهک ۵: مقدار ۱۰۰ ng از نمونه «ژن *egfp* هضم و خالص‌سازی شده»

۵- ژل خود را اجرا سپس نتایج را همان‌گونه که شرح داده شد، مشاهده کنید.

ج. محاسبه‌های هفته آینده

هنگام اجرا شدن ژل، محاسبه‌های زیر را انجام دهید. از این محاسبات می‌توانید برای انجام فرآیند لیگاسیون در هفته آینده استفاده کنید:

۱- حجم وکتور pET-41a هضم و خالص‌سازی شده برابر با ۵۰ ng را محاسبه کنید (برحسب μL).

۲- حجم ژن الحاقی *egfp* هضم و خالص‌سازی شده برابر با ۳۰ ng را محاسبه کنید (برحسب μL).

پرسش‌های مباحثه‌ای

۱- وقتی فرآورده PCR خود را روی ژل DNA اجرا می‌کنید، چه عواملی ممکن است باعث ایجاد بیش از یک باند در ژل شود؟

۲- اگر ما هضم ژن *egfp* تکثیر با PCR را با استفاده NcoI/NotI حذف کنیم، آیا کلون کردن ژن *egfp* در وکتور pET-41a امکان‌پذیر خواهد بود؟ نتایج فرآیند لیگاسیون در هفته آینده چه تأثیری خواهد پذیرفت؟

۳- به‌طور معمول، هنگام کلون با PCR در روش استفاده شده در این کتاب، چند نوکلئوتید اضافی باید به انتهای ۵' جایگاه‌های محدودکننده هر دو آغازگر رفت و برگشت مهندسی شود؟ چرا این امر لازم است؟ چگونه می‌توانید تعیین کنید که چند نوکلئوتید اضافی باید به انتهای آغازگرهای PCR اضافه شود؟ آیا مهم است که کدام نوکلئوتید اضافه شود؟

لیگاسیون DNA و ترادیسی^۱ باکتری *Escherichia coli*

هدف: هدف از این هفته کلاس آزمایشگاه، وصل شدن ژن *egfp* (ژن الحاقی) به یک وکتور بیانی pET-41a خطی شده است. در مرحله بعدی ترکیب وصل شدنی به سلول‌های میزبان *Escherichia coli* منتقل خواهد شد.

۱. مقدمه

الف. فرآیند وصل شدن (لیگاسیون)

آنزیم DNA لیگاز سبب ایجاد تشکیل پیوند کووالانسی بین $OH^{3'}$ و $PO_4^{5'}$ (پیوند فسفودی استر) در مولکول DNA می‌گردد. این فرآیند، به دو انتها DNA دو رشته‌ای و بافر حاوی آدنوزین تری فسفات (ATP) نیاز دارد. فرآیند لیگاسیون دارای مکانیک پیچیده‌ای است و درک برخی از مؤلفه‌های تأثیرگذار روی تعداد و فرآورده‌های لیگاسیون، امری ارزشمند است. DNA لیگاز باکتریوفاژ T4، رایج‌ترین آنزیم مورد استفاده در بیشتر مطالعات کلون‌سازی است، زیرا این آنزیم به‌صورت مؤثری توانایی وصل شدن DNA با انتهای صاف دارد و همچنین با DNA حاوی انتهای چسبنده (قطعات کوتاه تک‌رشته‌ای از DNA که به‌صورت بسط‌های $5'$ یا $3'$ توسط هضم آنزیم محدود کننده ایجاد می‌شوند) نیز سازگاری دارد.

دمای وصل شدن بهینه برای یک واکنش معین، می‌تواند از لحاظ تجربی متفاوت باشد. مولکول‌های DNA با انتهای چسبنده سازگار بیشترین تمایل را برای وصل شدن دارند، اگرچه انتهای صاف مولکول‌های DNA نیز می‌توانند به هم متصل شوند. فرآیندهای لیگاسیون مختلف با توجه به معرف‌ها و نوع بافر، زمان و درجه حرارت‌های مختلفی را برای فرآیند وصل شدن به خود اختصاص می‌دهند. درجه حرارت واکنش لیگاسیون در اصطلاح تعادلی است بین فعالیت آنزیم و درجه حرارت وصل شدن دو انتهای چسبنده سازگار با یکدیگر. به همین دلیل، واکنش‌های وصل شدن با دو انتهای چسبنده سازگار، به‌طور معمول در دمای اتاق انجام می‌شود، درحالی‌که واکنش‌های وصل شدن مولکول‌ها با انتهای صاف، در دمای $4^{\circ}C$ انجام می‌شود. همیشه شیوه‌نامه‌های شرکت سازنده را برای شرایط پیشنهادشده برای واکنش لیگاز خود مد نظر قرار دهید.

هنگام طراحی واکنش‌های وصل شدن، چندین قانون عملی وجود دارد که رعایت آن‌ها مفید واقع خواهد شد:

- واکنش‌های وصل شدن به‌طور معمول در حجم‌های کوچک $10-20 \mu\text{L}$ تنظیم شده است تا انتهای چسبنده سازگار (صاف) در محلول خیلی رقیق نشوند.
- برای وکتورهایی با اندازه کوچک ($2-6 \text{ kb}$)، به ازای هر واکنش از حدود 50 ng وکتور استفاده کنید.
- مقدار ایده آل ژن برای الحاق در واکنش را فقط می‌توان به‌صورت تجربی تعیین کرد، اما نسبت‌های مولی رایج وکتور به الحاق^۱ به‌طور معمول $1:1$ ، $1:3$ ، $1:5$ و $1:10$ است.
- بافر لیگاز شامل نمک‌های ضروری و ATP است و به‌طور معمول در غلظت‌های $10\times$ توسط کارخانه ارائه می‌شوند. به حتم آن را در مخلوط واکنش لیگاسیون خود قرار دهید در غیر این صورت، واکنش لیگاز فعال نخواهد شد.
- میزان $1 \mu\text{L}$ لیگاز به ازای هر واکنش از اکثر منابع تجاری موجود کافی است. با این حال، استفاده از آنزیم‌های لیگازی غلیظ‌تر ممکن است برای بستن رشته‌ها با انتهای صاف، کارآمدی بیشتری داشته باشند.

در آزمایش امروز، ما سعی خواهیم کرد وکتور بیانی pET-41a را به ژن الحاقی *egfp*، با استفاده از نسبت مولی $1:5$ وکتور به ژن الحاقی، پیوند دهیم. علاوه بر لیگاز کردن آزمایشی و ترادپسی، ما همچنین از واکنش‌های کنترلی برای تأیید زنده بودن و شایستگی^۲ (مستعد بودن، منظور توانایی سلول‌ها در گرفتن DNA خارجی (خارج سلولی) از محیط اطراف) سلول‌های خود و همچنین تأیید اینکه برش وکتور ما به‌درستی در جلسه دوم آزمایشگاهی تکمیل شده است یا خیر، انجام خواهیم داد. درحالی که پیش از این pET-41a هضم شده را روی ژل آگارز بررسی کردیم تا مشخص کنیم که پلازمید خطی شده است یا خیر، با وجود فرآیندها کنترلی، فرآیند ترادپسی حساس‌تر خواهد شد. برای کنترل بهتر این واکنش‌های حیاتی، دانستن اطلاعات زیر کاربردی خواهد بود:

۱- رشته‌های DNA خودبه‌خود به هم متصل نمی‌شوند، حتی اگر رشته‌ها دارای انتهای چسبنده مکمل باشند. آنزیمی که تشکیل پیوند فسفودی استر را کاتالیز می‌کند (مانند DNA لیگاز) باید برای وصل شدن وجود داشته باشد.

۲- تنها DNA حلقوی امکان ایجاد حالت ترادپسی به سلول‌های *E. coli* زنده را دارد. DNA خطی توانایی ورود به سلول‌ها را دارد، اما پس از جذب نمی‌تواند تکثیر شود.

1. Vector-to-insert
2. Competent.

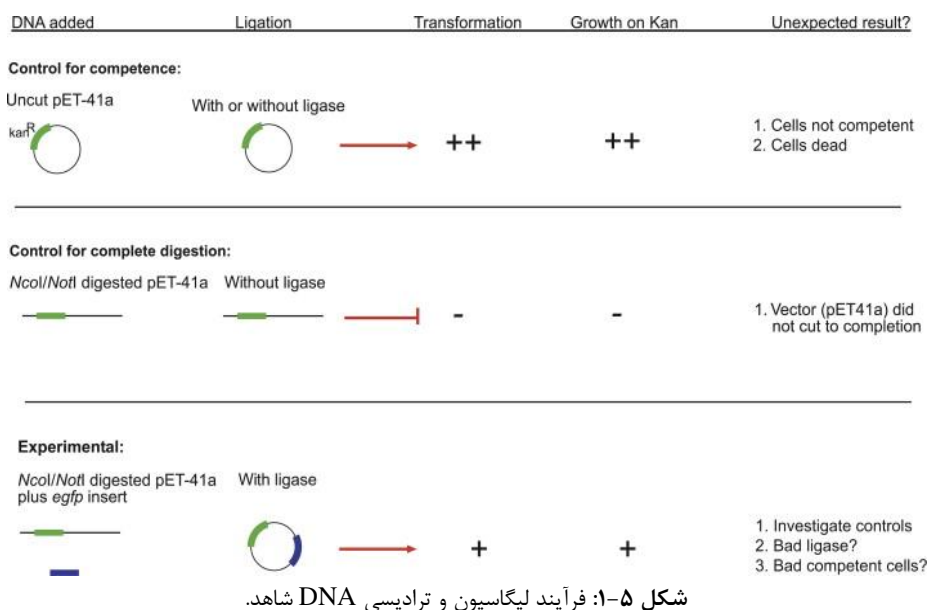
ب. ترادیسی

سلول‌های باکتریایی را می‌توان از طریق تیمار کردن آن‌ها با کاتیون‌های دو ظرفیتی، آماده جذب کاتیون‌ها کرد. این سلول‌ها را در این حالت می‌توان به‌صورت نامحدود در دمای 80°C - نگهداری کرد. پس از سرد شدن، سلول‌ها نباید در دمای اتاق گرم شوند در غیر این صورت توانایی خود را (برای جذب) از دست خواهند داد. برای افزایش بازدهی فرآیند ترادیسی، سلول‌ها باید روی یخ نگهداری شوند.

از آنجایی که وکتور بیانی pET-41a دارای یک پروموتور T7 بوده که رونویسی ژن مورد نظر را کنترل می‌کند، سویه میزبان *E. coli* در آزمایش ما باید یک لیزوژن λ باشد تا حاوی یک RNA پلیمراز T7 برای وصل شدن به پروموتور برای بیان شدن باشد.

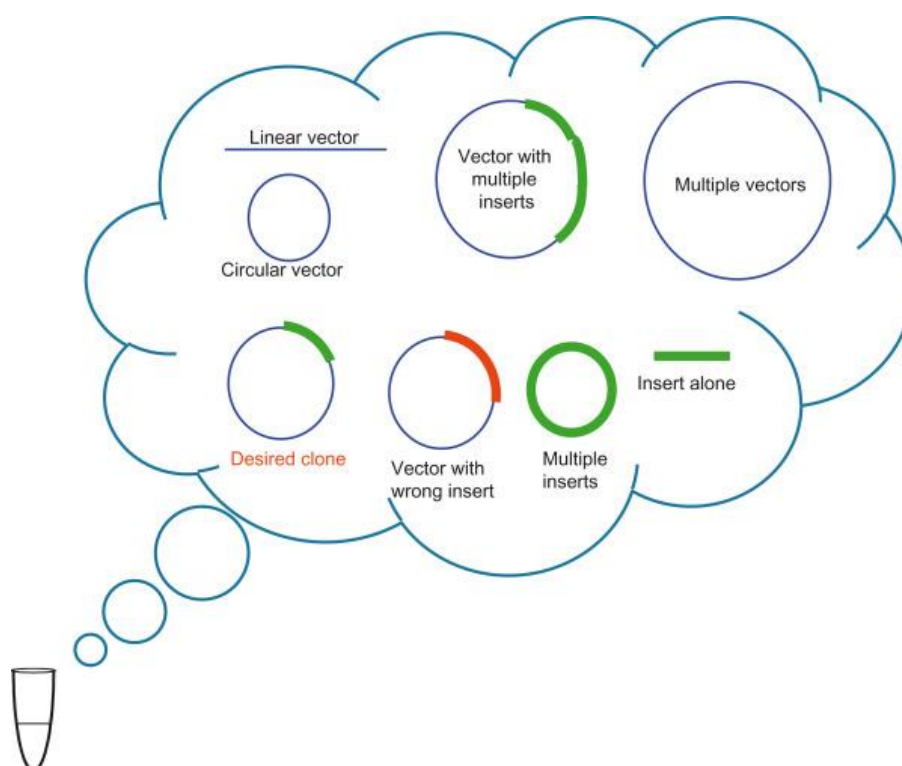
شکل ۵-۱ نشان‌دهنده خروجی‌های دو فرآیند کنترلی، لیگاسیون تجربی و ترادیسی است. ردیف بالا نشان‌دهنده نمونه کنترلی برای قابلیت زنده‌مانی و شایستگی سلول‌های انتخابی است. ردیف دوم نشان‌دهنده نمونه کنترلی برای هضم کامل محدود شونده وکتور pET-41a و ردیف آخر نشان‌دهنده فرآیند وصل شدن تجربی (وکتور به علاوه ژن الحاقی) است. ستون اول نشان‌دهنده نوع DNA اضافه شده به واکنش است: حلقوی یا خطی. ستون دوم نشان می‌دهد که آیا DNA لیگاز به واکنش اضافه شده است یا خیر. ستون سوم نشان می‌دهد که آیا DNA باید تبدیل (ترادیسی) و تکثیر شود یا خیر (DNA حلقوی توانایی ترادیسی را دارد اما خطی خیر). اگر پلازمید تغییر حالت دهد (ترادیسی کند)، سلول‌های حاوی آن‌ها باید در محیط حاوی کانامایسین^۱ رشد کنند، زیرا وکتور حاوی ژن مقاومت به کانامایسین است. ستون آخر توضیحاتی را برای نتایج غیرمنتظره ارائه می‌دهد. توجه کنید که واکنش‌های هضم محدود کننده و وصل شدن، به‌ندرت تکمیل می‌شوند. دیدن چند کلنی در پس‌زمینه پلیت (پتری دیش) pET-41a خطی‌شده کنترل، حتی اگر نتایج قبلی از ژل آگارز تنها یک باند را نشان دهد (همان‌طور که انتظار می‌رود)، امری طبیعی است زیرا حساسیت فرآیند ترادیسی بالاتر است. توجه داشته باشید که این کلنی‌ها حاوی ژن الحاقی نیست و نباید برای غربالگری در مراحل بعدی آزمایش استفاده شود.

1. Kanamycin



توجه داشته باشید که هر (دو) قطعه DNA با انتهای چسبنده مکمل ممکن است به هم متصل شوند. این یعنی در لوله آزمایش لیگاسیون، هر اتفاقی ممکن است رخ بدهد. مولکول‌ها ممکن است به صورت یک وکتور به اضافه یک ژن الحاقی (کلون مورد نظر شما)، وکتور حلقوی شده، وکتور با چندین ژن الحاقی، ترکیب چندگانه وکتورها و وکتور با ژن‌های الحاقی نادرست وجود داشته باشند (شکل ۵-۲).

با وجود اینکه این مولکول‌ها در طی محیط واکنش لیگاسیون تشکیل می‌شوند با این حال، این مولکول‌های DNA به احتمال بسیار زیاد فاقد منشا همانندسازی هستند؛ بنابراین قابل تکثیر در شرایط *in vivo* (محیط زنده) را نخواهند داشت.



شکل ۵-۲: فرآورده‌های واکنش لیگاسیون. با توجه اینکه امکان تشکیل ترکیبات بسیاری در محیط واکنش لیگاسیون وجود دارد، بعد از غربالگری، سلول‌های ترادیدی شده حاوی وکتور و یا وکتور به همراه ژن مورد نظر (کلون مورد نظر) قابل مشاهده خواهد بود.

۲. تمرین‌های آزمایشگاهی

الف. لیگاسیون و کنترل‌های لیگاسیون

توجه: در این شیوه‌نامه از DNA لیگاز T4 شرکت NEB با شماره کاتالوگ M0202L استفاده خواهد شد. در صورتی که از DNA لیگاز T4 یک شرکت دیگر استفاده می‌کنید، شیوه‌نامه شرکت سازنده را اجرا کنید. زمان انکوباسیون ممکن است بسیار متفاوت باشد.

۱- ژل آگارز ۱ درصد را طبق روش‌های گفته شده آماده کنید و در مخزن ژل بریزید. به محض بستن ژل، وارد مرحله ۲ شوید.

۲- سه واکنش را در ویال‌های میکروسانتریفیوژ تنظیم کنید. ویال‌های خود را به‌وضوح (DNA حلقوی (برش نخورده)، DNA خطی و لیگاسیون برجسب بزنید. به حتم جدول‌ها را در دفترچه یادداشت آزمایشگاه خود وارد و به وضوح اجزای هر واکنش/شاهد را درج کنید.

واکنش اول (برای کنترل قابلیت زیست‌پذیری / شایستگی سلول‌ها و روش شما): وکتور pET-41 a حلقوی (بریده نشده).

50 ng pET-41a uncut	_____ μ L
Sterile dH ₂ O	_____ μ L
20 μ L total	

واکنش دوم (برای کنترل وجود وکتور برش نخورده): وکتور pET-41a خطی

50 ng pET-41a Nco I/Not I	_____ μ L
Sterile dH ₂ O	_____ μ L
20 μ L total	

واکنش سوم (لیگاسیون تجربی): نسبت ۱:۵ مولار pET-41a : *egfp*

50 ng pET-41a Nco I/Not I	_____ μ L
30 ng <i>egfp</i> insert	_____ μ L
Sterile dH ₂ O	_____ μ L
10× ligase buffer	2 μ L
Ligase	1 μ L
20 μ L total	

۳- مواد را از طریق سانتریفوژ (۵-۲ ثانیه) و یا از طریق ضربه زدن به آرامی ترکیب کنید. واکنش را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوباسیون کنید. به مرحله ترادیدی وارد شوید (بخش ب).

ب. ترادیدی از طریق کاتیون دو ظرفیتی

توجه: سلول‌های شایسته بسیار شکننده هستند. هرگز این سلول‌ها را به شدت ورتکس یا پایت نکنید، زیرا هضم می‌شوند. هرگز این سلول‌ها را در دمای اتاق گرم نکنید زیرا آن‌ها شروع به ترمیم غشاهای خود می‌کنند و صلاحیت خود را از دست می‌دهند. پیش از استفاده از سلول‌ها، آن‌ها را سانتریفوژ نکنید زیرا دیگر نمی‌توانید آن‌ها را به حالت تعلیق بازگردانید.

شیوه‌نامه‌های ترادیدی بین سازنده‌ها و انواع تیره‌های سلولی متفاوت است. شیوه‌نامه زیر یک راهنمای کلی برای ترادیدی است، اما برای دستیابی به نتایج بهینه، از شیوه‌نامه مربوط به ترادیدی سلول‌های خود پیروی کنید. به‌طور معمول، بازدهی ترادیدی برای سلول‌های شایسته خریداری‌شده (به‌عنوان مثال، NEB #C2527) بسیار بالاتر از سلول‌های مستعد خانگی (مانند مواردی که در پیوست ۳ توضیح داده شده است) است.

بر طبق توضیحات زیر، سه واکنش ترادیدی (یکی برای هر واکنش در قسمت الف) را تنظیم کنید. شیوه‌نامه توصیف‌شده بر اساس ۵۰ μ L از سلول‌های شایسته در هر واکنش ترادیدی است. برخی از شیوه‌نامه‌ها ممکن است مقادیر کمتری را پیشنهاد دهند. در هر صورت، حجم DNA اضافه

شده به واکنش ترادیدی شما هرگز نباید بیش از ۱۰ درصد حجم کل سلول‌ها باشد. به‌عنوان مثال، در صورت استفاده از ۲۰ μL سلول، نباید بیش از ۲ μL از مخلوط واکنش (حاوی مولکول DNA) اضافه شود.

نکته صرفه‌جویی در هزینه: برای هر واکنش ترادیدی، تنها از ۲۰ μL از سلول‌های شایسته استفاده کنید. به هر ۲۰ μL سلول (در ویال‌های از قبل سرد شده)، ۲ μL از مخلوط واکنش اضافه کنید. همچنین مقدار SOC (یک محیط برای رشد باکتری-م) را به ۸۰ μL برسانید و کل پلیت (منظور پتری دیش) مخلوط ترادیدی را به پلیت‌های LB/Kan (نوعی پلیت برای رشد باکتری-ها-م) منتقل کنید. بقیه مؤلفه‌ها نسبت به شیوه‌نامه زیر بدون تغییر باقی می‌مانند.

۱- دستگاه‌های بلاک^۱ خود را روی دمای 42°C تنظیم و سوراخ‌های آن را با آب پر کنید (یا از حمام آبی با دمای 42°C استفاده کنید). دما را با استفاده از دماسنج بررسی کنید زیرا نمایشگرهای دیجیتال همیشه دقیق نیستند.

۲- سه ویال میکرو سانتریفیوژ استریل را علامت‌گذاری کنید (به‌منظور تعیین هر کدام از واکنش‌ها). سلول‌های منجمد را سرد و روی یخ نگه دارید (برخی از سلول‌های شایسته خریداری شده در ویال‌های از پیش تعیین غلظت شده می‌آیند. در این مورد، می‌توانید یکراست ویال‌ها برچسب بزنید و به مرحله ۵ بروید).

۳- مقدار ۱۷۵ μL از سلول‌های شایسته را بگیرید و آن‌ها را روی یخ نگه دارید. (این سلول‌ها را همواره روی یخ نگهداری کنید).

۴- برای اطمینان از اینکه سلول‌ها در حالت تعلیق هستند، ویال‌ها را با انگشت تکان بدهید و ۵۰ μL از سلول‌های شایسته را به هر یک از سه لوله میکروسانتریفیوژ سرد شده، تسهیم کرده و اضافه کنید. بالافاصله پس از تقسیم کردن سلول‌ها، آن‌ها را روی یخ قرار دهید.

۵- مقدار ۵ μL از هر یک از مخلوط‌های واکنش را به ویال‌های مناسب منتقل کنید و مطمئن شوید که DNA را یکراست به سوسپانسیون حاوی باکتری اضافه کرده‌اید. ویال‌ها را به آرامی از طریق تکان دادن مخلوط کنید.

۶- به مدت ۵ دقیقه روی یخ انکوباسیون کنید.

۷- سلول‌ها را به مدت ۳۰ ثانیه با درجه حرارت 42°C ، در معرض شوک گرمایی قرار دهید. مدت زمان و میزان درجه حرارت بسیار مهم است.

۸- ویال‌ها را به مدت ۲ دقیقه روی یخ انکوباسیون کنید.

1. Heat. block

۹- مقدار $950 \mu\text{L}$ از SOC و یا LB هم دما با محیط را به هر لوله اضافه کنید و سپس به‌منظور هوادهی به مدت ۶۰ دقیقه در دمای 37°C ، آن را شیک کنید. (ژل آگارز خود را در این زمان آماده کنید) توجه: برخی از شیوه‌نامه‌ها به یک روش ترادیسی سریع اشاره می‌کنند که این مرحله را به ۵ دقیقه کوتاه یا به‌طور کامل حذف می‌کنند. حذف این مرحله با پلازمیدهای مقاوم به کانامایسین، همانند pET-41a فاقد کارایی است. به حتم ویال‌ها را به مدت ۶۰ دقیقه انکوباسیون کنید.

۱۰- تعداد سه پلیت (پتری دیش) (LB/kan) از پیش گرم شده به دمای 37°C را با شرایط واکنش زیر علامت‌گذاری کنید: (۱) کنترل مثبت حلقوی؛ (۲) کنترل منفی خطی؛ و (۳) لیگاسیون تجربی. همیشه پشت ظروف پتری دیش را به‌جای درب آن برچسب بزنید تا از ایجاد اشتباه جلوگیری شود.

۱۱- سلول‌های ترادیسی را در ویال‌ها به‌آرامی تکان دهید و سپس هرکدام از آن‌ها را به میزان $100-200 \mu\text{L}$ در پلیت‌های LB/kan برچسب‌دار قرار دهید.

۱۲- پلیت‌ها را به‌صورت وارونه (درب پایین) در انکوباتور با 37°C و به مدت یک شبانه‌روز قرار دهید.

نکته برای صرفه‌جویی در زمان: انکوباسیون پلیت‌های باکتریایی به‌طور معمول در دمای 37°C و در طول یک شبانه‌روز انجام می‌شود. با این حال، سلول‌ها در دماهای پایین‌تر نیز رشد می‌کنند، اما سرعت آن کمتر خواهد بود. سلول‌های باکتریایی ترادیسی شده و قرار گرفته روی محیط مقاوم به آنتی‌بیوتیک، در دمای اتاق رشد می‌کنند و به‌طور معمول در ۲۴ الی ۴۸ ساعت، کلنی‌ها را تشکیل می‌دهند و بیشتر وقت‌ها می‌توانند تا ۷۲ ساعت و بدون محیط کشت، به رشد حداکثری خود ادامه دهند و کلنی‌های ماهواره‌ای را ایجاد کنند. این کلنی‌ها، کلنی‌های کوچک‌تر فاقد پلازمید هستند که کلنی بزرگ‌تر و حاوی باکتری را احاطه می‌کنند.

پ. الکتروفورز واکنش‌های لیگاسیون

درحالی‌که کنترل فرآیند ترادیسی برای تشخیص حلقوی شدن وکتور (وکتوری که هضم آن تکمیل نشده) امر بسیار حساسی است، الکتروفورز ژل فرآورده‌های لیگاز شده و کنترل‌ها، به ما بازخورد سریع‌تری را می‌دهد.

برخلاف DNA خطی، DNA پلازمید حلقوی شده دارای ساختار ثانویه است و این ساختار بر حرکت DNA روی ژل تأثیر می‌گذارد؛ بنابراین، DNA پلازمید حلقوی بیشتر وقت‌ها با وزن مولکولی غیرقابل‌پیش‌بینی حرکت می‌کند. از سویی، در صورت رخ دادن واکنش لیگاسیون، چه‌بسا چندین فرآورده شکل‌گرفته و در نهایت باعث ایجاد باندهای متعدد خواهد شد. به این ترتیب، ما

می‌توانیم بلافاصله ببینیم که آیا فرآیند لیگاسیون موفقیت‌آمیز بوده است یا خیر. اگر فقط یک باند وکتور و یک باند ژن الحاقی در لیگاسیون تجربی ظاهر شود، این شاخص به‌صورت معنی‌داری نشان می‌دهد که فرآیند لیگاسیون موفقیت‌آمیز نبوده است.

نمونه‌های خود را همان‌گونه که نشان داده شد بارگذاری کنید و مطمئن شوید که مقدار کافی از بافر بارگذاری را به نمونه‌های ۵-۲ اضافه کرده‌اید.

۱- مقدار ۱۰۰ ng خط‌کش ۱ kb (از پیش ترکیب‌شده با بافر بارگذاری-رنگ دای).

۲- مقدار ۱۰ μL از واکنش ۱ pET-41a بریده نشده).

۳- مقدار ۱۰ μL از واکنش ۲ pET-41a خطی شده).

۴- مقدار ۱۰ μL از واکنش ۲ (لیگاسیون تجربی).

۵- ۱۰۰ ng ژن الحاقی (*egfp*) هضم و خالص‌سازی شده).

ژل خود را همان‌گونه که پیشتر توضیح داده شد، اجرا کنید.

هنگام تجزیه و تحلیل ژل، اگر واکنش لیگاسیون تجربی (چاهک ۴) به‌صورت موفقیت‌آمیز انجام شده باشد، به‌طور معمول باند مربوط به برش وکتور ناپدید می‌شود و باندهای مربوط به وکتور برش نخورده، همچنین برخی باندهای اضافی، ظاهر می‌شوند. اگر واکنش لیگاسیون تجربی فقط حاوی وکتور خطی باشد، چه‌بسا مشکلی در لیگاز یا بافر لیگاز شما وجود دارد. اگر برش وکتور شما تکمیل شده باشد، چاهک ۳ باید یک باند منفرد را نشان دهد که مربوط به DNA خطی است.

منبع

1. Dugaiczky A, Boyer HW, Goodman HM. Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. J Mol Biol 1975;96:171_84.

پرسش‌های مباحثه‌ای

۱- در روش کلون‌سازی استفاده شده در این کتاب، ممکن است (هرچند بعید است) چندین ژن الحاقی، یک concatemer تشکیل دهند و در یک وکتور بیانی واحد کلون شوند. اگر سه ژن *egfp* در یک وکتور بیانی pET-41a کلون شوند، آیا EGFP (به دنبال القای IPTG) بیان می‌شود و اگر چنین است، آیا این کلنی‌ها در مقایسه با کلون‌هایی که یک نسخه از ژن *egfp* را داشتند (به دنبال القای IPTG) فلورسانس بیشتری از خود ساطع خواهند کرد؟ چرا در آزمایش شما، نمی‌توان دو ژن *egfp* متوالی را در pET-41a کلون کرد؟

۲- در واکنش لیگاسیون، از نسبت مولی ۱:۵ از وکتور به ژن الحاقی استفاده کردیم. چگونه نسبت‌های مولی مختلف (۱:۱ یا ۱:۱۰) می‌توانند بر واکنش لیگاز تأثیر بگذارند؟ مزایا و معایب وکتور اضافی در مقابل ژن الحاقی اضافی چیست؟

۳- شما با وکتور pET-41a هضم شده با NcoI/NotI و ژن *egfp* از pEGFP-N1 (مانند آزمایشگاه) یک واکنش لیگازی را انجام می‌دهید. سپس مخلوط لیگازی را به *E. coli* منتقل و سپس روی محیط LB حاوی کانامایسین قرار می‌دهید. نتایج غیرمنتظره زیر را در نظر بگیرید و کنترل‌هایی را پیشنهاد کنید:

الف: هیچ چیز رشد نمی‌کند. چه کنترل‌هایی را می‌توانید به منظور بررسی زنده بودن و یا شایسته بودن سلول‌های *E. coli* طراحی کنید؟ نتایج آن کنترل‌ها چه خواهد بود؟

ب: شما رشد بسیار زیادی را مشاهده می‌کنید، اما هنگام جدا کردن پلازمید از کلنی‌های متعدد *E. coli*، تنها گزینه قابل مشاهده وکتور pET-41a بدون ژن الحاقی است. محتمل‌ترین راه پیدا شدن این کلنی‌ها (به غیر از وجود آلودگی) چیست؟ اگر سوء ظن شما درست باشد، نتایج کنترل‌های شما چگونه خواهد بود؟

بخش دوم
غربالگری سلول‌های ترادیسی شده

غربالگری سلول‌های ترادیسی شده را می‌توان به روش‌های مختلفی انجام داد. در عمل، روش‌های مورد استفاده توسط یک پژوهشگر بیشتر به معرف‌ها، زمان و بودجه در دسترس بستگی دارد. در چند آزمایش بعدی، برخی از روش‌های رایج‌تر مورد استفاده برای تعیین اینکه آیا یک کلون باکتریایی حامل ژن مورد نظر است یا خیر را انجام خواهید داد. درحالی‌که طراحی آزمایش کلون کردن اجباری در آزمایش‌های قبلی نتایج مناسبی را تولید کرده‌اند؛ در این روش‌های غربالگری تأیید می‌شود که آیا ژن *egfp* در جهت و چارچوب خواندن صحیح برای تولید پروتئین الحاقی GST::EGFP، به ژنوم پلازمید الحاق شده است یا خیر.

تأیید این امر که مولکول نوترکیب مورد استفاده برای بیان پروتئین در مقیاس وسیع، به‌طور دقیق همان ترکیب مورد انتظار یعنی یک نسخه از وکتور و یک نسخه از ژن الحاقی باشد، بسیار مهم است. آزمایش نقشه‌برداری محدودشدگی^۱، وجود ژن الحاقی با اندازه صحیح را تأیید می‌کند. آزمایش غربالگری PCR تعیین خواهد کرد که آیا ژن در جهت‌گیری صحیحی نسبت به پروموتور قرار گرفته است یا خیر. با تصویرسازی فلورسانس سبز مشخص می‌شود که آیا پروتئین نوترکیب به‌درستی بیان شده است یا خیر. در نهایت، تعیین توالی DNA پلازمید نوترکیب یک کلون مثبت احتمالی، تأیید می‌کند که هیچ خطای تک نوکلئوتیدی در طول تکثیر PCR ژن *egfp* در طول کلون‌سازی ثبت نشده است. درک و فراگیری روش‌های غربالگری مختلف به‌منظور بررسی مشکلات احتمالی در فرآیند کلون‌سازی بسیار مهم است.

جایگزین‌های پیشرفته: قسمت دوم - غربالگری سلول‌های ترادیسی شده

بسته به تغییرات ایجاد شده در بخش اول - دست‌کاری DNA، تغییرات مناسبی باید در طول این بخش از طرح آزمایشگاهی ایجاد شود. هدف کلی این طرح، تأیید کلون شدن ژن مورد نظر در وکتور pET-41a است؛ به عبارت دیگر، آیا توالی کدگذاری صحیحی را در حال حاضر (در چارچوب خوانش) دارید تا بیان پروتئین را در باکتری‌ها فعال کنید؟ در این قسمت، سه روش برای انجام این کار را شرح می‌دهیم: غربالگری PCR، تجزیه و تحلیل محدود شونده به روش DNA Miniprep و توالی‌یابی DNA. بسته به اینکه *egfp* یا یک ژن دیگر در قسمت اول کلون شده باشد، ممکن است آغازگر و آنزیم‌های محدودکننده متفاوتی برای این آزمایش‌ها مورد نیاز باشد. در عمل، تعیین توالی DNA بهترین روش برای تأیید این امر است. برای انجام توالی‌یابی، DNA پلازمید باید از کلون‌های منفرد و پس از ترادیسی، خالص‌سازی شود. در مدت زمان لازم برای خالص‌سازی DNA، ارسال نمونه‌ها برای تعیین توالی و به دست آوردن داده‌های حاصل از توالی‌یابی، استفاده از سایر روش‌های

1. Restriction. mapping. experiment

غربالگری نیز می‌تواند مفید واقع شود. درحالی‌که استفاده از سایر روش‌های دیگر به‌طور کامل ضروری نیست، اما همیشه در اختیار داشتن و فراگیری چندین روش دیگر، امر مفیدی است. برخلاف برخی از جایگزین‌های پیشرفته در قسمت اول، آزمایش‌های بخش پایین‌دستی در قسمت سوم تحت تأثیر گزینه‌های پیشنهاد شده در اینجا قرار نمی‌گیرند.

۱-۲- حذف غربالگری PCR

درحالی‌که غربالگری با PCR به‌ویژه در روش‌های کلون کردن دشوارتر، می‌تواند ابزار مفیدی باشد، روش کلون کردن *egfp* توضیح داده شده در این کتاب، به‌طور معمول درصد قابل توجهی از کلون‌های مثبت را تولید می‌کند. دانشجویان بلافاصله می‌توانند پس از ایجاد پلیت ترادیدی تجربی، فرآیند خالص‌سازی با استفاده از DNA Miniprep را انجام دهند. DNA خالص‌سازی شده با استفاده از این روش، می‌تواند برای تجزیه و تحلیل فرآیند محدود شونده‌گی و تعیین توالی DNA استفاده شود. از آنجایی که برای برای به‌دست آوردن توالی پلازمید باید یک Miniprep انجام شود، انجام یک هضم سریع و به دنبال آن تجزیه و تحلیل ژل آگارز DNA قبل از تعیین توالی به شما نشان خواهد داد که این ژن الحاقی وجود دارد یا نه.

۲-۲- تجزیه و تحلیل هضم محدود کننده

دانشجویان ممکن است مشابه «حذف غربالگری PCR»، تجزیه و تحلیل محدود شدگی را نیز حذف کنند. در این مورد، کلنی‌های حاصل‌شده از پلیت ترادیدی تجربی را می‌توان به‌عنوان الگو در غربالگری PCR استفاده کرد، سپس از همان کلنی‌ها برای یک کشت یک‌شبه استفاده کرد. مهم است که دانشجویان تنها یک‌بار از هر کلنی استفاده کنند و پلیت را با همان سری مورد استفاده برای افزودن باکتری به واکنش PCR تیمار کنند. به‌طور کلی، مهم‌ترین داده، داده‌های حاصل از توالی‌یابی بوده است که توالی کلون مورد نظر را تأیید می‌کند. با این حال، در طرح‌های کلون‌سازی چالش‌برانگیزتر، می‌توان از طریق انجام غربالگری PCR پیش از توالی‌یابی و به‌منظور شناسایی کلون‌ها با ژن الحاقی مورد نظر، در زمان و هزینه صرفه‌جویی کرد.

۲-۳- استفاده از آنزیم‌های محدود کننده دیگر برای تجزیه و تحلیل

درحالی‌که متداول‌ترین روش برش ژن الحاقی از پلازمید، استفاده از همان آنزیم‌هایی است که برای کلون‌سازی استفاده شده، از آنزیم‌های دیگر نیز می‌توان برای تأیید وجود ژن الحاقی استفاده کرد. در این روش جایگزین، به دانشجویان اجازه دهید که آنزیم‌ها را از کتابخانه آنزیم‌های محدودکننده انتخاب کنند و از آن‌ها بخواهید الگوهای ژل را برای پلازمید با ژن الحاقی و پلازمیدهای بدون ژن

الحاقی پیش‌بینی کنند. موثرترین روش برای این کار، انتخاب یک آنزیم منفرد است که الگو ارائه شده آن برای حضور پلازمید با ژن الحاقی، به‌صورت قابل توجهی متفاوت باشد. علاوه بر این، تعداد بسیار زیادی از ابزارهای آنلاین رایگان در دسترس است که توالی‌های داده شده را برای مکان‌های آنزیم محدود تجزیه و تحلیل و تعداد قطعات و اندازه‌های تولید شده توسط آن‌ها را پیش‌بینی می‌کنند. از دانشجویان بخواهید که به‌منظور بررسی نتایج خود و مشخص کردن حضور ژن الحاقی مورد نظر، الکتروفورز ژل آگارز را انجام دهند.

مواد اضافی

آنزیم‌های محدود کننده جایگزین برای دانشجویان.

۲-۴- طراحی آغازگرهای خود برای غربالگری PCR

برای تمرین بیشتر در طراحی آغازگرهای PCR، از دانشجویان بخواهید آغازگرهایی را برای غربالگری PCR خود به روشی مشابه در کلاس آزمایشگاه، جلسه ۶ (پ) طراحی کنند. شیوه‌نامه‌های کلی برای طراحی آغازگر PCR در جلسه ۲۵ آزمایشگاه ارائه شده است.

مواد اضافی

آغازگرهای اولیگونوکلوئیدی مختلف.

کلاس آزمایشگاه: جلسه ششم

در طول سه دوره آزمایشگاهی بعدی، شما از چهار روش مختلف برای تأیید DNA الحاقی کلون شده در وکتور pET-41a استفاده خواهید کرد. این روش‌ها عبارت‌اند از: خالص‌سازی با استفاده از روش Miniprep DNA و هضم، غربالگری PCR، فلورسانس EGFP و تعیین توالی DNA. پیش از آغاز این آزمایش‌ها، دست‌کم یک روز قبل از دوره معمول آزمایشگاهی، شما یک جلسه موقت آزمایشگاهی لازم دارید تا کلنی‌های خود را شمارش و تکثیر و کشت‌ها را برای Minipreps تلقیح کنید. سه آزمایشی که در طول دوره منظم آزمایشگاهی این هفته انجام می‌دهید، طی دو هفته آینده تکمیل خواهند شد. چهارمین آزمایش (توالی یابی DNA) را هفته آینده شروع کنید تا بتوانید نتایج را در جلسه آزمایشگاهی بعدی تجزیه و تحلیل کنید.

کلاس آزمایشگاه: جلسه ششم-الف

جلسه آزمایشگاهی موقت

شمارش سلول‌های ترادیسی شده، مضاعف کردن پلیت‌ها و تلقیح شبانه کشت‌ها

هدف: امروز شما تعداد سلول‌های ترادیسی شده در هر پلیت شمارش و ثبت خواهید کرد. شما همچنین تعداد پلیت‌های حاوی سلول‌های ترادیسی شده خود را مضاعف خواهید کرد. این پلیت‌های مضاعف شده برای غربال کردن کلون‌های مثبت (آنهايي که پروتئين فلورسنت سبز بهیود یافته را بیان می‌کنند) استفاده خواهند شد. در نهایت، شما کشت‌هایی را تلقیح می‌کنید که از آن‌ها DNA پلازمید را با استفاده از یک Miniprep در طول دوره معمول آزمایشگاهی، خالص‌سازی خواهید کرد.

۱- مقدمه

مضاعف کردن پلیت‌ها^۱ عبارت است از فرآیندی که در طی آن هر کلون/کلنی و بر اساس یک الگوی شمارشی، روی یک پلیت دیگر تلقیح می‌شود. این روش به هر یک از کلون‌ها اجازه می‌دهد تا با روش‌های مختلف آزمایش شوند، درحالی‌که پلیت اصلی حفظ خواهد شد. از آنجایی که کلون‌های مثبت باید با سرعت بالایی مشخص شوند، ما فقط باید ده‌ها کلنی را غربال کنیم؛ بنابراین هر کلنی را به‌صورت جداگانه انتخاب و پلیت‌ها را با استفاده از یک خلال‌دندان استریل یا سرسمپلر تلقیح می‌کنیم. در مواردی که صدها یا هزاران کلنی باید تکثیر شوند، یک پارچهٔ مخملی استریل را می‌توان روی پلیت اصلی قرار داد و سپس آن را روی چندین پلیت خالی الصاق کرد تا کلونی‌ها رشد کنند. هر کدام از الیاف مخمل، مانند سوزن‌های تلقیح‌کننده ریز عمل می‌کنند.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

الف. شماره سلول‌های ترادیسی شده و راندمان ترادیسی

تعداد سلول‌های ترادیسی شده را در هر یک از پلیت‌های لیگاسیون/ترادیسی خود بشمارید و ثبت کنید. شما باید تعداد زیادی کلنی از ترادیسی‌های کنترل مثبت وکتور برش نخورده و چندین کلنی از لیگاسیون تجربی خود را روی پلیت داشته باشید و تعداد بسیار کمی از کلنی‌ها -در صورت وجود- حاوی باکتری‌های ترادیسی شده با وکتور pET-41a خطی (کنترل منفی) را روی پلیت

1. Replica. plating

خود داشته باشید. تعیین کنید که آیا کنترل‌های شما حاوی نتایج مورد انتظار بوده‌اند یا خیر (به شکل ۵-۱ مراجعه کنید). اگر چنین نیست، چه مشکل فنی رخ داده است؟ اگر کلنی‌های متعددی را با کنترل منفی مشاهده کردید، ممکن است یافتن سلول‌های ترادیدی شده حاوی ژن الحاقی در فرآیند لیگاسیون تجربی، دشوار باشد.

بر اساس تعداد کلنی‌های موجود در پلیت کنترل مثبت (وکتور برش نخورده)، می‌توانید نرخ بازدهی ترادیدی سلول‌های خود را محاسبه کنید. این روش به‌ویژه در آزمایش‌های کلون‌سازی دشوارتر که در آن به اندازه انتظار کلون‌های مثبت زیادی مشاهده نمی‌شود، می‌تواند یک محاسبه مفید باشد. راندمان ترادیدی سلول‌ها به‌طور معمول توسط شرکت سازنده به شما داده می‌شود، اما دانستن اینکه آیا به بازدهی مورد نظر می‌رسید یا خیر، می‌تواند به شما بگوید که آیا شیوه‌نامه ترادیدی شما همان‌گونه که انتظار می‌رود پیش می‌رود یا خیر.

راندمان ترادیدی تحت عنوان تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی^۱ (cfu) به ازای هر میکروگرم DNA مورد استفاده برای ترادیدی باکتری تعریف می‌شود. گزینه مهم در این محاسبه، تعیین جرم DNA استفاده شده به هنگام قرار دادن سلول‌ها روی محیط‌های کشت انتخابی است. به‌عنوان مثال، فرض کنید شما مقدار ۵۰ ng از DNA را به ۵۰ μL از سلول‌های شایسته به‌منظور ترادیدی منتقل و پس از اعمال شوک حرارتی، ۹۵۰ μL از محیط SOC اضافه کرده‌اید. در این مرحله، شما هنوز ۵۰ ng از DNA را در ویال حاوی سلول‌ها و در حجم کلی ۱۰۰۰ μL خواهید داشت. با این حال، اگر شما فقط ۲۰۰ μL از مخلوط نهایی (۱,۵ از مقدار کل) را در پلیت حاوی LB/kan قرار دهید، شما تنها ۱۰ ng از DNA را پلیت کرده‌اید؛ بنابراین، اگر شما تعداد ۱۰۰ کلنی را شمارش کنید، بازدهی ترادیدی شما باید به‌صورت ۱۰۰ کلنی/(۰,۰۱ μg DNA) = 1×10^4 cfu باشد.

ب. مضاعف‌سازی پلیت و تلقیح شبانه کشت‌ها

شما در این مرحله یک پلیت مضاعف برای بررسی کلون‌های مثبت احتمالی از کلون‌های در حال رشد حاوی ژن الحاقی شده به وکتور ایجاد خواهید کرد.

۱- یک پلیت LB/kan تهیه کنید و یک برچسب توری شکل را به پشت آن بچسبانید. در صورت موجود نبودن این برچسب‌ها، پشت پلیت خود یک صفحه حاوی ۱۵ عدد مربع را با استفاده از ماژیک ایجاد کنید (به شکل ۷-۱ مراجعه کنید). مهم: مطمئن شوید که روی پلیت تاریخ و نام / حروف اول خود را درج کنید. همیشه کف صفحه پتری را برچسب بزنید، نه درب آن.

1. Colony. forming. units. (cfu)

۲- هفت لوله کشت تهیه کنید که هرکدام به‌طور تقریبی حاوی ۵ mL محیط کشت LB/kan است.

۳- یک پلیت حاوی pBIT (کنترل مثبت حاوی وکتور pET-41a با ژن الحاقی *egfp*) تهیه کنید و با استفاده از یک خلال دندان یا سرسمپلر استریل، سلول‌ها را از کشت کنترل مثبت (pBIT) با لمس ملایم یک کلنی منفرد و به‌خوبی جدا شده (ترکیب نشده با کلون‌های دیگر) بردارید. خلال دندان یا سرسمپلر را به شکل ۱ در یکی از مربع‌ها و به‌آرامی به سمت وسط پلیت بکشید. توجه داشته باشید آگار سوراخ یا خراشیده نشود. خلال دندان یا سرسمپلر را در یکی از لوله‌های کشت قرار دهید (به‌خوبی علامت بزنید به‌عنوان مثال «۱ کنترل» یا «Pbit»). خلال دندان یا سرسمپلر استفاده شده در پلیت تلقیح و لوله‌های کشت را به کلنی‌ها باز نگردانید.

توجه: این روش تلقیح از اصل تکنیک ضدعفونی^۱ استفاده نمی‌کند. این روش تلقیح کشت‌ها برای Minipreps خوب عمل می‌کند، زیرا آنتی‌بیوتیک‌های موجود در محیط کشت از رشد بیشتر آلاینده‌ها جلوگیری می‌کند و به دلیل بالا بودن مقایس تلقیح، چه‌بسا پدیده رقابت با هر آلاینده‌ای وجود نخواهد داشت. در موارد نیاز به یک کشت خالص همانند ایجاد یک استوک فریزری، از این روش استفاده نکنید.

۴- مرحله قبل را با یک کلنی از پلیت حاوی pET-41a (کنترل منفی) تکرار کنید، به‌جز اینکه شکل ۲ (علامت منفی) را در مربع مجاور کنترل مثبت (۱) ایجاد کنید. علائم ۱ و ۲، تشخیص کنترل‌های موجود روی پلیت را آسان می‌کند. مطمئن شوید که لوله کشت را بعد از مضاعف سازی پلیت، تلقیح کنید.

۵- صفحه پلیت و کشت‌های مایع را با پنج کلنی جداسازی شده از پلیت لیگاسیون تجربی خود (pET-41a+ژن الحاقی *egfp*) تلقیح کنید. برای هر کلنی از یک خلال دندان یا سرسمپلر متفاوت استفاده کنید! به حتم به‌خوبی علامت بزنید تا بدانید کدام لوله کشت با شبکه (مربع) مناسب روی پلیت مطابقت دارد. هنگامی که این کشت‌ها را روی صفحه LB/kan خود می‌گذارید، خلال دندان یا سرسمپلر را به‌صورت یک خط مورب در طول مربع بکشید.

۶- درحالی که شما فقط کنترل مثبت، کنترل منفی و پنج نمونه ناشناخته خود را با استفاده از تمام سنجش‌های غربالگری تجزیه و تحلیل می‌کنید، بقیه شبکه مربعی خود را در پلیت

1. Principle. of. aseptic. technique

LB/kan با کلنی‌های باقی‌مانده از پلیت لیگاسیون تجربی خود پر کنید. این کلنی‌های اضافی را می‌توان با استفاده از تصویرسازی فلورسانس غربال کرد.

۷- اگر کمتر از پنج کلنی در پلیت لیگاسیون تجربی خود دارید، دست‌کم پنج کلنی از پلیت یک گروه آزمایشگاهی دیگر انتخاب کنید یا به مربی خود مراجعه کنید تا یک پلیت از «کلنی‌های ترکیبی ناشناخته» را پیدا کند. به حتم در دفتر خود یادداشت کنید که هر کلون از کدام پلیت منشا گرفته است. کلنی‌ها را از پلیت ترادیدی شده‌های ۱ یا ۲ انتخاب نکنید، زیرا همه آن‌ها منفی خواهند بود.

۸- پلیت LB/kan مضاعف شده خود را (درب پایین) به مدت یک شب (۱۶ ساعت)، در یک انکوباتور 37°C قرار دهید. پس از رشد کلنی‌ها، پلیت مضاعف شده خود را در پارافیلیم بپیچید و به یخچال منتقل کنید (درب آن را پایین نگه دارید).

نکته برای صرفه‌جویی در زمان: انکوباسیون پلیت‌های باکتریایی به‌طور معمول در دمای 37°C و در طول شب انجام می‌شود. با این حال، سلول‌ها با سرعت کمتر، در دماهای پایین‌تر نیز رشد می‌کنند. سلول‌های باکتریایی ترادیدی شده و قرار گرفته روی محیط مقاوم به آنتی‌بیوتیک، در دمای اتاق رشد می‌کنند و به‌طور معمول در ۲۴ الی ۴۸ ساعت، کلنی‌ها را تشکیل می‌دهند و بیشتر وقت‌ها می‌توانند تا ۷۲ ساعت و بدون محیط کشت، به رشد حداکثری خود ادامه دهند و کلنی‌های ماهواره‌ای را ایجاد کنند. این کلنی‌ها که کلنی‌های کوچک‌تر فاقد پلازمید هستند کلنی بزرگ‌تر و حاوی باکتری را احاطه می‌کنند.

۹- لوله‌های کشت باید تا روز پیش از جلسه بعدی آزمایشگاه، در یخچال (4°C) قرار داده شوند. یک روز پیش از جلسه آزمایشگاه، آن‌ها باید به مدت یک شب در انکوباتور شیکردار و در دمای 37°C قرار داده شوند.

کلاس آزمایشگاه: جلسه ششم-ب

هدف: شما DNA پلازمید را از چندین کلنی ترادیدی شده جدا خواهید کرد (Miniprep). هفته آینده، شما پلازمیدها را با اندونوکلازهای محدود کننده NcoI-HF و NotI-HF هضم خواهید کرد تا وجود ژن *egfp* را تأیید کنید.

کلون‌های حاوی وکتور با ژن الحاقی *egfp* پس از هضم، دارای دو باند قابل مشاهده روی ژل خواهند بود: ۷۲۴ kb (مرتبط با *egfp*) و ۵,۹ kbp (جفت کیلوباز) (مرتبط با وکتور pET-41a). کلون‌های حاوی وکتور دارای باند به اندازه ۵,۹ kbp (مرتبط با قطعه ناقل بزرگ) روی ژل هستند؛ با این حال قطعه دیگری که برای نشان دادن روی ژل بسیار کوچک است، نیز وجود دارد (۷۳ kb، مربوط به قطعه کوچک DNA بین مکان‌های NcoI و NotI روی وکتور).

این آزمایش در طول دو هفته انجام خواهد شد. این هفته DNA پلازمید را خالص‌سازی خواهید کرد و هفته آینده هضم محدود کننده و تجزیه و تحلیل آن را انجام خواهید داد. DNA پلازمید به دست آمده از این Miniprep، نیز برای تعیین توالی DNA استفاده خواهد شد.

۱- مقدمه

صرف نظر از روش‌های اولیه مورد استفاده برای شناسایی سلول‌های ترادیدی شده مثبت، در نهایت برای تأیید تجزیه و تحلیل نهایی یعنی توالی‌یابی DNA، باید DNA را جدا کنید. به همین منظور، ما از همان شیوه‌نامه‌ای که در ابتدای ترم استفاده کردیم، برای خالص‌سازی DNA پلازمید استفاده خواهیم کرد.

به یاد داشته باشید، فرآورده‌های بسیار مختلفی می‌توانند در طول فرآیند لیگاسیون شما ایجاد شوند (شکل ۵-۲ را بررسی کنید). نکته اصلی در تجزیه و تحلیل سلول‌های ترادیدی شده در این است که اگر با الگوی مورد انتظار شما مطابقت داشت، آن را حفظ و در غیر این صورت، آن را از مسیر مطالعه خود خارج کنید. هنگام تجزیه و تحلیل الگوهای هضم محدود کننده، این اصول را در نظر داشته باشید:

- DNA با سرعت معکوس نسبت با اندازه قطعه DNA در ژل مهاجرت می‌کند. از نتایج حاصل‌شده از تجربه‌های قبلی، می‌دانید که استفاده از یک چاهک به‌منظور قرار دادن نشانگرهای مولکولی استاندارد وزنی، برای تجزیه و تحلیل DNA شما حیاتی است. از آنجایی که وزن مولکولی هر یک از باندهای استاندارد DNA مشخص است، می‌توانید از

این نشانگرهای مولکولی مخصوص برآورد وزن، برای تخمین اندازه قطعات نمونه ناشناخته استفاده کنید.

- DNA حلقوی به دلیل داشتن ساختار ثانویه، با سرعت غیر قابل پیش‌بینی در ژل حرکت می‌کند؛ بنابراین، اندازه DNA برش نخورده را نمی‌توان با استفاده از یک خط‌کش DNA معمولی تخمین زد. هر زمان که DNA پلازمید هضم شده محدود شده را الکتروفورز می‌کنید، در صورت امکان یک چاهک باید حاوی DNA بریده نشده به‌عنوان مرجع باشد. بسته به یکپارچگی نمونه، هنگام تجزیه و تحلیل DNA پلازمید برش نخورده روی ژل، بین دو تا چهار باند مشاهده خواهید کرد. برای توضیح اشکال مختلف و تحرکات الکتروفورتیکی نسبی DNA برش نخورده، به کلاس آزمایشگاه جلسه سوم مراجعه کنید.
- مجموع وزن مولکولی قطعات حاصل از هضم یک مولکول حلقوی، برابر با وزن مولکولی مولکول بریده نشده است (برای تجسم این موضوع، به بریدن یک باند لاستیکی به قطعات کوچک‌تر فکر کنید. طول کل قطعات برابر خواهد بود با طول باند لاستیکی).
- شدت فلورسانس یک باند، به‌طور مستقیم با جرم DNA بارگذاری شده در چاهک بستگی دارد. انحراف از این اصل نشان دهنده هضم جزئی یا دوتایی (دو باند هم‌اندازه) است.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

DNA پلازمید را از هفت کشت خود که در جلسه قبلی آزمایشگاه خود تلقیح کردید (یک کنترل مثبت، یک کنترل منفی و پنج ناشناخته) خالص‌سازی کنید. شیوه‌نامه زیر با شیوه‌نامه‌ای که در کلاس آزمایشگاه جلسه دوم استفاده کردید یکسان است و از کتاب راهنمای QIAGEN QIAprep Miniprep Kit (June 2015) اقتباس شده است. در راهنما این شرکت، مرحله شماره ۳ آغاز کار شما خواهد بود.

قابل توجه مربیان: تعداد زیادی کیت Miniprep آماده دیگر برای خالص‌سازی DNA وجود دارد. اگر می‌خواهید از کیت دیگری استفاده کنید، شیوه‌نامه آماده‌سازی پلازمید با نسخه کم و معرف‌های قبل از استفاده را به کار ببرید.

۳- مقدار ۵-۱/۵ mL از کشت را در یک ویال میکروسانتریفیوژ قرار دهید. در این آزمایش پیشنهاد می‌شود که مقدار تقریبی ۵mL از محیط کشت را به‌منظور تولید مقادیر کافی از پلازمید pET-41a خالص‌سازی شده استفاده کنید. به ویژه که شما به حدود ۸۰۰ ng از DNA برای فرآیند توالی‌یابی نیاز دارید. شما به‌همین منظور می‌توانید: (۱) مقدار ۵ mL را بین چندین ویال میکروسانتریفیوژ تقسیم کنید؛ یا (۲) یک ویال را پر کرده و آن را همان‌گونه که در مرحله ۴ توضیح داده شد سانتریفیوژ کنید، سپس پس از برداشتن مایع

- رویی، مقدار بیشتری از کشت را در بالای کلاف (DNA) باقی مانده اضافه کنید. این کار را تا زمانی که تمام ۵ mL کلاف شود، تکرار کنید.
- ۴- سلول‌های باکتریایی را ابتدا سانتریفیوژ $> 8000 \text{ rpm}$ (به مدت ۳ دقیقه) و سپس جمع‌آوری کنید. تمام آثار مایع رویی را با ریختن یا میکروپیت کردن محیط کشت در یک ظرف زباله مخصوص مایعات حاوی ۱۰ درصد سفید کننده، حذف کنید.
- ۵- کلاف‌های باکتریایی را در $250 \mu\text{L}$ بافر P1، تعلیق مجدد کنید (بافر تعلیق مجدد). باکتری‌ها باید به‌طور کامل معلق شده تا زمانی که هیچ توده سلولی باقی نماند. اگر سلول‌های هر نمونه را در چندین ویال جمع‌آوری کرده‌اید، مقدار $250 \mu\text{L}$ را به یک لوله اضافه و تعلیق مجدد کنید؛ سپس محلول تعلیق مجدد یافته را به لوله بعدی منتقل کنید. هدف از این امر، داشتن تمامی سلول‌های حاوی pET-41a مربوط به نمونه در یک لوله و معلق‌سازی مجدد آن‌ها در بافر P1 است.
- ۶- مقدار $250 \mu\text{L}$ از بافر P2 را به هر نمونه اضافه و به آرامی اما به‌طور کامل با چهار تا شش بار معکوس کردن مخلوط کنید. ورتکس نکنید، زیرا این امر باعث برش DNA ژنومی می‌شود. در صورت لزوم، معکوس کردن لوله را ادامه دهید تا محلول چسبناک و کمی شفاف شود. اجازه ندهید که واکنش هضم شدن بیش از ۵ دقیقه ادامه یابد. بافر P2 حاوی یک شوینده (SDS) برای هضم سلولی و هیدروکسید سدیم برای دناتوره کردن DNA است.
- ۷- مقدار $350 \mu\text{L}$ از بافر N3 را به محلول هضم شده هر نمونه اضافه و بلافاصله و به‌طور کامل (به آرامی) با چهار تا شش بار معکوس کردن مخلوط کنید. پس از افزودن بافر N3، یک رسوب سفید کرکی حاوی DNA ژنومی، پروتئین‌ها، بقایای سلولی و SDS قابل مشاهده می‌شود. بافرها باید به‌طور کامل مخلوط شوند. اگر محلول همچنان چسبناک و قهوه‌ای به نظر می‌رسد، برای خنثی‌سازی کامل محلول، به مخلوط کردن بیشتری نیاز است. بافر N3 محلول را خنثی می‌کند و باعث وصل شدن مجدد DNA پلازمید می‌شود و DNA کروموزومی و پروتئین‌های نامحلول را رسوب می‌دهد.
- ۸- به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت $13,000 \text{ rpm}$ در یک میکروسانتریفیوژ، اقدام به سانتریفیوژ کردن کنید.
- ۹- مایع سوپرناتانت (مایع بالای کلاف) را با پایپت کردن از مرحله ۸ ستون چرخشی QIAprep (حاوی غشای سیلیسی) بریزید و مراقب باشید که رسوب سفید کرکی را منتقل نکنید.
- ۱۰- به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید. مایع جمع شده در بخش زیر را دور بریزید.

- ۱۱- ستون چرخشی QIAprep را با افزودن ۰/۵ mL بافر PB بشویید و به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید. مایع جمع شده در بخش زیر را دور بریزید.
- ۱۲- ستون چرخش QIAprep را با افزودن ۰/۷۵ mL بافر PE بشویید و به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید.
- ۱۳- مایع جمع شده در بخش زیر را دور بریزید و به مدت ۱ دقیقه دیگر سانتریفیوژ کنید تا باقی‌مانده بافر شست و شو حذف شود.
- ۱۴- ستون‌ها را در لوله‌های میکروسانتریفیوژ تمیز ۱/۵mL قرار دهید. برای شستشوی DNA، ۵۰ μ L بافر EB را به مرکز هر ستون اضافه و به مدت یک ۱ دقیقه صبر کنید و سپس ۱ دقیقه سانتریفیوژ کنید (در صورت لزوم، درب ویال ۱/۵mL را با قیچی برش بدهید تا در میکروسانتریفیوژ قرار گیرد).
- ۱۵- ستون را بردارید و دور بریزید. مطمئن شوید که ویال‌های حاوی DNA به‌خوبی علامت‌گذاری و در دمای 20°C - نگهداری می‌شوند.

کلاس آزمایشگاه: جلسه ششم-پ

هدف: این غربالگری PCR تأیید می‌کند که آیا کلون‌ها دارای ژن الحاقی *egfp* هستند یا خیر و آیا جهت‌گیری صحیحی در وکتور داشته است یا خیر. شما این آزمایش را امروز آغاز و هفته آینده نتایج را تجزیه و تحلیل خواهید کرد.

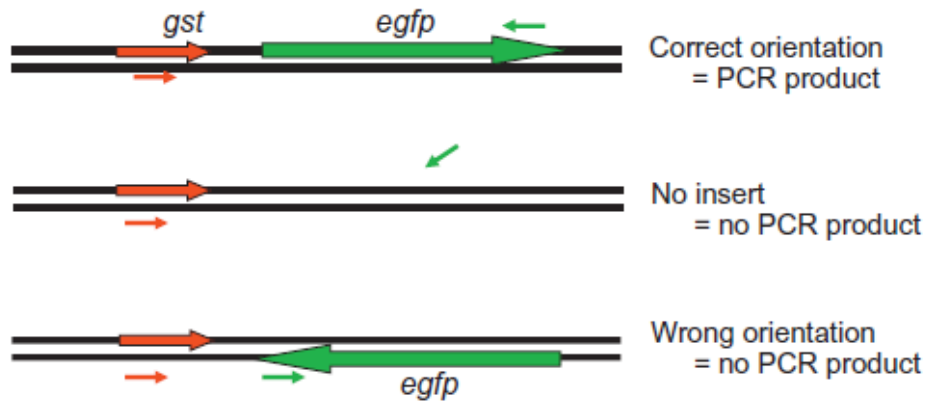
۱- مقدمه

از آنجایی که ما ژن *egfp* را با استفاده از روش کلون‌سازی اجباری به سلول‌ها الحاق کردیم، بنابراین مطمئن هستیم که این ژن فقط می‌تواند در جهت صحیح الحاق شده باشد. با این حال، این روش غربالگری همچنین می‌تواند جهت‌گیری صحیح یک ژن الحاقی را در مواردی که از کلون‌سازی اجباری استفاده نمی‌شود (کلونینگ تنها با یک آنزیم انجام می‌شود) تأیید کند.

نکته قابل توجه در این آزمایش، آغازگرهای PCR طراحی شده برای وصل شدن است؛ مانند هر واکنش PCR، دو آغازگر در کنار یک ناحیه DNA پهلوزینی می‌کند. در این حالت، یک آغازگر به رشته بالایی و یکی به رشته پایین متصل است و انتهای ۳' آغازگرها به سمت داخل و به سمت یکدیگر هستند (توجه داشته باشید که سنتز DNA فقط در جهت ۵' ← ۳' انجام می‌شود). در این تکنیک غربالگری، یک آغازگر باید به توالی ژن الحاقی و دیگری باید به توالی وکتور متصل شود. در صورت وجود ژن الحاقی و جهت‌گیری صحیح آن، یک فرآورده PCR به اندازه توالی DNA پهلوزینی شده توسط آغازگر، تولید می‌شود (در مورد این آزمایش، ۱۱۸۳ bp). اگر ژن الحاقی در وکتور وجود نداشته باشد، آغازگری که برای وصل شدن به آن طراحی شده، قادر به وصل شدن به هیچ قطعه‌ای نخواهد بود و هیچ فرآورده PCR ساخته نخواهد شد. اگر ژن الحاقی در جهت نادرست در وکتور کلون شود، هر دو آغازگر به یک رشته DNA در جهت یکسان متصل خواهد شد و فرآیند تکثیر نمایی امکان پذیر نخواهد بود؛ بنابراین هیچ فرآورده PCR روی ژل آگارز ظاهر نمی‌شود؛ بنابراین می‌توانیم مطمئن شویم که اگر یک فرآورده PCR با اندازه پیش‌بینی شده روی یک ژل آگارز قابل مشاهده باشد، می‌توان نتیجه گرفت که ژن الحاقی در وکتور وجود داشته و به درستی جهت‌گیری شده است (شکل ۶-۱).

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

روش PCR استفاده شده در این مرحله، همانند روش تکثیر DNA جداشده است اما در مرحله اول؛ یعنی در مرحله واسرشته شدن در دمای 95°C متفاوت خواهد بود. در این روش مرحله اول طولانی‌تر خواهد بود، زیرا ما نه تنها باید DNA را دناتوره کنیم، بلکه باید اطمینان حاصل کنیم که باکتری‌ها توسط گرما هضم گردد تا DNA آزاد شود.



→ Forward primer anneals to vector sequence (*gst*)
← Reverse primer anneals to sequence in *egfp*

شکل ۶-۱: غربالگری سلول‌های ترادیدی شده با روش PCR. آغازگر رفت به ژن *gst* روی وکتور متصل و آغازگر برگشت به توالی ژن الحاقی *egfp* متصل می‌شود. در اولین امکان، *egfp* در جهت صحیح در وکتور الحاق شده است. آغازگرها در موقعیت‌های صحیح متصل و یک فرآورده PCR با ۱۱۸۳ bp جفت باز ساخته می‌شود. در احتمال دوم، *egfp* وجود ندارد؛ بنابراین آغازگر برگشت امکان متصل شدن را ندارد و فرآورده PCR ساخته نمی‌شود. در حالت نهایی، *egfp* در جهت معکوس قرار گرفته است. هر دو آغازگر در جهت‌های یکسان، به یک رشته متصل و در نتیجه هیچ فرآورده PCR ساخته نخواهد شد.

هر گروه یک ویال از مستر میکس را دریافت کنید یا ممکن است از شما خواسته شود که مستر میکس خود را مطابق جدول ۶-۱ بسازید.

۱- اگر مستر میکس PCR یکراست در اختیار شما قرار نگرفت، آن را آماده کنید. شما در کل هفت واکنش و $20\ \mu\text{L}$ به ازای هر واکنش نیاز خواهید داشت. به‌منظور مطمئن بودن از

داشتن حجم کافی از محلول مستر میکس، هنگام ساختن آن، از حجم بیشتری استفاده کنید. ویال مستر میکس PCR را برجسب بزنید. پیش از تهیه مستر میکس خود، به حتم غلظت معرف‌های خود را بررسی کنید! اگر مستر میکس خود را تهیه می‌کنید، باید جدولی مانند جدول ۶-۱ در دفترچه یادداشت آزمایشگاه خود داشته باشید.

جدول ۶-۱: تنظیم مستر میکس PCR

مقدار در ۸ واکنش (۱۶۰ μL)	مقدار در هر واکنش (۲۰ μL)	غلظت نهایی	غلظت استوک	معرف‌ها
		-	-	آب عاری از نوکلئاز
		۲mM / ۱۰ از هر dNTP		میکس dNTP
		۰/۴ μM		آغازگر pBITrev
		۰/۴ μM		آغازگر pBITfor
				بافر ThermoPol ×۱۰
		۰/۵ U به ازای ۲۰ μL		Taq polymerase

آغازگر pBITrev (برگشت) (۵'CTTGTACAGCTCGTCCATGC3') به انتهای ۳' رشته سنس ژن *egfp* متصل می‌شود.

آغازگر pBITfor (رفت) (۵'CAAGCTACCTGAAATGCTGA3') به توالی وکتور متصل می‌شود (مخصوصاً، به توالی وسط رشته آنتی‌سنس ژن *gst*).

۲- مقدار ۲۰ μL از مستر میکس PCR خود را در ۷ ویال مخصوص PCR قرار دهید. هفت نمونه شما، باید همان هفت نمونه حاصل شده از طریق Miniprep و هضم محدود کننده باشد: pBIT (کنترل مثبت)، pET-41a (کنترل منفی) و همان پنج نمونه ناشناخته از لیگاسیون تجربی شما.

۳- از سرسمپلر p10 استریل (خلال دندان چوبی حاوی یک مهارکننده PCR) برای برداشتن مقدار کمی از کشت باکتری و از کلون‌های مناسب موجود در پلیت مضاعف شده خود استفاده کنید. نوک سرسمپلر را در مخلوط واکنش PCR بچرخانید. ویال‌های PCR را با شماره روی پلیت اصلی خود، علامت‌گذاری کنید. این امر را برای هر ویال (همانند کنترل) و با یک کلون متفاوت تکرار کنید. مقدار بسیار کمی از باکتری‌ها را برداشت کنید؛ نزدیک

به اندازه‌ای که روی سر یک سنجاق قرار می‌گیرد. قرار دادن بیش از حد باکتری در محیط واکنش، PCR منجر به تخریب فرآورده‌های PCR می‌شود.

۴- واکنش PCR خود را با استفاده برنامه ارائه شده در جدول ۶-۲ اجرا کنید.

جدول ۶-۲: برنامه PCR

زمان	درجه حرارت	
۱۰ دقیقه (واسرشته‌سازی)	۹۵°C	مرحله ۱
۱ دقیقه	۹۵°C	مرحله ۲
۱ دقیقه	۵۶°C	مرحله ۳
۱/۵ دقیقه	۷۲°C	مرحله ۴
۲۹ بار (به صورت کل ۳۰ چرخه)	تکرار مراحل ۲-۴	مرحله ۵
۵ دقیقه تا بسط کامل تمام فرآورده‌های ناتمام	۷۲°C	مرحله ۶
به طور نامحدود نگه دارید	۴°C	مرحله ۷

پس از پایان برنامه PCR، نمونه‌ها باید در دمای ۲۰°C- نگهداری شوند. هفته آینده باید نتایج را با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز تجزیه و تحلیل کنید.

کلاس آزمایشگاه: جلسه ششم-ج

مشاهده پروتئین فلورسنت سبز، بخش ۱

هدف: شما سلول‌های ترادیدی شده (کنترل‌های مثبت و منفی) خود را روی محیط LB حاوی کانامایسین و IPTG پلیت می‌کنید. این امر امکان مشاهده فلورسانس سبز را در کلون‌های مثبت ممکن می‌سازد.

۱- مقدمه

همان‌گونه که در کلاس آزمایشگاه-جلسه دوم در مورد خالص‌سازی و هضم DNA پلازمید (وکتور) بحث شد، IPTG باعث مهار پروموتور T7/lac روی وکتور بیانی pET-41a می‌شود (شکل ۲-۳). با ترکیب شدن IPTG در محیط رشد، باکتری‌ها می‌توانند پروتئین فلورسنت سبز افزایش یافته را بیان کنند. کلنی‌های حاوی ژن *egfp* که در چارچوب خوانش صحیح قرار گرفته‌اند، حتی هنگام قرارگیری در شرایط نوری معمولی، مقداری نور سبز را از خود منعکس می‌کنند. کلون‌های مثبت هنگام قرارگیری در معرض نور فرابنفش، رنگ سبز را از خود منعکس می‌کنند.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

شما در این مرحله، از پلیت مضاعف شده خود برای انتقال کلنی‌ها به پلیت حاوی LB/kan/IPTG استفاده خواهید کرد. در اصل، شما در حال ایجاد یک نسخه از پلیت مضاعف خود هستید؛ با این تفاوت که در این پلیت می‌توانید بیان پروتئین را القا کنید.

۱- پلیت مضاعف خود را از یخچال خارج کنید.

۲- یک پلیت LB/kan/IPTG را تهیه کنید و یک برچسب شبکه‌ای را به پایین آن بچسبانید. برای جلوگیری از سردرگمی، همیشه به جای درب ظروف پتری‌دیش، قسمت پایینی (طرف آگار) را برچسب بزنید.

۳- همانند کلاس آزمایشگاه، جلسه ششم-الف، از یک خلال دندان استریل یا سرسمپلر برای برداشتن مقدار کمی باکتری از هر مربع موجود در شبکه پلیت اصلی استفاده و همان مربع‌ها را روی پلیت تازه LB/kan/IPTG تلقیح کنید. برای هر کلونی از یک خلال دندان یا سرسمپلر مجزا استفاده کنید.

۴- پلیت مضاعف شده اصلی خود را در پارافیلیم ببیچید و در یخچال قرار دهید. پلیت LB/kan/IPTG جدید خود را به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در دمای اتاق قرار دهید.

انکوباسیون را می‌توان در دمای 37°C در طول شب انجام داد، اما نرخ بیان پروتئین در دمای اتاق بالاتر خواهد بود. پس از رشد کلنی‌ها در پلیت LB/kan/IPTG، می‌توان آن را در پارافیلیم پیچید و تا زمان تجزیه و تحلیل به یخچال منتقل کرد.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- آیا غربالگری با نقشه‌برداری محدودکننده توانایی شناسایی سلول‌های ترادیدی شده با چندین ژن الحاقی را دارد؟ چرا؟
- ۲- در غربالگری PCR، اگر یک ژن الحاقی نادرست در وکتور کلون شود، چه نتیجه‌ای را فرض می‌کنید اگر:
 - الف: اندازه ژن الحاقی نادرست، با اندازه صحیح متفاوت بود؟
 - ب: اندازه ژن الحاقی نادرست، به اندازه مورد صحیح بود؟
- ۳- هنگام انجام غربالگری PCR، چرا قرار دادن بیش از حد باکتری در مخلوط واکنش PCR باعث تخریب احتمالی فرآورده PCR می‌شود؟
- ۴- چه اتفاقی رخ خواهد داد اگر آغازگرهای مورد استفاده در غربالگری PCR، در جهت مخالف با ژن الحاقی به وکتور متصل شود (آیا چنین آغازگری برای وصل شدن به ژن الحاقی طراحی نشده است)؟ اگر آزمایش به این شکل طراحی می‌شد، چه نتیجه‌ای قابل پیش‌بینی بود؟

کلاس آزمایشگاه: جلسه هفتم

غربالگری سلول‌های ترادیسی شده: بخش دوم

در این هفته، شما هضم محدودکننده حاصل شده از خالص‌سازی پلازمید با Miniprep (از هفته گذشته) را انجام خواهید داد. سپس با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز، هم هضم‌ها و هم نمونه‌های غربالگری شده با PCR را تجزیه و تحلیل خواهید کرد. پلیت پروتئین فلورسنت (القا شده با IPTG) از جلسه قبلی آزمایشگاه نیز برای تأیید نتایج غربالگری شما قابل استفاده خواهد بود. علاوه بر این، شما یک واکنش توالی‌یابی را روی یکی از نمونه‌های مثبت خود انجام خواهید داد تا توالی نوکلئوتیدی را با استفاده از روش توالی‌یابی سانگر^۱ تأیید کنید.

1. Sanger. sequencing

کلاس آزمایشگاه: جلسه هفتم-الف

هدف: شما DNA خالص‌سازی شده (آخرین جلسه آزمایشگاه) را از گروه‌های کنترل خود و سلول‌های ترادیدی شده *pET-41a/egfp* را هضم کنید تا وجود ژن *egfp* را تأیید شود.

۱- مقدمه

ما از جایگاه‌های محدود شونده *NcoI* و *NotI* برای کلون کردن ژن *egfp* در *pET-41a* استفاده کردیم و از همین دو آنزیم برای آزادسازی ژن الحاقی استفاده خواهیم کرد. استفاده از یک ژل مرتبط با هضم با آنزیم‌های محدود کننده به‌منظور پیش‌بینی تعداد و اندازه قطعات DNA پلازمید حاوی ژن الحاقی و فاقد ژن الحاقی، می‌تواند امری مفید باشد.

برای انجام هفت واکنش هضمی دوگانه با *NcoI-HF* و *NotI-HF* از روشی که در زیر توضیح داده شده است پیروی خواهید کرد. هنگام انجام هضم‌های متعدد با آنزیم یا آنزیم‌های (محدود کننده) یکسان، تهیه یک مستر میکس حاوی معرف‌های رایج موجود در هر واکنش مفید است. در این مورد، مستر میکس از آب، بافر آنزیم محدود کننده و دو آنزیم محدود (*NotI*- و *NcoI*-*HF*) تشکیل شده است. بعد از ساخته شدن این مستر میکس، ترکیب حاضر شده به ویال‌های جداگانه تقسیم می‌شود که نمونه‌های DNA منحصربه‌فرد برای هضم به آن اضافه شوند. ایجاد یک مستر میکس در مقایسه با پاییت کردن همه معرف‌ها در ویال‌های جداگانه، مزایای مشخصی را به همراه دارد. در درجه اول، از آنجایی که حجم‌های بزرگ‌تری را پاییت می‌کنید، خطای ذاتی در پاییت کردن حجم‌های کوچک‌تر را به کمترین حد می‌رسانید. دوم، استفاده از یک مستر میکس، تنوع ایجاد شده احتمالی بین نمونه‌ها را کاهش می‌دهد. می‌توانید این‌گونه تصور کنید که اگر سعی کنید مقدار $0.5 \mu\text{L}$ از *NcoI-HF* را در هر شش ویال پاییت کنید، برخی از ویال‌ها ممکن است $0.4 \mu\text{L}$ داشته باشند درحالی‌که برخی دیگر ممکن است $0.6 \mu\text{L}$ داشته باشند. مستر میکس این تنوع را کاهش می‌دهد. در نهایت، استفاده از مستر میکس باعث صرفه‌جویی در زمان می‌شود. شما کمتر از زمانی که هر جزء را برای هضم در هر ویال جداگانه پاییت کنید، پاییت خواهید کرد. برای تنظیم مستر میکس خود و برای واکنش‌های هضمی، شیوه‌نامه‌های زیر را دنبال کنید:

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

۱- هشت ویال مربوط به هفت نمونه DNA هضمی و یک ویال را با برچسب «با توجه به مستر میکس^۱» برچسب بزنید.

۲- حجم معرف (آنزیم، بافرهای محدودکننده، آب) را برای یک واکنش هضم آنزیمی در نظر بگیرید (جدول ۷-۱) و مستر میکس کافی برای هشت واکنش (هفت واکنش شما، به علاوه یک واکنش اضافی برای تغییرپذیری پایت کردن) آماده کنید. در دفترچه یادداشت آزمایشگاهی خود جدولی شبیه به جدول ارائه شده تهیه کنید و معرف‌ها، غلظت استوک، غلظت نهایی، مقدار برای یک واکنش و مقدار برای هشت واکنش را فهرست کنید. توجه: DNA در هر نمونه متفاوت است و نمی‌توان آن را به مستر میکس اضافه کرد. حجم نهایی هر واکنش ۲۰ μL خواهد بود.

جدول ۷-۱: تنظیم تجربی برای هضم آنزیم محدود کننده

معرف	غلظت استوک	غلظت نهایی	حجم برای یک واکنش	حجم برای هشت واکنش
آب استریل				
بافر CutSmart				
NcoI-HF		۰/۲۰ واحد در هر واکنش		
Not I-HF		۰/۲۰ واحد در هر واکنش		
DNA			۱۰ μL	
حجم کل			۲۰ μL	

DNA باید به‌طور جداگانه به لوله‌های شماره‌گذاری شده اضافه شود (نه به مستر میکس). غلظت DNA برای هر نمونه را می‌توان با استفاده از نانودراپ پیش از تنظیم هضم‌های محدود کننده تعیین کرد. اگر زمان این اجازه را نمی‌دهد، می‌توانید فرض کنید که DNA Miniprep شما دارای غلظتی بین ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر است. استفاده از DNA ۱۰ μL در هر واکنش هضمی در این آزمایش می‌تواند کافی باشد.

۳- به ترتیب: آب، بافر CutSmart و آنزیم (ها) را در ویال RE Master Mix ترکیب کنید. مطمئن شوید که ویال را خوب مخلوط کرده‌اید و روی یخ نگه دارید.

۴- مقدار ۱۰ μL از مستر میکس را به درون هر کدام از هفت ویال هضمی بریزید. اطمینان حاصل کنید که ویال‌ها را علامت زده‌اید و سپس ۱۰ μL از DNA حاصل شده از Miniprep را به هر ویال نشان‌دار مناسب اضافه کنید.

1. RE. Master. Mix

۵- هفت واکنش را برای دست‌کم ۱۵ دقیقه در دمای 37°C انکوباسیون کنید. در طول دوره انکوباسیون، به کلاس آزمایشگاه: جلسه هفتم-ب بروید، ژل آگارز خود را آماده کنید و در محفظه ژل بریزید.

کلاس آزمایشگاه: جلسه هفتم-ب

تجزیه و تحلیل غربالگری PCR و هضم‌های Miniprep

هدف: شناسایی کلون‌های مثبت از طریق تجزیه و تحلیل ژل نمونه‌های قبلی.

۱- مقدمه

جلسات آزمایشگاهی ۶-ب و ۶-پ را مرور کنید.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

۱- دو ژل آگارز ۱ را همان‌طور که پیشتر توضیح داده شد (جلسه ۳ آزمایشگاه) در مخزن ژل بریزید. یک ژل برای تجزیه و تحلیل هضم‌های محدود شونده و دیگری برای غربالگری‌های PCR شما ضروری است. همچنین، می‌توانید از یک ژل و با دو ردیف شانه استفاده کنید. مربی شما می‌تواند اطلاعات بیشتری در مورد روش ترجیحی ارائه دهد.

۲- درحالی‌که ژل بسته می‌شود، نمونه‌های خود را با افزودن بافر بارگذاری به نمونه‌ها آماده کنید. برای نمونه‌های غربالگری PCR خود، $2\ \mu\text{L}$ از هر نمونه را با $8\ \mu\text{L}$ آب در یک ویال میکروسانتریفیوژ جدید حاوی برچسب رقیق کنید. سپس مقدار مناسب بافر بارگذاری را اضافه کنید. انجام مرحله رقیق‌سازی امری ضروری است، زیرا اگر واکنش PCR مطابق انتظار عمل کند، تکثیر فرآورده به‌گونه‌ای خواهد بود که باندهای دیگر روی ژل را تغییر و آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

۳- بافر بارگذاری نیز باید به هر یک از واکنش‌های هضمی Miniprep (در مجموع هفت ویال) اضافه شود. از آنجایی که این هضم‌ها در آزمایش‌های دیگر استفاده نخواهد شد، می‌توانید بافر بارگذاری را یکراست به ویال‌های حاوی DNA هضم شده اضافه کنید. هر هضم باید در حجم نهایی $20\ \mu\text{L}$ انجام شود. هنگام اضافه کردن بافر بارگیری با ویال‌ها، به خاطر داشته باشید که حجم نهایی محلول تغییر خواهد کرد. به‌عنوان مثال، اگر یک محلول بافر بارگیری 63 دارید، باید $4\ \mu\text{L}$ بافر بارگذاری اضافه کنید (63 باید در محلول نهایی 6 برابر رقیق شوند که در این حالت در مجموع $24\ \mu\text{L}$ خواهد بود). بافر بارگذاری را به ویال‌های حاوی DNA هضم نشده اضافه نکنید!

۴- ژل خود را طبق جدول زیر بارگذاری کنید:

	ژل دو- غربالگری PCR	ژل یک- هضم‌های Miniprep
چاهک ۱	NEB 1 kb خط‌کش ۱۵۰ ng	NEB 1 kb خط‌کش ۱۵۰ ng
چاهک ۲	۱۰ μ L کنترل مثبت (رقیق‌شده)	۱۵ μ L کنترل مثبت
چاهک ۳	۱۰ μ L کنترل منفی (رقیق‌شده)	۱۵ μ L کنترل منفی
چاهک ۴	۱۰ μ L نمونه ۱ (رقیق‌شده)	۱۵ μ L نمونه ۱
چاهک ۵	۱۰ μ L نمونه ۲ (رقیق‌شده)	۱۵ μ L نمونه ۲
چاهک ۶	۱۰ μ L نمونه ۳ (رقیق‌شده)	۱۵ μ L نمونه ۳
چاهک ۷	۱۰ μ L نمونه ۴ (رقیق‌شده)	۱۵ μ L نمونه ۴
چاهک ۸	۱۰ μ L نمونه ۵ (رقیق‌شده)	۱۵ μ L نمونه ۵

اگر از یک ژل منفرد با دو شانه استفاده می‌کنید، نمونه‌های Miniprep را در چاهک‌های بالایی و نمونه‌های غربالگری PCR را در چاهک‌های پایینی قرار دهید. این امر از تداخل نوکلئوتیدها و آغازگرهای آزاد از نمونه‌های غربالگری PCR و نمونه‌های Miniprep جلوگیری می‌کند.

۵- ژل خود را با ولتاژ ۸۵ ولت (با استفاده از تنظیمات مناسب برای واکنش خود) اجرا کنید. اگر از یک ژل با دو شانه استفاده می‌کنید، ژل را به‌دقت زیر نظر داشته باشید و هنگامی که قسمت جلویی رنگ از نمونه‌های بالایی به مجموعه چاهک‌های نمونه‌های پایینی رسید، دستگاه را خاموش کنید. ژل را روی یک ترانسیلیمیناتور فرابنفش (UV) مشاهده کنید.

۶- از این نتایج، همراه با نتایج کلاس آزمایشگاه: جلسه هفتم-پ برای تعیین اینکه کدام نمونه DNA برای تعیین توالی‌یابی ارسال شود، استفاده کنید (کلاس آزمایشگاه: جلسه هفتم-ت).

کلاس آزمایشگاه: جلسه هفتم-پ**مشاهده پروتئین فلورسنت سبز بهبود یافته، بخش دوم**

هدف: در این بخش، سلول‌های ترادیدی شده روی پلایت LB/kan/IPTG را با استفاده از نور UV مشاهده خواهید کرد. کلون‌های مثبت حاوی ژن *egfp* (دارای پروتئین الحاقی GST::EGFP بیان شده) دارای رنگ فلورسانس سبز روشن خواهند بود.

۱- مقدمه

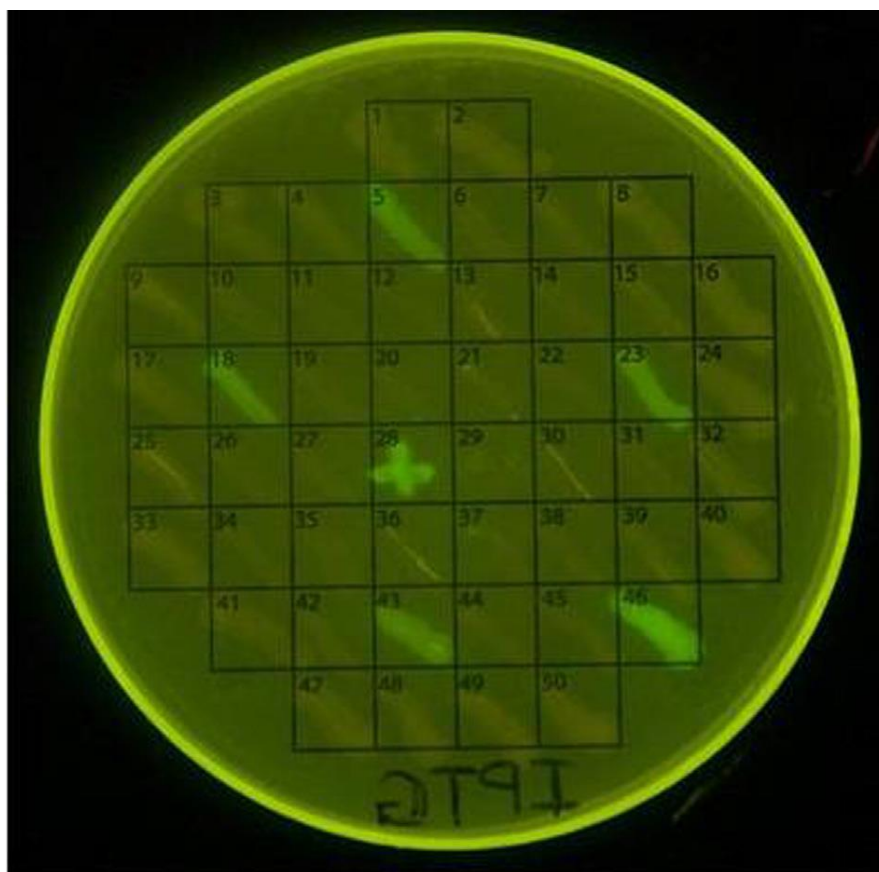
حداکثر میزان برانگیختگی پروتئین فلورسنت سبز افزایش یافته در طول موج ۴۸۸ نانومتر (نور آبی) است و حداکثر در طول موج ۵۰۷ نانومتر از خود نور ساطع می‌کند. هنگامی که کلون‌های مثبت را در معرض نور فرابنفش قرار دهید، اگرچه EGFP در اوج بیشترین میزان برانگیختگی قرار ندارد، اما هنوز هم برانگیختگی به‌میزان کافی وجود دارد و کلنی‌ها رنگ سبز روشن را از خود منعکس می‌کنند. از آنجایی که استفاده از سنجش بسیار راحت است، از آن می‌توان به‌منظور ارزیابی موفقیت سایر روش‌های غربالگری نیز استفاده کرد. در یک آزمایشگاه تحقیقاتی، به ندرت به کلون چنین ژنی برخورد خواهید داشت که چنین الگوی ساده‌ای برای بیان شدن داشته باشد. برای اهداف ما، این روش به‌عنوان یک سنجش تأیید مثبت و بدون ابهام عمل می‌کند که می‌تواند برای تعیین قابلیت بازدهی روش‌های غربالگری استفاده شود و مورد بهره‌وری قرار گیرد.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

۱- پلایت مضاعف IPTG را که هفته گذشته تلقیح کردید، آماده کنید.

۲- درب را بردارید و پلایت را (درب باز به سمت پایین) به‌صورت وارونه روی ترانسیلیمیناتور UV قرار دهید. هنگام مشاهده سلول‌های ترادیدی شده خود در دستگاه نور ماوراءبنفش، باید از محافظ صورت در برابر UV استفاده کنید و همچنین با پوشیدن دستکش و/یا روپوش آزمایشگاهی از پوست در برابر قرار گرفتن مستقیم در معرض نور UV محافظت کنید.

۳- نور فرابنفش را روشن و پلایت را مشاهده کنید. همان‌گونه که در شکل ۷-۱ نشان داده شده است، کنترل مثبت و کلون‌های مثبت به دلیل بیان پروتئین فلورسنت سبز بهبود یافته، رنگ فلورسانس را به‌صورت سبز روشن ساطع خواهند کرد.



شکل ۷-۱: بیان کننده پروتئین فلورسنت سبز افزایش یافته. کنترل مثبت، pBIT، در شبکه شماره ۲۸ تلقیح شده است. کلون‌های شماره ۵، ۱۸، ۲۳، ۴۳ و ۴۶ نیز مثبت و بقیه کلون‌ها منفی هستند.

کلاس آزمایشگاه: جلسه هفتم-ت

تجزیه و تحلیل توالی DNA از یک کلون مثبت، بخش اول

هدف: در این بخش، توالی DNA ژن الحاقی *egfp* را که در pET-41a کلون کرده‌اید، بررسی می‌کنید. در ابتدا، شما نمونه‌ها را آماده می‌کنید و سپس آن‌ها را به یک مرکز توالی‌یابی DNA خواهید فرستاد. در مرحله بعد، داده‌های به‌دست‌آمده از اجرای توالی‌یابی برای تعیین دقیق توالی ژن الحاقی *egfp* را با توالی شناخته شده و مورد انتظار مقایسه می‌کنید.

۱- مقدمه

کلون کردن با استفاده از PCR یک روش مؤثر و ساده برای کلون کردن یک ژن به یک وکتور است. همان‌طور که در کلاس آزمایشگاه: جلسه سوم در مورد تکمیل آماده‌سازی وکتور و تکثیر ژن *egfp* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بحث شد، کلون کردن با PCR نسبت به روش‌های کلون کردن سنتی مزایای زیادی دارد. با وجود این موارد، یک نگرانی اصلی در شبیه‌سازی PCR وجود دارد: خطاهایی که در طی PCR ایجاد می‌شوند. ایجاد یک جهش در یک باز فرآورده PCR شما می‌تواند منجر به تغییرات اسید آمینه یا خاتمه زودهنگام پروتئین الحاقی شما در طول ترجمه شود. با اینکه استفاده از DNA پلیمرزهای با دقت بالا همانند Vent، می‌تواند برای به حداقل رساندن این خطاها استفاده شود، احتمال بروز جهش‌ها همچنان وجود دارد. برای اطمینان از اینکه آزمایش‌های بعدی با پروتئین مورد انتظار شما و نه نسخه جهش‌یافته آن انجام شود، تأیید توالی DNA پلازمید شما ضروری است.

توالی‌یابی DNA در زیست‌شناسی مولکولی به یک عمل معمول تبدیل می‌شود و کاربردهای بسیاری دارد. توالی‌یابی DNA در ابتدا در دهه ۱۹۷۰، با شیوه‌های سخت و پرهزینه انجام می‌شد. این فناوری تا حد زیادی در نتیجه تلاش‌های فردریک سانگر که دومین جایزه نوبل شیمی از دو جایزه نوبل خود را به دلیل انجام فعالیت در توسعه فناوری توالی‌یابی DNA دریافت کرده بود، توسعه پیدا کرد. روش پایان زنجیره‌ای توالی‌یابی DNA^۱ که به نام توالی‌یابی سانگر^۲ نیز شناخته می‌شود، روشی است که شما برای تجزیه و تحلیل توالی DNA یک سلول ترادیدی شده مثبت استفاده خواهید کرد. سایر پلتفرم‌های توالی‌یابی DNA، برای کاربردهای با بازدهی بالا^۳ همانند

1. Chain-termination. method. of. DNA. sequencing

2. Sanger. sequencing

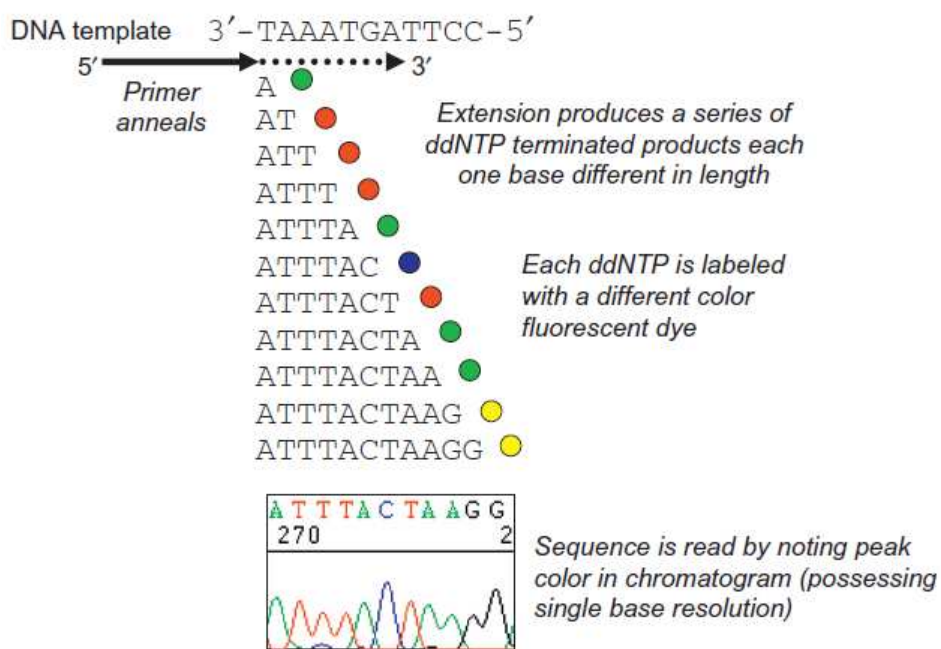
3. High-throughput

توالی‌یابی کل ژنوم^۱ استفاده می‌شوند. این پلتفرم‌ها می‌توانند تا صدها میلیون جفت باز را در روز توالی‌یابی کنند. بیشتر اشکال غربالگری با بازدهی بالا هنوز در هر اجرا، گران‌تر از روش سنتی پایان زنجیره‌ای هستند. برای تعیین توالی ژن الحاقی *egfp* خود، فقط باید حدود ۷۵۰ جفت باز را توالی‌یابی کنید، نه میلیون‌ها نوکلئوتید.

یک واکنش توالی‌یابی سانگر رایج شامل DNA الگو، DNA پلیمراز، یک آغازگر توالی‌یابی، تری فسفات‌های دئوکسی نوکلئوتید^۲ (dNTPs) و تری فسفات‌های دئوکسی نوکلئوتید^۳ (ddNTPs) است. گزینه‌های کلیدی در توالی‌یابی DNA با پایان زنجیره‌ای، ddNTP ها هستند. همان‌گونه که در شکل ۷-۲ نشان داده شده است، DNA که باید توالی‌یابی شود، به‌عنوان الگویی برای سنتز رشته‌های DNA مکمل عمل می‌کند.

آغازگر توالی‌یابی به رشته الگو متصل و DNA پلیمراز به هیبریدی از DNA الگو/آغازگر متصل می‌شود و با استفاده از نوکلئوتیدهای موجود در مخلوط واکنش، رشته‌های DNA جدیدی را سنتز می‌کند. dNTP ها جفت بازهای «عادی» (A، C، G و T) هستند و می‌توانند به‌صورت متوالی و از طریق پیوندهای فسفو دی استر به یکدیگر اضافه شوند. به‌صورت متضاد، ddNTP ها فاقد گروه هیدروکسیل ۳' هستند که برای تشکیل پیوند فسفو دی استر ضروری‌اند. به همین دلیل، اگر یک ddNTP در طول سنتز در رشته DNA گنجانده شود، فرآیند سنتز ادامه نخواهد یافت. به‌عبارت دیگر، ddNTP به‌عنوان یک پایان‌دهنده زنجیره‌ای عمل می‌کند. ddNTP ها در واکنش توالی‌یابی در مقادیر محدود وجود دارند؛ بنابراین، بیشتر مواقع یک dNTP اضافه می‌شود و سنتز ادامه می‌یابد و فقط گاهی اوقات یک ddNTP اضافه می‌شود. از آنجایی که افزوده شدن یک ddNTP به‌صورت تصادفی است، نتیجه یک واکنش توالی‌یابی، نسخه‌های جزئی از DNA الگویی هستند که اندازه آن‌ها متفاوت است. هر قطعه از انتهای ۵' توالی مربوط به توالی آغازگر شروع می‌شود و هنگام افزوده شدن ddNTP در توالی، پایان می‌یابد.

-
1. Whole-genome. sequencing
 2. Deoxynucleotide. triphosphates. (dNTPs)
 3. Dideoxynucleotide. triphosphates. (ddNTPs)



شکل ۷-۲: توالی‌یابی DNA با استفاده از ddNTP های فلورسنت، همچنین تحت عنوان توالی‌یابی Sanger شناخته می‌شود. ddNTP های نشان‌دار شده با فلورسنت به‌عنوان پایان دهنده‌های زنجیره‌ای در طول سنتز قطعات DNA مکمل عمل می‌کنند. این قطعات با استفاده از الکتروفورز موینه جدا می‌شود و نتایج به‌صورت کروماتوگرام به دست می‌آید (تجدید چاپ از Butler JM. مبانی نگارش DNA پزشکی قانونی، San Diego, CA: Elsevier، Academic Press; 2009. p. 65).

تعیین توالی DNA به خواندن طول این قطعات و دانستن اینکه کدام ddNTP در موقعیت ۳' قرار گرفته است، بستگی دارد. این عمل به‌طور معمول با استفاده از ddNTP های نشان‌دار شده با فلورسنت (هر ddNTP با رنگ متفاوتی برچسب‌گذاری شده است) به همراه الکتروفورز موینه^۱ و در دستگاه‌های توالی‌یابی خودکار DNA انجام می‌شود. هر واکنش توالی‌یابی، شامل مجموعه‌ای از قطعات DNA سنتز شده با طول‌های متفاوت است و هر قطعه به‌منظور بررسی قرار گرفتن ddNTP معین در انتهای ۳' رشته، در معرض نور فلورسانس قرار می‌گیرد. در توالی‌یابی خودکار DNA، این قطعات با استفاده از الکتروفورز ژل موینه و بر اساس اندازه جدا می‌شوند (کوچک‌ترین قطعات در ماتریس سریع‌تر حرکت می‌کنند). همان‌طور که قطعات از ستون موینه خارج می‌شود، یک لیزر نمونه‌ها را تحریک می‌کند و یک کامپیوتر فلورسانس ساطع شده از نمونه را ثبت می‌کند.

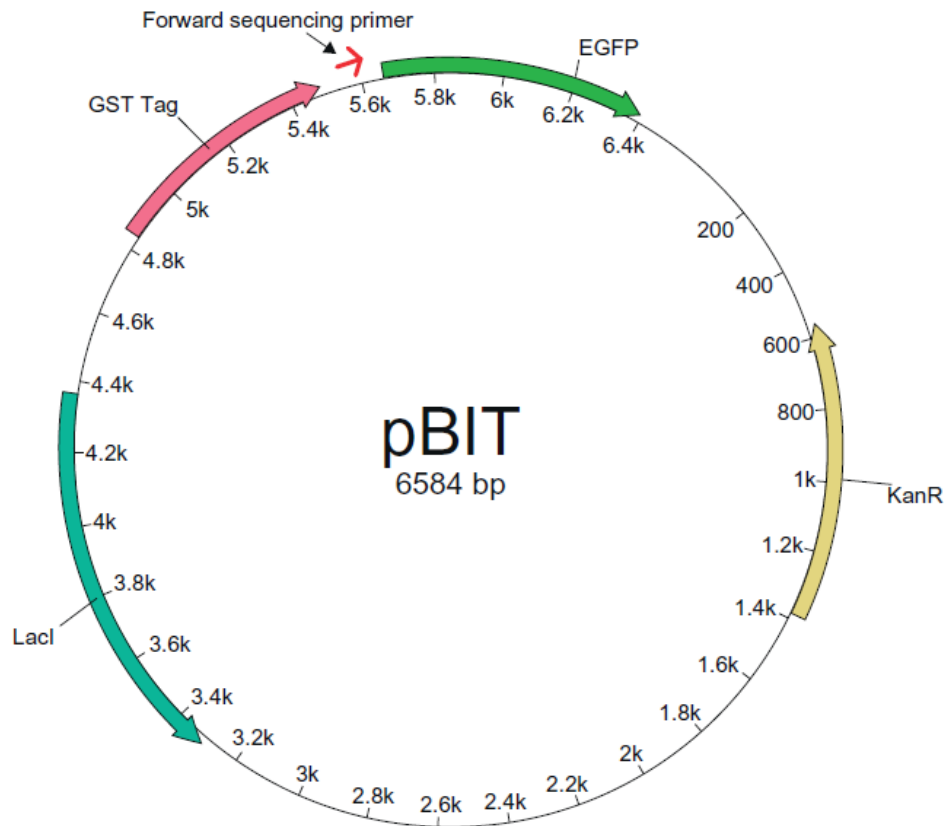
1. Capillary. electrophoresis

داده‌های به دست آمده که کروماتوگرام^۱ یا الکتروفوروگرام^۲ نامیده می‌شوند، مجموعه‌ای از پیک‌ها را نشان می‌دهد که توالی DNA رشته سنتز شده را منعکس می‌کنند. برای درک بیشتر توالی‌یابی DNA با استفاده از پایان زنجیره‌ای می‌توانید به وبگاه www.dnalc.org/resources/animations/cycseq.html مراجعه کنید.

در این جلسه آزمایشگاهی، شما واکنش‌های توالی‌یابی را برای ارسال به یک مرکز توالی‌یابی DNA سرهم^۳ می‌کنید. هنگام انجام توالی‌یابی DNA، انتخاب آغازگرهای توالی‌یابی، یکی از حیاتی‌ترین جنبه‌های آزمایش است. به طور معمول، یک اجرای توالی‌یابی موفق ۸۰۰-۱۰۰۰ نوکلئوتید از توالی را به دست می‌دهد. از آنجایی که طول توالی ژن *egfp* ۷۲۰ نوکلئوتید است، باید بتوانیم کل ژن را با استفاده از آغازگری که درست در بالادست ابتدای توالی *egfp* متصل می‌شود، توالی‌یابی کنیم (شکل ۷-۳). شایان ذکر است که توالی قابل تفسیر از ۳۰-۱۵ نوکلئوتید پایین‌دست آغازگر شروع می‌شود؛ بنابراین هرگز آغازگرهای توالی‌یابی را در همان ابتدای منطقه‌ای که قصد توالی‌یابی آن را دارید، طراحی نکنید. درحالی‌که می‌توان کل توالی *egfp* را با استفاده از یک آغازگر توالی‌یابی کرد، موارد زیادی وجود دارد که استفاده از آغازگرهای اضافی را ضروری می‌کند. اگر طول یک توالی ژن الحاقی بیش از ۱۰۰۰ نوکلئوتید باشد، برای پوشش کل توالی به آغازگرهای متعددی نیاز خواهید داشت. این آغازگرها را می‌توان برای هر یک از رشته‌های الگو طراحی کرد. گاهی اوقات، محققان از آغازگرهای موازی و در جهت معکوس^۴ در کنار یک ژن استفاده کرده و DNA را در هر دو جهت توالی‌یابی می‌کنند. همچنین، اگر در نتایج توالی‌یابی شما عدم قطعیت یا اختلاف وجود داشت، انجام یک واکنش توالی‌یابی اضافی با استفاده از یک آغازگر متفاوت (آغازگری که به ناحیه دیگری از DNA متصل می‌شود) می‌تواند نتیجه صحیح را نشان دهد. در نهایت، اگر در حال تعیین توالی DNA با یک توالی ناشناخته هستید (در این تمرین یک توالی شناخته شده را تأیید نمی‌کنید)، همیشه از آغازگرهای متعدد استفاده کنید. این امر منجر به هم‌پوشانی نتایج توالی‌یابی برای تعیین دقیق‌ترین توالی DNA می‌شود.

-
1. Chromatogram
 2. Electropherogram
 3. Assemble
 4. Antiparallel. primers

هفته آینده، نتایج حاصل از واکنش توالی‌یابی خود را برای تعیین توالی ژن *egfp* در کلون خود، تجزیه و تحلیل خواهید کرد.



شکل ۷-۳: طرح شماتیک مکان آغازگرهای توالی‌یابی در pBIT.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

قابل توجه مربیان: شیوه‌نامه‌های زیر برای تهیه نمونه‌های توالی‌یابی برای ارسال به مرکز توالی‌یابی GENEWIZ است. بسیاری از امکانات توالی‌یابی مختلف در سراسر جهان وجود دارد که در اختیار بسیاری از مؤسسات دانشگاهی است و هرکدام از آن‌ها امکانات خاص خود را دارند. اگر از روش دیگری استفاده می‌کنید، شیوه‌نامه‌های آماده‌سازی نمونه‌های مربوط به آن‌ها را دنبال کنید.

- ۱- یک ویال PCR با دیواره نازک تهیه و در آن واکنش توالی‌یابی خود را تنظیم کنید. مربی شما جزئیاتی در مورد نحوه برچسب زدن ویال در اختیار شما قرار می‌دهد.
- ۲- بر اساس نتایج قبلی خود، کلنی مورد نظر خود را برای توالی‌یابی انتخاب کنید.
- ۳- با استفاده از DNA Miniprep هضم نشده خود (خالص‌سازی شده در کلاس آزمایشگاه: جلسه ششم-ب)، غلظت نمونه DNA خود را همان‌طور که پیشتر توضیح داده شد، تعیین کنید.
- ۴- واکنش توالی‌یابی باید حاوی ۸۰۰ ng از DNA پلازمید شما و ۲۵ pmol (پیکومول) آغازگر توالی‌یابی باشد (توجه: اگر غلظت DNA شما برای به دست آوردن ۸۰۰ نانوگرم خیلی کم است، سعی کنید کلون دیگری را انتخاب کنید. اگر همه کلون‌های شما غلظت پایینی دارند، کلونی «پ» با بالاترین غلظت را انتخاب کنید). یک جدول را همانند جدول ۲-۷ در دفترچه یادداشت خود ایجاد کنید تا شما را در تنظیم واکنش توالی‌یابی راهنمایی کند. در صورت نیاز به توالی‌یابی کردن چندین کلون مختلف، باید برای هر واکنش توالی‌یابی یک ویال واکنشی متفاوت تنظیم کنید.
- به یاد داشته باشید، برای یک واکنش توالی‌یابی، فقط یک آغازگر اضافه کنید. (شما واکنش PCR را انجام نمی‌دهید و یک الگوی دو رشته‌ای را تکثیر نمی‌کنید؛ شما در حال کپی کردن بخشی از یک رشته هستید).

جدول ۲-۷: تنظیم واکنش‌های توالی‌یابی

حجم افزایشی	غلظت / مقدار نهایی	غلظت استوک	
	۸۰۰ ng		DNA الگو (کلون)
	۸۰۰ pmol		آغازگر توالی‌یابی pBIT
			dH ₂ O (برای حجم نهایی ۱۵ μL)

- ۵- به انتهای ویال ضربه بزنید تا از مخلوط شدن معرف‌ها و قرار گرفتن آن‌ها در کف ویال اطمینان حاصل کنید.
- ۶- ویال خود را به مربی بدهید تا آن را به GENEWIZ و یا یک مرکز توالی‌یابی دیگر ارسال کند.

۳- داده‌های غربالگری گردآوری شده

اکنون که چندین تکنیک مختلف برای غربالگری سلول‌های ترادیدی شده انجام داده‌اید، مقایسه قابلیت اطمینان هر روش می‌تواند مفید واقع شود. نموداری مشابه آنچه در زیر ارائه شده است را در دفترچه یادداشت آزمایشگاه خود ایجاد کنید. فضاهای ترادیدی شده‌هایی که در سنجش‌های خاص آزمایش نشده‌اند را خالی بگذارید. به خاطر داشته باشید که تست فلورسانس قابل اطمینان‌ترین روش سنجش است؛ بنابراین از آن به عنوان مرجع خود برای تعیین اینکه کدام سنجش بیشترین نتایج قابل اعتماد را نشان می‌دهد، استفاده کنید.

سنجش فلورسانس	هضم محدود کننده	غربال PCR	عدد ترادیدی شده

منابع

1. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. PNAS 1977;74(12):5463_7.
2. Butler JM. Fundamentals of forensic DNA typing. San Diego, CA: Elsevier Academic Press; 2009.
3. DNA Learning Center. Biology Animation Library: Cycle Sequencing, Cold Spring Harbor Laboratory.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- اگر طول ژن *egfp* نزدیک به ۷۰۰ bp جفت باز باشد، چرا طول فرآورده PCR از کلون‌های مثبت در کلاس آزمایشگاه جلسه ششم-پ را نزدیک به ۱۲۰۰ bp پیش‌بینی می‌کنیم؟
- ۲- آیا ممکن است یک کلون چندین نسخه از *egfp* را داشته باشد؟ آیا می‌توان دو نسخه را الحاق کرد؟ آیا می‌توان سه نسخه را الحاق کرد؟ اگر چنین است، نتیجه غربالگری PCR چه خواهد بود؟
- ۳- اگر بتوان چندین نسخه از ژن *egfp* را الحاق کرد، آیا در مقایسه با یک کلون حاوی یک نسخه از ژن *egfp*، فلورسانس بیشتر، کمتر یا یکسان خواهد بود؟
- ۴- اگر برش DNA شما در طول تجزیه و تحلیل هضم محدود کننده ترادیدی کامل نشده باشد، انتظار دارید ژل شما چگونه باشد؟ آیا هنوز هم می‌توانید کلون‌های مثبت را از منفی تشخیص دهید؟
- ۵- هنگام انجام توالی‌یابی DNA، در هر واکنش فقط از یک آغازگر استفاده می‌کنید. چه اتفاقی رخ خواهد داد که اگر شما به‌اشتباه یک آغازگر رفت و برگشت را به یک واکنش توالی‌یابی اضافه کنید؟ داده‌های شما چگونه تحت تأثیر قرار خواهند گرفت؟

کلاس آزمایشگاه: جلسه هشتم

تجزیه و تحلیل توالی DNA حاصل شده از یک کلون مثبت، بخش دوم

هدف: شما داده‌های به دست آمده از واکنش‌های توالی‌یابی را تجزیه و تحلیل خواهید کرد تا مطمئن شوید که کلون شما دارای توالی *egfp* مورد نظر شما است.

۱- مقدمه

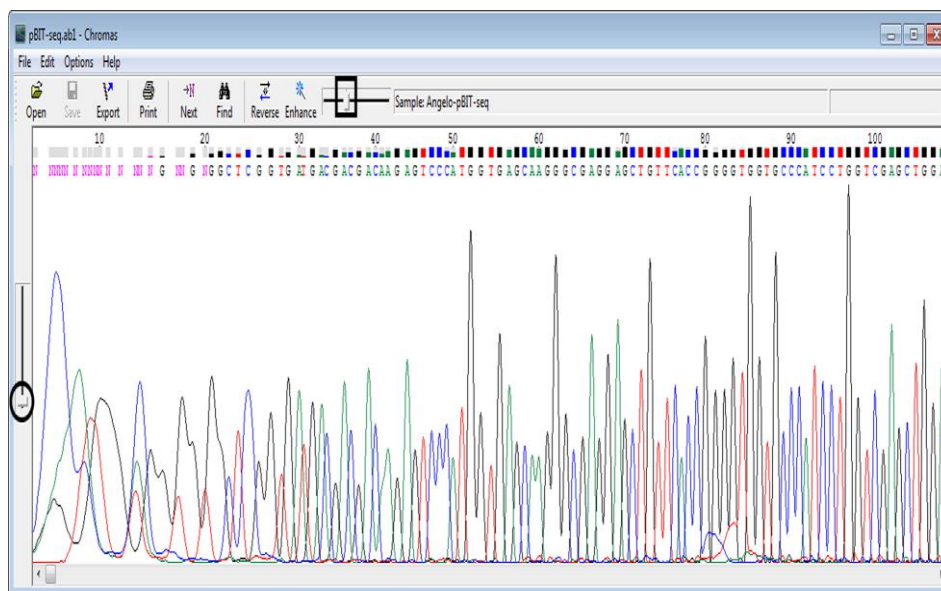
توالی‌یابی خودکار DNA ابزاری است که بیشتر برای تعیین توالی DNA در یک نمونه معین استفاده می‌شود. در حالی که توالی‌یابی DNA از ابتدای پیدایش خود، به یک فرآیند خودکار تبدیل شده است. داده‌های به دست آمده از رایانه هنوز به اعتبارسنجی انسانی نیاز دارند. در واقع، بیشتر تجزیه و تحلیل‌های کامپیوتری اطلاعات خام و مبهمی را در اختیار قرار می‌دهند و شما را به تفسیر داده‌ها و تصمیم‌گیری در مورد توالی واقعی DNA هدایت می‌کنند.

تعدادی از انواع پلتفرم‌های توالی‌یابی DNA در حال حاضر در اختیار مراکز پژوهشی و محققین قرار گرفته است. نوع توالی‌یابی مورد استفاده بستگی به آزمایش مورد نظر دارد. توالی‌یابی سانگر استفاده شده در این آزمایش، روشی استاندارد برای ارزیابی توالی‌های کوتاه، مانند کلون کردن با پلازمیدهای DNA است. روش‌های جدیدتر توالی‌یابی که بیشتر وقت‌ها به عنوان توالی‌یابی با بازدهی بالا شناخته می‌شوند، برای توالی‌یابی توالی‌های بزرگ‌تر، همانند کل ژنوم‌ها و ترانسکریپتوم‌ها^۱ استفاده می‌شوند.

در تعیین توالی پایان زنجیره (Sanger sequencing) با استفاده از تری فسفات‌های دی اکسی نوکلئوتید فلورسنت (ddNTPs)، داده‌ها به صورت کروماتوگرام فلورسنت به دست می‌آیند. هر پیک (قله) نشان دهنده یک قطعه DNA سنتز شده با رنگی است که در ddNTP به عنوان پایان دهنده زنجیره گنجانده شده است. به این ترتیب، پیک‌های کروماتوگرام به طور متوالی (از کوچک‌ترین به بزرگ‌ترین و نقطه شروع آن در نزدیک‌ترین فاصله به آغازگر توالی‌یابی قرار دارد) برای تعیین توالی مولکول DNA شما خوانده می‌شوند.

1. Transcriptome

کروماتوگرام‌ها به‌طور معمول به‌صورت فایل‌های abi ذخیره می‌شوند. با استفاده از برنامه‌های زیادی می‌توان این فایل‌ها را مشاهده کرد. دستور کار این جلسه آزمایشگاهی مخصوص Chromas است که به‌عنوان نرم‌افزار رایگان از طریق Technelysium Pty Ltd^۱ در دسترس قرار دارد، اما کاربرد عمومی بیشتر برنامه‌ها مشابه است و عملکردهای مشابهی را در اختیار قرار می‌دهند. پس از باز کردن کروماتوگرام خود، طرحی مشابه آنچه در شکل ۸-۱ نشان داده شده را مشاهده خواهید کرد که کروماتوگرام توالی pBIT (pET-41a) با ژن *egfp* است.

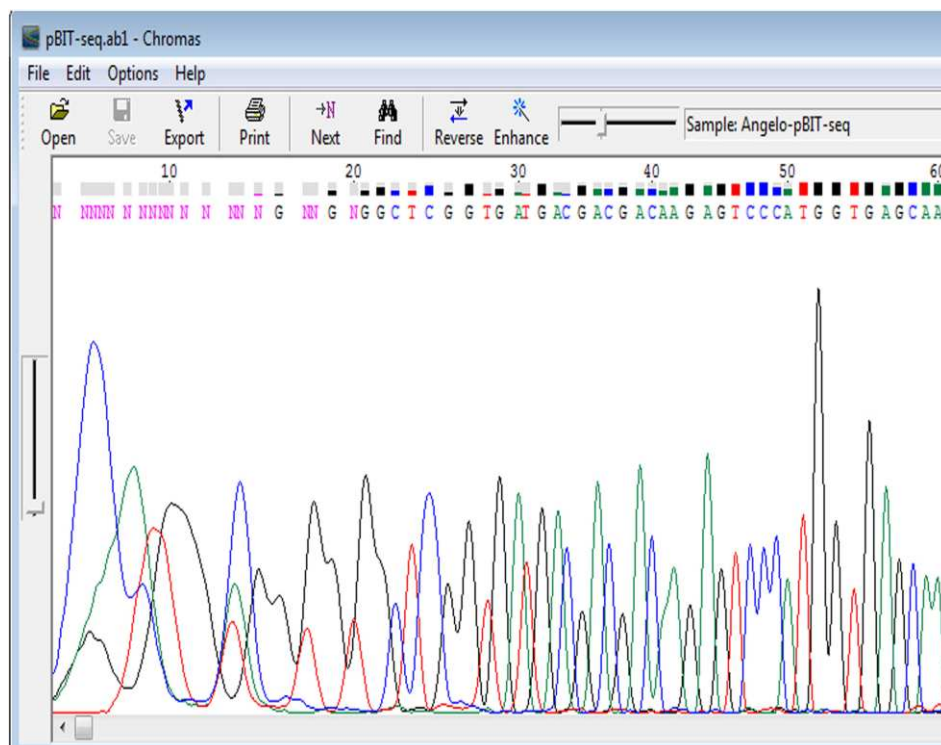


شکل ۸-۱: تصویر نمونه از ۱۱۰ نوکلئوتید اولیه در یک کروماتوگرام. کادر مربعی برای تنظیم وضوح افقی و دایره‌ای برای تنظیم وضوح عمودی است.

در بررسی کروماتوگرام خود، چندین نکته وجود دارد که باید آن‌ها در نظر بگیرید. در ابتدا، در نظر داشته باشید که توالی قابل تفسیر از ۳۰-۱۵ نوکلئوتید پس از بخش پایین‌دست انتهای آغازگر توالی‌یابی، آغاز می‌شود. همان‌طور که در شکل ۸-۲ نشان داده شده است، نزدیک به ۲۵ پیک اولیه گرد است و در مقایسه با پیک‌های بعدی به‌خوبی قابل تمایز نیستند. باوجود این واقعیت که قطعات DNA بلافاصله پس از نوکلئوتید شماره ۳۰ قرار گرفته و فرآیند خوانش از انتهای آغازگر توالی‌یابی شروع می‌شود، شما در این مثال می‌توانید ببینید که چرا آغازگر توالی‌یابی باید در بالادست توالی

1. <http://technelysium.com.au/wp/chromas/>

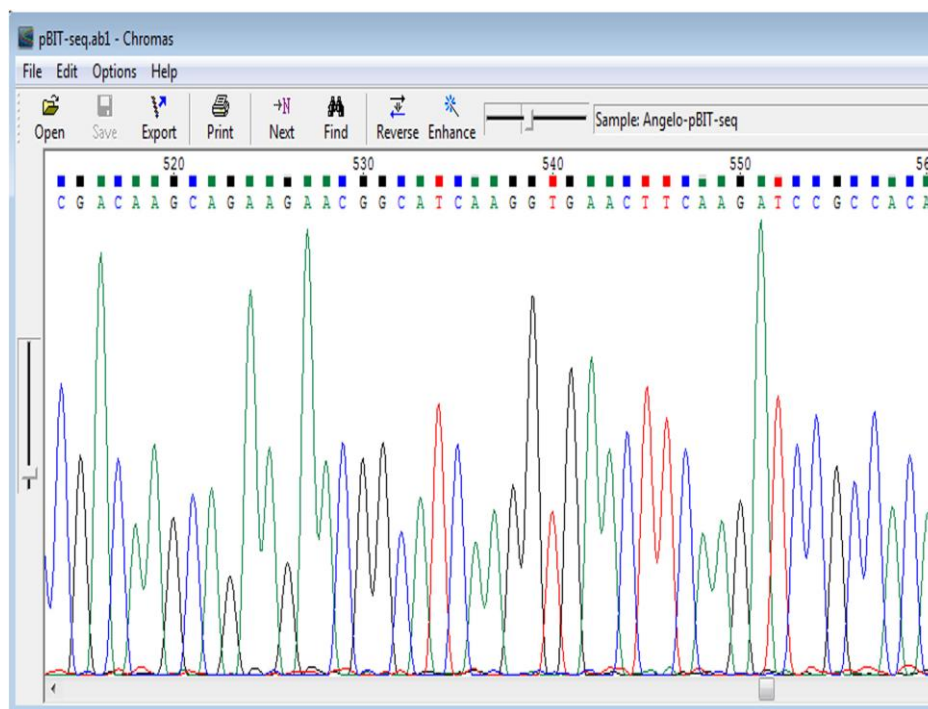
مورد نظر شما برای توالی‌یابی، قرار بگیرد. آغازگر استفاده شده در این آزمایش به‌صورتی طراحی شده است که در فاصله ۶۰ نوکلئوتید از بالادست محل وصل شدن بین ژن الحاقی *egfp* و وکتور pET-41a به رشته متصل شود. شما از نوکلئوتید شماره ۳۰ می‌توانید مشاهده کنید که قله‌ها به‌خوبی قابل‌تمایز شده‌اند و از هم فاصله دارند؛ همچنین اختلال نسبت کمی در بخش پایینی نمودار قابل مشاهده است.



شکل ۸-۲: داده‌های توالی‌یابی pBIT در ابتدای کروماتوگرام. به قله‌های پهن و گرد در ابتدا توجه کنید که به قله‌های تیز و با فاصله یکنواخت تبدیل می‌شوند.

شکل ۸-۳ نشان‌دهنده وضعیت کروماتوگرام در وسط خوانش توالی‌یابی است. شما در این قسمت از بررسی پیک‌ها می‌توانید مشاهده کنید که آن‌ها به‌خوبی قابل‌تمایزاند و اختلال (نویز) کمی وجود دارد. ارتفاع پیک در این منطقه بیشتر وقت‌ها بسیار بیشتر از پیک‌های ابتدایی است. مهم‌تر از همه، این توالی بسیار «واضح» است. به‌عبارت‌دیگر، با توجه به توالی قابل مشاهده، می‌توان دریافت که بدون ابهام است. با نگاهی به نوک پیک‌ها در کروماتوگرام دریافت خواهید کرد که

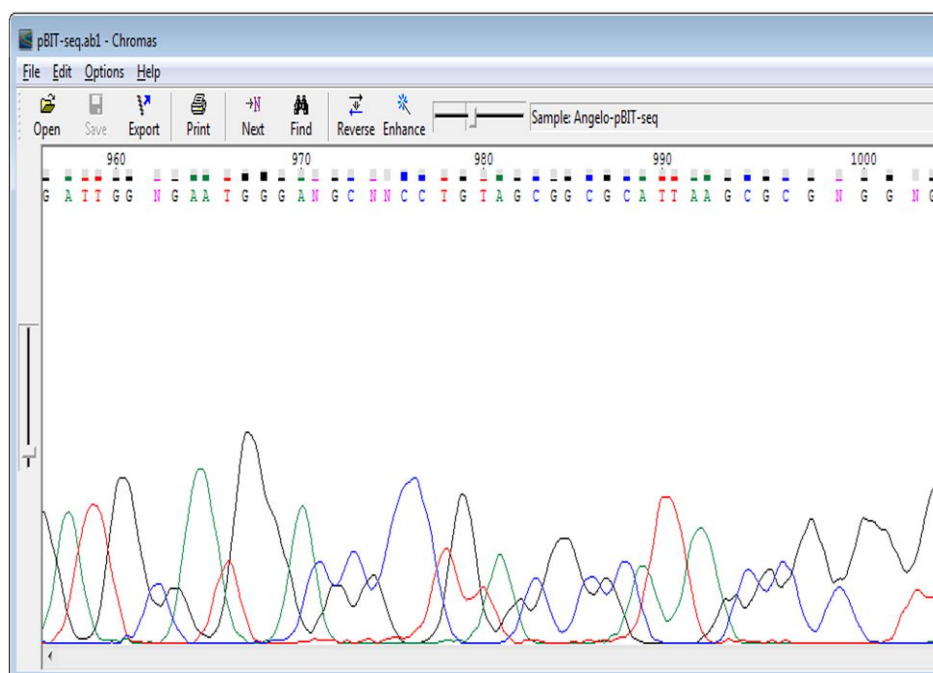
نرم‌افزار کروماتوگرام را می‌خواند و یک نوکلئوتید را به پیک‌های مربوطه اختصاص می‌دهد. در ناحیه نشان داده شده، وضوح بین پیک‌ها به رایانه این اجازه را می‌دهد تا این عمل را با دقت بالا انجام دهد. با نگاهی به شکل ۸-۲ متوجه خواهید شد که ابتدای خوانش توالی، تعدادی باز با عنوان «N» وجود دارد. معنی این عنوان به این صورت است که نرم‌افزار به‌صورت مطمئن قادر به اختصاص یک باز به یک پیک معین نخواهد بود. در قسمت میانی توالی (شکل ۸-۳)، N یا نادر است و یا هرگز وجود نخواهد داشت.



شکل ۸-۳: داده‌های توالی‌یابی pBIT در میانه کروماتوگرام. به پیک‌های تیز و یکنواخت در سرتاسر و فقدان N در توالی ایجادشده توسط نرم‌افزار در بالای داده‌های کروماتوگرام توجه کنید.

هر واکنش توالی‌یابی بسته به کیفیت DNA و سایر عوامل، طول متفاوتی را به همراه خواهد داشت. به‌صورت کلی، یک خوانش توالی‌یابی پیش از آغاز سیگنال اختلال، محدوده ۸۰۰-۱۰۰۰ از نوکلئوتیدهای توالی بدون ابهام (واضح) را در برمی‌گیرد. در نهایت، پیک‌ها پهن و گردتر می‌شود و با فاصله کمتری از هم قرار می‌گیرند که این امر تخصیص باز مناسب را دشوار می‌کند. همان‌طور که در شکل ۸-۴ نشان داده شده است، ارتفاع پیک کاهش می‌یابد و تعداد اندکی N در خوانش

توالی‌یابی قابل مشاهده است. اگر بتوانید با بررسی تصویری کروماتوگرام و با اطمینان بازها را به پیک‌ها اختصاص دهید، این توالی همچنان قابل استفاده خواهد بود؛ اما به‌طور کلی، اگر بازهای مبهمی همانند این مورد وجود داشته باشد، تعیین توالی با آغازگر متفاوتی که این نوکلئوتیدها را در میانه اجرای توالی‌یابی قرار می‌دهد، ترجیح داده می‌شود.

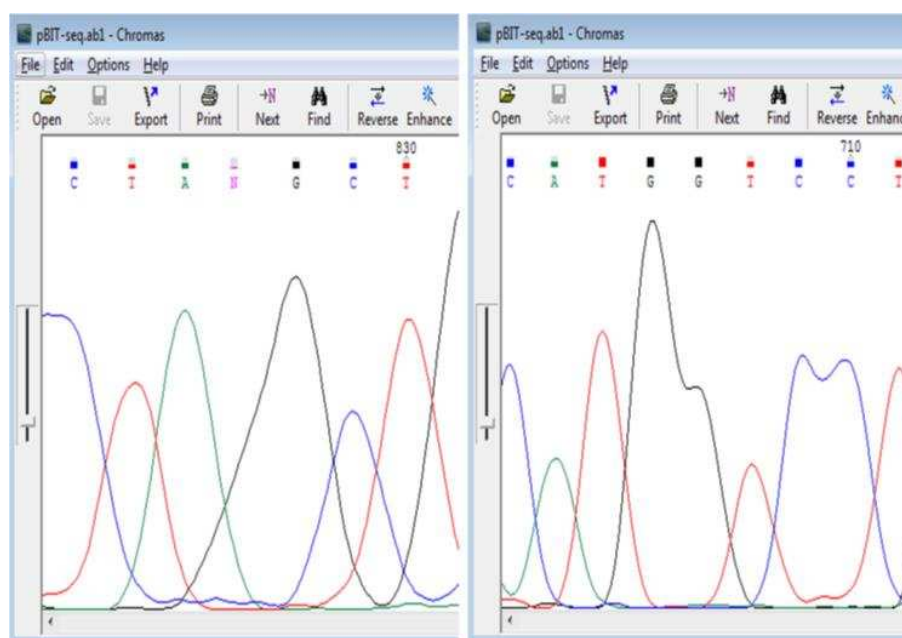


شکل ۸-۴: داده‌های توالی‌یابی pBIT در انتهای کروماتوگرام. مشابه ابتدای کروماتوگرام، پیک‌های پهن و گرد شروع به نمایان شدن می‌کند که منجر به بروز ابهاماتی در تفسیر توالی می‌شود که با N در بازهای توالی نشان داده می‌شوند.

در این مورد، شما در حال تعیین توالی ژن *egfp* کلون شده در pET-41a هستید تا مطمئن شوید در طول کلون کردن در PCR، هیچ جهشی در *egfp* ایجاد نشده است؛ بنابراین، درحالی‌که برخی از توالی‌های حاصل‌شده حالت مبهم دارد تا زمانی که توانایی تأیید توالی *egfp* را داشته باشید، می‌توانید به پرسش خود پاسخ دهید. از آنجایی که می‌دانید *egfp* در مکان NcoI (CCATGG) و در انتهای ۵' کلون شده است، می‌توانید توالی را اسکن کنید و به دنبال این مکان بگردید. با نگاهی به شکل ۸-۲ می‌توان مشاهده کرد که در نوکلئوتیدهای ۴۸-۵۳ خوانش‌های توالی CCATTG، مکان NcoI و ابتدای توالی ژن الحاقی *egfp* قابل مشاهده است. با دانستن این امر که ژن *egfp* تعداد ۷۲۰ نوکلئوتید دارد، می‌توان دریافت که توالی‌یابی باید در محدوده

۷۶۹-۵۰ نوکلئوتید قرار داشته باشد. در شکل ۸-۴ می‌توان دید که در سیگنال به دست آمده، (به‌طور تقریبی) تا نوکلئوتید شماره ۹۷۰ (nt)، هیچ‌گونه اختلالی دیده نمی‌شود؛ بنابراین، ما باید یک خوانش کافی برای دیدن توالی خود داشته باشیم.

با بررسی توالی مورد نظر (در این بررسی، نوکلئوتیدهای ۷۶۹-۵۰)، می‌خواهید ببینید آیا N اختصاص داده شده توسط نرم‌افزار وجود دارد یا خیر؟ می‌توانید توالی را به‌صورت دستی اسکن کنید و از میانبر «Next N» که در شکل ۸-۵ و در قسمت سمت چپ نشان داده شده است، استفاده کنید. اگر N وجود داشته باشد، می‌توانید بهترین قضاوت خود را برای تعیین این بازها به کار ببرید. در شکل ۸-۵ (سمت چپ) یک N خارج از محدوده قابل مشاهده است. ما این N را در باز شماره ۸۲۷ و در حد فاصل (یک شکاف) بین باز A در ۸۲۶ nt و باز G در ۸۲۸ nt مشاهده کردیم. با این حال، به نظر می‌رسد که این N نشان‌دهنده دو باز G متوالی باشد. این حالت دوتایی را می‌توانید با حالت‌های دوتایی در سایر کروماتوگرام‌ها همانند مثال ارائه شده در سمت راست تصویر ۸-۵ (بازهای ۷۰۶-۷۰۷ و ۷۱۰-۷۰۹)، مقایسه کنید.



شکل ۸-۵: کروماتوگرام pBIT بزرگنمایی شده. در تصویر سمت چپ، یک N به دلیل وجود یک شکاف در موقعیت باز ۸۲۷ شناسایی شده است. در سمت راست، نمونه‌های از جفت بازهای متوالی (نه شکاف) در موقعیت‌های ۷۰۶-۷۰۷ و ۷۱۰-۷۰۹ نشان داده شده است.

در صورت تعیین توالی DNA یک نمونه مکمل ناشناخته، شما می‌توانید به داده‌های یک آغازگر دیگر یا خوانش توالی یک توالی هم‌پوشان برای اطمینان از مشخص شدن باز اختصاصی در نوکلئوتید ۸۲۹ اطمینان حاصل کنید. در این مورد، ما از یک گمان علمی و استفاده از توالی *egfp* شناخته شده، اقدام به این بررسی می‌کنیم. اگر توالی شناخته شده *egfp* در ناحیه مربوط به نوکلئوتیدهای ۸۲۹-۸۲۴ در کروماتوگرام CTAGGC باشد، می‌توانیم با احتمال بالا در اختصاص موقعیت ۸۲۹ به عنوان G مطمئن باشیم. به‌طور مشابه، اگر توالی *egfp* در آن ناحیه CTAGC بود، می‌توانیم به‌طور منطقی فرض کنیم که باوجود یک شکاف بصری، توالی فقط حاوی یک باز G است. یکی از تفاوت‌های اصلی بین تأیید یک توالی شناخته شده و تعیین یک توالی DNA ناشناخته این است که در طول فرآیند تأیید، می‌توان از این نوع حدس‌های منطقی استفاده کرد؛ زیرا الحاق و حذف تصادفی ژن‌ها امری نادر است.

نوکلئوتیدهای مبهم^۱ می‌توانند به دلایل مختلفی در کروماتوگرام ظاهر شوند. علاوه بر کاهش رایج کیفیت توالی در ابتدا و انتهای واکنش توالی‌یابی، عوامل دیگری نیز می‌توانند منجر به تولید کروماتوگرام‌هایی با تفسیر دشوار شوند. اگر N در کل توالی شما وجود داشته باشد، دلیل بروز این امر چه‌بسا در نتیجه وجود شرایط نامناسب در توالی‌یابی شما خواهد بود. کیفیت پایین یا کمیت ناکافی DNA، یا وجود آغازگر توالی‌یابی با کیفیت پایین (*Tm* پایین یا عدم تطابق با رشته الگو) رایج‌ترین دلیل برای یک توالی‌یابی بی‌کیفیت است. حتی در خوانش‌هایی با شرایط واکنشی مناسب از لحاظ توالی‌یابی، گاهی اوقات ابهاماتی ایجاد می‌شود. یکی از رایج‌ترین دلایل ابهامات، بسط یک نوکلئوتید متوالی است. این امر بیشتر وقت‌ها می‌تواند هم در استنتاج تعداد صحیح بازها در آن بسط و هم در پیچیده کردن توالی بلافاصله پس از ناحیه هموپلیمری^۲ (یک ناحیه poly-A از یک cDNA یوکاریوتی)، سبب ایجاد مشکل شود. در صورتی که این نوع توالی در یک نمونه معین مورد انتظار باشد، برخی «ترفندهای» توالی‌یابی در یک مرکز توالی‌یابی وجود دارد که از آن‌ها می‌توان برای به دست آوردن خوانش‌های توالی‌یابی با کیفیت بالاتر استفاده کرد.

مقایسه داده‌های توالی‌یابی شما با توالی *egfp* شناخته شده، می‌تواند به روش‌های مختلفی انجام شود. از جمله ابزارهای هم‌ترازی توالی موجود در اینترنت می‌توان به ClustalW و بسیاری دیگر از ابزارها اشاره کرد. یکی دیگر از روش‌های ساده برای مقایسه داده‌های توالی خود با توالی‌های شناخته شده، استفاده از ابزار جست‌وجو هم‌ترازی موضعی^۳ (BLAST) است که در مرکز ملی

1. Ambiguous. nucleotides

2. Homopolymeric

3. Basic. Local. Alignment. Search. Tool. (BLAST)

اطلاعات زیست‌فناوری^۱ (NCBI) در دسترس است. BLAST^۲ ابزاری است که بیشتر وقت‌ها برای محاسبه شباهت بین توالی‌ها استفاده می‌شود. کاربردهای BLAST شامل مطالعه تفاوت‌های تکاملی بین ژن‌ها یا پروتئین‌ها در ارگانیسم‌های مختلف، پیش‌بینی عملکرد ژن‌های جدید بر اساس همسانی^۳ با ژن‌های دارای عملکرد شناخته‌شده و شناسایی موتیف‌ها یا حوزه‌های خاص در یک توالی است. شیوه‌نامه‌های مقایسه داده‌های توالی خود با توالی کنترل مثبت (pBIT) با استفاده از BLAST به صورت کامل در زیر آمده است.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

۱- نرم‌افزار Chromas را باز کنید، روی گزینه Open کلیک و فایل حاوی توالی خود را برای باز کردن آن پیدا کنید.

۲- کروماتوگرام خود را به صورت چشمی اسکن کنید تا طول توالی خود را که حاوی داده‌های با کیفیت بالا و بدون (فقط چند) N است را تعیین کنید.

۳- به عنوان مثال، با استفاده از داده‌های نشان داده شده در شکل ۸-۲ و ۸-۴، می‌توان گفت که توالی با کیفیت از نوکلئوتید ۲۱ آغاز می‌شود و (به طور تقریبی) در نوکلئوتید ۹۶۰ به پایان می‌رسد. طول دقیق این ناحیه مهم نیست، اما در صورت امکان باید کل توالی *egfp* را شامل شود. در این آزمایش، ناحیه مورد نظر به طور معمول بین ۵۰-۸۰۰ نوکلئوتید طول خواهد داشت. ناحیه دقیق حاوی توالی *egfp* را می‌توان با جستجوی جایگاه‌های محدود شونده NcoI (CCATGG) و NotI (GCGGCCGC) پیدا کرد.

۴- با کلیک روی File و انتخاب جستجوی BLAST، جستجوی BLAST را در توالی خود در Chromas انجام دهید. هیچ کدام از پارامترها به استثنای قسمت ناحیه^۴ نیازی به تغییر ندارند. برای Region باید از ناحیه توالی‌ای که در مرحله قبل تعیین کردید، استفاده کنید. روی OK کلیک کرده و سپس یک پنجره BLAST باید در مرورگر وب شما باز شود. روی دکمه مشاهده گزارش کلیک کنید. همچنین می‌توانید توالی را از حالت نمایشگر توالی به حالت متنی تبدیل کنید و داده‌های توالی را از حالت جست‌وجو BLAST کپی و در حالت متنی جای گذاری کنید.

1. National. Center. for. Biotechnology. Information. (NCBI)

2. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

3. Homology

4. Region

۵- در بالای صفحه نتایج BLAST، اطلاعات مرتبط با جستجوی شما (طول کوثری^۱، جستجو در پایگاه داده و غیره) وجود دارد. کمی پایین‌تر، یک خلاصه گرافیکی وجود دارد و در زیر آن یک برگه با عنوان «توضیحات» ظاهر می‌شود. بهترین گزینه در زیر توضیحات باید pBIT (شماره دسترسی JF275063.1) باشد. مقدار E (مقدار مورد انتظار) معیاری برای معنی‌دار بودن تطبیق است. هر چه این عدد به صفر نزدیک‌تر باشد، تطابق بیشتر معنی‌دار می‌شود. برای مشاهده هم‌ترازی واقعی توالی بین توالی ورودی خود و توالی pBIT شناخته شده، روی نام ساختار در زیر توضیحات کلیک کنید. این امر باید توالی شما با توالی pBIT را تراز کند (شکل ۸-۶). شما می‌خواهید تأیید کنید که ژن الحاقی *egfp* که در وکتور pET-41a و بین NcoI و NotI کلون شده است، توالی درستی دارد. در pBIT، محل NcoI از شروع نوکلئوتید ۵۶۷۴ شروع می‌شود و محل NotI در نوکلئوتید ۶۴۰۴ به پایان می‌رسد. این نواحی در شکل ۸-۶ کادر بندی شده است. در شکل ۸-۶ تطابق با یک خط در بین کوثری (پرس‌وجو) (ورودی شما) و موضوع (pBIT) نشان داده شده است. در این مثال، تطابق ۱۰۰ درصدی در ناحیه *egfp* ثبت می‌شود و نشان می‌دهد که ما در واقع یک شکل غیر جهش‌یافته از ژن الحاقی را کلون کرده‌ایم. اگر توالی مطابقت نداشته باشد، هیچ خطی بین این دو وجود نخواهد داشت. نمونه‌ای از این حالت در موقعیت کوثری ۲۶ قرار دارد. این موقعیت خارج از چارچوب خوانش *egfp* قرار دارد و بنابراین بر توانایی ما برای تأیید توالی *egfp* تأثیر نمی‌گذارد. با این حال، چارچوب خوانش بین ژن *gst* در وکتور pET-41a و *egfp* کلون شده را تغییر می‌دهد. درحالی‌که بسیار بعید است که در وکتور pET-41a یک جهش دیده شود. ما می‌توانیم با بررسی کروماتوگرام، داده‌های خود را تجزیه و تحلیل کنیم. با نگاهی به شکل ۸-۲ می‌توان دریافت که پیک C موجود در موقعیت ۲۵، گسترده‌تر از پیک‌های اطراف است که حاکی از وجود یک دایمر بالقوه است. یکی از راه‌های تأیید این موضوع، توالی‌بندی مجدد ساختار با استفاده از یک آغازگر متفاوت است؛ بنابراین این موقعیت در وسط خوانش قرار می‌گیرد. در این آزمایش، می‌توان تأیید کرد که توالی موجود در آن ناحیه در واقع CTCCGGT است، زیرا باکتری‌ها بر اثر القاء سبز می‌شوند. وجود یک جهش تغییر چارچوب (اگر یکی از C ها در pET-41a حذف

1. Query. length

شود)، چارچوب خوانش را تغییر می‌دهد و از ساخته شدن صحیح پروتئین ژن *egfp* در باکتری جلوگیری می‌کند.

Synthetic construct plasmid pBIT GST/EGFP fusion protein gene, complete cds

Sequence ID: [gi|326910732|JF275063.1](#) Length: 6584 Number of Matches: 1

Range 1: 5646 to 6576 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1570 bits(1740)	0.0	926/931(99%)	1/931(0%)	Plus/Plus
Query 21	GGCTC-GGTGATGACGACGACAAGAGTCCCATGGT	79		
Sbjct 5646	GGCTCCGGTGATGACGACGACAAGAGTCCCATGGT	5705		
Query 80	GGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTG	139		
Sbjct 5706	GGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTG	5765		
Query 140	TCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACC	199		
Sbjct 5766	TCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACC	5825		
Query 200	ACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGCAG	259		
Sbjct 5826	ACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGCAG	5885		
Query 260	TGCTTCAGCCGCTACCCCGACCATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCC	319		
Sbjct 5886	TGCTTCAGCCGCTACCCCGACCATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCC	5945		
Query 320	GAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGC	379		
Sbjct 5946	GAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGC	6005		
Query 380	GCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC	439		
Sbjct 6006	GCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC	6065		
Query 440	TTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAAC	499		
Sbjct 6066	TTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAAC	6125		
Query 500	GTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAGAAGACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCAC	559		
Sbjct 6126	GTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAGAAGACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCAC	6185		
Query 560	AACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGC	619		
Sbjct 6186	AACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGC	6245		
Query 620	GACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCAGCCAGTCCGCCCTGAGCAAA	679		
Sbjct 6246	GACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCAGCCAGTCCGCCCTGAGCAAA	6305		
Query 680	GACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATC	739		
Sbjct 6306	GACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATC	6365		
Query 740	ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCACTCGAGcaccaccaccacca	799		
Sbjct 6366	ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCACTCGAGcaccaccaccacca	6425		

شکل ۸-۶: هم‌ترازی توالی بین توالی ورودی و pBIT. توالی *egfp* ناحیه‌ای بین جعبه‌هایی است که مکان‌های NotI (GCGGCCGC) و NcoI (CCATGG) را نشان می‌دهند.

اگر N در توالی *egfp* شما وجود داشت، به کروماتوگرام بازگشته و داده‌ها را به‌منظور بررسی دقیق تطابق توالی تجزیه و تحلیل کنید. اگر چندین N در توالی وجود داشته باشد، در عمل چه‌بسا منطقه را دوباره (شاید با یک آغازگر توالی‌یابی متفاوت) توالی‌یابی کنید تا داده‌های بیشتری برای تخصیص دقیق بازهای مبهم به دست آورید.

در بیشتر موارد، داده‌های توالی‌یابی شما با pBIT مطابقت کامل دارند. با این حال، در موارد نادری که PCR یک جهش را در توالی ژن الحاقی *egfp* وارد می‌کند، ما را قادر می‌سازد تا جهش را شناسایی و مطابق با آن عمل کنیم. در صورتی که یک جهش خاموش رخ دهد (تغییر نوکلئوتید، توالی کد کننده پروتئین را تغییر نمی‌دهد)، آزمایش شما نباید تحت تأثیر قرار گیرد. از سوی دیگر، اگر جهش بی‌معنی باشد، می‌توانید به عقب بازگردید و یک کلون مثبت متفاوت را برای ادامه آزمایش خود انتخاب کنید.

اگر یک توالی خوانده شده، کیفیت پایین و/ یا طول کوتاهی داشته باشد، تطابق ۱۰۰ درصدی با pBIT را نخواهید داشت. در این حالت شما ممکن است هم‌ترازی جزئی را با آن توالی کنترل مثبت مشاهده کنید، اما نمی‌توانید نتیجه‌گیری کنید که آیا توالی ژن الحاقی به‌طور کامل صحیح است یا خیر.

در دفترچه یادداشت آزمایشگاهی خود، داده‌های خود را برای هر کلون توالی‌یابی شده از جمله مکان‌های نوکلئوتیدی غیر هم‌تراز، شکاف و/ یا جهش و سایت‌های NcoI و NotI را در صورت وجود ثبت کنید. اگر یک کلون، تراز مورد انتظار را ایجاد نکرد، به آن نیز توجه داشته باشید.

منابع

1. Madden T. The BLAST sequence analysis tool. In: McEntyre J, Ostell J, editors. The NCBI handbook. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information; 2003.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- چرا DNA مربوط به *egfp* کانون توجه اصلی در توالی‌یابی این تمرین آزمایشگاهی است؟ چرا ما هیچ جهشی را در خارج از توالی *egfp* پیش‌بینی نمی‌کنیم؟
- ۲- هنگام انجام جستجوی BLAST، در مورد سایر توالی‌هایی که به‌طور معنی‌داری شبیه به توالی شما هستند، متوجه چه چیزی می‌شوید؟

بخش سوم

بیان، تشخیص و خالص سازی پروتئین های نو ترکیب از باکتری

در این بخش از دوره، نحوه خالص‌سازی پروتئین دست‌کاری شده ژنتیکی از باکتری‌ها را فرا خواهید گرفت. همان‌طور که پیش‌تر بحث کردیم، بسیاری از داروها و آنزیم‌های صنعتی با استفاده از روش‌های نوترکیب تولید می‌شوند. بعلاوه، ما به‌عنوان یک محقق بیوشیمی و زیست‌شناس مولکولی، به رویدادهایی که بر زندگی یک سلول حاکم است علاقه‌مند هستیم. چرخه سلولی چگونه کنترل می‌شود؟ وقتی یک سلول در حال رشد شروع به تمایز می‌کند، چه اتفاقی‌هایی رخ می‌دهد؟ عوامل کنترل‌کننده رشد سلولی کدام‌اند؟ چرا و چگونه سلول‌ها می‌میرند؟ اگر موجود زنده یک پاتوژن باشد، چگونه می‌تواند میزبان را آلوده کند؟ پیش از اینکه بتوانیم به جزئیات به این پرسش‌ها پاسخ دهیم، باید در مورد مولکول‌های واقعی شرکت‌کننده در این فرآیندها، اطلاعات بیشتری داشته باشیم. یک راه‌حل کلاسیک بیوشیمیایی برای این مشکل، جدا کردن سلول و جداسازی هر یک از اجزای آن برای مطالعه است. برای پروتئین‌هایی با سطح بسیار بالا در سلول بیان شده، استفاده از این رویکرد امکان‌پذیر است. با این حال، برای خالص‌سازی پروتئین و یا پپتیدهای که در مقادیر بسیار اندک یافت شده، تلاش بسیار زیادی نیاز است. این امر یک محدودیت مهم است، زیرا فرآورده‌های ژنی بسیار فعال مانند آنزیم‌ها یا هورمون‌ها، به‌طور معمول در سطوح بسیار پایین در مواد بیولوژیکی وجود دارند.

با ظهور شیوه‌های DNA نوترکیب و افزایش اطلاعات در مورد توالی‌ها، کلون کردن ژن و بیان آن در باکتری‌ها بسیار آسان‌تر از خالص‌سازی پروتئین از موجود مورد نظر شد. شما اکنون کلون کردن ژن *egfp* در وکتور بیانی pET-41a را تکمیل کرده‌اید. همان‌طور که خواهید دید، پروتئین الحاقی GST::EGFP ممکن است تا ۲۰ درصد از کل پروتئین باکتریایی را تشکیل دهد. فراوانی پروتئین الحاقی، نسبت آلودگی پروتئینی را کاهش می‌دهد، اما هنوز هم باید روشی برای تفکیک آن وجود داشته باشد. بسیاری از ناقل‌های pET به صورتی مهندسی شده‌اند که امکان استفاده از یک روش جزء‌به‌جزء یک مرحله‌ای^۱ به نام کروماتوگرافی میل ترکیبی^۲ را فراهم کرده است که می‌تواند برای جداسازی پروتئین خالص در مقادیر کمابیش زیاد، مورد استفاده قرار گیرد.

در این بخش از دوره، شما بیان پروتئین الحاقی را از کلون پلازمید خود، القاء خواهید کرد. پس از القاء کشت‌های باکتریایی خود، الگوی بیان پروتئین را با الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید سدیم دودسیل سولفات^۳ (SDS-PAGE) و وسترن بلات^۴ مشاهده خواهید کرد. پس از تأیید سطوح بالای بیان پروتئین نوترکیب، شما یک کشت در مقیاس بزرگ‌تر را برای خالص‌سازی با کروماتوگرافی میل ترکیبی ایجاد خواهید کرد. شما سنجش‌هایی را برای بررسی کمیت پروتئین الحاقی در مراحل

1. One-step, fractionation, method

2. Affinity, chromatography

3. Sodium, Dodecyl, sulfate, polyacrylamide, gel, electrophoresis (SDS-PAGE)

4. Western, blot

مختلف فرآیند خالص‌سازی و اطمینان از اینکه پروتئین الحاقی به‌درستی تا شده و یکپارچگی عملکردی خود را حفظ کرده است، انجام خواهید داد. در نهایت، خلوص نهایی توسط SDS-PAGE تجزیه و تحلیل خواهد شد.

گزینه‌های جایگزین پیشرفته در بخش سوم

جایگزین‌های پیشرفته، بخش سوم - بیان، تشخیص و خالص‌سازی پروتئین‌های نو ترکیب از باکتری‌ها

این قسمت برای خالص‌سازی پروتئین^۱ الحاقی نو ترکیب از باکتری‌ها و تجزیه و تحلیل آن طراحی شده است. با خالص‌سازی پروتئین، تغییرات زیادی را به‌منظور بهینه‌سازی فرآیندها می‌توان به کار گرفت. به‌طور مشابه، بسته به کاربردهای پایین‌دستی پروتئین، ممکن است بعضی از روش‌های خالص‌سازی نسبت به سایرین مطلوب‌تر باشد، درحالی‌که سایر روش‌ها در زمینه آزمایش‌های آینده فاقد کارایی باشند. به‌عنوان مثال، پروتئین الحاق شده با GST، می‌تواند فعالیت آنزیم‌های معین را کاهش دهد یا برهمکنش‌های پروتئینی مهم را مسدود کند.

۳-۱: حذف وسترن بلات روی هضم‌های کامل سلولی و انجام وسترن بلات روی جزء خالص‌سازی

اگر هنوز زمان کافی را برای انجام آزمایش‌های بخش چهارم (تجزیه و تحلیل mRNA) دارید، استفاده از این روش در صورت تمایل داشتن به استفاده از روش وسترن بلات^۲، می‌تواند امری مفید باشد. به‌جای انجام وسترن بلات با استفاده از هضم سلولی کامل در این قسمت (جلسه ۹)، با انجام خالص‌سازی GST (جلسه ۱۱) شروع کنید. جزای خالص‌سازی را می‌توان با مشاهده پروتئین غیر اختصاصی (با استفاده از ژل بدون رنگ یا GelCode Blue) و وسترن بلات تجزیه و تحلیل کرد.

۳-۲: وسترن بلات نیمه کمی

همانند «الکتروفورز ژل آگارز نیمه کمی»، وسترن بلات را نیز می‌توان به روش نیمه کمی انجام داد. درحالی‌که طراحی آزمایش دقیق (با تکرارها) می‌تواند به فرد اجازه دهد که داده‌های کمی وسترن بلات را به دست آورد، آنچه در اینجا پیشنهاد می‌شود یک روش نیمه کمی است. این جایگزین در

1. Protein. purification
2. Western. Blot

صورتی مفید است که وسترن بلات به دنبال خالص‌سازی پروتئین GST::EGFP و همان‌گونه که در بخش ۳-۱ توضیح داده شده است، انجام شود.

همان‌گونه که در متن ذکر شد، روش‌های زیادی برای مشاهده وسترن بلات وجود دارد. بسته به روشی که استفاده می‌کنید، جزئیات آزمایش متفاوت خواهد بود. با این حال، اصل کلی یکسان است. شما EGFP نوترکیب (موجود شده از تأمین‌کنندگان مختلف) را خریداری و رقتی را تهیه کنید که به شما امکان می‌دهد که طیف وسیعی از توده‌های پروتئین EGFP را در محدوده تشخیص خطی سنجش خود بارگیری کنید. این امر را می‌توان به صورت تجربی تعیین کرد. برای تهیه کلونفتول^۱ (همان‌طور که در کلاس آزمایشگاه: جلسه دهم توضیح داده خواهد شد)، نقطه شروع برای محدوده استانداردها ۵۰ ng تا ۵ µg است. برای ELC، استفاده از مقدار ۱ ng-۱۵۰۰ (بسته به حساسیت معرف‌های ECL مورد استفاده)، محدوده شروع معقولی است. تا آنجا که ممکن است توده‌های مختلف استاندارد را روی ژل خود بارگذاری کنید و می‌توانید شدت باندهای موجود در نمونه‌های خود را با استانداردهای خود مقایسه کنید. بسیاری از سیستم‌های تصویربرداری شامل ابزارهای نرم‌افزاری برای انجام این تجزیه و تحلیل‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (به‌عنوان مثال، بسته نرم‌افزاری NIH Image J- شرح داده شده در کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و دوم- نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد). به یاد داشته باشید که شما به جرم پروتئین بارگذاری شده چاهک ژل را ثبت می‌کنید. برای تعیین غلظت نمونه خود، باید جرم را بر حجم نمونه‌ای که روی ژل بارگذاری شده است، تقسیم کنید (فراموش نکنید که مقدار بافر نمونه را کم کنید). یکی از موارد احتیاطی در این آزمایش، متفاوت بودن آنتی‌ژن در استانداردها (EGFP نوترکیب)، به نسبت نمونه‌های تجربی (GST::EGFP پروتئین الحاقی) است. این امکان وجود دارد که آنتی‌بادی به دلیل وجود تگ GST، بدتر (حتی بهتر) به پروتئین الحاقی متصل شود.

مواد اضافه

EGFP نوترکیب. همچنین استفاده از شانه ژل ۱۵-۱۲ عددی، می‌تواند برای بارگیری تعداد بیشتری از نمونه‌ها ترجیح داده شود.

۳-۳: حذف تگ GST الحاقی

در بسیاری از موارد، حذف تگ الحاقی از پروتئین مورد نظر پس از خالص‌سازی می‌تواند مفید واقع شود. بیشتر وکتورها، از جمله pET-41a، این امر را از طریق ادغام محل‌های برش پروتئاز داخل

1. Chloronaphthol

توالی خود ممکن می‌سازند. مکان‌های تشخیص پروتئاز برای ترومبین و انتروکیناز داخل DNA وکتور کدگذاری می‌شوند، به صورتی که وقتی پروتئین الحاقی ساخته می‌شود، تگ را می‌توان با افزودن پروتئاز حذف کرد. روش متداول اندکی [دو روش] برای حذف تگ الحاقی از پروتئین الحاقی نو ترکیب وجود دارد که هر دوی آن‌ها در مقایسه با خالص‌سازی معمولی، به مراحل اضافی نیاز دارند. روش اول شامل خالص‌سازی پروتئین با استفاده از ستون میل ترکیبی گلوپتاتین^۱ است. هنگامی که پروتئین خالص شسته شد، می‌توان آن را با ترومبین یا انتروکیناز تیمار کرد. پس از تیمار با پروتئاز، خالص‌سازی بیشتر باید انجام شود تا هم پروتئاز و هم GST از پروتئین EGFP حذف شوند. GST را می‌توان به راحتی با عبور دادن محلول از روی یک ستون گلوپتاتین دیگر حذف کرد. در این مرحله، GST متصل شده و پروتئین EGFP شما (از آنجایی که دیگر به GST متصل نیست) از طریق ستون خارج می‌شود. در مرحله بعد، اگر می‌خواهید پروتئاز را از EGFP جدا کنید، باید از روش‌های کروماتوگرافی دیگر مانند کروماتوگرافی تبادل کاتیونی یا آنیونی استفاده کنید. توجه داشته باشید که کروماتوگرافی حذف بر اساس اندازه^۲، برای جداسازی ترومبین یا انتروکیناز از EGFP به دلیل شباهت در وزن مولکولی آن‌ها مفید نخواهد بود.

روش جایگزین دیگر، افزودن مستقیم پروتئاز به ستون و در حالتی است که پروتئین هنوز متصل است. در این حالت به جای افزودن بافر شست‌وشو، پروتئاز اضافه می‌شود. همان‌طور که پروتئاز پیوند پپتیدی را می‌شکند و پروتئین الحاقی را جدا می‌کند، EGFP آزاد می‌شود و GST به ستون متصل باقی می‌ماند. پس از شست‌وشو با پروتئاز، جداسازی EGFP و پروتئاز همچنان به یک مرحله اضافی نیاز دارد.

بسیاری از شرکت‌ها، بیدهای (منظور دانه‌های موجود در محیط واکنش که به صورت ماتریکس یا رزین هستند-م) ترومبین سفاروش^۳ را ارائه می‌دهند که در آن‌ها ترومبین از طریق پیوند کووالانسی به بیدهای یک ستون متصل می‌گردد. با استفاده از این دانه‌ها، می‌توان پروتئین الحاقی GST::EGFP خالص را گرفت، آن را از روی ستون عبور داد و پس از شست‌وشو، GST و EGFP را دریافت کرد. مرحله دوم شامل عبور محلول شست‌وشو از روی یک ستون گلوپتاتین است که منجر به حاصل شدن EGFP می‌شود. رزین متصل شونده به انتروکیناز^۴ که می‌تواند به طور اختصاصی انتروکیناز را جذب کند، یک فرآورده مفید برای حذف انتروکیناز از محلول است. این دانه‌ها با مهارکننده تریپسین سویا کونژوگه (آمیخته) می‌شوند که با میل ترکیبی بالا به انتروکیناز متصل می‌شوند. انتروکیناز را می‌توان با عبور دادن محلول روی این رزین، از EGFP حذف کرد.

-
1. Glutathione
 2. Size-exclusion. chromatography
 3. Thrombin. Sepharose. beads
 4. Enterokinase-binding. resin

مواد اضافی

ترومبین (دانه‌های ترومبین سفاروز). انتروکیناز و رزین وصل شدن دهنده انتروکیناز.

کلاس آزمایشگاه: جلسه نهم

بیان پروتئین الحاقی از کلون‌های مثبت، SDS-PAGE و وسترن بلات: بخش اول

هدف: این هفته، شما (مربی) کشت‌های کوچکی از کلون‌های خود را با ایزوپروپیل- β -D-تیوگالاکتوپیرانوسید (IPTG) القا و نمونه‌های پروتئینی را برای الکتروفورز ژل آماده می‌کنید. برای جلوگیری از پروتئولیز پروتئین الحاقی که می‌تواند در فاز ثابت رشد رخ دهد، کشت‌های باکتریایی را از فاز لگاریتمی (که از لحاظ رشد فعال هستند) برداشت می‌کنید. IPTG تنها چند ساعت قبل از برداشت باکتری اضافه می‌شود، زیرا القاء پروتئین نوترکیب بیشتر وقت‌ها برای رشد و زنده ماندن باکتری مضر است.

شما امروز کشت‌ها را هضم می‌کنید و سپس آن‌ها را با الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) تفکیک و به غشاء نیتروسلولزی منتقل می‌کنید. شما غشاء نیتروسلولز را برای هفته آینده ذخیره خواهید کرد تا وسترن بلات را به پایان برسانید.

کلاس آزمایشگاه: جلسه نهم-الف

جلسه موقت آزمایشگاه

تلقیح کشت برای SDS-PAGE

۱- تمرین‌های آزمایشگاهی

- ۱- چهار لوله کشت ۱mL حاوی LB/kan تهیه کنید.
- ۲- این لوله‌ها را با ترادیزی شده‌هایی از پلید اصلی خود که مربوط به کنترل مثبت (pBIT)، کنترل منفی (pET-41a) و دو کلون مثبت که از سنجش غربالگری شما حاصل شده است، به‌شدت تلقیح کنید. برای تلقیح هر یک از لوله‌های LB/kan، از یک نوک خلال‌دندان / سرسمپلر جداگانه استفاده کنید.
- ۳- کشت‌های LB/kan را با اطلاعات نمونه، حروف اول اسم خود و تاریخ برچسب بزنید.
- ۴- کشت‌های تلقیح شده را در رک‌های معین قرار دهید.
- ۵- لوله‌های LB/kan حاوی کشت‌های تلقیح شده را در دمای 4°C در یخچال نگهداری کرده تا رشد در مرحله تعلیق قرار گرفته شود. بعدازظهر پیش از دوره آزمایشگاهی، آن‌ها را در شیکر با دمای 37°C قرار بدهید و به‌مدت یک شب انکوبه کنید.

کلاس آزمایشگاه: جلسه نهم-ب

بیان پروتئین الحاقی از کلون‌های مثبت، SDS-PAGE و وسترن بلات: بخش اول

۱- مقدمه

SDS-PAGE برای تفکیک پروتئین‌ها و بر اساس وزن مولکولی عمل می‌کند. SDS-PAGE پروتئین‌ها کاربردهای متعددی دارد که عبارت‌اند از: تعیین وزن مولکولی، تعیین خلوص نمونه، تعیین کمیت بیان، وسترن بلات (ایمونوبلات) و تفکیک پروتئین‌ها برای تعیین توالی پپتید یا تولید آنتی‌بادی.

شما از قبل با الکتروفورز DNA با ژل آگارز آشنا شدید؛ روش SDS-PAGE شباهت‌هایی با این روش دارد. هر دو روش مولکول‌ها را بر اساس اندازه تفکیک و از اختلاف بار الکتریکی برای ایجاد مهاجرت استفاده می‌کند و هر دو به یک ماتریس برای تفکیک مولکول‌ها بر اساس اندازه نیاز دارد. با این حال، تفاوت‌های ساختاری و بیوشیمیایی بین DNA و پروتئین‌ها، سبب ایجاد مقداری تفاوت در ماهیت جداسازی آن‌ها توسط الکتروفورز شده که عبارت‌اند از:

۱- پروتئین‌ها به‌طور کلی کوچک‌تر از DNA هستند؛ بنابراین، درحالی‌که DNA (بزرگ‌تر از ۱۰۰bp) به‌طور معمول روی ژل‌های آگارز تفکیک می‌شوند، پروتئین‌ها به‌طور معمول روی ژل‌های پلی‌آکریل آمید اجرا می‌شوند، زیرا ماتریس‌های پلی‌آکریل آمید دارای منافذ (الک) کوچک‌تری نسبت به آگارز هستند. قطعات DNA کوچک‌تر از ۱۰۰ bp، بیشتر وقت‌ها با استفاده از پلی‌آکریل آمید تفکیک می‌شوند.

۲- تمامی مولکول‌های DNA دارای بار منفی هستند، اما پروتئین‌ها بسته به محتوای اسیدآمین یک پلی‌پپتید خاص و pH بافر، بارهای متفاوتی دارند. برخی از پروتئین‌ها دارای بار مثبت هستند، درحالی‌که برخی دارای بار منفی خالص.

۳- مولکول DNA، به‌ویژه DNA خطی، ساختار ثانویه کمی دارد، درحالی‌که پروتئین‌ها می‌توانند کروی یا خطی باشند و ساختار چهارتایی مانند دایمرها و سایر مولتیمرها داشته باشند.

با توجه به دلایل ذکر شده در بند ۲ و ۳، اگر پروتئین‌ها روی یک ژل پلی‌آکریل آمید معمولی یا غیر دناتوره شونده (بدون SDS اجرا شوند)، مهاجرت پروتئین دست‌کم به سه عامل بستگی دارد: اندازه، بار و شکل.

SDS-PAGE به پروتئین‌ها این امکان را می‌دهد تا با استفاده از SDS و یک عامل کاهنده، تنها بر اساس اندازه مهاجرت کنند. SDS یک ماده شوینده یونی است که با پیچیده شدن به دور

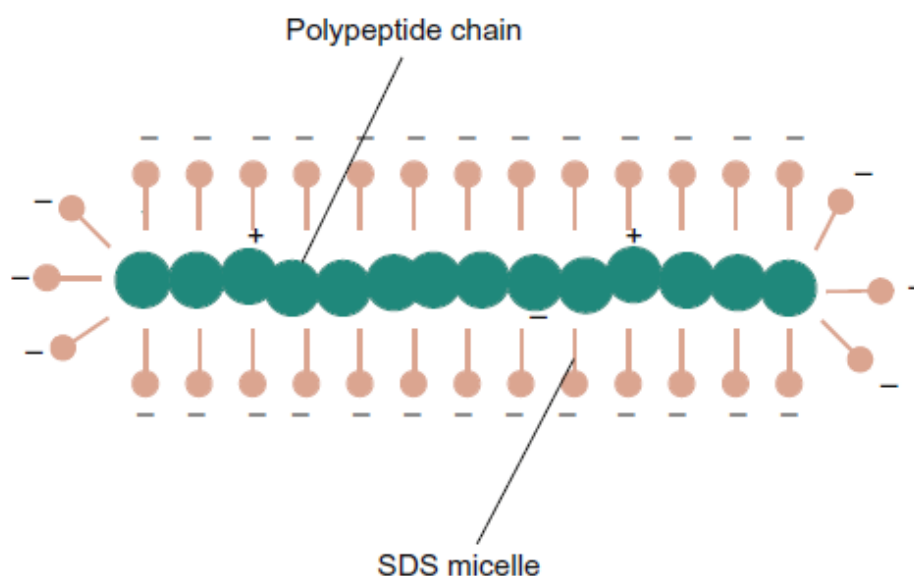
ساختمان پلی‌پپتید و تشکیل یک میسل، پروتئین‌ها را واسرشته می‌کند (باز می‌کند)؛ بنابراین یک بار منفی خالص متناسب با طول پلی‌پپتید را ایجاد می‌کند. SDS همچنین بیشتر برهمکنش‌های غیر کووالانسی، همانند برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی و پیوندهای هیدروژنی را مختل می‌کند و در نتیجه تاخوردگی پروتئینی را کاهش می‌دهد. برای کاهش پیوندهای دی‌سولفیدی (پیوندهای سیستین) و باز شدن بیشتر پروتئین‌ها، یک عامل کاهنده مانند β -مرکاپتواتانول^۱ یا دی‌تیوتریتول^۲ اضافه می‌شود.

پس از جوشاندن یک نمونه پروتئین در SDS و β -مرکاپتواتانول، پروتئین‌ها به‌عنوان مولکول‌های خطی با بار منفی عمل می‌کنند و می‌توانند بر اساس اندازه به‌صورت الکتروفورزی تفکیک شوند (شکل ۱-۹).

پس از اجرای ژل، می‌توان آن را به‌طور غیر اختصاصی و به‌منظور مشخص شدن باندهای پروتئینی، با استفاده از رنگ Coomassie Blue، GelCode Blue یا رنگ نقره‌ای، رنگ‌آمیزی کرد یا پروتئین‌ها را می‌توان به‌منظور مشاهده پروتئین معین مورد نظر، به غشای نیتروسلولزی برای وسترن بلات (ایمونوبلات) منتقل کرد. در کلاس آزمایشگاه: جلسه دوازدهم (تجزیه و تحلیل جزه‌های خالص‌سازی)، یک ژل SDS-PAGE را اجرا می‌کنیم و با استفاده از GelCode Blue آن را رنگ‌آمیزی می‌کنیم تا باندهای پروتئینی را مشاهده کنیم.

در جلسه آزمایشگاه امروز، وسترن بلات را شروع خواهیم کرد (در جلسه آزمایشگاهی بعدی تکمیل خواهد شد). اولین مرحله از این فرآیند، آماده‌سازی نمونه‌های پروتئینی و تفکیک آن‌ها با استفاده از SDS-PAGE است. سپس پروتئین‌های ژل پلی‌آکریل‌آمید به غشای نیتروسلولز منتقل می‌شوند. پروتئین کل موجود روی غشای نیتروسلولزی، ممکن است در این مرحله با استفاده از رنگ پانسو^۳ (رنگ قرمز آتشی) محلول در آب قابل مشاهده باشد. پس از انتقال پروتئین‌ها، یک آنتی‌بادی مونوکلونال (ایجاد شده از یک کلون) علیه GFP برای مشاهده اختصاصی پروتئین الحاقی GST::EGFP شما استفاده می‌شود (اطلاعات بیشتر در این مورد در کلاس آزمایشگاه: جلسه دهم: بیان پروتئین الحاقی از کلون‌های مثبت، SDS-PAGE و وسترن بلات: قسمت دوم قابل مشاهده است). این قسمت از وسترن بلات در جلسه آزمایشگاه بعدی تکمیل خواهد شد.

-
1. β -mercaptoethanol
 2. Dithiothreitol
 3. Ponceau. stain



شکل ۹-۱: پلی پپتید تیمار شده با β -مرکاپتو اتانول و SDS. β -مرکاپتو اتانول سبب شکستن پیوندهای دی سولفید کووالانسی (سیستئین) می‌شود. SDS فعل و انفعالات غیر کووالانسی را مختل، پروتئین را بیشتر واسرشته می‌کند، یک میسل در اطراف آن تشکیل می‌دهد و بار منفی ایجاد می‌کند. SDS، سدیم دودسیل سولفات.

وزن مولکولی پروتئین الحاقی GST::EGFP را با فرض بر اینکه میانگین وزن هر اسید آمینه برابر ۱۱۴ دالتون (Da) است، می‌توان تخمین زد. ژن *gst* دارای ۶۶۰ bp است که ۲۲۰ آمینواسید را رمز می‌کند: $220 \times 114 = 25/080$ Da. ژن *egfp* دارای ۷۲۰ bp است که ۲۴۰ آمینواسید را رمز می‌کند: $240 \times 114 = 27/360$ Da. تعداد ۱۷۴ نوکلئوتید اضافی بین *gst* و *egfp* وجود دارد که ۵۸ آمینواسید را کد می‌کند: $58 \times 114 = 6612$ Da. بنابراین، وزن پروتئین الحاقی را می‌توان به صورت زیر تخمین زد: $25/080 + 27/360 + 6612 = 59/052$ Da یا $59 \sim \text{kDa}$. شما می‌توانید وزن مولکولی واقعی (با استفاده از وزن مولکولی برای هر اسید آمینه) را با استفاده از نرم افزار آنالیز و به صورت رایگان تعیین کنید؛ وزن مولکولی دقیق پروتئین الحاقی GST::EGFP برابر است با ۵۸۵۰۰ دالتون. شما قادر خواهید بود با استفاده از رنگ پانسو، یک باند پروتئینی با این اندازه تقریبی را در کلون‌های مثبت خود و به صورت غیر اختصاصی مشاهده کنید. تمرین و سترن بلات در هفته آینده و با استفاده از یک آنتی بادی اختصاصی برای EGFP و به منظور تأیید باند GST::EGFP تکمیل خواهد شد. در کلون‌های منفی و پس از رنگ آمیزی پانسو، ممکن است یک باند با وزن تقریبی ۲۵ کیلو دالتون را مشاهده کنید که تنها مربوط به پروتئین GST است.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

الف. آماده‌سازی نمونه

- ۱- مقدار ۲ mL از محیط $2 \times \text{YT/kan/IPTG}$ را به هر کشت شبانه اضافه کنید.
- ۲- برای القاء بیان پروتئین، به مدت ۳-۴ ساعت و در دمای 37°C ، انکوباسیون کنید.
- ۳- دمای هات‌بلاک را روی 95°C یا بالاتر تنظیم کنید (مطمئن شوید که هات‌بلاک در منافذ خود دارای دانه‌های مخصوص آزمایشگاهی که به‌منظور انتقال حرارت تعبیه شده است، می‌باشد).
- ۴- کشت‌ها را برداشت کنید. مقدار $200 \mu\text{L}$ از هر کشت (کنترل مثبت، کنترل منفی و کلون‌های فردی خود) را به مدت ۲ دقیقه در میکروسانتریفیوژ با حداکثر سرعت سانتریفیوژ کنید. مواد رویی را بردارید و دور بریزید و کلاف‌ها را در ویال ذخیره کنید. ویال‌ها را روی حوله‌های کاغذی به‌صورت معکوس قرار دهید تا مایعات باقیمانده حذف شوند.
- ۵- به هر ویال، $200 \mu\text{L}$ معرف کامل B-PER اضافه (این معرف حاوی DNase و لیزوزیم است) و چندین بار پایپت (ورتکس) کنید تا کلاف پراکنده شود. محلول را به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه و در دمای اتاق انکوبه کنید. در طول این انکوباسیون، دستگاه ژل خود را سرهم کنید. توجه: شیوه‌نامه شرکت سازنده B-PER، خواستار استفاده از 5 mL معرف B-PER به‌ازای هر گرم کلاف سلولی است. این شیوه‌نامه از مقدار بیشتری از معرف B-PER استفاده می‌کند و نمونه پروتئین رقیق‌تری را برای بارگذاری مستقیم روی ژل و برای استفاده در وسترن بلات شما ایجاد می‌کند.
- نکته برای صرفه‌جویی در هزینه: به‌جای هضم کردن سلول‌ها با B-PER، می‌توانید $100 \mu\text{L}$ از dH_2O و 100 میکرولیتر بافر نمونه SDS-PAGE $2 \times$ را یکراست به کلاف اضافه، دوباره تعلیق کنید و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید. محلول رویی به‌دست‌آمده بسیار چسبناک خواهد بود، بنابراین پیشنهاد می‌شود پیش از بارگذاری روی ژل، نمونه‌ها را در سونیکاتور بگذارید و سپس به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار دهید.
- ۶- نمونه‌ها را به مدت ۵ دقیقه با حداکثر سرعت در میکروسانتریفیوژ، سانتریفیوژ کنید.
- ۷- مقدار $25 \mu\text{L}$ از مایع رویی (سوپرناتانت) هر نمونه را به یک ویال میکروفیوژ جداگانه حاوی $5 \mu\text{L}$ از بافر نمونه SDS-PAGE $2 \times$ اضافه کنید (اگر بافر نمونه SDS-PAGE شما با غلظت متفاوتی عرضه می‌شود، حجم‌ها را متناسب با فرآیند خود تنظیم کنید). مطمئن شوید که از بافر نمونه SDS-PAGE استفاده می‌کنید، نه بافر بارگذاری DNA که پیشتر استفاده شده بود، زیرا هر دو آبی هستند!

۸- ویال‌ها را در حداقل دمای 95°C و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه کنید (در صورت استفاده از آب، مطمئن شوید که آب در سوراخ‌های بلوک حرارتی انکوباتور به خوبی به جوش می‌آید). نمونه‌ها را می‌توان از روی حرارت برداشت و تا زمانی که روی ژل قرار گیرند، در دمای اتاق قرار داد. اگر درب ویال‌های شما هنگام گرم شدن باز شد، می‌توان از قفل‌های درپوش ویال میکرو سانتریفیوژ استفاده کرد.

- آماده‌سازی دستگاه ژل

نکته: سرهم کردن دستگاه ژل و ترانس بلات مخصوص دستگاه الکتروفورز Bio-Rad Mini-Protein 3 و Bio-Rad Mini Trans-Blot Cell است. اگر از تجهیزات ساخته شده توسط سازنده دیگری استفاده می‌کنید، مربی شما شیوه‌نامه‌های سرهم کردن و استفاده از آن‌ها را در اختیار شما قرار می‌دهد.

ما از ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید پیش‌ساخته شده استفاده می‌کنیم. با این حال، اگر در آینده باید ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید خود را بسازید و استفاده کنید، به خاطر داشته باشید که آکریل‌آمید غیر پلیمریزه، هم در حالت پودر و هم در حالت مایع، نوروکسین‌های قدرتمندی هستند. برای جلوگیری از استنشاق، بلعیدن و قرار گرفتن در معرض پوست با این ماده باید با احتیاط عمل کنید. پلی‌آکریل‌آمید جامد شده، خطرات ایمنی ذکر شده را ایجاد نمی‌کند.

نکته برای صرفه‌جویی در زمان: شرکت Bio-Rad در حال حاضر ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید TGX بدون رنگ (شماره کاتالوگ ۴۵۶۸۰۳۳) را ارائه و این امکان را فراهم می‌کنیم که پروتئین‌ها با قرار گرفتن در معرض نور UV و بدون مرحله رنگ‌آمیزی مشاهده شوند. این ژل‌ها حاوی Tris-Glycine و با ماندگاری طولانی هستند. اگر قصد استفاده از ژل‌های بدون لکه در کلاس آزمایشگاه: جلسه دوازدهم (تجزیه و تحلیل جزهای خالص‌سازی) را دارید، می‌توانید از ژل‌های استفاده شده در این جلسه استفاده کنید. علاوه بر این، در صورت استفاده از این ژل‌های بدون رنگ، می‌توانید کارایی انتقال خود را در پایان جلسه آزمایشگاهی این هفته با مشاهده ژل در زیر نور ماوراءبنفش و برای تأیید پروتئین‌های منتقل شده به غشای نیتروسلولوز تأیید کنید.

۱- دو ژل باید به ازای هر واحد اجرا شود. اگر با گروه/ دانشجو دیگری همراه نشده‌اید و فقط یک ژل برای اجرا در دستگاه دارید، باید به جای ژل دوم از یک سد بافری استفاده کنید.

۲- دستگاه Bio-Rad را همان‌طور که توسط مربی توضیح داده شده است، با صفحات کوتاه به سمت مرکز سرهم کنید.

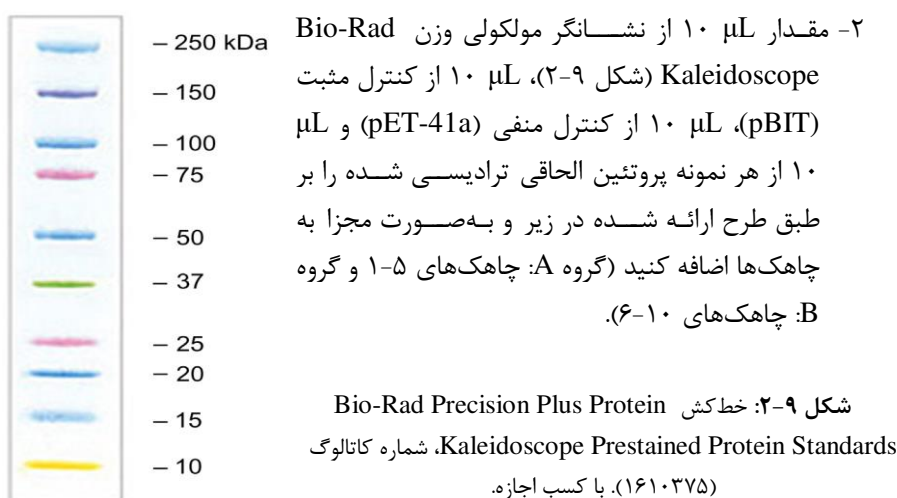
۳- بافر Tris-glycine $1 \times$ را به محفظه بافر (مطمئن شوید که چاهک را می‌پوشاند) اضافه کنید. نشتی‌ها را بررسی کنید.

۴- چاهک‌ها را با بافر Tris-glycine و یا dH₂O بشویید.

چاهک ۱	چاهک ۲	چاهک ۳	چاهک ۴	چاهک ۵	چاهک ۶	چاهک ۷	چاهک ۸	چاهک ۹	چاهک ۱۰
نشانهگر مولکولی وزن	کنترل مثبت	کنترل منفی	نمونه ۱	نمونه ۲	نشانهگر مولکولی وزن	کنترل مثبت	کنترل منفی	نمونه ۱	نمونه ۲

ب- بارگذاری نمونه‌ها روی ژل

۱- هنگام پایت کردن نمونه‌ها، سعی نکنید تمام مایع را از سرسمپلر خارج کنید. این حالت، سبب ایجاد حباب هوا می‌شود که می‌تواند مهاجرت نمونه شما را مختل، همچنین می‌تواند نمونه شما را از چاهک خارج کند. ما مطالعه نکات بارگیری ژل را که به صورت اختصاصی برای SDS-PAGE طراحی شده‌اند را پیشنهاد می‌کنیم.



پ- الکتروفورز

- ۱- دو ژل در هر دستگاه اجرا می‌شود: پیش از آغاز با گروه دیگری هماهنگ کنید.
- ۲- الکترودها را به منبع تغذیه وصل کنید. احتیاط: به حتم آند (قرمز) را با سری مثبت و کاتد (مشکی) را با سری منفی مطابقت دهید.
- ۳- منبع تغذیه را روشن کنید. ژل خود را با ولتاژ ثابت (۱۰۰-۱۱۰ V) اجرا کنید. اگر چندین ژل به منبع تغذیه خود وصل کرده‌اید، نیازی به تغییر ولتاژ ندارید. هر ۱۰ دقیقه در طول

الکتروفورز، جریان (آمپر) منبع تغذیه را بررسی کنید. جریان در هر زمان از آزمایش نباید از ۶۰ میلی‌آمپر در هر ژل تجاوز کند.

۴- ژل را اجرا کنید تا رنگ دای بروموفنول آبی به انتهای ژل برسد. این امر به‌طور معمول ۴۵-۳۰ دقیقه طول می‌کشد، اما شما هر ۱۰ دقیقه ژل خود را بررسی کنید تا مطمئن شوید که مجموعه به‌درستی کار می‌کند.

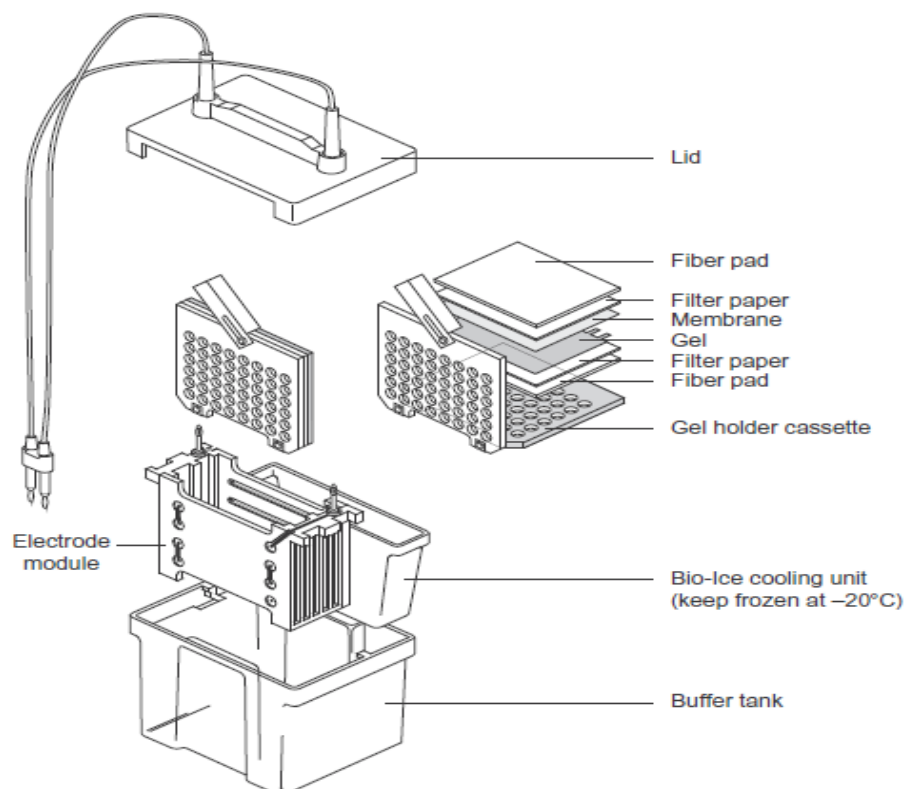
ت- توقف الکتروفورز

- ۱- منبع تغذیه را خاموش کنید.
 - ۲- سرسیم‌ها را از منبع تغذیه جدا کنید. ژل خود را از دستگاه خارج کنید. اگر ژل‌های دیگر متصل به منبع تغذیه تمام نشده‌اند، منبع تغذیه را دوباره روشن کنید.
 - ۳- بافر را داخل سینک بریزید.
 - ۴- همان‌طور که نشان داده شد، ژل را از صفحات جدا کنید.
 - ۵- پس از جدا کردن ژل، چاهک‌ها را جدا کنید.
- رنگ‌آمیزی ژل برای مشاهده پروتئین‌ها در این مرحله امکان‌پذیر است، اما برای وسترن بلات، ژل را نمی‌توان به‌طور غیرقابل‌برگشت رنگ‌آمیزی کرد. در عوض، ابتدا پروتئین را به یک غشاء نیتروسلولزی منتقل و سپس غشاء را با رنگ محلول در آب قبل و از تکمیل وسترن بلات، رنگ‌آمیزی کنید.

ج- انتقال به نیتروسلولوز

ما از سلول Bio-Rad Mini Trans-Blot برای انتقال پروتئین‌ها از ژل پلی‌آکریل‌آمید به غشاء نیتروسلولز استفاده خواهیم کرد (شکل ۹-۳).

نکته برای صرفه‌جویی در زمان: روش‌های دیگر انتقال پروتئین از ژل به نیتروسلولز، مانند استفاده از سیستم‌های خشک و نیمه‌خشک، به‌طور معمول بسیار سریع‌تر هستند. این سیستم‌ها به‌طور معمول گران‌تر هستند اما می‌توانند به اندازه روش انتقال مرطوب مؤثر باشند. برای استفاده از این ابزار به‌منظور انتقال، به شیوه‌نامه‌های شرکت سازنده مراجعه کنید.



شکل ۹-۳: طرح شماتیک Mini Trans-Blot و سرهم‌بندی قطعات. شرکت Bio-Rad-۲۰۰۴، با کسب اجازه.

۱- ۱/۵ لیتر بافر انتقال را با مخلوط کردن ۳/۷ گرم بی‌کربنات سدیم در ۱/۵ لیتر آب دیونیزه آماده کنید.

نکته برای صرفه‌جویی در هزینه: بافر انتقال بی‌کربنات بیشتر وقت‌ها برای فرآورده‌هایی با وزن مولکولی کم (کمتر از ۱۰۰ کیلو دالتون) و پروتئین‌های پایه به‌خوبی عمل می‌کند. از بافرهای انتقال سنتی همانند Tris/glycine/SDS متانول نیز می‌توان به این منظور

استفاده کرد، اما برای انتقال پروتئین الحاقی GST::EGFP، بافر بی‌کربنات به همان خوبی عمل می‌کند.

۲- برای جلوگیری از انتقال اثر انگشت به غشای نیتروسلولوزی، به حتم از این مرحله به بعد دستکش بپوشید. یک ظرف شیشه‌ای، دو ورق کاغذ صافی واتمن^۱ و یک ورق نیتروسلولوز تهیه کنید. نیتروسلولوز را در بالا سمت چپ با مداد برچسب بزنید.

۳- مقدار کمی (حدود ۱ سانتی‌متر عمق) از بافر انتقال را داخل ظرف بریزید.

۴- غشای نیتروسلولوزی، پدهای فیبری و کاغذ صافی را در ظرف بافر انتقال، به‌طور کامل مرطوب کنید. مراقب باشید که نیتروسلولوز به ژل برخورد نکند.

۵- یک ساندویچ ژل را همان‌طور که در اینجا توضیح داده شده و در شکل ۹-۴ نشان داده شده است، آماده کنید. تحت هیچ شرایطی نباید موقعیت نیتروسلولوز را روی ژل پس از تماس آن‌ها تغییر دهید.

الف. کاست (بخش خاکستری در پایین) را در ظرف شیشه‌ای حاوی بافر انتقال قرار دهید.

ب. یک پد فیبر از قبل مرطوب شده را در سمت خاکستری کاست قرار دهید.

پ. یک ورق کاغذ صافی را روی پد قرار دهید.

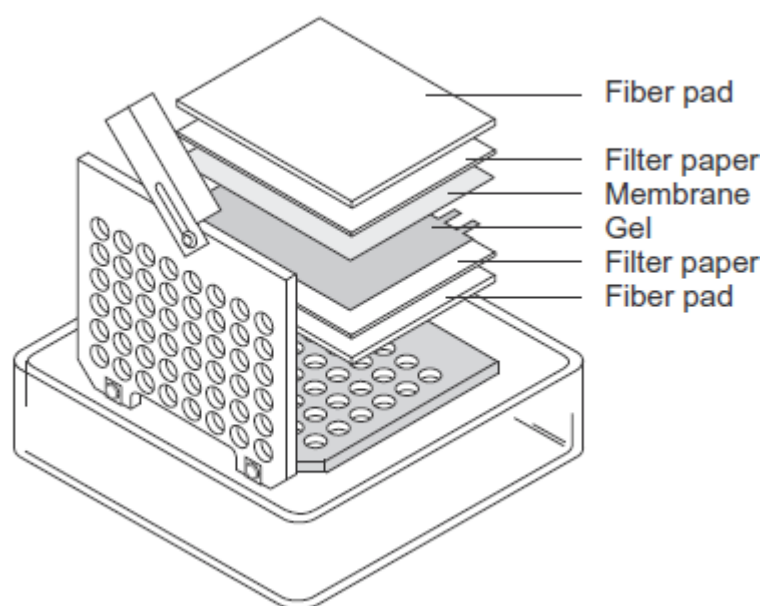
ت. ژل را روی کاغذ صافی قرار دهید. حباب‌ها را با غلتاندن یک لوله شیشه‌ای روی آن، به آرامی حذف کنید.

ج. غشای نیتروسلولوز از قبل خیس شده را روی ژل (با برچسب سمت پایین در بالای ژل) قرار دهید. حباب‌ها را با غلتاندن یک لوله شیشه‌ای روی آن به آرامی حذف کنید.

چ. یک کاغذ صافی روی غشا قرار دهید. حباب‌ها را با غلتاندن یک لوله شیشه‌ای روی آن به آرامی حذف کنید.

1. Whatman. Filter. paper

ح. آخرین پد فیبری را اضافه کنید و ساندویچ را ببندید.



شکل ۹-۴: ژل ساندویچ از نمای نزدیک. شرکت Bio-Rad-۲۰۰۴، با کسب اجازه.

۶- کاست را در اتاقک قرار دهید. سمت خاکستری کاست باید به سمت سیاه و سمت روشن کاست باید به سمت قرمز اتاقک باشد.

۷- با بافر انتقال (نزدیک به ۱ لیتر)، محفظه اتاقک را تا بالا پر کنید (اگر تمام شد، از بافر انتقال برای مرطوب کردن ژل استفاده کنید یا حجم بیشتری از بافر را درست کنید).

۸- درب مجموعه را طوری قرار دهید که قرمز با قرمز و مشکی با مشکی جفت شود.

۹- جریان را به مدت ۴۰ دقیقه و بر روی ۳۰۰ میلی‌آمپر تنظیم و سپس دستگاه را روشن کنید.

نکته برای صرفه‌جویی در زمان: اگر زمان کافی برای اتمام انتقال وجود نداشته باشد، بسیاری از منابع تغذیه دارای یک تایمر هستند که می‌توانید آن را برای تأمین جریان برای مدت زمان ثابت تنظیم کنید. از طرف دیگر، ژل‌ها را می‌توان با شدت جریان ۳۰ میلی‌آمپر در طول شب و در دمای ۴°C انتقال داد. ژل ساندویچ‌ها باید جدا و نیتروسلولز روز بعد ذخیره شود.

چ- باز کردن و ذخیره‌سازی

۱- دستگاه را جدا کنید.

۲- ژل و دو ورق کاغذ صافی را دور بریزید و پدهای فیبری (پدهای فیبر یک‌بار مصرف نیستند)

و بقیه دستگاه را با مقدار زیادی آب استریل بشویید و کنار بگذارید.

۳- ورق حاوی لکه‌ها را بین دو ورقه کاغذ صافی و اتمن قرار بدهید و به مربی تحویل دهید تا

آن را در فویل بیپچد و سپس در یخچال با دمای 4°C نگهداری کند. توجه: غشای

نیتروسلولز را می‌توان تا هفته آینده در ظرف دربدار حاوی بافر نمکی تریس^۱ نگهداری

کرد.

1. Tris-buffered. saline

منبع

1. Dunn SD. Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. Anal Biochem. 1986;157:144_53.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- به پیروی از روش SDS-PAGE، مزیت تشخیص پروتئین با ایمونوبلات (وسترن بلات) نسبت به روش رنگ‌آمیزی ژل غیر اختصاصی چیست؟ تحت چه شرایطی بهتر است که به جای ایمونوبلات، از رنگ‌آمیزی غیر اختصاصی ژل استفاده کرد.
- ۲- یک روش جایگزین برای این روش آزمایشگاهی، هضم کردن باکتری‌ها به‌طور مستقیم در بافر نمونه SDS-PAGE $1 \times$ به جای معرف B-PER است. در این حالت، محلول به‌دست آمده بسیار چسبناک (مخاط مانند) است و به‌سختی پایت می‌شود. چه اجزایی در باکتری و بافر نمونه SDS PAGE باعث ایجاد محلول چسبنده می‌شوند؟ چرا این مشکل با استفاده از معرف B-PER حل می‌شود؟

کلاس آزمایشگاه: جلسه دهم

بیان پروتئین الحاقی از کلون‌های مثبت، SDS-PAGE و وسترن بلات: بخش دوم

هدف: امروز غشای خود را با رنگ پانسو رنگ‌آمیزی کنید تا انتقال پروتئین‌های خود به نیتروسلولز را تأیید کنید و وسترن بلات را که در آخرین جلسه آزمایشگاهی شروع شده بود، تکمیل کنید.

۱- مقدمه

آنتی‌بادی‌ها ابزاری چندوجهی هستند که در مطالعه پروتئین‌ها و در سنجش‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. وسترن بلات، ایمونوفلورسانس^۱، سنجش ایمونوسوربنت مرتبط با آنزیم^۲، ترسیب ایمینی^۳ و مرتب‌سازی سلولی فعال‌شده با فلورسانس^۴ تنها برخی از شیوه‌های مبتنی بر آنتی‌بادی است که به‌طور معمول توسط دانشمندان استفاده می‌شوند. آنتی‌بادی‌ها پروتئین‌هایی هستند که توسط سیستم ایمنی پستانداران ساخته و به‌طور اختصاصی به پروتئین‌های دیگر متصل می‌شوند. برای اهداف تحقیقاتی، بیشتر آنتی‌بادی‌ها در خرگوش‌ها (آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال) یا موش‌ها (آنتی‌بادی‌های مونوکلونال) با تزریق یک پپتید، پروتئین یا قطعه پروتئین مورد نظر به حیوان تولید می‌شوند (مدتی پس از تزریق منتظر بمانید تا سیستم ایمنی به‌طور طبیعی آنتی‌بادی تولید کند و سپس خالص‌سازی می‌شود). برخی از آنتی‌بادی‌ها نسبت به سایرین، اختصاصی‌تر عمل می‌کنند. به‌عنوان مثال، آنتی‌بادی مورد استفاده در آزمایش امروز برای وصل شدن به GFP طراحی شده است، اما این آنتی‌بادی همچنین به EGFP، پروتئین فلورسنت زرد، پروتئین فلورسنت فیروزه‌ای و به‌طور تقریبی تمامی واریانتهای رنگی دیگر GFP متصل می‌شود. نکته مهم این است که آنتی‌بادی‌ها به دانشمندان این امکان را می‌دهند که یک پروتئین معین مورد نظر را از هزاران پروتئین دیگر موجود در یک نمونه خاص مشاهده و تشخیص دهند. در آزمایش امروز، آنتی‌بادی به شما این امکان را می‌دهد که به‌طور خاص پروتئین الحاقی GST::EGFP را در میان تمام پروتئین‌های دیگر موجود در سلول باکتری مشاهده کنید.

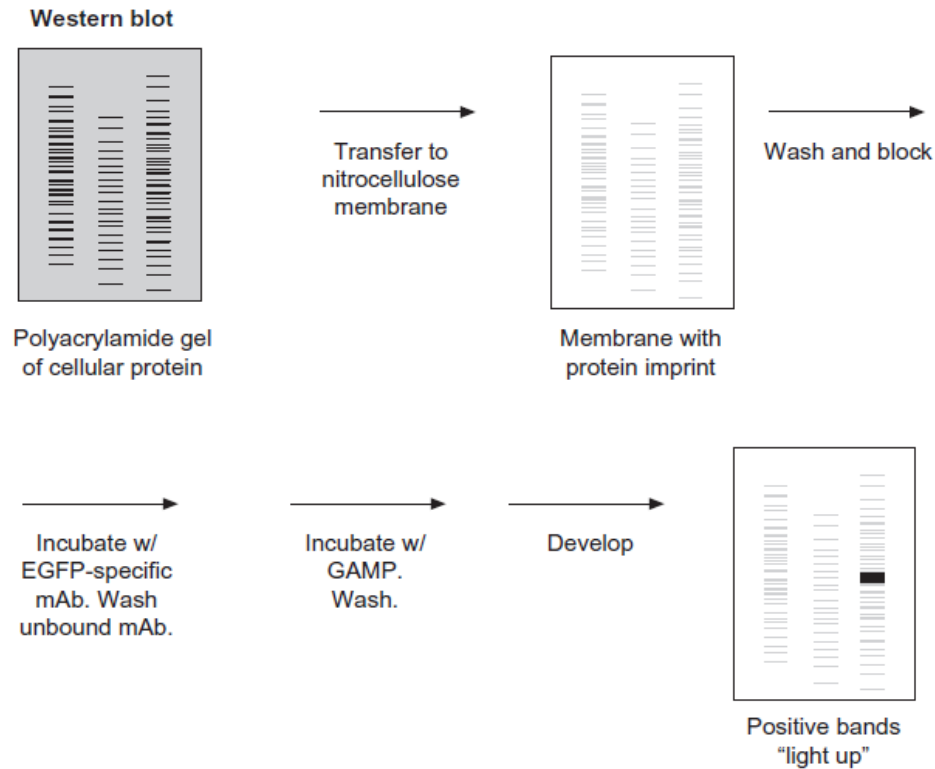
پروتئین‌های سلولی هر کلون توسط SDS-PAGE در آخرین جلسه آزمایشگاهی جدا شد و امروز با انجام وسترن بلات، باند پروتئینی اختصاصی مربوط به پروتئین الحاقی GST::EGFP را مشاهده خواهید کرد. پس از انتقال پروتئین به غشای نیتروسلولز، غشاء با پروتئینی مسدود می‌شود

-
1. Immunofluorescence
 2. Enzyme-linked. immunosorbent. assay
 3. Immunoprecipitation
 4. Fluorescence-activated. cell. sorting

که با آنتی‌بادی اولیه (مانند کازئین موجود در شیر بدون چربی یا آلبومین سرم گاوی) برهمکنش نخواهد داشت. آنتی‌بادی اولیه اضافه و اجازه داده می‌شود تا به اپی‌توپ^۱ (قسمتی از یک آنتی‌ژن است که توسط سیستم دفاعی تشخیص داده می‌شود-م) اختصاصی روی پروتئین متصل شود و آنتی‌بادی غیر متصل شسته می‌شود.

نام‌گذاری آنتی‌بادی‌ها بیشتر وقت‌ها با حرف یونانی «آلفا» (α) یا پیشوند «ضد» نشان داده می‌شود. به‌عنوان مثال، آنتی‌بادی که به‌طور خاص به پروتئین EGFP متصل شده، ممکن است به‌عنوان "anti-EGFP" یا " α -EGFP" نام‌گذاری شود. آنتی‌بادی ثانویه باید در گونه‌ای متفاوت از گونه آنتی‌بادی اولیه ایجاد و به‌گونه‌ای طراحی شود که به‌طور اختصاصی با خود آنتی‌بادی (نه پروتئین مورد نظر شما) واکنش نشان دهد. در آزمایش امروز شما، آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه می‌شود به هورس‌رادیخ پراکسیداز^۳ (HRP) (goat anti-mouse peroxidase; GAMP) اضافه و اجازه داده می‌شود تا به آنتی‌بادی اولیه متصل شود و سپس مازاد آن شسته خواهد شد. HRP یک جزء کلیدی برای آنتی‌بادی ثانویه است که امکان مشاهده آن روی لکه را پس از افزودن یک بستر^۴ در مرحله بعدی فراهم می‌کند. متداول‌ترین روش تجسم مورد استفاده برای وسترن بلات، نورتابی شیمیایی تقویت‌شده^۵ (ECL) است. در ECL، لومینول^۶ توسط آنزیم HRP اکسید ANI و به یک فرآورده نورتابی شیمیایی تبدیل می‌شود (بیشتر وقت‌ها توسط یک ماده شیمیایی اضافی برای مدت طولانی‌تر نور را ساطع می‌کند). باندهای موجود در لکه‌های توسعه‌یافته توسط ECL، در نتیجه قرار گرفتن لکه در معرض فیلم یا استفاده از تصویرگرهای خاص و مجهز به دوربین‌های تشخیص لومینسانس، مشاهده می‌شوند. یک جایگزین با حساسیت کمتر برای ECL، تشخیص رنگ‌سنجی^۷ است. این اصل از این نظر مشابه است که بستر (کلروفتول)^۸، توسط HRP به یک فرآورده بنفش تبدیل می‌شود. نتیجه این امر تولید باندهای بنفش روی غشای شما است که در آن آنتی‌بادی متصل است. برای پروتئین الحاقی GST::EGFP این باند باید با وزن مولکولی نزدیک به ۵۹kDa ظاهر شود. کلون‌هایی که EGFP (کلون‌های منفی) را بیان نکرده‌اند، هیچ باندهای نشان نمی‌دهند. شکل ۱-۱۰ نمودار مراحل مربوط به انجام وسترن بلات را نشان می‌دهد.

-
1. Epitope
 2. Anti
 3. Horseradish. peroxidase. (HRP)
 4. Substrate
 5. Enhanced. chemiluminescence. (ECL)
 6. Luminol
 7. Colorimetric. detection
 8. Chloronaphthol



شکل ۱۰-۱: نمودار آزمایشی وسترن بلات. نمونه‌ها توسط SDS-PAGE جدا و سپس به غشای نیتروسلولزی منتقل می‌شوند. غشاء شسته و مسدود می‌شود و سپس با آنتی‌بادی مونوکلونال اولیه (mAb)، α -EGFP انکوبه می‌شود. آنتی‌بادی اولیه اضافی شسته و آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه شده به هورس‌رادی‌ش پراکسیداز^۱ (HRP) (goat anti-) اضافه می‌شود. آنتی‌بادی ثانویه اضافی شسته و سپس لکه با استفاده از سوبسترای پراکسیداز، کلروفتول یا نورتابی شیمیایی تقویت شده، مشاهده می‌شود.

1. Horseradish. peroxidase. (HRP)

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

الف. SDS-PAGE و وسترن بلات، بخش دوم

- رنگ پانسو

علاوه بر وسترن بلات، الگوی ایجاد باند کل پروتئین‌ها برای هر نمونه را مشاهده خواهید کرد. شما با یک رنگ محلول دای به نام پانسو قرمز (همان رنگ مورد استفاده در کلاس آزمایشگاه: جلسه اول، جهت‌گیری؛ تمرین با سمپلرها) روند رنگ‌آمیزی را انجام خواهید داد که این رنگ در مرحله مسدود کردن و به دلیل وجود مواد شوینده (Tween 20) در محلول مسدودکننده، حذف می‌شود. شما می‌توانید این تمرین آزمایشگاهی را با گروهی که غشا شما را به اشتراک گرفته، کامل کنید. از طرف دیگر، ممکن است مربی از شما بخواهد که غشاها را بعد از رنگ‌آمیزی پانسو با دقت برش دهید.

۱- لکه را از یخچال خارج کنید.

۲- لکه (سمت بالایی آن) را در یک ظرف پتری دیش مربعی قرار داده و فقط روی آن را با لکه قرمز پانسو بپوشانید (ظرف را پر نکنید). به مدت ۲ دقیقه با هم زدن ملایم انکوبه کنید.

۳- پس از ۲ دقیقه انکوباسیون، بلات را سه بار با dH_2O و از طریق هم زدن شست‌وشو دهید تا رنگ دای متصل شده با غشاء پاک شود. ممکن است باندی با وزن مولکولی تقریبی ۵۹ kDa را در کلون‌های مثبت مشاهده کنید که در کلون‌های کنترل منفی یا منفی قابل مشاهده نیست.

۴- مشاهدات لکه پانسو را در دفترچه یادداشت آزمایشگاهی خود ثبت کنید. به‌طور خاص توجه کنید: آیا چاهک‌ها به‌طور مساوی بارگذاری شده بودند؟ آیا حباب هوا روی لکه ظاهر شد؟ آیا باند مورد انتظار را در ۵۹ kDa مشاهده کردید؟

- مسدود کردن

مرحله انسداد وسترن بلات برای جلوگیری از چسبیدن غیر اختصاصی آنتی‌بادی به غشاء نیتروسلولزی ضروری است.

۱- آب را از ظرف پتری‌دیش تخلیه و ۱۰ mL محلول مسدودکننده (۵ درصد شیر خشک در TBS-T) را به آن اضافه کنید.

۲- ظرف را به مدت ۵ دقیقه روی شیکر اوربیتالی (۵۰ rpm)، انکوبه کنید.

۳- دو بار با TBS-T تازه (هر بار ۵ دقیقه) بشویید.

انکوباسیون با α -EGFP (آنتی‌بادی اولیه)

- ۱- مقداری از α -EGFP (ضد EGFP) را تهیه کنید. آنتی‌بادی را روی یخ نگه‌داری کنید.
- ۲- یک رقت ۱:۲۰۰۰ از α -EGFP را با مخلوط کردن $4 \mu\text{L}$ آنتی‌بادی با 8 mL از TBS-T ایجاد و محلول را به غشاء شسته شده اضافه کنید. ترکیب را به مدت ۱ ساعت روی شیکر اوربیتال انکوبه کنید. صفحه مضاعف شده خود را (قسمت B از این جلسه آزمایشگاهی) در طول این انکوباسیون آماده کنید.
- ۳- دو بار با TBS-T تازه (هر بار ۵ دقیقه) بشویید.

انکوباسیون با GAMP: goat anti-mouse peroxidase (آنتی‌بادی ثانویه)

- ۱- ترکیب شستشوی نهایی را دور بریزید.
- ۲- یک رقت ۱:۱۰۰۰ از goat anti-mouse antibody کونژوگ شده با HRP (GAMP) را با ترکیب کردن $8 \mu\text{L}$ از آنتی‌بادی با 8 mL از TBS-T تهیه کنید. محلول را به لکه اضافه کنید و به مدت ۴۵ دقیقه روی شیکر اوربیتال انکوبه کنید. توجه: اگر از تست تشخیصی ECL استفاده می‌کنید، چه‌بسا به غلظت کمتری از آنتی‌بادی ثانویه نیاز باشد. به‌همین منظور، پیشنهاد معرف ECL که از آن استفاده کرده است را به‌منظور تهیه محلول‌ها بررسی کنید. به‌عنوان مثال، برای معرف Bio-Rad Clarity ECL، رقت ۱:۳۰۰۰، آنتی‌بادی ثانویه برای تشخیص با استفاده از سیستم تصویربرداری Bio-Rad ChemiDoc(TM) MP کافی است.
- ۳- دو بار با TBS-T تازه (هر بار ۵ دقیقه) بشویید.

تشخیص فعالیت پراکسیداز

بسته به ابزار دقیقی که در دسترس دارید، روش مناسب تشخیص را انتخاب کنید.

گزینه الف-تشخیص رنگ سنجی

- ۱- محلول TBS-T را از لکه تخلیه کنید.
- ۲- حدود 10 mL بستر پراکسیداز را به سینی حاوی بلات اضافه کنید. رنگ (بنفش تیره) باید در عرض چند ثانیه یا چند دقیقه آشکار شود.
- ۳- در نتیجه شست‌وشو با dH_2O واکنش را متوقف کنید.
- ۴- برای حفظ رنگ، لکه را بین دو تکه کاغذ صافی خشک کنید.

۵- نتایج را در دفترچه یادداشت آزمایشگاهی خود ثبت کنید.

گزینه ب-لومینسانس شیمیایی بهبودیافته

۱- محلول را با مخلوط کردن ۳/۵ mL معرف وسترن پراکسید با ۳/۵ mL معرف وسترن

لومینول/ بهبود دهنده، در یک لوله مخروطی ۱۵ میلی‌لیتری آماده کنید. بین پایت کردن دو محلول، به حتم سرسمپلر را عوض کنید! به خوبی مخلوط کنید.

۲- TBS-T را دور بریزید و محلول را اضافه کنید تا لکه را بپوشاند. انکوباسیون را می‌توان در

همان سینی رنگ‌آمیزی آنتی‌بادی انجام داد یا می‌توان لکه را روی یک تکه پلاستیک

شفاف قرار داد و محلول را به آرامی روی لکه اضافه کرد. به مدت ۵ دقیقه (در تاریکی)

انکوبه کنید. قرار دادن یک سطل یخ خالی روی غشاء سبب خارج شدن نور از آن می‌شود.

۳- با استفاده از انبرک، غشاء را از محلول خارج کنید و اجازه دهید محلول اضافی چکه کند.

۴- در صورت قرار گرفتن در معرض فیلم -قبل از قرار گرفتن در معرض فیلم در اتاق تاریک-

غشاء را با دقت در پوشش پلاستیکی قرار دهید. اگر از تصویرگر دیجیتال استفاده می‌کنید،

غشاء را روی سطح تصویرگر قرار دهید و شیوه‌نامه‌های سیستم را برای گرفتن تصویر

بررسی کنید.

۵- نتایج را در دفترچه یادداشت آزمایشگاهی خود ثبت کنید.

کلون‌های مثبت باید باندی با وزن مولکولی تقریبی ۵۹ kDa را نشان دهند، درحالی‌که

کلون‌های منفی نباید باندی را نشان دهند. در کلون‌های مثبت، ممکن است باندهای لکه‌دار یا

متمایز را در محدوده زیر باند ۵۹ kDa مشاهده کنید. این امر به احتمال زیاد به دلیل تخریب جزئی

پروتئین الحاقی ایجاد شده است.

ب. پلیت مضاعف کلون مثبت

پلیت مضاعف یکی از کلون‌های مثبت خود را روی LB/kan قرار دهید تا هفته آینده یک تلقیح

تازه داشته باشید. پشت پلیت را برچسب بزنید و در انکوباتور ۳۷°C قرار دهید. مربی شما سپس

پلیت را پس از انکوباسیون یک شبه، در یخچال قرار می‌دهد.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- پس از انجام رنگ‌آمیزی پانسو، ممکن است یک باند متمایز با وزن تقریبی ۲۵ kDa را در کنترل منفی خود مشاهده کنید که در کنترل مثبت یا سایر باندهای کلون مثبت شما وجود ندارد. این باندها چه چیزی را نشان می‌دهد؟
- ۲- اگر پروتئین‌های مورد استفاده در SDS-PAGE دناتوره شوند، آنتی‌بادی اولیه چگونه به آن‌ها متصل می‌شود؟ آیا ساختار ثانویه برای وصل شدن آنتی‌بادی مهم نیست یا آنتی‌بادی‌هایی برای وصل شدن به نسخه دناتوره شده پروتئین‌ها ایجاد می‌شوند؟ استفاده از منابع خارجی برای فکر کردن در مورد این پرسش ضروری خواهد بود.

کلاس آزمایشگاه: جلسه یازدهم

استخراج پروتئین نو ترکیب از *Escherichia coli* با استفاده از ستون میل ترکیبی گلو تاتیون

هدف: این هفته پروتئین الحاقی GST::EGFP را با کروماتوگرافی میل ترکیبی خالص سازی خواهید کرد. شما باید یکی از کلون های خود را دست کم یک روز پیش از آزمایشگاه در محیط کشت مایع تلقیح کنید. شما یا مربی تان بیان پروتئین را با ایزوپروپیل- β -D-تیوگالاکتوپیرانوسید (IPTG) را ۳-۴ ساعت پیش از آغاز کلاس آزمایشگاه، القاء خواهید کرد.

کلاس آزمایشگاه: جلسه یازدهم-الف
جلسه موقت آزمایشگاه
تلقیح کشت‌ها برای خالص‌سازی پروتئین

۱- تمرین‌های آزمایشگاهی

کلون مثبت حاصل شده از تازه‌ترین پلیت خود را در یک ویال حاوی درپوش و با محتوی ۲ mL از محیط LB/kan تلقیح کنید. این عمل را با برداشتن باکتری از آخرین پلیت اصلی خود و با یک خلال‌دندان یا سرسمپلر استریل و قرار دادن آن در ویال حاوی LB/kan انجام دهید. به حتم درب ویال را با حروف اول اسم خود و تاریخ برجسب بزنید. اگر به‌طور کامل مطمئن نیستید که یک کلون مثبت دارید، باید از کنترل مثبت خود (pBIT) به‌عنوان کلون برای خالص‌سازی پروتئین استفاده کنید. ویال را در یک رک مشخص قرار دهید. کشت‌های تلقیح شده تا غروب قبل از دوره آزمایشگاهی در یخچال باقی خواهند ماند و سپس مربی آن‌ها را به مدت یک‌شب و در انکوباتور حاوی شیکر و در دمای ۳۷°C قرار خواهد داد.

کلاس آزمایشگاه: جلسه یازدهم-ب

استخراج پروتئین نو ترکیب از *Escherichia coli* با استفاده از ستون میل ترکیبی گلاتینون

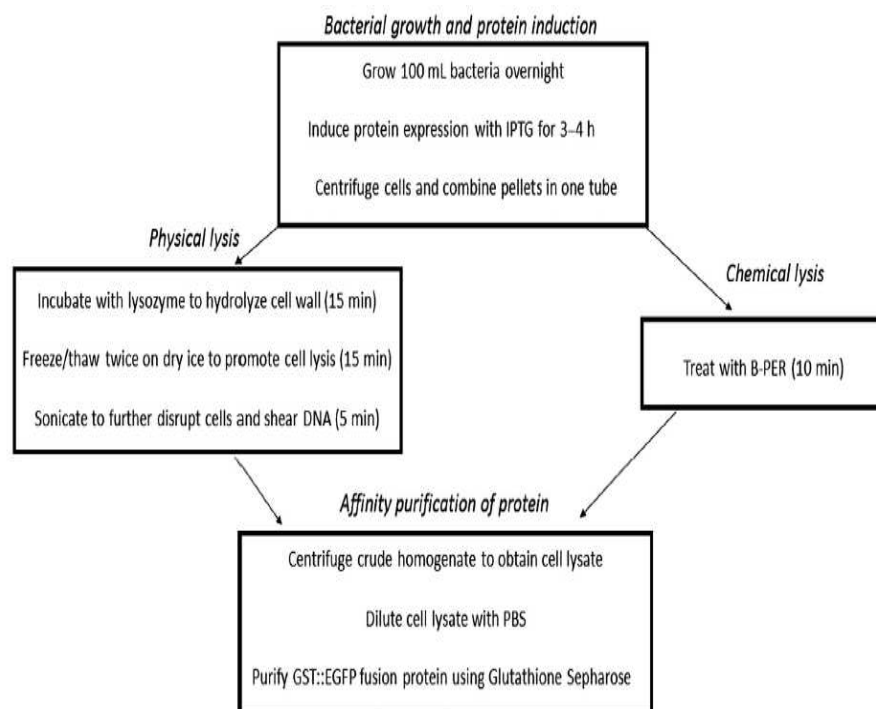
هدف: امروز شما سلول‌های باکتریایی القاء شده با IPTG را برای بیان پروتئین الحاقی GST::EGFP هضم می‌کنید و یک هموزن (سوسپانسیون از قطعات سلولی و اجزای سلولی که هنگام همگن شدن بافت به دست می‌آید-م) سلولی خام تهیه می‌کنید. در مرحله بعد، از کروماتوگرافی میل ترکیبی برای خالص‌سازی پروتئین الحاقی بیان شده GST::EGFP استفاده خواهید کرد. این امر با بهره‌گیری از میل ترکیبی بین بخش گلاتینون-S-ترانسفراز (GST) پروتئین الحاقی و تری پپتید کوچک، گلاتینون به دست می‌آید.

۱- مقدمه

اولین گام در خالص‌سازی پروتئین سلولی، هضم کردن (شکستن) سلول‌ها برای دسترسی به پروتئین است. روش‌های مختلفی برای رسیدن به هضم سلولی وجود دارد و این روش‌ها بسته به ترکیب دیواره سلولی (در برخی ارگانیسم‌ها) و غشاهای سلولی، در بین انواع سلول‌ها متفاوت است. روش‌های فیزیکی مانند فراصوت، انجماد-ذوب^۱ و فرنچ پرس^۲ (دستگاهی است که در آزمایش‌های بیولوژیکی استفاده می‌شود تا غشای پلاسمایی سلول‌ها را با عبور از دریچه‌ای باریک و تحت فشار بالا مختل کند-م) به‌طور معمول غشاهای سلولی را از طریق برش فیزیکی غشاء مختل و همگن می‌کنند. روش‌های شیمیایی شامل تیمار سلول‌ها با یک معرف است که با غشاء واکنش می‌دهد و برای آزاد کردن پروتئین‌های داخل سلولی، غشا را حل می‌کند. در بیشتر موارد، پروتئین‌های محیطی مرتبط با غشاها نیز آزاد می‌شوند. بسته به معرف مورد استفاده، پروتئین‌های غشایی سراسری^۳ بیشتر وقت‌ها حل و آزاد می‌شوند. در آزمایش امروز، از روش فیزیکی (صوت و انجماد - ذوب) یا شیمیایی (معرف استخراج پروتئین باکتری با لیزوزیم و DNase) برای هضم کردن سلول‌های باکتری و تهیه هموزن پروتئین خام استفاده خواهید کرد. به دنبال این همگن‌سازی اجزای سلولی، پروتئین هدف یعنی پروتئین الحاقی GST::EGFP، می‌تواند با تکنیک

-
1. Freeze-thawing
 2. French. press
 3. Integral. Membrane. proteins

کروماتوگرافی میل ترکیبی، خالص‌سازی شود. روش کلی تهیه عصاره (هضمات) سلولی از کشت باکتریایی در شکل ۱۱-۱ نشان داده شده است.



شکل ۱۱-۱: مروری بر تهیه عصاره (هضمات) سلولی از سلول‌های باکتریایی. زمان‌های نشان داده شده، کل زمان‌های تقریبی را برای هر یک از مراحل دخیل در هضم نشان می‌دهد.

«کروماتوگرافی میل ترکیبی» یک روش متداول برای خالص‌سازی پروتئین‌های نو ترکیب است. استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی به دلیل توسعه وکتورهای بیانی متعدد حاوی توالی‌هایی که ممکن است به‌عنوان تگ میل ترکیبی عمل کنند، گسترده شده است. این وکتورهای بیانی حاوی توالی DNA هستند که یک تگ میل ترکیبی (همچنین تگ الحاقی نیز نامیده می‌شود) را یکر است در بالادست یا پایین‌دست مکان چندگانه کلون‌سازی کد می‌کند. ژن مورد نظر با توجه به تگ میل ترکیبی، باید در جهت‌گیری و چارچوب خوانش صحیح به وکتور درج شود. هنگام القا شدن بیان پروتئین، یک پروتئین الحاقی تولید می‌شود. پروتئین الحاقی حاوی دو بخش پلی‌پپتیدی است. یکی مربوط به تگ میل ترکیبی و دیگری مربوط به پروتئین مورد نظر. تگ‌های میل ترکیبی

متعددی به‌منظور بررسی‌های تحقیقاتی وجود دارد که دو مورد از رایج‌ترین آن‌ها GST (تگ استفاده شده در این آزمایش) و هگزاهیسیتیدین^۱ (یک سری از شش باقیمانده هیستیدین) هستند. pET-41a حاوی ژن GST (*gst*) یکر است در بالادست ناحیه پلی‌لینکر (مکان کلونینگ چندگانه) است. هنگامی که یک ژن معین (در ای مورد، *egfp*) در جهت‌گیری و چارچوب خوانش صحیح در پلی‌لینکر وارد شود، وکتور می‌تواند یک پروتئین الحاقی را بیان کند. پروتئین الحاقی که بیان خواهیم کرد، GST::EGFP خواهد بود. ما از بخش GST پروتئین الحاقی GST::EGFP استفاده خواهیم کرد تا آن را از طریق کروماتوگرافی میل ترکیبی خالص‌سازی کنیم.

در اصل، کروماتوگرافی میل ترکیبی بر پایه وصل شدن یک لیگاند زیست‌اختصاصی به مولکول مورد نظر عمل می‌کند. لیگاند GST، گلوپتاتئون است که به‌صورت کووالانسی به یک ماتریکس پشتیبانی متصل می‌شود که تا حد امکان، جداسازی مولکول‌های اتصال دهنده گلوپتاتئون را از سایر اجزای سلولی فراهم کند.

مراحل اصلی کروماتوگرافی میل ترکیبی این آزمایش، در شکل ۱۱-۲ نشان داده شده است.

۱- تزریق نمونه. نمونه حاوی مخلوطی از پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های سلولی به همراه

پروتئین نو ترکیب مورد نظر است. نمونه‌ای که استفاده خواهید کرد، هموژن خام پاک شده

از کشت باکتری القا شده و حاوی پروتئین الحاقی GST::EGFP شما است.

۲- جذب مولکول‌ها با میل ترکیبی برای لیگاند. مولکول‌هایی با میل ترکیبی معین برای لیگاند

ایستا، به رزین میل ترکیبی متصل می‌شوند درحالی‌که سایر مولکول‌ها از آن عبور

می‌کنند. تنها پروتئین الحاقی GST::EGFP به رزین میل ترکیبی مرتبط با گلوپتاتئون

متصل می‌شود.

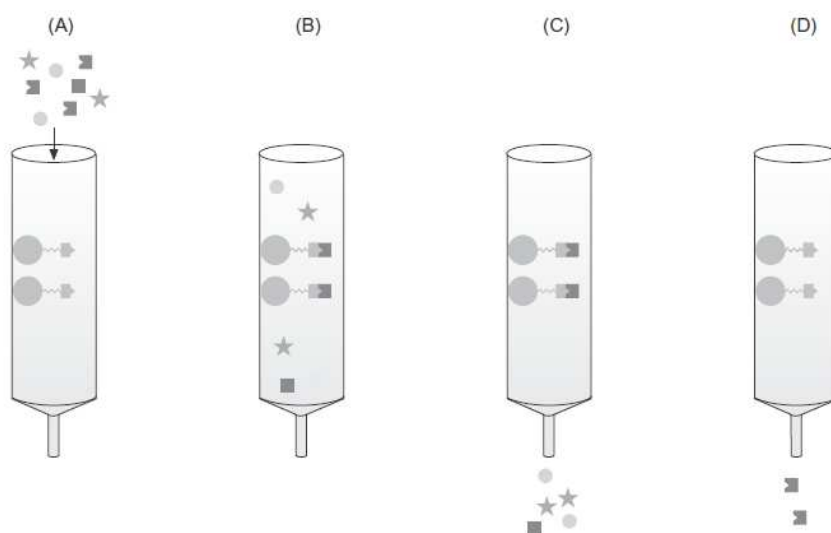
۳- ناخالصی‌ها را از ستون شست‌وشو دهید. مولکول‌های بدون میل ترکیبی (ضعیف، غیر

اختصاصی) برای لیگاند از ستون شسته می‌شوند. تمام مولکول‌های سلولی، غیر از پروتئین

الحاقی GST::EGFP از ستون شسته می‌شود و این پروتئین در وصل شدن با گلوپتاتئون،

در ستون باقی خواهد ماند.

۴- شستشوی مولکول (های) هدف از ستون. یک معرف زیست اختصاصی به رزین میل ترکیبی متصل می‌شود و مولکول‌های متصل به لیگاند را از جای خود خارج می‌کند و شستشو می‌دهد. پروتئین الحاقی GST::EGFP با استفاده از محلول گلوپاتین کاهش می‌یابد و از ستون شسته می‌شود.

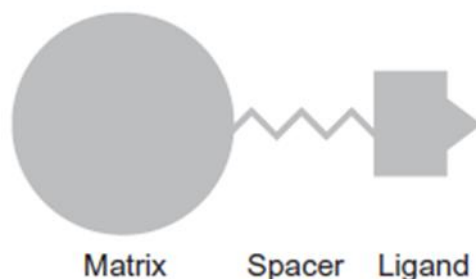


شکل ۱۱-۲: مراحل اصلی کروماتوگرافی میل ترکیبی: (A) تزریق نمونه، (B) جذب مولکول (های) هدف، (C) شستشوی ناخالصی‌ها و (D) شستشوی مولکول (های) هدف.

ماده‌ای که در رزین میل ترکیبی را ایجاد می‌کند دارای سه بخش ایجاد کننده پیوند کوالانسی است که عبارت‌اند از: ماتریکس، اسپیسر^۱ (فضا دهنده) و لیگاند. ماتریس پشتیبانی برای تعلیق لیگاند در ستون عمل می‌کند. ماتریس از لحاظ فیزیکی باید سخت، از لحاظ بیوشیمیایی بی‌اثر و نسبت سطح به حجم بالایی داشته باشد. متداول‌ترین ماتریس پشتیبانی سفارز بوده که از دانه‌های آگارز کوچک و متقاطع تشکیل شده است. فضادهنده یک زنجیره کربنی است که لیگاند را به ماتریکس متصل می‌کند. هدف فضادهنده تحویل لیگاند به مولکول مورد نظر است. اگر هیچ فضادهنده‌ای وجود نداشته یا اگر خیلی کوتاه باشد، لیگاند در ماتریس فرو رفته و ممکن است برای وصل شدن به مولکول مورد نظر از دسترس خارج شود. از سویی، اگر اندازه فضادهنده بیش از حد طولانی باشد، ممکن است از طریق فعل و

1. Spacer

انفعالات آب‌گریزی به مولکول‌های نامطلوب تمایل داشته باشد. بزرگی اندازه فضا دهنده ایده‌آل تنها به اندازه‌ای است که لیگاند را نشان دهد و به اندازه‌ای کوتاه است که از نظر بیوشیمیایی خنثی بماند. آنچه در شکل ۳-۱۱ نشان داده شده است، به عنوان «رزین میل ترکیبی» شناخته می‌شود.



شکل ۳-۱۱: رزین میل ترکیبی از یک لیگاند زیست اختصاصی، یک ماتریس پشتیبانی و یک فضا دهنده بیوشیمیایی بی‌اثر تشکیل شده است.

لیگاند زیست اختصاصی رزین میل ترکیبی، به‌طور خاص به مولکول مورد نظر متصل می‌شود. بسته به نوع مولکولی که قرار است خالص‌سازی شود، می‌توان از کلاس‌های مختلفی از لیگاندها استفاده شود. به‌عنوان مثال، در صورت نیاز به خالص‌سازی یک آنزیم، لیگاند ممکن است حاوی سوبسترا (بستر)، بازدارنده یا کوفاکتور آنزیمی باشد. در صورت نیاز به خالص‌سازی یک آنتی‌بادی، ممکن است از یک آنتی‌بادی هم‌ریشه^۱ به‌عنوان لیگاند استفاده شود. در صورت خالص‌سازی یک نوکلئیک اسید، لیگاندها می‌توانند توالی‌های اسید نوکلئیک مکمل باشند (به‌عنوان مثال، یک ستون oligodT برای خالص‌سازی RNA پیام‌رسان یوکاریوتی (mRNA) استفاده می‌شود). رزین‌های میل ترکیبی را می‌توان در آزمایشگاه و از طریق وصل شدن شیمیایی رزین‌های واکنش‌دهنده با لیگاند ایجاد کرد، اما در این آزمایش، شما از ماتریس میل ترکیبی تجاری استفاده خواهید کرد. از آنجایی که پروتئین شما با آنزیم GST تگ شده است، لیگاند زیست اختصاصی که استفاده خواهید کرد، سوبسترای (بستر) آنزیم، گلو تاتیون است.

آخرین مورد هنگام طراحی یک شیوه‌نامه خالص‌سازی^۲ میل ترکیبی، موضوع ظرفیت ستون است. ظرفیت ستون به تعداد مولکول‌های لیگاند در دسترس برای وصل شدن اشاره دارد. در عمل، این امر مربوط به مقدار رزین مورد استفاده برای فرآیند خالص‌سازی است. انواع لیگاندهای مختلف،

1. Cognate. antigen

2. Purification. protocol

قابلیت وصل شدن متفاوتی خواهند داشت. اگر لیگاند کافی برای وصل شدن همه مولکول‌های هدف در نمونه وجود نداشته باشد، برخی از مولکول‌های هدف در ستون شسته می‌شوند و از بین می‌روند. از سویی، اگر تعداد زیادی محل وصل شدن لیگاند در مقایسه با مولکول‌های هدف در نمونه وجود داشته باشد، مولکول‌های نمونه غیر هدف با میل ترکیبی کمتر برای لیگاند ممکن است بتوانند همراه با مولکول‌های هدف به رزین میل ترکیبی متصل شوند. اگر این مولکول‌های غیر هدف در طول مراحل شست‌وشو متصل بمانند، همراه با مولکول‌های هدف در طول شست‌وشو شسته می‌شوند. این امر سبب کاهش خلوص خواهد شد. در حالت بهینه، تعداد محل‌های وصل شدن لیگاند به‌طور دقیق باید برابر با تعداد مولکول‌های هدف در نمونه باشد. در عمل، دستیابی به این امر غیرممکن است. ظرفیت ستون در بیشتر موارد نیاز به بهینه‌سازی تجربی دارد، زیرا سطوح بیان پروتئین‌های بیان شده مختلف که از پروموتورهای مختلف و تحت شرایط رشدی متفاوت ایجاد شده‌اند، متفاوت است. فرآیند SDS-PAGE تشخیصی که در هفته آینده انجام خواهید داد، به شما کمک کرده تا خلوص نمونه خود را تجزیه و تحلیل کنید. در صورتی که مایع شست‌وشو خالص نباشد و یا اگر مقدار زیادی از پروتئین هدف در واکنش شست‌وشو از دست رفته است، شما می‌توانید شیوه‌نامه خالص‌سازی را با تنظیم ظرفیت ستون یا شدت شست‌وشوها تغییر دهید.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

الف. رشد کشت سوسپانسیون باکتریایی برای خالص‌سازی پروتئین الحاقی

مربی، کشت شبانه شما را در ۱۰۰ mL از محیط YT/kan/IPTG $2 \times$ تلقیح و به مدت ۳-۴ ساعت و در دمای 37°C ساعت انکوبه می‌کند.

ب. برداشت کشت‌های تلقیح شده IPTG

۱- کشت خود را (۳۵-۴۵ میلی‌لیتر در هر لوله) بین دو لوله سانتریفیوژ بزرگ که قادر به تحمل نیروی $10000 \times g$ هستند تقسیم کنید. کشت اضافی را می‌توان در «قبرستان باکتریایی»^۱ دور انداخت.

۲- باکتری‌ها را با چرخاندن در یک سانتریفیوژ با سرعت بالا به مدت ۵ دقیقه در نیروی $10000 \times g$ و در دمای 4°C به حالت کلاف تبدیل کنید.

۳- مایع رویی شفاف را خارج کنید و داخل قبرستان باکتری‌ها بریزید.

1. Bacterial. graveyard

۴- دو کلاف را با استفاده از روش زیر به یک ویال میکرو سانتریفیوژ منتقل کنید. حدود ۰/۷۵ mL از محیط ۲×YT (یا LB) را به یک کلاف باکتری اضافه کنید. این سوسپانسیون سلولی را به کلاف دوم منتقل و با پایپت کردن دوباره آن‌ها را تعلیق کنید. اکنون سوسپانسیون را به یک ویال میکرو سانتریفیوژ ۱/۵ mL منتقل کنید.

۵- وزن ویال حاوی باکتری را با یک ویال دیگر (حاوی آب) متعادل کنید و به مدت ۲ دقیقه در میکروسانتریفیوژ با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm قرار دهید تا باکتری‌ها به حالت کلاف تبدیل شوند. مایع شفاف رویی را با تخلیه یا پایپت کردن خارج کنید. ویال حاوی باکتری را روی یک حوله کاغذی معکوس کنید و حدود ۲ دقیقه زمان دهید تا مایع باقیمانده خارج شود.

شکستن سلول‌های باکتریایی

دو روش مختلف برای شکستن سلول‌ها و آماده‌سازی هموژن خام توصیف شده است که عبارت‌اند از: روش فیزیکی (صوت و انجماد - ذوب) و روش شیمیایی (درمان با معرف B-PER). تنها یکی از این روش‌ها را انتخاب کنید.

گزینه الف - فراصوت و انجماد - ذوب (روش فیزیکی)

۱- مقدار ۰/۷۵ mL از بافر نمکی فسفات ۱× (PBS) بسیار سرد (به همراه ۲mM از Pefabloc، یک مهار کننده پروتئاز) را کلاف اضافه کنید. به‌منظور تعلیق کلاف‌ها، ورتکس کنید.

۲- مقدار ۱۵ µL لیزوزیم ۱۰ mg/mL (غلظت نهایی ۲۰۰ µg/mL) اضافه کنید. ورتکس کنید و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ مرطوب (H₂O) انکوبه کنید.

۳- ویال میکروسانتریفیوژ را روی یک بستر یخ خشک (CO₂) قرار دهید تا منجمد شود.

۴- ویال را با گرم کردن آن در کف دست خود ذوب کنید. به‌محض ذوب شدن نمونه، دوباره آن را روی یخ خشک فریز کنید.

۵- ویال را همان‌طور که در مرحله ۴ توضیح داده شد، ذوب و به شکل مایع روی یخ مرطوب نگهداری کنید. انجماد و ذوب به آزادسازی پروتئین الحاقی و در نتیجه ایجاد اختلال (شکست) در دیواره سلولی باکتری کمک می‌کند. احتیاط: قبل از فعال کردن دستگاه سونیکاتور در مرحله ۶، محافظ گوش قرار دهید.

۶- شما از دستگاه سونیکاتور با نوک غوطه‌ور (پروب) استفاده خواهید کرد. فراصوت به آزادسازی پروتئین الحاقی از سلول‌های باکتریایی کمک می‌کند و ویسکوزیته محلول را با

برش DNA کروموزومی کاهش می‌دهد. توجه: ممکن است یک تنظیم حداکثری توان برای این مورد وجود داشته باشد. مطمئن شوید که از این تنظیم تجاوز نخواهید کرد. شرایط استفاده از دستگاه در اینجا مشخص نشده است، زیرا شرایط بسته به دستگاه سونیکاتور معین مورد استفاده، متفاوت خواهد بود - به احتمال زیاد شما به علت وجود مقادیر اندک نمونه، از تنظیم کم استفاده خواهید کرد. در ابتدا، نوک دستگاه را با آب مقطر شسته و از دستمال مرطوب کیم برای خشک کردن آن استفاده کنید. نوک را در محلول حاوی باکتری فرو کنید، اما اجازه ندهید نوک آن با دو طرف ویال تماس پیدا کند. محلول یخ سرد را به مدت ۱۵ ثانیه در معرض فراصوت قرار دهید و ویال را داخل یخ برگردانید. فراصوت محلول را گرم کنید و مهم است که برای مدت‌زمان کوتاهی این عمل را انجام دهید. در مجموع سه سیکل سونیکاسیون را انجام دهید و بین هر پالس ۱۵ ثانیه‌ای، ویال را به یخ برگردانید. این کسر نشان دهنده هموژن خام است.

گزینه ب - معرف استخراج پروتئین باکتریایی، B-PER (روش شیمیایی)

- ۱- معرف کامل B-PER را با افزودن Pefabloc به غلظت نهایی ۲mM آماده کنید. به ازای هر گرم کلاف سلولی، ۵ mL معرف B-PER اضافه کنید و کلاف را دوباره با پایپت کردن معلق کنید تا محلول همگن شود.
- ۲- محلول را در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه با تکان دادن ملایم انکوبه کنید. این مخلوط نشان دهنده هموژن خام است.

ت. حذف مواد نامحلول از هموژن خام

- ۱- هموژن خام را با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm در یک میکروسانتریفیوژ یخچال‌دار و یا در یک میکروسانتریفیوژ که در جعبه سرد (۴°C) و به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شده است سانتریفیوژ کنید تا مواد نامحلول از بین برود.
- ۲- تمام مایع رویی را به یک ویال میکروسانتریفیوژ تازه منتقل کنید و با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm در سانتریفیوژ یخچال یا میکروسانتریفیوژ موجود در جعبه سرد (۴°C) و به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ کنید. اطمینان از این امر که نمونه بارگذاری شده روی ستون میل ترکیبی، عاری از ذرات نامحلول باشد، بسیار حائز اهمیت است. مواد نامحلول در کلاف سلولی در صورت بارگذاری شدت در ستون میل ترکیبی، سبب کاهش جریان در ستون خواهد شد. این هموژن خام تمیز شده تحت عنوان هضم سلولی نامیده می‌شود.

۳- هضم سلولی را به یک ویال مخروطی ۱۵ mL منتقل و ۳ mL PBS اضافه کنید. رقیق کردن نمونه پیش از افزودن به ستون، بازدهی وصل شدن نمونه به ستون را افزایش می‌دهد.

۴- حجم تقریبی عصاره سلولی (پس از رقیق شدن) را در دفترچه یادداشت آزمایشگاهی خود یادداشت کنید.

۵- مقدار ۵۰ μ L از عصاره سلولی را برای تجزیه و تحلیل توسط SDS-PAGE بردارید. مقدار مناسبی از نمونه SDS-PAGE را به نمونه اضافه کنید، ویال را برچسب بزنید و در دمای ۲۰°C نگهداری کنید.

۶- ۱۰۰ μ L اضافی از عصاره سلولی (برای تجزیه و تحلیل فلورسانس یا پروتئین) را به یک ویال میکروسانتریفیوژ برچسب دار منتقل و در دمای ۲۰°C نگهداری کنید.

ج. خالص‌سازی پروتئین با کروماتوگرافی میل ترکیبی

رزین میل ترکیبی و بافرها باید پیش از استفاده در دمای اتاق تراز شوند.

۱- مربی شما ترکیبی از رزین گلوپاتیون سفاروز (رزین میل ترکیبی) را در اختیار شما قرار می‌دهد. شما باید حجم تقریبی ۰/۷۵ mL از دانه‌های ته‌نشین شده را در اختیار داشته باشید. توجه: دانه‌ها شکننده هستند.

۲- ستون کروماتوگرافی را سرهم‌بندی کنید. شیر توقف را به پایین ستون وصل کنید. ستون سرهم‌بندی شده را روی پایه حلقه‌ای نصب کنید. (اگر شیر در اختیار شما نیست، بسیاری از ستون‌های یک‌بار مصرف دارای سوراخ‌گیرهایی است که می‌توان آن‌ها را به پایین ستون وصل کرد تا جریان مایع را از طریق ستون متوقف کند).

۳- مطمئن شوید که شیر توقف بسته است. رزین گلوپاتیون سفاروز را برعکس کنید تا به آرامی مخلوط شود. مخلوط یکنواخت مواد حاوی رزین میل ترکیبی را به ستون اضافه کنید. دریچه توقف را باز کنید تا اجازه دهید بافر داخل محفظه زباله چکه کند. هنگامی که سطح بافر درست بالاتر از رزین میل ترکیبی قرار گرفت، شیر را ببندید. همچنین مطمئن شوید که ستون شما نشستی ندارد. در صورت وجود این امر، شاید نیاز باشد که شیر را تعویض کنید.

۴- ستون را با ۵ mL PBS بشوئید. با باز نگه‌داشتن شیر، اجازه دهید سطح مایع تا بالای بستر رزین پایین بیاید. شیر توقف را ببندید.

۵- هضم سلولی خود را به ستون اضافه و دریچه را باز کنید. محلول خارج شده را در یک ویال مخروطی ۱۵ mL و با برچسب «FT» جمع‌آوری کنید. هنگامی که سطح بافر درست بالای

رزین ته‌نشین شده قرار گرفت، میله را ببندید. بیشتر پروتئین‌های *Escherichia coli* به رزین میل ترکیبی گلوپاتینون متصل نمی‌شوند، بنابراین در محلول خروجی یافت می‌شوند. در کروماتوگرافی میل ترکیبی، وصل شدن پروتئین فیوژن به لیگاند به جریان محلول با سرعت آهسته نیاز دارد. اجازه دادن به نمونه برای عبور از ستون توسط جریان گرانشی، این امر را محقق می‌کند. قرار دادن نمونه داخل ستون با سرعتی سریع‌تر، کارایی وصل شدن مولکول هدف به لیگاند را کاهش می‌دهد. فرمول‌های خاصی از رزین‌های میل ترکیبی برای خالص‌سازی با فشار بالا، همانند کروماتوگرافی سریع پروتئین مایع^۱ و یا کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا^۲ (HPLC) مورد نیاز است.

۶- محلول خروجی را دوباره به ستون اعمال کنید و سپس آن را در همان ویال ۱۵ mL جمع‌آوری کنید. پس از پایان خروج محلول، آن را روی یخ نگه‌داری کنید. عبور دادن نمونه خود از روی ستون برای بار دوم، مقدار پروتئین الحاقی GST::EGFP متصل شده به رزین میل ترکیبی را افزایش می‌دهد، بنابراین بازدهی شما افزایش پیدا می‌کند.

۷- مقدار ۵۰ µL از محلول خروجی را برای تجزیه و تحلیل توسط SDS-PAGE بردارید. مقدار مناسبی از بافر نمونه SDS-PAGE را به نمونه و در یک ویال برچسب دار اضافه کنید و در دمای ۲۰°C نگه‌داری کنید.

۸- ۱۰۰ µL اضافی از محلول خروجی را (برای تجزیه و تحلیل فلورسانس یا پروتئین) به یک ویال میکروسانتریفیوژ برچسب دار منتقل و در دمای ۲۰°C نگه‌داری کنید.

۹- ۵mL از PBS را به ستون اضافه و شیر را باز کنید و محلول‌های خروجی را جمع‌آوری کنید، ۱mL از هر کدام را در ویال‌ها و با برچسب W1-W5 بریزید و در دمای ۲۰°C منجمد کنید. هنگامی که سطح بافر درست بالای دانه‌های ته‌نشین شده قرار گرفت، شیر را ببندید. در اولین مرحله شست‌وشو، شما در واقع به دلیل حجم خالی ستون، باقیمانده محلول خروجی را جمع‌آوری خواهید کرد. حجم خالی به حجم مایع محبوس شده در دانه‌ها اشاره دارد که با اضافه شدن مایع بیشتر به ستون، جایگزین می‌شود؛ بنابراین، اولین مرحله (بخش) شست‌وشوی شما حاوی مقدار قابل توجهی از پروتئین کل خواهد بود. در بقیه مراحل و بخش‌های شست‌وشو، چه‌بسا مقادیر کمتری از پروتئین کل را در اختیار خواهید داشت. باید امیدوار باشید که پروتئین الحاقی GST::EGFP اندکی در محلول خروجی یا شست‌وشو داشته باشید، زیرا پروتئین در این مرحله باید به ستون متصل شود.

1. Fast. liquid. protein. chromatography

2. High. performance. liquid. chromatography. (HPLC)

۱۰- ستون را با ۵ mL از PBS دیگر بشوید تا هرگونه پروتئین غیر GST را حذف کنید. مقداری از انتهای این شست‌وشو (نزدیک به ۲۰۰ μ L) را جمع‌آوری کنید و آن را به دو ویال میکروسانتریفیوژ با برچسب «آخرین شست‌وشو» انتقال دهید (۵۰ μ L برای SDS-PAGE و ۱۰۰ μ L برای تجزیه و تحلیل فلورسانس/پروتئین). از این امر برای اطمینان از عدم جابجایی GST::EGFP از ستون، پیش از شست‌وشو استفاده خواهد شد. هنگامی که سطح بافر درست در بالای دانه‌های ته‌نشین‌شده قرار گرفت، میله را ببندید. محلول خروجی از این مرحله شست‌وشوی ۵ mL (به جز مقدار ذخیره شده) را دور بریزید.

۱۱- شش ویال میکروسانتریفیوژ برای نمونه‌های شسته‌شده (شوینده‌ها) را تحت عنوان E1-E6 برچسب‌گذاری کنید.

۱۲- مقدار ۳ mL از بافر شست‌وشوی GST (۱۰ mM + PBS) گلوکاتینون کاهش‌یافته) را به ستون اضافه کنید. مقدار تقریبی ۰/۵ mL از هر لوله برچسب خورده خود را جمع‌آوری کنید. گلوکاتینون کاهش‌یافته، عامل رقابتی در بافر شست‌وشو است که پروتئین الحاقی GST::EGFP شما را از ستون میل ترکیبی جایگزین می‌کند.

۱۳- ویال‌های خود را در دستگاه ترانسیلیمیناتور UV و در اتفاقی با نور کم قرار دهید. به حتم از محافظ صورت در برابر نور UV استفاده کنید. ویالی که دارای فلورسانس سبز است را در دفترچه یادداشت خود ثبت کنید.

۱۴- نمونه‌های خود (هموژن خام، جریان عبوری، شست‌وشو، شویش) را برای تجزیه و تحلیل بیشتر در دمای ۲۰°C- نگهداری کنید.

نکته برای صرفه‌جویی در زمان: اگر امروز وقت داشتید، به کلاس آزمایشگاه جلسه دوازدهم - تجزیه و تحلیل جزیهای خالص‌سازی رجوع کنید تا ببینید کدام نمونه‌ها را روی ژل SDS-PAGE بارگذاری خواهید کرد. با افزودن بافر نمونه SDS-PAGE به نمونه‌های لازم در ویال‌های جداگانه، نمونه‌های خود را برای تجزیه و تحلیل ژل در هفته آینده آماده کنید.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- اگر ظرفیت ستون خیلی زیاد یا خیلی کم باشد، چه اتفاقی روی می‌دهد؟
- ۲- هنگامی که می‌خواهید دانه‌ها را به ستون اضافه کنید، به‌طور تصادفی رزین گلوتاتیون سفاروز می‌ریزید. متأسفانه رزین گلوتاتیون سفاروز اضافی در هیچ کجا یافت نمی‌شود! از چه روش‌های دیگری برای کروماتوگرافی میل ترکیبی می‌توانید به‌منظور خالص‌سازی پروتئین الحاقی خود استفاده کنید؟

کلاس آزمایشگاه: جلسه دوازدهم

تجزیه و تحلیل جزهای خالص سازی

این هفته شما جزهای خالص سازی خود را با الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید دودسیل سولفات سدیم (SDS-PAGE) تجزیه و تحلیل خواهید کرد و مقدار پروتئین الحاقی GST::EGFP خالص شده را تعیین می کنید؛ همچنین یک پلیت مضاعف تازه از یکی از کلون های مثبت خود را برای استفاده در هفته آینده خواهید ساخت.

کلاس آزمایشگاه: جلسه دوازدهم-الف تجزیه و تحلیل جزهای خالص‌سازی

هدف: امروز جزهای خالص‌سازی خود را با استفاده از SDS-PAGE تجزیه و تحلیل می‌کنید و مقدار پروتئین الحاقی GST::EGFP خالص‌سازی شده را با استفاده از فلورسانس یا سنجش پروتئین برادفورد^۱ تعیین می‌کنید. SDS-PAGE این امکان را به شما می‌دهد که خلوص جزهای شویش‌شده را تخمین بزنید و تعیین کنید که آیا پروتئین الحاقی نوترکیب در طی مراحل شست‌وشو از بین رفته است یا خیر؟ سنجش پروتئین فلورسانس یا برادفورد این امکان را به شما خواهد داد که بازدهی خالص‌سازی پروتئین الحاقی GST::EGFP را تعیین کنید. (نکته مهم: در طول تمرین‌های آزمایشگاهی مختلف در این کتاب، از دو واژه شست‌وشو^۲ و شویش^۳ استفاده شده است که اندکی باهم تفاوت دارند. در طی واکنش شست‌وشو از بافر شست‌وشو^۴ استفاده می‌شود که برای به حداقل رساندن وصل شدن پروتئین‌های غیر اختصاصی در طول فرآیند خالص‌سازی به کار می‌رود، اما در فرآیند شویش، از بافر شویش^۵ استفاده می‌شود که برای شست‌وشو مولکول‌های هدف و اختصاصی مورد استفاده قرار می‌گیرد-م).

۱- مقدمه

هدف از این جلسه آزمایشگاهی تعیین کمیت پروتئین الحاقی GST::EGFP خالص‌سازی شده، همچنین تعیین خلوص نمونه‌های حاصل از شویش است. شما همچنین جزهای حاصل شده از میل ترکیبی را بررسی خواهید کرد تا ببینید آیا پروتئین الحاقی شما در جزهای غیر متصل یا شست‌وشو وجود دارد یا خیر. در این آزمایش‌ها از دو روش مکمل استفاده خواهید کرد: SDS-PAGE پس از رنگ‌آمیزی پروتئین کل و فلورسانس یا تشخیص پروتئین برادفورد.

در کلاس آزمایشگاه: جلسه‌های ۹ و ۱۰، شما SDS-PAGE را روی هضم‌های ترادیدی شده خود انجام دهید و سپس پروتئین‌ها را به غشای نیتروسلولزی منتقل کنید و به‌منظور تأیید پروتئین الحاقی GST::EGFP، از آنتی‌بادی ضد GFP استفاده کنید. در آن مورد خاص، ما نگران وجود یا عدم وجود پروتئین (های) دیگر در نمونه نبودیم. ما فقط می‌خواستیم تأیید کنیم که GST::EGFP بیان شده است یا خیر. هدف از انجام SDS-PAGE در این جلسه آزمایشگاهی،

1. Bradford, protein. assay

2. Wash.

3. Elute.

4. Wash. Buffer

5. Elution. Buffer

تعیین این امر است که کدام جز خالص‌سازی حاوی پروتئین الحاقی است، همچنین تعیین اینکه آیا پروتئین الحاقی فاقد پروتئین‌های آلوده کننده در جزهای شویش شده است یا خیر؟ ما از آنتی‌بادی استفاده نخواهیم کرد، زیرا می‌خواهیم تمام پروتئین‌های موجود در جزهای شست‌وشو و شویش را بررسی کنیم. برای رسیدن به این هدف، ما از معرف GelCode Blue، یک دای‌کلوئیدی G-250 مبتنی بر کوماسی^۱ (یک رنگ دای در بررسی‌های SDS-PAGE) استفاده می‌کنیم که به تمام پروتئین‌های ژل متصل می‌شود. عصاره سلولی^۲ (CL) شامل تمام پروتئین‌های سلولی، از جمله پروتئین الحاقی است. در حالت ایده‌آل، محلول خروجی^۳ (FT) و شست‌وشوها حاوی تمام پروتئین‌های سلولی به‌جز پروتئین الحاقی هستند و جزهای شویش تنها حاوی پروتئین الحاقی‌اند. وجود پروتئین الحاقی در جزهای FT و/یا شست‌وشو نشان می‌دهد که ستون حاوی رزین میل ترکیبی کمی است و یا سرعت جریان برای وصل شدن پروتئین الحاقی به رزین بسیار زیاد است. وجود باندهای پروتئینی اضافی در جزهای شویش می‌تواند ناشی از وجود دلایل زیر باشد: شست‌وشوی ناقص ستون؛ پروتئولیز پروتئین الحاقی؛ وصل شدن غیراختصاصی پروتئین‌ها به رزین میل ترکیبی یا خالص‌سازی مشترک پروتئین‌های درونی *Escherichia coli* که با پروتئین الحاقی مرتبط است. برای تعیین کمیت پروتئین GST::EGFP خالص‌سازی شده از یکی از دو روش زیر استفاده خواهید کرد: اندازه‌گیری فلورسانس یا تجزیه و تحلیل پروتئین برادفورد. این دو روش مکمل یکدیگرند و به شما امکان می‌دهند مقدار پروتئین الحاقی خالص‌سازی شده را تعیین کنید. تجزیه و تحلیل فلورسانس به‌طور اختصاصی حضور پروتئین الحاقی GST::EGFP را برآورد می‌کند، درحالی‌که تجزیه و تحلیل پروتئین برادفورد، کمیت تمام پروتئین‌های موجود در یک نمونه معین را برآورد می‌کند.

الف. تعیین کمیت پروتئین توسط فلورسانس

برای تعیین مقدار پروتئین الحاقی GST::EGFP خالص‌سازی شده، می‌توانید یکراست فلورسانس EGFP را در نمونه‌های حاصل شده در طی خالص‌سازی اندازه‌گیری کنید. علاوه بر این، با تجزیه و تحلیل مقدار فلورسانس در سایر جزها، یعنی FT و شست‌وشو، می‌توانید به‌طور کمی تعیین کنید که چه مقدار از مواد اولیه خود را در طول شیوه‌نامه خالص‌سازی از دست داده‌اید. همان‌گونه که پیش‌ازاین بحث شد، پروتئین EGFP پس از برانگیخته شدن توسط نور در طول موج‌های معین، نور فلورسانس را ساطع می‌کند. این پروتئین در طول موج ۴۸۸ nm (نور آبی)، به‌صورت بهینه

1. Coomassie-based. dye

2. Cell. lysate. (CL)

3. Flow. -through. (FT)

برانگیخته می‌شود. از سویی در طول موج ۵۰۷ nm (مربوط به نور سبز)، کلنی‌ها و بخش‌های خالص‌سازی را به رنگ سبز نمایان می‌کند. برای تعیین کمیت فلورسانس EGFP در نمونه‌های خود، می‌توانید از یک میکروپلیت‌خوان فلورسانس^۱ استفاده کنید. با توجه به این امر که پروتئین الحاقی شما در واقع GST::EGFP است، خواص فلورسنت آن باید با خواص EGFP مشابه باشد. میکروپلیت‌خوان، مجهز به فیلترهایی است که تنها به نور با طول‌موج مشخصی اجازه عبور می‌دهد. در آزمایش شما، فیلتر برانگیختگی شما، یک فیلتر میان‌گذر^۲ ۴۸۵/۲۰ است. این بدان معنی است که نور در طول‌موج‌های بین ۴۶۵ تا ۵۰۵ نانومتر از فیلتر عبور می‌کند و بقیه موج‌های نوری مسدود می‌شوند. این نور برای برانگیختگی EGFP موجود در نمونه شما استفاده می‌شود. پس از تحریک، EGFP فلورسانس شده و نور ساطع شده پیش از تشخیص توسط دستگاه، از فیلتر انتشار^۳ عبور می‌کند. فیلتر انتشار یک فیلتر میان‌گذر ۵۲۸/۲۰ است که به نور با طول‌موج‌های ۵۰۸ تا ۵۴۸ نانومتر اجازه عبور می‌دهد. همان‌گونه که از مقایسه فیلترها قابل استنتاج است، نور ناشی از برانگیختگی توسط فیلتر انتشار غربال می‌شود؛ در نتیجه می‌توان اطمینان حاصل کرد که نور شناسایی‌شده توسط پلیت‌خوان، به‌طور اختصاصی با فلورسانس نمونه شما مطابقت دارد.

مشابه دیگر روش‌های استاندارد سنجش پروتئین (مانند سنجش برادفورد)، برای تعیین کمیت فلورسانس، ابتدا یک منحنی استاندارد را با استفاده از مقادیر حاصل‌شده از پروتئین فلورسنت نوترکیب، EGFP، ایجاد می‌کنید. سپس مقدار فلورسانس در نمونه‌های ناشناخته شما، با مقایسه با منحنی استاندارد تعیین می‌شود. به خاطر داشته باشید، هنگام تعیین کمیت فلورسانس، به جای اندازه‌گیری پروتئین کل، فقط مقدار پروتئین الحاقی GST::EGFP در نمونه‌های خود را اندازه‌گیری می‌کنید. با ترکیب داده‌های فلورسانس و نتایج حاصل‌شده از SDS-PAGE، هم میزان خلوص نسبی نمونه‌های خود و هم بازدهی پروتئین الحاقی GST::EGFP را تعیین خواهید کرد.

ب. تعیین کمیت پروتئین با استفاده از روش برادفورد

استفاده از سنجش تعیین کمیت برادفورد، به‌عنوان یک روش جایگزین به‌جای روش پلیت‌خوان فلورسانس که یک روش به نسبت گران‌قیمت است، می‌تواند مورد استفاده واقع شود. سنجش کمی پروتئین، مقدار کل پروتئین را در یک نمونه اندازه‌گیری می‌کند. چند روش برای تعیین غلظت پروتئین وجود دارد. برای هر یک از این سنجش‌ها، غلظت پروتئین در نتیجه مقایسه مقدار یک نمونه ناشناخته با منحنی استاندارد ایجاد شده با سنجش یک سری از غلظت‌های شناخته شده

1. Fluorescence. Microplate. reader

2. Bandpass. filter

3. Emission. filter

برای پروتئین‌های مرجع همانند، گاما گلوبولین گاوی^۱ (BGG) یا آلبومین سرم گاوی (BSA) تخمین زده می‌شود. رایج‌ترین روش‌های مورد استفاده، سنجش برادفورد و سنجش اسید بیسینکونیک^۲ (BCA) است که هر کدام از این روش‌ها، معایب و مزیت‌های مختص به خود را دارد. سنجش برادفورد روشی است که برای تعیین غلظت پروتئین استفاده خواهیم کرد. در این روش از یک دای کلوئیدی G-250 مبتنی بر کوماسی استفاده خواهد شد که بیشتر به باقی‌مانده‌های اسید آمینه‌های آروماتیک (به‌ویژه آرژنین) متصل می‌شود. رنگ‌های مبتنی بر کوماسی به رنگ قرمز مایل به قهوه‌ای (حداکثر جذب ۴۶۵ nm) دیده شده، اما پس از وصل شدن به پروتئین‌های موجود در محیط‌های اسیدی، آبی می‌شوند (حداکثر جذب ۶۱۰ nm). بیشترین تفاوت جذب نوری بین پروتئین‌های آزاد و متصل به رنگ دای در طول موج ۵۹۵ nm رخ می‌دهد و در این حالت می‌توان ترکیب پیچیده پروتئین - رنگ دای را مورد بررسی قرار داد. این سنجش قادر است غلظت پروتئین را در محدوده ۱-۱۵۰۰ $\mu\text{g/mL}$ تشخیص دهد و کمی‌سازی کند. عیب این روش در این است که با بیشتر مواد شوینده و برخی از بافرهای پروتئینی رایج، ناسازگار است. اگر سلول‌های خود را با استفاده از روش شیمیایی (با معرف B-PER) هضم کرده باشید، شوینده موجود در آن معرف می‌تواند با روش برادفورد شما، به‌ویژه در نمونه CL، تداخل ایجاد کند؛ با این حال، نمونه پیش از کروماتوگرافی میل ترکیبی با PBS رقیق می‌شود و پیش از تجزیه و تحلیل در سنجش، دوباره رقیق خواهد شد. این مراحل رقیق‌سازی، مشکلات ناشی از تداخل مواد شوینده در سنجش را کاهش می‌دهد. قابلیت سازگاری معرف‌ها برای استفاده در سنجش‌های پروتئینی، به‌طور معمول توسط شرکت سازنده ارائه می‌شود.

سنجش BCA این مزیت را دارد که با مواد شوینده و بافرهای مختلف سازگار است؛ با این حال، این سنجش بر مبنای برهمکنش با تیروزین، سیستئین و باقی‌مانده تیروزین در نمونه پروتئین است که با تیروزین قوی‌ترین برهمکنش را دارد. این روش برای یک نمونه با مخلوطی از پروتئین‌ها مفید است، اما برای تک پروتئین‌ها می‌تواند مشکل‌ساز باشد. نمونه پروتئینی که مقدار باقی‌مانده سه آمینواسید ذکر شده در آن (به ویژه تیروزین) کمتر از حد متوسط باشد، خوانش مصنوعی پایینی دارد و نمونه پروتئینی که مقدار باقی‌مانده سه آمینواسید آن بالاتر از حد متوسط باشد، خوانش مصنوعی بالاتری را نشان می‌دهد. از سویی، این امر می‌تواند برای سنجش برادفورد نیز صادق باشد. سنجش برادفورد نسبت به سنجش BCA، به اسیدهای آمینه بیشتری نیاز دارد. به همین دلیل، سنجش BCA برای اندازه‌گیری غلظت یک پروتئین منفرد پیشنهاد نمی‌شود؛ به ویژه اگر ترکیب اسید آمینه مشخص نباشد. این سنجش دارای محدوده حساسیت ۲۰-۲۰۰۰ $\mu\text{g/mL}$ است. در

1. Bovine. gamma. globulin. (BGG)

2. Bicinchoninic. acid. (BCA)

آزمایش ما، سنجش BCA نمی‌تواند مورد استفاده قرار گیرد؛ زیرا به شدت با گلوکاتیون کاهش یافته، واکنش نشان می‌دهد. گلوکاتیون یک تری‌پتید متشکل از گلوکاتامات، سیستئین و گلیسین است که سیستئین در سنجش BCA به شدت واکنش نشان می‌دهد. به همین دلیل، روش برادفورد بهترین انتخاب برای تعیین غلظت پروتئین در این آزمایش است.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

الف. الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید دودسیل سولفات سدیم (SDS-PAGE) پروتئین الحاقی خالص‌سازی شده

نکته برای صرفه‌جویی در زمان: توجه: اگر از ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید TGX بدون رنگ استفاده می‌کنید، می‌توانید از رنگ‌آمیزی با GelCode Blue چشم‌پوشی کنید. به سادگی باندهای پروتئینی را با قرار دادن ژل در معرض نور UV و مطابق شیوه‌نامه شرکت سازنده، مشاهده کنید. تصویری از ژل را ذخیره کنید و به تجزیه و تحلیل نتایج ادامه دهید.

۱- نمونه‌های هفته گذشته را از فریزر -20°C خارج کنید. $30\ \mu\text{L}$ از هر یک از نمونه‌های خود را با افزودن مقدار مناسبی از بافر نمونه SDS-PAGE به هر یک از نمونه‌های فهرست شده در جدول زیر آماده کنید. نشانگر مولکولی وزن، نیازی به افزودن بافر نمونه SDS-PAGE به آن را ندارد. اگر در هر نمونه شست‌وشو یا شویش متوجه فلورسانس شدید، بهتر است با مربی خود مشورت کنید، زیرا ممکن است بخواهید آن نمونه‌ها را روی ژل خود قرار دهید. هدف از این امر، بارگذاری ژل با نمونه‌هایی است که برای تجزیه و تحلیل فرآیند خالص‌سازی مفید واقع شود.

چاهک ۱۰	چاهک ۹	چاهک ۸	چاهک ۷	چاهک ۶	چاهک ۵	چاهک ۴	چاهک ۳	چاهک ۲	چاهک ۱
شویش ۵	شویش ۴	شویش ۳	شویش ۲	آخرین شست‌وشو	شست‌وشو ۴	شست‌وشو ۳	محلول خروجی	عصاره سلولی	نشانگر مولکولی وزن

۲- هنگامی که نمونه‌ها با بافر نمونه SDS-PAGE مخلوط شدند، نمونه‌ها (به جز نشانگر وزن مولکولی) را پیش از بارگذاری به مدت ۱۰ دقیقه در معرض دمای 95°C یا بالاتر قرار دهید. اگر درب ویال‌های شما هنگام گرم شدن باز شد، می‌توانید از قفل‌های درپوش ویال میکرو سانتریفیوژ استفاده کنید.

- ۳- در میکروسانتریفوژ یک اسپین سریع انجام دهید تا محتویات مایع را به پایین هر لوله هدایت کنید.
- ۴- ژل آگارز ۱۲ درصد (هر درصدی که توسط مربی شما ارائه می‌شود) را با $5 \mu\text{L}$ از نشانگر مولکولی وزن (نشانگر Bio-Rad Kaleidoscope) و $20 \mu\text{L}$ از هر مخلوط نمونه، در چاهک‌ها بارگذاری کنید.
- ۵- ژل را با ولتاژ ثابت (۱۱۰-۱۰۰ ولت) اجرا کنید تا قسمت قدامی رنگ دای به انتهای ژل برسد (همان‌گونه که در کلاس آزمایشگاه: جلسه نهم-ب توضیح داده شد).
- ۶- درحالی‌که ژل در حال اجرا است، به قسمت B (آزمایش‌های کمی پروتئین) وارد شوید.

رنگ‌آمیزی ژل

هشدار: هنگام کار با ژل از دستکش استفاده کنید.

- ۱- منبع تغذیه را خاموش و ژل خود را از دستگاه خارج کنید. مراقب باشید ژل را له نکنید.
- ۲- دو تکه پلاستیک را به‌آرامی از هم جدا کنید. ژل باید به یک صفحه بچسبد.
- ۳- صفحه را در دست خود طوری نگه دارید که طرف ژل رو به بالا باشد. درحالی‌که آن را روی سینی رنگ‌آمیزی قرار دادید، یک جریان مستقیم از آب مقطر (از بطری آبپاش) را زیر ژل هدایت کنید تا ژل از حالت چسبندگی خارج شود. صفحه را کج کنید تا ژل در یک ظرف پتری‌دیش مربعی بریزد.
- ۴- ژل را در ظرف قرار دهید و سه بار (هر بار ۵ دقیقه) با dH_2O و با تکان دادن ملایم آبکشی کنید. سینی را با یک تکه چسب برچسب بزنید.
- ۵- معرف GelCode Blue را پیش از استفاده به‌صورت ملایم معکوس و میکس کنید.
- ۶- مقدار تقریبی 20 mL از معرف رنگ را اضافه کنید (به مقداری که ژل را بپوشاند، اما سینی را با آن پر نکنید!) و ظرف را به‌آرامی روی یک شیکر یا میکسر اوربیتال به مدت یک ساعت شیک کنید.
- نکته برای صرفه‌جویی در زمان: GelCode Blue را می‌توان در طول شب روی ژل قرار داد (اگر این امر مقدور باشد). روز بعد، می‌توان رنگ را دور ریخت و ژل را در نتیجه شست‌وشو با dH_2O رنگ‌زدایی کرد.
- ۷- معرف رنگ را با dH_2O جایگزین کنید و به شیک کردن ادامه دهید. این مرحله حساسیت به رنگ افزایش پیدا می‌کند و باندهای پروتئین ضعیف، به توسعه خود ادامه می‌دهند. ممکن است آب- برای کسب نتایج بهینه- چندین بار نیاز به تعویض داشته باشد. ژل را می‌توان تا زمانی که لازم است در آب قرار داد: ۱۵ دقیقه تا یک‌شب.

نکته برای صرفه‌جویی در زمان: رنگ‌زدایی با GelCode Blue ضروری نیست، اما تصویر نهایی بهتری را ارائه می‌دهد. همچنین، در طول فرآیند رنگ‌زدایی می‌توان از طریق قرار دادن چند دستمال کیم به لبه‌های پتری‌دیش، به فرآیند رنگ‌زدایی سرعت بخشید.

۸- از ژل خود عکس بگیرید و نتایج را تجزیه و تحلیل کنید.

ب. سنجش کمی پروتئین

یکی از این دو روش را برای تعیین کمیت پروتئین موجود در نمونه‌های خالص‌سازی شده خود انتخاب کنید:

- فلورسانس یا سنجش برادفورد.
 - تعیین کمیت پروتئین با استفاده از تجزیه و تحلیل فلورسانس
- هنگامی که SDS-PAGE شما در حال اجرا است، این سنجش را شروع کنید.
- ۱- رقت‌های EGFP نوترکیب را برای یک منحنی استاندارد همان‌گونه که بیشتر توضیح داده شد، آماده کنید. به شما یک ویال با $3/2 \mu\text{L}$ از 1 mg/mL EGFP نوترکیب محلول در PBS داده می‌شود. رقت‌های پروتئین EGFP را در سه ویال و همان‌طور که در جدول ۱-۱۲ نشان داده شده است، آماده کنید. هر بار که رقت‌ها را تنظیم می‌کنید، یک سرسمپلر جدید را به سمپلر متصل کنید. به حتم پس از انجام رقیق‌سازی، هر ویال را به‌خوبی مخلوط کنید.

جدول ۱-۱۲: رقت‌های نوترکیب EGFP برای منحنی استاندارد

ویال	رقت	غلظت پروتئین ($\mu\text{g/mL}$)	اختصار میکروپلیت
۱	$3/2 \mu\text{L}$ استوک + 1 mg/mL PBS	۵	ST5
۲	$175 \mu\text{L}$ + $175 \mu\text{L}$ PBS از ویال ۱	$2/5$	ST2.5
۳	$125 \mu\text{L}$ + $500 \mu\text{L}$ PBS از ویال ۱	۱	ST1
۴	$175 \mu\text{L}$ + $175 \mu\text{L}$ PBS از ویال ۳	$0/5$	ST0.5

۲- پیش از افزودن نمونه‌های خود به صفحه میکروپلیت، آن‌ها را با PBS رقیق کنید. رقیق نشدن نمونه‌ها، به‌ویژه در CL و برخی از جزه‌های شویش، باعث بالا رفتن بیش از حد فلورسانس و عدم تشخیص آن توسط دستگاه میکروپلیت‌خوان می‌شود. برای CL خود، دو رقت مختلف را انجام دهید تا مطمئن شوید که خوانش شما در منحنی استاندارد قرار می‌گیرد. برای نمونه‌های دیگر،

رقت‌های ۱۰ برابری از نمونه‌های خود را تهیه خواهید کرد. جدول ۱۲-۲ جزئیات رقت‌ها را نشان می‌دهد.

۳- با توجه به جدول ۱۲-۳، مقدار μL ۱۰۰ از EGFP, PBS های استاندارد (برای منحنی استاندارد) و نمونه‌های ناشناخته از خالص‌سازی خود را به یک صفحه میکروپلیت ۹۶ جایگاهی، در سه تکرار قرار دهید.

۴- فلورسانس را در چاهک‌ها با استفاده از میکروپلیت‌خوان اندازه‌گیری کنید. مربی شما دستگاه را برای خوانش صحیح فلورسانس تنظیم می‌کند. این تنظیم بین میکروپلیت‌خوان‌های مختلف، متفاوت است. به‌طور کلی شما باید از فیلترهای زیر استفاده کنید: فیلتر برانگیختگی ۴۸۵/۲۰ و فیلتر انتشار ۵۲۸/۲۰. علاوه بر این، در صورت امکان، حساسیت فلورسانس باید به‌گونه‌ای باشد که چاه‌های ST5 در محدوده بالایی مقیاس قرار گیرند.

جدول ۱۲-۲: روش رقیق‌سازی برای نمونه‌ها

نمونه	اختصار میکروپلیت	حجم نمونه (μL)	حجم PBS برای رقیق‌سازی (μL)
عصاره سلولی (۱۰ برابر رقیق شدن)	CL10	۳۵	۳۱۵
عصاره سلولی (۳۰ برابر رقیق شدن)	CL30	۱۲	۳۴۸
محلول خروجی	FT	۳۵	۳۱۵
آخرین شست‌وشو	LW	۳۵	۳۱۵
شویش ۱	E1	۳۵	۳۱۵
شویش ۲	E2	۳۵	۳۱۵
شویش ۳	E3	۳۵	۳۱۵
شویش ۴	E4	۳۵	۳۱۵
شویش ۵	E5	۳۵	۳۱۵
شویش ۶	E6	۳۵	۳۱۵

محاسبه غلظت و مقدار پروتئین در هر نمونه

۱- تفريق پس‌زمينه: داده‌های خود را از میکروپلیت‌خوان در یک برنامه رایانه‌ای مانند مایکروسافت اکسل باز کنید و میانگین سه چاهک PBS خود را محاسبه کنید. این میانگین پس‌زمینه شما است و مقدار آن باید از تمام چاهک‌های شما کم شود.

۲- ایجاد یک منحنی استاندارد: یک منحنی استاندارد برگرفته از استانداردهای EGFP خود را رسم کنید. در نمودار شما، غلظت EGFP باید در محور X و خوانش فلورسانس در محور Y قرار گرفته باشد.

۳- تعیین غلظت پروتئین نمونه‌های رقیق‌شده: میانگین فلورسانس هر خوانش (حاوی سه تکرار) را برای نمونه‌های ناشناخته خود محاسبه کنید. در صورت وجود ابهام در پایت کردن محتویات یک ویال معین، می‌توانید از خوانش آن صرف نظر کنید. از یک برنامه رایانه‌ای مانند مایکروسافت اکسل، به منظور محاسبه شیب منحنی استاندارد: $m = \Delta Y / \Delta X$ یا غلظت Δ فلورسانس = شیب، استفاده کنید. سپس، $y = mx + b$ یا غلظت $\times$ شیب = فلورسانس را متصل کنید ($b=0$ در این مورد). غلظتی که در اینجا محاسبه می‌کنید، غلظت نمونه در چاه سنجش (Ca) است. به یاد داشته باشید که نمونه‌های خود را برای سنجش رقیق کرده‌اید، بنابراین برای تعیین غلظت پروتئین در نمونه اصلی، محاسبات بیشتری لازم است.

۴- غلظت را در نمونه اصلی تعیین کنید:

$$C_o(\mu\text{g/mL}) = \frac{C_a(\mu\text{g/mL})}{d_1}$$

که در این فرمول C_o عبارت است از غلظت پروتئین در نمونه اصلی ($\mu\text{g/mL}$)، C_a غلظت پروتئین در چاهک میکروپلیت و d_1 رقت نمونه شما قبل از خوانش فلورسانس. به عنوان مثال، برای نمونه‌های FT، آخرین شست‌وشو (LW) و شویش شما، $d_1 = 35 / (35 + 315) = 0.1$. برای نمونه CL خود، تعیین می‌کنید که بر اساس منحنی استاندارد، از کدام فاکتور رقت استفاده خواهید کرد. غلظت‌ها را در دفترچه یادداشت آزمایشگاهی خود ثبت کنید.

۵- پروتئین کل را (به میکروگرم) محاسبه کنید.

حجم کل $\times$ غلظت پروتئین = پروتئین کل

شما حجم کل CL را در کلاس آزمایشگاه: جلسه یازدهم ثبت کردید و نزدیک به $500 \mu\text{L}$ از جزیهای حاصل شده از شویش را جمع‌آوری کردید. (اگر حجم شست‌وشوی شما متفاوت است، بر اساس آن تنظیم کنید).

پس از محاسبه مقدار کل (جرم) پروتئین الحاقی GST::EGFP در نمونه‌های مختلف، به پرسش‌های زیر پاسخ دهید:

چند درصد از کل پروتئین فیوژن خود را با موفقیت خالص کردید؟ (جمع مقادیر شویش / مقدار کل در $100 \times CL$).

پروتئین‌ها به دلایل مختلفی خالص‌سازی می‌شوند. برخی از پروتئین‌ها همانند انسولین و هورمون‌های رشد به‌عنوان عوامل درمانی استفاده می‌شوند. دلیل دیگر فروش پروتئین‌ها به‌صورت تجاری، استفاده از آن‌ها در مطالعات علمی است. پروتئین نوترکیب EGFP که برای ایجاد منحنی استاندارد خود استفاده کردید، نمونه‌ای از پروتئین‌های الحاقی تجاری است (EGFP نوترکیب حاوی تگ His-۶۳ است). در حال حاضر، قیمت EGFP نوترکیب ۳۵۴ دلار برای $100 \mu g$ پروتئین خالص است. کار شما در آزمایشگاه در طول ترم چقدر ارزش داشت؟ حساب کنید تا متوجه شوید که پروتئین نوترکیبی که خالص کرده‌اید، چقدر ارزش دارد!

تعیین کمیت پروتئین با استفاده از سنجش پروتئین برادفورد:

توجه: شیوه‌نامه زیر برای سنجش پروتئین برادفورد، از روش اختصاصی Bio-Rad Quick Start (TM) بهره می‌برد. اگر از معرف یا کیت دیگری استفاده می‌کنید، از شیوه‌نامه شرکت سازنده پیروی کنید.

توجه: مراحل زیر برای سنجش استاندارد 1 mL در اسپکتروفتومتر است. با این حال، می‌توانید به‌جای آن از تنظیم مقیاس میکروپلیت استفاده کنید. برای مشاهده جزئیات، به شیوه‌نامه‌های شرکت سازنده مراجعه کنید.

۱- استاد شما استانداردهای (غلظت شناخته‌شده) گاما گلوبولین گاوی (BGG) را در اختیار شما قرار می‌دهد. استانداردها بین ۰ تا $1500 \mu g$ میکروگرم در میلی‌لیتر است و برای ایجاد منحنی استاندارد شما استفاده خواهند شد.

نکته برای صرفه‌جویی در پول (زمان): با مخلوط کردن $20 \mu L$ از هر استاندارد با معرف برادفورد، یک مجموعه واحد از استانداردهای BGG را برای کل کلاس آماده کنید. استانداردها می‌تواند توسط مربی ساخته شود و هر گروه به‌طور مستقل میزان جذب را خوانش کند یا مقادیر جذب نمونه‌ها توسط مربی اندازه‌گیری شود و در اختیار دانشجویان قرار بگیرد. توجه داشته باشید که مقادیر جذب نمونه‌ها پس از مخلوط شدن با معرف برادفورد، در طول زمان افزایش پیدا می‌کند. اگر نمونه‌ها پس از انکوباسیون با رنگ در مدت‌زمان مشخصی (بین ۵ تا ۶۰ دقیقه) خوانده شوند، دقیق‌ترین داده‌ها حاصل خواهد شد.

۲- یک ویال میکروسانتریفیوژ یا کووت یک‌بار مصرف را برای هر یک از جزیهای خالص‌سازی که ذخیره کرده‌اید (CL, FT, LW و همه شویش‌ها E1, E2 و غیره)، برچسب بزنید؛ همچنین ویال‌هایی را برای هر یک از نمونه‌های منحنی استاندارد BGG و در صورتی که توسط مربی شما تهیه نشده‌اند، لحاظ کنید (خالی، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر).

۳- مقدار $5 \mu\text{L}$ از CL و FT خود را به ویال / کووت مورد نظر پایت کنید.

۴- مقدار $15 \mu\text{L}$ از dH_2O را به ویال CL و FT پایت کنید تا رقیق شود. میزان رقت ایجاد شده توسط شما چقدر است؟

۵- مقدار $20 \mu\text{L}$ از تمام جزیهای دیگر خود را در یک ویال / کووت برچسب‌دار پایت کنید. برای استانداردهای پروتئین BGG، همچنین مقدار $20 \mu\text{L}$ را به هر ویال / کووت اضافه کنید.

۶- مقدار 1 mL از معرف دای برادفورد $1 \times$ را به هر یک از ویال‌ها / کووت‌های خود اضافه کنید. برای ترکیب کردن و رتکس کنید.

۷- به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید (زمان انکوباسیون طولانی‌تر تا ۶۰ دقیقه می‌تواند مفید واقع شود) و میزان جذب از اسپکتروفتومتر را ثبت کنید. مهم است که همه نمونه‌ها تا حد امکان در یک محدوده زمانی انکوبه شوند، زیرا میزان جذب نمونه‌ها در طول زمان تغییر می‌کند.

۸- یک صفحه گسترده با داده‌های خود ایجاد و یک منحنی استاندارد را به توجه به مقادیر جذب از استانداردهای BGG خود تهیه کنید.

۹- با استفاده از شیب خطی تولید شده از منحنی استاندارد، غلظت کل پروتئین را در هر یک از جزیهای خالص‌سازی خود محاسبه کنید. به یاد داشته باشید که جزیهای CL و FT شما در مرحله ۵ رقیق شده باشد و به حتم آن رقت‌ها را در محاسبه خود مد نظر قرار دهید (تنها جزیهای CL و FT شما رقیق شده‌اند، بنابراین دیگران نیازی به رقیق کردن ندارند).

۱۰- پروتئین کل را بر حسب میکروگرم در هر یک از جزیهای اصلی خود محاسبه کنید:

$$(\text{mL}) \times \text{حجم جزی} \times (\mu\text{g/mL}) \text{ غلظت پروتئین کل} = (\mu\text{g}) \text{ پروتئین کل}$$

شما حجم کل CL را در کلاس آزمایشگاه: جلسه یازدهم ثبت کردید و نزدیک به $500 \mu\text{L}$ از جزیهای حاصل شده از شویش را جمع‌آوری کردید. (اگر حجم شستشوی شما متفاوت است، بر اساس آن تنظیم کنید).

چند درصد از کل پروتئین فیوژن خود را با موفقیت خالص کردید؟ (جمع مقادیر شویش / مقدار کل در $100 \times \text{CL}$).

پروتئین‌ها به دلایل مختلفی خالص‌سازی می‌شوند. برخی از پروتئین‌ها همانند انسولین و هورمون‌های رشد به‌عنوان عوامل درمانی استفاده می‌شوند. دلیل دیگر فروش پروتئین‌ها به‌صورت تجاری، استفاده از آن‌ها در مطالعات علمی است. پروتئین نوترکیب EGFP که برای ایجاد منحنی استاندارد خود استفاده کردید، نمونه‌ای از پروتئین‌های الحاقی تجاری است (EGFP نوترکیب حاوی تگ ۶۳-His است). در حال حاضر، قیمت EGFP نوترکیب ۳۵۴ دلار برای ۱۰۰ μg پروتئین خالص است. کار شما در آزمایشگاه در طول ترم چقدر ارزش داشت؟ حساب کنید تا متوجه شوید که پروتئین نوترکیبی که خالص کرده‌اید، چقدر ارزش دارد!

کلاس آزمایشگاه: جلسه دوازدهم-ب مضاعف سازی پلیت (تنها در صورت اجرای کلاس آزمایشگاه: جلسه سیزدهم)

۱- تمرین‌های آزمایشگاهی

پلیت مضاعف یکی از کلون‌های مثبت خود را روی LB/kan قرار بدهید تا هفته آینده یک تلقیح تازه داشته باشید. پلیت را برجسب بزنید و آن را به صورت معکوس در انکوباتور با درجه حرارت 37°C قرار دهید. مربی شما پلیت را پس از انکوباسیون یک شبه در یخچال نگهداری می‌کند.

پرسش‌های مباحثه‌ای

۱- پس از اجرای SDS-PAGE، چرا برخی از چاهک‌های حاوی نمونه‌های شویش، هیچ بانندی را نشان نمی‌دهند؟ چرا ما نمونه‌های شویش را به جای یک ویال، به صورت جزئی جمع‌آوری می‌کنیم؟

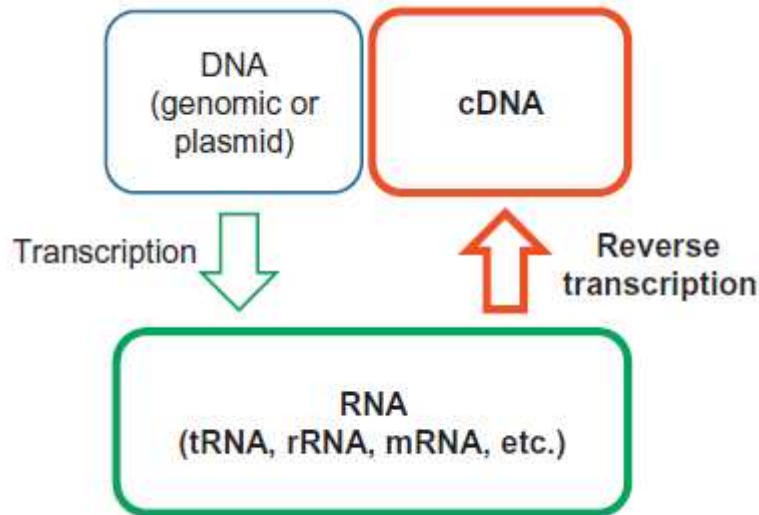
۲- فرض کنید که تجزیه و تحلیل فلورسانس و سنجش برادفورد را روی جزیهای خالص سازی خود انجام داده‌اید. در کدام روش انتظار دارید غلظت پروتئین بالاتری را برای جزی CL خود محاسبه کنید؟ برای جزیهای شستشوی چطور؟

بخش چهارم
بررسی سطوح mRNA

تا این مرحله، شما یک مولکول DNA نوترکیب را با موفقیت مهندسی کرده‌اید و پروتئین الحاقی نوترکیب GST::EGFP را بیان و خالص‌سازی کردید. آزمایش‌های نهایی شرح داده شده در این کتاب راهنما، با هدف اندازه‌گیری سطوح اسید ریبونوکلئیک پیام‌رسان (*gst::egfp* mRNA) ارائه شده است. همان‌طور که در قاعده اصلی^۱ زیست‌شناسی مولکولی توضیح داده شده است، "DNA سبب تولید RNA و RNA سبب تولید پروتئین می‌شود". DNA، چه DNA ژنومی باشد یا DNA پلازمید، توسط آنزیمی به نام RNA پلیمرز به RNA رونویسی می‌شود (شکل ۱). در پروکاریوت‌هایی مانند اشریشیاکلی، یک RNA پلیمرز مسئول رونویسی انواع مختلف RNA است. فراوان‌ترین نوع RNA، RNA ریبوزومی^۲ است. این نوع RNA جزء اصلی ریبوزوم‌ها است. RNAهای انتقال‌دهنده^۳ (tRNA) نیز در ترجمه نقش دارند، زیرا به افزودن اسیدهای آمینه به زنجیره پلی‌پپتیدی در حال توسعه کمک می‌کنند. ژن‌های کد کننده پروتئین در ابتدا به mRNA ها رونویسی و در نهایت به پروتئین ترجمه می‌شوند. از این‌رو، mRNA ها به‌عنوان پیام‌رسان برای گرفتن اطلاعات از DNA و رساندن آن به ریبوزوم‌های پروتئین‌ساز عمل می‌کنند. درحالی‌که زمانی اعتقاد بر این بود که این سه نوع RNA تمام RNA های موجود در کل یک سلول را تشکیل می‌دهند، اکنون می‌دانیم که انواع مختلفی از RNA از جمله microRNA ها، RNA های واکنش‌دهنده با پروتئین^۴ Piwi و بسیاری دیگر از RNA ها در سلول‌ها یافت می‌شوند. این یافته‌ها، دیدگاه ما را در مورد تنوع عملکردهای RNA گسترش داده است.

در طرح شما، فرآورده PCR که در pET-41a کلون شد، توالی کد کننده *egfp* است. وکتور pET-41a، توالی کد کننده *gst* را رمزگذاری می‌کند؛ بنابراین، هنگامی که رونویسی کلون مثبت شما رخ می‌دهد، mRNA مربوط به *gst::egfp* تولید می‌شود. در بخش پایانی این دوره، شما بیان ژن (رونویسی و ترجمه) را از کلون پلازمید خود، همان‌گونه که در بخش سوم انجام دادید، القا خواهید کرد. این بار، شما سطح پروتئین را تجزیه و تحلیل خواهید کرد، بلکه سطوح DNA مکمل^۵ (cDNA) و با تفسیر، سطوح mRNA را تجزیه و تحلیل خواهید کرد. برای انجام این کار، یاد خواهید گرفت که چگونه RNA کل (که شامل mRNA است) را از *E. coli* خالص و کمی‌سازی کنید و آن را با یک واکنش رونویسی معکوس، به cDNA تبدیل کنید. علاوه بر این، القاء را با IPTG یا لاکتوز و یا بدون وجود القاء، مقایسه خواهید کرد.

-
1. Central. Dogma
 2. Ribosomal. RNA
 3. Transfer. RNA
 4. Piwi-interacting. RNA
 5. Complementary. DNA. (cDNA)



شکل ۱-۱: قاعده اصلی زیست‌شناسی مولکولی. این شکل رونویسی معکوس (فقط سنتز رشته اول cDNA) را در یک سلول پروکاریوتی نشان می‌دهد؛ بنابراین، mRNA، همچنین rRNA و tRNA، به‌طور معکوس به cDNA رونویسی می‌شوند. cDNA، DNA مکمل. mRNA، اسید ریبونوکلیک پیام‌رسان؛ rRNA، RNA ریبوزومی؛ tRNA، RNA انتقال‌دهنده.

چالش‌های آزمایشگاهی مرتبط با RNA

در مقایسه با DNA، RNA پایداری بسیار کمتری دارد و باید با مراقبت ویژه از آن استفاده کرد. این تفاوت در پایداری را می‌توان به چندین ویژگی نسبت داد. همه RNA ها دارای یک گروه ۲' هیدروکسیل روی قند ریبوز^۱ هستند. این گروه هیدروکسیل می‌تواند در حمله هسته‌دوست ۵' اتم فسفر دخالت داشته باشد. این منجر به شکسته شدن پیوند فسفودی‌استر RNA می‌شود. DNA به جای ریبوز حاوی دئوکسی ریبوز^۲ است، بنابراین این واکنش در DNA رخ نمی‌دهد. DNA در ساختار مارپیچ دوگانه خود شیارهای کوچک‌تری دارد، درحالی‌که RNA شیارهای بزرگ‌تری دارد (و به‌طور معمول دو رشته‌ای نیست). این شیارهای بزرگ‌تر، توالی‌های بیشتری را فراهم می‌کند که می‌تواند مستعد برش آنزیمی باشد. در نهایت، RNA در شرایط قلیایی (پایه)، از پایداری کمتری برخوردار است. لازم به ذکر است که تخریب mRNA باکتری بسیار سریع رخ می‌دهد و نیمه‌عمر آن بیشتر وقت‌ها تنها چند دقیقه است. علاوه بر این ویژگی‌های ساختاری RNA، وجود گروه

-
1. Ribose
 2. Deoxyribose

خاصی از آنزیم‌ها به نام RNase ها RNA را در برابر تخریب آسیب‌پذیر می‌کند. میکروارگانیزم‌ها منابع RNase هستند که در هوا، روی سطوح، روی پوست ما و مایعات بدن یافت می‌شوند. این آنزیم‌ها RNA را تجزیه می‌کنند و می‌توانند برای افرادی که سعی در جداسازی و کار با RNA سالم را دارند، آزاردهنده باشد.

علاوه بر این، در شیوه‌های آزمایشگاهی همانند سنجش‌های حفاظتی نوکلئاز و شیوه‌نامه‌های خالص‌سازی پلازمید که از RNase ها استفاده می‌کنند، ممکن است با همان ابزار و معرف‌هایی که شما استفاده کردید، انجام شده باشد و حاوی RNase ها باشند. بهترین راه‌حل پیشگیری است: مقدار RNase هایی را که نمونه‌های خود را در معرض آن‌ها قرار می‌دهید، به حداقل برسانید. به‌منظور رسیدن به این امر، در جلسه‌های آزمایشگاهی بعدی اقدامات زیر را انجام دهید. اول، همیشه دستکش بپوشید و به‌صورت مرتب آن را عوض کنید. RNase ها به‌راحتی می‌توانند از دست‌ها به پایت‌ها، لوله‌ها و معرف‌ها منتقل شوند. دوم، از سر سمپلرها، ویال‌ها و آبی استفاده کنید که «عدم وجود RNase» توسط شرکت سازنده در آن‌ها تأیید شده باشد. ممکن است اتوکلاو برای استریل کردن سر سمپلرها و برای استفاده عمومی مفید واقع شود، اما این عمل تضمین نمی‌کند که RNase ها دناتوره شده‌اند. سر سمپلرهای حاوی گواهی «عدم وجود RNase»، ممکن است حاوی فیلترهایی (موانع) باشد که مانع از آلوده شدن محور سمپلر از ذرات معلق مانند RNase شود. خرید آب و سر سمپلرهای استریل و بدون RNase، ساده‌ترین راه برای جلوگیری از انتقال آلودگی از این منابع است. در نهایت، بهتر است سر سمپلرها و سیستم‌های الکتروفورز ژل را که برای کار با RNA اختصاص داده شده‌اند را از سایر ابزارها تفکیک کنید. با این حال، اگر این کار در آزمایشگاه شما عملی نیست، می‌توانید پیپت‌ها و سیستم‌های الکتروفورز ژل خود را با یک معرف تجاری موجود همانند RNaseZAP که RNase ها را غیرفعال می‌کند، تمیز کنید. همچنین پیش از آغاز جلسه آزمایشگاهی، باید از این معرف برای تمیز کردن قسمت بالای نیمکت استفاده کنید. بر خلاف DNA، نمونه‌های RNA بهتر است که در دمای -80°C ذخیره شوند. اگر قرار است نمونه RNA برای بیش از چند هفته نگهداری شود، افزودن نمک (استات سدیم) و محلول اتانول به نمونه پیش از نگهداری در دمای -80°C پیشنهاد می‌شود. در زمان کار کردن در آزمایشگاه، نمونه‌های RNA باید روی یخ نگهداری شوند، با این حال، هر شیوه‌نامه‌ای که در اینجا توضیح داده می‌شود، مشخص می‌کند که آیا واکنش حاوی RNA باید روی یخ یا در دمای اتاق انجام شود. به‌طور کلی، بهتر است هنگام کار با RNA سریع (اما با دقت) عمل کنید. جلسات آزمایشگاهی در این بخش از کتاب راهنما برای شما طراحی شده است تا یکی از دو روش ارائه شده را برای تجزیه و تحلیل سطوح mRNA انتخاب کنید.

اگر یک سیستم ترموسایکلر مجهز به PCR کمی^۱ (یک زمان واقعی) دارید، پیشنهاد می‌شود جلسات آزمایشگاهی ۱۳، ۱۴ و ۱۵ را انجام دهید. اگر سیستم PCR کمی را ندارید، باید جلسات آزمایشگاه ۱۳، ۱۶ و ۱۷ را انجام دهید. هر دو روش نتایج قابل مقایسه‌ای ایجاد می‌کنند، اگرچه PCR زمان واقعی بسیار دقیق‌تر است. هر دو روش با مراحل یکسانی (القاء، خالص‌سازی RNA کل، هضم DNase، کمی‌سازی و رونویسی معکوس) شروع می‌شوند. پس از آن، مراحل PCR و تجزیه و تحلیل داده‌ها، سبب تفکیک دو روش از یکدیگر می‌شود.

1. Quantitative. PCR. (real-time. system)

کلاس آزمایشگاه: جلسه سیزدهم

خالص سازی RNA کل

هدف: در این هفته، شما کشت‌های یک کلون ترادیدی شده مثبت را تلقیح می‌کنید، سپس مربی شما این کشت‌ها را با IPTG (با لاکتوز یا بدون القاء کننده) القاء می‌کند. سپس تمامی RNA را از این سلول‌ها خالص‌سازی می‌کنید، هر نمونه RNA را با DNase تیمار و RNA را کمی‌سازی می‌کنید. نمونه‌ها را تا جلسه بعدی آزمایشگاه در دمای -80°C نگهداری کنید.

کلاس آزمایشگاه: جلسه سیزدهم-الف جلسه موقت آزمایشگاه

۱- تمرین‌های آزمایشگاهی

- ۱- یک کلون مثبت را در ۳ mL از LB/kan و در یک ویال درپوش‌دار تلقیح کنید. این کار را با برداشتن باکتری با سرسمپلر استریل و از آخرین پلیت اصلی خود و قرار دادن آن در ویال حاوی LB/kan انجام دهید.
- ۲- لوله را با حروف اول مربوط به نمونه و تاریخ برچسب بزنید.
- ۳- سه ویال درپوش‌دار خالی را با حروف اول، تاریخ و «عدم وجود»، «IPTG» یا «لاکتوز» برچسب بزنید.
- ۴- کشت تلقیح شده و سه ویال خالی و برچسب‌دار را در رک‌های مشخص شده قرار دهید. ویال‌های حاوی LB/kan به‌منظور به تأخیر انداختن رشد، در یخچال نگهداری شوند. شب قبل از آزمایشگاه شما، مربی آن‌ها را در انکوباتور حاوی شیکر و در دمای 37°C قرار می‌دهد. پس از رشد یک‌شبه، کشت‌ها برای القاء آماده خواهند شد. مربی شما از لوله‌های خالی حاوی برچسب، برای این القاء استفاده می‌کند.

کلاس آزمایشگاه: جلسه سیزدهم-ب

خالص سازی RNA کل

۱- مقدمه

در جلسات قبلی آزمایشگاه، IPTG به منظور القاء بیان ژن، به کشت‌های باکتریایی شما (محلول آبی یا صفحه آگار) اضافه شد. این القاء در سطح پروتئین اندازه‌گیری شد (مشاهده GST::EGFP توسط نور UV، SDS-PAGE و وسترن بلات). بیان ژن به‌طور معمول به رونویسی و ترجمه اشاره دارد و نتیجه نهایی آن تولید پروتئین است. برای تجزیه و تحلیل القاء در سطح mRNA، کشت‌ها به‌طور مشابه با IPTG القا می‌شود تا اپراتور *lac* مربوط به pET-41a را مهار کنند. IPTG آنالوگ غیر قابل هیدرولیز لاکتوز است، بنابراین شما سعی کنید با IPTG القاء کنید و سپس آن را با القاء حاصل شده با غلظت مشابه با لاکتوز مقایسه خواهید کرد. این دو شرط به‌عنوان شرایط آزمایشی شما عمل می‌کند و هیچ القا کننده‌ای به‌عنوان کنترل منفی شما عمل نمی‌کند.

RNA کل پس از این تیمارها، از سلول‌های *E. coli* خالص‌سازی خواهد شد. RNA کل به تمام محتوای RNA یک سلول اشاره دارد و به mRNA، rRNA و tRNA، محدود نمی‌شود. فراوان‌ترین نوع RNA، rRNA است درحالی‌که RNA مورد استفاده در تجزیه و تحلیل ما یعنی mRNA، بخش بسیار کوچکی از RNA کل را تشکیل می‌دهد. به همین منظور، ما از کیت QIAGEN RNeasy Mini Kit برای خالص‌سازی RNA کل استفاده خواهیم کرد (شکل ۱۳-۱). ابتدا سلول‌های *E. coli* با لیزوزیم انکوبه می‌شود تا دیواره سلولی باکتری‌ها را تجزیه کند. سپس یک بافر هضم حاوی گوانیدین تیوسیانات^۱ اضافه می‌شود. این ماده شیمیایی یک دنا توره کننده است که به سرعت RNases (آنزیم‌هایی که RNA را تجزیه می‌کنند) را غیرفعال می‌کند. سپس، عصاره ورتکس می‌شود و از ستونی به نام هموژنایزر QIAshredder عبور داده می‌شود. این مراحل همگن‌سازی (هموژنیزه کردن) برای کاهش ویسکوزیته (DNA ژنومی با وزن مولکولی بالا بریده می‌شود) و حذف مواد نامحلول از هضم باکتریایی عمل می‌کند. استفاده از روش QIAshredder به نسبت سایر روش‌های همگن‌سازی همانند استفاده از سوزن و سرنگ‌ها، روشی سریع‌تر و آسان‌تر است. در مرحله بعدی، اتانول اضافه می‌شود تا شرایط مطلوب برای وصل شدن RNA به غشاء ستون RNeasy ایجاد شود. مراحل نهایی خالص‌سازی، مشابه مراحل جذب سیلیکا است که در این کتاب راهنما برای خالص‌سازی DNA پلازمید استفاده شده است. نمونه روی ستون RNeasy اعمال می‌شود، آلاینده‌ها شسته می‌شوند و RNA کل به آب بدون RNase شویش

1. Guanidine. thiocyanate

می‌شود. غشای ستون به‌طور انتخابی به RNA بزرگ‌تر از ۲۰۰ نوکلئوتید متصل خواهد شد؛ بنابراین RNA شوییش شده شامل tRNA یا سایر RNA های با وزن مولکولی پایین نخواهد بود. این امر در مورد آزمایش ما مفید واقع خواهد شد، زیرا ما به تجزیه و تحلیل mRNA علاقه‌مند هستیم.

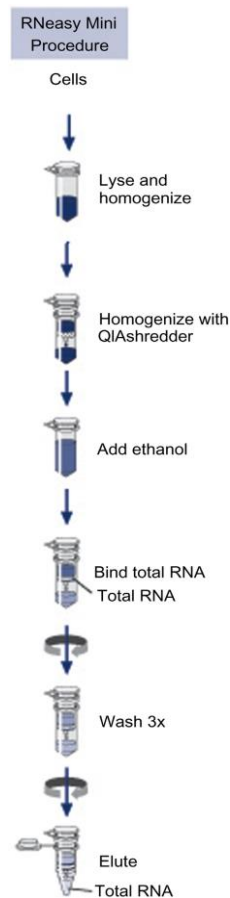
ستون‌های RNeasy بیشتر DNA موجود در عصاره را حذف می‌کنند؛ با این حال، برای انجام مطالعات مربوط به مراحل پایین‌دست، حذف مؤثر DNA مورد نیاز است. حتی مقادیر کمی از DNA ژنومی *E. coli* (که به‌طور طبیعی در همه سلول‌های *E. coli* یافت می‌شود) یا DNA پلازمید (ترادیسی شده به سلول‌های *E. coli*) را می‌توان با روش حساسی مانند RT-PCR شناسایی کرد. رشته الگویی که شما علاقه‌مند به تکثیر آن در PCR هستید، cDNA است که یکر است از mRNA ساخته شده است؛ بنابراین، برای دستیابی به کمیت دقیق سطوح mRNA، باید هرگونه DNA را در نمونه RNA که ممکن است به‌عنوان رشته الگو در فرآیند تکثیر عمل کند حذف کنید. اگرچه هضم DNase را می‌توان «در ستون» انجام داد، اما تیمار RNA شوییش شده به‌صورت مجزا، کارایی بیشتری دارد. در نهایت، DNase غیرفعال می‌شود و نمک‌ها در مرحله خالص‌سازی نهایی و در یک ستون RNeasy Mini دیگر، حذف می‌شوند. این مرحله مشابه خالص‌سازی ستونی DNA پلازمید خطی شده شما است.

ارزیابی یکپارچگی (عدم تخریب) RNA خالص شده پیش از آغاز مرحله بعد، بیشتر وقت‌ها ارزشمند است. در روش‌هایی مانند نورشن بلات یا آماده‌سازی نمونه ریزآرایه، وجود RNA دست‌نخورده برای انجام موفقیت‌آمیز آزمایش‌ها و همچنین تجزیه و تحلیل‌های بعدی حیاتی است. یکی از روش‌هایی که می‌توان یکپارچگی RNA را با استفاده از آن تجزیه و تحلیل کرد، الکتروفورز ژل آگارز است. به دلیل تک رشته بودن مولکول‌های RNA، آن‌ها توانایی تا شدن روی خود و تشکیل ساختارهای ثانویه را از طریق جفت شدن بازهای مکمل دارند. برای جلوگیری از تأثیر این ساختار ثانویه بر مهاجرت از طریق ژل آگارز، از حالت دناتوره استفاده می‌شود. به‌جای ژل آگارز معمولی مانند ژل‌هایی که برای تجزیه و تحلیل DNA تهیه کردید، ژل‌های آگارز دناتوره‌کننده (به‌طور معمول حاوی فرمالدئید) بیشتر برای تخمین دقیق وزن مولکولی استفاده می‌شوند. نمونه‌های RNA نیز قبل از بارگذاری در ژل، در یک رنگ بارگذاری که حاوی فرمامید دناتوره‌کننده^۱ است، حرارت داده می‌شود. RNA در شرایط قلیایی پایدار نیست و بنابراین یک بافر خنثی هم در ژل و هم در بافر در حال اجرا استفاده می‌شود. بافر MOPS^۲ بیشتر وقت‌ها برای الکتروفورز RNA استفاده می‌شود. این مراحل تضمین می‌کند که مولکول‌های RNA به‌صورت دناتوره (تک

1. Denaturant, formamide

2. (3-[N-Morpholino]-propanesulfonic acid), MOPS

رشته‌ای) باقی می‌ماند و تنها بر اساس اندازه مهاجرت می‌کنند. نشانگرهای مولکولی وزن RNA در کنار نمونه‌های RNA اجرا می‌شوند، زیرا قطعات یک نشانگر مولکولی وزن DNA به دلیل دو رشته‌ای بودن، با سرعت متفاوتی از قطعات RNA با همان اندازه مهاجرت می‌کنند.



شکل ۱۳-۱: چارچوب RNeasy Mini Kit. شرکت QIAGEN-۲۰۱۲. با کسب اجازه.

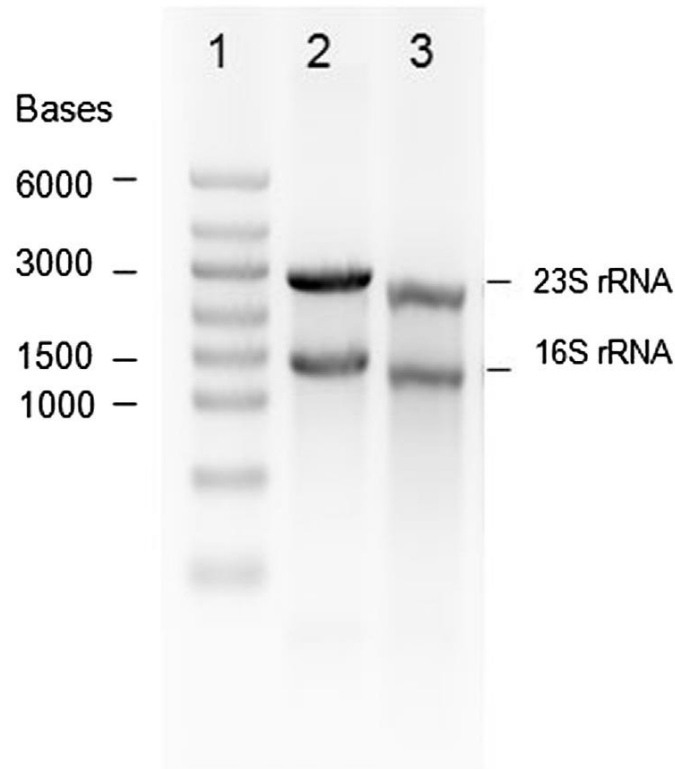
نتایج یک ژل آگارز دنا توره کننده معمولی بارگذاری شده با RNA کل خالص سازی شده از *E. coli* در شکل ۱۳-۲ نشان داده شده است. به یاد داشته باشید که RNA کل خالص شده است؛ بنابراین فراوان ترین انواع RNA با استفاده از اتیدیوم بروماید، یا یک رنگ دای اسید نوکلئیک فلورسنت مشابه GelRed شناسایی می‌شود. به همین دلیل است که بیشتر وقت‌ها باندهای

rRNA روی ژل قابل مشاهده است. در *E. coli*، 23S rRNA و 16S rRNA به ترتیب در اوزان مولکولی ۲/۹ و ۱/۵ کیلو بایت به وضوح دیده می‌شوند. توجه کنید که در چاهک ۲، میزان rRNA 23S به‌طور تقریبی دو برابر 16S rRNA است. این نسبت ۱:۲ یکی از نشانه‌های RNA دست نخورده است. همچنین، وجود باندهای واضح در چاهک ۲ نشان دهنده تخریب اندک مولکول RNA است. اگر RNA تخریب شده باشد، وجود آلودگی (باندها به‌صورت لکه دیده می‌شوند) مشهود خواهد بود. چاهک ۳، نشان دهنده RNA تیمار شده با DNase است. سه تفاوت ناشی از هضم DNase را می‌توان در این شکل مشاهده کرد. اول، وجود آلودگی جزئی در چاهک ۳ و در زیر هر باند rRNA نشان دهنده مقداری تخریب است. اگر RNA به شدت تخریب می‌شد، هیچ باند مشخصی به‌هیچ‌وجه آشکار نمی‌شد و کل چاهک به‌صورت یک لکه دیده می‌شد. دوم، نسبت ۱:۲ حفظ نمی‌شد.

به نظر می‌رسد که 16S rRNA و 23S در چاهک ۳ از نظر فراوانی برابر هستند. سوم، توجه کنید که باندهای rRNA در چاهک ۳ بیشتر از باندهای rRNA در چاهک ۲ مهاجرت کرده‌اند. از این امر می‌توان نتیجه گرفت که rRNAها کوچک‌تر از حد معمول و تخریب پذیر هستند. این نتایج تعجب‌آور نیستند، زیرا تیمار DNase و مرحله خالص‌سازی بعدی، دست‌کاری‌های فیزیکی اضافی برای نمونه هستند. به یاد داشته باشید که RNA، به‌ویژه RNA باکتریایی، می‌تواند به سرعت تجزیه شود. برای آزمایش RT-PCR، ما تیمار DNase را مد نظر قرار می‌دهیم اما از الکتروفورز ژل آگارز دنا توره کننده صرف نظر می‌کنیم. با وجود اینکه مقادیر 16S rRNA و 23S گویا برابر است، اما این تنها شاخص یکپارچگی RNA نیست. علاوه بر این، میزان تخریب RNA که به نظر می‌رسد به دلیل تیمار با DNase رخ داده است، هنوز قابل تحمل است و بر مراحل رونویسی معکوس و PCR تأثیر منفی نخواهد گذاشت. در این آزمایش نیاز به حذف آلودگی DNA به نسبت هرگونه تخریب احتمالی جزئی در RNA (و نیاز به رفع آن)، بیشتر است.

در نهایت، قیمت RNA توسط یک اسپکتروفتومتر (یا Nanodrop) تعیین خواهد شد. همانند DNA، RNA نیز نور UV را حداکثر در ۲۶۰ نانومتر جذب می‌کند؛ با این حال، RNA به دلیل تکرشته‌ای بودن، میانگین ضریب جذب^۱ متفاوتی را نسبت به DNA دو رشته‌ای دارد. جذب یک واحد در طول موج ۲۶۰ نانومتر، معادل ۴۰ µg از RNA تکرشته‌ای به ازای هر میلی‌لیتر است. هنگام محاسبه غلظت نمونه RNA، باید از ضریب جذب صحیح استفاده شود. در صورت استفاده از نانودراپ، باید مشخص کنید که در حال تجزیه و تحلیل RNA هستید. این امر به نرم‌افزار اجازه می‌دهد تا به‌طور خودکار غلظت را با استفاده از ضریب جذب مناسب محاسبه کند.

1. Extinction. coefficient



شکل ۱۳-۲: الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد دناتوره کننده RNA کل از اشریشیاکلی. چاهک ۱: خطکش
 چاهک ۲: ۱ µg از RNA کل بدون هضم DNase. چاهک ۳: Fermentas RiboRuler High-Range RNA. چاهک ۲: ۱ µg از RNA کل بدون هضم DNase. چاهک ۳: ۱ µg از RNA کل با هضم DNase.

خلوص نمونه RNA را می توان با اسپکتروفتومتر نیز تخمین زد. همان طور که ذکر شد، نسبت A260/A280 مولکول DNA خالص باید نزدیک به ۱/۸ و این نسبت برای RNA خالص باید در حدود ۲ باشد. هر نسبتی کمتر از ۲ می تواند نشان دهنده آلودگی احتمالی با پروتئین ها باشد؛ با این حال، در صورت بالا بودن بسیار زیاد میزان آلودگی، این نسبت به صورت قابل توجهی تغییر پیدا خواهد کرد. به احتمال زیاد، در صورت وجود ترکیبات بافری، نور UV به آن ها جذب می شود و این ضریب کاهش پیدا خواهد کرد. اگر نسبت بسیار کم باشد، ممکن است غلظت خود نمونه کم باشد. از آنجایی که DNA و RNA نور UV را در ۲۶۰ نانومتر جذب می کنند، نسبت A260/A280 قابل قبول نمی تواند وجود آلودگی با DNA را رد کند. به یاد داشته باشید که ما یک هضم با

DNase را برای به حداقل رساندن مقدار آلودگی DNA در نظر می‌گیریم. گام‌های بعدی برای محاسبه سطح واقعی آلودگی DNA استفاده خواهد شد. در نهایت، به‌طور معمول نسبت ۱/۲-۱/۹ برای RNA قابل قبول خواهد بود.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

الف. خالص‌سازی RNA کل

با استفاده از کیت QIAGEN RNeasy Mini، RNA کل باکتری‌ها را خالص‌سازی می‌کنیم. ستون‌های چرخشی QIAshredder را می‌توان به‌طور جداگانه خریداری یا به‌عنوان بخشی از کیت QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit تهیه کرد. محلول لیزوزیم نیز مورد نیاز است که توسط Mini Kit یا Plant Mini Kit عرضه نمی‌شود. گزینه دیگر نیز استفاده از کیت RNeasy Protect Bacteria Mini Kit است. شیوه‌نامه‌های زیر از کتابچه راهنمای شرکت سازنده (QIAGEN RNeasy Mini Handbook 06/2012) اصلاح و ارائه شده است.

ب. آماده‌سازی نمونه

مراحل ۱-۳ برای شما انجام خواهد شد.

- ۱- مقدار ۱ mL از کشت یک شبه را به هر یک از سه ویال برچسب‌دار خود پایت کنید.
- ۲- مقدار ۲ mL از کشت ۲×YT را در هر ویال: ۲×YT/kan/IPTG، ۲×YT/kan/lac، یا ۲×YT/kan پایت کنید.
- ۳- ویال‌ها در انکوباتور شیکردار و در دمای ۳۷°C به مدت ۲ ساعت انکوباسیون کنید (اجازه ندهید انکوباسیون بیش از ۲ ساعت ادامه یابد).
- ۴- هیت بلاک یا حمام آب خود را برای مرحله بعدی روی ۳۷°C تنظیم کنید.
- ۵- مقدار ۱/۵ mL از هر کشت *E. coli* را در سه ویال میکروسانتریفیوژ عاری از RNase برچسب‌دار، پایت کنید.
- ۶- مهم: تمام ویال‌ها و ستون‌های چرخشی را در سراسر این شیوه‌نامه به‌وضوح برچسب‌گذاری کنید تا مطمئن شوید که نمونه‌های کنترل (بدون القاکننده) و نمونه‌های آزمایشی (IPTG و لاکتوز) از هم تفکیک شده‌اند.
- ۷- سلول‌ها را با سانتریفیوژ در سرعت $300 \times g$ و به مدت ۵ دقیقه، برداشت کنید.
- ۸- درحالی‌که سلول‌ها در حال چرخش هستند، استوک لیزوزیم را به نسبت ۱:۱۰۰ (با گرفتن یک استوک ۴۰ mg/mL و رقیق کردن آن به میزان ۴۰ mg/mL) با پایت کردن μL

۵ از لیزوزیم در یک لوله میکروسانتریفیوژ جدید و افزودن $495 \mu\text{L}$ آب، رقیق کنید و روی یخ نگه‌داری کنید.

۹- تمام مایع رویی را با احتیاط در یک ظرف زباله مایع باکتریایی مناسب بریزید و ویال را روی یک حوله کاغذی برگردانید تا مطمئن شوید که هیچ مایعی از محیط کشت باقی نمانده است. حذف ناقص کشت از هضم جلوگیری می‌کند.

۱۰- هر کلاف باکتریایی را در $100 \mu\text{L}$ لیزوزیم رقیق شده موجود در مرحله ۷، تعلیق مجدد کنید. با چند بار پایپت کردن، تمامی کلاف‌ها را حل کنید.

۱۱- اجازه دهید سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق هضم شوند.

۱۲- مقدار $350 \mu\text{L}$ بافر RLT را در هر ویال پایپت کنید و به مدت ۱ دقیقه به‌شدت و رتکس کنید.

۱۳- عصاره را به یک ستون چرخشی QIAshredder (یاسی) که در یک لوله جمع‌آوری کننده 2 mL قرار داده شده، منتقل کنید و به مدت ۲ دقیقه و با حداکثر سرعت سانتریفیوژ کنید. مهم: محلول خروجی (در ویال جمع‌آوری کننده) را دور نریزید. در مرحله بعد به آن نیاز خواهید داشت!

۱۴- سوپرناتانت محلول خروجی را با احتیاط به یک ویال میکروسانتریفیوژ جدید و بدون RNase منتقل کنید. در این عمل، نباید به کلاف‌های سلولی موجود انتهای ویال جمع‌آوری کننده اختلالی وارد شود. در مراحل بعدی فقط از این سوپرناتانت استفاده کنید.

۱۵- مقدار $250 \mu\text{L}$ اتانول (۹۶-۱۰۰ درصد) را به سوپرناتانت ذخیره شده اضافه کنید و بلافاصله با پایپت کردن مخلوط کنید. دیگر سانتریفیوژ نکنید و بلافاصله به مرحله بعدی بروید.

۱۶- نمونه را (به‌طور معمول $700 \mu\text{L}$)، از جمله هرگونه ترسیب احتمالی تشکیل شده را، به یک ستون چرخشی RNeasy (صورتی) که در یک ویال جمع‌آوری کننده 2 mL قرار داده شده است، انتقال دهید.

۱۷- درب ویال را به‌آرامی بسته و سپس به مدت ۱۵ ثانیه و در سرعت $8000 \times g (\leq 10000 \text{ rpm})$ سانتریفیوژ کنید. محلول خروجی را دور بریزید. در مرحله بعد دوباره از ویال جمع‌آوری کننده استفاده کنید.

۱۸- مقدار $700 \mu\text{L}$ بافر RW1 را به ستون چرخشی RNeasy اضافه کنید. درب ویال را به‌آرامی ببندید و سپس به مدت ۱۵ ثانیه و در سرعت $8000 \times g (\leq 10000 \text{ rpm})$

- سانتریفوژ کنید تا غشای ستون چرخشی شسته شود. محلول خروجی را دور بریزید. در مرحله بعد دوباره از ویال جمع‌آوری کننده استفاده کنید.
- ۱۹- $500 \mu\text{L}$ میکرولیتر بافر RPE را به ستون چرخشی RNeasy اضافه کنید. درب ویال را به آرامی ببندید و سپس به مدت ۱۵ ثانیه و در سرعت $\leq 8000 \times g$ ($\leq 10000 \text{ rpm}$) سانتریفوژ کنید تا غشای ستون چرخشی شسته شود. محلول خروجی را دور بریزید. در مرحله بعد دوباره از ویال جمع‌آوری کننده استفاده کنید.
- ۲۰- $500 \mu\text{L}$ میکرولیتر بافر RPE را به ستون چرخشی RNeasy اضافه کنید. درب ویال را به آرامی ببندید و سپس به مدت ۲ دقیقه و در سرعت $\leq 8000 \times g$ ($\leq 10000 \text{ rpm}$) سانتریفوژ کنید تا غشای ستون چرخشی شسته شود. سانتریفوژ طولانی، غشای ستون چرخشی را خشک می‌کند و به شما این اطمینان را می‌دهد که هیچ اتانولی در طول شویش RNA منتقل نمی‌شود. اتانول باقی‌مانده ممکن است با واکنش‌های پایین‌دستی، تداخل داشته باشد.
- ۲۱- ستون چرخش RNeasy را در یک ویال میکروسانتریفوژ بدون RNase و با برچسب جدید قرار دهید. $50 \mu\text{L}$ آب بدون RNase را یکرست به مرکز غشاء ستون چرخشی اضافه کنید. درب ویال را به آرامی ببندید و سپس به مدت ۱ دقیقه و در سرعت $\leq 8000 \times g$ سانتریفوژ کنید تا RNA شویش شود.

پ. هضم DNase

- DNase I بازسازی شده را ورتکس نکنید. DNase I به دنا توره شدن فیزیکی حساس است. مخلوط کردن فقط باید با معکوس کردن آرام ویال انجام شود.
- ۱- به هر ویال از RNA شویش شده ($50 \mu\text{L}$)، موارد زیر را برای رساندن حجم کل به $100 \mu\text{L}$ اضافه کنید:
- $30 \mu\text{L}$ آب عاری از RNase
 - 10 میکرولیتر بافر RDD
 - 10 میکرولیتر DNase ($2/73$ واحد استوک Kunitz units/L ، $10^4 \times 2/73 \text{ Kunitz units/L}$ غلظت نهایی)
- ۲- ویال را با تکان دادن مخلوط کنید و به مدت ۳۰ دقیقه در هیت بلاک و در دمای 37°C یا حمام آب قرار دهید.
- ۳- مقدار $350 \mu\text{L}$ بافر RLT را اضافه و با ورتکس، به‌خوبی مخلوط کنید.

- ۴- مقدار $250 \mu\text{L}$ اتانول (۹۶-۱۰۰ درصد) را به RNA رقیق شده اضافه کنید و با پایپت کردن به خوبی مخلوط کنید. سانتریفیوژ نکنید و بلافاصله به مرحله ۵ بروید.
- ۵- نمونه را (به طور معمول $700 \mu\text{L}$) را به یک ستون چرخشی RNeasy Mini که در یک ویال جمع‌آوری کننده 2mL قرار داده شده است، انتقال دهید. درب ویال را به آرامی ببندید و سپس به مدت ۱۵ ثانیه و در سرعت $\leq 8000 \times g$ ($\leq 10000 \text{ rpm}$) سانتریفیوژ کنید. محلول خروجی را دور بریزید.
- ۶- $500 \mu\text{L}$ میکرولیتر بافر RPE را به ستون چرخشی RNeasy اضافه کنید. درب ویال را به آرامی ببندید و سپس به مدت ۱۵ ثانیه و در سرعت $\leq 8000 \times g$ ($\leq 10000 \text{ rpm}$) سانتریفیوژ کنید تا غشای ستون چرخشی شسته شود. محلول خروجی را دور بریزید. در مرحله بعد دوباره از ویال جمع‌آوری کننده استفاده کنید.
- ۷- $500 \mu\text{L}$ میکرولیتر بافر RPE را به ستون چرخشی RNeasy اضافه کنید. درب ویال را به آرامی ببندید و سپس به مدت ۲ دقیقه و در سرعت $\leq 8000 \times g$ ($\leq 10000 \text{ rpm}$) سانتریفیوژ کنید تا غشای ستون چرخشی شسته شود.
- ۸- ستون چرخشی RNeasy را در یک ویال میکروسانتریفیوژ عاری از RNase و با برچسب جدید قرار دهید. هر ویال را با حروف اول، تاریخ و القاء مورد استفاده برای آن نمونه (بدون القاء، IPTG یا *lac*) برچسب بزنید. $50 \mu\text{L}$ آب بدون RNase را یگراست به مرکز غشاء ستون چرخشی اضافه کنید. درب ویال را به آرامی ببندید، سپس به مدت ۱ دقیقه و در سرعت $\leq 8000 \times g$ ($\leq 10000 \text{ rpm}$) سانتریفیوژ کنید تا RNA شویش شود.

ت. کمی‌سازی RNA

- با توجه به تجهیزات موجود در آزمایشگاه شما، از اسپکتروفتومتر یا NanoDrop برای تعیین کمیت هر یک از نمونه‌های RNA هضم شده با DNase خود استفاده خواهید کرد. علاوه بر این، خلوص هر نمونه را نیز ارزیابی خواهید کرد.
- ۱- برای جزئیات بیشتر در مورد نحوه استفاده از هر یک از ابزارها، به کلاس آزمایشگاه جلسه دوم مراجعه کنید.
- ۲- هنگام صفر کردن ابزار، از همان آب بدون RNase استفاده کنید که برای شست‌وشوی نمونه‌های شما استفاده شده است.
- ۳- مهم: در صورت استفاده از نانودراپ، باید نرم‌افزار را روی خوانش «RNA» تنظیم کنید. RNA ضریب جذب متفاوتی با DNA دارد؛ بنابراین اگر نرم‌افزار از ضریب جذب DNA در محاسبات استفاده کند، غلظت نمونه شما نادرست خواهد بود. اگر غلظت را به صورت

- دستی از روی یک اسپکتروفتومتر محاسبه می‌کنید، از ضریب جذب RNA ($40 \mu\text{g/mL}$) در معادله خود استفاده کنید. غلظت هر نمونه را در دفترچه یادداشت خود یادداشت کنید و در کنار لوله بنویسید.
- ۴- غلظت هر نمونه را در دفترچه یادداشت خود یادداشت کنید و در کنار ویال بنویسید. از واحدهایی که استفاده کرده‌اید، آگاه باشید.
- ۵- نسبت $280/260$ هر نمونه را محاسبه و ثبت کنید. اگر نسبت در محدوده $1/9-2/1$ قرار نداشت، به مربی خود اطلاع دهید.
- ۶- نمونه‌ها را تا جلسه بعدی آزمایشگاه در فریزر 20°C - ذخیره کنید.
- یادآوری: اگر PCR کمی را با یک ترموسایکلر زمان واقعی انجام می‌دهید، به کلاس آزمایشگاه جلسه چهاردهم، تجزیه و تحلیل سطوح mRNA ژن *gst::egfp* با استفاده از RT-qPCR: بخش اول مراجعه کنید. اگر PCR نیمه کمی را با یک ترموسایکلر استاندارد انجام می‌دهید، به کلاس آزمایشگاه: جلسه شانزدهم، تجزیه و تحلیل سطوح mRNA ژن *gst::egfp* با استفاده از RT-PCR نیمه کمی: بخش اول، مراجعه کنید.

منبع

1. QIAGEN. RNeasy Mini handbook. 2012.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- آیا می‌توانید با استفاده از اسپکتروفتومتر یا NanoDrop کمیت mRNA موجود در نمونه‌ها را بررسی کنید؟ چرا؟
- ۲- آیا نسبت ۲۸۰/۲۶۰ بین نمونه‌های RNA سالم و نمونه‌های RNA تخریب شده متفاوت است؟ چرا؟

تجزیه و تحلیل سطوح mRNA ژن *gst::egfp* توسط RT-qPCR، بخش اول

هدف: RNA کل که در جلسه آخر خالص‌سازی کردید، با واکنش رونویسی معکوس (RT) به DNA مکمل (cDNA) تبدیل می‌شود. سپس، cDNA به‌عنوان یک الگو برای PCR کمی (در زمان واقعی) استفاده خواهد شد. در نهایت شما cDNA را با آغازگرهای مخصوص *egfp* (ژن آزمایشی شما) و 23S rRNA (ژن مرجع شما) تکثیر خواهید کرد.

۱- مقدمه

روش‌های مختلفی برای تشخیص RNA و تجزیه و تحلیل فراوانی آن وجود دارد. یکی از روش‌های مورد استفاده نورشن بلات است و شبیه به وسترن بلات‌هایی است که در جلسات گذشته انجام دادید؛ با این تفاوت که نمونه RNA روی ژل آگارز بارگذاری می‌شود. سپس نمونه‌ها به یک غشای نایلونی منتقل و با یک پروب DNA یا RNA نشان‌دار مخصوص ژن مورد نظر انکوبه می‌شوند. از شدت (تیزی) باندهای شناسایی شده موجود در غشاء، برای تعیین کمیت سطوح RNA استفاده می‌شود. اگرچه این روش هنوز در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما روش دشواری است و به مقدار کمابیش زیادی از RNA به‌طور کامل دست نخورده نیاز دارد. نوعی از سنجش حفاظت از نوکلئاز، به نام سنجش حفاظتی (RPA) RNase، نیز به یک پروب نشان‌دار برای تشخیص RNA هیبرید شده با آن، متکی است. این روش نیز دشوار است اما حساس‌تر از نورشن بلات است. در مقابل، روش‌های جدیدتر مبتنی بر PCR (که در این دوره نیز انجام دادید) که به زمان کمتری نیاز دارد، حساس‌تر است و توانایی اجرای نمونه‌های RNA تا حدی تخریب شده را دارند. در این جلسه و جلسه آزمایشگاه پانزدهم، RT-PCR انجام خواهد شد. بخش اول این روش، رونویسی معکوس^۱ (همچنین سنتز cDNA نامیده می‌شود).

این فرآیند عبارت است از تبدیل RNA به DNA با استفاده از آنزیمی به نام رونوشت بردار معکوس^۲. DNA حاصل مکمل الگوی RNA است؛ بنابراین cDNA (DNA مکمل) نامیده می‌شود. در قسمت دوم این روش، از cDNA به‌عنوان الگو در PCR استفاده می‌شود. به این ترتیب، مقدار فرآورده PCR نشان دهنده مقدار cDNA ورودی (با استنباط، RNA است که از آن تولید شده) است. RT-PCR می‌تواند در دو مرحله انجام شود که واکنش RT در ابتدا انجام می‌شود.

1. Reverse. transcription
2. Reverse. transcriptase

سپس، از آن فرآورده به‌عنوان یک الگو در واکنش PCR استفاده می‌شود. در روش دیگر، RT-PCR را می‌توان در یک مرحله و هر دو واکنش را در یک ویال انجام داد. در این جلسه و جلسه آزمایشگاه پانزدهم، از نسخه بسیار حساس RT-PCR به نام RT-qPCR کمی^۱ (RTqPCR) استفاده خواهد شد. در این مرحله باید چند توضیح در مورد روش‌های نام‌گذاری بیان شود. اگرچه نام‌های اختصاری دیگری برای این روش وجود دارد، اما از RT-qPCR (با q قبل از PCR) در این راهنما استفاده خواهد شد؛ زیرا این مرحله از PCR به صورت کمی است. PCR کمی (qPCR) همچنین می‌تواند روی DNA به‌عنوان الگو اولیه انجام شود؛ بنابراین در این مورد نیازی به RT نیست. این روش به سادگی qPCR نامیده می‌شود. هر دو نوع qPCR ذکر شده در این قسمت را می‌توان تحت عنوان Real-time PCR طبقه‌بندی کرد؛ زیرا فراوانی فرآورده در حال تکثیر، در زمان واقعی اندازه‌گیری می‌شود. جلسات آزمایشگاهی ۱۶ و ۱۷ به‌عنوان گزینه‌هایی برای RT-PCR های با حساسیت کمتر گنجانده شده‌اند.

الف. رونویسی معکوس

برای واکنش رونویسی معکوس به چه چیزی نیاز است؟ آنزیمی که این واکنش را کاتالیز کرده یک رونوشت بردار معکوس است و چندین مدل تجاری از آن وجود دارد که به‌طور معمول از ویروس‌هایی به نام رتروویروس^۲ جدا شده‌اند. این ویروس‌ها در ژنوم خود به جای DNA، RNA دارند؛ بنابراین باید یک آنزیم رونوشت‌بردار معکوس را رمزگذاری کنند تا ژنوم خود را به DNA تبدیل کنند. ویروس نقص ایمنی انسانی^۳ (HIV) نمونه‌ای از رترو ویروس است. آنزیم رونوشت‌بردار معکوس استفاده شده در این آزمایش، از نوعی ویروس مختص جوندگان (لوسمی مولونی جوندگان^۴) جدا شده است. همراه با بافر عرضه شده برای آن، وجود آغازگرها برای آغاز سنتز cDNA ضروری هستند. به‌جای استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت (مانند آغازگرهایی که در PCR استفاده می‌شود)، واکنش‌های RT تنها از یک آغازگر استفاده می‌کنند؛ زیرا تنها یک رشته cDNA در واکنش ساخته می‌شود. آغازگرها به سه دسته تقسیم می‌شوند: رندومر^۵ (تصادفی) (در این آزمایش هگزامر است)، oligo-dT و اختصاصی برای ژن. آغازگرهای Oligo-dT به‌طور اختصاصی به دنباله‌های poly-A موجود در بیشتر mRNA های یوکاریوتی متصل می‌شوند. ما

1. Quantitative. RT-PCR. (RTqPCR)

2. Retroviruse

3. Human. immunodeficiency. virus. (HIV)

4. Moloney. murine. leukemia. virus

5. Randomers

نمی‌توانیم از این نوع آغازگر استفاده کنیم زیرا RNA پروکاریوتی خالص‌سازی شده فاقد دم پلی-A است.

ما می‌خواهیم سنتز cDNA را از تمام RNA های موجود در سلول تحریک کنیم؛ بنابراین آغازگرهای اختصاصی برای ژن نیز در این مورد مناسب نخواهند بود. ما از هگزامرهای تصادفی استفاده خواهیم کرد که توانایی متصل شدن به همه گونه‌های RNA را بدون اطلاع از توالی آن‌ها، دارند. هگزامرهای تصادفی مجموعه‌ای از آغازگرها است که برای نمایش تمام ترکیبات ممکن قطعه‌های شش نوکلئوتیدی، طراحی شده‌اند. این طراحی به آغازگرها اجازه می‌دهد تا به تمام توالی‌های RNA متصل شوند. در نهایت، dNTP ها (همان موارد استفاده شده در PCR) در واکنش‌های RT گنجانده می‌شوند. این dNTP ها در رشته cDNA سنتز شده جدید، گنجانده می‌شوند.

هر زمان که RT-PCR انجام می‌شود، یک جنبه مهم کنترلی، آلودگی DNA است. همان‌گونه که پیش از این گفته شد، RT-PCR از RNA به‌عنوان رشته الگو استفاده می‌کند. هدف، سنتز cDNA از RNA و به دنبال آن تکثیر cDNA با آغازگرهای اختصاصی برای ژن است؛ با این حال، اگر DNA هنوز در نمونه RNA وجود داشته باشد، آن مولکول در طی واکنش PCR تکثیر می‌شود که به کمی‌سازی نادرست سطوح mRNA منجر می‌شود. برای کنترل هرگونه آلودگی DNA در نمونه‌های شما و حتی پس از تیمار با DNase، باید واکنش‌های کنترل منفی که شامل ترانس کریپتاز معکوس نباشد، لحاظ شوند. بدون وجود این آنزیم، DNA موجود در نمونه‌ها، تحت عنوان آلودگی DNA (ژنومی یا پلازمیدی) شناخته می‌شود که سبب تولید فرآورده‌های PCR می‌گردد؛ با این حال، اگر DNA را به‌طور موثر در نمونه‌های اولیه خود حذف کرده باشید، تکثیر با استفاده از کنترل «-RT» نباید فرآورده‌ی را نشان دهد. اگر در این کنترل منفی تکثیر DNA وجود داشته باشد، می‌توان آن را کمی‌سازی و حساب کرد. این امر وجود آلودگی DNA را آشکار می‌سازد. واکنش «+RT» مربوطه، باید منجر به تولید یک فرآورده شود. این واکنش‌ها دارای cDNA است که از RNA سنتز شده‌اند و هدف شما این است که تکثیر آن‌ها را کمی‌سازی کنید.

ب. PCR کمی

qPCR به تجسم فرآورده‌های روی ژل آگارز متکی نیست. در عوض، کمی‌سازی DNA تکثیر شده با استفاده از سنجش‌های فلورسانس به دست می‌آید. به جای بررسی فلورسانس در پایان آزمایش PCR، فلورسانس در زمان تولید (در «زمان واقعی») بررسی می‌شود. با استفاده از دو روش شیمیایی می‌توان این امر را انجام داد. یک رنگ فلورسنت دای به نام SYBR Green به DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود و پس از برانگیختگی توسط منبع نوری، مولکول DNA به‌طور تقریبی

۱۰۰۰ برابر روشن‌تر از زمانی خواهد شد که رنگ به مولکول متصل نباشد؛ بنابراین، مقدار فلورسانس در یک واکنش با مقدار DNA دو رشته‌ای متناسب است. نوع دوم تشخیص شیمیایی که به‌طور معمول در qPCR استفاده شده، سنجش ۵' نوکلئاز است و تحت عنوان سنجش TaqMan شناخته می‌شود. این مورد نه تنها حاوی آغازگرهای اختصاصی برای ژن است، بلکه یک پروب DNA اختصاصی برای ژن را نیز شامل می‌شود. اگرچه سنجش TaqMan روش حساس‌تری است و تشکیل فرآورده‌های غیر اختصاصی را حذف می‌کند، اما برای هر ژنی که می‌خواهید کمیت آن را برآورد کنید، به یک پروب نیاز است. روش SYBR Green دارای معایبی همانند وصل شدن دایمری آغازگرها^۱ (وصل شدن آغازگرها به یکدیگر) و تولید فرآورده‌های غیر اختصاصی و همچنین فرآورده‌های خاص است (زیرا نمی‌تواند بین DNA های دو رشته‌ای مختلف تمایز قائل شود)، اما اگر چندین ژن مختلف را بررسی می‌کنید، روش مقرون به‌صرفه‌تری است. ما در این راهنما از SYBR Green به‌عنوان روشی برای تعیین کمیت سطوح mRNA استفاده خواهیم کرد. RT-qPCR یک روش قدرتمند و حساس برای تجزیه و تحلیل بیان ژن است، اما طراحی یک آزمایش موفقیت‌آمیز RT-qPCR، نیاز به مدنظر قرار دادن جزئیات زیادی دارد. در ابتدا، از آنجایی که می‌خواهیم سطح mRNA ژن *gst::egfp* (ژن آزمایشی ما) را تعیین کنیم، به آغازگرهایی نیاز داریم که به‌طور اختصاصی این توالی را از cDNA تکثیر کنند. به‌طور کلی، پیشنهاد می‌شود که آغازگرهای مورد استفاده در qPCR دارای ویژگی‌های زیر باشند:

- یک توالی (آمپلیکون) در محدود اندازه ۵۰-۱۵۰ bp را تکثیر کند.
- محتوی CG آن باید در محدوده ۸۰-۲۰ درصد باشد.
- از اجرای یک نوکلئوتید (به‌ویژه از چهار یا بیشتر گوانیدین) اجتناب کنید.
- T_m باید نزدیک به 60°C باشد.
- T_m آغازگرهای رفت و برگشت نباید بیش از 1°C تفاوت داشته باشند.

بسته‌های نرم‌افزاری طراحی آغازگر زمانی می‌تواند مفید واقع شوند که تنظیمات پیش‌فرض آن‌ها برای تعیین شیوه‌نامه‌های مشخص شده، تغییر کنند. علاوه بر ژن آزمایشی ما، ژن دوم نیز مورد سنجش قرار خواهد گرفت. این امر یک کنترل داخلی را فراهم می‌کند که برای نرمال‌سازی نتایج تجربی، مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آن ژن (ژن دوم) به‌عنوان ژن مرجع یاد می‌شود. ژن مرجع مورد استفاده در این آزمایش، 23S rRNA باکتری *Escherichia coli* است. ژن‌های مرجع باید در هر نمونه بیان شوند، اما برای تأیید اعتبار آن‌ها، نباید سطوح بیانی متفاوتی داشته باشند. تنها ژنی که انتظار داریم بیان آن در طول اعمال تیمارها تغییر کند (القاء با IPTG یا لاکتوز)،

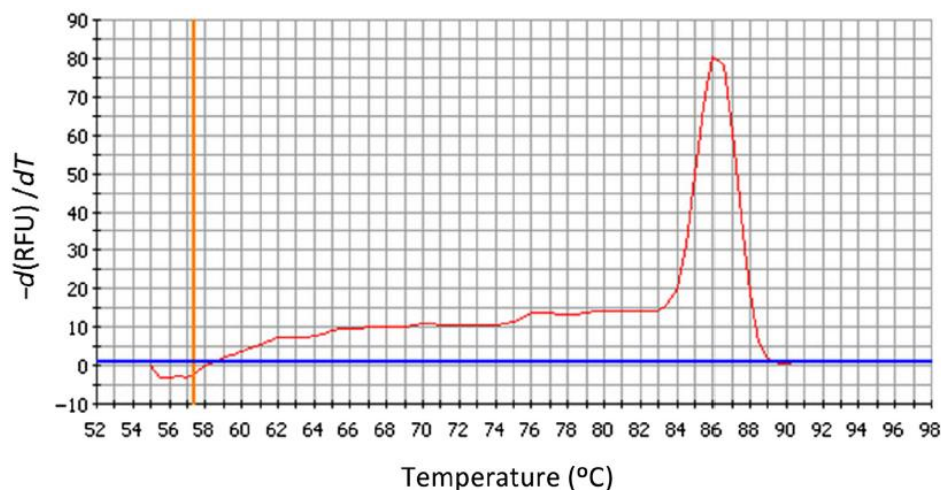
1. Binding. primer. dimers

gst::egfp است. با توجه به محدودیت‌های SYBR Green که پیشتر ذکر شد، ضروری است که آغازگرهای qPCR فقط یک آمپلیکون معین را تولید کنند. توجه داشته باشید که ما نتایج PCR را روی ژل آگارز مشاهده نخواهیم کرد. ما به فلورسانس تولید شده در طول واکنش، برای نشان دادن مقدار DNA موجود تکیه خواهیم کرد. اگر فلورسانس در تکثیر دایمری آغازگرها یا سایر فرآورده‌های غیر اختصاصی قابل مشاهده باشد، مقدار دقیقی از *gst::egfp* به دست نخواهد آمد. آغازگرهای مورد استفاده، از قبل به منظور تولید کردن تنها یک آمپلیکون مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته‌اند. رایج‌ترین روش برای انجام این عمل، از طریق تجزیه و تحلیل منحنی ذوب آغازگر حاصل می‌گردد. منحنی ذوب (منحنی تفکیک نیز نامیده می‌شود) نموداری است که اطلاعاتی را در مورد نحوه تفکیک (ذوب شدن) DNA هنگام گرما دیدن، در اختیار قرار می‌دهد. این تحلیل را می‌توان در پایان برنامه qPCR و از طریق افزایش تدریجی دما در دستگاه انجام داد. در نتیجه این عمل، تغییرات فلورسانس در برابر دما ترسیم می‌شود. در شکل ۱۴-۱، نمونه‌ای از منحنی ذوب نشان داده شده است. وجود یک پیک منفرد و باریک نشان دهنده تشکیل یک آمپلیکون معین است. دمای ذوب Tm آمپلیکون 23S rRNA موجود در شکل ۱۴-۱، نزدیک به ۸۶°C است. در صورت تشکیل حالت دایمری در آغازگرها، پیک Tm آن‌ها کمتر از آمپلیکون مورد نظر است.

برای تولید نتایج کمی واقعی، وجود تکرارهای بیولوژیکی و فنی مورد نیاز است. در آزمایش ما، تکرارهای بیولوژیکی از نمونه‌های RNA حاصل شده از کشت‌های باکتریایی که به صورت مستقل القا شده‌اند، تشکیل شده است. تکرارهای فنی شامل انجام دادن چندین واکنش PCR است که هر کدام دارای یک الگوی cDNA مشابه هستند؛ با این حال، برای اینکه کل نمونه‌های کلاس در یک دستگاه ترموسایکلر قرار بگیرند، آزمایش‌های ما فاقد تکرار خواهند بود. نقطه ضعف اصلی RT-qPCR هزینه‌بردار بودن آن است، زیرا برای انجام این آزمایش، به یک ترموسایکلر با قابلیت تشخیص فلورسانس نیاز خواهد بود؛ با این حال، اگر یک ترموسایکلر برای استفاده در دسترس باشد، مزایای زیادی را نسبت به RT-PCR نیمه کمی در مطالعات بیان ژن دارد. RT-PCR با استفاده از فلورسانس، یک روش کمابیش کوتاه است، زیرا نیازی به الکتروفورز ژل ندارد. استفاده از یک رنگ فلورسنت حساس (با حساسیت بسیار بیشتر از اتیدیوم بروماید یا GelRed) امکان تشخیص ژن‌های بیان شده حتی در سطوح بسیار اندک را فراهم می‌کند. علاوه بر این، RT-qPCR، دامنه تشخیص دینامیکی گسترده‌تری را دارد (محدوده میزان RNA ورودی که با استفاده از این روش می‌توان تشخیص داد). این ویژگی‌های مطلوب، qPCR را به روشی قدرتمند در مطالعات بیان ژن تبدیل می‌کند و بیشتر وقت‌ها در تأیید نتایج ریزآرایه و توالی‌یابی نسل جدید^۱ مورد استفاده

1. Next. generation. sequencing

واقع می‌شود. فراتر از آزمایشگاه تحقیقاتی پایه، qPCR در محیط‌های بالینی و صنعتی نیز استفاده می‌شود. تعیین بار ویروسی، شناسایی عوامل بیماری‌زا، تعیین ژنوتیپ، تعیین اثربخشی درمان دارویی و کنترل کیفیت را می‌توان با این استفاده از این روش مورد بررسی قرار داد. برای مرور منابع بیشتر در مورد qPCR، وبگاه زیر^۱ را بررسی کنید.



شکل ۱۴-۱: تجزیه و تحلیل منحنی ذوب آمپلیکون 23S rRNA. محور X نشان دهنده دما و محور Y تغییر در فلورسانس (واحد‌های فلورسانس نسبی، RFU) را نسبت به تغییر دما نشان می‌دهد.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

الف. رونویسی معکوس

شیوه‌نامه زیر از کیت Bio-Rad's iScript Select cDNA Synthesis اقتباس شده است. توجه داشته باشید که ما در حال تنظیم واکنش‌ها در ویال‌های PCR هستیم؛ با این حال، این مرحله تنها یک واکنش رونویسی معکوس (RT) است و نه PCR. ما به سادگی از یک ترموسایکلر به‌عنوان یک سیستم حرارتی برنامه‌ریزی‌شده استفاده می‌کنیم تا به راحتی مراحل دمایی زمان‌بندی شده RT را در ویال‌های مورد نظر، انجام دهیم. مطمئن شوید که به استفاده از سرسمپلر و ویال‌های بدون RNase ادامه می‌دهید و از راهکارهای ارائه‌شده در بخش چهارم «چالش‌های کار با RNA» برای به حداقل رساندن تخریب RNA استفاده می‌کنید. پوشیدن دستکش در هر مرحله ضروری است. علاوه بر این، بهترین پایت کردن را در دقیق‌ترین حالت ممکن انجام دهید. توجه داشته

1. <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center.html>

باشید که وقتی یک نمونه نیاز به برداشت $5 \mu\text{L}$ را فراخوانی می‌کند، یک سمپلر P10 باید در واقع روی $5 \mu\text{L}$ تنظیم شود. همیشه سمپلر را تا حد امکان نزدیک به حجم مورد نظر تنظیم کنید و تمام ارقام نشان داده شده را در نظر بگیرید.

۱- سه نمونه RNA خود را از فریزر -80°C خارج کنید و بلافاصله آن‌ها را روی یخ قرار دهید تا ذوب شوند.

۲- شش ویال PCR عاری از RNase را با علائم القاء-، -IPTG، -lac، القاء+، +IPTG و +lac، برچسب بزنید.

۳- حجم RNA مورد نیاز برای $1 \mu\text{g}$ را بر اساس مرحله کمی‌سازی هفته گذشته، محاسبه کنید. از معادله زیر استفاده کنید:

$$(\mu\text{g}/\mu\text{L}) \text{ غلظت} / (\mu\text{g}) \text{ مقدار مورد نیاز} = (\mu\text{L}) \text{ حجم مورد نیاز}$$

این عمل را برای هر یک از سه نمونه انجام دهید و حجم‌ها را در دفترچه یادداشت خود و در جدولی مشابه جدول ۱-۱۴ ثبت کنید.

جدول ۱-۱۴: مجموع حجم RNA مورد نیاز برای رونویسی معکوس

حجم آب عاری از نوکلئاز برای رساندن حجم به $13 \mu\text{L}$	حجم مورد نیاز برای $1 \mu\text{g}$	RNA نمونه
		بدون القاء
		IPTG
		لاکتوز

۴- این حجم را در ویال PCR مناسب و روی یخ پایت کنید. هر نمونه RNA دو بار پایت می‌شود: یک بار در یک ویال «-» و یک بار در یک ویال «+».

۵- مقدار آب عاری از نوکلئاز را برای هر نمونه و به‌منظور رساندن حجم به $13 \mu\text{L}$ محاسبه کنید. این حجم ممکن است برای هر یک از سه نمونه متفاوت باشد. این حجم از آب عاری از نوکلئاز را به ویال‌های متناظر به آن پایت کنید.

۶- برای اطمینان از اینکه نمونه‌های مختلف با هر معرف به‌طور مساوی تیمار شده است و برای سهولت در پایت کردن، مطابق جدول ۱-۱۴، دو مستر میکس جداگانه را ایجاد خواهید کرد. یک مستر میکس حاوی ترانس کریپتاز معکوس (RT+) و مستر میکس دوم فقط حاوی آب بدون نوکلئاز (RT-) خواهد بود. پیش از ادامه، حجم لازم هر جزء را برای تکمیل جدول، در دفترچه یادداشت آزمایشگاه خود محاسبه کنید. سپس اجزای توصیف

شده را به ترتیب نشان داده شده در جدول و روی یخ، به یک ویال میکروسانتریفیوژ اضافه کنید.

جدول ۱۴-۲: مستر میکس‌های رونوشت‌برداری معکوس

مستر میکس -RT (μL)	مستر میکس +RT (μL)	برای واکنش RT شماره ۱ (μL)	معرف
۱۶	۱۶	۴	5 × iScript select reaction mix
۸	۸	۲	آغازگر تصادفی
۰	۴	۱	ترانسکریپتاز معکوس iScript
۴	۰	۰	آب عاری از نوکلئاز
۲۸	۲۸	۷	کل

۷- به‌منظور مخلوط کردن و رتکس کنید و یک سانتیفیوژ سریع (۳-۲ ثانیه) را به‌منظور اطمینان از قرار گرفتن محتویات ویال به انتهای آن، انجام دهید و سپس ویال را روی یخ نگه‌داری کنید.

۸- مقدار $7 \mu\text{L}$ از مستر میکس صحیح را در هر یک از سه ویال PCR و روی یخ پایت کنید. به‌منظور مخلوط کردن پایت کنید. نکته مهم: سرسمپلر را پیش از مصرف مجدد از مستر میکس، عوض کنید.

۹- واکنش‌ها را تا زمان اتمام کار توسط گروه‌های دیگر، روی یخ نگه دارید.

۱۰- ویال‌های PCR را در یک ترموسایکلر برنامه‌ریزی شده به شکل زیر، قرار دهید:

- الف. 25°C به مدت ۵ دقیقه
- ب. 42°C به مدت ۳۰ دقیقه
- پ. 85°C به مدت ۵ دقیقه
- ت. 4°C به مدت مورد نیاز

۱۱- پس از رسیدن دما به 4°C ، ترموسایکلر را متوقف کنید و شش ویال PCR خود را روی یخ قرار دهید.

ب. PCR کمی

cDNA که شما سنتز کردید، اکنون به‌عنوان یک الگو در واکنش‌های qPCR استفاده می‌شود. شما cDNA ژن *gst::egfp* (از mRNA که از وکتور بیانی شما تولید شده است) را در هر یک از نمونه‌های خود تکثیر خواهید کرد. آغازگرها به‌طور اختصاصی به توالی *egfp* متصل می‌شوند. شما همچنین *E. coli 23S rRNA* (ژنی که در کروموزوم تمام سلول‌های *E. coli* یافت می‌شود) را

تکثیر خواهید کرد. این آمپلیکون به عنوان یک ژن مرجع (یک کنترل داخلی برای مقادیر مختلف RNA ورودی در هر واکنش) عمل خواهد کرد. هفته آینده، سطح *cDNA::egfp* (mRNA) را در کلون مثبت خود (پس از عدم القاء، القاء با IPTG یا القاء با لاکتوز) تعیین خواهید کرد.

قابل توجه مربیان: یک ترموسایکلر با ۹۶ جایگاه، واکنش های PCR را برای حداکثر هشت گروه دو نفره از دانشجویان (۱۲ واکنش در هر جفت) انجام می دهد. اگر بیش از این تعداد دانشجو دارید، باید یکی از این موارد زیر را انجام دهید: از یک ترموسایکلر دیگر استفاده کنید، برخی از واکنش ها را در فویل بیچید و در یخچال نگهداری کنید تا اولین اجرا کامل شود و سپس اجرای دوم را انجام دهید، یا واکنش ها را به ترتیب حذف کنید. نمونه های القا شده با لاکتوز را حذف کنید تا به جای ۱۲ واکنش، هشت واکنش باقی بماند. سپس ترموسایکلر واکنش های مربوط به ۱۲ گروه را در خود جای می دهد. از آنجایی که تکثیر هر دو ژن *gfp::egfp* و *23S* برای اهداف کمی سازی ضروری است و واکنش های RT-تضمین می کنند که آلودگی DNA در کمی سازی mRNA وجود نخواهند داشت، در صورت امکان گنجاندن آن ضروری خواهد بود.

آغازگرهایی که برای تکثیر اختصاصی ژن *gfp::egfp* از کلون مثبت شما استفاده شده، عبارت اند از:

- egfp14 F: 5' CGACGGCAACTACAAGACC 3'
- egfp14 R: 5' GTCCTCCTTGAAGTCGATGC 3'

آغازگرهایی که برای تکثیر اختصاصی ژن *23S rRNA* از کلون مثبت شما استفاده شده، عبارت اند از:

- 23S14 F: 5' GACGGAGAAGGCTATGTTGG 3'
- 23S14 R: 5' GTTGCTTCAGCACCGTAGTG 3'

این شیوه نامه از شیوه نامه های Bio-Rad's iQ SYBR Green Supermix اقتباس شده است:

۱- cDNA که به تازگی سنتز کردید، اکنون به عنوان یک الگو در سنجش qPCR استفاده

می شود. برای این سنجش، مقدار بسیار کمی cDNA مورد نیاز است؛ با این حال، شما

به طور مستقیم مقدار cDNA تولید شده را تعیین نمی کنید. در عوض، شما این گونه در

نظر می گیرید که مقدار جرم یکسانی از RNA، مقدار جرمی مشابهی از cDNA را در

طی واکنش RT تولید می کند. از آنجایی که شما یکراست cDNA را کمی سازی

نمی کنید، می توانید مقدار جرم معادل با RNA را بیان کنید. برای این واکنش های

qPCR، شما می خواهید از معادل ۱۰ pg از RNA الگو استفاده کنید؛ بنابراین باید هر

نمونه cDNA را همان طور که در جدول ۱۴-۳ نشان داده شده است، رقیق کنید. با

استفاده از یک سمپلر P10، حجم واکنش نشان داده شده RT را به یک ویال

میکروسانتزیرفیوژ جدید با برجسب «cDNA رقت ۱» پایت کنید. هنگام اضافه کردن آب استریل، سرسمپلر را تعویض کنید. در مرحله بعد، ورتکس کنید تا محلول به‌خوبی ترکیب شود. از یک سرسمپلر جدید برای پایت کردن محلول به یک ویال میکروسانتزیرفیوژ جدید و با برجسب «cDNA رقت ۲» استفاده کنید. هنگام اضافه کردن آب استریل، سرسمپلر را تعویض کنید. در مرحله بعد، ورتکس کنید تا محلول به‌خوبی ترکیب شود. توجه داشته باشید که در این مراحل، RNA به cDNA تبدیل می‌شود که پایداری بیشتری دارد؛ بنابراین نیازی به استفاده از آب بدون RNase نیست. استفاده دیونیزه و اتوکلاو شده پیشنهاد می‌شود.

۲- تعداد ۱۲ ویال PCR سازگار با واکنش زمان واقعی را تهیه کنید و اگر اعداد روی آن چاپ نشده است، آن‌ها را از شماره ۱-۱۲ شماره‌گذاری کنید. روی درب ویال‌ها علامت زنید. با احتمال اینکه جوهر علامت زده شده در اطراف ویال از بین خواهد رفت، بهتر است که موقعیت ویال‌ها در دستگاه را در دفتر خود یادداشت کنید. از طرف دیگر، مربی شما ممکن است یک پلیت (حاوی چندین چاهک) را اختیار شما قرار دهد تا با گروه‌های دیگر به اشتراک بگذارید. این نمونه‌ها را در رک ویال PCR و روی یخ قرار دهید.

۳- دو لوله میکروسانتزیرفیوژ را «مستر میکس *egfp*» و «مستر میکس *23S*» علامت بزنید. برای اطمینان از اینکه نمونه‌های مختلف با هر معرف به‌طور مساوی تیمار شود و برای سهولت در پایت کردن، یک مستر میکس از هر یک از اجزای فهرست شده در جدول ۴-۱۴ را ایجاد کنید. هر مستر میکس به جز cDNA، حاوی تمامی ترکیبات ضروری برای واکنش PCR است. یک مستر میکس حاوی آغازگرهای اختصاصی برای *egfp* خواهد بود. مستر میکس دیگر حاوی آغازگرهای اختصاصی برای *23S rRNA* خواهد بود. قابل توجه مریبان: جدول ۴-۱۴ حجم‌های مورد نیاز برای واکنش PCR با هر جفت آغازگر (سه واکنش RT- و سه واکنش RT+) را نشان می‌دهد که شامل ۲۰ μL حجم اضافی برای محاسبه خطای پایت کردن است. اگر تعداد نمونه‌های شما کمتر یا بیشتر شد، باید حجم را متناسب با آن‌ها تنظیم کنید.

جدول ۴-۳: رقت‌های cDNA

آب استریل (μL)	واکنش رونویسی معکوس	رقت cDNA
۹۹۸	۲ μL واکنش اصلی	رقت cDNA ۱ (۱:۵۰۰)
۹۸	۲ μL از رقت ۱	رقت cDNA ۲ (۱:۲۵۰۰)

جدول ۱۴-۴: مستر میکس‌های qPCR

مستر میکس 23S	مستر میکس <i>egfp</i>	برای یک واکنش (μL) PCR	معرف
۴۷/۲۵ μL	۴۷/۲۵ μL	۶/۷۵	آب استریل
۵/۲۵ μL مخلوط آغازگر 23S	۵/۲۵ μL مخلوط آغازگر <i>egfp</i>	۰/۷۵	مخلوط آغازگر (۱۰ μM) از آغازگر R و F
۸۷/۵ μL	۸۷/۵ μL	۱۲/۵	iQ SYBR Green Supermix
۱۴۰ μL	۱۴۰ μL	۲۰	کل

۴- هر معرف را به ترتیب نشان داده شده در یک ویال میکروسانتریفیوژ و روی یخ پایت کنید.

۵- به‌خوبی ورتکس کنید و روی یخ برگردانید.

۶- مقدار ۲۰ μL از مستر میکس *egfp* را با بیشترین دقت ممکن در هر ویال PCR که با شماره‌های ۱-۶ علامت‌گذاری شده، پایت کنید. پیش از رفتن به مستر میکس بعدی، سرسمپلر را تعویض کنید. مقدار ۲۰ μL از مستر میکس 23S را با بیشترین دقت ممکن در هر ویال PCR که با شماره‌های ۷-۱۲ علامت‌گذاری شده، پایت کنید. از ایجاد حباب‌هایی که ممکن است با خوانش فلورسانس تداخل ایجاد کنند، خودداری کنید.

۷- همان‌طور که در جداول ۱۴-۵ و ۱۴-۶ نشان داده شده است، ۵ μL از cDNA رقیق شده مناسب را با حداکثر دقت ممکن در ویال‌ها پایت کنید. مطمئن شوید که نمونه را از ویال با علامت «cDNA رقت ۲» برداشت می‌کنید. از ایجاد حباب‌هایی که ممکن است با خوانش فلورسانس تداخل ایجاد کنند، خودداری کنید.

جدول ۱۴-۵: تنظیم qPCR با مستر میکس *egfp*

ویال	۱	۲	۳	۴	۵	۶
مستر میکس (۲۰ μL)	<i>egfp</i>	<i>egfp</i>	<i>egfp</i>	<i>egfp</i>	<i>egfp</i>	<i>egfp</i>
cDNA (۵ μL)	القاء-	القاء+	-IPTG	+IPTG	-lac	+lac

جدول ۱۴-۶: تنظیم qPCR با مستر میکس 23S

ویال	۱	۲	۳	۴	۵	۶
مستر میکس (۲۰ μL)	۲۳S	۲۳S	۲۳S	۲۳S	۲۳S	۲۳S
cDNA (۵ μL)	القاء-	القاء+	-IPTG	+IPTG	-lac	+lac

- ۸- ویال‌های PCR را تا اتمام کار تمامی گروه‌ها، روی یخ نگه دارید.
- ۹- مربی شما با انجام یک سانتریفوژ سریع و یا با ضربه زدن به انتهای ویال‌ها، حباب‌ها را پس از بستن درب ویال‌ها حذف می‌کند. بعد از این عمل، ویال‌ها را بلافاصله در یک ترموسایکلر که مطابق جدول ۷-۱۴ برنامه ریزی شده است، قرار دهید.
- ۱۰- تکمیل این برنامه نزدیک به ۱/۵ ساعت طول خواهد کشید. داده‌های جمع‌آوری‌شده در طول آزمایش توسط مربی شما ذخیره می‌شود و شما آن‌ها را در جلسه بعدی آزمایشگاه خود تجزیه و تحلیل خواهید کرد.

جدول ۷-۱۴: برنامه qPCR

چرخه	تکرار	مرحله	زمان مرحله	دمای تنظیمی (°C)
۱	۱	۱	۳ دقیقه	۹۵
۲	۴۰	۱	۱۵ ثانیه	۹۵
		۲	۳۰ ثانیه	۶۰

منبع

1. Thermo Fisher. Real-time PCR (qPCR) Learning Center. <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcrlearning-center.html>. Accessed December 12, 2018.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- اگر رونویسی معکوس RNA باکتری *E. coli* را به جای هگزامر تصادفی با آغازگر oligo-dT آغاز کرده بودید، چگونه بر آزمایش تأثیر می‌گذاشت؟
- ۲- شما mRNA دو ژن *gst::egfp* و *23S rRNA* را در مراحل PCR تکثیر می‌کنید. این دو ژن به دو نوع RNA مختلف (به ترتیب پیام‌رسان و ریبوزومی) اشاره دارد. آیا می‌توان یک mRNA باکتری *E. coli* را به جای tRNA، به‌عنوان یک ژن مرجع تکثیر کرد؟ چرا؟ معیارهای اصلی برای انتخاب ژن مرجع چیست؟

کلاس آزمایشگاه: جلسه پانزدهم

تجزیه و تحلیل سطوح mRNA ژن *gst::egfp* توسط RT-qPCR، بخش دوم

هدف: شما داده‌های RT-qPCR به دست آمده در جلسه قبل را برای تعیین سطوح نسبی mRNA ژن *gst::egfp* در *Escherichia coli* القاء شده با IPTG و لاکتوز را در مقایسه با باکتری‌های فاقد القاء کننده، تجزیه و تحلیل خواهید کرد.

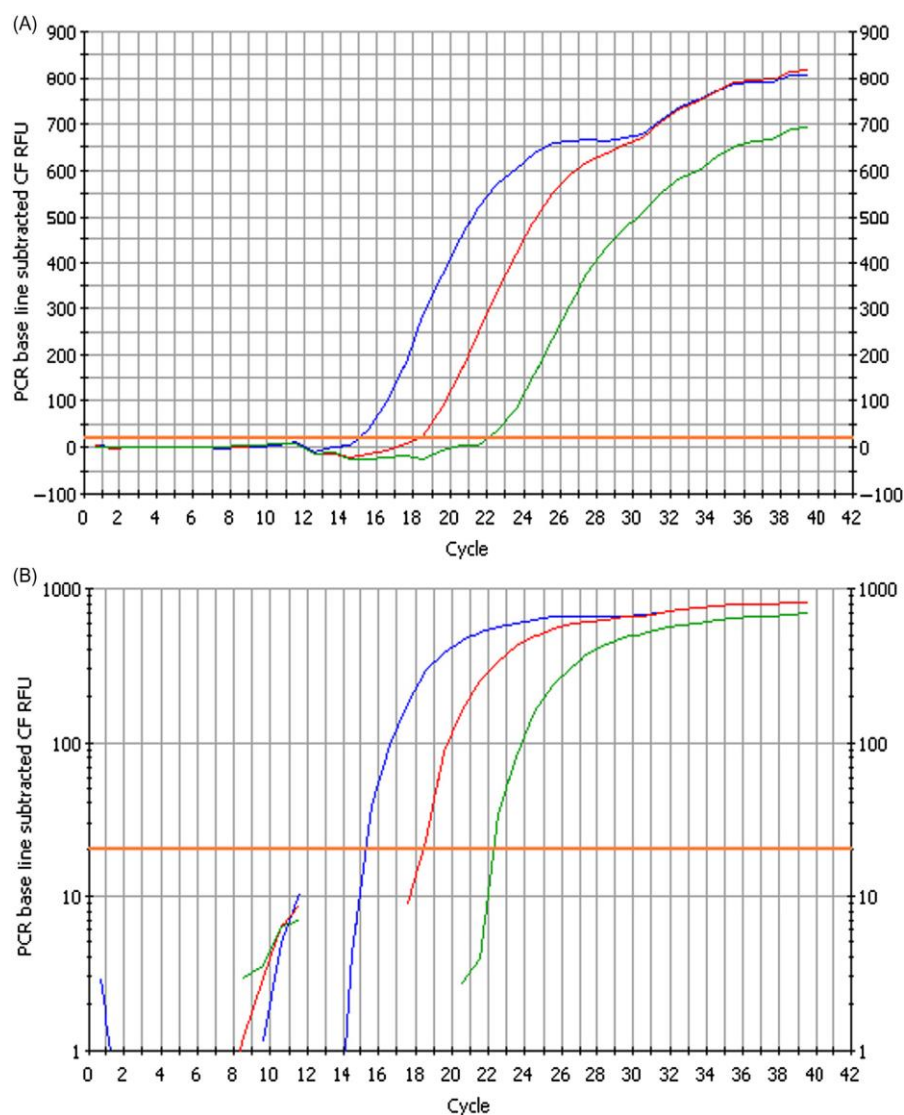
۱- مقدمه

در طول اجرای qPCR، خوانش‌های فلورسانس در مرحله وصل شدن/ بسط هر نمونه و در هر چرخه (در «زمان واقعی») ثبت شد. در پایان اجرا، یک نمودار تکثیر کامل (خوانش‌های فلورسانس در مقابل تعداد چرخه) برای هر نمونه تولید شد. اکنون، شما باید این نمودارها را تجزیه و تحلیل کنید تا سطح بیان ژن را کمی‌سازی کنید. پیش از معرفی این نوع روش‌های کمی‌سازی، ابتدا نگاهی دقیق‌تر به نتایج تولید شده در این آزمایش خواهیم داشت.

همان‌گونه که در کلاس آزمایشگاه: جلسه سوم توضیح داده شد، DNA در واکنش PCR به صورت تصاعدی تکثیر و مقدار آن در هر چرخه دو برابر خواهد شد. بسته به مقدار DNA الگو در زمان شروع، برای تشخیص دادن فلورسانس، چندین چرخه باید سپری شود. کمی‌سازی را نمی‌توان در اوایل آزمایش بررسی کرد. سپس، هنگامی که معرف‌ها در واکنش PCR به یک عامل محدود کننده تبدیل می‌شوند، تکثیر به یک پلاتو^۱ (پیشرفت متوقف خواهد شد) می‌رسد؛ بنابراین، شما نمی‌توانید به طور دقیق سطح cDNA را در این مرحله تعیین کنید. کمی‌سازی دقیق فقط می‌تواند در طول تکثیر نمایی رخ دهد. به دست آوردن داده‌ها از فاز نمایی در qPCR آسان است، زیرا داده‌ها تنها در پایان واکنش جمع‌آوری نمی‌شوند، بلکه در هر چرخه جمع‌آوری می‌شوند.

به طور معمول، نمودار تکثیر هر نمونه با رنگ متفاوتی نشان داده می‌شود. نمودار فلورسانس در مقابل شماره چرخه را می‌توان به صورت خطی یا لگاریتمی نمایش داد (شکل ۱-۱۵). در هر صورت، به وضوح می‌توانید ببینید که شدت فلورسانس (نشان دهنده فراوانی DNA است) با افزایش تعداد چرخه افزایش پیدا می‌کند. در نظر گرفتن این مفهوم کاربردی می‌تواند مفید واقع شود: هر چه cDNA ورودی به PCR بیشتر باشد، سطح فلورسانس سریع‌تر افزایش پیدا خواهد کرد. همان‌گونه که در شکل ۱-۱۵ (A) (نمودار خطی) مشخص است، تمام نمونه‌ها حداقل فلورسانس را در طول ۱۳ چرخه اول تولید می‌کنند.

1. Plateau



شکل ۱۵-۱: نمودارهای تکثیر. رقت‌های ده برابری از cDNA به‌عنوان الگو برای واکنش‌های RT-qPCR و با استفاده از آغازگرهای 23S استفاده شد. خط افقی نارنجی نشان دهنده آستانه است. محور X تعداد چرخه و محور Y واحدهای فلورسانس نسبی (RFU) را نشان می‌دهد. (A) نمودار خطی و (B) نمودار لگاریتمی.

این چرخه‌ها به‌عنوان نقطه شروع در نظر گرفته می‌شوند. سپس، نمودار تکثیر آبی به‌صورت قابل توجهی شروع به افزایش می‌کند و به دنبال آن نمودارهای قرمز و سبز در شمارش چرخه‌های بعدی قرار می‌گیرند. از آنجایی که نمودار آبی افزایش فلورسانس را در اولین چرخه‌ها نشان می‌دهد،

می‌توان نتیجه گرفت که نمونه مورد بررسی حاوی cDNA ورودی بیشتری (در این مورد، S23) نسبت به نمونه‌های دیگر است. برای تخصیص مقادیر عددی به این مشاهدات، یک آستانه تنظیم شده است که تمامی نمودارها را در طول تکثیر نمایی قطع می‌کند. آستانه در شکل ۱۵-۱ با یک خط افقی نارنجی نشان داده شده است. توجه داشته باشید که در نمودار خطی و در چرخه‌های اولیه، هر نمودار از آستانه عبور می‌کند. با حفظ تمامی تنظیمات به‌صورت قبل و با مشاهده داده‌ها در مقیاس لگاریتمی (شکل ۱۵-۱ B) می‌توان دید که آستانه به قدری بالا است که بالاتر از اختلال مشاهده شده در پس‌زمینه باشد، اما به قدر کافی پایین است تا از فاز پلاتو خارج شود. چرخه‌ای که در آن نمودار از آستانه عبور می‌کند، آستانه چرخه^۱ (CT) نامیده می‌شود. هرچه CT پایین‌تر باشد، میزان ژن الگو فراوان‌تر است. از لحاظ نظری، مقدار DNA در طول تکثیر نمایی، باید با هر چرخه دو برابر شود؛ بنابراین، میزان DNA پس از دو چرخه، چهار برابر و پس از حدود ۳/۳ چرخه، ۱۰ برابر بیشتر از مقدار ورودی خواهد شد. با وجود اینکه CT آمپلیکون‌های نشان‌داده‌شده در شکل ۱۵-۱ B تنها در حدود سه چرخه متفاوت دارند، این تصویر نشان‌دهنده تفاوت‌های ۱۰ برابری در فراوانی آمپلیکون 23S است. اگر همین واکنش‌ها با استفاده از PCR معمولی انجام می‌شد، امکان بررسی آمپلیکون‌ها پس از ۳۰ چرخه یا بیشتر روی ژل آگارز وجود داشت. بر اساس نتایج qPCR نشان داده شده (به ویژه در نمای لگاریتمی)، مشخص می‌شود که در این مرحله از واکنش، فاز پلاتو رسیده و معرف‌ها به یک عامل محدود کننده تبدیل شده‌اند. با استفاده از این حالت می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت کمی در سطوح 23S rRNA بین نمونه‌ها وجود دارد؛ با این حال، با بررسی آمپلیکون‌ها در اوایل واکنش (در فاز نمایی)، می‌توان اختلاف ۱۰ برابری بین هر نمونه را مشاهده کرد.

دو روش کلی برای گزارش کمی‌سازی وجود دارد: مطلق و نسبی. کمی‌سازی مطلق^۲، مقدار یک ژن هدف در نمونه‌های ناشناخته شما را با درون‌یابی^۳ از یک منحنی استاندارد مطلق محاسبه می‌کند. این منحنی به‌طور معمول توسط RNA رونویسی شده در شرایط آزمایشگاهی^۴ یا DNA پلازمید با نسخه‌های شناخته شده از یک ژن هدف ساخته می‌شود. این روش زمانی مفید است که بخواهید تعداد نسخه‌های دقیق یک ژن را تعیین کنید. روش دوم کمی‌سازی، کمی‌سازی نسبی^۵ نامیده می‌شود. در این روش تفاوت در بیان یک ژن هدف در بین دو نمونه، تعیین می‌شود. گزارش مقادیر نسبی بیشتر وقت‌ها هنگام مطالعه تغییرات بیان ژن کافی است. هدف این روش پاسخگویی

-
1. Threshold. cycle. (CT)
 2. Absolute. quantification
 3. Interpolation
 4. *in. vitro*
 5. Relative. quantification

به این پرسش است که «چه مقدار از ژن X در نمونه ۱ در مقایسه با نمونه ۲ بیان شده است؟» کمی‌سازی نسبی، تغییرات n برابری بیان ژن را به جای مقادیر دقیق، گزارش می‌کند: «ژن X در نمونه ۱ در مقایسه با نمونه ۲ پنج برابر بیشتر بیان شده است». در این مثال، نمونه ۲ به‌عنوان کالیبراتور^۱ (نمونه‌ای که به‌عنوان مبنای مقایسه استفاده می‌شود)، عمل می‌کند. در آزمایش‌های خود، سطوح $gst::egfp$ را بین نمونه‌های القاء نشده، القاء شده با IPTG و القاء شده با لاکتوز، مقایسه خواهیم کرد؛ بنابراین، نمونه‌های القاء نشده به‌عنوان کالیبراتور عمل می‌کند و سطوح بیانی $gst::egfp$ نمونه‌های القا شده با IPTG و لاکتوز نسبت به نمونه‌های القاء نشده، مقایسه خواهد شد.

دو روش برای کمی‌سازی نسبی وجود دارد: روش منحنی استاندارد نسبی و روش C_T مقایسه‌ای (روش $\Delta\Delta C_T$ نیز نامیده می‌شود). روش C_T مقایسه‌ای در این جلسه آزمایشگاهی استفاده خواهد شد. لازم به ذکر است که فرض روش C_T مقایسه‌ای بر این مبنا است که بازده تکثیر PCR برای تکثیر ژن آزمایشی و ژن مرجع، بسیار نزدیک به هم هستند. همه واکنش‌ها بازدهی ۱۰۰ درصدی تکثیر را ندارند، زیرا مقدار DNA به‌طور دقیق در هر چرخه دو برابر می‌شود. بازدهی بیشتر واکنش‌ها مقداری کمتر یا بیشتر از ۱۰۰ درصد خواهند بود که این امر در نهایت می‌تواند بر کمیت تأثیر بگذارد. قبل از انجام این مرحله، یک آزمایش اعتبار سنجی به‌منظور تأیید مشابه بودن بازدهی تکثیر آغازگرها صورت پذیرفته است.

در آخرین آزمایش، شما نه تنها $gst::egfp$ (ژن آزمایشی) بلکه $23S$ rRNA (ژن مرجع) را نیز تکثیر کردید. وجود این ژن مرجع برای مطالعه روش C_T مقایسه‌ای مورد نیاز است. ما مقادیر C_T واکنش‌های $egfp$ را با واکنش‌های $23S$ rRNA برای نرمال‌سازی داده‌ها مقایسه خواهیم کرد. سپس، این تفاوت‌ها (ΔC_T) با کالیبراتور یعنی نمونه فاقد القاء (دو مقایسه، بنابراین $\Delta\Delta C_T$) مقایسه خواهد شد. به این ترتیب، سطوح $gst::egfp$ در کنترل بدون القاء $\times 1$ است و سطوح $gst::egfp$ در نمونه‌های القاء شده با IPTG و القاء شده با لاکتوز، تفاوت n برابری خواهند داشت.

مرحله ۱: نرمال‌سازی ژن مرجع باکتری

$$\Delta C_T = C_{T\ egfp} - C_{T\ 23S}$$

برای هر cDNA در این آزمایش (بدون القاء، IPTG و لاکتوز)، شما C_T واکنش $egfp$ را از C_T واکنش $23S$ کم کرده تا یک ΔC_T به دست آورید.

1. Calibrator

مرحله ۲: مقایسه با کالیبراتور

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ IPTG}} - \Delta C_{T \text{ no}}$$

هنگامی که مقدار ΔC_T برای cDNA های بدون القاء، IPTG و لاکتوز محاسبه شد، هر مقدار را نسبت به کالیبراتور (بدون القاء) گزارش دهید تا یک $\Delta\Delta C_T$ به دست آورید.

مرحله ۳: محاسبه کمیت نسبی

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

در نهایت، مقدار ژن آزمایشی (*gst::egfp* با IPTG یا لاکتوز) که اکنون نسبت به یک ژن مرجع (23S یا IPTG یا لاکتوز) و یک کالیبراتور (بدون القاء) نرمال سازی شده است، محاسبه می شود تا مقدار نسبی mRNA ژن *gst::egfp* را در اختیار ما قرار دهد. با در دست داشتن این مقادیر، می توان نتیجه گرفت که چه مقدار mRNA ژن *gst::egfp* با IPTG و لاکتوز در کلون مثبت شما بیان شده است. منابع ارائه شده در پایان این فصل، راهنمای دقیقی را در مورد انجام و تجزیه و تحلیل آزمایش های RT-qPCR در اختیار شما قرار می دهند.

۲- تمرین های آزمایشگاهی

توجه: شیوه نامه های زیر برای تجزیه و تحلیل داده های به دست آمده در Bio-Rad iCycler و با استفاده از نرم افزار MyiQ است. اگر از تجهیزات ساخته شده توسط شرکت دیگری استفاده می کنید، مربی شما شیوه نامه های تجزیه و تحلیل داده ها را در اختیار شما قرار می دهد. مربی شما ممکن است مراحل ۱-۱۷ را برای شما انجام دهد.

۱- نرم افزار MyiQ متصل به iCycler را باز کنید.

۲- روی افزونه «مشاهده داده های پس از اجرا» کلیک کنید.

۳- روی فایل داده (odm) از جلسه آزمایشگاه خود دوبار کلیک کنید تا باز شود.

۴- روی دکمه «انتخاب چاهک ها» کلیک کنید و موقعیت های واکنش های گروه خود را انتخاب کنید. اگر گروه شما ۱۲ واکنش و در یک ردیف را به خود اختصاص می داد، می توانید روی علامت ردیف (A، B و غیره) کلیک کنید تا به طور خودکار کل ردیف انتخاب شود.

۵- مطمئن شوید که «نمودار لگاریتمی» نمایش داده می شود؛ یعنی نمودار فعلی، یک نمودار عادی است.

۶- بررسی کنید که نمودارهای تقویت در چرخه های اولیه آزمایش، در امتداد ۰ واحد

فلورسانس نسبی (RFU) (موازی با محور x) اجرا می شوند. اگر نمودارها بسیار کمتر از ۰ و یا اگر مقادیر RFU در چرخه های اولیه بسیار متفاوت باشد، باید تنظیمات پایه را تغییر

دهید. به‌منظور این عمل، چرخه‌ای را تعیین کنید که در آن اولین (اولین نمودار سمت چپ) نمودار شما شروع به بالا رفتن از ۰ RFU (تکثیر) می‌کند. تنظیمات پایه را بر مبنای این چرخه‌ها تنظیم کنید.

۷- روی دکمه «نمایش لگاریتمی» کلیک کنید.

۸- بررسی کنید تا موقعیت آستانه که به‌صورت خودکار محاسبه شده (خط نارنجی)، بالاتر از محور اختلالات پس‌زمینه در محور y است (نباید هیچ پیک تیز دیده شده در چرخه‌های اولیه را قطع کند) اما به اندازه کافی پایین است که نمودارها را در یک سوم پایین فاز نمایی قطع کند.

۹- اگر تنظیمات در مراحل ۶ و ۸ تغییر کرد، باید روی گزینه «محاسبه مجدد چرخه‌های آستانه» کلیک کنید.

۱۰- روی گزینه «گزارش‌ها» کلیک کنید.

۱۱- در منوی کشویی «انتخاب گزارش»، «PCR baseline» را انتخاب کنید.

۱۲- روی «ذخیره در فایل» کلیک و گزارش را در یک درایو فلش ذخیره کنید.

۱۳- برای چاپ یک نسخه به‌منظور درج در دفترچه یادداشت آزمایشگاهی خود، روی دکمه «چاپ» کلیک کنید.

۱۴- مایکروسافت ورد را باز کنید. گزارشی را که ذخیره کرده‌اید (a Rich Text Format file)، باز کنید.

۱۵- عدد چاهک و مقادیر C_T را برای هر یک از واکنش‌های خود کپی کنید.

۱۶- مایکروسافت اکسل را باز کنید.

۱۷- یک صفحه گسترده جدید با عناوین ستون و ردیف نشان داده شده در شکل ۱۵-۲ ایجاد کنید. مقادیر C_T خود را از واکنش‌های RT+ فقط در سلول‌های مناسب بچسبانید (پیست کنید).

۱۸- فرمول‌های نشان داده شده در شکل ۱۵-۳ را برای محاسبه مقادیر ΔC_T ، $\Delta\Delta C_T$ و $2^{-\Delta\Delta C_T}$ وارد کنید.

۱۹- اکنون آخرین ستون (کمیت نسبی) سطح *gst::egfp* را در هر نمونه نسبت به نمونه‌های بدون القاء نشان می‌دهد.

۲۰- زیر داده‌هایی که وارد شده است، عنوان‌های ستون و ردیف نشان داده شده در شکل ۱۵-۳ را وارد کنید. مقادیر C_T خود را برای شش واکنش RT- و شش واکنش RT+ قرار دهید.

۲۱- برای هر نمونه RNA (بدون القاء کننده، IPTG، لاکتوز)، مقادیر C_T مربوط به واکنش‌های واکنش‌های RT- و RT+ را برای هر جفت آغازگر تعیین کنید (در ابتدا *egfp* را تجزیه و تحلیل خواهید کرد). به یاد داشته باشید که این واکنش‌های RT- برای کنترل آلودگی با DNA گنجانده شده است.

۲۲- تکثیر با آغازگرهای *egfp* آلودگی با DNA پلازمید را نشان می‌دهد. برای محاسبه مقدار DNA پلازمید که در نمونه‌های RT+ شما وجود دارند، محاسبه ΔC_T را برای هر واکنش *egfp* انجام دهید. این بار از نمونه RT+ به عنوان کالیبراتور استفاده خواهید کرد:

$$\Delta C_T = C_{T \text{ without RT}} - C_{T \text{ with RT}}$$

شما علاقه‌ای به انجام مقایسه دوم بین C_T در یک نمونه RNA نسبت به نمونه دیگر در این مرحله ندارید؛ بنابراین از مقادیر $\Delta \Delta C_T$ استفاده نخواهید کرد. شما تنها یک مقایسه (ΔC_T) را انجام خواهید داد. در نهایت، معادله $2^{-\Delta C_T}$ ، مقدار DNA پلازمید آلوده (بر حسب درصد) را محاسبه خواهد کرد. این مقدار را در ۱۰۰ ضرب کنید تا درصد آلودگی محاسبه شود.

$$\text{DNA contamination}_{\text{IPTG}}(\%) = 2^{[-C_T \text{ without RT} - C_T \text{ with RT}]} \times 100$$

۲۳- تکثیر با آغازگرهای ۲۳S نشان دهنده آلودگی با DNA ژنومی خواهد بود. محاسبات شرح داده شده در مرحله ۲۲ را برای هر واکنش ۲۳S انجام دهید. به شکل ۱۵-۳ مراجعه کنید.

۲۴- به طور خلاصه، این نتایج در دفترچه یادداشت شما جمع‌آوری شود:

الف. مقدار نسبی mRNA ژن *gst::egfp* در نمونه‌های القا نشده، القا شده با IPTG و

لاکتوز. این باید به عنوان یک تغییر درصدی بیان شود (مراحل ۱۹-۱۷).

ب. آلودگی DNA پلازمید برای هر نمونه (مرحله ۲۲).

پ. آلودگی DNA ژنومی برای هر نمونه (مرحله ۲۳).

	A	B	C	D	E	F
1		<i>egfp</i>	23S	$C_T \text{ egfp} - C_T \text{ 23S}$	$\Delta C_T \text{ inducer} - \Delta C_T \text{ no inducer}$	Relative Quantity
2		C_T	C_T	ΔC_T	$\Delta \Delta C_T$	$2^{-\Delta \Delta C_T}$
3	no inducer			$=B3-C3$	$=D3-D3$	$=2^{-E3}$
4	IPTG			$=B4-C4$	$=D4-D3$	$=2^{-E4}$
5	lactose			$=B5-C5$	$=D5-D3$	$=2^{-E5}$
6						
7						
8						
9						

شکل ۱۵-۲: نمونه اکسل. این شکل طرح و فرمول‌های مورد استفاده در روش C_T مقایسه‌ای را برای محاسبه کمیت نسبی نشان می‌دهد.

	A	B	C	D	E	F	G
1		egfp	23S	CT egfp - CT 23S	ΔCT inducer - ΔCT no inducer	Relative Quantity (Fold Change)	
2		CT	CT	ΔCT	$\Delta \Delta CT$	$2^{-\Delta \Delta CT}$	
3	No inducer			%B3-C3	+D3-D3	+2 ^{-E3}	
4	IPTG			%B4-C4	+D4-D3	+2 ^{-E4}	
5	Lactose			%B5-C5	+D5-D3	+2 ^{-E5}	
6							
7		egfp		CT without RT - CT with RT	Quantity of contaminating plasmid DNA (%)		
8		without RT	with RT	ΔCT	$2^{-\Delta CT}$		
9	No inducer			%B9-C9	+2 ^{-D9} /100		
10	IPTG			%B10-C10	+2 ^{-D10} /100		
11	Lactose			%B11-C11	+2 ^{-D11} /100		
12							
13							
14		23S		CT without RT - CT with RT	Quantity of contaminating genomic DNA (%)		
15		without RT	with RT	ΔCT	$2^{-\Delta CT}$		
16	No inducer			%B16-C16	+2 ^{-D16} /100		
17	IPTG			%B17-C17	+2 ^{-D17} /100		
18	Lactose			%B18-C18	+2 ^{-D18} /100		
19							
20							
21							

شکل ۱۵-۳: نمونه اکسل. این شکل، طرح و فرمول‌های مورد استفاده برای محاسبه درصد آلودگی DNA را نشان می‌دهد.

منابع

1. Applied Biosystems. Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR. ,http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf/; 2008.
2. Applied Biosystems. User bulletin #2. ,http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_040980.pdf/; 2001.
3. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nat Protoc 2008;3:1101_8.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- چرا برنامه‌های استاندارد PCR بیشتر وقت‌ها شامل ۳۰ یا تعداد بیشتری چرخه است، درحالی‌که در نمودارهای تکثیر qPCR (مانند شکل ۱-۱۵ B) و در چرخه‌های بعد (بعد از چرخه‌های شماره ۳۰)، بیشتر وقت‌ها به فاز پلاتو می‌رسد؟
- ۲- شما سطوح mRNA ژن *gst::egfp* را در کشت‌های القاء شده نسبت به القاء نشده تعیین کردید. بدون وجود یک مولکول القاء کننده برای مهار اپراتور *lac* وکتور pET-41a آیا mRNA ژن *gst::egfp* رونویسی خواهد شد؟ چرا؟

تجزیه و تحلیل سطوح mRNA ژن *gst::egfp* توسط RT-PCR نیمه کمی، بخش اول

هدف: RNA کل خالص سازی شده توسط شما، با واکنش رونویسی معکوس (RT) به cDNA تبدیل می شود. سپس از آن cDNA، به عنوان الگو برای واکنش زنجیره ای پلیمرز نیمه کمی^۱ (PCR) استفاده می شود. در نهایت، شما DNA را با آغازگرهای اختصاصی *egfp* (ژن آزمایشی) و 23S rRNA (ژن مرجع) تکثیر خواهید کرد.

۱- مقدمه

مقدمه ارائه شده در کلاس آزمایشگاه: جلسه چهاردهم را برای کسب اطلاعات بیشتر در مورد RT مطالعه کنید. همان گونه که از نام RT-PCR نیمه کمی پیداست، این روش کمیت کمتری را نسبت به روش RT-Quantitative PCR (qPCR) در اختیار قرار می دهد (به کلاس آزمایشگاه: جلسات ۱۴ و ۱۵ مراجعه کنید)، اما اگر تغییرات در بیان ژن نزدیک به ۱۰ برابر یا بیشتر باشد، می تواند به عنوان روشی مطمئن مورد استفاده قرار گیرد. با استفاده از این روش ممکن است تغییرات کوچک تری را بتوان شناسایی کرد؛ با این حال، محدوده اندازه گیری ممکن است به دلیل کم تر بودن حساسیت این سنجش کاهش یابد. RT-PCR به عنوان یک روش «نقطه پایانی» در نظر گرفته می شود زیرا شما سطوح cDNA (معادل سطوح mRNA) را در پایان مراحل PCR با الکتروفورز ژل آگارز بررسی می کنید. شما مانند RT-qPCR، سطوح cDNA را در طول واکنش PCR بررسی نمی کنید.

همان گونه که ذکر شد، واکنش PCR مولکول DNA را به صورت تصاعدی تکثیر کنید و متوجه خواهید شد که مقدار DNA در هر چرخه دو برابر خواهد شد. بسته به مقدار DNA الگو در آغاز واکنش، تولید فلورسانس قابل تشخیص چندین مرحله به طول خواهد انجامید. کمی سازی را نمی توان در اوایل این آزمایش انجام داد. در مراحل بعدی و هنگامی که میزان معرف ها در PCR به یک عامل محدود کننده تبدیل شدند، تکثیر به یک پلاتو خواهد رسید؛ بنابراین نمی توانید سطوح cDNA را در این فاز پلاتو به طور دقیق تعیین کنید. در نتیجه تعیین چرخه های موجود در فاز نمایی هنگام استفاده از RT-PCR برای تعیین کمیت بیان ژن مهم است. در عمل، فاز نمایی باید با هر نمونه cDNA جدید و هر جفت آغازگر، پیش از انجام آزمایش واقعی تعیین شود. در این

1. Semiquantitative. polymerase. chain. reaction. (PCR)

مرحله، تلاش برای تشخیص تغییرات کوچک بسیار مهم است، اما در مورد این آزمایش، ما در حال بررسی تغییرات بزرگ هستیم. علاوه بر این، به‌طور کلی طیف وسیعی از چرخه‌ها در فاز نمایی قرار می‌گیرند و بنابراین برای این آزمایش، عامل ذکر شده از قبل تعیین شده است. دلایل دیگری نیز برای نام‌گذاری RT-PCR نیمه‌کمی، به حالت نیمه‌کمی وجود دارد. در درجه اول، تشخیص cDNA های تکثیر شده بر اساس شدت باندهای موجود در ژل آگارز است. اتیدیوم بروماید یا رنگ‌های فلورسنت دای مانند GelRed معرف‌هایی است که برای تشخیص DNA مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ با این حال، موارد ذکر شده به نسبت سنجش فلورسانس حساس نیستند. علاوه بر این، مقایسه شدت فرآورده‌های مختلف PCR کمی نیست، زیرا یک فرآورده کوچک‌تر به‌طور معمول با راندمان بالاتر نسبت به یک فرآورده بزرگ‌تر تکثیر می‌شود.

برای کنترل این محدودیت، مناطقی را برای هر دو ژن (*egfp* و *23S rRNA*) تکثیر خواهید کرد که طول یکسانی داشته باشند. علاوه بر این، مقدار رنگ دای که برای وصل شدن به DNA در دسترس است، با اجرای همه نمونه‌ها روی یک ژل، ثابت باقی می‌ماند. همیشه باید از مقایسه شدت باندها روی ژل‌های مختلف خودداری کنید. در نهایت، RT-PCR نیمه‌کمی متکی بر چندین مرحله متوالی است که باید با دقت انجام شود تا از ایجاد نتایج ناسازگار در نمونه‌ها جلوگیری شود. فرض این روش و همچنین RT-qPCR بر این است که بازدهی RT در هر نمونه یکسان خواهد بود. به عبارت دیگر، اگر ۱ میکروگرم RNA کل را به هر لوله پایت کنید، باید همان مقدار cDNA تولید شود. به عبارت دیگر، اگر ۱ μg از RNA کل را به هر ویال پایت کنید، باید همان مقدار cDNA در آن ویال تولید شود؛ بنابراین، بارگذاری مقادیر معادل RNA کل در هر واکنش RT حیاتی است. برای محدود کردن این احتمال که بازدهی RT از نمونه‌ای به نمونه دیگر متفاوت است، یک مستر میکس از همه معرف‌ها به جز RNA برای اطمینان از تیمار شدن مشابه هر RNA، ایجاد و سپس تقسیم خواهد شد. پس‌از این مرحله، باید حجم‌های معادل cDNA الگو را به‌طور دقیق در هر واکنش PCR پایت کنید. RT-PCR نیمه‌کمی شامل مرحله نهایی الکتروفورز ژل آگارز است. می‌توانید تصور کنید که اگر نمونه‌ای را در چاهک، کمتر از حد مورد نیاز بارگیری کنید، کمیت شما تغییر خواهد کرد، زیرا این چاهک نسبت به زمانی که آن را به‌درستی بارگیری کرده بودید، شدت کمتری خواهد داشت. فرآورده‌های *23S* به‌عنوان عامل کنترل بارگیری ما عمل خواهند کرد. مهم‌تر از همه، منابع خطا را می‌توان با پایت کردن دقیق به حداقل رساند. مزیت اصلی RT-PCR نیمه‌کمی نسبت به RT-qPCR در این است که این روش نیازی به ترموسایکلر با قابلیت تشخیص فلورسانس (می‌تواند بسیار گران باشد) ندارد.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

الف. رونویسی معکوس

بهتر است شیوه‌نامه‌های ارائه شده در مورد RT را در کلاس آزمایشگاه: جلسه چهاردهم-الف را مشاهده کنید.

ب. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نیمه کمی

قابل توجه مربیان: یک ترموسایکلر با ۹۶ جایگاه، واکنش‌های PCR را برای حداکثر هشت گروه دو نفره از دانشجویان (۱۲ واکنش در هر جفت) انجام می‌دهد. اگر بیش از این تعداد دانشجویان دارید، باید یکی از این موارد زیر را انجام دهید: از یک ترموسایکلر دیگر استفاده کنید، برخی از واکنش‌ها را در فویل بیچید و در یخچال نگهداری کنید تا اولین اجرا کامل شود و سپس اجرای دوم را انجام دهید، یا واکنش‌ها را به ترتیب حذف کنید. سعی کنید که نمونه‌های القا شده با لاکتوز را حذف، تا به جای ۱۲ واکنش، هشت واکنش باقی بماند. سپس ترموسایکلر واکنش‌های مربوط به ۱۲ گروه را در خود جای می‌دهد. از آنجایی که تکثیر هر دو ژن *gst::egfp* و *23S* برای اهداف کمی‌سازی ضروری است و واکنش‌های RT-تضمین می‌کنند که آلودگی DNA در کمی‌سازی mRNA وجود نخواهند داشت، در صورت امکان، گنجاندن این مرحله ضروری خواهد بود.

آغازگرهایی که برای تکثیر اختصاصی ژن *gst::egfp* از کلون مثبت شما استفاده کرده است، عبارت‌اند از:

- *egfp* 16F 5' CCTGAAGTTCATCTGCACCA 3'
- *egfp* 16R 5' TGCTCAGGTAGTGGTTGTCTG 3'

آغازگرهایی که برای تکثیر اختصاصی ژن *23S rRNA* از کلون مثبت شما استفاده کرده است، عبارت‌اند از:

- *23S* 16F 5' ACTGCGAATACCGGAGAATG 3'
- *23S* 16R 5' CCTGTTTCCCATCGACTACG 3'

آغازگرهای رفت و برگشت به صورت مخلوط باهم گنجانده می‌شوند. هر جفت آغازگر باید یک فرآورده با اندازه ۴۷۹bp را تکثیر کند.

۱- مولکول cDNA که سنتز کردید، اکنون به عنوان یک الگو در یک سنجش PCR نیمه کمی

استفاده خواهد شد. حجم بسیار کمی از cDNA مورد نیاز خواهد بود (۵/۰ μL) برای یک

واکنش (۲۵ μL)؛ بنابراین شما هر نمونه را به صورت ۱:۵ رقیق کنید تا حجم بیشتری را

پایپت کنید. مقدار ۸۰ μL آب را به هر ویال واکنش cDNA اضافه کنید (حجم کل

اکنون ۱۰۰ μL است). به منظور ترکیب شدن واکنش، ورتکس انجام دهید. این امر را برای

هر واکنش cDNA تکرار کنید (با یک سرسمپلر جدید).

- ۲- تعداد ۱۲ ویال PCR را تهیه کنید و آن‌ها را با شماره‌های ۱-۱۲ (درپوش و اطراف) علامت بزنید. آن‌ها را در یک رک ویال PCR و روی یخ قرار دهید.
- ۳- دو ویال میکروسانتریفیوژ را تحت عنوان «مستر میکس *egfp*» و «مستر میکس *23S*» علامت‌گذاری کنید. برای اطمینان از اینکه نمونه‌های مختلف با هر معرف به‌طور مساوی تیمار شده است و برای سهولت در پایت کردن، یک مستر میکس متشکل از هر یک از اجزای فهرست شده در جدول ۱-۱۶ را ایجاد کنید. هر مستر میکس به‌غیر از cDNA، حاوی تمامی ترکیبات لازم برای واکنش PCR است. دومین مستر میکس حاوی آغازگرهای اختصاصی برای *23S rRNA* خواهد بود. قابل توجه مربیان: جدول ۱-۱۶ حجم‌های مورد نیاز برای واکنش PCR با هر جفت آغازگر (سه واکنش RT- و سه واکنش +RT) را نشان می‌دهد که شامل $22/5 \mu\text{L}$ حجم اضافی برای محاسبه خطای پایت کردن است. اگر تعداد نمونه‌های شما کمتر یا بیشتر شد، باید حجم را متناسب با آن‌ها تنظیم کنید.
- ۴- هر معرف را به ترتیب نشان داده شده در ویال‌های میکروسانتریفیوژ و روی یخ پایت کنید.
- ۵- به‌منظور مخلوط شدن، نمونه‌ها را به‌خوبی ورتکس کنید و سپس روی یخ بازگردانید.
- ۶- مقدار $22/5 \mu\text{L}$ از مستر میکس *egfp* را با حداکثر دقت ممکن به ویال‌های PCR شماره ۱-۶، پایت کنید. سر سمپلرها را هنگام تعویض انتقال مستر میکس‌ها، تغییر دهید. مقدار $22/5 \mu\text{L}$ از مستر میکس *23S* به ویال‌ها PCR شماره ۷-۱۲ پایت کنید.
- ۷- همان‌گونه که در جداول ۲-۱۶ و ۳-۱۶ نشان داده شده است، $2/5 \mu\text{L}$ از cDNA رقیق شده مناسب را با حداکثر دقت ممکن در ویال‌ها پایت کنید.
- ۸- ویال‌ها را تا زمان تکمیل کار گروه‌های دیگر، روی یخ نگه دارید.
- ۹- ویال‌ها را در یک ترموسایکلر که مطابق جدول ۴-۱۶ برنامه‌ریزی شده است، قرار دهید.
- ۱۰- تکمیل این برنامه نزدیک به $1/5$ ساعت طول خواهد کشید. مربی شما ویال‌ها را پس از اتمام برنامه از دستگاه خارج می‌کند و آن‌ها را تا جلسه بعدی آزمایشگاه، در دمای 20°C - نگه‌داری خواهد کرد.

جدول ۱۶-۱: مستر میکس‌های PCR

مسترمیکس 23S	مسترمیکس <i>egfp</i>	برای یک واکنش (μL) PCR	معرف
۱۳۱/۶ μL	۱۳۱/۶ μL	۱۸/۸	آب استریل
۱۷/۵ μL	۱۷/۵ μL	۲/۵	۱۰×Taq buffer
۳/۵ μL	۳/۵ μL	۰/۵	مخلوط dNTP (۱۰ mM) از هر dNTP
۳/۵ μL مخلوط آغازگر <i>rrs</i>	۳/۵ μL مخلوط آغازگر <i>egfp</i>	۰/۵	مخلوط آغازگر (۱۰ μM از آغازگر R و F)
۱/۴ μL	۱/۴ μL	۰/۲	Taq polymerase (۵ U/ μL)
۱۵۷/۵ μL	۱۵۷/۵ μL	۲۲/۵	کل

جدول ۱۶-۲: تنظیم PCR با مستر میکس *egfp*

۶	۵	۴	۳	۲	۱	ویال
<i>egfp</i>	<i>egfp</i>	<i>egfp</i>	<i>egfp</i>	<i>egfp</i>	<i>egfp</i>	مسترمیکس (۲۲/۵ μL)
+lac	-lac	+IPTG	-IPTG	القاء+	القاء-	cDNA (۲/۵ μL)

جدول ۱۶-۳: تنظیم PCR با مستر میکس *rrs*

۶	۵	۴	۳	۲	۱	ویال
<i>rrs</i>	<i>rrs</i>	<i>rrs</i>	<i>rrs</i>	<i>rrs</i>	<i>rrs</i>	مسترمیکس (۲۲/۵ μL)
+lac	-lac	+IPTG	-IPTG	القاء+	القاء-	cDNA (۲/۵ μL)

جدول ۱۶-۴: برنامه PCR

دمای تنظیمی ($^{\circ}\text{C}$)	زمان مرحله	مرحله	تکرار	چرخه
۹۵	۲ دقیقه	۱	۱	۱
۹۵	۳۰ ثانیه	۱	۲۶	۲
۶۰	۳۰ ثانیه	۲		
۷۲	۴۵ ثانیه	۳		
۷۲	۱۰ دقیقه	۱	۱	۳
۴	∞	۱	۱	۴

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- اگر رونویسی معکوس RNA باکتری *E. coli* را به جای هگزامر تصادفی با آغازگر oligo-dT آغاز کرده بودید، چگونه بر آزمایش تأثیر می‌گذاشت؟
- ۲- شما mRNA دو ژن *gst::egfp* و *23S rRNA* را در مراحل PCR تکثیر می‌کنید. این دو ژن به دو نوع RNA مختلف (به ترتیب پیام‌رسان و ریبوزومی) اشاره دارد. آیا می‌توان یک mRNA باکتری *E. coli* را به جای rRNA، به‌عنوان یک ژن مرجع تکثیر کرد؟ چرا؟ معیارهای اصلی برای انتخاب ژن مرجع چیست؟

کلاس آزمایشگاه: جلسه هفدهم

تجزیه و تحلیل سطوح mRNA ژن *gst::egfp* توسط RT-PCR نیمه کمی، بخش دوم

هدف: شما واکنش های نیمه کمی RT-PCR خود را با الکتروفورز ژل آگارز مشاهده خواهید کرد. از نرم افزار تصویربرداری (در صورت موجود بودن) برای تعیین کمیت سطوح *gst::egfp* نرمال شده به 23S rRNA استفاده خواهد شد. به این ترتیب، شما قادر خواهید بود سطوح نسبی mRNA ژن *gst::egfp* الحاقی را در *E. coli* تیمار شده با IPTG و لاکتوز مقایسه کنید.

۱- مقدمه

مقدمه کلاس آزمایشگاه: جلسه شانزدهم مطالعه شود.

۲- تمرین های آزمایشگاهی

الف. الکتروفورز ژل آگارز

۱- ژل آگارز ۱ درصد را که شامل GelRed بوده (همان گونه که در کلاس آزمایشگاه: جلسه

سوم توضیح داده شد)، در مخزن ژل بریزید. اگر ۱۲ واکنش PCR انجام شده باشد، به دو ردیف چاهک (هشت چاهک در هر ردیف) روی مینی ژل خود برای تمامی واکنش ها و نشانگر مولکولی وزن نیاز خواهید داشت. به این منظور، یک شانه را در بالای سینی ژل و یک شانه اضافی در وسط سینی ژل قرار دهید. از طرف دیگر، می توانید تمام نمونه ها را روی یک ژل بزرگ تر اجرا کنید که دست کم ۱۳ چاهک را در خود جای دهد.

۲- نمونه های PCR خود را از آخرین جلسه آزمایشگاه دریافت کنید و اجازه دهید در دمای اتاق ذوب شوند.

۳- مقدار مناسبی از بافر بارگذاری DNA را یکر است به هر نمونه اضافه کنید. برای مخلوط کردن با انگشت به انتهای ویال ضربه بزنید.

۴- مقدار مناسبی از خط کش ۱ kb را به اولین چاهک در هر ردیف اضافه کنید (جدول ۱۷-۱ را مشاهده کنید).

۵- مقدار ۵ μ L از هر نمونه را به ترتیب نشان داده شده در جدول ۱۷-۱ بارگذاری کنید.

۶- دستگاه را سرهم بندی و سیم ها را به منبع تغذیه وصل کنید. ژل را با ولتاژ تقریبی ۸۵V یا با ولتاژ مناسب برای دستگاه خود (۱۰V/cm) اجرا کنید. وقتی رنگ دای بروموفنول آبی

ردیف بالا یک‌چهارم مسیر ژل را به سمت پایین حرکت کرد (نیم راه تا ردیف دوم چاهک)، دستگاه را خاموش کنید و ژل را روی یک ترانسیلیمیناتور UV قرار دهید. از ژل خود عکس بگیرید و پیش از ادامه کار، آن را ذخیره کنید.

جدول ۱۷-۱: ترتیب بارگذاری نمونه در ژل آگارز

خالی	۶	۵	۴	۳	۲	۱	خط کش ۱kb	ردیف بالا
خالی	۱۲	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	خط کش ۱kb	ردیف پایین

ب. کمی‌سازی

قابل توجه مریبان: اگر نرم‌افزار تصویربرداری در دسترس نیست، به دانش‌آموزان آموزش دهید که شدت باند فرآورده‌های PCR (+RT) ژن *gst::egfp* را بین نمونه‌های زیر به‌صورت چشمی مقایسه کنند: بدون القاء، IPTG و لاکتوز. همچنین، از آن‌ها بخواهید هرگونه تفاوت در شدت باند فرآورده PCR ژن *23S rRNA* را مشاهده و بررسی کنند. حضور و شدت فرآورده‌های در خطوط (-RT) نیز باید ثبت شود. شیوه‌نامه‌های زیر برای رایانه‌های شخصی در نظر گرفته شده است. ممکن است تغییراتی جزئی برای سایر سیستم‌عامل‌ها وجود داشته باشد.

۱- بسته نرم‌افزاری NIH Image J. Image J را که به‌صورت رایگان برای انواع سیستم‌عامل‌های مختلف و از طریق مؤسسه ملی بهداشت (<https://imagej.nih.gov/i>) [/download.html](https://imagej.nih.gov/ij/download.html) ارائه شده است، دریافت و باز کنید.

۲- از منوی فایل، «Open» را انتخاب و تصویر ژل آگارز خود را انتخاب کنید.

۳- شما باید مطمئن شوید که ژل شما به‌طور کامل صاف است. در غیر این صورت، از منوی Image گزینه «Rotate, Open» و «Arbitrarily» را انتخاب کنید. یک پنجره چرخش جدید ظاهر می‌شود. کادر «Preview» را انتخاب کنید و زاویه تصویر ژل خود را تا زمانی که به‌صورت مستقیم قابل مشاهده باشد، تنظیم کنید. پس از اتمام «OK» را انتخاب کنید.

۴- از باند ابزار Image J در بالا، ابزار «Rectangle» را انتخاب کنید. با استفاده از این ابزار و ماوس، تصویر ژل خود را با دقت ترسیم کنید.

۵- هنگامی که محدوده ژل خود را مشخص کردید، در منوی «Image» گزینه «Crop» را انتخاب کنید تا منطقه مورد نظر را برش دهید.

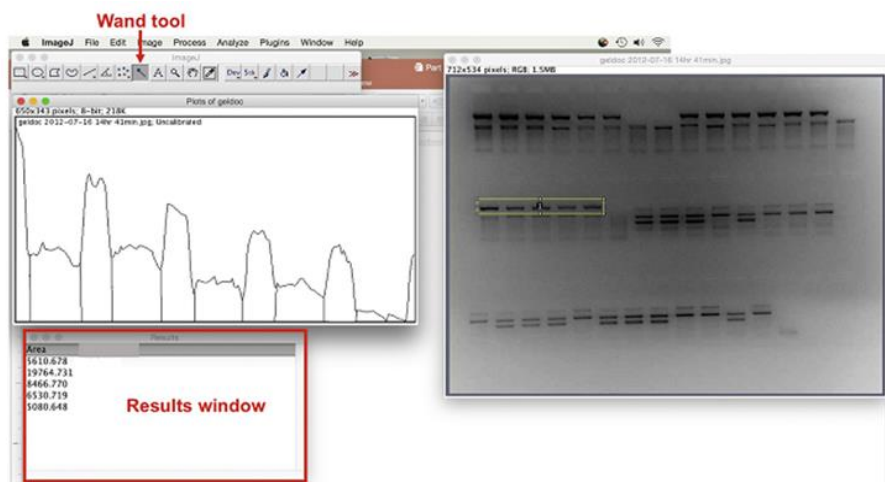
۶- سپس، در منوی Image، بخش‌های «Look up tables» و «Invert LUT» را انتخاب کنید. تغییر دادن رنگ پس‌زمینه به سفید و باندها به سیاه، مشاهده باندها را آسان‌تر می‌کند.

۷- با انتخاب مجدد ابزار «Rectangle»، یک کادر افقی در اطراف باندهای ژل و به‌منظور بررسی وزن‌های مولکولی مورد نظر در چاهک، بکشید. به‌عنوان مثال، یک کادر واحد در اطراف همه باندهای *egfp* بکشید. سپس «CTRL 1» را فشار دهید تا اولین چاهک‌ها مشخص شوند. کادر بعدی را به سری بعدی باندهای *23S* بکشید. «CTRL 2» را برای تعیین این باندها فشار دهید. اگر پنجره جدیدی ظاهر شد و از شما پرسید که آیا چاهک‌های شما افقی هستند، «Yes» را انتخاب کنید.

۸- سپس در زیر منوی Analyze گزینه «Gels» و «Gel Analyzer» را انتخاب کنید. یک پنجره جدید ظاهر خواهد شد. تمامی موارد دیگر می‌تواند به‌صورت پیش‌فرض باقی بماند؛ بنابراین، گزینه «OK» را انتخاب کنید.

۹- با بازگشت به منوی «Gels, Analyze» گزینه «Plot-lanes» را انتخاب کنید. پس‌ازاین عمل یک پنجره جدید که نشان‌دهنده حداکثر شدت باندهای انتخابی روی ژل شما است، ظاهر می‌شود. توجه داشته باشید که در پس‌زمینه، پیک‌های بلند نباید نشان داده شوند.

۱۰- با استفاده از «Straight line tool»، هر پیک را با کشیدن یک خط مستقیم، همان‌طور که در شکل ۱۷-۱ نشان داده شده است، از سایر پیک‌ها جدا کنید.



شکل ۱۷-۱: نمونه‌ای از ژل DNA آگارز که با استفاده از NIH Image J کمی‌سازی شده است. به نحوه قرار گرفتن straight line tool و پنجره نتایج که شدت پیک باند را نشان می‌دهد، توجه کنید. توجه داشته باشید که این تصویر با آزمایش واقعی شما مطابقت ندارد.

۱۱- برای اختصاص دادن یک مقدار عددی به هر پیک/باند، «ابزار Wand» را از منوی Image J انتخاب کنید. با استفاده از ابزار Wand، در مرکز هر پیک کلیک کنید تا یک مساحت را به آن اختصاص دهید. این کار را برای هر پیک/باند انجام دهید. مقادیر این مساحت در یک جدول نشان داده خواهد شد (شکل ۱۷-۲).

۱۲- می‌توانید داده‌های منطقه خود را در مایکروسافت اکسل، کپی و جایگذاری کنید. سپس، سطوح mRNA نسبی *gst::egfp* را در هر نمونه با استفاده از این دو فرمول محاسبه کنید:

$$\text{Normalized } gst::egfp \text{ level} = \frac{\text{Band area}_{egfp}}{\text{Band area}_{23S}}$$

9

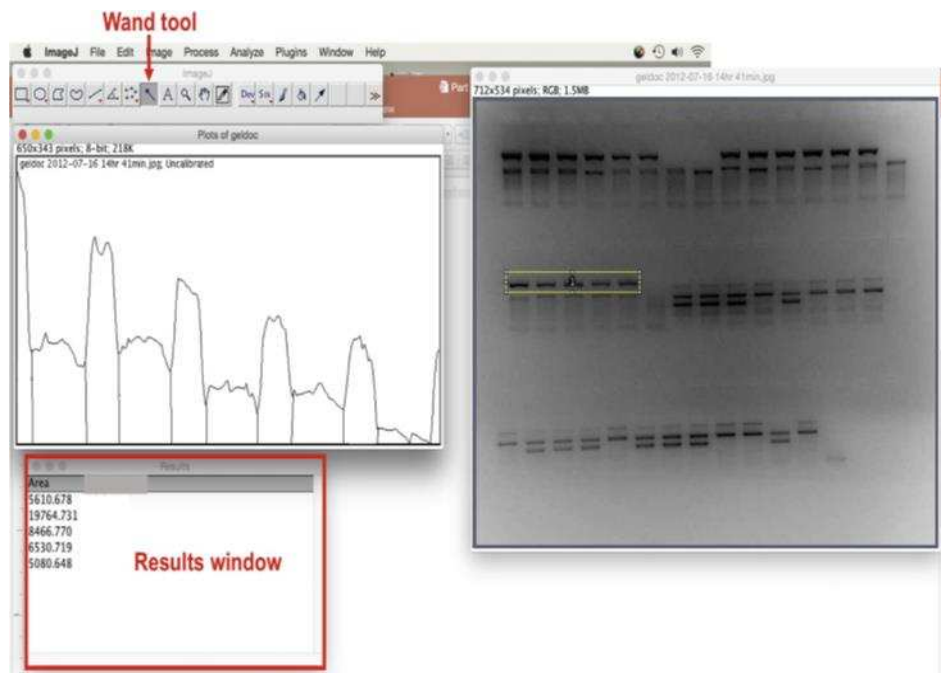
$$\text{Relative } gst::egfp \text{ level} = \frac{\text{Normalized } gst::egfp \text{ level}_{\text{with inducer}}}{\text{Normalized } gst::egfp \text{ level}_{\text{no inducer}}}$$

۱۲- تعیین کنید که آیا فرآورده‌ی در واکنش‌های RT- وجود دارد یا خیر. تکثیر با آغازگرهای ۲۳S نشان‌دهنده آلودگی با DNA ژنومی است، زیرا این ژنی است که توسط ژنوم *E. coli* کدگذاری شده است. تکثیر با آغازگرهای *egfp* نشان‌دهنده آلودگی با DNA پلازمید است، زیرا این یک ژن باکتریایی نیست، بلکه توسط پلازمیدی که توسط شما مهندسی شده است، کدگذاری می‌شود. با مشاهده هر واکنش RT-، سطح آلودگی DNA را (در صورت وجود) ارزیابی کنید. سطوح آلودگی برای هر نمونه را می‌توان با استفاده از فرمول‌های زیر تخمین زد:

$$\% \text{ Genomic DNA contamination} = \frac{\text{Band area}_{-RT \ 23S}}{\text{Band area}_{+RT \ 23S}} \times 100$$

9

$$\% \text{ Plasmid DNA contamination} = \frac{\text{Band area}_{-RT \ egfp}}{\text{Band area}_{+RT \ egfp}} \times 100$$



شکل ۱۷-۲: تصویر ژل با نرم‌افزار NIH Image J که مکان wand tool و band area را در پنجره نتایج نشان می‌دهد.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- شما ژل آگارز را اجرا کردید اما فراموش کردید که واکنش ۲۳S القاء شده با لاکتوز حاوی ترانس کریپتاز معکوس (ویال ۱۲ PCR) را اضافه کنید. بدون تکرار ژل، چه نتیجه‌ای می‌توان در مورد سطوح mRNA ژن *gst::egfp* پس از القاء با لاکتوز و IPTG گرفت؟ کدام مورد بی نتیجه باقی می‌ماند؟ اگر نمونه که فراموش شده، واکنش 23S القاء شده با لاکتوز و بدون ترانس کریپتاز معکوس (لوله ۱۱ PCR) باشد، چطور؟
- ۲- شما سطوح mRNA ژن *gst::egfp* در کشت‌های القا شده نسبت به کشت‌های غیر القاء شده را تعیین کردید. بدون وجود یک مولکول القاء کننده برای مهار اپراتور *lac* وکتور pET ۴۱a، آیا mRNA ژن *gst::egfp* رونویسی خواهد شد؟ چرا؟

بخش پنجم
اصلاح بیان زن

تبریک می‌گوییم! شما پیشرفت قابل‌توجهی را در فراگیری و دست‌کاری موفقیت‌آمیز DNA نوترکیب، کسب کرده‌اید. تاکنون، شما یک وکتور بیانی نوترکیب pET-41a حاوی ژن *egfp* را ایجاد کرده‌اید و این پلازمید را به‌منظور بیان و خالص‌سازی پروتئین GST::*EGFP*، به یک ارگانیسم مدل یعنی *E. coli* منتقل کردید. همچنین ممکن است بیان بیش‌ازحد^۱ پروتئین در *E. coli* را با استفاده از IPTG، القا کرده و پروتئین را خالص و همچنین با استفاده از RT-qPCR میزان بیان ژن را برای بررسی سطوح mRNA ژن *gst::egfp* تعیین کرده باشید. هدف از ارائه آزمایش‌های پیشرفته زیر، ارتقاء مهارت‌های علمی شما، به سطوح بالاتر است. شما ژن *egfp* را در یک سیستم مدل آزمایشگاهی متفاوت (*in vitro*)، در سلول‌های جنینی کلیه انسان HEK293 (یک مدل کشت سلولی در پستانداران)، منتقل^۲ (فرآیندی که نوکلئیک اسید خالص شده را به‌صورت عامدانه وارد سلول‌های یوکاریوتی خواهند کرد-م) خواهید کرد. پس از غربالگری فلورسانس و تأیید بیان پروتئین EGFP در سلول‌های HEK293، به جای بیان افزایشی^۳ (بیان بیش از حد) *egfp* همان‌طور که در *E. coli* انجام دادید، اکنون بیان ژن *egfp* را کاهش^۴ خواهید داد. برای انجام این عمل، از دو ترفند پیشرفته و موثر استفاده خواهید کرد: تداخل RNA^۵ (RNAi) و CRISPR-Cas9. هر روش مزایا و معایب منحصربه‌فرد خود را دارد که در مقدمه جلسات آزمایشگاهی مربوطه به آن‌ها توضیح داده شده است. در مراحل بعدی جلسات آزمایشگاهی، یک لاین سلولی HEK293 پایدار ایجاد می‌کنید که به‌طور دائمی پروتئین EGFP را با استفاده از وکتور بیانی پستانداران یعنی pEGFP-N1، بیان خواهد کرد. در مرحله بعد، سلول‌های HEK293 ترانسفکت شده با پلازمید pEGFP-N1 را برای تعیین انتقال موفقیت‌آمیز ژن *egfp*، با میکروسکوپ فلورسانس غربال می‌کنید. در نهایت، بیان پروتئین EGFP در سلول‌های HEK293 را با مولکول‌های siRNA که با هدف کاهش بیان^۶ (ناک دان- روشی که با استفاده از آن بیان یک یا تعدادی از ژن‌ها در یک موجود زنده کاهش پیدا می‌کند-م) mRNA ژن *egfp*، به‌صورت اختصاصی طراحی شده، کاهش خواهید داد؛ بنابراین میزان پروتئین EGFP را به میزان قابل توجهی کاهش پیدا می‌کند. در نهایت، با طراحی RNA های راهنما برای استفاده در سیستم CRISPR-Cas9، بیان *egfp* را کاهش می‌دهید و نتایج خود را با روش ناک دان، مقایسه خواهید کرد.

-
1. Overexpression
 2. Transfect
 3. Upregulating
 4. Downregulate
 5. RNA. interference. (RNAi)
 6. Knockdown

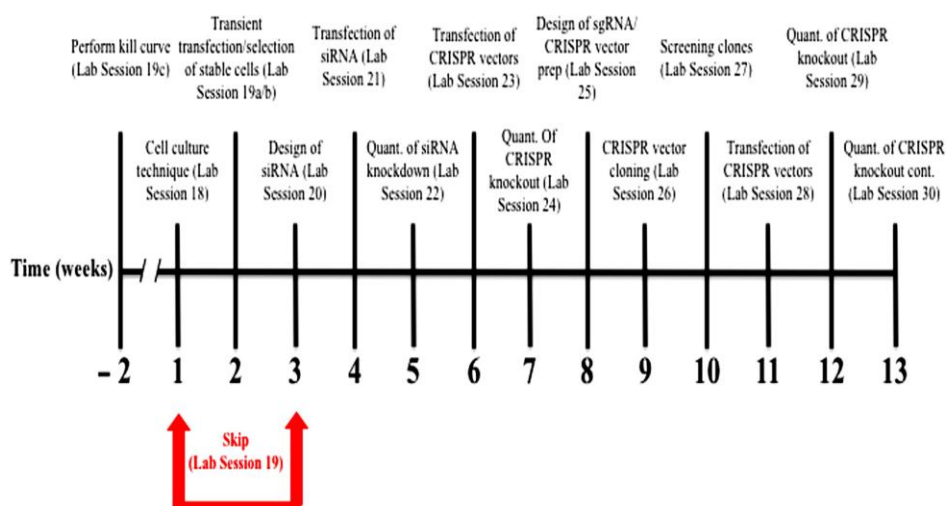
تمامی آزمایش‌ها از این نقطه به بعد مستلزم داشتن درک و دانش مناسب از نحوه کار با سلول‌های پستانداران در مرحله کشت است؛ بنابراین، تسلط بر ترفند ضدعفونی کردن^۱، اولین قدم بسیار مهم در این مراحل است.

برنامه زمانی

آزمایش‌های طراحی‌شده در این بخش، به‌عنوان مباحث تکمیلی بخش‌های اول تا چهارم ارائه شده است و در طول ۱۵ هفته در ترم بعدی برگزار خواهد شد؛ با این حال، به دلیل پیچیدگی آزمایش‌ها، ما به افرادی که محدودیت زمانی دارند پیشنهاد می‌کنیم سلول‌های HEK293 بیان‌کننده GFP (توجه: نه EGFP) را به‌جای تولید کردن در کلاس آزمایشگاه جلسه نوزدهم، انتقال کوتاه‌مدت^۲ در سلول‌های پستانداران، خریداری کنند (شکل ۱-بخش پنجم).

این سلول‌ها از شرکت Cell BioLabs (شماره کاتالوگ: AKR-200) در دسترس هستند. از سویی، این جلسه‌های آزمایشگاهی به‌صورت انعطاف‌پذیر و متناسب با نیازهای درسی طراحی شده‌اند؛ بنابراین، ممکن است برای دانشجویان تنها تولید سلول‌های بیانی EGFP (جلسات ۱۹-۱۸) مناسب باشد، درحالی‌که سایر دانشجویان نیاز به فراگیری روش‌های کاهش/ یا سرکوب بیان ژن با استفاده از RNAi (جلسات ۲۰-۲۲) و یا سیستم CRISPR-Cas9 را داشته باشند. برای انتخاب مسیر آزمایشی که برای دوره شما مناسب‌تر است، به شکل ۱-بخش پنجم مراجعه کنید.

1. Aseptic
2. Transient. Transfection

Option A: Creation of stable cells**Option B: Purchase of stable cells**

شکل ۱-بخش پنجم: برنامه زمانی پیشنهادی برای آزمایش‌های ارائه شده در بخش پنجم. اگر سلول‌های HEK293 پایدار بیان‌کننده GFP به صورت تجاری خریداری شوند، دانشجویان با جلسه هجدهم، کشت سلول‌های پستانداران را شروع می‌کنند و از جلسه نوزدهم آزمایشگاه، انتقال گذرای سلول‌های پستانداران، صرف‌نظر می‌کنند. توجه: تکمیل جلسه آزمایشگاه نوزدهم پ «ایجاد منحنی کشتار» نزدیک به دو هفته زمان نیاز دارد و باید تا آغاز دوره به پایان برسد.

کلاس آزمایشگاه: جلسه هجدهم

کشت سلول‌های پستانداران

هدف: یادگیری روش مناسب کشت سلولی استریل و اصول اولیه کشت سلول‌های پستانداران در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*)، هم‌زمان با آماده‌سازی سلول‌های HEK293 برای انتقال با پلازمید pEGFP-N1. شما یاد خواهید گرفت که لاین سلولی جنین انسان جاودانه HEK293 را کشت دهید. شما فرا خواهید گرفت که چگونه لاین سلولی جنینی نامیرای (این سلول‌ها به صورتی دست‌کاری شده‌اند که توانایی تکثیر شدن نامحدود را داشته باشند؛ بنابراین امکان کشت دادن آن‌ها برای مدت زمان طولانی وجود خواهد داشت. این سلول‌ها می‌توانند به‌صورت پیوسته تکثیر شوند-م) انسانی^۱ HEK293 را کشت دهید؛ اما توجه داشته باشید که شرایط کشت و محیط کشت از یک لاین سلولی به لاین دیگر متفاوت است.

۱- مقدمه‌ای بر روش استریل کردن

کشت سلولی (معروف به کشت بافت) ابزار مهمی است که برای مطالعه طیف وسیعی از فرآیندهای سلولی و بیوشیمیایی در هر دو حالت طبیعی و پاتوفیزیولوژیک^۲ استفاده می‌شود. به‌عنوان مثال، می‌توان از آن برای مطالعه سرطان‌زایی، جهش‌زایی^۳، غربالگری^۴ و توسعه داروها و همچنین برای ساخت ترکیبات بیولوژیکی استفاده کرد.

کشت سلولی به حذف سلول‌ها از حیوان یا گیاه و رشد دادن آن‌ها در یک محیط مصنوعی اشاره دارد. سلول‌ها ممکن است یکرست از بافت‌های مورد نظر برداشته شده باشند یا از لاین‌های سلولی یا سویه‌ای که پیشتر ایجاد شده است، مشتق شوند. سلول‌های اولیه طبیعی (آن‌هایی که یکرست از بافت گرفته می‌شوند) فقط برای مدت‌زمان محدودی و پیش از پیر شدن، تقسیم و تکثیر می‌شوند (از نظر متابولیک فعال هستند اما دیگر تقسیم نمی‌شوند) و برخی ممکن است در نهایت بمیرند. سلول‌های پیر، به‌طور برگشت‌ناپذیری تقسیم خود را متوقف می‌کنند و بدون مرگ وارد حالت توقف رشد دائمی^۵ می‌شوند. این مدت‌زمان در نتیجه اثر گذاری تعدادی از عوامل ژنتیکی، متفاوت است. از سوی دیگر، برخی از رده‌های سلولی، در نتیجه وجود فرآیندی به نام تراندیسی^۶

1. Immortalized. human. embryonic. cell. line

2. Pathophysiology

3. Carcinogenesis

4. Mutagenesis

5. Permanent. growth. arrest

6. Transformation

می‌توانند به‌طور نامحدود تقسیم و تکثیر شوند. ترادیدی می‌تواند به‌صورت خود به خودی، توسط مواد شیمیایی یا عفونت‌های ویروسی و به‌طور معمول از طریق غیرفعال کردن ژن‌های تراز کننده چرخه سلولی، ایجاد شود. سلول‌های ترادیدی شده به‌عنوان یک رده سلولی پیوسته شناخته می‌شوند. این سلول‌ها در نتیجه وجود شرایط رشدی مناسب، می‌توانند به‌طور نامحدود در محیط کشت سلولی مصنوعی رشد کنند. هر نوع سلول، به مجموعه شرایط کشت منحصر به فرد خود نیاز دارد، اما در یک محیط مصنوعی، سلول‌ها به مجموعه خاصی از عوامل نیاز دارند:

۱- ظرف کشت^۱ - به‌طور معمول یک پلاستیک مخصوص است که برای ترغیب چسبندگی سلولی، امکان ایجاد وصل شدن سلولی بین سلول‌های چسبنده و پلاستیک را فراهم می‌کند و همچنین استریل شده و با پلی دی هضمین^۲ پوشانده شده است. این سلول‌ها تحت عنوان وابسته به وصل شدن^۳ یا چسبنده^۴ شناخته می‌شوند و در یک کشت، یک لایه را تشکیل می‌دهند. در مقابل، سلول‌های معلق وابسته به وصل شدن نیستند ولی به یک ظرف مشابه نیاز دارند، اما با پلاستیک تماس سلولی ایجاد نمی‌کنند؛ آن‌ها در محلول شناور می‌مانند.

۲- محیط رشد^۵ - مایعی که مواد مغذی ضروری مانند اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی را تأمین می‌کند.

۳- فاکتورهای رشد - در صورت نیاز رده‌های سلولی خاص، این موارد در سرم جنین گاوی (FBS) یا سرم گوساله لحاظ خواهد شد. اعمال هر فاکتور رشد ویژه دیگری که توسط شرکت فروشنده رده سلولی اعلام شده است، باید به‌طور جداگانه به محیط رشد اضافه شود.

۴- هورمون‌ها.

۵- گازها - (O_2 , CO_2).

۶- محیط فیزیکی و شیمیایی تنظیم شده (pH، فشار اسمزی، دما). تنظیم گازها و محیط فیزیکی و شیمیایی همراه با رشد سلول‌ها در یک محفظه اختصاصی به نام انکوباتور کشت سلولی انجام می‌شود. این انکوباتور با انکوباتور باکتریایی تفاوت دارد؛ زیرا CO_2 (سایر گازها) را می‌توان برای ورود به داخل دستگاه تنظیم کرد و علاوه بر دما، غلظت ثابت و تعریف شده (برای نمونه ۵ یا ۱۰ درصد CO_2) را حفظ کرد. این امر بسیار مهم است که

2. Culture. vessel

3. Poly-D-lysine

4. Anchorage-dependent

5. Adherent

6. Growth. medium

به دلیل وجود مسائل آلودگی، هرگز کشت سلولی خود را در انکوباتور باکتری یا کشت باکتری را در انکوباتور کشت سلولی قرار ندهید.

هنگام کشت سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی، بسیار مهم است که ریخت‌شناسی^۱ (به‌عنوان مثال، ظاهر) و همچنین تلاقی^۲ آن‌ها (به‌عنوان مثال، درصد سلول‌های موجود در سطح در یک ظرف کشت) را زیر میکروسکوپ و در طی مراحل کنترلی، بررسی کنید. این امر برای حفظ سلامت سلول‌های شما همچنین برای تشخیص زودهنگام علائم آلودگی پیش از گسترش آن به سلول‌های دیگر در کشت و همچنین در میان تجهیزات مشترک، ضروری است. علائم سلول‌های آلوده یا چسبنده ناسالم می‌تواند به‌صورت کوچک شدن پیکره سلولی، جدا شدن از محیط، محیط کشت کدر، تغییر در pH محیط رشد (نشانهگر pH)، گرانوله شدن اطراف هسته و اجسام سلولی مرده یا آپوپتوز^۳ و/یا واکنشی شدن، ظاهر شود.

سلول‌های پستانداران موجود در محیط کشت را می‌توان بر اساس شکل و ظاهر آن‌ها به سه دسته اصلی ریخت‌شناسی تقسیم کرد (شکل ۱۸-۱):

۱- سلول‌های فیبروبلاستی (شبه فیبروبلاست) که دوقطبی یا چندقطبی است، کشیده شده بوده و به یک بستر متصل می‌شوند.

۲- سلول‌های اپیتلیالی (شبه اپیتلیال) که به شکل چندضلعی با ابعاد منظم‌تر است و به‌صورت تکه‌های مجزا به یک بستر متصل می‌شوند و رشد می‌کنند.

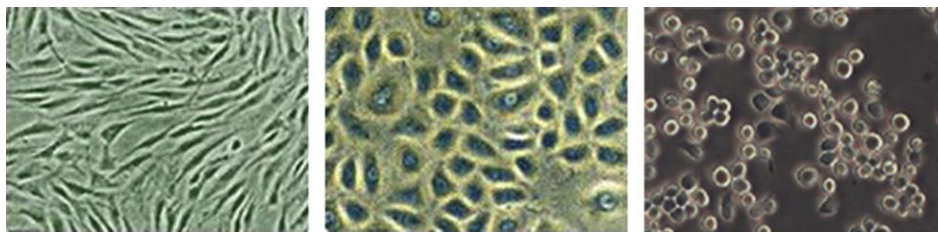
۳- سلول‌های لنفوبلاستی (شبه لنفوبلاست) که کروی شکل است و به‌طور معمول به‌صورت معلق و بدون وصل شدن به بستر، رشد می‌کنند.

تلاقی سلول‌ها در یک ظرف کشت به‌طور معمول به‌عنوان درصدی از سطح اشغال شده توسط سلول‌های چسبنده توصیف می‌شود. به‌عنوان مثال، اگر سلول‌ها یک حالت تک لایه‌ای را تشکیل دهند که در آن هیچ فضایی بین سلول‌ها وجود نداشته باشد، میزان تلاقی آن‌ها ۱۰۰ درصد است. اگر سلول‌ها فقط نیمی از فضای مشاهده شده را اشغال کنند، میزان تلاقی آن‌ها ۵۰ درصد خواهد بود (شکل ۱۸-۲). این مشاهدات تخمینی تقریبی از تعداد سلول‌های موجود در کشت را در اختیار ما قرار می‌دهد. هنگام انجام مشاهدات چشمی سلول‌های خود، مهم است که به بخش‌های مختلف موجود در زیر میکروسکوپ نگاه کنید تا تصویری کلی از میزان تلاقی و ریخت‌شناسی سلول‌های خود در کشت به دست آورید. یکی از مهم‌ترین چالش‌ها در حفظ رده‌های سلولی در شرایط آزمایشگاهی، جلوگیری از بروز آلودگی در آن‌ها است.

1. Morphology

2. Confluency

3. Apoptotic. bodies



شکل ۱۸-۱: ریخت‌شناسی (مورفولوژی) پایه سلول‌ها در کشت. (شکل سمت چپ) سلول‌های فیبروبلاست دوقطبی، چسبنده و دارای اشکال کشیده شده هستند. (شکل وسط) سلول‌های شبه اپیتلیال، چسبنده هستند و در کلتی‌هایی با اشکال چند ضلعی ظاهر می‌شوند و (شکل سمت راست) سلول‌های شبه لنفوبلاست، غیر چسبنده هستند، به‌صورت معلق رشد می‌کند و دایره‌ای شکل هستند. عکس و شرح عکس با مجوز Thermo Fisher Scientific گرفته شده است.

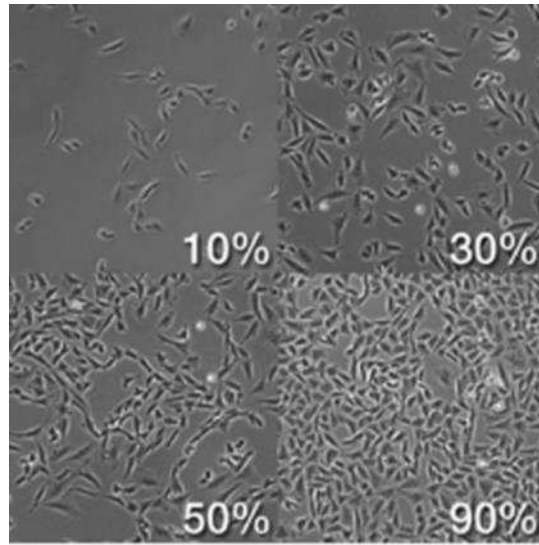
به منظور حفظ سلول‌های سالم در شرایط آزمایشگاهی، اعمال تکنیک آسپتیک (استریل) مناسب با کشت، امری مهم است. این روش با روش استریل کردن باکتری‌ها که در جلسه‌های آزمایشگاهی پیشین ذکر شد، متفاوت خواهد بود. این روش، سدی را در مقابل میکروارگانیسم‌هایی همانند باکتری‌ها، مخمرها، مایکوپلاسما، قارچ‌ها و ویروس‌ها ایجاد می‌کند که ممکن است کشت‌های سلولی شما را آلوده کنند. به‌علاوه، این روش به جلوگیری از انتقال آلودگی بین لاین‌های سلولی مختلف کمک می‌کند. استفاده از هرگونه مواد غیر استریل شامل محیط، معرف‌ها، سطوح کار، تجهیزات، پلاستیک و شیشه که احتمال تماس آن‌ها با کشت‌های سلولی شما وجود داشته باشد، خطر انتقال آلودگی را به همراه دارد. روش استریل یا ضدعفونی کردن، شامل مجموعه‌ای از روش‌های روندی استاندارد و به‌منظور کاهش شدید آلودگی ناشی از این منابع، همچنین ایمن نگه‌داشتن شما است. هنگام انجام این روش، توجه به سه نکته قابل‌توجه ضروری است:

۱- بهداشت فردی: همیشه پیش و پس از کار با کشت سلولی دست‌های خود را بشویید. از تجهیزات محافظت شخصی^۱ (PPE) مانند عینک آزمایشگاهی، دستکش و روپوش آزمایشگاهی استفاده کنید تا خطر انتقال چرک، سلول‌های مرده پوست و سایر آلاینده‌ها را به کشت سلولی خود کاهش دهید. مهم است که یک مجموعه اختصاصی از PPE را در اتاق کشت سلولی نگه دارید و برای هیچ هدف دیگری از آن استفاده نکنید.

۲- استفاده از معرف‌ها، محیط‌ها، شیشه و ظروف پلاستیکی استریل: پلاستیک‌های کشت بافت، معرف‌ها و محیط‌هایی که یک‌راست از سازنده تهیه می‌شوند، از قبل استریل می‌شوند، اما ممکن است در نتیجه استفاده از روش استریل کردن نامناسب، آلوده شوند. همیشه هر

1. Personal. protective. equipment. (PPE)

محلول، محیط، معرف یا ظروف شیشه‌ای موجود در آزمایشگاه را با استفاده از روش‌های استریلیزاسیون مناسب (مانند اتوکلاو، فیلتر استریل با الک $0.2\mu\text{m}$) استریل کنید.



تلاقی‌های مختلف

شکل ۱۸-۲: تصویر

سلولی. تصویر با کسب اجازه از Mirus Bio LLC گرفته شده است.

۳- دست‌کاری استریل

الف. دستکش و محل کار خود را به‌طور مکرر با اتانول ۷۰ درصد پاک کنید.

ب. هر جسمی را که وارد هود لامینار می‌شود، با اتانول ۷۰ درصد پاک کنید.

پ. مایعات را از ظرفی به ظرف دیگر نریزید. برای انتقال مایعات فقط از سمپلر استفاده کنید.

ت. تنها یک بار از سر سمپلرهای پلاستیکی استریل و پاییت پاستور شیشه‌ای استریل استفاده کنید و تمامی مواردی را که با آن‌ها کار می‌کنید را در نزدیکی محل کار خود قرار دهید.

ج. هرگز یک گزینه استریل را خارج از هود لامینار آرام باز نکنید.

چ. هنگام باز کردن محفظه استریل در هود لامینار، فقط هنگام وارد یا خارج کردن مایع از دورن آن، ظرف در حالت بدون درپوش قرار داشته باشد. برای جلوگیری از ورود

میکروارگانیسیم‌ها و ذرات معلق در هوا، به محض اتمام کار، بی درنگ درب محفظه را بگذارید.

ح. آزمایش‌های خود را تا حد امکان سریع و با دقت انجام دهید.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

توجه: شیوه‌نامه‌های شرکت‌های مختلف برای استفاده از هودهای لامینار، ممکن است متفاوت باشد؛ بنابراین، بررسی آن‌های امری مهم است. هودهای لامینار مورد استفاده در این آزمایش دارای یک محفظه خلاء برای حذف زباله‌های بیولوژیکی مایع خطرناک هستند. مهم است که پیش از اجرای این آزمایش، تأیید ایمنی زیستی را از دفتر ایمنی زیستی سازمانی خود دریافت کنید و همچنین دانشجویان خود را در زمینه رعایت ایمنی مناسب برای کار با ارگانیسیم‌های ایمنی زیستی سطح ۲^۱ (BSL-2) آموزش دهید. بزرگ‌ترین دشمن ما برای سلول‌ها در کشت، وجود آلودگی است! این مراحل به کاهش خطر آلودگی و همچنین انتشار آلاینده‌ها بین کشت‌ها و به‌ویژه در فضاهای تحقیقاتی مشترک کمک می‌کند.

الف. استفاده از هود لامینار

۱- محفظه ورودی هود را تا مکان نشان داده شده، بالا بکشید. دمنده و نور میکروبوکس (UV) را دست‌کم ۱۵ دقیقه پیش از هود لامینار روشن کنید. این امر اجازه می‌دهد تا زمان کافی برای فیلتر شدن هوای داخل هود وجود داشته باشد. پیش از کار با هود لامینار، مطمئن شوید که نور میکروبوکس را به نور معمولی تغییر داده‌اید.

۲- خلأ را روشن و بخش‌های داخلی آسپراتور را با اتانول ۷۰ درصد اسپری کنید.

۳- داخل هود و اشیایی که در هود قرار می‌گیرند (از جمله دستان خود!) را با اتانول ۷۰ درصد و یک دستمال مرطوب بدون پرز (مانند کیم‌ویپ یا دستمال کاغذی) پاک کنید.

۴- هنگام قرار دادن اشیاء در هود، از قرار دادن آن‌ها در مناطقی که جریان هوا را مسدود می‌کند، خودداری کنید.

۵- به‌طور دوره‌ای دستکش‌های خود را با الکل ۷۰ درصد اسپری کنید تا آلودگی به کمترین میزان ممکن برسد. این عمل را همیشه هنگام بیرون آوردن دست‌ها از هود و بازگرداندن آن‌ها به دستگاه انجام دهید.

1. Biosafety. Level. 2. (BSL-2)

- ۶- در صورت ریزش محلول‌ها، محل را با الکل ۷۰ درصد اسپری کنید و از کیم‌وایپ یا حوله کاغذی برای تمیز کردن آن استفاده کنید. توجه کنید که نمک‌های موجود در محلول‌ها و محیط‌ها می‌توانند به بخش‌های فلزی هود آسیب وارد کنند.
- ۷- هر جسمی که احتمال برخورد با سلول‌های شما را داشته باشد، باید استریل باشد: فلاسک‌های استریل، سر سمپلرهای بسته بندی شده استریل، بطری شیشه‌ای اتوکلاو شده، پایپت پاستور و غیره. اگر هر یک از این موارد از حالت استریل خارج شده بودند (مانند فلاسک‌های شکسته/ ترک‌خورده، بطری اتوکلاو شده و خارج از هود باز شده) از آن‌ها استفاده نکنید.
- ۸- تنها یک‌بار از پایپت‌های پاستور شیشه‌ای و پایپت‌های پلاستیکی استریل استفاده کنید و سپس آن‌ها را دور بیندازید.
- ۹- هنگام استفاده از محفظه‌های درب‌دار، درب آن را پس از برداشتن به پشت، روی محیط کار قرار دهید. درب محفظه را در زودترین زمان ممکن در جای خود قرار دهید.
- ۱۰- مطمئن شوید که سرسمپلر به بدنه و دیواره ظرف استریل برخورد نکند. در صورت انجام این عمل، از یک سرسمپلر جدید استفاده کنید.
- ۱۱- سعی کنید از ظروف بدون درپوش در هود استفاده نکنید.
- ۱۲- پس از استفاده، دستکش را دور بیندازید و هنگام ورود به هر منطقه آزمایشگاهی دیگر از آن استفاده نکنید.
- ۱۳- از نزدیکی بیش از حد به قسمت قدامی (نزدیک به ورودی) هود یا قسمت غیر استریل هود خودداری کنید. محل کار را در مرکز یا قسمت‌های پشتی قرار دهید. اشیاء مورد نیاز برای آزمایش خود را در دسترس نگه دارید.
- ۱۴- اگر جسمی به درستی اتوکلاو شده باشد، باندهای نشانگر روی باند اتوکلاو باید سیاه شوند.
- ۱۵- هرگز مواد موجود در یک ظرف استریل را به ظرف دیگر نریزید. این عمل، یک مسیر مایع را برای ایجاد آلودگی از بیرون به داخل ایجاد می‌کند. هنگام انتقال از یک ظرف به ظرف دیگر، همیشه از پایپت یا از فیلترها استفاده کنید.
- ۱۶- پایپت‌ها را در زیر هود و به کمک جلد آن‌ها، از بسته خارج کنید.
- ۱۷- هنگام کار با پایپت‌های پاستور شیشه‌ای، پایپت‌ها را یک‌راست با انگشتان خود از جعبه خارج نکنید. در صورت امکان از انتهای لوله آسپیراتور برای برداشتن آن‌ها استفاده کنید.
- ۱۸- از ایجاد به‌هم‌ریختگی در هود لامینار خودداری کنید. در صورت عدم استفاده از ابزار و تجهیزات معین، آن‌ها را از هود خارج کنید. اطمینان حاصل کنید که هنگام برداشتن این موارد، درب آن‌ها به‌طور کامل بسته شده باشد تا محتویات داخل آن‌ها استریل باقی بماند.

- ۱۹- پس از پایان کار، محل کار را با الکل ۷۰ درصد پاک کنید، شیشه هود را پایین بیاورید، دمنده و چراغ را خاموش کنید.
- ۲۰- الکل ۷۰ را در لوله آسپیراتور اسپری و سپس سیستم خلأ را خاموش کنید.

ب. سایر ملاحظات: استفاده از انکوباتورها و میکروسکوپ‌ها در یک مرکز کشت سلولی به‌طور معمول اتاق‌هایی که برای کشت سلول‌ها مورد استفاده قرار خواهند گرفت، علاوه بر هودهای لامینار، شامل تجهیزات دیگری نیز هستند. این تجهیزات اضافی برای حفظ کشت‌های سلولی ضروری است. در بسیاری از مواقع، این تجهیزات با کلاس‌ها و آزمایشگاه‌های تحقیقاتی دیگر به‌صورت اشتراکی استفاده می‌شود؛ بنابراین در صورت استفاده از روش‌های ضعیف ضد عفونی کردن، آن‌ها یک وسیله بسیار عالی به‌منظور انتقال آلودگی عمل خواهند کرد.

فهرستی از روش‌هایی ارائه شده در زیر می‌تواند به‌منظور به حداقل رساندن آلودگی هنگام استفاده از این قطعات کمک کند:

- ۱- پیش از استفاده از میکروسکوپ، کیم‌وایپ (حوله کاغذی) را به اتانول ۷۰ درصد اسپری آغشته و قسمت پایینی صفحه را پاک کنید. مطمئن شوید که اتانول به عدسی شیئی برخورد نکند.
- ۲- اگر برای قرار دادن صفحات توسط میکروسکوپ به فضا نیاز دارید، ابتدا محل را با الکل ۷۰ درصد تمیز کنید.
- ۳- انکوباتورها از نظر فنی استریل نیستند؛ با این حال، باید تمام تلاش خود را برای حفظ پاکیزگی آن‌ها و جلوگیری از گسترش آلودگی انجام داد. اگر محیط کشت در انکوباتور دچار نشد، نشد را با الکل ۷۰ درصد تمیز کنید. ریختن نشی محیط در حوضچه آب موجود در پایین دستگاه انکوباتور که برای حفظ رطوبت استفاده می‌شود، باید بی‌درنگ رفع شود - به مربی خود اطلاع دهید.
- ۴- فلاسک‌ها و/یا پلیت‌های کشت بافت را با دقت در انکوباتور قرار دهید. مطمئن شوید که با پلیت‌های دیگران برخورد نکند و تا آنجا که ممکن است روی هم چیده شدن را به حداقل برسانید. همیشه ظرف کشت سلولی خود را با حروف اول، تاریخ و شماره پاساژ^۱ (به حالتی که سلول‌ها بعد از هر بار تقسیم به ظرف جدیدی منتقل شوند تا فرآیند تقسیم را ادامه دهند، پاساژ می‌گویند-م) و رده سلولی، به وضوح علامت بزنید. پلیت‌های خود را به‌گونه‌ای تنظیم کنید که امکان دسترسی راحت به آن‌ها فراهم شود.

۵- اگر متوجه شدید که محیط کشت سلولی شما بسیار بنفش شده است، این نشان دهنده افزایش pH بوده و باید به مربی خود اطلاع دهید. ممکن است CO₂ تمام شده باشد. اگر متوجه شدید که محیط کشت سلولی شما بسیار زرد شده، محیط اسیدی شده است و سلول‌ها باید پاساژ یا تغذیه شوند.

برای دسترسی به ویدیوهای مفید و کسب اطلاعات بیشتر در مورد روش استریل کشت سلولی، به پایگاه اینترنتی Thermo Fisher Scientific مراجعه کنید^۱.

پ: شمارش و پلیت کردن سلول‌هایی پستانداران

در این تمرین، شما سلول‌های HEK293 خود را برای انتقال با پلازمید pEGFP-N1 ترپسینه^۲ (فرآیند تجزیه سلولی با استفاده از ترپسین؛ یک آنزیم پروتئولیتیک که پروتئین‌ها را تجزیه می‌کند تا سلول‌های چسبنده را از ظرفی که در آن کشت می‌شوند، جدا کند-م) و شمارش می‌کنید. سلول‌های HEK293، سلول‌های کلیه جنینی مشتق شده از انسان هستند که دارای ریخت‌شناسی اپیتلیال و به‌صورت معمول چسبنده هستند. این فرآیند باید ۱-۲ روز پیش از انتقال انجام شود تا زمان کافی برای چسبیدن مجدد سلول‌ها به ظرف کشت، داده شود. همیشه هنگام کار با سلول‌های کشت، ترفند ضدعفونی کردن را تمرین کنید.

۱- یک پتری‌دیش یا فلاسک ۱۰ سانتی‌متر مربعی از سلول‌های HEK293 که توسط مربی شما فراهم شده است، تهیه کنید. تلاقی و ریخت‌شناسی آن‌ها را مشاهده کنید و جزئیات را در دفترچه آزمایشگاه خود بنویسید. در صورت مشاهده هرگونه علائم آلودگی، بلافاصله به مربی خود اطلاع دهید. همچنین به رنگ محیط رشد کشت سلولی (حاوی محیط رشد کامل) خود توجه کنید. محیط رشد کامل برای سلول‌های HEK293 محیط Dulbecco's Modified Eagle's Medium با گلوکز فراوان (۴۵۰۰ mg/L) است که حاوی ۱۰ درصد FBS، ۱ mM، ۰.۱ آمینواسیدهای غیر ضروری، ۲ mM ال-گلوتامین، ۱ mM سدیم پیرووات، ۱۵۰۰ mg/L سدیم بی‌کربنات و ۱ درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین است. این محیط همچنین حاوی فنول قرمز است که نشانگر pH است. اگر رنگ محیط به شدت به زرد (اسیدی) یا بنفش (بازی) تغییر کرد، به مربی خود اطلاع دهید.

۲- با استفاده از پایپت پاستور استریل، محیط را از پتری‌دیش خارج کنید. این کار باید به آرامی انجام شود. ظرف را به سمت خود بچرخانید و نوک پایپت پاستور را در ته ظرف قرار دهید

1. <https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/gibco-cell-culture-basics.html>

2. Trypsinize

- و تا زمانی که تمام محیط به داخل پایپت کشیده شود، آن را ظرف نگه دارید. نقطه‌ای را که در آن نوک پایپت قرار گرفت را به خاطر بسپارید. شما همیشه از این نقطه آسپیراسیون کنید تا از آسپیراسیون سلول‌ها از ظرف خود جلوگیری کنید.
- ۳- به آرامی در حدود ۱۳ mL از PBS استریل را به ظرف اضافه کنید و با دقت بچرخانید. هر زمان که سلول‌های خود را خارج یا به آن مایع اضافه می‌کنید، به حتم این کار را از همان مکان انجام دهید تا از جابجایی سلول‌ها جلوگیری کنید.
- ۴- PBS را از ظرف خارج کنید.
- ۵- مقدار ۲/۵ mL از محلول ۰/۲۵ درصد تریپسین-EDTA از قبل گرم شده را به ظرف اضافه کنید و برای اطمینان از پوشش کافی در کف، روی ظرف بچرخانید. ظرف را دوباره در انکوباتور قرار دهید و تایمر خود را برای ۲ تا ۳ دقیقه تنظیم کنید. تریپسین یک پروتئاز حاوی سرین است که وصل شدن سلولی و همچنین تماس‌های ایجاد شده بین سلول‌ها و ظرف پلاستیکی را با بریدن قسمت C ترمینال لیزین یا آرژنین از بین می‌برد. تریپسین به شدن بیش از حد می‌تواند به سلول‌های شما آسیب وارد کند؛ بنابراین اطمینان حاصل کنید که آن را بیش از زمان مشخص شده تیمار نکنید. EDTA یک شلاته‌ساز^۱ فلزی دو ظرفیتی است. مولکول‌های چسبیده که متشکل از برهمکنش‌های سلول-سلول و ماتریکس-سلول هستند، به Ca^{2+} و Mg^{2+} نیاز دارند؛ بنابراین، EDTA می‌تواند این فعل و انفعالات را تضعیف و به ساده کردن جدا شدن توسط تریپسین کمک کند.
- ۶- سلول‌های خود را زیر میکروسکوپ مشاهده کنید. سلول‌های جدا شده در محیط شناور می‌شود و گرد به نظر می‌رسند. ممکن است بخواهید به آرامی اما محکم روی یک سطح استریل ضربه بزنید تا به جدا شدن بیشتر سلول‌های خود کمک کنید. اگر هنوز ۵۰ درصد (بیشتر) از سلول‌های شما به ظرف چسبیده‌اند، آن را به مدت ۲ دقیقه دیگر در انکوباتور $37^{\circ}C$ قرار دهید.
- ۷- پس از جدا شدن سلول‌ها، ۵ mL از محیط رشد کامل از قبل گرم شده را اضافه کنید تا تریپسین غیرفعال شود. محیط را چندین بار به آرامی روی سطح لایه سلولی پایپت کنید تا از جدا شدن آن اطمینان حاصل کنید. پایپت کردن شدید می‌تواند باعث ایجاد آسیب سلولی شود، بنابراین مراقب باشید.
- ۸- به آرامی ظرف را بچرخانید تا مطمئن شوید که سلول‌ها به‌طور یکنواخت توزیع شده‌اند. اکنون آماده شمارش سلول‌های خود با استفاده از هماسیتومتر هستید.

1. Chelator

نکته برای صرفه‌جویی در زمان: می‌توان از یک شمارشگر سلولی خودکار مانند Cellometer از شرکت Nexcelom استفاده کرد.

هماسیتومترها دستگاه‌هایی هستند که برای شمارش سلول‌ها استفاده می‌شوند. روش ارائه شده در زیر برای هماسیتومترهای شیشه‌ای مناسب است، اگرچه می‌توان از نمونه‌های پلاستیکی یک‌بار مصرف نیز استفاده کرد.

۹- محفظه و لامل را با الکل ۷۰ درصد تمیز کنید. روکش را خشک کنید و در جای خود قرار دهید.

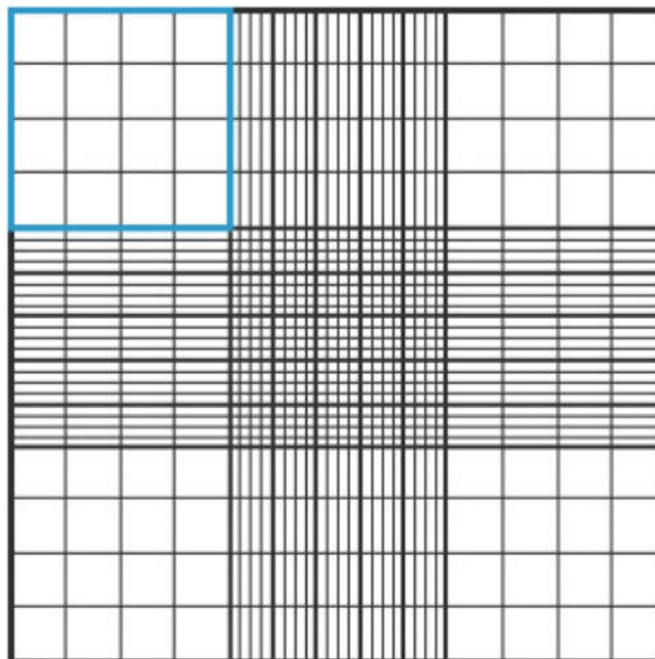
۱۰- سلول‌ها را به بالا و پایین پایت کرده تا مخلوط شوند. با استفاده از سرسمپلر استریل، ۲۰ μL از سوسپانسیون سلولی را با دقت خارج کنید. این ۲۰ μL را به هر محفظه هماسیتومتر اضافه کنید. این عمل را با آهسته پایت کردن سوسپانسیون سلولی بین لامل و هماسیتومتر انجام دهید. عمل موینگی، محلول را در یک لایه یکنواخت بین دو سطح پخش می‌کند. محفظه را بیش از حد پر نکنید.

۱۱- محفظه را در میکروسکوپ زیر یک شیئی ۱۰ $\times$ و با استفاده از کنتراست فاز و فوکوس مسیر/ریز قرار دهید تا سلول‌ها و خطوط شبکه هماسیتومتر را تشخیص دهید.

۱۲- با استفاده از شمارنده دستی، سلول‌های موجود در یک مجموعه ۱۶ مربعی را بشمارید (شکل ۱۸-۳). هنگام شمارش، سلول‌هایی را که در مرزهای وسط، بالا و سمت راست قرار می‌گیرند، بگنجانید.

۱۳- هماسیتومتر را به مجموعه بعدی ۱۶ مربعی منتقل کنید و تا برآورد تعداد سلول‌های هر چهار مجموعه ۱۶ مربعی، شمارش را ادامه دهید. به حتم تعداد سلول‌های ثبت شده از هر مربع را در دفترچه آزمایشگاه خود ثبت کنید.

۱۴- میانگین تعداد سلول‌ها را از هر یک از مجموعه‌های ۱۶ مربعی برآورد و در ۱۰۰۰۰ ضرب کنید (۱۰^۴). عدد نهایی کل مقدار سلول به ازای هر میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی شما است.



تصویر ۱۸-۳: طرح شماتیک یک هماسیتومتر که نشان‌دهنده مجموعه مربع‌های ۱۶ عددی است که باید سلول‌ها را در آن قرار داد.

- ۱۵- حجم سلول‌های مورد نیاز برای کاشت تراکم 5×10^5 سلول در یک چاهک از یک پلیت ۶ چاهکی را با استفاده از فرمول $C_1 V_1 = C_2 V_2$ محاسبه کنید:
- C_1 : غلظت سلول‌های شمارش‌شده (cells/mL):
- V_1 : حجم سوسپانسیون سلولی (mL) مورد نیاز (مجهول):
- C_2 : غلظت مطلوب سلول‌ها: 2.5×10^5 cells/mL
- V_2 : حجم کل مورد نظر: ۱۴ mL

حجم مناسبی از سوسپانسیون سلولی را به یک ویال مخروطی استریل ۵۰ mL اضافه کنید. حجم کل را با محیط کامل به ۱۴ mL برسانید. خوب مخلوط کنید. با دقت پایپت کنید (از تشکیل حباب جلوگیری کنید) و بلافاصله ۲ mL سوسپانسیون سلولی را به هر چاهک از پلیت ۶ چاهکی خود اضافه کنید.

۱۶- پلیت را به آرامی به جلو و عقب تکان دهید تا محیط به طور مساوی در قسمت پایین پخش شود. درب را دوباره روی آن قرار دهید و دست کم ۲۴ ساعت در انکوباتور 37°C قرار دهید تا سلول‌ها دوباره به پایین صفحه بچسبند.

منبع

1. Thermo Fisher. Cell culture basics handbook. ,thermofisher.com/gibcoeducation.; 2016.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- برخی از بزرگ‌ترین چالش‌ها هنگام کشت رده‌های سلولی در شرایط آزمایشگاهی چیست؟ سه مرحله برای جلوگیری از این مسائل را ارائه دهید.
- ۲- تریپسین-EDTA با چه مکانیسم‌هایی برای جدا کردن سلول‌های چسبیده از ظرف کشت بافت و همچنین از سایر سلول‌ها عمل می‌کند؟
- ۳- اگر در مجموع تعداد $10^4 \times 1/5$ cells/mL سلول را بشمارید، چه حجمی از سوسپانسیون سلولی برای ساخت یک محلول با $10^3 \times 3$ سلول در ۱۰۰mL از محیط لازم است؟

کلاس آزمایشگاه: جلسه نوزدهم

انتقال گذرای سلول‌های پستانداران

این هفته، پلازمید pEGFP-N1 را به‌طور موقت به سلول‌های HEK293 منتقل خواهید کرد. در مرحله بعد، با ارزیابی کیفی میزان پروتئین EGFP و با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس، موفقیت فرآیند انتقال خود را تعیین خواهید کرد. در نهایت، شما می‌توانید سلول‌های HEK293 را ایجاد کنید که با استفاده از انتخاب آنتی‌بیوتیک، EGFP را به‌طور پایدار بیان می‌کنند.

کلاس آزمایشگاه: جلسه نوزدهم-الف

جلسه موقت آزمایشگاه

انتقال موقت pEGFP-N1 در سلول‌های HEK293 با استفاده از FUGENE HD

هدف: انجام انتقال موقت پلازمید pEGFP-N1 در رده سلولی HEK293 پستانداران. این امر امکان بیان پروتئین EGFP در سلول‌های شما را فراهم می‌آورد که به نوبه خود امکان دست‌کاری ژنتیکی آن را در جلسات بعدی آزمایشگاهی ممکن می‌کند.

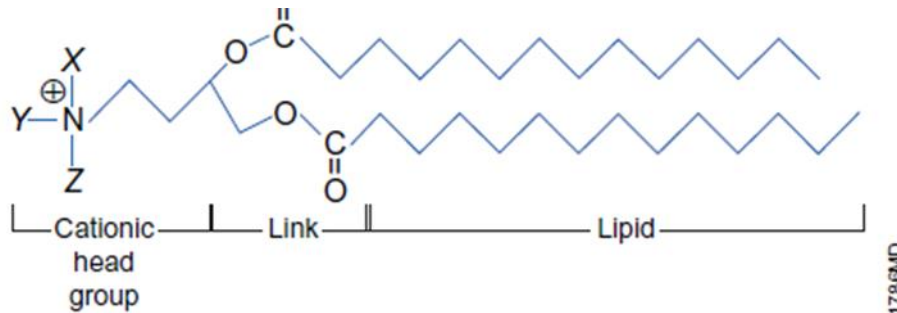
مقدمه

همانند باکتری‌ها، پلازمیدها به‌طور طبیعی در پستانداران وجود ندارند؛ با این حال، دانشمندان با استفاده از فرآیندهای مهندسی، پلازمیدهایی را برای استفاده در سلول‌های پستانداران کشت‌شده قرار می‌دهند که این امر مطالعه عملکرد ژن یا بیان پروتئین در انواع مختلفی از سلول‌های پستانداران را ممکن ساخته است. انتقال^۱ فرآیند وارد کردن اسیدهای نوکلئیک به سلول‌های یوکاریوتی با روش‌های مختلف شیمیایی، لیپید-کاتیونی^۲ یا فیزیکی است. انتقال پستانداران شبیه ترادیزی در باکتری‌ها (انتقال DNA خارجی به باکتری) است؛ با این حال، روش‌ها و واکنشگرهای مورد استفاده متفاوت است. لازم به یادآوری است که اسیدهای نوکلئیک به دلیل داشتن ستون‌های فسفودی‌استری، مولکول‌هایی با بار منفی هستند و به‌طور مشابه، غشاء لیپیدی دو لایه‌ای نیز به دلیل ساختار بیوشیمیایی خود دارای بار منفی هستند. از آنجایی که بارهای منفی یکدیگر را دفع می‌کنند، خنثی کردن ستون فسفاتی اسیدهای نوکلئیک گامی مهم در ساده کردن ورود آن‌ها از طریق غشاء سلولی پستانداران با دو لایه لیپیدی است.

روش‌های مختلفی برای پوشاندن اسیدهای نوکلئیک وجود دارد تا امکان عبور آن‌ها از غشاء فراهم شود. در این بخش از کلاس آزمایشگاه، ما روی روش انتقال مبتنی بر لیپید که سبب ایجاد یک پوشش روی مولکول‌های اسید نوکلئیک با بار منفی (مانند RNA، DNA) و انتقال احتمالی آن‌ها به سلول‌هایی با غشاء حاوی بار منفی خواهد شد، تمرکز خواهیم کرد. فرآیند انتقال با واسطه لیپید، می‌تواند بسته به عامل مورد استفاده متفاوت باشد. این عمل در بسیاری از روش‌ها، بر اساس ایجاد یک لیپوزوم مصنوعی (لیپیدهای دو لایه‌ای که یک وزیکول کروی در محیط آبی تشکیل می‌دهند) متشکل از لیپیدهای کاتیونی سنتزی است. لیپیدهای کاتیونی، مولکول‌های آمفی‌فیلیک^۳

-
1. Transfection
 2. Cationic. lipid
 3. Amphiphilic

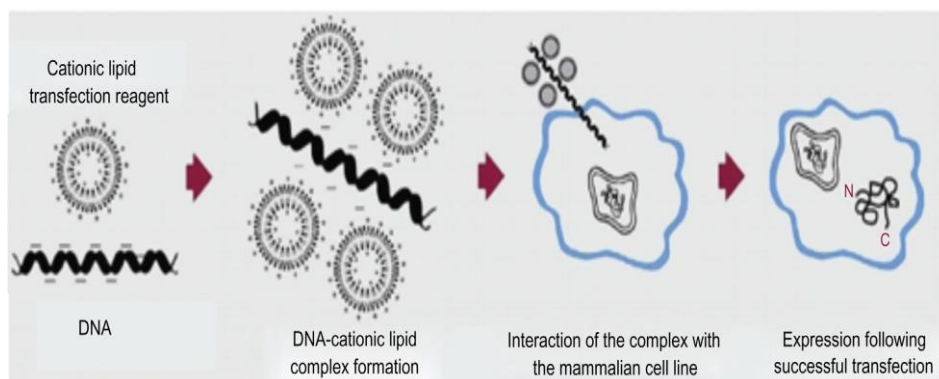
(یک ترکیب شیمیایی که آب دوست و چربی دوست است) هستند که یک سر آن‌ها دارای یک گروه با بار مثبت است که به بخش آب‌گریز غیر قطبی که به‌طور معمول از دو زنجیره آلکیلی تشکیل شده‌اند، متصل می‌شود (شکل ۱۹-۱).



شکل ۱۹-۱: ساختار کلی یک لیپید کاتیونی مصنوعی. X، Y و Z تعدادی از قسمت‌های شیمیایی ممکن را نشان می‌دهند که بسته به لیپید خاص می‌توانند متفاوت باشند. با کسب اجازه از Promega Corporation، ۲۰۱۸.

لیپیدهای کاتیونی با توجه به ویژگی‌های بخش آب‌گریز خود (طول و درجه اشباع شدگی)، می‌توانند از نظر ساختاری متفاوت باشند. بخش حاوی بار مثبت، میل ترکیبی بالایی به فسفات‌های (با بار منفی) موجود در ستون اسید نوکلئیک دارد، آن را متراکم می‌کند و مجموعه‌ای را تشکیل می‌دهد که در آن اسید نوکلئیک درون لیپوزوم محصور می‌شود؛ بنابراین، بار منفی اسید نوکلئیک در پوشش قرار می‌گیرد و بار خالص کلی لیپوزوم در pH فیزیولوژیکی، مثبت خواهد بود. این امر امکان انتقال سریع مولکول‌ها از لایه‌های لیپیدی (از طریق اندوسیتوز یا الحاق دو غشا) را ساده کردن می‌کند؛ بنابراین، کمپلکس انتقال، باید از تخریب درون سلولی در امان بماند و اسید نوکلئیک را به سیتوپلاسم (برای mRNA، siRNA، miRNA) یا هسته (برای DNA پلازمید یا وکتورهای کد کننده shRNA) برساند. در سیتوپلاسم، mRNA در مجاورت ریبوزوم‌ها (بخشی که می‌توان mRNA را ترجمه کرد) قرار خواهد گرفت و siRNA یا miRNA می‌تواند با کمپلکس القاء کننده خاموشی RNA مرتبط باشد که در فصل‌های بعدی به آن خواهیم پرداخت. از طرف دیگر، DNA برای ساده کردن رونویسی باید وارد هسته شود تا دستگاه درون سلولی را فعال کند؛ با این حال، مکانیسم دقیق این عمل ناشناخته باقی مانده است (شکل ۱۹-۲).

از جمله مزایای روش‌های انتقال توسط لیپیدها در این است که اسیدهای نوکلئیک را می‌توان در آزمایش‌های موقت و/ یا پایدار و طولانی‌مدت، به مولکول‌های mRNA رونویسی کرد. برای انتقال‌های گذرا، DNA فقط برای مدت کوتاهی (نزدیک به ۹۶-۲۴ ساعت) بیان می‌شود و در ژنوم ادغام نمی‌شود. از سوی دیگر، انتقال پایدار به یک DNA خارجی نیاز دارد که به‌طور کامل در ژنوم میزبان ادغام شود؛ بنابراین امکان بیان نامحدود DNA خارجی را فراهم می‌کند. یکی دیگر از مزایای انتقال با استفاده از لیپیدها، راندمان بالای انتقال در نتیجه استفاده تعداد کمی از مراحل آزمایشگاهی است؛ با این حال، انتقال مبتنی بر لیپید برای همه انواع سلول، به‌ویژه سلول‌های اولیه مناسب نیست.



شکل ۱۹-۲: فرآیند انتقال مبتنی بر لیپید کاتیونی. تصویر با کسب مجوز از Thermo Fisher Scientific مورد استفاده واقع شده است.

برای دستیابی به اهداف این آزمایش، شما یک رده سلولی از HEK293 را ایجاد خواهید کرد که به‌طور موقت پروتئین EGFP را بیان می‌کند. برای این عمل از معرف انتقال FuGENE HD استفاده خواهید کرد. معرف انتقال FuGENE HD در انواع مختلفی از رده‌های سلولی کاربردهای متنوعی دارد، همچنین سمیت کمی نیز دارد. این معرف از یک گروه پلی‌کاتیونی برای وصل شدن به ساختار ستون لیپیدی و به‌منظور رساندن اسیدهای نوکلئیک به سلول‌های یوکاریوتی استفاده می‌کند و می‌تواند در حضور سرم نیز استفاده شود.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

پیش از آغاز، به کلاس آزمایشگاه: جلسه هجدهم، کشت سلول‌های پستانداران مراجعه کنید. پیروی از روش مناسب استریل کردن در تمام آزمایش‌هایی که شامل دست‌کاری سلول‌های پستانداران در

کشت می‌شود، مهم است. علاوه بر این، لازم است که همیشه از تجهیزات حفاظت فردی مناسب استفاده کنید. به شکل ۱۹-۳ مراجعه کنید تا با شمای کلی روش انتقال آشنا شوید. این فرآیند، با کسب مجوز (شیوه‌نامه معرف ترانسفکشن FuGENE HD Promega) اصلاح شده است:

۱- پلیت شش چاهکی سلول‌های HEK293 گروه خود را که از جلسه ۱۸ آزمایشگاه، آماده

کردید، حاضر کنید. با استفاده از میکروسکوپ و عدسی شیئی ۱۰×، ریخت‌شناسی و تلاقی سلول‌های خود را در زیر نور سفید مشاهده و ثبت کنید. میزان تلاقی سلول‌های شما باید در حدود ۶۰-۸۰ درصد باشد و تعدادی سلول نیز باید در محیط شما غوطه‌ور باشند. اگر متوجه هرگونه علائم آلودگی شدید یا سلول‌های شما خارج از محدوده ۶۰-۸۰ درصدی تلاقی هستند، به مربی خود اطلاع دهید. پلیت خود را به انکوباتور کشت سلولی برگردانید. ۲- معرف FuGENE HD را از یخچال ۴°C خارج کنید و اجازه دهید به دمای اتاق برسد.

پیش از استفاده از معرف، ویال آن به آرامی و با وارونه کردن مخلوط کنید.

۳- در هود لامینار، سه ویال میکروسانتیریفوز استریل را به صورت: بدون DNA، pcDNA3 (وکتور خالی/کنترل منفی) و pEGFP-N1 برچسب بزنید. دو وکتور بیانی در پستانداران است که توسط یک پروموتر سیتومگالوویروس^۱ کنترل می‌شوند؛ با این حال pcDNA3 حاوی ژن *egfp* نیست.

۴- مقدار ۱۵۰ μL از Opti-MEM را در دمای اتاق به هر ویال، پایت کنید. نکته برای صرفه‌جویی در هزینه: به جای Opti-MEM می‌توان از محیط بدون سرم استفاده کرد.

۵- برای محاسبه حجم هر پلازمید که برابر با ۳ μg است، جدولی مانند جدول ۱۹-۱ ایجاد کنید. مقدار ۳ μg از DNA پلازمید صحیح را به هر ویال برچسب‌دار که اکنون حاوی Opti-MEM است، اضافه کنید. پایت کنید تا مخلوط شوند.

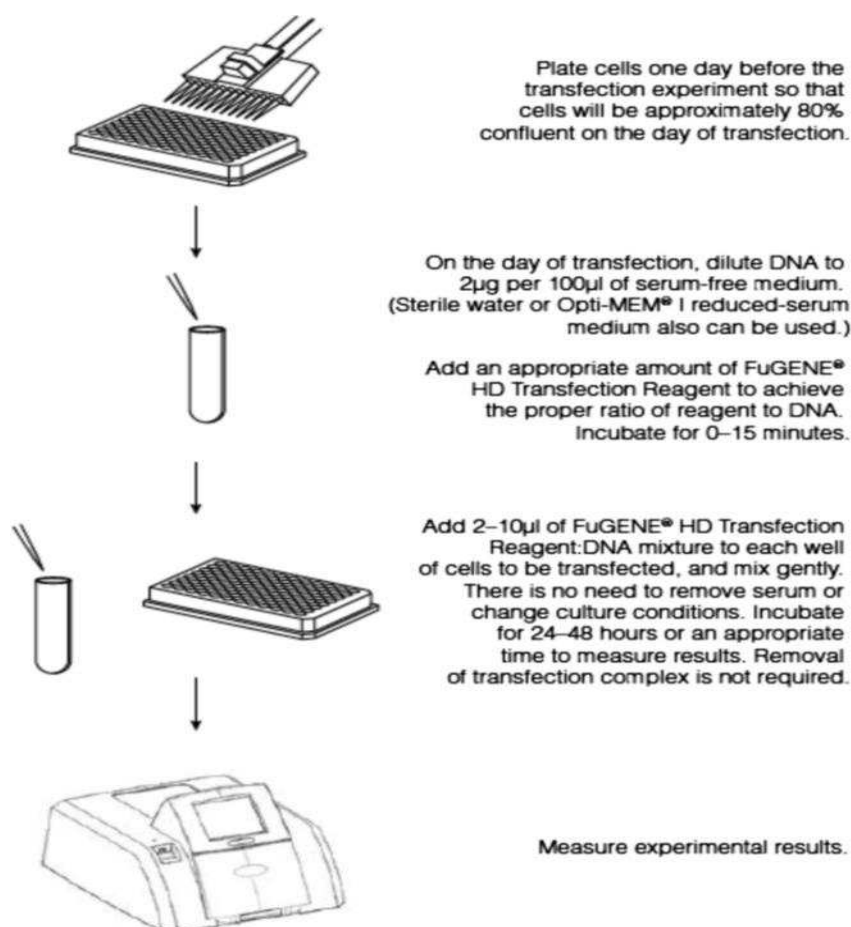
جدول ۱۹-۱: پلازمیدهای مورد استفاده در فرآیند انتقال

DNA	غلظت (μg/μL)	حجم برای افزودن (μL)
DNA بدون	.	.
pcDNA3 (کنترل منفی)		
pEGFP-N1		

۶- مقدار ۱۰ μL معرف FuGENE HD (با استفاده از نسبت ۱:۳) را به‌طور مستقیم به DNA رقیق شده با Opti-MEM، در هر ویال پایت کنید. اجازه ندهید که معرف

1. Cytomegalovirus

FuGENE HD یکراست با دیواره‌های پلاستیکی ویال تماس پیدا کند، زیرا این عمل راندمان انتقال را به شدت کاهش می‌دهد. سر سمپلرها را برای افزودن نمونه به ویال‌های دیگر، تعویض کنید.

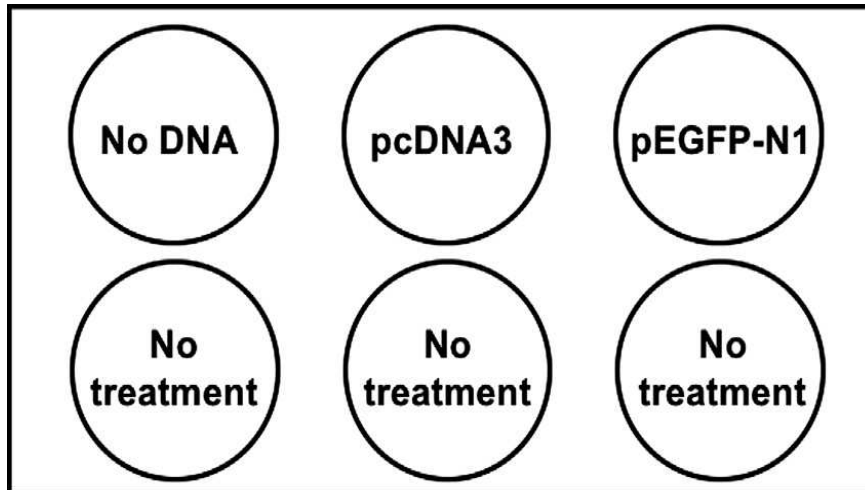


شکل ۱۹-۳: شمای کلی انتقال سلول‌های پستانداران با استفاده از معرف FuGENE HD. با کسب اجازه از Promega Corporation، ۲۰۱۸.

۷- مواد موجود در هر ویال را با پایپت کردن محتویات به بالا و پایین و یا با ورتکس مختصر، مخلوط کنید. ویال‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه در هود لامینار قرار دهید. این زمان سبب تشکیل کمپلکس‌های DNA:FuGENE HD می‌شود؛ بنابراین DNA را قادر می‌سازد تا وارد سلول‌ها شود.

۸- پلیت شش چاهکی سلول‌های HEK293 خود را از انکوباتور خارج کنید. با استفاده از علائم ذکر شده در شکل ۴-۱۹، هر کدام از چاهک‌ها را علامت بزنید. در نهایت، سه چاهک تیمار نشده باقی خواهد ماند.

شکل ۴-۱۹: راه‌اندازی پلیت شش چاهکی برای انتقال گذرا سلول‌های HEK293.



۹- مقدار تقریبی $170 \mu\text{L}$ از مخلوط کمپلکس را به صورت قطره‌ای به هر یک از چاهک‌های مربوطه اضافه کنید. برای اطمینان از اختلاط کامل کمپلکس‌های DNA:FuGENE HD در سرتاسر محیط، پلیت را به آرامی به جلو و عقب تکان دهید و سپس آن را به انکوباتور 37°C باز گردانید.

۱۰- سنجش کیفی بیان گذرا EGFP ۴۸ ساعت پس از انتقال، با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس (همان‌گونه که در کلاس آزمایشگاه: جلسه نوزدهم-ب شرح داده شد)، قابل برآورد است. توجه: پیشنهاد می‌شود که پس از ۴۸ ساعت، محیط را آسپیره و با محیط کامل تازه جایگزین کنید؛ این امر سلول‌های شناور و مرده را پیش از تصویربرداری فلورسانس از بین می‌برد.

کلاس آزمایشگاه: جلسه نوزدهم-ب

تجزیه و تحلیل بیان EGFP با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس

هدف: بررسی کیفی انتقال گذرا پلازمید pEGFP N1 در رده سلولی HEK293 پستانداران با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس.

۱- مقدمه

میکروسکوپ فلورسانس^۱ یک ابزار رایج در آزمایشگاه زیست‌شناسی مولکولی / بیوشیمی است. بسیاری از نمونه‌ها و ترکیبات/ پروتئین‌های آلی مختلف دارای خواص فلورسانس منحصر به فردی است که می‌توان از آن‌ها برای تجسم، کمی‌سازی و اهداف دیگر استفاده کرد. وجود طیف گسترده‌ای از فلوروفورها^۲ (بخشی از مولکول است که باعث می‌شود مولکول دارای خاصیت فلوئورسانس شود-م)، امکان برچسب‌گذاری پروتئین‌ها به صورت اختصاصی و به منظور شناسایی عملکردهای درون سلولی، برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین و حتی تشخیص مولکول‌های منفرد را ممکن کرده است. نمونه‌هایی از فلوروفورهای رایج مورد استفاده در تصویربرداری زیست‌شناسی مولکولی، در جدول ۱۹-۲ فهرست شده است.

مبنای عمل میکروسکوپ فلورسانس، تابش نور با طول موج خاص (برانگیختگی) روی نمونه است که در نهایت نور ساطع شده را در طول موج دیگر (انتشار) مجسم می‌کند. در سطح اتمی، فلورسانس زمانی رخ می‌دهد که الکترون‌های موجود در مولکول، در نتیجه برانگیختگی انرژی بیشتری را دریافت کنند و در نتیجه ناپایدار خواهند شد؛ سپس انرژی دریافتی را از دست می‌دهند و به حالت پایه خود بازمی‌گردند و در نتیجه یک فوتون (نور) را آزاد می‌کنند. نور برانگیختگی، سبب تحریک الکترون‌ها و افزایش سطوح انرژی آن‌ها خواهد شد. نور برانگیختگی طول موج کوتاه‌تر و انرژی بالاتری نسبت به انتشار فلورسانس دارد. این انتشار دارای طول موج بالاتر، انرژی کمتر و رنگ متفاوتی هنگام ساطع شدن دارد. به عنوان مثال، ما از EGFP استفاده می‌کنیم که یک پروتئین فلورسنت طبیعی است. طول موج تحریک این پروتئین ۴۸۸ nm (طول موج کوتاه، انرژی بالا، رنگ آبی) و طول موج انتشار آن ۵۰۹ nm (طول موج بلندتر، انرژی کمتر، رنگ سبز)، است.

استفاده از میکروسکوپ فلورسانس دانشمندان را قادر ساخته است تا تنها طول موج انتشار را با چشم یا توسط یک آشکارساز مانند دوربین، در پس‌زمینه‌ای تاریک تجسم کنند؛ بنابراین ساختار با

1. Fluorescence. microscopy
2. Fluorophores

کنتراست بالا قابل شناسایی می‌شود. نوع میکروسکوپ فلورسانس مورد استفاده، حدود دقت تشخیص را برای نمونه تحت بررسی تعیین می‌کند. اجزای اصلی میکروسکوپ فلورسانس بسیار شبیه به میکروسکوپ‌های نوری است، به‌استثنای منبع نوری و مجموعه فیلترهای تخصصی که به‌طور انتخابی طول‌موج‌های حاصل از منابع نوری مختلف را مسدود و هدایت می‌کنند.

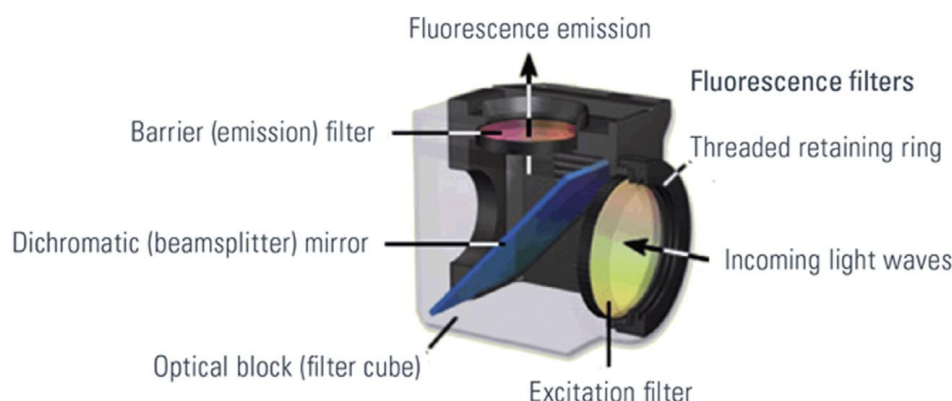
جدول ۱۹-۲: فلوروفورهای رایج مورد استفاده و محدوده برانگیختگی/انتشار آن‌ها.

رنگ	حداکثر انتشار (nm)	حداکثر برانگیختگی (nm)	فلوروفور
سبز	۵۰۷	۴۸۴	EGFP
فیروزه‌ای	۴۷۶	۴۳۹	ECFP
نارنجی	۵۸۱	۵۵۴	dTomato
قرمز	۶۱۰	۵۸۷	mCherry
قرمز	۶۰۵	۵۵۸	mRuby
زرد	۵۲۷	۵۱۴	EYFP

منابع نوری مورد استفاده توسط میکروسکوپ‌های فلورسانس به نسبت میکروسکوپ‌های نوری سنتی، بسیار قدرتمندتر هستند. آن‌ها ممکن است شامل لامپ‌های زنون یا جیوه‌ای قوسی باشند که نزدیک به ۱۰-۱۰۰ برابر روشن‌تر از لامپ‌های معمولی هستند و طیف گسترده‌ای از طول‌موج‌های نوری را از ماوراءبنفش تا مادون قرمز تولید می‌کنند. هنگامی که نور از لامپ قوسی خارج می‌شود، از یک فیلتر برانگیختگی عبور می‌کند که طول‌موج تحریک مناسب را برای نمونه انتخاب می‌کند (جدول ۱۹-۲). این فیلترها بسته به طول‌موج نور مورد نیاز برای برانگیختن نمونه/فلوروفور، متفاوت است. طول‌موج‌هایی که از فیلتر برانگیختگی عبور می‌کنند، دو رنگ^۱ آینه/تقسیم کننده پرتو^۲ (معروف به دورنگی) (منظور حالتی است که در آن دو طول‌موج از هم متمایز می‌شوند) را از طریق بخش شیئی میکروسکوپ، به نمونه منعکس می‌کنند. انتشار فلورسنت از نمونه، از طریق عدسی شیئی و سپس از طریق آینه دو رنگی صورت می‌پذیرد. در نهایت، نور توسط فیلتر انتشار فیلتر می‌شود و این عمل به‌صورتی انجام می‌شود که طول‌موج‌های انتشار یافته ناخواسته مسدود می‌شوند و هر نور ساطع شده را از منبع نوری یا اجزای میکروسکوپ فیلتر می‌کند. فلورسنت فیلتر شده منتشر شده می‌تواند برای مشاهده به عدسی چشمی یا آشکارساز (که در آن تصویر به‌صورت دیجیتالی قابل مشاهده است) ارسال شود. بسیاری از اوقات فیلتر برانگیختگی، آینه دو رنگ و فیلتر مسدود کننده در یک بخش قرار می‌گیرد که بیشتر به‌عنوان مکعب فیلتر از آن یاد می‌شود (شکل

1. Dichromatic
2. Beamsplitter

۵-۱۹). تعدادی از میکروسکوپ‌های فلورسانس می‌توانند تا شش مکعب فیلتر مجزا را در خود جای دهند تا طیف وسیعی از فلوروفورها در آن‌ها قابل مشاهده باشند.



شکل ۵-۱۹: تصویر مکعب فیلتر. تصویر از Leica Microsystems.

هنگام کار با مولکول‌های فلورسنت توجه داشته باشید که طول موج انتشار دارای یک پیک جذب است که به‌طور معمول از نظر طول موج و بزرگی، کمتر از پیک برانگیختگی است. تفاوت بین این دو پیک جذب، به‌عنوان جابه‌جایی استوکس^۱ شناخته می‌شود. هرچه فاصله در این جابجایی بیشتر باشد، با استفاده از ترکیب فیلترهای مناسب، امکان تفکیک نور برانگیختگی و انتشار راحت‌تر خواهد بود. این امر، یک ملاحظه مهم هنگام استفاده از چندین فلوروفور در نمونه شما است، زیرا این امر می‌تواند از طریق نورهای موجود در بین طیف‌های مختلف، سبب ایجاد تداخل در برآورد نمونه‌ها شود. توجه شود که قرار گرفتن مداوم فلوروفور در معرض نور تحریک کننده، سبب کاهش تدریجی فلورسانس فلوروفور خواهد شد. این امر تحت عنوان نور رنگ بری^۲ نیز شناخته می‌شود. این امر زمانی اتفاق می‌افتد که یک فلوروفور برانگیخته‌شده با نور، با اکسیژن مولکولی برهم‌کنش ایجاد کند. در نتیجه این واکنش، فلوروفور تخریب و اکسیژن بسیار واکنش‌پذیر ($^1\text{O}_2$) و اکسیژن سه‌گانه ($^3\text{O}_2$)، تولید می‌شود.

این مولکول‌ها توانایی واکنش و تخریب فلوروفورهای مجاور را خواهند داشت. علاوه بر این، در نمونه‌های زنده، مانند نمونه‌هایی که در جلسات بعدی آزمایشگاه استفاده می‌کنید، نور پریدگی همچنین می‌تواند هموستاز سلولی را تغییر دهد، زیرا سلول‌های فاقد رنگ‌دانه، سلول‌های آسیب‌دیده هستند؛ بنابراین، برای کاهش نور رنگ بری، همیشه باید مجموعه فیلترهای برانگیختگی

1. Stokes. shift

2. Photobleaching

را بهینه کنید و کمترین شدت نور معقول و زمان نوردهی مورد نیاز برای مشاهده نمونه (زنده یا فیکس شده) خود را، انتخاب کنید. شما تنها باید در زمانی که آماده دیدن نمونه خود هستید، لامپ قوسی را روشن کنید. نمونه‌های ثابت باید با محیط پایه ضد محو شدن تهیه و با لاک ناخن شفاف مهر و موم شوند. در نهایت، در زمان عدم تصویربرداری از اسلایدها (لام و لامل)، آن‌ها را باید در تاریکی نگهداری کرد و سلول‌های زنده در صورت عدم استفاده، باید در انکوباتور کشت بافت نگهداری شوند.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

مشاهده فلورسانس EGFP و تصویربرداری با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس برای

تجزیه و تحلیل‌های بعدی

EGFP یک مولکول فلورسنت طبیعی است که می‌تواند در طول موج ۴۸۸ nm برانگیخته و در طیف سبز و در طول موج ۵۰۹ nm، منتشر شود. ما از این ویژگی EGFP برای تأیید بیان آن در سلول‌های HEK293 و با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس، ۴۸ ساعت پس از انتقال گذرا استفاده خواهیم کرد (جلسه ۱۹-الف). اگر سلول‌ها EGFP را بیان کنند، فلورسانس در سراسر سیتوپلاسم سلولی قابل مشاهده خواهد بود. از آنجایی که این سلول‌ها را در آزمایش‌های بعدی استفاده خواهید کرد، مطمئن شوید که زمان قرار گرفتن در معرض آن‌ها را روی میکروسکوپ محدود کنید و در صورت عدم استفاده، آن‌ها را به انکوباتور کشت سلولی برگردانید.

توجه: میکروسکوپ‌های فلورسنت می‌توانند انواع مختلفی از منابع نوری را مانند لامپ‌های بخار جیوه^۱، لامپ‌های قوس زنون^۲، لیزرها یا LEDهای پر قدرت استفاده کنند. شناسایی و درک استفاده از هر میکروسکوپ، ضروری است، زیرا هر کدام به روش‌های روندی متفاوتی نیاز دارند. مراحل ذکر شده برای استفاده با میکروسکوپ فلورسانس معکوس Olympus LED، مجهز به دوربین با حسگر CCD^۳ و نرم‌افزار تصویربرداری علوم زیستی cellSens است. برای دسترسی به شیوه‌نامه‌های کار با تجهیزات خاص، به شیوه‌نامه‌های شرکت سازنده مراجعه کنید. برای افزایش ایمنی، مهم است که هرگز یکر است به نور فیلتر نشده از میکروسکوپ فلورسنت نگاه نکنید؛ زیرا این امر می‌تواند منجر به وارد شدن آسیب جدی به چشم شود.

۱- پوشش محافظ را از میکروسکوپ فلورسانس خود بردارید. قبل از روشن کردن میکروسکوپ، پایه را به پایین‌ترین موقعیت و شدت نور را به پایین‌ترین میزان کاهش دهید.

1. Mercury-vapor. lamps

2. Xenon. arc. lamps

3. Charged. coupled. device. (CCD)

- ۲- کامپیوتر و دوربین CCD را روشن کنید.
- ۳- مطمئن شوید که گیره شیئی در دیافراگم عددی متناسب با ضخامت پتری دیش پلاستیکی مورد استفاده شما قرار گرفته است. سپس لنز شیئی با کمترین توان را در مسیر نور بچرخانید.
- ۴- پلیت شش چاهکی خود را (از جلسه ۱۹-ب) در صفحه میکروسکوپ، محکم کنید. درب پتری دیش را بردارید.
- ۵- منبع نور سفید را روشن و نمونه را از طریق عدسی نگاه کنید. تنظیمات لازم را برای مشاهده سلول‌ها انجام دهید. ابتدا از تنظیم وضوح استفاده کنید و صفحه را با احتیاط به سمت بالا حرکت دهید تا سلول‌ها در معرض دید قرار گیرند. میدان دید سلول‌های سالم و چسبنده با ریخت‌شناسی شبه اپیتلیال را پیدا کنید. از میدان‌های دید حاوی سلول‌های گرد یا بیش از حد شناور صرف نظر کنید، زیرا این نشانه سلول‌های مرده است. همچنین می‌توانید دستگیره‌های تنظیم صفحه را حرکت دهید تا مناطق مورد نظر خود را پیدا کنید. هنگامی که سلول‌های سالم را مشاهده کردید، از اعمال تنظیم دقیق برای حصول وضوح نهایی استفاده کنید. اگر در یافتن سلول‌های خود مشکل دارید، به مربی خود مراجعه کنید.
- ۶- عدسی شیئی را به حالت بزرگنمایی بیشتر بچرخانید و دوباره سلول‌ها را بررسی کنید. این کار را تا زمان مشاهده سلول‌ها با استفاده از عدسی شیئی $20 \times$ ($40 \times$ در صورت وجود)، ادامه دهید.
- ۷- مسیر نور خروجی را از حالت «چشمی» به «دوربین» تغییر دهید. با استفاده از نرم‌افزار cellSens، یک تصویر زنده از سلول‌های خود را روی صفحه کامپیوتر مشاهده کنید. ممکن است نیاز باشد یک بار دیگر تنظیمات را تراز کنید. هنگامی که سلول‌های شما در حالت متمرکز و در میدان دید مناسب هستند، تصویربرداری کنید.
- نکته برای صرفه‌جویی در هزینه: اگر میکروسکوپ شما مجهز به دوربین نیست، دوربین تلفن همراه خود را در مقابل خروجی چشمی قرار دهید و از آن برای گرفتن عکس در غیاب تجهیزات دیگر استفاده کنید.
- ۸- تصویر خود را به‌صورت فایل TIFF یا JPG ذخیره کنید. به حتم مشاهدات کیفی چشمی خود را نیز در دفترچه یادداشت ثبت کنید.
- ۹- منبع نور سفید و سایر چراغ‌های اتاق را خاموش کنید تا نور پس‌زمینه کاهش یابد. پلیت را حرکت ندهید، زیرا در محله بعدی تصویر فلورسانس را از همان میدان دید تهیه خواهید کرد.

۱۰- مسیر نور خروجی را از حالت «دوربین» به «چشمی» برگردانید. منبع نور LED را روشن کنید (ممکن است نیاز باشد که شدت نور را بسته به درجه بیان EGFP تنظیم کنید) و فیلتر برانگیختگی/انتشار مناسب را در جای خود قرار دهید. برای حداکثر تجسم EGFP، طول موج انتشار باید بین ۵۰۲ تا ۵۳۸ نانومتر و طول موج تحریک بین ۴۵۷ و ۴۸۷ نانومتر باشد. برای ایمنی خود یکراست به نور فلورسنت نگاه نکنید!

۱۱- همان نمونه را از طریق خروجی چشمی مشاهده کنید و هرگونه تنظیمات لازم را به منظور دسترسی به حداکثر میزان فوکوس انجام دهید. سلول‌هایی که با موفقیت با پلازمید pEGFP-N1 منتقل شده‌اند، به دلیل بیان پروتئین EGFP، رنگ سبز فلورسانس را ساطع خواهند کرد. توجه داشته باشید که سلول‌ها سطوح مختلفی از رنگ فلورسانس را ساطع می‌کنند که این امر مربوط به مقدار EGFP بیان شده در آن‌ها است؛ برخی از سلول‌ها ممکن است هرگز نور فلورسانس را ساطع نکنند (سلول‌های منتقل نشده). این مشاهدات کیفی را مطابق جدول ۱۹-۳ در دفترچه یادداشت آزمایشگاه خود ثبت کنید.

۱۲- مسیر نور خروجی را از حالت «چشمی» به «دوربین» تغییر دهید. با استفاده از نرم‌افزار cellSens، یک تصویر زنده از سلول‌های خود را روی صفحه کامپیوتر مشاهده خواهید کرد. ممکن است نیاز باشد یک بار دیگر تنظیمات را تراز کنید. هنگامی که سلول‌های شما به‌خوبی فوکوس شدند و در میدان دید مناسب قرار گرفتند، با تنظیم زمان نوردهی روی دوربین، روشنایی EGFP را در سلول‌های ترانسفکت شده pEGFP-N1 خود به حداکثر برسانید و سپس عکس‌برداری کنید. به زمان نوردهی توجه کنید و آن را برای هر نمونه‌ای که در آزمایش خود از آن تصویربرداری کردید، ثابت نگه دارید.

۱۳- هنگامی که سلول‌های خود را مشاهده/تصویربرداری نمی‌کنید، نور فلورسنت را خاموش کنید.

۱۴- تصاویر خود را به‌عنوان یک فایل TIFF یا JPG ذخیره کنید. توجه کنید که نام این فایل با فایل ذخیره شده از تصویر قبلی متفاوت باشد.

۱۵- مراحل ۱۴-۵ را برای حداقل ۲-۳ میدان دید مشاهده شده برای هر نمونه تکرار کنید. شما باید تصاویر فلورسانس و تصاویر با نور سفید را برای هرکدام از نمونه‌ها و همچنین میدان‌های دید، داشته باشید.

۱۶- پس از تصویربرداری از تمامی نمونه‌های خود، به‌طور کیفی میانگین سطح و درصد سلول‌های بیان‌کننده پروتئین EGFP را برآورد کنید. این مشاهدات را در دفترچه یادداشت آزمایشگاه خود ثبت کنید (جدول ۱۹-۳).

توجه: اگر متمایل به تعیین سطح فلورسانس EGFP پس از انتقال گذرا هستید، به کلاس آزمایشگاه جلسه بیست و دوم، سرکوب ژن *EGFP* توسط RNAi، بخش سوم مراجعه کنید.

جدول ۱۹-۳: مشاهدات تجربی فلورسانس ژن *egfp* در سلول‌های HEK293 منتقل شده

ریخت‌شناسی	تلاقی	شدت فلورسانس	آزمایش
			بدون DNA
			pcDNA3 (وکتور خالی، کنترل منفی)
			pEGFP-N1

کلاس آزمایشگاه: جلسه نوزدهم-پ تولید سلول‌های HEK293 با بیان پیوسته پروتئین EGFP

هدف: تولید سلول‌های HEK293 که به‌طور پایدار پلازمید pEGFP-N1 را با استفاده از انتخاب آنتی‌بیوتیک بیان می‌کنند.

۱- مقدمه

در فرآیند انتقال پایدار، DNA خارجی به‌طور کامل در ژنوم میزبان ادغام می‌شود؛ بنابراین میزبان امکان بیان نامحدود DNA خارجی را فراهم می‌کند. به منظور ایجاد رده‌های سلولی پایدار (در مورد ما، سلول‌های HEK293 که به‌طور پایدار EGFP را بیان می‌کنند)، باید یک فشار انتخابی^۱ وجود داشته باشد تا سلول‌ها را مجبور به ادغام DNA پلازمید در ژنوم کند. فرآیند انتخاب در سلول‌های پستانداران مشابه آنچه در فصل‌های قبل با استفاده از سلول‌های باکتریایی آموخته‌اید، است؛ با این حال، فرآیند انتخاب در این مورد برای انتخاب کلی پلازمید استفاده نمی‌شود، بلکه برای تولید سلول‌هایی که به‌طور پایدار DNA نوترکیب ادغام شده را بیان می‌کنند، مورد استفاده واقع می‌شود. عامل انتخابی مورد استفاده، به‌صورت اختصاصی در سلول‌های پستانداران عمل می‌کند و روی پلازمید قابل تشخیص است. عوامل انتخابی رایج در سلول‌های پستانداران شامل عوامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌هایی همانند ژنتیکین^۲ (معروف به G418)، بلئومایسین^۳، پورومایسین^۴، ژئوسین یا هیگرومایسین^۵ B است.

پیش از انجام فرآیند انتقال، پیشنهاد می‌شود یک «منحنی کشتار» با عامل انتخابی در سلول‌های پستانداران (که توسط پلازمید مورد استفاده برای انتقال تعیین می‌شود) را برای رده سلولی خاص خود ایجاد کنید. در مورد pEGFP-N1، انتخاب سلول‌های پستانداران G418 است. منحنی کشتار این امکان را به شما می‌دهد که به‌طور تجربی کمترین غلظت انتخابی مورد نیاز برای کشتن سلول‌های منتقل نشده را تعیین کنید. از آنجایی که این امر از یک رده سلولی به رده سلولی دیگر و عامل انتخابی به عامل دیگر متفاوت است، پیشنهاد می‌شود برای هر رده سلولی/عامل انتخابی معین مورد استفاده، یک منحنی کشتار را تولید کنید. به‌طور معمول، سلول‌هایی که با پلازمید منتقل نشده‌اند، باید در عرض ۷-۳ روز شروع به مرگ کنند. هنگامی که یک منحنی کشتار

1. Selective. pressure

2. Geneticin

3. Bleomycin

4. Puromycin

5. Hygromycin. B

تکمیل شد، غلظت مناسب محیط انتخابی در حدود ۴۸ ساعت پس از عمل انتقال، به سلول‌های انتقال گذرا اضافه می‌شود. با گذشت زمان، سلول‌هایی که به‌طور پایدار DNA خارجی را در ژنوم خود ادغام نکرده‌اند، از بین خواهند رفت و تنها سلول‌هایی باقی خواهند ماند که DNA را در ژنوم خود ادغام کرده‌اند. سلول‌های پایدار باقی‌مانده را می‌توان گسترش داد، ذخیره کرد و/ یا برای آزمایش‌های بعدی استفاده کرد.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

اگر می‌خواهید سلول‌های پایدار بیانی با پلازمید pEGFP-N1 ادغام شده در ژنوم HEK293 را تولید کنید، پس از تأیید موفقیت‌آمیز بیان EGFP در فرآیند انتقال گذرا (جلسه ۱۹-ب)، شیوه‌نامه‌های ارائه شده را انجام دهید.

الف. تولید منحنی کشتار

پیش از فرآیند انتقال اولیه، پیشنهاد می‌شود یک منحنی کشتار را ایجاد کنید، زیرا کسب نتایج مطلوب ممکن است ۱-۲ هفته زمان به خود اختصاص دهد. سلول‌های منتقل نشده با درصد تلاقی ۲۰-۳۰٪ در یک پلیت شش چاهکی قرار دهید. پس از ۲۴-۴۸ ساعت، دوزهای مختلفی از G418 را به محیط کامل و برای رساندن حجم کل به ۲mL در هر چاهک، اضافه کنید. به‌طور معمول، استفاده از حدود ۱۰۰-۲۰۰ µg/mL از G418 برای شروع، مقدار مناسبی است. برای مثال، می‌توانید یک منحنی کشتار را با غلظت‌های (µg/mL) ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ از G418 را ایجاد کنید. پس از افزودن محیط انتخابی سلول‌ها را می‌توانید پس از ۱-۲ هفته، در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده کنید. سلول‌ها باید پس از ۳-۷ روز، شروع به از بین رفتن کنند. دزی از G418 مورد استفاده شما، کمترین دزی است که ۱۰۰ درصد از سلول‌های فاقد پلازمید انتقالی را از بین خواهد برد. این غلظتی است که برای انتخاب کلون‌های پایدار و پس از انتقال با pEGFP-N1 یا پلازمید مورد علاقه دیگر استفاده می‌کنید.

ب. انتخاب سلول‌های پایدار

۱- پس از ۴۸ ساعت از انتقال اولیه، محیط انتخابی مناسب (در این مورد، DMEM همراه با G418 مناسب تعیین شده از منحنی کشتار) را به سلول‌ها اضافه کنید تا کلون‌های پایدار ایجاد شوند.

۲- در طول ۷-۱۰ روز آینده، می‌توانید سلول‌های خود را با استفاده از میکروسکوپ نوری مشاهده کنید. تمام سلول‌های فاقد پلازمید pEGFP-N1، در حضور G418 کشته خواهند شد. سلول‌هایی که پلازمید pEGFP-N1 را دریافت کرده‌اند، در حضور G418 زنده خواهند ماند. سلول‌ها باید طی ۳-۷ روز شروع به مردن کنند، کلنی‌های مقاوم (آنهایی که DNA را در ژنوم ادغام کردند) باقی می‌مانند و بسته به سرعت تقسیم سلول‌ها، در طی ۱۴-۱۰ روز تکثیر می‌شوند.

۳- محیط را با غلظت مناسب G418 هر ۲-۳ روز یک بار و یا هر هفته جایگزین کنید. توجه: طبیعی است که بازدهی انتقال مبتنی بر لیپید کاتیونی بین ۲۰ تا ۶۰ درصد متغیر باشد؛ بنابراین اگر تعداد سلول‌های مرده زیادی در طول فرآیند انتخاب مشاهده کردید، نگران نباشید. سلول‌های باقی مانده و دارای *egfp* ادغام شده را می‌توان از طریق چندین دور تقسیم سلولی گسترش داد.

۴- برای حفظ کلون‌های پایدار، باید به کشت آن‌ها در حضور محیط کامل و G418 ادامه دهید؛ با این حال، برای انجام آزمایش‌های بعدی، جایگزینی محیط با محیط بدون آنتی‌بیوتیک پیشنهاد می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی ممکن است بر نتایج تجربی شما تأثیر بگذارد.

۵- هنگامی که تعداد سلول‌های شما به حد کافی رسید، بیان EGFP آن‌ها را با میکروسکوپ فلورسانس تأیید کنید (جلسه ۱۹-ب) و پیشنهاد می‌شود مقدار کمی از آن‌ها را در نیتروژن مایع منجمد و برای استفاده در آینده ذخیره کنید. سلول‌های پایدار ایجاد شده، از یک جمعیت ناهمگن ژنتیکی از سلول‌های انتقالی تشکیل شده است که سطوح مختلفی از EGFP را بیان می‌کنند. روش دیگر برای ایجاد سلول‌های پایدار، جداسازی کلون‌های تک سلولی برای تولید یک جمعیت ژنتیکی همگن و کلونی است.

برای کسب اطلاعات بیشتر، به کتابچه راهنما FuGENE HD Transfection Reagent مراجعه کنید.^۱

1. <http://bit.ly/1GaEIqy>

منابع

1. Felgner PL, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84(21):7413_17.
2. Kabanov AV, Kabanov VA. DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. *Bioconj Chem* 1995;6:7_20.
3. Promega Corporation. FuGENEs HD Transfection Reagent Technical Manual. Madison, WI: Promega Corporation; 2013.
4. Magidson V, Khojakov A. Circumventing photodamage in live-cell microscopy. *Methods Cell Biol* 2013;114(10):1_15.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- برخی از چالش‌های انتقال اسیدهای نوکلئیک به سلول‌های پستانداران چیست؟ چگونه می‌توان بر این موانع فائق آمد؟
- ۲- تفاوت بین انتقال گذرا و پایدار چیست؟ استفاده از کدام روش برای ایجاد یک رده سلولی و برای بررسی تغییرات طولانی مدت بیان ژن پس از تیمار با عوامل دارویی مختلف، بهتر است؟
- ۳- چگونه می‌توانید تأیید کنید که سلول‌های HEK293 با پلازمید pEGFP-N1، با موفقیت ادغام شده‌اند؟
- ۴- آیا می‌توان پلازمید pEGFP-N1 را با موفقیت به سلول‌های HEK293 انتقال داد، اما با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس، هیچ‌گونه فلورسانسی را مشاهده نکرد؟ چه روش‌های دیگری را برای تأیید موفقیت آمیز انتقال پیشنهاد می‌کنید؟

کلاس آزمایشگاه: جلسه بیستم

سرکوب بیان پروتئین EGFP به واسطه RNAi

هدف: برای انجام این تمرین، از ابزار طراحی RNA کوچک (کوتاه) تداخلی (siRNA)^۱ تحت وب، (BLOCK-It)، از شرکت Thermo Fisher Scientific، برای طراحی اولیگونوکلوئوتیدهای siRNA نشانه‌گیر ژن *egfp* استفاده خواهید کرد. پس از انتخاب siRNA های مناسب، آن‌ها را به‌صورت تجاری سنتز خواهید کرد تا در جلسه آزمایشگاهی بعدی آزمایش شوند. توجه داشته باشید که بسیاری از شرکت‌های دیگر (به‌عنوان مثال، Ambion, Dharmacon و غیره) نرم‌افزار رایگان مشابهی را در وبگاه‌های خود ارائه می‌کنند.

۱- مقدمه

تداخل RNA (RNAi)^۲ یا خاموش کردن ژن پس از رونویسی، یک ابزار زیست‌فناوری قدرتمند است که می‌تواند برای مطالعه اثرات ژن‌ها در سیستم‌های بیولوژیکی موجود در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) و درون تنی (*in vivo*) مورد استفاده قرار گیرد. RNAi یک مسیر درونی و بسیار حفاظت شده در بسیاری از موجودات است که پس از رونویسی، بیان ژن‌ها را کاهش می‌دهد. RNA های دو رشته‌ای (dsRNAs)^۳ از بیان mRNA درونی و از طریق ایجاد برهمکنش‌های مکمل با mRNA هدف، ممانعت به عمل می‌آورند در نتیجه مانع تولید پروتئین‌ها (معروف به خاموشی) خواهد شد. فرآیند خاموشی به‌صورت اختصاصی روی می‌دهد. به صورتی که تنها ژنی که mRNA آن با dsRNA مطابقت دارد، تحت تأثیر قرار خواهد گرفت. سرکوب بیان ژن توسط RNAi در نتیجه دو سازوکار اصلی رخ می‌دهد: (۱) برای تخریب مورد هدف قرار خواهد گرفت یا (۲) ترجمه مولکول mRNA از طریق ممانعت از ورود این مولکول به اجسام پردازش‌گر (p-bodies)^۴ یا تداخل در عملکرد ریبوزوم مختل خواهد شد. اعتقاد بر این است که RNAi یک «سیستم ایمنی» اجدادی است که از موجودات در برابر اسیدهای نوکلئیک پاتوژن انگلی درونی و بیرونی و همچنین تنظیم بیان ژن‌های کد کننده پروتئین، محافظت می‌کند. تاکنون، چندین نوع از RNA های کوچک غیر کد کننده پروتئین کشف شده است که عملکردهای خاموش کنندگی را انجام می‌دهند. تا به امروز، این مولکول‌ها شامل رده‌هایی از siRNA ها، microRNA ها

-
1. (Short)-interfering. RNA. (siRNA)
 2. RNA. interference. (RNAi)
 3. Double-stranded. RNAs. (dsRNAs)
 4. Processing. bodies. (p-bodies)

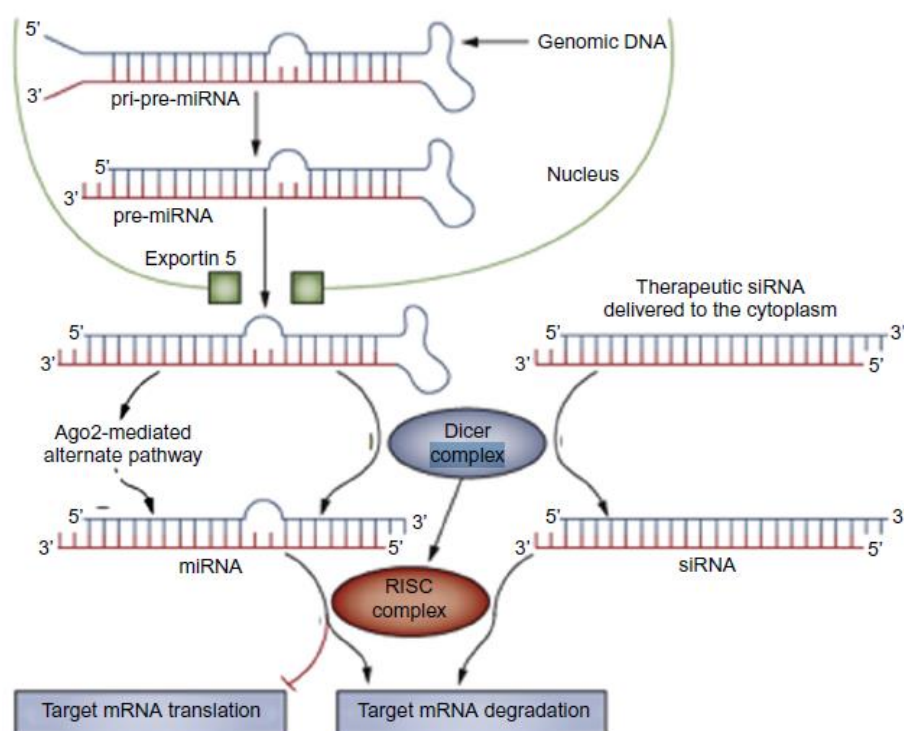
(miRNA ها)، RNA های مرتبط با تکرار (rasiRNA) و RNA های واکنش دهنده با piwi (piRNAs) هستند.

سازوکارهای RNAi پیچیده است؛ با این حال، مسیر اصلی مشاهده در پستانداران به این صورت خلاصه می‌شود: فعالیت RNAi می‌تواند توسط تعدادی از محرک‌های بیرونی مانند DNA خارجی، یا dsRNA از یک ویروس آغاز شود. این اسیدهای نوکلئیک «خارجی» توسط یک آنزیم ریبونوکلاز RNase II، به نام دایسر^۱ یا دروша^۲ شناسایی می‌شوند. آنزیم دایسر مانند یک خط‌کش مولکولی عمل می‌کند و به انتهای dsRNA متصل می‌شود و هر دو رشته را به قطعاتی از siRNA و با طول تقریبی ۲۱-۲۳ نوکلئوتید، می‌شکافد. siRNA روی ترکیب خاموش کننده القاء شده با RISC (RISC) RNA^۳ بارگذاری می‌شود. RISC یک ترکیب با چند زیر واحد است که حاوی یک جزء کاتالیزوری کلیدی به نام آرگونوت (AGO)^۴ است. siRNA به RNA های تک رشته‌ای تفکیک می‌شود: رشته راهنما^۵ (آنتی‌سنس نسبت mRNA هدف) روی RISC بارگذاری و رشته رونده^۶ (سنس نسبت به mRNA هدف) آزاد و تجزیه می‌شود. در مرحله بعد، مجموعه siRNA-RISC با mRNA هدف خود، هیبرید می‌شود. فرآیند هیبرید شدن به صورت ۱۰۰ درصدی انجام می‌شود و خاموشی ژن در نتیجه تخریب نوکلئوتیک mRNA هدف و توسط آنزیم RNase H AGO صورت می‌پذیرد (شکل ۲۰-۱؛ مسیر siRNA در سمت راست). از آنجایی که ژن کد کننده پروتئین هدف هنوز وجود دارد، بازدهی سرکوب به‌طور معمول ۱۰۰ نیست؛ بنابراین، این فرآیند به‌عنوان خاموشی پروتئین (به جای حذف) شناخته می‌شود (شکل ۲۰-۱).

در بسیاری از موجودات، خاموش کردن RNA توسط miRNA ها برای تنظیم بیان ژن‌های درونی استفاده می‌شود. تفاوت اصلی بین رده‌های مختلف مولکول‌های خاموش کننده، منشأ آن‌ها است. siRNA ها از dsRNA های مکمل مشتق می‌شوند و به‌طور معمول از خارج از سلول و به واسطه ویروس‌ها وارد می‌شوند. siRNA ها به‌صورت ۱۰۰ درصدی با mRNA هدف خود، هیبرید می‌شوند. miRNA ها ممکن است از مناطق غیر کد کننده پروتئین در DNA ژنومی درونی یا به‌عنوان بخشی از رونوشت RNA های کد کننده پروتئین تشکیل شوند. رونوشت miRNA دارای بخشی است که روی خود تا می‌شود و یک ساختار سنجاق سری^۷ و یک حلقه بزرگ جفت نشده را

-
1. Dicer
 2. Drosha
 3. RNA-induced silencing complex. (RISC)
 4. Argonaute
 5. Guide. strand
 6. Passenger. strand
 7. Hairpin

تشکیل می‌دهد. سپس، رونوشت اولیه miRNA در هسته توسط ریبونوکلاز دروشا^۱ به یک رشته با طول تقریبی ۲۰ نوکلئوتید، پردازش می‌شود. پیش‌ساز miRNA توسط پروتئین Exportin-5 به سیتوپلاسم (بستر برای برش توسط دایسر) منتقل می‌شود. پردازش دایسر و بارگذاری روی مجموعه RISC مشابه siRNA ها است. هنگامی که miRNA روی مجموعه RISC بارگذاری شد، mRNA های موجود در سلول برای تنظیم بیان ژن، مورد هدف قرار می‌گیرد؛ با این حال، برخلاف siRNA ها، mRNA هدف به‌طور معمول مطابقت کامل با miRNA راهنما ندارد که این امر منجر به مهار ترجمه mRNA از طریق جدا شدن (از ریبوزوم) یا جلوگیری از عملکرد ریبوزوم می‌شود (شکل ۲۰-۱؛ مسیر miRNA در سمت چپ).



شکل ۲۰-۱: سازوکارهای عمل تداخل RNA (RNAi). تجدید چاپ با اجازه Czech MP, et al. RNAi-based therapeutic strategies for metabolic disease. Nat Rev Endocrinol 2011;7(8):473-84

در سطح آزمایشگاه، RNAi را می‌توان در تعدادی از موجودات مدل مختلف، همانند کشت‌های سلولی پستانداران، گیاهان، *Caenorhabditis elegans* و غیره را با معرفی dsRNA خارجی (برای سرکوب کوتاه‌مدت) یا سازه‌هایی که پلازمیدهای حاوی RNA سنجاق سری کوتاه (shRNA) را بیان کرده‌اند (برای سرکوب طولانی مدت)، مورد بررسی قرار داد. تخصصی عمل کردن و بازدهی بالا (تعداد مولکول mRNA هدف که توسط siRNA مهار می‌شود) سرکوب ژن با استفاده از RNAi، این روش را به ابزاری سودمند برای مطالعه عملکرد ژن تبدیل می‌کند. موفقیت RNAi در این زمینه بستگی به نحوه وصل شدن siRNA به mRNA هدف دارد، زیرا توانایی هر siRNA در خاموش کردن mRNA هدف و همچنین اثرات غیر مرتبط با هدف آن، متفاوت است. اثرات خارج از هدف می‌تواند شامل شروع پاسخ ایمنی طبیعی اینترفرون سلول‌ها (در پستانداران) یا هدف قرار دادن mRNA های ناخواسته باشد. این پدیده ممکن است از طریق تشابه توالی هر رشته از siRNA دورشته‌ای با یک mRNA غیر هدف باشد. علاوه بر این، استفاده از غلظت‌های بسیار بالای siRNA (۱۰۰ nm)، می‌تواند سبب ایجاد چنین فعالیت‌هایی شود. هر چه غلظت یک siRNA منفرد بیشتر باشد، احتمال متصل شدن آن به mRNA غیر هدف افزایش پیدا می‌کند؛ بنابراین، طراحی اولیگونوکلوئوتیدهای siRNA کارآمد و اختصاصی، گامی کلیدی در کاربرد موفقیت‌آمیز این روش است.

شرکت‌های متعددی اقدام به طراحی سفارشی siRNA کرده‌اند؛ همچنین ابزارهای تخصصی مبتنی بر وب را برای ساده کردن طراحی siRNA های شما، ارائه می‌دهند. این ابزارها معیارهای منتخب منتشر شده را در نظر می‌گیرند. علاوه بر این، بسیاری از شرکت‌ها تغییرات شیمیایی اختصاصی را در مولکول‌های siRNA سنتز شده خود اعمال می‌کنند که می‌تواند پایداری و عمل اختصاصی siRNA ها را افزایش دهد. صرف‌نظر از روش طراحی siRNA، دانستن شیوه‌نامه‌های کلی برای تشکیل دادن یک مولکول siRNA مؤثر، می‌تواند مفید واقع شود. در ادامه، فهرستی از قوانین کلی ارائه می‌شود. توجه کنید که این لیست جامع نیست و تولید یک مولکول مؤثر را تضمین نمی‌کند. تمامی siRNA های طراحی شده در شرایط رایانه‌ای (*in silico*) باید در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) و در کنار کنترل‌های مناسب آزمایش شوند.

فهرست ملاحظات کلی هنگام طراحی siRNA ها شامل موارد زیر است:

- ۱- ناحیه mRNA هدف را انتخاب کنید: منطقه هدف به‌طور معمول در حدود ۲۱ نوکلئوتید طول دارد. برای جلوگیری از ایجاد خاموشی غیر اختصاصی، siRNA های بزرگ‌تر از ۳۰ نوکلئوتید را طراحی نکنید. بهتر است که در ابتدا mRNA مورد علاقه خود را با استفاده

از پایگاه داده RefSeq ارائه شده توسط NCBI^۱ پیدا کنید. یک توالی را که با کدون آغاز AUG شروع شده اسکن کنید و این عمل را تا زمانی که به توالی دی نوکلئوتیدی AA برسید، ادامه دهید. محل قرارگیری هر AA و ۳' مجاور نوکلئوتید شماره ۱۹ را به عنوان مکان‌های بالقوه siRNA هدف ثبت کنید. طبق پیشنهاد های Elbashir و همکاران، siRNA ها با اوور هنگ های ۳' UU، مؤثرترین siRNA های خاموش کننده هستند، اگرچه می‌توان از سایر اوور هنگ های دی نوکلئوتیدی نیز استفاده کرد. پیشنهاد شده است که از به کارگیری اوور هنگ های دی نوکلئوتیدی ۳' GG اجتناب کنید، زیرا این توالی ممکن است به هدفی برای برش توسط RNAase، در باقیمانده های G تک رشته ای تبدیل شود. شما قصد انتخاب دو تا چهار توالی هدف را دارید که همگی آن‌ها از این شیوه نامه ها پیروی می کنند.

۲- نوکلئوتید شروع: اولین نوکلئوتید توالی siRNA می تواند A یا G باشد.

۳- اجتناب از نواحی با تکرار نوکلئوتیدی: از مناطقی با سه یا بیشتر G' یا C' اجتناب کنید. این امر مانع از تشکیل ساختارهای ثانویه درون مولکولی می شود که این امر سبب افزایش بازدهی هیبرید شدن خواهد شد.

۴- محتوای GC: توالی هایی را با محتوای GC کم (۵۰-۳۰ درصد)، با محتوای GC بالاتر در انتهای ۵' انتخاب کنید؛ با این حال، برخی از siRNA های مؤثر دارای محتوای GC بالایی هستند؛ بنابراین مهم است که تمام ساختارهای خاموش کننده خود را در شرایط آزمایشگاهی تأیید کنید.

۵- BLAST^۲ برای همسانی با پایگاه داده mRNA: سایت های هدف خود را با پایگاه داده ژنوم مناسب (انسان، موش و غیره) مقایسه کنید. هر توالی siRNA هدف فرضی را که بیش از ۱۳ جفت باز پیوسته همسان با سایر توالی های کد کننده دارد، حذف کنید.

۶- از کنترل های مناسب siRNA استفاده کنید: هر آزمایش siRNA باید شامل تعدادی کنترل باشد تا از اختصاصی عمل کردن و عدم وجود اثرات خارج از هدف در آن، اطمینان حاصل شود.

الف. siRNA اسکرمل شده^۳. این کنترل منفی یک توالی نوکلئوتیدی اسکرمل شده از siRNA مختص ژن است. یک جستجوی BLAST دیگر از siRNA اسکرمل شده برای تأیید عدم همسانی آن با هیچ ژن دیگر، مورد نیاز است.

1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>

2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

3. Scrambled. siRNA

ب. توالی‌های siRNA اضافی که mRNA مشابه را هدف قرار می‌دهد و به اثرات بیوشیمیایی مشابهی را ایجاد می‌کنند.

پ. یک siRNA غیر اختصاصی که هدف آن در انتخاب یک ژن در ژنوم گونه مورد نظر شما، مشخص نیست.

ت. سنجش نجات برای اطمینان از ایجاد خاموشی در ژن مورد نظر. این را می‌توان با انتقال یک وکتور بیانی پستانداران (که ژن مورد نظر شما را رمزگذاری می‌کند) به سلول‌های شما و پس از سرکوب بیان ژن به واسطه siRNA، برای «نجات» فنوتیپ انجام داد.

در این جلسه آزمایشگاه، شما siRNA های اختصاصی برای mRNA های *egfp* را طراحی می‌کنید و سپس آن‌ها را به صورت تجاری (تحت عنوان رشته‌های RNA مکمل جداگانه که به هم متصل خواهند شد) تهیه خواهید کرد؛ با این حال، برخی از محققان استفاده از siRNA های ترکیبی که حاوی چندین siRNA برای یک هدف (خزانة siRNA) هستند را ترجیح می‌دهند. از جمله مزیت‌های استفاده از خزانه‌های حاوی siRNA^۱ این است که این مولکول‌ها می‌توانند اثرات خارج از هدف را کاهش دهند، زیرا غلظت اولیه هر siRNA کم است اما بازدهی کلی خاموش کنندگی حفظ می‌شود.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

طراحی siRNA های هدف گیرنده *egfp* در محیط رایانه (*In silico*)

این شیوه‌نامه با مجوز Thermo Fisher Scientific ارائه شده است:

۱- در وبگاه BLOCK-iT RNAi^۲، روی قسمت siRNA های استاندارد کلیک کنید.

۲- در صفحه BLOCK-iT RNAi Designer، گزینه طراحی siRNA هدف را انتخاب کنید (شکل ۲۰-۲).

۳- اطلاعات توالی هدف را با کد یکتا^۳ یا توالی نوکلئوتیدی وارد کنید. برای توالی *egfp*، از بخش جستجو پایگاه داده نوکلئوتید در NCBI^۴، به منظور پیدا کردن پلازمید سنتزی pEGFP-N1 از آزمایشگاه‌های Clontech (شماره دسترسی: U55762)، استفاده کنید. این پلازمید همان مولکولی است که برای ایجاد سلول‌های HEK293 بیان کننده EGFP

1. Pooled. siRNAs

2. <https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/>

3. Accession. number

4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>

پایدار، استفاده کردید. شما می‌خواهید فقط توالی نوکلئوتیدی را برای *egfp* کپی و جایگذاری کنید که بین موقعیت‌های نوکلئوتیدی ۶۷۹ تا ۱۳۹۸ قرار دارد. مطمئن شوید که هیچ عددی را حذف نخواهید کرد. اگر از سلول‌های تجاری HEK293 خریداری شده استفاده کرده‌اید GFP را بیان می‌کنند، از کد یکتا: M62653 استفاده خواهید کرد. کل توالی نوکلئوتیدی از موقعیت ۱ تا ۹۶۱ را بدون حذف هیچ عددی کپی و جایگذاری کنید. توجه: در صورتی که siRNA ها را برای یک ژن معین دیگر طراحی می‌کنید، شما باید شماره یکتا RefSeq را وارد کنید. این امر هنگامی که siRNA بر مبنای ۳' UTR رونوشت mRNA طراحی شود، بسیار مهم است. افراد یا گروه‌های مختلف ممکن است مناطق دیگری را برای هدف قرار دادن siRNA خود انتخاب و کارایی خاموش شدن را در جلسات بعدی آزمایشگاه مقایسه کنند.

۴- پایگاه داده برای انجام جستجوی BLAST از ژن خود (به‌عنوان مثال، *egfp*) در برابر سایر ژن‌های موجود در موجود، قرار داده و انتخاب کنید (شکل ۲۰-۲). از آنجایی که می‌خواهید بیان EGFP را در سلول‌های کلیه جنینی انسان خاموش کنید، پایگاه داده انسانی را انتخاب کنید. جستجوی BLAST در طراحی siRNA امری مهم تلقی می‌شود. از این امر برای مقایسه توالی‌های ورودی در پایگاه داده و به‌منظور یافتن مناطق منحصر به فرد در طراحی اهداف RNAi استفاده خواهید کرد.

۵- حداقل و حداکثر درصد G/C را انتخاب کنید. برای این تمرین آزمایشگاهی پیشنهاد می‌کنیم که تنظیمات پیش‌فرض ۳۵-۵۵ درصد را لحاظ کنید (شکل ۲۰-۳).

۶- گزینه طراحی اختصاصی siRNA (موتیف پیش فرض) را انتخاب کنید. این گزینه از الگوریتم طراحی siRNA اختصاصی Thermo Fisher استفاده می‌کند. این گزینه شامل تجزیه و تحلیل آماری توالی هدف از جمله ترکیب توالی، محتوای نوکلئوتید در انتها ۵' و ۳' توالی و مشخصات ترمودینامیکی رشته است و آن را با داده‌های جمع‌آوری‌شده از مجموعه‌های اولیگو siRNA از پیش تأیید شده، مرتبط می‌کند.

۷- روی گزینه «RNAi Design» کلیک کنید (شکل ۲۰-۳).

۸- طرح‌ها را با استفاده از check box ها انتخاب کنید. به‌طور معمول، انتخاب گزینه‌ها با دو یا سه ستاره مؤثر خواهد بود. دنباله مولکول‌های siRNA انتخابی خود را در دفترچه یادداشت ثبت کنید (شکل ۲۰-۴).

شکل ۲۰-۲: وبگاه BLOCK-iT برای طراحی RNAi. پلتفرم siRNA ها را برای سنتز انتخاب کنید. (A) کادری که توالی EGFP را در قالب FASTA وارد می‌کنید. (B) Check boxes که می‌توانید مناطقی را برای طراحی siRNA هدف انتخاب کنید. (C) کادر کشویی برای انتخاب پایگاه داده آرگانیزم برای انجام BLAST. با این عمل، نواحی منحصر به فرد در mRNA هدف شناسایی می‌شود.

۹- روی «Continue» کلیک کنید.

۱۰- شما باید یک کنترل منفی را نیز انتخاب کنید. کنترل منفی شما می‌تواند یک siRNA اسکرمبل شده یا یک siRNA باشد که ژنی را هدف قرار می‌دهد که در موجود مورد نظر شما وجود ندارد (شکل ۲۰-۵).

۱۱- روی بخش «Tube» و «Email/Save Order» کلیک کنید.

۱۲- شما می‌توانید انتخاب‌های خود را در این قسمت را دوباره بررسی کنید. قسمت «Searcher Name» را پر کنید و siRNA های طراحی شده را در صفحه گسترده مایکروسافت اکسل با کلیک روی «Save to Excel Spreadsheet» موجود پایین صفحه، ذخیره کنید (شکل ۲۰-۶). یک نسخه را به مربی خود ارسال کنید تا siRNAهایی را که در آزمایش‌های بعدی بررسی خواهید کرد، انتخاب کند.

(D) Select default min/max G/C percentage

(E) Select default motif pattern

Step 4: Choose minimum and maximum G/C percentage

Minimum G/C percentage: Maximum G/C percentage:

Step 5: Select siRNA design options and click "RNAi Design" to design siRNA.

Default motif pattern: ☒ P: Proprietary (Recommended)

Tusch's motif pattern: ☐ A: AA(N19)TT ☐ B: NA(N19)NN ☐ C: NA(RN17Y)NN ☐ D: NA(N18Y)NN

(F)

Guarantee: The BLOCK-IT™ RNAi Designer is such an effective tool for the design of siRNAs that if you order the three best siRNA sequences designed by the BLOCK-IT™ RNAi Designer, we guarantee that two of them will give greater than 70% knockdown of mRNA, given that the transfection efficiency in your experiment is at least 80%. If two or more fail to knock down your target RNA by at least 70% under these conditions, Invitrogen will design and ship a fourth siRNA to your target for free*.

*Please contact Invitrogen Technical Services to take advantage of this offer (800-955-6288 ext 2). Please be prepared to fax or email your order reference number, oligo sequences and data showing your transfection efficiency and knockdown. This offer is good for one free duplex per target.

How to Order: You must have an online account with Invitrogen to order custom oligos. After your oligos have been designed, you must enter a valid user name and password to send them to the ordering system. If you do not already have an account, click [user registration](#) or contact your [local representative](#) to set up an account.

شکل ۲۰-۳: (D) درصد پیش‌فرض min/max G/C، (E) انتخاب الگوی-موتیف و (F) طراحی siRNA های موردنظر.

Gene Name: rhoB Accession: X06820.1 GI: Unknown
 Organism: Homo sapiens Length: 591 ORF Region: 1-591
 Definition: H.sapiens rhoB gene mRNA.
 Sequence: X06820.1

[Continue](#) [View Blast Results](#) [Sort By:](#) Start

10 siRNA Sequences (Up to 10 top scoring siRNA sequences are reported, sorted by the Start position and ranked as ★★★★★ to ★☆☆☆☆ to indicate knockdown probability). Select the sequence to order and click "Continue".

Select	No.	Start	Sequence(DNA)	Region	GC%	Tuschl's pattern match ¹	Rank ¹
☒	1	60	CCTGCTGATCGTGTTCAGT	ORF	52.64	★★★★★	★★★★★
☒	2	62	TGCTGATCGTGTTCAGTAA	ORF	42.11	★★★★★	★★★★★
☒	3	63	GCTGATCGTGTTCAGTAAG	ORF	47.37	★★★★★	★★★★★
☐	4	119	AGAACTATGTGGCCGACAT	ORF	47.37	★★★★★	★★★★★
☐	5	120	GAACATGTGGCCGACATT	ORF	47.37	BCD	★★★★★
☐	6	227	ACACCGACGTCATTCTCAT	ORF	47.37	★★★★★	★★★★★
☐	7	233	ACGTCATTCTCATGTGCTT	ORF	42.11	★★★★★	★★★★★
☐	8	449	GCATCCAAGCCTACGACTA	ORF	52.64	★★★★★	★★★★★
☐	9	563	GCTGCATCACTGCTGCAA	ORF	52.64	★★★★★	★★★★★
☐	10	566	GCATCAACTGCTGCAAGGT	ORF	52.64	★★★★★	★★★★★

(G) Select siRNA oligo(s)

(H)

[Continue](#)

Tuschl's pattern¹: A=AA(N19)TT, B=NA(N19)NN, C=NA(N17)YNN, D=NA(N17)YNN; Nucleotides: A = Adenine; T = Thymine; R = Adenine or Guanine (Purines); Y = Thymine or Cytosine (Pyrimidines); N = Any.

¹Note: As a result of the recent update to the BLOCK-IT™ RNAi Designer, the "Star Scoring System" has also been updated to reflect our more highly refined RNAi duplex designs. Only the duplexes with the highest probability of success are provided which means that out of a possible five stars, no duplex has less than a three-star ranking. While each individual RNAi duplex is designed to achieve the highest quality results, we recommend selecting the top three star-ranked designs for your target of interest to guarantee your knockdown success.

شکل ۲۰-۴: (G) از بخش check-boxes را به منظور انتخاب siRNA (های) مورد نظر استفاده و سپس روی ادامه (H) کلیک کنید.

Selected siRNA with negative control sequences

The negative control sequence for each selected siRNA is displayed. Select control sequences to order and click "Order Online"

(I) Select tube format

Select order format first before selecting products to order*: ☒ Tube ☐ Plate

[Order Online](#) [Email/Save Order](#)

Select	No.	Name	Start	Sequence(DNA)	Region	GC%	Rank
☒	1	X06820.1 siRNA_60	60	CCTGCTGATCGTGTTCAGT	ORF	52.64	★★★★★
☐		X06820.1 siRNA_control_60		CCTAGTGTGCTTCAGT		52.64	
☒	2	X06820.1 siRNA_62	62	TGCTGATCGTGTTCAGTAA	ORF	42.11	★★★★★
☐		X06820.1 siRNA_control_62		TGCTAGCGTTTACGTGTA		42.11	
☒	3	X06820.1 siRNA_63	63	GCTGATCGTGTTCAGTAAG	ORF	47.37	★★★★★
☐		X06820.1 siRNA_control_63		GCTGCTGTACTTGGAAAG		47.37	

(J) Select control siRNA oligo(s)

(K) Email/Save Order

شکل ۲۰-۵: (I) قالب ویال را انتخاب کنید و siRNA (J) های اسکرمل شده کنترلی قابل تطابق با توالی های اولیگونوکلوئیدی siRNA را که پیشتر انتخاب شده بود، انتخاب کنید. پس از اتمام، روی (K) ایمیل/ ذخیره کلیک کنید.

(L) Input

researcher
name

Researcher Name: *: Required field

siRNA Order #1:

Primer Name	Purity	Scale
X06820.1_siRNA_60	Desalted	20 nmole
Primer Sequence (Duplex)		
Sense: CCUGCGAUCGUGUUCAGU	dTdT	None
Antisense: ACUGAACACGATCAGG	dTdT	None

siRNA Order #2:

Primer Name	Purity	Scale
X06820.1_siRNA_62	Desalted	20 nmole
Primer Sequence (Duplex)		
Sense: UCCGAGUCGUGUUCAGUA	dTdT	None
Antisense: UUAUCGAAACGATCAGCA	dTdT	None

siRNA Order #3:

Primer Name	Purity	Scale
X06820.1_siRNA_63	Desalted	20 nmole
Primer Sequence (Duplex)		
Sense: GCGAGUCGUGUUCAGUAG	dTdT	None
Antisense: CUUACUGAACACGATCAGC	dTdT	None

(M) Save to excel
spreadsheet

Save to Excel Spreadsheet

Reset Form

شکل ۲۰-۶: ذخیره کردن siRNA و توالی‌های اولیگونوکلوئیدی کنترل (L) نام خود را وارد کنید و (M) ذخیره در صفحه گسترده اکسل را انتخاب کنید.

منابع

1. Du T, Zamore PD. MicroPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 2005;132(21):4645_52.
2. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:376_85.
3. Editors of Nature Cell Biology. Whither RNAi? *Nat Cell Biol* 2003;5:489_90.
4. Yu JY, et al. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *PNAS* 2002;99(9):6047_52.
5. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 1990;2:279_89.
6. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000;404:293_6.
7. Elbashir, et al. Functional anatomy of siRNA for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 2001;20:6877_88.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- چگونه متوجه خواهید شد که آیا مولکول siRNA شما در خاموش کردن انتخابی ژن *egfp* مؤثر واقع شده و یک ژن غیر اختصاصی را خاموش نکرده است؟
- ۲- کدام نوع مولکول RNAi در ارزیابی اثرات بلند مدت بیان ژن بهتر است: siRNA یا shRNA که در یک پلازمید طراحی شده است؟ پاسخ خود را تفسیر کنید.
- ۳- شما از پیش یک siRNA را طراحی و تأیید کرده‌اید که پروتئین هیستون را در سلول‌های HeLa هدف قرار داده است تا میزان mRNA را از طریق خاموشی، به میزان ۹۰ درصد کاهش دهد (همان‌طور که توسط RT-qPCR تعیین می‌شود)؛ با این حال، وقتی سطح پروتئین هیستون را با وسترن بلات آزمایش می‌کنید، مقادیر زیادی از پروتئین هیستون باقی مانده است. دلیل این وضعیت را تشریح کنید.

کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و یکم
سرکوب بیان پروتئین EGFP به واسطه RNAi-بخش دوم

هدف: شما سلول‌های HEK293 بیان کننده EGFP را (در کلاس آزمایشگاه: جلسه نوزدهم: انتقال گذرا سلول‌های پستانداران ایجاد شد) برای انتقال گذرا اولیگوهای siRNA پروتئین EGFP به منظور از خاموش کردن بیان پروتئین EGFP در اواخر این هفته، آماده خواهید کرد.

۱- مقدمه

مقدمه‌های ارائه شدن در جلسه‌های ۲۰-۱۸ را مرور کنید.

کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و یکم-الف

سرکوب بیان پروتئین EGFP به واسطه RNAi-بخش دوم

شمارش و پلیت کردن سلول‌های پستانداران بیان کننده EGFP^۱

۱- تمرین‌های آزمایشگاهی

پیش از آغاز، نحوه کشت، شمارش و پلیت کردن سلول‌های پستانداران را در کلاس آزمایشگاه: جلسه هجدهم، کشت سلول‌های پستانداران مرور کنید. نزدیک به ۲۴ ساعت پیش از جلسه بیست و یکم-ب، مقدار 3×10^5 از سلول‌های HEK293 بیان کننده پلازمید pEGFP-N1 (ایجاد شده در جلسه نوزدهم، انتقال گذرا سلول‌های پستانداران) را به ازای هر چاهک از یک پلیت ۶ چاهکی، پلیت کنید. سلول‌ها باید در ۲ mL محیط رشد کامل و بدون هیچ‌گونه آنتی‌بیوتیک قرار داده شوند.

1. Counting. and. plating. EGFP. expressing. mammalian. cells

کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و یکم-ب

جلسه موقت آزمایشگاه

انتقال گذرا siRNA

هدف: سرکوب بیان پروتئین EGFP در سلول‌های HEK293. شما با استفاده از معرف انتقال FuGENE HD، به‌طور موقت اولیگونوکلوئوتیدهای siRNA کنترل مثبت و منفی طراحی شده خود را به سلول‌های HEK293 بیان‌کننده EGFP انتقال خواهید داد. یک شمای کلی از روند انتقال در جلسه نوزدهم، انتقال گذرا سلول‌های پستانداران نشان داده شده است (شکل ۱۹-۳).

۱- تمرین‌های آزمایشگاهی

هنگام کار با siRNA ها، به شیوه‌نامه «چالش‌های کار با RNA» که در قسمت چهارم این راهنما آمده است، توجه کنید. اطمینان حاصل کنید که علاوه بر استفاده از مواد و تجهیزات استریل، آن‌ها همچنین فاقد RNase هستند. این موارد شامل آب، سر سمپلرها، ویال‌های میکروسانتریفیوژ و پایپت‌های سرولوژیکی است. استفاده از اسپری غیرفعال‌کننده RNase، می‌تواند خطر آلودگی RNase ها را در آزمایش شما کاهش دهد.

۱- معرف FuGENE HD را از یخچال 4°C خارج کنید و اجازه دهید تا به دمای اتاق برسد. قبل از استفاده، به آرامی با وارونگی مخلوط کنید.

۲- ریخت‌شناسی، تلاقی و فلورسانس هر چاهک حاوی سلول‌های HEK293 بیان‌کننده EGFP خود را که از جلسه قبلی آزمایشگاه با عدسی شیئی $20\times$ یک میکروسکوپ فلورسانس پلیت کرده بودید مشاهده کنید. مشاهدات خود را در دفترچه یادداشت آزمایشگاهی خود مانند جلسه جدول ۲-۱۹ ثبت کنید. پلیت خود را به انکوباتور کشت سلولی 37°C بازگردانید.

۳- در زیر هود لامینار، ۵ ویال میکروسانتریفیوژ را با عناوین: بدون siRNA (فقط Opti-MEM)، siRNA غیر خاموش‌کننده یا اسکرمبل شده (کنترل منفی)، siRNA eGFP (کنترل مثبت)، siEGFP #1، siEGFP #2 (siEGFP #1)، siEGFP #1 و siEGFP #2 به اولیگوهای siRNA آزمایشی که پیشتر در جلسه بیستم طراحی شده بودند، اشاره دارد) و Opti-MEM برچسب بزنید.

نکته برای صرفه‌جویی در هزینه: می‌توانید به جای Opti-MEM، از محیط بدون سرم استفاده کنید.

- ۴- مقدار $100 \mu\text{L}$ از Opti-MEM را در هر ویال، پایت کنید.
- ۵- هر اولیگونوکلوئید siRNA را برای رساندن غلظت نهایی به 40 nM در مجموع 2 mL از محیط، به ویال برجسب‌دار مربوط به خود اضافه کنید. در دفترچه یادداشت آزمایشگاهی خود، جدول ارائه شده در زیر (جدول ۱-۲۱) را رسم کنید تا میزان siRNA مورد نیاز برای هر تیمار را ثبت کنید. محلول را به آرامی به بالا و پایین پایت کنید تا به خوبی مخلوط شود. توجه: برای siRNA های آزمایشی، ممکن است نیاز به تنظیم غلظت نهایی کل داشته باشید. برای شروع، محدود $100-20 \text{ nM}$ از siRNA پیشنهاد می‌شود.

جدول ۱-۲۱: تنظیم آزمایشی برای خاموش کردن EGFP با واسطه siRNA

ویال	غلظت (nM) siRNA	حجم افزایشی به (μL) siRNA	Opti-MEM (μL)	FuGENE HD (μL)
خالی	.	.	.	.
siRNA اسکرمل شده (کنترل منفی)			۱۰۰	۱۰
siRNA eGFP (کنترل مثبت)			۱۰۰	۱۰
siEGFP #1			۱۰۰	۱۰
siEGFP #2			۱۰۰	۱۰
Opti-MEM	.	.	۱۰۰	۱۰

- ۶- مقدار $10 \mu\text{L}$ معرف FuGENE HD را یکرست در هر ویال مشخص شده پایت کنید. اجازه ندهید که معرف FuGENE HD یکرست با دیواره‌های پلاستیکی ویال تماس پیدا کند، زیرا این عمل راندمان انتقال را به شدت کاهش می‌دهد. برای انتقال محلول به هر ویال جدید، از یک سرسمپلر جدید استفاده کنید.
- ۷- محلول را با پایت کردن به بالا و پایین به خوبی مخلوط کنید و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در هود لامینار قرار دهید. این زمان امکان تشکیل ترکیب معرف انتقال: siRNA را فراهم می‌آورد و siRNA را قادر ساخته تا وارد سلول‌ها شود.
- ۸- پلیت گروه خود را از انکوباتور خارج کنید. با استفاده از عنوان ارائه شده در جدول ۱-۲۱، چاهک‌ها را با توجه به محتوی آن علامت بزنید.
- ۹- کل حجم ترکیب FuGENE HD:siRNA را به صورت قطره‌ای به چاهک مربوطه در پلیت ۶ چاهکی اضافه کنید. برای اطمینان از اختلال کامل ترکیب FuGENE HD:siRNA

در سرتاسر محیط، پلیت را به آرامی به جلو و عقب تکان دهید و سپس آن را به انکوباتور 37°C بازگردانید.

۱۰- ۷۲ ساعت پس از انتقال siRNA، سرکوب بیان پروتئین EGFP را به صورت کیفی و با میکروسکوپ فلورسانس مشاهده کنید. توجه: برای siRNA هایی که خود طراحی کرده‌اید، پیشنهاد می‌شود که سلول‌ها در ساعت‌های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ از لحاظ سرکوب بیان ژن نظارت شوند.

کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و دوم

سرکوب بیان پروتئین EGFP به واسطه RNAi-بخش سوم

هدف: تعیین کمیت بازدهی سرکوب بیان پروتئین EGFP با واسطه RNAi در سلول‌های HEK293 با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس و NIH Image J.

۱- مقدمه

به مقدمه کلاس آزمایشگاه: جلسه نوزدهم، انتقال گذرا سلول‌های پستانداران مراجعه شود.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

هفتاد و دو ساعت پس از انتقال اولیگونوکلوته‌های siRNA در سلول‌های HEK293 (کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و یکم-ب)، تصاویر زمینه روشن (میکروسکوپ نوری) و فلورسانس هر چاهک را همان‌طور که پیشتر در جلسه نوزدهم-ب توضیح داده شد، به دست آورید و ذخیره کنید. تصاویر خود را به‌صورت فایل‌های JPG یا TIFF ذخیره کنید. به حتم مشاهدات کیفی را نیز مطابق جدول ۱-۲۲ در دفترچه یادداشت آزمایشگاه خود ثبت کنید.

۱- نرم‌افزار NIH Image J را در رایانه شخصی خود دریافت و باز کنید. این نرم‌افزار به‌صورت رایگان برای انواعی از سیستم‌عامل‌ها و از مؤسسه ملی بهداشت^۱ در اختیار کاربران قرار گرفته است.

۲- از منوی فایل، «Open» را انتخاب کنید و اولین تصویر فلورسانس مورد نظر برای تجزیه و تحلیل را انتخاب کنید. بهتر است با سلول‌های HEK293 بیان‌کننده EGFP که با هیچ siRNA منتقل نشده‌اند (برای نمونه فقط تحت تیمار با Opti-MEM قرار گرفته‌اند) شروع کنید. می‌توان پیش‌بینی کرد که این سلول‌ها بالاترین سطوح فلورسانس را با واسطه داشتن EGFP، داشته باشند.

۳- از منوی تجزیه و تحلیل، «Set measurement» را انتخاب کنید. از این بخش به حتم موارد زیر را تعیین کنید: مساحت، تراکم یکپارچه^۲ و متوسط مقدار خاکستری^۳ و سپس «OK» را انتخاب کنید (شکل ۱-۲۲).

1. <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>

2. Integrated. density

3. Mean. gray. value

۴- از باند ابزار Image J در بالا، «ابزار Freehand» را انتخاب کنید (شکل ۲۲-۱). با استفاده از این ابزار و ماوس، دور یک سلول سالم معین را در تصویر فلورسانس خود به دقت خط بکشید (شکل ۲۲-۲). توجه: باز کردن زمینه میدان روشن برای شناسایی سلول‌هایی با بیان اندک پروتئین EGFP مفید است، اما همچنان باید برای تجزیه و تحلیل، از تصویر فلورسانس استفاده کنید.

۵- هنگامی که اولین سلول خود را مشخص کردید، گزینه «Measure» (Ctrl-M؛ کامپیوترهای PC یا Command-M؛ کامپیوترهای Mac) را در منوی تجزیه و تحلیل انتخاب کنید (شکل ۲۲-۲).

۶- یک پنجره جدید ظاهر خواهد شد که تمام نتایج حاصل از اندازه‌گیری را برای سلول مورد نظر، فهرست می‌کند (شکل ۲۲-۲).

۷- یک ناحیه غیر سلولی و کوچک (اندازه دقیق مهم نیست) موجود در کنار سلول مورد نظر خود که فلورسانس ندارد را انتخاب کنید. اندازه‌گیری را با انتخاب «Measure» در منوی تجزیه و تحلیل ثبت کنید. این امر به عنوان خوانش فلورسانس در پس‌زمینه عمل می‌کند.

جدول ۲۲-۱: مشاهدات تجربی سرکوب پروتئین EGFP به واسطه siRNA

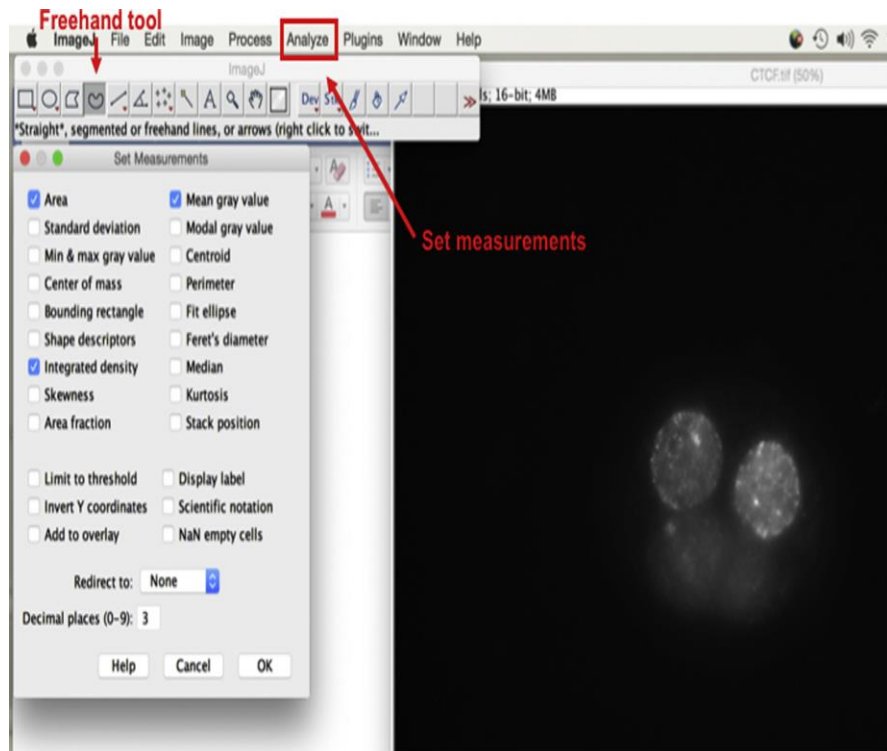
ریخت‌شناسی	تلاقی	شدت فلورسانس	آزمایش
			بدون siRNA (تنها حاوی Opti-MEM)
			siRNA اسکرمل شده (کنترل منفی)
			siRNA eGFP (کنترل مثبت)
			siRNA EGFP#1 (آزمایشی)
			siRNA EGFP#2 (آزمایشی)

۸- مراحل ۴-۷ را برای تمام سلول‌های خود در آزمایش کنترل، تکرار کنید. از هر تیمار، دست‌کم ۱۰ سلول را بشمارید. اگر حداقل ۱۰ سلول ندارید، ممکن است به تصاویر اضافی از میدان‌های دید دیگر برای تجزیه و تحلیل نمونه خود نیاز داشته باشید.

۹- هنگامی که تمام سلول‌های خود را اندازه‌گیری کردید، داده‌های به‌دست‌آمده را در پنجره نتایج انتخاب و در صفحه گسترده مایکروسافت اکسل کپی و جایگذاری کنید (شکل ۲۲-۳).

۱۰- مقدار کل فلورسانس تصحیح شده سلول (CTCF)^۱ را برای هر سلول با استفاده از معادله محاسبه کنید:

(میانگین فلورسانس پس‌زمینه × منطقه سلول‌های انتخابی) - تراکم یکپارچه = CTCF



شکل ۲۲-۱: برنامه NIH Image J که مکان freehand tool و موقعیت ابزار تنظیم اندازه‌گیری را نشان می‌دهد.

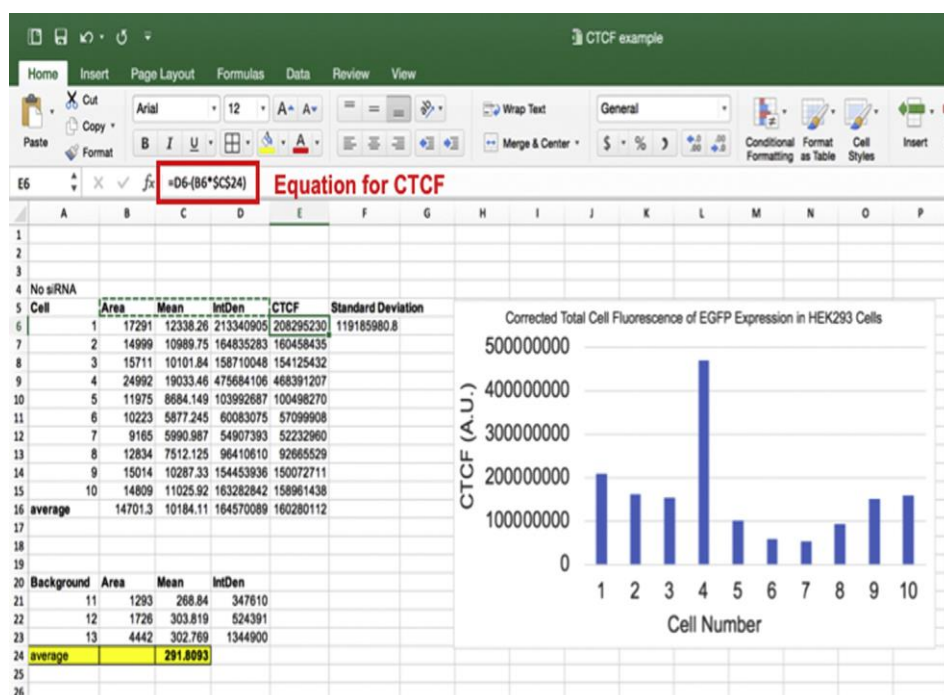
از تراکم یکپارچه برای نشان دادن منطقه مورد نظر (ROI)^۲ × میانگین ROI استفاده می‌شود. اگر فقط میانگین شدت فلورسانس را در نظر بگیرید، میانگین فلورسانس بدون در نظر گرفتن اندازه سلول، محاسبه می‌شود؛ بنابراین، اگر شما یک سلول بزرگ را با یک سلول کوچک مقایسه می‌کنید، چه‌بسا مقدار فلورسانس بالاتری را در سلول کوچک در مقایسه با سلول بزرگ به دست خواهید آورد؛ با این حال، هر چه اندازه سلول‌ها بزرگ‌تر باشد، چه‌بسا سطح بیان بیشتری از EGFP وجود خواهد داشت. ما از تراکم یکپارچه

1. Corrected, total, cell, fluorescence. (CTCF)
2. Region. of. interest. (ROI)

استفاده خواهیم کرد؛ بنابراین لازم نیست نگران مسائل مربوط به اندازه بین نمونه‌های مختلف باشیم، زیرا از پیش به آن توجه شده است.

۱۱- مقدار متوسط را در یک سلول جدید در مایکروسافت اکسل تعیین کنید. برای انجام این کار، در باند فرمول «=AVERAGE» را تایپ کنید (همه سلول‌های حاوی CTCF را انتخاب کنید).

۱۲- با ایجاد یک ستون جدید، انحراف معیار CTCF را با تایپ کردن «=STDEV.P» در باند فرمول (انتخاب تمام سلول‌های حاوی مقادیر CTCF) محاسبه کنید.



شکل ۲۲-۲: مثالی از محاسبه CTCF در مایکروسافت اکسل.

۱۳- مراحل ۱۳-۲ را در هر گروه آزمایشی، برای دست‌کم ده سلول در هر تیمار تکرار کنید: siRNA eGFP (کنترل مثبت)، siRNA اسکرمبل شده (کنترل منفی)، siRNA EGFP#1 (آزمایشی) و siRNA EGFP#2 (آزمایشی).

۱۴- پس از پایان کار، یک نمودار میله‌ای ایجاد کنید و میانگین فلورسانس CTCF (در واحدهای دلخواه) را در محور y و تیمار سلولی (بدون siRNA، siRNA eGFP و غیره)

در محور x قرار دهید و سپس تیمارها و کنترل‌ها را با هم مقایسه کنید. در شکل ۲۲-۳، مثالی از مقادیر CTCF در یک سلول منفرد نشان داده شده است.

۱۵- نمودار خود با داشتن عنوان مناسب، مشخص نمودن محورهای x و y ، انحراف معیار و سایر موارد مورد نیاز، ذخیره کنید.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- میانگین فلورسانس را برای هر تیمار مقایسه کنید. کدام گروه‌ها فلورسانس بیشتری دارند، کدام گروه‌ها کمتر؟ آیا داده‌ها با انتظارات شما برای اولیگونوکلوئوتیدهای siRNA منتقل شده مطابقت دارد؟ اگر نه دلیل آن را توضیح دهید.
- ۲- چرا هنگام اندازه‌گیری شدت فلورسانس کل، مد نظر قرار دادن اندازه سلول‌ها مهم است؟
- ۳- سه اثر (ژن) خارج از هدف siRNA ها را ثبت کنید. چه کنترل‌های خاصی را باید در هر آزمایش اجرا کنید تا مطمئن شوید داده‌های شما نتیجه اثرات خارج از هدف siRNA نیست؟
- ۴- روش دیگری که می‌توان از آن برای تعیین کمیت میزان سرکوب بیان ژن در سلول‌های شما استفاده کرد، چیست؟

کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و سوم

سرکوب بیان EGFP به واسطه CRISPR-بخش اول

در جلسه‌های آزمایشگاهی بعدی، شما از یک فناوری مهندسی ژنوم کمابیش جدید به نام CRISPRCas9^۱ (تناوب‌های کوتاه پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای- CRISPR مرتبط با پروتئین ۹) یا به اختصار CRISPR استفاده خواهید کرد. برخلاف RNAi که در آن سطوح یک فرآورده ژنی کاهش می‌یابد، CRISPR می‌تواند به‌طور کامل ژن مورد نظر را سرکوب کند. این در اصل، یک سرکوب را عملکردی ایجاد می‌کند که در آن اطلاعات موجود در سطح DNA مختل می‌شوند. این روش برخلاف تولید یک موش ناک اوت شده^۲ (موش‌هایی که در نتیجه اصلاح ژنتیکی، بیان یک ژن در آن‌ها در نتیجه جایگزینی و یا ایجاد اختلال در DNA، خاموش شده است-م) است؛ به‌عنوان مثال، در این روش، توالی DNA حذف می‌شود. قابلیت‌های زیاد روش CRISPR، امکان استفاده از آن را در سایر برنامه‌ها همانند ناک-این ژن^۳ (فرآیندی که در آن توالی ژن را از طریق الحاق یک توالی ناموجود در ژنوم، تغییر می‌دهند-م)، ویرایش ژن، یا حتی فعال‌سازی و سرکوب ژن ممکن می‌سازد. انعطاف‌پذیری، سهولت نسبی استفاده و هزینه کم این فناوری نوظهور، استفاده از آن را برای دانشمندان علوم پایه و کاربردی به یک گزینه جذاب تبدیل کرده است. همان‌طور که دانش ما در مورد CRISPR گسترش می‌یابد، برنامه‌های کاربردی آن نیز گسترش می‌یابند.

هدف شما در دو هفته آینده، حذف ژن *egfp* از رده سلولی پستانداران با استفاده از فناوری CRISPR خواهد بود. در این جلسات، از همان رده‌های سلولی که در جلسات آزمایشگاهی مرتبط با RNAi استفاده کردید (رده سلولی چسبنده کلیه انسان، HEK293 که به‌طور پایدار EGFP را بیان می‌کند)، دوباره استفاده خواهید کرد. این رده سلولی دیپلوئید است؛ یعنی باید دو نسخه از هر ژن در ژنوم انسان وجود داشته باشد. این سلول‌ها در آزمایش CRISPR به نسبت یک رده از سلول‌های سرطانی که حاوی تعداد نسخه‌های نامتعارف از هر ژن بوده، مطلوب‌تر است. سلول‌های HEK293 که به‌طور پایدار EGFP را بیان می‌کنند، با DNA پلازمیدی که دو جزء اصلی سیستم CRISPR را کد کرده (Cas9 و یک RNA راهنمای منفرد (sgRNA یا gRNA) که مکمل *egfp* است)، منتقل می‌شوند. سپس، در جلسات ۲۵-۳۰ آزمایشگاه، شما این امکان را خواهید داشت که sgRNA های مختص به ژن مورد علاقه خود را طراحی، ایجاد و آزمایش کنید.

1. Clustered, regularly, interspaced, short, palindromic, repeats—CRISPR, associated, protein. 9. (CRISPRCas9)

2. Knockout, mouse

3. Gene, knockin

در این هفته، دست‌کم به یک کلاس آزمایشگاه موقت نیاز خواهید داشت، زیرا سلول‌ها باید یک روز پس از پلیت شدن، منتقل شوند. پس از منتقل شدن، شما (مربی) باید در هفته بعدی یعنی پیش از تجزیه و تحلیل سرکوب، سلول‌ها را یک بار گسترش دهید.

کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و سوم-الف

سرکوب بیان EGFP به واسطه CRISPR-بخش اول

هدف: امروز شما سلول‌های HEK293 را که به‌طور پایدار EGFP را بیان می‌کنند، شمارش و پلیت خواهید کرد.

۱- مقدمه

در طول جلسات آزمایشگاهی این کتاب، شما *egfp* را کلون، بیان و خالص‌سازی کرده‌اید. شما همچنین ممکن است این ژن را در سلول‌های پستانداران بیان کرده و آزمایش‌های RNAi را برای سرکوب بیان آن انجام داده باشید. برای به دست آوردن تجربه بیشتر در کشت سلولی پستانداران و آشنایی با یک فناوری مدرن، در مرحله بعدی ویرایش ژن *egfp* را از طریق سیستم CRISPR-Cas9 یا به اختصار CRISPR انجام خواهید داد.

توالی‌های CRISPR برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ در آرکی‌ها و باکتری‌ها به‌عنوان قطعات DNA تکراری کوتاه با توالی‌های فاصله‌دهنده^۱ توصیف شدند که نقش آن‌ها نامشخص بود. در سال ۲۰۰۲، اصطلاح «CRISPR» ابداع و ژن‌های Cas (ژن‌های مرتبط با CRISPR) شناسایی شدند. بر طبق مطالعات، مشخص شد که توالی‌های فاصله‌دهنده با DNA باکتریوفاژ^۲ همولوگ است و در باکتری‌های از پیش آلوده شده، به‌عنوان یک توالی ژنتیکی خارجی باقی مانده است. پس از آن، پروتئین‌های Cas شناسایی شدند که آن‌ها از RNAهای CRISPR رونویسی شده برای شناسایی توالی‌های همولوگ، شکافت و نابودی مؤثر ژن‌های فاژ و پلازمیدهای انتقال‌یافته استفاده می‌کردند؛ مانند سیستم ایمنی قابل تطبیق انسان، CRISPR می‌تواند اطلاعات پاتوژن‌های مهاجم را حفظ کند و توالی‌های آن‌ها را پس از عفونت مجدد، به‌منظور تخریب، مورد هدف قرار دهد. این روش از نظر عملکرد مشابه مسیر RNAi است که به‌طور طبیعی در بسیاری از موجودات وجود دارد و به مبارزه با RNAهای خارجی کمک می‌کند.

با فاش شدن جزئیات بیشتر در مورد این پدیده، دانشمندان شروع به استفاده از CRISPR به‌عنوان نوع جدیدی از ابزار مهندسی ژنوم کردند. اگرچه فن‌آوری‌های ویرایش ژن از قبل وجود داشت، اما سهولت نسبی روش CRISPR قابل توجه است. با بهره‌گیری از قدرت CRISPR، یک محقق اکنون می‌تواند یک ژن معین را هدف قرار دهد، شکستگی‌های دو رشته‌ای (DSBs)^۳ در آن

1. Short, repetitive, DNA, fragments, with, spacer, sequences

2. Bacteriophage

3. Double-strand, breaks, (DSBs)

DNA ایجاد و یا آن را حذف کند، آن را اصلاح و یا یک ژن دیگر را در آن مکان معرفی کند. با هدف قرار دادن DNA، (نه RNA)، ویرایش‌ها را می‌توان به توارث رساند. هر ساله کاربردهای بیشتری از این فناوری کشف می‌شود. پیش از اینکه در مورد نحوه استفاده از CRISPR برای حذف *egfp* بحث کنیم، ابتدا سازوکار آن را شرح خواهیم داد.

دو مؤلفه اصلی در سیستم CRISPR وجود دارد: Cas9، یک اندونوکلاز که DSB ها را در DNA هدف کاتالیز می‌کند و یک gRNA که با Cas9 یک ترکیب را تشکیل می‌دهد تا آن را به توالی خاصی از DNA هدایت کند. شمای کلی این فرآیند در شکل ۱-۲۳ نشان داده شده است. هنگامی که ترکیب Cas9:gRNA تشکیل شد، می‌تواند به‌طور تصادفی به ژنوم متصل و یا جدا شود. برای انجام این عمل، Cas9 یکراست یک موتیف مجاور فاصله‌انداز اولیه (PAM)^۱ را متصل می‌کند. این توالی ۳ نوکلئوتیدی، بین موجودات مختلف متفاوت است، اما به دلیل طول کوتاه آن، در سراسر ژنوم بسیار فراوان است. سپس، Cas9 بخشی از DNA ژنومی / هدف را به DNA تکرشته‌ای باز می‌کند. اگر مؤلفه gRNA با DNA هدف که اکنون باز شده، مکمل باشد، پیوندهای هیدروژنی تشکیل و بنابراین هیبرید gRNA: DNA تثبیت می‌شود. این امر باعث سبب تغییر ساختار Cas9 و فعال شدن فعالیت نوکلئازی آن خواهد شد. این امر منجر به برش هر دو رشته DNA و درست در فاصله اندکی با قسمت بالادست مکان PAM می‌شود. مکان PAM با رنگ بنفش در شکل ۱-۲۳ نشان داده شده است.

سلول‌ها، DSB ها را از طریق یکی از دو مکانیسم اصلی ترمیم می‌کنند: وصل شدن انتهای غیر همولوگ (NHEJ)^۲ یا ترمیم جهت‌دار همولوژی (ترمیم نو ترکیبی همولوگ)^۳. برای اهداف این جلسه آزمایشگاه از سازوکار NHEJ استفاده خواهیم کرد، زیرا در جلسات بعدی آزمایشگاه از CRISPR استفاده خواهد شد. NHEJ در شکل ۲-۲۳ نشان داده شده است. بر طبق شکل می‌توان دریافت که هنگام رخ داد یک DSB، یک هتروداایمر Ku^۴ به شکستگی متصل می‌شود و DNA پلیمرازها، نوکلئازها و لیگازهای دخیل در NHEJ را جذب می‌کند. این آنزیم‌ها سبب انجام واکنش‌هایی می‌شود که می‌توانند نوکلئوتیدها را به روشی وابسته به رشته الگو یا مستقل از آن، در محل شکستگی حذف و یا اضافه کنند. NHEJ انعطاف‌پذیری زیادی در سازوکارهای ترمیمی دارد، همچنین می‌تواند منجر به لیگاسیون مستقیم دو انتهای DNA و بدون افزودن یا حذف نوکلئوتیدها شود. به‌صورت متناوب، توالی‌های بسیار کوتاه همولوژی (میکروهمولوژی) می‌توانند بین نوکلئوتیدهای انتهای هر دو رشته منفرد، ایجاد شوند. (همولوژی توالی یک همولوژی زیستی بین

1. Protospacer. adjacent. motif. (PAM)

2. Non-homologous. end. joining. (NHEJ)

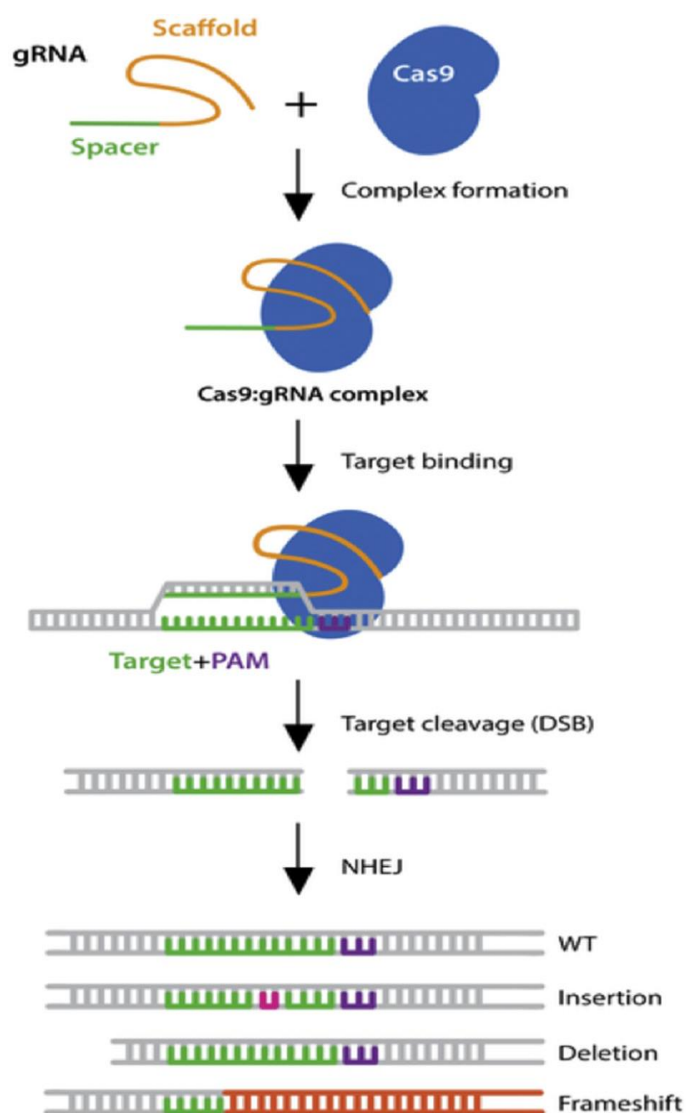
3. Homology. directed. repair. (homologous. recombination. repair)

4. Ku. heterodimer

توالی‌های DNA، RNA یا پروتئین است که بر اساس جد مشترک در چرخه زندگی تعریف می‌شود-م). این توالی‌های یا از قبل وجود داشته‌اند یا در نتیجه فعالیت‌های پلیمرازی هنگام ترمیم ایجاد می‌شوند. این میکروهمولوژی بیشتر وقت‌ها برای هدایت وصل شدن انتهای استفاده می‌شود. این فرآیند به‌طور طبیعی مستعد خطا است و منجر به درج یا حذف جفت بازهایی می‌شود که به «این‌دل‌ها»^۱ معروف هستند. این‌دل‌ها شواهدی مبنی بر وجود ویرایش ژنوم در توالی DNA مورد نظر هستند. وجود این‌دل‌ها در یک توالی ژنی می‌تواند چارچوب خوانش ژن را تغییر دهد، آن را غیرفعال و در نتیجه آن را سرکوب کند. با استفاده از CRISPR به‌عنوان یک ابزار مهندسی ژنوم، دانشمندان قادر به سرکوب، ناک‌این، ویرایش و فعال کردن ژن‌های منفرد در طیف گسترده‌ای از موجودات هستند. برخلاف RNAi که با جلوگیری از ترجمه، بیان یک ژن را کاهش یا خاموش می‌کند، CRISPR قادر است ژن را در ژنوم به‌طور کامل غیرفعال کند. علاوه بر این، این روش‌ها کمابیش ارزان و سریع هستند. اثرات خارج از هدف در آزمایش‌های RNAi به‌خوبی مطالعه شده است و هیچ راهی برای حذف کامل آن‌ها وجود ندارد؛ بنابراین، زمانی که CRISPR به‌طور گسترده مورد استفاده قرار گرفت، دانشمندان به شدت علاقه‌مند بودند تا مشخص کنند که آیا همانند روش RNAi اهداف غیر اختصاصی دارد یا خیر.

CRISPR به‌احتمال زیاد نه‌تنها در تحقیقات زیست‌شناسی مولکولی، بلکه در مطالعات زیست‌فناوری، ژن‌درمانی و سایر کاربردهای بالینی نیز نقشی تحولی خواهد داشت. سؤالات اخلاقی متعددی در مورد آینده CRISPR و اینکه به‌طور دقیق چگونه ژنوم انسانی را می‌توان با استفاده از آن ویرایش کرد، وجود دارد. این موارد مهم، شایسته توجه دانشمندان در سراسر جهان است. برای کسب اطلاعات بیشتر در مورد سازوکار-کاربردهای CRISPR-Cas9، به وبگاه زیر مراجعه کنید:

[https://www.hhmi.org/biointeractive/crispr-cas-9-mechanism application](https://www.hhmi.org/biointeractive/crispr-cas-9-mechanism-application)



شکل ۲۳-۱: شما کلی سرکوب بیان ژن با استفاده از CRISPR-Cas9. PAM: موتیف مجاور فاصله‌انداز اولیه، DSB: شکستگی‌های دو رشته‌ای، NHEJ: وصل شدن انتهای غیر همولوگ، WT: نوع وحشی. با کسب اجازه از Addgene.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

مربی شما سلول‌های HEK293 را در اختیار شما قرار داده که به‌طور پایدار EGFP را بیان می‌کنند. بهتر است که هنگام کار با این سلول‌ها از روش ضد عفونی استفاده کنید (برای بررسی، به کلاس آزمایشگاه: جلسه هجدهم، کشت سلول‌های پستانداران مراجعه کنید).

۱- همان‌طور که در کلاس آزمایشگاه: جلسه ۱۸ آزمایشگاه انجام شد، پیش از آغاز کار با سلول‌ها، هود لامینار را روشن، تمیز و آماده کنید. تمام مواد مصرفی مورد نیاز خود را برای این مراحل از پیش آماده کنید: سرسمپلر استریل، پایپت پاستور استریل، پایپت سرولوژی استریل و یک پلیت استریل ۴۸ چاهکی. سمپلر و پیتورها باید در زیر هود لامینار باقی بمانند.

۲- یک پتری‌دیش یا فلاسک سلولی را از مربی خود دریافت کنید. تلاقی و ریخت‌شناسی آن‌ها را مشاهده و جزئیات را در جدولی مانند جدول ۱۹-۳ در دفترچه یادداشت آزمایشگاه خود ثبت کنید. در صورت مشاهده هرگونه علائم آلودگی، بلافاصله به مربی خود اطلاع دهید. همچنین به رنگ محیط رشد کامل کشت سلولی خود توجه کنید.

۳- با استفاده از پایپت پاستور استریل، محیط را از پتری‌دیش خارج کنید. این کار را با چرخاندن آرام ظرف به سمت خود انجام دهید و درحالی‌که درب یا درپوش آن را باز کرده‌اید، نوک پایپت پاستور را در ته ظرف قرار دهید و تا زمانی که تمام محیط آسپیره شود، پایپت کردن را ادامه دهید. محل آسپیره کردن را به خاطر بسپارید. شما همیشه باید از این نقطه محیط را آسپیره کنید تا از کشیدن سلول‌ها به داخل جلوگیری کنید.

۴- به آرامی در حدود ۲mL از $1 \times \text{PBS}$ را به پتری‌دیش خود اضافه کنید و آن را با دقت بچرخانید. هنگام اضافه یا افزودن مایع به سلول‌های خود، به حتم این عمل را از یک مکان انجام دهید تا از جابجایی سلول‌ها جلوگیری کنید.

۵- $1 \times \text{PBS}$ را از پتری‌دیش آسپیره (خارج) کنید.

۶- مقدار ۲/۵mL از محلول Trypsin-EDTA ۰/۲۵ درصد از پیش گرم شده را به ظرف اضافه کنید و به‌منظور اطمینان از پوشش دادن کامل کف ظرف، آن را بچرخانید. پتری‌دیش را دوباره در انکوباتور قرار دهید و تایمر خود را برای ۲-۳ دقیقه تنظیم کنید.

۷- سلول‌های خود را زیر میکروسکوپ مشاهده کنید. سلول‌های جدا شده در محیط شناور می‌شوند و گرد به نظر می‌رسند. ممکن است بخواهید به آرامی اما محکم روی یک سطح استریل ضربه بزنید تا به جدا شدن بیشتر سلول‌های خود کمک کنید. اگر هنوز ۵۰ درصد (بیشتر) از سلول‌های شما به ظرف چسبیده‌اند، آن را به مدت ۲ دقیقه دیگر در انکوباتور 37°C قرار دهید.

۸- پس از جدا شدن سلول‌ها، ۵mL از محیط رشد کامل (DMEM با FBS ۱۰ درصد) از پیش گرم شده، بدون وجود هیچ‌گونه آنتی‌بیوتیک را اضافه کنید تا تریپسین غیرفعال شود. محیط را چندین بار به آرامی روی سطح لایه سلولی پایت کنید تا از جدا شدن آن مطمئن شوید. پایت کردن شدید می‌تواند باعث ایجاد آسیب سلولی شود، بنابراین مراقب باشید.

۹- به آرامی ظرف را بچرخانید تا مطمئن شوید که سلول‌ها به‌طور یکنواخت توزیع شده‌اند. اکنون آماده شمارش سلول‌های خود با استفاده از هماسیتومتر هستید.

نکته برای صرفه‌جویی در زمان: می‌توان از یک شمارشگر سلولی خودکار مانند Cellometer از شرکت Nexcelom استفاده کرد.

۱۰- محفظه و لامل را با الکل ۷۰ درصد تمیز کنید. روکش را خشک کنید و در جای خود قرار دهید.

۱۱- سلول‌ها را به بالا و پایین پایت کنید تا مخلوط شوند. با استفاده از سرسمپلر استریل، ۲۰ μ L از سوسپانسیون سلولی را با دقت خارج کنید. این ۲۰ μ L را به هر محفظه هماسیتومتر اضافه کنید. این عمل را با آهسته پایت کردن سوسپانسیون سلولی بین لامل و هماسیتومتر انجام دهید. عمل موینگی محلول را در یک لایه یکنواخت بین دو سطح پخش می‌کند. محفظه را بیش از حد پر نکنید.

۱۲- محفظه را در میکروسکوپ زیر یک شیئی $\times 10$ و با استفاده از کنتراست فاز و فوکوس مسیر/ ریز قرار دهید تا سلول‌ها و خطوط شبکه هماسیتومتر را تشخیص دهید.

۱۳- با استفاده از شمارنده دستی، سلول‌های موجود در یک مجموعه ۱۶ مربعی را بشمارید (شکل ۱۸-۳). هنگام شمارش، سلول‌هایی را که در مرزهای وسط، بالا و سمت راست قرار می‌گیرند، در بگنجانید.

۱۴- هماسیتومتر را به مجموعه بعدی ۱۶ مربعی منتقل کنید و تا برآورد تعداد سلول‌های هر چهار مجموعه ۱۶ مربعی، شمارش را ادامه دهید. به حتم تعداد سلول‌های ثبت شده از هر مربع را در دفترچه آزمایشگاه خود ثبت کنید.

۱۵- میانگین تعداد سلول‌ها را از هر یک از مجموعه‌های ۱۶ مربعی برآورد و در ۱۰۰۰۰ ضرب کنید (۱۰۴). عدد نهایی کل مقدار سلول به ازای هر میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی شما است.

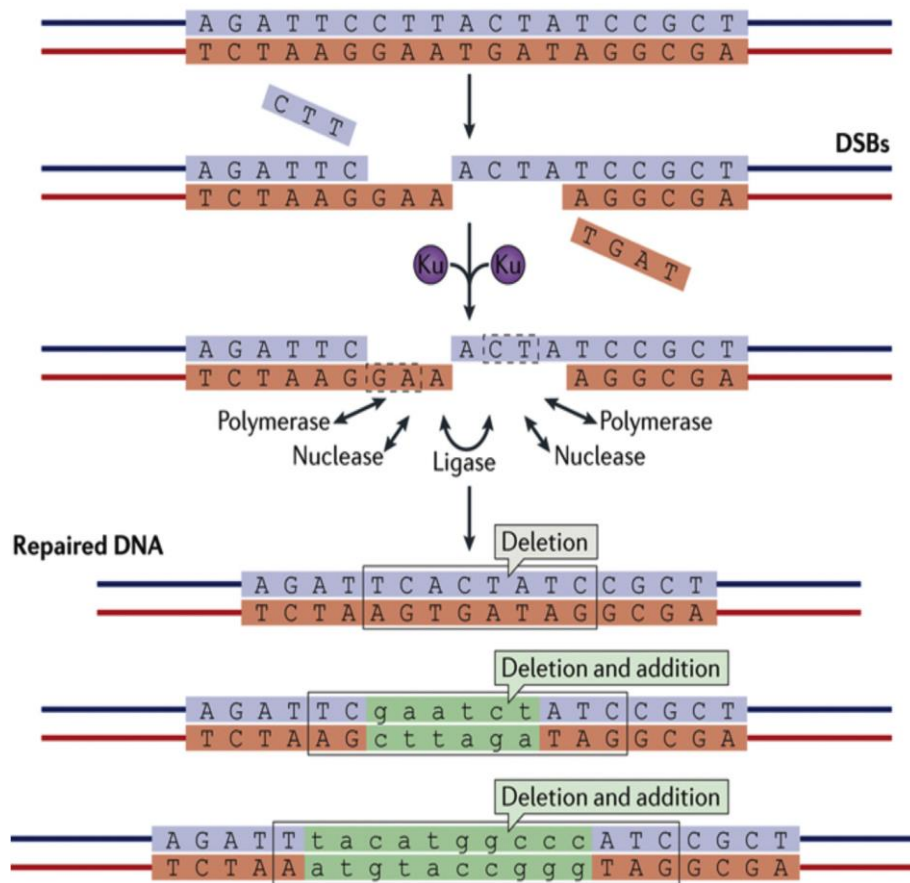
۱۶- حجم سلول‌های مورد نیاز برای کاشت تراکم 4×10^5 سلول در یک چاهک از یک پلیت ۴۸ چاهکی را با استفاده از فرمول $C_1 V_1 = C_2 V_2$ محاسبه کنید:

C_1 : غلظت سلول‌های شمارش شده (cells/mL):

V_1 : حجم سوسپانسیون سلولی (mL) مورد نیاز (مجهول):

C_2 : غلظت مطلوب سلول‌ها: $1/6 \times 10^5$ cells/mL

V_2 : حجم کل مورد نظر: ۱/۵ mL



شکل ۲۳-۲: شمای کلی NHEJ. NHEJ: وصل شدن انتهای غیر همولوگ. با کسب اجازه از Springer Nature.

حجم مناسب محلول برای هر چاهک از پلیت ۴۸ چاهکی برابر است با ۲/۵mL یا ۲۰۰ μL. برای افزودن 4×10^4 سلول به حجم ۲/۵mL، غلظت سوسپانسیون مورد نیاز $1/6 \times 10^5$ cells/mL خواهد بود.

۱۷- حجم مناسب سوسپانسیون سلولی را به یک ویال میکروسانتریفیوژ استریل اضافه کنید. حجم کل را با استفاده از محیط کامل (DMEM) و بدون لحاظ آنتی‌بیوتیک، به $1/5\text{mL}$ برسانید. محلول را با دقت به بالا و پایین پاپیت کنید (از تشکیل حباب اجتناب کنید) و بلافاصله $0/25\text{mL}$ سوسپانسیون سلولی را به سه چاهک از یک پلیت ۴۸ چاهکی اضافه کنید. ممکن است از شما خواسته شود که این پلیت را با سایر گروه‌های دانشجویی به اشتراک بگذارید.

۱۸- در ادامه، $0/125\text{mL}$ ($125\text{ }\mu\text{L}$) از سوسپانسیون سلولی را به سه چاهک دیگر منتقل کنید.

۱۹- مقدار $125\text{ }\mu\text{L}$ از محیط کامل (DMEM) فاقد آنتی‌بیوتیک‌ها را به چاهک‌های مرحله ۱۸ و به‌منظور رساندن حجم کل به $250\text{ }\mu\text{L}$ به ازای هر چاهک، اضافه کنید. شما اکنون دارای سه چاهک با 4×10^4 سلول و سه چاهک با نصف مقدار ذکر شده از سلول‌ها (2×10^4) خواهید بود.

۲۰- اطلاعات مورد نیاز، همچنین تاریخ را روی درب پلیت خود درج کنید. پلیت خود را به انکوباتور کشت سلولی برگردانید. مربی شما به شما می‌گوید که چگونه سلول‌های اضافی خود را معدوم کنید.

کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و سوم-ب

جلسه موقت آزمایشگاه

انتقال وکتورهای CRISPR

هدف: امروز وکتورهای بیانی پستانداران را به سلول‌های HEK293 بیان‌کننده EGFP که پیشتر پلیت کرده‌اید، منتقل خواهید کرد. این وکتورها مؤلفه‌های مورد نیاز برای CRISPR را وارد سلول‌ها می‌کنند.

۱- مقدمه

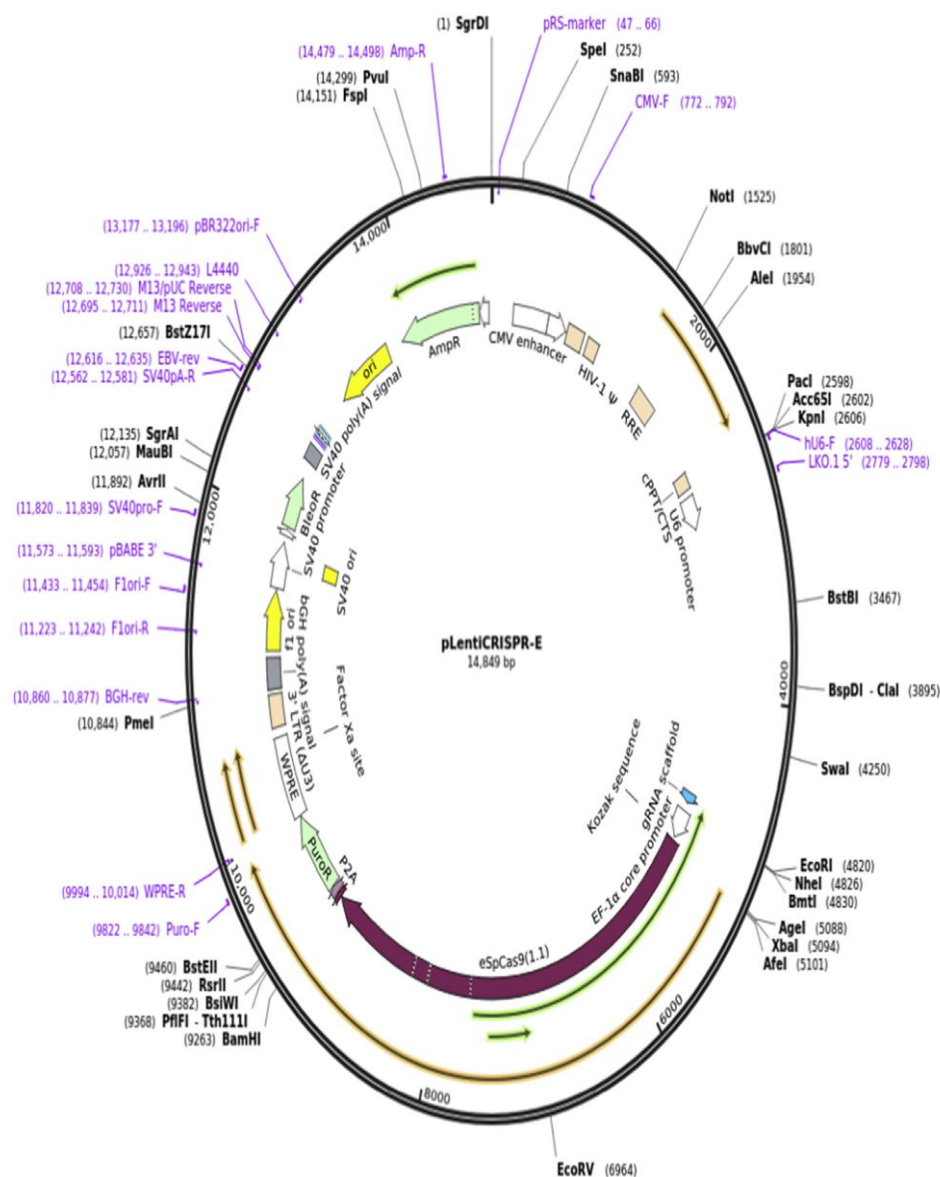
وکتورهای بیانی مورد استفاده در این آزمایش، Cas9 را رمز می‌کند و توسط یک پروموتور مربوط به پستانداران به نام EF-1 α کنترل می‌شود. این پروموتور، بیان ژن انسانی را که زیر واحد آلفای عامل افزایش طول-1^۱ را رمز کرده است، کنترل می‌کند. پروموتور EF-1 α به‌طور معمول در وکتورهای بیانی پستانداران استفاده می‌شود. در نقشه وکتور pLentiCRISPR-E (شکل ۲۳-۳)، می‌توان مشاهده کرد که Cas9 به‌صورت eSpCas9 نوشته شده است. «Sp» مخفف باکتری *Streptococcus pyogenes* است که توالی آنزیم از آن به دست آمده است؛ بنابراین، Cas9 تولید شده در سلول‌های انسانی، از یک باکتری منشأ می‌گیرد. حرف «e» در eSpCas9 مخفف «Enhanced» یا بهبود یافته است. این گونه از Cas9 به صورتی مهندسی شده‌اند که قابلیت اختصاصی عمل کردن آن برای DNA هدف، افزایش پیدا کرده باشد؛ بنابراین اثرات خارج از هدف را به حداقل می‌رساند. pLentiCRISPR-E به‌عنوان یک کنترل منفی عمل می‌کند، زیرا حاوی sgRNA نیست.

وکتور بیانی آزمایشی شما بر اساس pLentiCRISPR خواهد بود، اما شامل یک sgRNA تخصصی برای *egfp* نیز خواهد بود. آزمایشگاه ژانگ^۲ شش وکتور مختلف CRISPR که *egfp* را هدف قرار داده، تولید و در دسترس قرار داده است. شما یکی از آن‌ها را مورد بررسی قرار خواهید داد. در نقشه محدود شونده pLentiCRISPR-E، پروموتور دیگری به نام U6 را مشاهده خواهید کرد. این پروموتور انسانی بلافاصله در بالادست مکان sgRNA قرار گرفته است. بخش مربوطه از وکتورهای pLentiCRISPR در شکل ۲۳-۴ نشان داده شده است. توجه داشته باشید که در

1. Elongation. factor-1
2. Zhang. lab

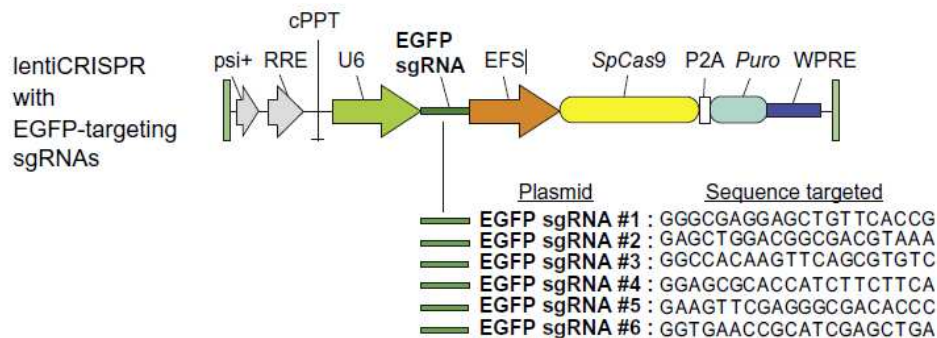
پایین‌دست *egfp* sgRNA، پروموتور EFS قرار دارد که بیان Cas9 را کنترل می‌کند. EFS نسخه کوتاه‌تر پروموتور EF-1 α است که پیشتر در این مقدمه توضیح داده شد.

Created with SnapGene®



شکل ۲۳-۳: نقشه وکتور pLentiCRISPR-E با کسب اجازه از Dr. Philip Abbosh

بنابراین، این وکتورهای هدف‌گیری *egfp*، هم Cas9 و هم یک sgRNA را کد می‌کنند که برای عملکرد CRISPR در رده سلولی انسانی بیان‌کننده EGFP ضروری است. همان‌طور که قابل مشاهده است، تمامی این بردارها کلمه «lenti» را در خود دارند. آن‌ها علاوه بر اینکه وکتور بیانی پستانداران هستند، می‌توانند برای تولید لنتی ویروسی‌ها^۱ نیز استفاده شوند. این ویروس‌ها حاوی ذرات ویروسی هستند که مؤلفه‌های کد کننده CRISPR را در خود جای می‌دهند. در برخی از برنامه‌ها، استفاده از ویروس‌ها برای آلوده کردن سلول‌های هدف میزبان (معروف به انتقال^۲)، ابزار کارآمدتری برای معرفی اسیدهای نوکلئیک خارجی در رده‌های سلولی که فرآیند انتقال در آن‌ها به‌سختی صورت پذیرفته، است. برای اهداف این تمرین‌های آزمایشگاهی، شما لنتی ویروس را از وکتورها ایجاد نمی‌کنید، بلکه به‌طور موقت ناقل‌ها را با استفاده از یک لیپید کاتیونی منتقل می‌کنید.



شکل ۲۳-۴: sgRNA هدف گیرنده *egfp* sgRNA: RNA تک هدایتی (کنترلی). با کسب اجازه از Feng Dr. Zhang

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

توجه: هنگام انجام جلسه موقت آزمایشگاه امروز، شیوه‌نامه‌های ترفند ضد عفونی کردن را به دقت انجام دهید. به شکل ۱۹-۳ مراجعه کنید تا با چارچوب کلی روش انتقال آشنا شوید. روش‌های زیر، با کسب مجوز به‌منظور اصلاح شیوه‌نامه معرف انتقال FuGENE HD Promega ارائه شده است:

- ۱- معرف FuGENE HD را از یخچال ۴°C خارج کنید و اجازه دهید به دمای اتاق برسد. پیش از استفاده، ویال معرف را به آرامی با وارونگی مخلوط کنید.

-
1. Lentivirus
 2. Transduction

- ۲- هود لامینار را همان‌گونه که در جلسه ۱۸ هجدهم توضیح داده شد، آماده کنید.
- ۳- پلیت ۴۸ چاهکی حاوی سلول‌های HEK293 بیان‌کننده EGFP از جلسه بیست و سوم-الف را آماده کنید.
- ۴- با استفاده از میکروسکوپ و عدسی شیئی ۱۰×، ریخت‌شناسی و تلاقی سلول‌های خود را در زیر نور سفید مشاهده و ثبت کنید. شما سلول‌ها را با دو تراکم مختلف پلیت کردید. شما باید تراکمی را انتخاب کنید که میزان تلاقی‌های آن‌ها در محدوده ۸۰-۶۰ درصد قرار دارد، زیرا فقط آن سه چاهک را منتقل خواهید کرد. باید تعداد کمی سلول شناور در محیط وجود داشته باشد. اگر متوجه هرگونه علائم آلودگی یا اگر عدم وجود سلول‌ها در محدوده تلاقی ۸۰-۶۰ درصدی شدید، به مربی خود اطلاع دهید. پلیت خود را به انکوباتور کشت سلولی بازگردانید.
- ۵- در زیر هود لامینار، سه ویال میکروسانتریفیوژ استریل را به‌صورت زیر برچسب بزنید: فقط Opti-MEM، خالی و *egfp*.
- ۶- در دفترچه یادداشت آزمایشگاه خود، جدولی را مطابق شکل (جدول ۲۳-۱) رسم کنید تا بتوانید مقدار پلازمید مورد نیاز برای هر تیمار را برای رسیدن به $0.85 \mu\text{g}$ و مقدار Opti-MEM را برای رساندن حجم نهایی به $36 \mu\text{L}$ ثبت کنید.
- نکته برای صرفه‌جویی در هزینه: می‌توان از محیط‌های بدون سرم به‌جای Opti-MEM استفاده کرد.
- ۷- مقدار $0.85 \mu\text{g}$ از DNA پلازمید متناظر به ویال را اضافه کنید.
- ۸- حجم محاسبه‌شده Opti-MEM را به ویال متناظر اضافه کنید.
- ۹- شما از نسبت ۵:۱ FuGENE HD:DNA استفاده خواهید کرد. با دقت میزان $4/2 \mu\text{L}$ از معرف FuGENE HD را یکرست به مایع موجود در ویال با برچسب خالی اضافه کنید. اجازه ندهید که معرف FuGENE HD یکرست با دیواره‌های پلاستیکی ویال تماس پیدا کند، زیرا این عمل بازدهی انتقال را به‌شدت کاهش می‌دهد. با استفاده از سرسمپلر جدید، همان حجم FuGENE HD را به ویال با برچسب *egfp* اضافه کنید.
- ۱۰- محلول را به‌خوبی به بالا و پایین پیپت کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در لامینار قرار دهید.
- ۱۱- پلیت ۴۸ چاهکی گروه خود را از انکوباتور خارج کنید. با استفاده از عناوین ذکر شده در جدول ۱-۲۳، هر چاهک را با توجه با محتوی آن برچسب بزنید.
- ۱۲- کل حجم ترکیب‌های انتقال را به‌صورت قطره‌ای به چاهک مربوطه در پلیت ۴۸ چاهکی اضافه کنید. برای اطمینان از اختلاط کامل ترکیب FuGENE HD:DNA در سرتاسر

محیط، پلیت را به آرامی به جلو و عقب تکان دهید و سپس آن را به انکوباتور 37°C بازگردانید.

جدول ۲۳-۱: تنظیم آزمایشی برای سرکوب بیان *egfp* در سلول‌های HEK293 با واسطه CRISPR

ویال	وکتور	غلظت ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	حجم افزایشی به پلازمید (μL)	Opti- MEM (μL)	FuGene HD (μL)
تنها Opti- MEM (کنترل منفی)	بدون وکتور	.	.	۳۶	.
خالی (کنترل منفی)	pLentiCRISPR-E			بیش از ۳۶ μL	۴/۲
<i>egfp</i> (آزمایشی)	pLentiCRISPR EGFP-2			بیش از ۳۶ μL	۴/۲

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- در صورت استفاده از یک رده سلولی پستانداران با قابلیت بیش از حد بیان پروتئین فلورسنت سبز (GFP) و انتقال یک وکتور بیانی که GFP بهبود یافته را مورد هدف قرار می‌دهد، آزمایش سرکوب ژن چگونه تحت تأثیر قرار خواهد گرفت؟
- ۲- پس از انتقال، تعدادی از فرآیندهای بیوشیمیایی باید قبل از شکستن DNA هدف رخ دهد. وقایع و ترتیب وقوع آن‌ها را شرح دهید.

کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و سوم-پ

جلسه موقت آزمایشگاه

توسعه سلول‌های منتقل شده

هدف: شما یا مربی سلول‌های منتقل شده را توسعه می‌دهید و در چند روز آینده محیطی را برای رشد آن‌ها ایجاد می‌کنید.

۱- مقدمه

در این مرحله (۲-۳ روز پس از انتقال)، سلول‌هایی که با آن‌ها کار می‌کنید به شدت با هم تلاقی دهید (۹۰ درصد) و باید به یک پلیت شش چاهکی منتقل (پاساژ) شوند. این امر باعث می‌شود تا درحالی‌که سلول‌ها مؤلفه‌های CRISPR-Cas9 را بیان می‌کنند، فضایی را برای رشد داشته باشند.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

۱- هود لامینار را آماده کنید.

۲- پلیت ۴۸ چاهکی حاوی سلول‌های ترانسفکت شده خود را از انکوباتور خارج کنید. تلاقی و ریخت‌شناسی آن‌ها را مشاهده و جزئیات را در دفترچه آزمایشگاه خود یادداشت کنید. در صورت مشاهده هرگونه علائم آلودگی، بلافاصله به مربی خود اطلاع دهید. همچنین به رنگ محیط کشت سلولی خود توجه کنید.

۳- با استفاده از پایپت پاستور استریل، محیط را از پتری‌دیش خارج (آسپیره) کنید. این عمل را به آرامی انجام دهید. ظرف را به سمت خود بچرخانید و نوک پایپت پاستور را در ته ظرف قرار دهید تا زمانی که تمام محیط آسپیره شود. محل لمس ظرف را به خاطر بسپارید. فرآیند آسپیره کردن تنها باید از این نقطه صورت بپذیرد تا مانع کشیده شدن سلول‌ها از پتری‌دیش شود.

۴- به آرامی $100\ \mu\text{L}$ از $1\times\text{PBS}$ استریل را به هر چاهک اضافه کنید و ظرف را با دقت بچرخانید.

۵- $1\times\text{PBS}$ را از هر چاهک خارج (آسپیره) کنید.

۶- مقدار $100\ \mu\text{L}$ از محلول ۰/۲۵ درصد تریپسین-EDTA را روی هر چاهک پایپت کنید و برای اطمینان از پوشش کافی محلول در کف، پلیت را بچرخانید. پتری‌دیش را دوباره در انکوباتور قرار دهید و به مدت ۲-۳ دقیقه صبر کنید.

۷- سلول‌های خود را زیر میکروسکوپ مشاهده کنید. سلول‌های جدا شده در محیط شناور شده و گرد به نظر می‌رسند. ممکن است بخواهید به آرامی اما محکم روی یک سطح استریل ضربه بزنید تا به جدا شدن بیشتر سلول‌های خود کمک کنید. اگر هنوز ۵۰ درصد (بیشتر) از سلول‌های شما به ظرف چسبیده‌اند، آن را به مدت ۲ دقیقه دیگر در انکوباتور 37°C قرار دهید.

۸- هنگامی که سلول‌ها جدا شده‌اند، $100\ \mu\text{L}$ از محیط کامل تازه گرم شده حاوی G418 را به هر چاهک اضافه و برای ایجاد یک سوسپانسیون سلولی، محلول را به بالا و پایین پایت کنید. توجه داشته باشید که G418 برای انتخاب pEGFP در سلول‌ها گنجانده شده است.

۹- نیمی از این حجم ($100\ \mu\text{L}$) را به یک چاهک از پلیت شش چاهکی حاوی علامت منتقل کنید. برای انتقال هر نمونه، به حتم سر سمپلرها را تعویض کنید.

۱۰- مقدار $2\ \text{mL}$ از محیط کامل از پیش گرم شده حاوی G418 را به هر چاهک اضافه کنید.

۱۱- درب را روی پلیت ۶ چاهی قرار دهید، آن را به آرامی تکان و در انکوباتور کشت سلولی قرار دهید. تا زمان مشاهده فلورسانس در حدود یک هفته پس از انتقال، سلول‌ها در انکوباتور باقی خواهند ماند.

منابع

1. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 1987;169(12):5429_33.
2. Jansen R, Van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 2002;43:1565_75.
3. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007;315(5819):1709_12.
4. Jinek M, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012;337:816_21.
5. Deltcheva E, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 2011;471:602_7.
6. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct* 2006;1:7.
7. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 2005;151:2551_61.
8. Garneau JE, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 2010;468:67_71.
9. Chang, et al. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017;18:495_506.
10. Kosicki M, Tomberg K, Bradley A. Repair of CRISPR-Cas9-induced double-stranded breaks leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol* 2018;36:765_71. (7/16/18 online).
11. Veres A, et al. Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell* 2014;15.1:27_30.
12. Fu Y, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 2013;31.9:822_6.
13. Slaymaker I, et al. *Science* 2016;351(6268):84_8. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.aad5227>.
14. Shalem O, et al. *Science* 2014;343(6166):84_7. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1247005>.

کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و چهارم سرکوب بیان EGFP به واسطه CRISPR-بخش دوم

هدف: کمی‌سازی و بررسی بازدهی حذف پروتئین EGFP با واسطه CRISPR در سلول‌های HEK293 با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس و NIH Image J.

۱- مقدمه

برای کسب اطلاعات در مورد میکروسکوپ فلورسانس، به کلاس آزمایشگاه جلسه نوزدهم-ب مراجعه کنید. در آن تمرین، یک وکتور بیانی پستانداران (pEGFP-N1) منتقل شد که منجر به رونویسی و ترجمه EGFP گردید. شما سلول‌ها را با میکروسکوپ فلورسانس بررسی کردید تا به دنبال شواهدی مبنی بر بیان بیش از حد EGFP باشید. در تمرین‌های RNAi، شما با سلول‌های پستانداران که EGFP را بیش از حد بیان کرده بود، تلاش‌هایی را مبنی بر سرکوب بیان آن‌ها انجام دادید. اکنون، یک وکتور بیانی پستانداران دیگر را معرفی کنید که باید مسیر CRISPR-Cas9 را برای حذف EGFP هدایت کند.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

نزدیک به یک هفته پس از انجام انتقال سلول‌ها با استفاده از وکتورهای CRISPR (جلسه ۲۳-ب)، تصاویر زمینه روشن و فلورسانس را همان‌گونه که در جلسه نوزدهم شرح داده شد، تهیه و ذخیره کنید. فایل‌های خود را با فرمت‌های JPG یا TIFF ذخیره کنید. مشاهدات کیفی را مطابق جدول ۱-۲۴ در دفترچه یادداشت آزمایشگاه خود ثبت کنید.

۱- نرم‌افزار NIH Image J را در رایانه شخصی خود دریافت و باز کنید. این نرم‌افزار به‌صورت رایگان برای انواعی از سیستم‌عامل‌ها و از مؤسسه ملی بهداشت^۱ در اختیار کاربران قرار گرفته است.

۲- از منوی فایل، «Open» را انتخاب کنید و اولین تصویر فلورسانس مورد نظر برای تجزیه و تحلیل را انتخاب کنید. بهتر است با سلول‌های HEK293 بیان‌کننده EGFP که با هیچ siRNA منتقل نشده‌اند (برای نمونه فقط تحت تیمار با Opti-MEM قرار گرفته‌اند) شروع کنید. می‌توان پیش‌بینی کرد که این سلول‌ها بالاترین سطوح فلورسانس را به واسطه داشتن EGFP، داشته باشند.

1. <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>

۳- از منوی تجزیه و تحلیل، «Set measurement» را انتخاب کنید. از این بخش به حتم موارد زیر را تعیین کنید: مساحت، تراکم یکپارچه^۱ و متوسط مقدار خاکستری^۲، سپس «OK» را انتخاب کنید (شکل ۱-۲۲).

۴- از نوار ابزار Image J در بالا، «ابزار Freehand» را انتخاب کنید (شکل ۱-۲۲). با استفاده از این ابزار و ماوس، دور یک سلول سالم معین را در تصویر فلورسانس خود به دقت خط بکشید (شکل ۲-۲۲). توجه: باز کردن زمینه میدان روشن برای شناسایی سلول‌هایی با بیان اندک پروتئین EGFP مفید است، اما همچنان باید برای تجزیه و تحلیل، از تصویر فلورسانس استفاده کنید.

۵- هنگامی که اولین سلول خود را مشخص کردید، گزینه «Measure» (Ctrl-M)؛ کامپیوترهای PC یا Command-M؛ کامپیوترهای Mac) را در منوی تجزیه و تحلیل انتخاب کنید (شکل ۲-۲۲).

۶- یک پنجره جدید ظاهر خواهد شد که تمام نتایج حاصل از اندازه‌گیری را برای سلول مورد نظر، فهرست می‌کند (شکل ۲-۲۲).

۷- یک ناحیه غیر سلولی و کوچک (اندازه دقیق مهم نیست) موجود در کنار سلول مورد نظر خود را که فلورسانس ندارد انتخاب کنید. اندازه‌گیری را با انتخاب «Measure» در منوی تجزیه و تحلیل ثبت کنید. این امر به عنوان خوانش فلورسانس در پس‌زمینه عمل می‌کند.

جدول ۲-۲۴: مشاهدات تجربی سرکوب پروتئین EGFP به واسطه CRISPR

ریخت‌شناسی	تلاقی	شدت فلورسانس	آزمایش
			بدون Opti-MEM (کنترل منفی)
			pLentiCRISPR-E (کنترل منفی)
			pLentiCRISPR-EGFP (آزمایشی)

۸- مراحل ۴-۷ را برای تمام سلول‌های خود در آزمایش کنترل تکرار کنید. از هر تیمار، دست‌کم ۱۰ سلول را بشمارید. اگر حداقل ۱۰ سلول ندارید، ممکن است به تصاویر اضافی از میدان‌های دید دیگر برای تجزیه و تحلیل نمونه خود نیاز داشته باشید.

1. Integrated. density
2. Mean. gray. value

۹- هنگامی که تمام سلول‌های خود را اندازه‌گیری کردید، داده‌های به دست آمده را در پنجره نتایج انتخاب و در صفحه گسترده مایکروسافت اکسل کپی و جایگذاری کنید (شکل ۲۲-۳).

۱۰- مقدار کل فلورسانس تصحیح شده سلول (CTCF)^۱ را برای هر سلول با استفاده از معادله محاسبه کنید:

(میانگین فلورسانس پس‌زمینه × منطقه سلول‌های انتخابی) - تراکم یکپارچه = CTCF
از تراکم یکپارچه برای نشان دادن منطقه مورد نظر (ROI)^۲ × میانگین ROI استفاده می‌شود. اگر فقط میانگین شدت فلورسانس را در نظر بگیرید، میانگین فلورسانس بدون در نظر گرفتن اندازه سلول، محاسبه می‌شود؛ بنابراین، اگر شما یک سلول بزرگ را با یک سلول کوچک مقایسه می‌کنید، مقدار فلورسانس بالاتری را در سلول کوچک در مقایسه با سلول بزرگ به دست خواهید آورد؛ با این حال، هر چه اندازه سلول‌ها بزرگ‌تر باشد، چه‌بسا سطح بیان بیشتری از EGFP وجود خواهد داشت. ما از تراکم یکپارچه استفاده خواهیم کرد؛ بنابراین لازم نیست نگران مسائل مربوط به اندازه بین نمونه‌های مختلف باشیم، زیرا از قبل به آن توجه شده است.

۱۱- مقدار متوسط را در یک سلول جدید در مایکروسافت اکسل تعیین کنید. برای انجام این کار، در نوار فرمول «=AVERAGE» را تایپ کنید (همه سلول‌های حاوی CTCF را انتخاب کنید).

۱۲- با ایجاد یک ستون جدید، انحراف معیار CTCF را با تایپ کردن «=STDEV.P» در باند فرمول (انتخاب تمام سلول‌های حاوی مقادیر CTCF) محاسبه کنید.

۱۳- مراحل ۱۳-۲ را در هر گروه آزمایشی، برای دست‌کم ده سلول در هر تیمار تکرار کنید: pLentiCRISPR-E (کنترل منفی)، pLentiCRISPR-EGFP (آزمایشی).

۱۴- پس از پایان کار، یک نمودار میله‌ای ایجاد کنید و میانگین فلورسانس CTCF (در واحدهای دلخواه) را در محور y و تیمار سلولی (بدون siRNA eGFP، siRNA و غیره) در محور x قرار دهید و سپس تیمارها و کنترل‌ها را با هم مقایسه کنید. در شکل ۲۲-۳، مثالی از مقادیر CTCF در یک سلول منفرد نشان داده شده است.

۱۵- نمودار خود را داشتن عنوان مناسب، مشخص نمودن محورهای x و y، انحراف معیار و سایر موارد مورد نیاز، ذخیره کنید.

1. Corrected, total, cell, fluorescence. (CTCF)

2. Region. of. interest. (ROI)

منبع

1. Shalem, et al. Science 2014;343(6166):84_7. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1247005>.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- شما جمعیتی از سلول‌ها با کاهش فلورسانس ناشی از EGFP را مشاهده کردید. بر اساس آنچه در مورد بازدهی انتقال می‌دانید، چرا انتظار از دست دادن کامل فلورسانس را ندارید؟
- ۲- این آزمایش CRISPR چه تفاوتی با تلاش برای سرکوب ژن انسانی مورد علاقه شما دارد؟

کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و پنجم

CRISPR پیشرفته: بخش اول

آزمایش‌های قبلی ما با هدف حذف *egfp* در رده سلولی انسان انجام شد. آزمایش‌های زیر تحت عنوان «CRISPR پیشرفته» ارائه می‌شوند، زیرا به صورتی طراحی شده‌اند که با استفاده از آن‌ها بتوان، بیان ژن انسانی مورد نظر را سرکوب کرد. این فرآیند شامل طراحی آزمایش، کلون‌سازی اولیه متصل شده و غربالگری با استفاده از توالی‌یابی سانگر، پیش از ورود معرف‌ها به سلول‌ها خواهد بود. هدف از ارائه این بخش‌ها، افزایش درک شما نسبت به فناوری CRISPR و استفاده از آن است. شما همچنان از سلول‌های HEK293 که به‌طور پایدار EGFP را بیان می‌کنند، استفاده خواهید کرد. استفاده از این رده سلولی به نسبت سلول‌های سرطانی که دارای تعداد نسخه‌های نامعقولی از هر ژن را دارد، مطلوب‌تر است. اگرچه مقصود شما دیگر هدف قرار دادن *egfp* نیست. استفاده از این رده سلولی امکان گنجاندن یک کنترل برای مسیر CRISPR را فراهم می‌کند، زیرا sgRNA های معتبر در برابر *egfp* در دسترس هستند. این مورد را می‌توان با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس مشاهده کرد. علاوه بر این، هدف قرار دادن *egfp* به‌عنوان یک کنترل منفی عمل می‌کند، زیرا این سلول‌ها نباید در صورت هدف قرار دادن ژن مورد نظر شما، علائمی را از خود نشان دهند. اگر سلول‌های مورد نظر شما در خارج از متن این کتاب قرار دارند (برای مرور چارچوب کلی روش CRISPR به کلاس آزمایشگاه جلسه ۳۰ مراجعه کنید)، پیشنهاد می‌شود که ژن مورد نظر شما نباید تحت تأثیر بیان بیش از حد EGFP قرار داشته باشد.

هدف: امروز، شما sgRNA ها را برای هدف قرار دادن یک ژن معین طراحی خواهید کرد. درحالی‌که این معرف‌ها در حال سفارش و سنتز هستند، شما پلازمید CRISPR خود را برای کلون‌سازی آماده خواهید کرد.

۱- مقدمه

پیش از آغاز این بخش، به مقدمه بخش بیست و سوم، سرکوب بیان EGFP با واسطه CRISPR، مراجعه کنید.

الف. طراحی sgRNA^۱

یکی از هیجان‌انگیزترین ویژگی‌های فناوری CRISPR، امکان ویرایش کمابیش سریع و آسان ژن‌ها است. این امر امکان هدف‌گیری یک جایگاه ژنومی منفرد و یا حتی بخش‌های بزرگ‌تر ژنوم را در اختیار پژوهشگران قرار داده است. اگرچه اکنون امکان سرکوب، ناک‌این و ویرایش ژن‌ها در رده‌های سلولی و ارگانیسم‌های متعدد مهیا شده است، اما این امر نیاز به طراحی آزمایش دقیق دارد. در درجه اول، اگر ژن مورد علاقه شما برای بقا ضروری باشد، در صورت سرکوب موفقیت‌آمیز آن، سلول‌های شما از بین خواهند رفت. به‌طور مشابه، ناک‌این (الحاق) کردن به ژن‌های کشنده یا ایجاد جهش در ژنوم، می‌تواند منجر به مرگ سلولی شود. در نهایت، هدف شما دستیابی به اثر دلخواه و معین، بدون اعمال اثرات نامطلوب خارج از هدف است. به‌عنوان مثال، اگر می‌خواهید ژن معین خود را برای مطالعه عملکرد طبیعی آن حذف کنید، تنها به یک sgRNA برای هدف قرار دادن نیاز خواهد بود؛ با این حال، اگر توالی sgRNA به اندازه کافی شبیه دیگر توالی‌های ژنوم باشد، این امکان وجود دارد که همچنان Cas9 را به خدمت بگیرد. آنزیم می‌تواند پنج ناهم‌جوری^۲ (عدم تطابق) در موتیف فاصله‌انداز اولیه-۱ و حتی یک ناهم‌جوری را در توالی PAM تحمل کند. در این حالت، شکستگی‌ای دو رشته‌ای و ایندل‌ها در سایر ژن‌های غیر هدف ایجاد می‌شود. تنها روش جامع برای تشخیص اثرات خارج از هدف، انجام توالی‌یابی کل ژنوم است. از آنجایی که انجام این امر همیشه امکان‌پذیر نیست، به حداقل رساندن این اثرات از ابتدای فرآیند طراحی آزمایش بسیار مهم است. با توجه به نتایج حاصل شده از مطالعات می‌توان دریافت که اثرات خارج از هدف قابل توجهی می‌تواند در طول آزمایش‌های CRISPR ایجاد شود. با ادامه یافتن انتشار داده‌ها از مطالعات مربوطه، ما همچنان به دنبال یافتن محدوده اثرات خارج از هدف در نتیجه ویرایش ژن با واسطه CRISPR هستیم. این امر یک چالش مهم در مطالعات علوم پایه و کاربردی است. به‌عنوان مثال، در مطالعه تصحیح توالی ژن القاء‌کننده یک بیماری و در صورت ویرایش ناخواسته بخشی دیگر از ژنوم، پیامد بسیار نامطلوبی را با خود به همراه خواهد داشت. این امر مشابه چالش‌های اثرات خارج از هدف در RNAi است. به همین منظور، تاکنون تلاش زیادی برای طراحی الگوریتم‌ها و به‌منظور شناسایی sgRNA‌های معین برای یک توالی معین، انجام شده است.

به‌طور خلاصه، معیارهای اولیه برای طراحی sgRNA عبارت‌اند از:

۱- این توالی در مقایسه با سایر بخش‌های ژنوم منحصر به فرد است؛ بنابراین از اثرات خارج از

هدف جلوگیری خواهد شد.

۲- هدف بلافاصله در بالادست یک PAM قرار دارد.

1. sgRNA. design

2. Mismatches.

تعدادی ابزار تحت وب برای کمک به طراحی sgRNA در دسترس هستند. در این بخش، ما از DESKGEN Cloud استفاده خواهیم کرد، اگرچه سایر نرم‌افزارها نیز بر اساس الگوریتم‌های طراحی مشابه عمل می‌کنند. پیش از آغاز آزمایش CRISPR، باید تعیین شود که آیا از روش‌های سرکوب، ناک‌این یا ویرایش برای دست‌کاری ژن معین خود استفاده خواهید کرد یا خیر؟ DESKGEN از شما می‌خواهد که برنامه یا «حالت» خود را انتخاب کنید. جلسات آزمایشگاهی زیر فقط شما را برای انجام سرکوب بیان ژن راهنمایی می‌کند.

این ابزار آنلاین به شما این امکان را خواهد داد که ژن مورد نظر و sgRNA های خود را با یک مرورگر ژنوم داخلی مشاهده کنید، نوع Cas9 خود را انتخاب، جایگاه‌های PAM و توالی‌های sgRNA را مشاهده و آن‌ها را بر اساس امتیازات مربوط به فعالیت روی ژن هدف و خارج از هدف غربال کنید. یک مرور کلی از امتیازاتی که الگوریتم DESKGEN محاسبه می‌کند در زیر نشان داده شده است:

امتیاز فعالیت از ۰ تا ۱۰۰ متغیر است. این عدد امتیازی است که فعالیت هدف یک RNA راهنمای معین را با استفاده از spCas9 پیش‌بینی می‌کند. امتیاز فعالیت به‌عنوان تابعی از فعالیت RNA راهنمای روی ژن هدف افزایش می‌یابد. اگرچه هیچ تضمینی وجود ندارد که یک gRNA با حداقل امتیاز فعالیت به‌طور مؤثر عمل کند. پیشنهاد می‌شود که از حداقل امتیاز فعالیت ۶۰ استفاده کنید.

امتیاز خارج از هدف بین ۰ تا ۱۰۰ است. این عدد امتیازی است که فعالیت اختصاصی RNA راهنما را پیش‌بینی می‌کند. هرچه امتیاز خارج از هدف بالاتر باشد، بهتر است. بالا بودن این امتیاز به این معنی است که RNA راهنما با احتمال کمتری توالی‌های غیر اختصاصی را مورد هدف قرار می‌دهد. به‌طور کلی، RNA های راهنما برای هدف قرار دادن چند اگزون اولیه یک ژن طراحی شده‌اند (توالی‌های پروموتور نیز مناسب هستند). هدف از سرکوب ژن با واسطه CRISPR، ایجاد شکستگی‌های دو رشته‌ای، ایندل‌ها و در نهایت یک رونوشت غیر عملکردی (mRNA) است؛ بنابراین، پیشنهاد می‌شود که این عمل در بخش‌های اولیه توالی DNA رخ دهد. در نتیجه این امر رونوشت کوتاه‌تری تولید می‌شود که در سلول تجزیه خواهد شد. به دلایل متعددی پیشنهاد می‌شود که از ۲-۳ sgRNA به ازای هر ژن طراحی شود. در درجه اول، ساختار کروماتین می‌تواند بر توانایی هیبرید شدن sgRNA با یک ژن معین، تأثیر بگذارد؛ بنابراین، طراحی ۲-۳ sgRNA در مکان‌های مختلف در ژن، شانس دسترسی مؤثر حداقل یکی از آن‌ها به ژنوم را افزایش می‌دهد تا فرآیند سرکوب معین شما را القا کند. در درجه دوم، گاهی اوقات sgRNA هایی که با همه معیارهای طراحی مطابقت دارند، نمی‌توانند نتیجه دلخواه را ایجاد کنند. استفاده از sgRNA های اضافی برای همان ژن، احتمال موفقیت‌آمیز بودن فرآیند CRISPR را افزایش می‌دهد.

ب. کلون کردن اولیگو متصل شده

در جلسات ۵-۲ آزمایشگاه، شما کلون کردن را با PCR انجام دادید. یک روش دیگر که به‌طور معمول برای ایجاد DNA نو ترکیب استفاده می‌شود، کلون کردن اولیگو متصل شده^۱ نام دارد. اولیگوها (مولکول‌های کوتاه ssDNA که به‌عنوان آغازگر نیز شناخته می‌شوند) را می‌توان به‌صورت تجاری طراحی و سفارش داد. توجه داشته باشید که dsDNA هم در حالت ضد موازی و هم در حالت جفت بازهای مکمل قرار دارند؛ بنابراین، اگر مکمل معکوس یک اولیگوی منفرد نیز سفارش داده شود، می‌توان این دو اولیگو را به هم متصل و یک مولکول DNA دو رشته‌ای ایجاد کرد. این مولکول‌ها به‌عنوان DNA الحاقی در کلون کردن اولیگوی متصل شده عمل می‌کنند. اولیگوهای نوع ۱ و ۲ نشان داده شده در شکل ۲۵-۱ (به‌صورت پر رنگ نشان داده شده است)، نمونه‌هایی از اولیگوهای متصل شده را نشان می‌دهند که به‌صورت مکمل معکوس یکدیگر هستند. توجه داشته باشید که طبق قرارداد، تنها یک رشته DNA و در جهت ۵' ← ۳' نوشته می‌شود. هنگام طراحی sgRNA، نرم‌افزار تنها توالی یک رشته را در اختیار شما قرار می‌دهد. شما می‌توانید از آن توالی به‌عنوان «اولیگو ۱» استفاده کنید (۵'-CAGTCTGATCAGTTTTTCCTT-3' در شکل ۲۵-۱). سپس، شما می‌توانید بازهای مکمل ۵' ← ۳' را از جهت چپ به راست بنویسید (۵'-AAGGAAAAGTATCAGACTG-3' به‌عنوان «اولیگو ۲»).

Example oligo design: Note that the NGG PAM is not included in the designed oligos.

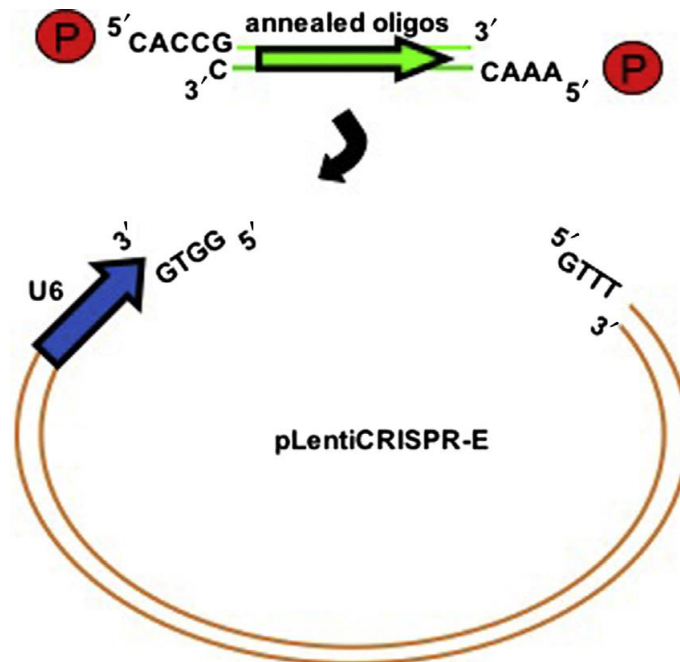
Target Sequence: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 NGG PAM
 Genomic 5' - ...GACCACAGTCTGATCAGTTTTTCCTTGGGCTGCAA...- 3'
 Sequence 3' - ...CTGGTGTCTAGTCAAAAAGGAAACCCGACGTT...- 5'
 Oligo 1 → 5' - CACCGCAGTCTGATCAGTTTTTCCTT - 3'
 3' - CGTCAGACTAGTCAAAAAGGAACAAA - 5' ← Oligo 2

شکل ۲۵-۱: مثالی از طراحی اولیگو برای رشته‌های کلون شده در pLentiCRISPR-E با کسب اجازه از Dr. Feng Zhang

توجه کنید که اولیگوهای موجود در شکل ۲۵-۱ همچنین دارای نوکلئوتیدهایی است که پر رنگ نیستند. این‌ها نوکلئوتیدهایی اضافی هستند که به‌عنوان اوورهنک‌ها عمل می‌کنند. این نوکلئوتیدها به sgRNA رونویسی نخواهند شد؛ بلکه آن‌ها اوورهنک‌هایی را ایجاد می‌کنند که به وکتور هضم شده با آنزیم محدود شما متصل می‌شوند. برای اولیگو ۱، هنگام سفارش یک اولیگو با یک اوورهنک مناسب که با اوورهنک وکتور CRISPR هضم شده با BsmBI پیوند هیدروژنی برقرار کند، "CACCG" را به انتهای ۵' اضافه خواهید کرد. برای اولیگو ۲، "AAAC" را به انتهای

1. Annealed, oligo. cloning

۵' و یک "C" را به انتهای ۳' اولیگو اضافه خواهید کرد. پس از دریافت اولیگوها، آن‌ها را از طریق ایجاد پیوند هیدوژنی به هم متصل خواهید کرد. این dsDNA سپس می‌تواند به وکتور هضم شده توسط BsmBI متصل شود تا DNA نوترکیب شما ایجاد شود (شکل ۲-۲۵). توجه داشته باشید که توالی الحاقی شما در این مورد از دو اولیگو تشکیل شده است که هضم نمی‌شوند.

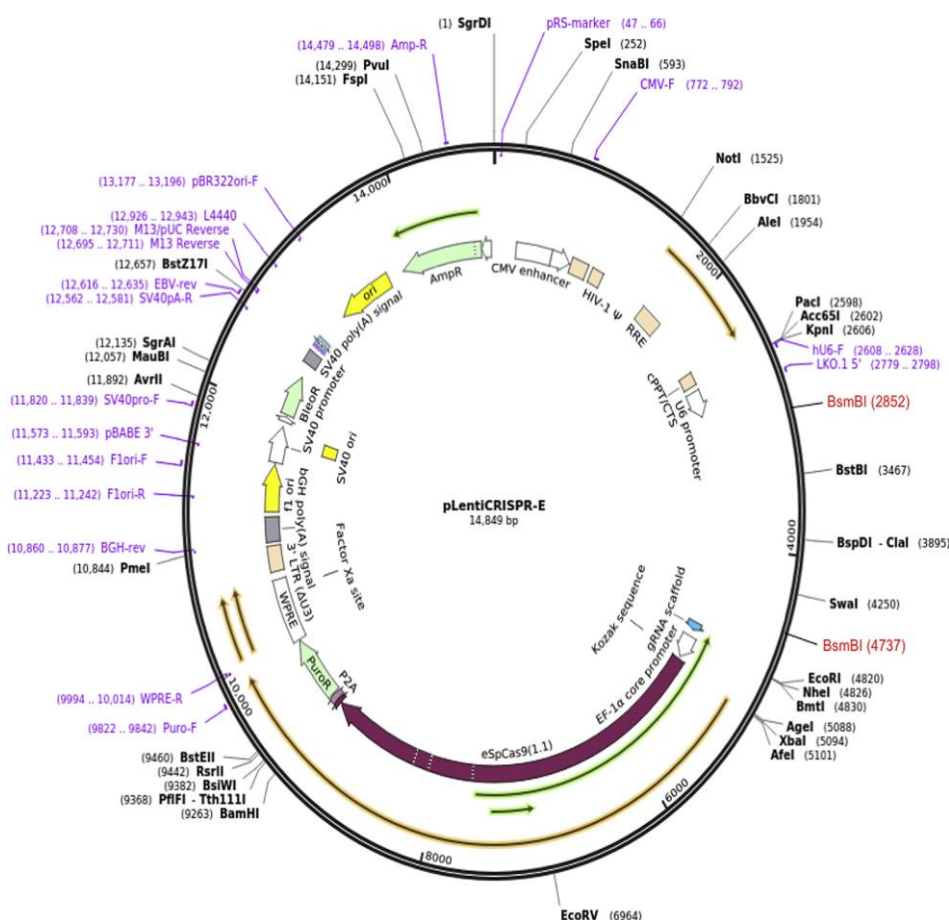


شکل ۲-۲۵: طرح شماتیک اولیگوهای فسفریله که باید به یک pLentiCRISPR-E دفسفریله شده با BsmBI متصل شوند. پیکان آبی نشان‌دهنده پروموتور U6 است. پیکان سبز نشان‌دهنده اولیگوهای متصل شده‌ای است که به یک sgRNA رونویسی می‌شوند. «P» قرمز نشان‌دهنده گروه‌های فسفریل است.

به‌طور خلاصه، نوکلئوتیدهای پررنگ در شکل ۱-۲۵ نشان‌دهنده اولیگوهای سفارشی است که با توالی ژنومی مورد نظر برای شکافتن، تطابق دارد. اوورهاینگ‌های پررنگ نشده تنها برای ساده کردن وصل شدن به اوورهاینگ‌های وکتور هضم شده، وجود دارند؛ بنابراین، در صورت متفاوت بودن طراحی توالی sgRNA شما با سایر گروه‌ها، اوورهاینگ‌های مورد استفاده در تمامی موارد، یکسان خواهد بود.

وکتور پلازمید pLentiCRISPR-E مورد استفاده، همان وکتوری که در جلسه بیست و سوم توضیح داده شد. دو مکان از BsmBI در این وکتور وجود دارد (شکل ۲-۲۵) که با فاصله تقریبی ۲kb از هم قرار گرفته‌اند؛ بنابراین، هضم وکتور با BsmBI دو قطعه ایجاد می‌کند: قطعه پرکننده

با فاصله تقریبی ۲ kb که بین دو مکان قرار دارد و وکتور با اندازه تقریبی ۱۳ kb. شما وکتور ۱۳ را که در مراحل بعدی به اولیگوهای شما متصل می‌شوند را با ژل آگارز خالص‌سازی می‌کنید. این عمل، DNA الحاقی (اولیگوهای متصل شده) را بلافاصله در پایین دست پروموتور U6 قرار می‌دهد که منجر به رونویسی sgRNA پس از ورود به سلول‌های پستانداران می‌شود.



شکل ۲۵-۳: نقشه وکتور pLentiCRISPR-E. مکان‌های منحصر به فرد، همچنین دو مکان BsmBI مورد استفاده برای کلون‌سازی نشان داده شده است. با کسب اجازه از Dr. Philip Abbosh.

برخلاف آنزیم‌های محدودکننده قبلی (NcoI و NotI)، BsmBI در توالی تشخیص خود بریده نمی‌شود. این آنزیم توالی مختص به خود را شناسایی می‌کند اما آن را از قسمت‌های خارجی برش می‌دهد؛ در نتیجه، این آنزیم به‌عنوان یک آنزیم محدودکننده نوع IIS طبقه‌بندی می‌شود. DNA

بریده شده با BsmBI باید دارای اوورهنگ‌هایی با چهار نوکلئوتید ناسازگار باشد؛ با این حال، انجام اقدامات اضافه به‌منظور جلوگیری از وصل شدن پلازمیدها به یکدیگر در فرآیند کلون‌سازی با یک آنزیم محدود کننده، امری متداول است. این امر برای افزایش تعداد سلول‌های نو ترکیب حاوی وکتور و ژن الحاقی ضروری است. برای جلوگیری از وصل شدن ناقل به خود و بدون وجود ژن الحاقی، وکتور هضم شده با BsmBI ابتدا توسط با یک فسفاتاز تیمار می‌شود. فسفاتازها حذف گروه‌های فسفریل را تسریع می‌کنند. بدون این گروه‌ها، پیوندهای فسفودی‌استر توانایی تشکیل شدن را ندارند که این امر از حلقوی شدن مجدد pLentiCRISPR ممانعت به عمل می‌آورد؛ با این حال، در صورت وجود DNA الحاقی (اولیگوهای آنیل شده با اوورهنگ‌های BsmBI) و دارا بودن گروه‌های فسفریل، می‌توان آن را به وکتور متصل کرد. به‌این‌ترتیب، شما با یک وکتور دفسفریله کار می‌کنید، اما ژن الحاقی فسفریله شده برای اطمینان از اینکه این ژن به درستی به وکتور متصل شده است، استفاده خواهد شد (شکل ۲۵-۲).

پ. اصول طراحی آغازگر PCR^۱

برای کسب اطلاعات مقدماتی بیشتر در مورد PCR و نقش آغازگرها، به کلاس آزمایشگاه: جلسه سوم مراجعه کنید.

اولیگوها (آغازگرها) را می‌توان برای بررسی اهداف متعددی مورد استفاده قرار داد. علاوه بر کلون کردن اولیگوی متصل شده، آغازگرها بیشتر در واکنش‌های PCR استفاده می‌شوند. در این کتاب ممکن است از آغازگرها در برنامه‌هایی همانند کلون کردن با PCR، غربالگری سلول‌های ترادیسی شده با PCR و RT-PCR استفاده کرده باشید. به همین منظور، جزئیات بیشتری در مورد طراحی آغازگر وجود دارد که باید نسبت به آن‌ها آگاهی کافی داشته باشید. این جزئیات به‌صورت خلاصه ارائه خواهند شد، زیرا به‌منظور تأیید ویرایش ژن با واسطه CRISPR، به آغازگرها نیاز خواهید داشت. در ادامه معیارهایی کلی در این مورد ارائه خواهند شد که ممکن است در تمامی برنامه‌ها، فاقد کاربرد باشند. تمرین‌های آزمایشگاهی ارائه شده برای طراحی آغازگر PCR در این بخش، حاوی معیارهای مورد نیاز برای بررسی ویرایش ژن با واسطه CRISPR است.

- به‌طورکلی، طول آغازگر در محدوده ۱۸-۳۰ نوکلئوتید قرار دارد. این بر اساس هدف استفاده از آغازگرها متفاوت است.
- محتوای GC آغازگرها در محدوده ۴۰-۶۰ درصد قرار دارد.
- دمای ذوب (T_m) جفت آغازگرها نسبت به یکدیگر 5°C اختلاف داشته باشد.

1. PCR. primer. design. basics

- از ایجاد همولوژی درون هر آغازگر جلوگیری کنید. مناطقی با طول بیش از سه باز که دارای یک توالی مکمل در یک آغازگر هستند، می‌توانند به جای متصل کردن آغازگر به توالی هدف، باعث ایجاد حالت دایمری در آغازگرها شوند.
- از ایجاد رشته‌ها با چهار باز مشابه و یا بیشتر و همچنین تکرارهای دی نوکلئوتیدی خودداری کنید (به‌عنوان مثال ATATATAT).

آغازگرها که در ابتدا تنها به‌صورت دستی طراحی می‌شدند، اکنون به‌طور معمول با کمک ابزارهای آنلاین طراحی می‌شوند. یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های آغازگر PCR، اختصاصی عمل کردن آن است. شما به آغازگرها به‌منظور وصل شدن به یک نقطه مشخص موجود در یک رشته الگوی خاص، نیاز خواهید داشت. الگوریتم‌های رایانه‌ای به‌طور معمول عملکرد اختصاصی تمامی آغازگرها را بررسی خواهند کرد. این الگوریتم از یک ابزار هم تراز می‌مانند BLAST (به جلسه ۸ مراجعه کنید)، به‌منظور جستجوی توالی‌های مکمل بین یک آغازگر معین و یک ژنوم خاص یا سایر توالی ذخیره شده استفاده می‌کند. در این تمرین آزمایشگاه، از راهنمای طراحی آغازگر NCBI's Primer BLAST، استفاده خواهد شد؛ اگرچه سایر ابزارهای طراحی آغازگر آنلاین نیز می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

الف. طراحی و تجزیه و تحلیل sgRNA

- توجه: جلسات آزمایشگاهی زیر (مربوط به آزمایش‌های ژن انسانی)، تنها برای رده سلولی HEK293 نوشته شده است. در صورت استفاده از یک رده سلولی متفاوت و به‌ویژه سلول پستانداران غیرانسانی، شیوه‌نامه‌های زیر باید اصلاح و طبق رده سلولی انجام شود. نرم‌افزار Deskgen Cloud برای طراحی sgRNA های سرکوب کننده EGFP مناسب نخواهد بود، زیرا این مولکول باید از یک لیست ژنومی از پیش تعیین شده انتخاب شود.
- ۱- ایجاد حساب کاربری رایگان یا دنبال کردن شیوه‌نامه‌های مربی خود برای دسترسی به یک حساب کاربری از قبل تهیه شده، به وبگاه Cloud Deskgen^۱ مراجعه کنید.
 - ۲- گزینه «حالت سرکوب^۲» را انتخاب کنید.
 - ۳- ژنوم مناسب را از لیست کشویی انتخاب کنید. توجه: برای استفاده از ستون (منظور ستون فسفات مولکول نوکلئیک اسید) PlenticRISPR-E، باید آزمایش CRISPR خود را در

1. <https://www.deskgen.com/landing/cloud.html>

2. Knockout

سلول‌های انسانی انجام دهید. به‌همین منظور، روی «*Homo Sapiens*» (GRCH38.81) کلیک کنید.

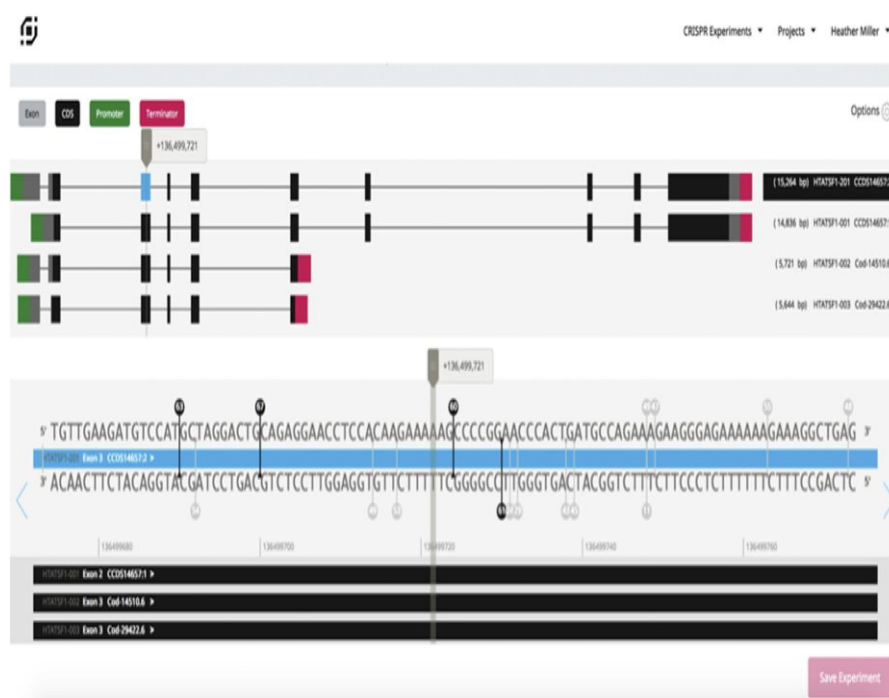
۴- در بخش Ensembl نام ژن انسانی مورد نظر خود را تایپ کنید. پیشنهادها ظاهر می‌شود. روی ژن مورد نظر کلیک کنید. توجه داشته باشید که اگر یک رده سلولی سرکوبی از قبل برای آن ژن وجود داشته باشد، Deskgen جزئیات مربوط به نحوه خرید آن را به شما ارائه می‌دهد؛ با این حال، شما هنوز هم می‌توانید طبق نظرات خود، اقدام به طراحی کنید.

۵- روی گزینه «Select Guides» در پایین صفحه کلیک کنید.

۶- اکنون یک مرورگر ژنوم را مشاهده خواهید کرد که حاوی بخش مربوط به ژنوم انسان است (شکل ۲۵-۴). مستطیل‌ها نمایانگر اگزون‌ها و خطوط افقی اینترون‌ها را نشان می‌دهند. علائم مربوط به توالی کد کننده، اگزون‌ها، پروموتورها و ترمیناتورها نیز نشان داده شده است. ممکن است واریته‌های مختلفی از ژن مورد نظر شما وجود داشته باشد که از طریق فرآیند پردازش جایگزین^۱ تولید می‌شود. در این صورت، بهتر است SGRNA هایی را شناسایی کنید که یک توالی مشترک را در تمامی واریته‌های مورد نظر شما هدف قرار می‌دهد. به‌عنوان مثال، اگر ژن شما توانایی تولید واریته‌هایی را دارد که یک اگزون را نادیده بگیرد و sgRNA شما آن اگزون را مورد هدف قرار دهد، این نوع واریته مورد هدف قرار نگرفته است و پروتئین‌ها همچنان تولید خواهند شد. برخی از ژن‌ها انواعی از واریته‌ها را دارند که برای هدف قرار دادن تمامی آن‌ها به چندین sgRNA نیاز خواهد بود. همچنین پیشنهاد می‌شود sgRNA ها را طبق چند اگزون اولیه انتخاب کنید. منطقه پروموتور نیز برای هدف قرار دادن بسیار مناسب است. sgRNA ها را می‌توان برای هدف قرار دادن هر دو رشته از DNA طراحی کرد.

1. Alternative. processing

۷- از آنجا که شما SGRNA ها را در یک وکتور بیانی پستانداران که همچنین SPCAS9 را کد کرده است، کلون می‌کنید، باید CAS9 مربوط به آن را نیز در Deskgen انتخاب کنید. در بالا سمت راست، یک منو از گزینه‌ها وجود داشته که شبیه یک دنده است. روی دنده کلیک و سپس «Set nuclease» را انتخاب کنید و مطمئن شوید که «SPCAS9» انتخاب شده است. در سمت چپ «SPCAS9»، یک منو فرعی ظاهر می‌شود. اطمینان حاصل کنید که «۲۰ bp» انتخاب شده است. این گزینه طول SGRNA را تعیین می‌کند.



شکل ۲۵-۴: یک مثال از ایجاد «حالت سرکوب» در DESKGEN Cloud. قسمت بالا، نشان‌دهنده مرورگر ژنوم و قسمت پایین توالی ژنومی و توالی‌های بالقوه‌ای را که RNA راهنما می‌تواند مورد هدف قرار دهد، نشان می‌دهد. با کسب اجازه از Desktop Genetics.

۸- در زیر پنجره قسمت مرورگر ژنوم، توالی DNA را مشاهده خواهید کرد. منطقه‌ای که مشاهده می‌کنید، بستگی به محل کلیک و کشیدن نشانگر دارد. سعی کنید که با استفاده

از کلیک کردن، نشانگر را به یک مکان ژنومی دیگر بکشید. توالی نشان داده شده در زیر مرورگر ژنوم، تنها توالی DNA را در آن منطقه نشان می‌دهد.

۹- در پایین صفحه، فهرستی از توالی‌های RNA راهنما قرار گرفته است. روی « on-target filter » کلیک کنید و تا رسیدن به ۶۰ آن را بکشید. اکنون، تنها RNA های راهنما با نمره هدف ۶۰ یا بالاتر در هر منطقه از صفحه نمایش داده می‌شوند. توجه داشته باشید که هرچه نمره بالاتر باشد، فعالیت پیش‌بینی شده بازدهی بیشتری خواهد داشت.

۱۰- برای محاسبه امتیازات خارج از هدف RNA های راهنمای خود، روی باکس موجود در سمت چپ هر توالی در پایین صفحه، کلیک کنید. سپس روی گزینه « Find Off Targets » کلیک کنید. امتیاز خارج از هدف اکنون برای هر RNA راهنمای موجود در فهرست نمایش داده می‌شود.

۱۱- در نتیجه کلیک کردن روی ردیف یکی از RNA های راهنما، تجزیه و تحلیل خارج از هدف در سمت راست ایجاد می‌شود (شکل ۲۵-۵). این تجزیه و تحلیل مکان سایت‌های خارج از هدف را نشان می‌دهد، همچنین میزان عدم تطابق بین RNA راهنمای شما و هدف را برآورد می‌کند. به‌طور کلی، وجود یک مورد عدم تطابق ممکن است تحمل شود، اما وجود بیش از یک مورد می‌تواند سبب کاهش راندمان سرکوب شود. تجزیه و تحلیل خارج از هدف همچنین نشان می‌دهد که آیا سایت خارج از هدف در یک ژن قرار دارد یا خیر. سعی کنید RNA های راهنما با امتیازهای خارج از هدف بالا را انتخاب کنید، به صورتی که این بخش‌های خارج از هدف درون یک ژن قرار نداشته باشد. توجه به اثرات احتمالی خارج از هدف بسیار مهم است. در صورت مواجه شدن با مورد عدم تطابق RNA راهنما با ژن مورد نظر و بالا بودن امتیازهای خارج از هدف RNA، احتیاط کنید. شما باید RNA هایی را با بالاترین امتیاز خارج از هدف انتخاب کنید.

The screenshot displays the Desktop Genetics software interface. It features a table of sequences with columns for Sequence, PAM, Score, Activity, and Off-target. The selected sequence is 'TTTGAATTTGATTTCT'. To the right, the 'Guide Details' section shows 'Guide name: chr10:10485702-10485702', 'GC%: 65', 'Activity: 67', and 'Off-target: 65'. Below this, the 'OFF-TARGET ANALYSIS' table shows 'Mononucleotides' with counts for G, A, C, T, and Total. The 'OFF-TARGET HITS' table lists sequences with their PAM, Similarity, Mon., Gene, and Locus.

Sequence	PAM	Score	Activity	Off-target
TTTGAATTTGATTTCT	AAA	3	67	67
TTTGAATTTGATTTCA	AAA	3	67	66
TTTGAATTTGATTTCT	AAA	3	67	67
TTTGAATTTGATTTCT	AAA	3	67	67

Mononucleotides	G	A	C	T	Total
Coding	0	0	0	0	0
Non-Coding	0	0	0	20	20

Sequence	PAM	Similarity	Mon.	Gene	Locus
TTTGAATTTGATTTCT	AAA	1	8,10,20	No	chr10:10485702-10485702
TTTGAATTTGATTTCT	AAA	1	5,8,12	No	chr10:10485702-10485702
TTTGAATTTGATTTCT	AAA	1	4,7,19	No	chr10:10485702-10485702
TTTGAATTTGATTTCT	AAA	1	10,11,20	No	chr10:10485702-10485702
TTTGAATTTGATTTCT	AAA	1	6,10,19	No	chr10:10485702-10485702
TTTGAATTTGATTTCT	AAA	0	8,17,20	No	chr10:10485702-10485702

شکل ۲۵-۵: توالی‌های RNA راهنما (چپ) و تجزیه و تحلیل خارج از هدف (راست). با کسب اجازه از Desktop Genetics

۱۲- فهرستی از RNA های راهنمای بالقوه را ایجاد کنید که توسط مربی بررسی شود. مربی به انتخاب بهترین گزینه منحصر به فرد در گروه کمک می‌کند، همچنین تعداد آن‌ها به ازای هر ژن را به‌منظور سفارش دادن انتخاب می‌کند.

۱۳- برای ایجاد اوورهاینگ‌ها و به‌منظور اهداف کلون‌سازی، توالی‌های زیر را به اولیگوهای خود اضافه کنید؛ «N» یکی از ۲۰ نوکلئوتید در اولیگو شماسست. توجه داشته باشید که دو اولیگو که به‌صورت مکمل معکوس یکدیگر هستند، باید برای ایجاد یک sgRNA طراحی شوند (شکل ۲۵-۱).

Oligo 1: 5' CACCG NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 3'

Oligo 2: 5' AAAC NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN C 3'

ب. طراحی آغازگر

پس از دریافت اولیگوهای sgRNA، سرانجام شما نیاز به برداشت سلول‌های HEK293 و تأیید ایجاد DSB ها، حداقل در برخی از سلول‌ها دارید (جلسه ۲۹). برای انجام این عمل، از PCR برای تکثیر توالی ژنومی اطراف DSB پیش‌بینی شده، استفاده می‌شود. به همین منظور، از آغازگرهای اختصاصی ژن (Oligos) برای PCR استفاده می‌شود. به همین منظور، آغازگرهای PCR باید در مرحله قبل به‌طور هم‌زمان با اولیگوهای sgRNA شما طراحی و سفارش داده شوند.

۱- به وبگاه NCBI Primer-BLAST tool^۱ مراجعه کنید. شماره یکتای ژن مورد نظر برای سرکوب را وارد کنید. شکل ۲۵-۶ (A)، مناطق مربوط به BLAST را نشان می‌دهد. به جای انتخاب آغازگرها در قسمت‌های مختلف ژن، می‌توانید محدوده بازی که آغازگرها به آن متصل می‌شوند را انتخاب کنید. این منطقه شامل مکان PAM می‌شود که بلافاصله در پایین‌دست CRISPR/Cas9، یعنی در مکانی که به‌صورت بالقوه یک DSB ایجاد خواهد شد، قرار دارد. ایجاد یک صفحه Word که نشان‌دهنده توالی ژن شما است، مفید خواهد بود؛ بنابراین می‌توانید مشخصه‌های مهم را برای هر sgRNA تولید شده را علامت‌گذاری کنید. (شکل ۲۵-۶-b). این مشخصات شامل فاصله ۲۰ نوکلئوتیدی به‌منظور شناسایی مکان NGG مربوط به PAM توسط sgRNA است. سپس، طیفی از توالی‌ها را انتخاب خواهید کرد که مکان شکافت نزدیک به PAM در آن، در مرکز فرآورده PCR قرار نداشته باشد. سپس، شکافت منجر به ایجاد دو قطعه از DNA با طول مشابه

1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

خواهد شد؛ اما برای جلسات ۲۹ و ۳۰ آزمایشگاه، بسیار مهم است که دو قطعه شکسته شده طول متفاوتی داشته باشند.

(A) NIH U.S. National Library of Medicine NCBI National Center for Biotechnology Information Sign in to NCBI

Primer-BLAST

A tool for finding specific primers

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

PCR Template [Reset page](#) [Save search parameters](#) [Retrieve recent results](#) [Publication](#) [Tips for finding specific primers](#)

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) [Clear](#)

1. Enter accession number here

Or, upload FASTA file No file selected.

Range

From To 2. Enter range here

Forward primer 3421

Reverse primer 3901

Enter the position ranges if you want the primers to be located on the specific sites. The positions refer to the base numbers on the plus strand of your template (i.e., the "From" position should always be smaller than the "To" position for a given primer). Partial ranges are allowed. For example, if you want the PCR product to be located between position 100 and position 1000 on the template, you can set forward primer "From" to 100 and reverse primer "To" to 1000 (but leave the forward primer "To" and reverse primer "From" empty).
Note that the position range of forward primer may not overlap with that of reverse primer.

(B)

```

3421 tatgtgtgtt cattacagaa ccaagaaatt tagtgtgtaa ctttgcatac caaccttttag
3481 gcttggttaa tgtaacttac agcagtgtgt cccttcccat tcagtggaggc cctcaagaaa
3541 gcataatttt aatgtatatt tgaacacaca aaaatgtgaa atttctcag ttccgtaaat
3601 gtaaaacttt tacatacatt tagaaaaatca acattgcatt cacctaagtt atagatttct
3661 aattggtaga atgctaagta attcaccttc attatcaatt ataaatgttt tttatatttt
3721 cttaaagac aggtttgcct ccagatatta cagtggatga atttatataa cttatgtcca
3781 agtttggcat tattatgaga gatcctcaga cagaagaatt taaggtaaaa ctttacaaaag
3841 ataatacaagg aaatcttaaa ggagacgggc tttgctgtta ttgaaagta agttgtatga
3901 tcaataaagt ttcttgtatc ttctgtttta actcaggaac cagggtctata atttctatag
  
```

شکل ۲۵-۶: تصویری از BLAST آغازگر (A) NCBI. مثالی از صفحه Word شامل ویژگی‌های توالی مربوطه (جفت آغازگر به رنگ زرد، توالی هدف در ژن که باید ۲۰ باز طول داشته باشد سبز و توالی PAM بنفش) (B).

برای تعیین این محدوده، می‌توانید اولین شماره نوکلئوتید را در کادر محدوده و برای آغازگر رفت، تایپ کنید. سپس آخرین شماره نوکلئوتید را در کادر محدوده برای آغازگر برگشت تایپ کنید (شکل ۲۵-۶). در صورتی که گروه شما بیش از یک RNA راهنما را طراحی کرده باشد، در این مرحله ممکن است به بیش از یک جفت آغازگر به منظور پوشش دادن مکان شکافت، نیاز داشته باشید. همچنین، اگر گروه‌های دیگر در حال طراحی RNA های راهنما برای هدف قرار دادن مناطق در نزدیکی همان ژن هستند، ممکن است یک جفت آغازگر برای تجزیه و تحلیل چندین مکان شکافت، کافی باشد. با مربی خود مشورت و تمام توالی‌ها را در Word را برجسته کنید.

- ۳- در قسمت «پارامترهای PCR» محدوده اندازه bp ۴۰۰-۵۰۰ را وارد کنید.
- ۴- دمای ذوب آغازگر (T_M) را حداقل ۵۸، بهینه ۶۰ و حداکثر 62°C وارد کنید. در صورت پیدا نکردن آغازگرهای مناسب، می‌توانید درجه حرارت‌ها را تغییر دهید.
- ۵- در قسمت «Primer pair specificity check parameters» گزینه عملکرد اختصاصی را علامت بزنید. گزینه‌های دیگر را به صورت پیش فرض قرار دهید.
- ۶- به پایین صفحه بروید و روی «Advanced parameters» کلیک کنید. محتوی GC آغازگرها را در محدوده ۴۵-۶۰ درصد قرار دهید.
- ۷- تمام گزینه‌های دیگر را به صورت پیش فرض قرار دهید و روی گزینه «Get Primers» کلیک کنید.
- ۸- یک نمای نگاره‌ای از جفت آغازگرهای بالقوه و همچنین جزئیات مربوط به هر جفت آغازگر نمایش داده می‌شود. این جزئیات شامل مقادیر مربوط به محتوای GC، T_M و غیره است که با معیارهای شما، همچنین اندازه فرآورده‌های PCR که با استفاده از آغازگرهای طراحی شده ایجاد می‌شوند، مطابقت دارد.
- ۹- جفت آغازگرهایی را که با مشورت با مربی تولید می‌شوند، ارزیابی کنید. ممکن است سفارش دو جفت آغازگر در صورت کارایی پایین دو جفت اول، مفید واقع شود. آغازگرهای سفارشی خود در مرحله ۲ را در صفحه Word علامت بزنید. مربی شما این توالی‌ها را به منظور سفارش اولیگوها ارسال خواهد کرد. درحالی که آن‌ها در حال سنتز هستند، شما به تهیه وکتور CRISPR خود ادامه خواهید داد.

پ. هضم با آنزیم محدود کننده و دفسفوریلاسیون وکتور CRISPR

- این مراحل سبب هضم BSMBI و دفسفوریلاسیون هم‌زمان وکتور CRISPR می‌گردد. اگرچه آنزیم‌های محدود کننده‌ای قبیل آنزیم‌های خریداری شده از Biolabs New England، مولکول DNA را تنها در ۱۵-۵ دقیقه برش می‌دهند، به منظور تکمیل فعالیت فسفاتاز قلیایی^۱، حداقل به مدت ۳۰ دقیقه فرآیند انکوباسیون را انجام دهید. اگر از معرف‌های شرکت دیگری استفاده می‌کنید، مربی شما ممکن است در شیوه‌نامه تغییراتی ایجاد کند.
- ۱- شما رقت مشخصی از PlenticRISPR-E را دریافت خواهید کرد. غلظت را برآورد کنید، سپس حجم را برای رسیدن به میزان $5\mu\text{g}$ محاسبه کنید.
 - ۲- در یک ویال میکروسانتریفوژ، معرف‌ها را به ترتیب ذکر شده در جدول ۱-۲۵ ترکیب کنید.

1. Calf. alkaline. phosphatase

- ۳- ویال را به سرعت ورتکس کنید تا محتویات ترکیب شوند. ویال را در یک میکروسانتروفوژ قرار دهید و آن را به مدت اندکی اسپین کنید تا محتویات به انتهای ویال منتقل شوند.
- ۴- ویال را دست‌کم به مدت ۳۰ دقیقه در یک حمام آب 37°C انکوبه کنید.

جدول ۲۵-۱: تنظیم آزمایشی برای هضم با آنزیم محدود کننده و واکنش دفسفریلاسیون.

معرف	حجم (μL)
pLentiCRISPR-E ($5\mu\text{g}$)	
آب	
10× NEB buffer 3.1	۶
BsmBI ($10\text{ U}/\mu\text{L}$)	۳
CIP (calf alkaline phosphatase) ($10\text{ U}/\mu\text{L}$)	۰/۵
کل	۶۰

ت. الکتروفورز ژل آگارز

- ۱- درحالی‌که واکنش در قسمت پ در حال انجام است، یک ژل آگارز ۰/۶ درصد را آماده کنید. این امر مشابه روش ارائه شده در جلسه سوم آزمایشگاه است، با این تفاوت که تنها ۰/۶ گرم آگارز در هر ۱۰۰ mL از ۱× TBE حل خواهد شد.
- ۲- پلازمید pLentiCRISPR-E هضم شده و دفسفریله شده خود را از حمام آب خارج کنید و یک اسپین سریع در یک میکروسانتریفیوژ انجام دهید تا مایع به انتهای ویال دسترسی پیدا کند.
- ۳- مقدار $12\ \mu\text{L}$ از رنگ بارگذاری DNA $6\times$ (رنگ بارگذاری DNA مناسب دیگر) را به واکنش اضافه کنید و با پایپت کردن به بالا و پایین، ترکیب را مخلوط کنید.
- ۴- با افزودن 200 ng از پلازمید pLentiCRISPR-E هضم نشده به یک ویال میکروسانتریفیوژ جدید، یک کنترل پلازمید هضم نشده آماده کنید. رنگ بارگذاری DNA $6\times$ و آب استریل را به منظور رساندن حجم نمونه به محدوده $10-20\ \mu\text{L}$ ، اضافه کنید.
- ۵- ژل آگارز خود را در مخزن الکتروفورز قرار دهید. ژل را با استفاده از بافر ۱× TBE پوشش دهید و سپس به آرامی شانه را خارج کنید.
- ۶- مقدار $0.5\ \mu\text{g}$ از خط کش DNA شرکت NEB Quick-Load 1 kb را بارگذاری کنید. این خط‌کش DNA، مخصوص قطعات DNA بسیار بزرگ است، زیرا وکتور شما بزرگ‌تر از موارد استفاده شده در جلسه‌های آزمایشگاهی قبلی است.

۷- با توجه به این که حجم نمونه شما به همراه رنگ دای ($72 \mu\text{L}$)، بیشتر از حجم گنجایش چاهک ژل است، کل نمونه خود را در دو چاهک مجاور بارگذاری کنید. هر چاهک را با دقت با استفاده از پایپت پر کنید.

۸- درب مخزن الکتروفورز را بگذارید و آن را به منبع تغذیه متصل کنید.

۹- منبع تغذیه را در ولتاژ ثابت ۸۵ ولت تنظیم کنید.

۱۰- هنگامی که قسمت جلویی رنگ دست کم نیمی از ژل را طی کرد، ژل را در محفظه نور UV قرار دهید. به منظور ممانعت از آسیب رسیدن به DNA، از نور UV با طول موج بلند استفاده کنید. توجه: هنگام مشاهده ژل خود در محفظه نور ماوراءبنفش، باید از محافظ صورت در برابر UV استفاده کنید؛ همچنین با پوشیدن دستکش و لباس آزمایشگاه، از پوست خود در برابر قرار گرفتن مستقیم در معرض نور UV محافظت کنید.

۱۱- کنترل هضم نشده باید نسبت به نمونه هضم شده با سرعت متفاوتی مهاجرت کند. اگر وکتور پلازمید با موفقیت با BsmBI بریده شد، دو باند ۲ kb و ۱۳ kb (ستون وکتور) باید قابل مشاهده باشد. شما تنها باید ستون وکتور ۱۳ kb را جدا کنید تا آن را برای کلون سازی خالص سازی کنید.

۱۲- درحالی که نور UV هنوز روشن است، با دقت و سرعت از یک تیغ تمیز برای جدا کردن باند ستون وکتور ۱۳ kb استفاده کنید و مقدار آگارز را در برش ژل به کمترین حد برسانید. میزان قرارگیری DNA در معرض نور UV را به حداقل میزان خود برسانید.

۱۳- برش ژل را در یک ویال میکروسانتریفیوژ استریل، بی رنگ و برچسب دار که روی یک ترازو وزن شده است، قرار دهید.

۱۴- از ژل آگارز موجود در محفظه نور ماوراءبنفش عکس بگیرید و قسمت بریده شده را تشخیص دهید. اگر ستون وکتور ۱۳ kb را با موفقیت برش داده باشید، تنها باند ۲ kb در چاهک ها قابل مشاهده خواهد بود. این تصویر نشان می دهد که هضم اتفاق افتاده است.

ج. استخراج ستون وکتور CRISPR هضم شده از ژل

استخراج از ژل (خالص سازی ژل) به طور معمول برای جداسازی DNA از ژل آگارز استفاده می شود. پس از ذوب برش آگارز حاوی DNA مورد نظر، شیوه نامه اجرایی مشابه سایر مراحل ستون چرخشی با غشاء سیلیکایی است. این شیوه نامه از کتابچه راهنمای شرکت تولید کننده (QIAquick Spin Handbook 03/2008) اصلاح شده است. نکته: تمامی مراحل سانتریفیوژ، در یک میکروسانتریفیوژ معمولی و در سرعت ۱۳۰۰۰ rpm انجام می شود. در صورت لزوم در دستگاه، ویال (های) خود را با ویال های گروه آزمایشگاهی دیگر در حالت تراز قرار دهید.

۱- برش ژل را که اکنون در یک ویال میکروسانتریفیوژ بی‌رنگ قرار دارد، وزن کنید. ۳ حجم بافر QG را به ۱ حجم ژل ($100 \mu\text{L} = 100 \text{ mg}$) اضافه کنید. به‌عنوان مثال، $300 \mu\text{L}$ بافر QG را به هر 100 mg ژل اضافه کنید. حداکثر مقدار برش ژل در هر ستون QIAquick ۴۰۰ میلی‌گرم است. برای برش‌های بیش از وزن مذکور، از دو ستون استفاده شود.

۲- ویال در دمای 50°C به مدت ۱۰ دقیقه (تا زمانی که برش ژل به‌طور کامل حل شود) انکوبه کنید. برای کمک به حل شدن ژل در طول دوره انکوباسیون، ویال را هر ۲-۳ دقیقه یک بار با ورتکس مخلوط کنید. مهم: از حل شدن آگارز اطمینان حاصل کنید.

۳- پس از حل شدن کامل برش ژل، بررسی کنید که رنگ مخلوط زرد باشد (مشابه بافر QG بدون آگارز حل شده). اگر رنگ مخلوط نارنجی یا بنفش بود، $10 \mu\text{L}$ استات سدیم ۳ M با pH ۵ به آن اضافه و مخلوط کنید. پس از این عمل رنگ ترکیب زرد خواهد شد. جذب DNA به غشای QIAquick فقط در pH کمتر از ۷/۵ کارآمد است. بافر QG حاوی یک نشانگر pH است که در pH کمتر از ۷/۵ زرد و در pH بالاتر به رنگ نارنجی یا بنفش متمایل می‌شود که امکان تعیین آسان pH بهینه برای وصل شدن DNA را فراهم می‌کند.

۴- به میزان ۱ حجم از ژل، ایزوپروپانول به نمونه اضافه و ترکیب کنید. به‌عنوان مثال، اگر برش ژل آگارز 100 mg است، $100 \mu\text{L}$ ایزوپروپانول اضافه کنید. این امر سبب تولید قطعات DNA با طول $< 500 \text{ bp}$ و $> 4 \text{ kb}$ خواهد شد. برای قطعات DNA بین 500 bp تا 4 kb ، افزودن ایزوپروپانول تأثیری بر بازدهی ندارد.

۵- یک ستون چرخشی QIAquick را در یک لوله جمع‌آوری 2 mL قرار دهید.

۶- برای وصل شدن DNA، نمونه را در ستون QIAquick قرار دهید و به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ کنید. حداکثر حجم مخزن ستون $800 \mu\text{L}$ است. برای حجم نمونه بیش از $800 \mu\text{L}$ ، در ابتدا $800 \mu\text{L}$ را بارگیری و سانتریفیوژ کنید، سپس محلول خروجی را از لوله جمع‌آوری خارجی کنید و در نهایت باقیمانده حجم را اضافه و دوباره اسپین کنید.

۷- محلول خروجی را دور بریزید و ستون QIAquick را در همان لوله جمع‌آوری قرار دهید. لوله‌های جمع‌آوری دوباره برای کاهش زباله‌های پلاستیکی استفاده می‌شوند.

۸- به‌منظور شستشو، 0.75 mL میلی‌لیتر بافر PE را به ستون QIAquick اضافه کنید و سپس به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۹- محلول خروجی را دور بریزید و ستون QIAquick را برای یک دقیقه دیگر سانتریفیوژ کنید.

مهم: باقی مانده اتانول از بافر PE به طور کامل حذف نمی شود مگر اینکه محلول خروجی پیش از این سانتریفیوژ اضافی دور ریخته شود.

۱۰- ستون QIAquick را در یک ویال میکروسانتریفیوژ تمیز ۱/۵ mL قرار دهید.

۱۱- برای شویش DNA، ۳۰ μ L بافر EB را به مرکز غشاء QIAquick اضافه کنید، یک دقیقه صبر کنید و سپس به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ کنید.

مهم: اطمینان حاصل کنید که بافر شویش، برای شویش کامل DNA، یگراست روی غشای QIAquick توزیع شده است.

چ. تعیین غلظت DNA

۱- از نانودراپ یا اسپکتروفتومتر برای تعیین غلظت ستون وکتور خالص سازی شده استفاده کنید. به حتم از بافر EB به عنوان نمونه خالی استفاده کنید.

۲- غلظت ستون فقرات وکتور استخراج شده از ژل، همچنین نسبت A260/A280 را برای ارزیابی خلوص DNA ثبت کنید.

۳- DNA را در فریزر -20°C قرار دهید.

منابع

1. Fu Y, et al. Nat Biotechnol 2013;31:822_6.
2. Hsu PD, et al. Nat Biotechnol 2013;31:827_32.
3. Kosicki M, et al. Nat Biotechnol 2018;36:765_771.
4. Anderson E, et al. Journal of Biotechnology 2015;211:56_65.

پرسش‌های مباحثه‌ای

۱- واریته‌های Cas9 به دلیل ویژگی‌های مختلف خود مهندسی شده‌اند. DESKGEN منویی برای انتخاب نوع Cas9 مورد استفاده توسط شما دارد. چرا دانستن واریته Cas9 هنگام طراحی sgRNA مهم است؟

۲- به جای خالص‌سازی ژل حاوی ستون وکتور، فرض کنید به‌طور تصادفی باند ۲kb را برای استفاده در روش کلون‌سازی خود خالص‌سازی کرده‌اید. آیا آن DNA دارای اوورهاینگ‌های BsmBI خواهد بود؟ آیا می‌توان اولیگوهای شما را به آن متصل کرد؟ آیا می‌توان Cas9 را از DNA نوترکیب حاصل شده بیان کرد؟

کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و ششم

CRISPR پیشرفته: بخش دوم

هدف: شما DNA الحاقی خود را آماده خواهید کرد، به وکتور CRISPR آماده شده خود متصل و به *E. coli* منتقل خواهید کرد.

۱- مقدمه

به منظور کسب اطلاعات بیشتر در مورد لیگاسیون و ترادسی، به جلسه پنجم آزمایشگاه مراجعه کنید. اکنون که نسخه دفسفریله شده و هضم شده با BsmBI از وکتور pLentiCRISPR-E را تهیه کرده‌اید، در مرحله بعدی باید ژن الحاقی خود را آماده کنید. در این مرحله دو فرآیند رخ می‌دهد: واکنش کیناز و وصل شدن اولیگوهای شما. کیناز آنزیمی است که انتقال یک گروه فسفریل را کاتالیز می‌کند. در مورد آزمایش ما، پلی نوکلئوتید کیناز T4 و بافر مناسب با هر دو رشته اولیگو سفارش داده شده، انکوبه می‌شود. در دمای 37°C (دمای بهینه برای فعالیت این آنزیم)، گروه‌های فسفریل از مولکول‌های ATP به انتهای $5'$ اولیگوها منتقل می‌شوند. به این ترتیب، انتهای $5'$ این مولکول‌های الحاقی می‌توانند با $3'$ گروه هیدروکسیل موجود در مولکول‌های وکتور، پیوندهای فسفودی‌استری ایجاد کنند. پس از وقوع واکنش کیناز، وصل شدن اولیگوی شما در همان ویال رخ می‌دهد. فرآیند وصل شدن^۱ به (متصل شدن) بازهای مکمل روی رشته‌های متضاد DNA اشاره دارد که پیوندهای هیدروژنی را با یکدیگر تشکیل می‌دهند. این امر امکان‌پذیر است، زیرا اولیگوهایی که شما طراحی و سفارش داده‌اید، مکمل‌های معکوس یکدیگر بودند. برخلاف واکنش کیناز، این مرحله با آنزیم کاتالیز نمی‌شود. با رسیدن دما به 95°C و کاهش تدریجی دمای واکنش، اولیگوهای دفسفریله شده به یکدیگر متصل می‌شوند و DNA دو رشته‌ای را تشکیل می‌دهند.

همان‌گونه که در فصل پنجم توضیح داده شد، باید وکتور را با قطعه الحاقی پیوند دهید. شما یک لیگاسیون آزمایشی (اولیگوهای دفسفریله و متصل شده به عنوان قطعه الحاقی و دفسفریله شده، pLentiCRISPR-E هضم شده با BsmBI به عنوان وکتور) را انجام خواهید داد. شما همچنین سه لیگاسیون کنترلی برای کنترل شایستگی سلول باکتری، وجود وکتور بریده نشده و حلقوی شدن مجدد وکتور خواهید داشت. کنترل آخر برای تأیید کلونی‌های حاوی وکتور pLentiCRISPR-E و اطمینان از عدم متصل شدن وکتورها به هم است. سپس واکنش‌های

1. Annealing. process

لیگاسیون خود را با استفاده از مؤلفه‌های شیمیایی به *E. coli* منتقل خواهید کرد. با این حال، این بار شما باکتری را به یک‌سویه *E. coli* ترادیدی شده تبدیل خواهید که به‌صورت مکرر ترکیب نمی‌شود، زیرا ناقل‌های لنتی ویروس دارای بخش‌های انتهایی طولی تکراری است که باعث ایجاد نوترکیبی‌های همولوگ می‌شود. سویه Stb13 دارای کمبود آنزیم رکومبیناز^۱ است؛ بنابراین، این سویه نرخ نوترکیبی را کاهش می‌دهد و این توالی‌های تکراری ناپایدار را در پلازمیدها حفظ می‌کند. تمایز دیگر این سویه با سویه BL21(DE3) در این است که سویه Stb13 مورد استفاده در آزمایش برای بیان پروتئین نوترکیب طراحی نشده است. در عوض، هدف ما استفاده از سویه‌ای است که برای تکثیر DNA وکتور مناسب است.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

الف. وصل شدن اولیگو sgRNA و فسفوریلاسیون

توجه: این فرآیند آزمایشی برای یک واکنش sgRNA است. در صورت نیاز به متصل و فسفریله شدن چند sgRNA، باید تعداد بیشتری واکنش را آماده کنید.

۱- دو رشته اولیگو DNA تک‌رشته‌ای طراحی شده را از مربی خود دریافت کنید. غلظت هرکدام باید $100\mu\text{M}$ باشد.

۲- روی یخ و در یک ویال PCR تمیز، معرف‌های فهرست شده در جدول ۲۶-۱ را به ترتیب مخلوط کنید. یک ترموسایکلر را به صورتی برنامه‌ریزی کنید که پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای 37°C برای واکنش کیناز، دما به 95°C افزایش پیدا کند و سپس به آرامی به دمای اتاق برسد. این امر به اولیگوهای فسفریله شده اجازه می‌دهد تا به یکدیگر متصل شوند. این برنامه در جدول ۲۶-۲ آورده شده است.

۴- اولیگوهای بازپخت شده را می‌توان تا زمان آماده شدن برای لیگاسیون و انتقال به باکتری‌ها، در دمای اتاق نگهداری کرد. اگر مراحل مذکور را در روز دیگری انجام می‌دهید، اولیگوها را می‌توان در دمای 4°C ذخیره کرد.

ب. لیگاسیون sgRNA ها به وکتور CRISPR هضم شده

توجه: این فرآیند آزمایشی برای یک واکنش sgRNA است. در صورت نیاز به متصل و فسفریله شدن چند sgRNA، باید تعداد بیشتری واکنش را آماده کنید.

جدول ۲۶-۱: تنظیم آزمایشی واکنش وصل شدن کیناز/اولیگو

معرف	حجم (μL)
اولیگو ۱ (۱۰۰ μM)	۱
اولیگو ۲ (۱۰۰ μM)	۱
10× T4 DNA ligase buffer	۱
آب استریل	۶/۵
0.5 μL T4 PNK (polynucleotide kinase) (10 U/μL)	۰/۵
کل	۱۰ μL

جدول ۲۶-۲: برنامه وصل شدن اولیگو/کیناز

چرخه	زمان (دقیقه)	درجه حرارت (°C)
۱	۳۰	۳۷
۱	۵	۹۵
۱۴	۱ دقیقه؛ ۵°C کاهش در هر چرخه	۳۵

۱- وکتور هضم شده با BsmBI، تیمار شده با CIP و خالص سازی شده از ژل را از جلسه ۲۵

آزمایشگاه تهیه کنید. اجازه دهید ویال در دمای اتاق ذوب شود.

۲- یک ویال میکروسانتریفیوژ جدید را علامت بزنید و هر یک از واکنش های اولیگو متصل شده از قسمت الف را به صورت ۱:۱۰۰۰ در آب استریل رقیق کنید (۱ μL) واکنش به اضافه ۱۹۹ آب). به خوبی مخلوط کنید.

۳- در ویال های میکروسانتریفیوژ علامت دار جدید، چهار واکنش لیگاسیون زیر را تنظیم و در نهایت آنزیم را اضافه کنید. برای مخلوط کردن، محلول را به خوبی به بالا و پایین پایت کنید.

واکنش ۱ (برای کنترل قابلیت زنده ماندن / صلاحیت سلول ها و تکنیک شما):

وکتور pLentiCRISPR-E حلقوی (برش نخورده)

50 ng uncut pLentiCRISPR-E _____ μL

Sterile dH₂O _____ μL

20 μL total

واکنش ۲ (برای کنترل وجود بردار بریده نشده):

pLentiCRISPR-E خطی

50 ng pLentiCRISPR-E cut with BsmBI _____ μL

Sterile dH₂O _____ μL

20 μL total

واکنش ۳ (برای کنترل حلقوی شدن وکتور):

pLentiCRISPR-E خطی به‌علاوه لیگاز

50 ng pLentiCRISPR-E cut with BsmBI	_____ μL
Sterile dH ₂ O	_____ μL
10× T4 DNA ligase buffer	_____ 2 μL
T4 DNA ligase	(400 U/ μL) 1 μL
	20 μL total

واکنش ۴ (لیگاسیون آزمایشی):

pLentiCRISPR-E به‌علاوه قطعه الحاقی، به‌علاوه لیگاز

50 ng pLentiCRISPR-E cut with BsmBI	_____ μL
Diluted oligo duplex from this Lab session	_____ 1 μL
Sterile dH ₂ O	_____ μL
10× T4 DNA ligase buffer	_____ 2 μL
T4 DNA ligase (400 U/ μL)	_____ 1 μL
	20 μL total

۴- هر یک از چهار ویال را به‌صورت کوتاه در یک میکروسانتریفیوژ اسپین کنید و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید تا فرآیند لیگاسیون ایجاد شود. توجه: شیوه‌نامه‌های شرکت سازنده را برای زمان لیگاسیون و دمای مورد نیاز، پیروی کنید.

ب. انتقال به *E. coli*

سلول‌های شایسته بسیار شکننده هستند؛ بنابراین باید را روی یخ نگهداری شوند. هرگز این سلول‌ها را به شدت ورتکس یا پایپت نکنید زیرا هضم خواهند شد. هرگز سلول‌های شایسته را در دمای اتاق گرم نکنید، زیرا آن‌ها شروع به ترمیم غشاهای خود می‌کنند و صلاحیت خود را از دست خواهند داد. پیش از استفاده از سلول‌های شایسته، آن‌ها را سانتریفیوژ نکنید، زیرا نمی‌توانید آن‌ها را به حالت تعلیق بازگردانید. چهار واکنش تبدیل (یک واکنش برای هر لیگاسیون) را به شرح زیر تنظیم کنید:

۱- دمای هات بلاک یا حمام آب را روی ۴۲°C تنظیم کنید. دما را با استفاده از دماسنج بررسی کنید، زیرا نمایشگرهای دیجیتال همیشه دقیق نیستند.

۲- چهار ویال سویه Stb13 از *E. coli* را از مربی خود دریافت کنید که حاوی ۵۰ μL از سلول‌های شایسته است. آن‌ها را با شماره‌های ۱-۴ علامت بزنید. ویال‌ها را همواره در سرما، یا روی یخ نگهداری کنید.

- نکته برای صرفه‌جویی در هزینه: سلول‌های Stb13 ارسال شده از شرکت سازنده، در مقادیر ۵۰ μL ارائه می‌شوند. مربی می‌تواند به‌منظور تولید بیشتر سلول‌های تراریخته شده، غلظت‌های ۲۵ μL از سلول‌ها در اختیار دانشجویان قرار دهد.
- ۳- با دقت ۲ μL از محلول‌های لیگاسیون را از قسمت ب، به ویال *E. coli* مناسب با برچسب متناظر اضافه کنید. مطمئن شوید که DNA را یکراست به سوسپانسیون باکتری اضافه می‌کنید. محلول را از طریق ضربه زدن با انگشت، مخلوط کنید.
- ۴- ویال‌ها را به مدت پنج دقیقه روی یخ انکوبه کنید.
- ۵- سلول‌ها را به مدت ۴۵ ثانیه در حمام آب 42°C یا هات بلاک انکوبه کنید و شوک گرما را به آن‌ها القاء کنید.
- ۶- ویال‌ها را به مدت ۲ دقیقه روی یخ بازگردانید.
- ۷- مقدار ۲۵۰ μL محیط SOC یا LB هم‌دمای با اتاق را به هر ویال اضافه کنید.
- ۸- ویال‌ها را به‌صورت افقی در دمای 37°C و با سرعت ۲۲۵ rpm شیک کنید.
- ۹- تعداد ۴ پلیت LB/amp از پیش گرم شده را از مربی خود دریافت کنید و آن‌ها را طبق واکنش‌های خود، برچسب بزنید. مقدار ۵۰ μL (کل حجم سلول‌های مورد استفاده در هر ترادیسی) را روی پلیت مربوطه قرار دهید.
- ۱۰- به مدت یک شب و در دمای 37°C ، انکوبه کنید.
- نکته برای صرفه‌جویی در زمان: می‌توانید پلیت‌ها را در دمای اتاق و در طول ۳ شبانه‌روز انکوبه کنید.
- ۱۱- می‌توانید ترکیب ترادیسی شده باقیمانده را در دمای 4°C ذخیره کنید تا در صورت نیاز، در روز بعد حجم متفاوتی از آن‌ها را پلیت کنید. از سوی دیگر، می‌توانید دو حجم مختلف از ترکیب مذکور خود را در همان روز پلیت کنید تا مطمئن شوید که دست‌کم یک پلیت دارای کلنی‌های مجزا است. در بیشتر موارد، استفاده از ۵۰ μL از ترکیب ترادیسی شده، سبب ایجاد کلنی‌های قابل تفکیک تا صبح روز بعد خواهد شد.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- در مورد فسفاتازها و کینازها در دو جلسه آخر آزمایشگاه بحث شد. وجه تمایز این دو دسته آنزیم را شرح دهید.
- ۲- تصور کنید که در تمامی مراحل این آزمایش، فراموش کرده‌اید که بافر DNA لیگاز T4 را روی یخ نگه‌داری کنید. این امر چگونه می‌تواند بر مراحل لیگاسیون و انجام فرآیند ترادیدی شما تأثیر بگذارد؟
- ۳- دو نوع پیوند مختلف در طی واکنش کیناز و وصل شدن اولیگوها تشکیل می‌شود. آن‌ها چه نوع پیوندی است و دو تفاوت آن‌ها را نام ببرید.

کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و هفتم
جلسه موقت آزمایشگاه

کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و هفتم-الف

جلسه موقت آزمایشگاه

شمارش سلول‌های ترادیسی شده و تلقیح کشت‌ها برای MINIPREP DNA

هدف: امروز سلول‌های ترادیسی شده در هر پلیت را شمارش و ثبت خواهید کرد. شما همچنین یک پلیت مضاعف از کلون‌های مثبت احتمالی خواهید ساخت و کشت‌های مایع را تلقیح خواهید کرد. DNA پلازمید از این کشت‌های باکتریایی مایع خالص‌سازی می‌شود که می‌توان با استفاده از فناوری توالی‌یابی، کلون شدن صحیح قطعه الحاقی خود را در این وکتورها تأیید کرد.

۱- مقدمه

بهتر است کلاس آزمایشگاه: جلسه ششم-الف را به‌منظور کسب اطلاعات در مورد ایجاد پلیت مضاعف، مطالعه کنید.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

۱- تعداد سلول‌های ترادیسی شده در هر یک از پلیت‌های لیگاسیون/ ترادیسی خود را بشمارید و ثبت کنید. شما باید تعداد زیادی کلونی روی پلیت وکتور بریده نشده کنترل خود (واکنش ۱) و چندین کلونی بر پلیت لیگاسیون آزمایشی خود (واکنش ۴) داشته باشید. در صورت وجود، شما باید تعداد بسیار کمی کلونی در پلیت‌هایی که در آن باکتری‌ها با سایر کنترل‌ها ترادیسی شده‌اند، داشته باشید.

۲- با فرض اینکه کنترل‌های شما نتایج مورد انتظار را به شما ارائه می‌دهند، یک پلیت LB/amp را دریافت کنید. یک برچسب شبکه‌ای را به پشت ظرف پلیت بچسبانید و اطلاعات مورد نیاز را روی آن علامت بزنید. همیشه پشت پتری‌دیش‌ها را علامت بزنید. نکته برای صرفه‌جویی در هزینه: به‌جای استفاده از برچسب‌های شبکه‌ای، می‌توان از ماژیک مخصوص برای کشیدن شبکه در پشت پتری‌دیش استفاده کرد.

۳- سه لوله کشت (حاوی ۲ میلی‌لیتر LB/amp) را با اطلاعات خود و شماره پلیت سلول‌های ترادیسی شده برچسب بزنید.

۴- شما سه کلنی تفکیک شده را از پلیت حاوی ترادیسی شده خود (شماره-۴) (لیگاسیون آزمایشی)، به پلیت آگار جدید و همچنین در یک محیط کشت مایع تلقیح خواهید کرد. همان‌طور که در جلسه ششم توضیح داده شد، برای این عمل از سرمپلر استریل جدید

برای هر نمونه ترادیسی شده استفاده کنید. در ابتدا، مقدار کمی از رشد باکتری را از هر کلنی تفکیک شده که قصد تجزیه و تحلیل آن را دارید، انتخاب و سپس آن را به آرامی روی یکی از مربع‌های پلیت مشبک قرار دهید. سپس، مقدار مشابهی از سلول‌ها را در ویال‌های مربوط به خود قرار دهید. اگر نتایج غیرمنتظره‌ای در کنترل‌های خود مشاهده کردید، چه‌بسا نیاز باشد که کلنی‌ها را از پلیت گروه دیگر انتخاب کنید.

توجه: در این روش تلقیح، نیازی به پیروی از اصول ضدعفونی نیست. این روش به‌صورت اساسی برای تلقیح کشت‌های حاصل از روش Minipreps مورد استفاده واقع می‌شود. در این کشت‌ها آنتی‌بیوتیک‌های موجود در محیط، مانع از رشد بسیاری از آلاینده‌ها خواهد شد. در مواردی همانند ایجاد یک استوک فریزر که وجود کشت خالص ضروری است، نیازی به استفاده از این روش نیست.

۵- ویال‌ها و پلیت‌های علامت‌دار خود را در قسمت پیش‌خوان آزمایشگاه قرار دهید. مربی شما، آن‌ها را تا بعدازظهر پیش از جلسه آزمایشگاه، در دمای 4°C (در یخچال) قرار می‌دهد، سپس آن‌ها را در دمای 37°C در طول شب انکوبه می‌کند تا کشت‌ها برای جلسه بعدی آزمایشگاه، تازه باشند.

نکته برای صرفه‌جویی در زمان: پلیت‌های مضاعف ترادیسی شده را می‌توان به جای این عمل، در دمای اتاق و به مدت ۲-۳ شب انکوبه کرد.

کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و هفتم-ب

CRISPR پیشرفته، بخش سوم

هدف: شما DNA پلازمید را از سلول‌های ترادیسی شده که در جلسه موقت آزمایشگاهی تلقیح کرده‌اید، جدا خواهید کرد و آن‌ها را برای تأیید وجود دست‌کم یک کلون مثبت، برای واکنش‌های توالی‌یابی آماده خواهید کرد.

۱- مقدمه

پس از تکمیل کلون‌سازی اولیگو متصل شده، چالش بعدی شما، تأیید کلون شدن صحیح قطعه‌های sgRNA (به‌عنوان قطعه الحاقی) در سایت‌های BsmBI وکتور pLentiCRISPRE توسط سلول‌های ترادیسی شده است. با توجه به وجود روش‌های غربالگری متعدد (جلسات آزمایشگاهی ۶-۸ را مشاهده کنید)، شما از روش توالی‌یابی سانگر برای شناسایی کلون‌های مثبت در جلسات بعدی آزمایشگاه استفاده خواهید کرد. یکی از دلایل مناسب بودن توالی‌یابی سانگر برای غربالگری، اندازه بسیار کوچک قطعه الحاقی شما است. هرکدام از اولیگوهای طراحی شده شما، کمی بیش از ۲۰ نوکلئوتید طول داشتند. اگر بخواهید از BsmBI برای هضم وکتور خالص‌سازی شده و آزاد کردن قطعه الحاقی sgRNA خود استفاده کنید، مشاهده این قطعه کوچک روی ژل آگارز دشوار خواهد بود. روش توالی‌یابی سانگر را (جلسه هفتم آزمایشگاه) را مطالعه کنید.

کیت DNA Miniprep هم برای تجزیه و تحلیل توالی‌یابی و هم برای اعمال ترادیسی به سلول‌ها مورد نیاز است. در صورت لزوم، اطلاعات لازم در مورد خالص‌سازی پلازمید (جلسه دوم آزمایشگاه) را مطالعه کنید.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

الف. جداسازی DNA از کیت Miniprep

این شیوه‌نامه از کتابچه راهنمای QIAGEN QIAprep Miniprep Kit (ژوئن ۲۰۱۵) اصلاح و اقتباس شده است. توجه: تمام مراحل این فرآیند باید در دمای اتاق انجام شود. قابل توجه مربیان: تعداد زیادی کیت Miniprep دیگر برای خالص‌سازی DNA موجود است. در صورت استفاده از کیت دیگر، از شیوه‌نامه برای خالص‌سازی پلازمید با تعداد نسخه‌های بالا استفاده کنید. برای آماده‌سازی معرف‌ها، به حتم پیش از استفاده، شیوه‌نامه‌های کیت را مطالعه کنید.

- ۱- سه ویال میکروسانتریفیوژ استریل را مطابق با برچسب ویال‌های کشت شبانه خود برچسب بزنید.
- ۲- با استفاده از یک سمپلر، مقدار تقریبی $1/5\text{ mL}$ از هر یک از سه کشت خود را به ویال میکروسانتریفیوژ متناظر منتقل کنید.
- ۳- سلول‌های باکتریایی را به مدت ۳ دقیقه و با سرعت 8000 rpm سانتریفیوژ و برداشت کنید. تمامی بخش‌های سوپرناتانت را از طریق ریختن و یا سمپلر کردن محیط، از ویال خارج کنید و در ظرف زباله مخصوص و یا وایتکس ۱۰ درصد بریزید. (توجه: در صورت نیاز به متوقف کردن فرآیند، کلاف‌های سلولی را در دمای 20°C - منجمد کنید).
- ۴- کلاف باکتریایی را در $250\text{ }\mu\text{L}$ بافر P1 (بافر تعلیق مجدد) دوباره تعلیق کنید. باکتری‌ها باید به‌طور کامل معلق شوند تا زمانی که هیچ توده سلولی باقی نماند.
- ۵- مقدار $250\text{ }\mu\text{L}$ بافر P2 را اضافه کنید. محتویات ویال را به آرامی با ۴-۶ بار وارونه کردن مخلوط کنید. ورتکس نکنید، زیرا این امر باعث تخریب DNA ژنومی می‌شود. در صورت لزوم، وارونه کردن ویال را ادامه دهید تا محلول چسبناک و کمی شفاف شود. اجازه ندهید که واکنش هضم بیش از ۵ دقیقه ادامه یابد. بافر P2 حاوی یک شوینده (SDS) برای هضم سلولی و هیدروکسید سدیم برای واسرشته کردن DNA است.
- ۶- مقدار $350\text{ }\mu\text{L}$ بافر N3 را به عصاره اضافه کنید و بلافاصله از طریق ۴-۶ بار وارونه کردن (به آرامی) محتویات ویال را مخلوط کنید. پس از افزودن بافر N3، یک رسوب سفید کلاف مانند حاوی DNA ژنومی، پروتئین‌ها، بقایای سلولی و SDS قابل مشاهده خواهد بود. بافرها باید به‌طور کامل مخلوط شوند. اگر ترکیب همچنان چسبناک و قهوه‌ای به نظر رسید، برای خنثی‌سازی کامل محلول به وارونه کردن بیشتری نیاز است. بافر N3 محلول را خنثی می‌کند و باعث وصل شدن مجدد DNA پلازمید می‌شود، همچنین DNA کروموزومی و پروتئین‌های نامحلول را رسوب می‌دهد.
- ۷- ویال‌ها را در یک میکروسانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و در سرعت 13000 rpm ، سانتریفیوژ کنید.
- ۸- سوپرناتانت (مایع بالای کلاف) حاصل شده از مرحله ۷ را از طریق پایپت کردن، روی ستون چرخشی QIAprep (حاوی غشای سیلیکایی) اعمال کنید. (مراقب باشید که رسوب کرکی شکل منتقل نشود). ستون را در لوله همراه قرار دهید.
- ۹- به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید. محلول خروجی را دور بریزید.
- ۱۰- ستون چرخش QIAprep را با افزودن $0/5\text{ mL}$ بافر PB بشوئید، سپس به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید. محلول خروجی را دور بریزید.

۱۱- ستون چرخش QIAprep را با افزودن ۰/۷۵mL بافر PE بشوید، سپس به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید.

۱۲- محلول خروجی را دور بریزید، سپس به مدت یک دقیقه دیگر سانتریفیوژ کنید تا باقیمانده بافر شست‌وشو حذف شود.

۱۳- هر ستون را در یک ویال ۱/۵mL میکروسانتتریفیوژ تمیز قرار دهید. ویال‌ها را با شماره کلون pLentiCRISPR-sgRNA _____، تاریخ و حروف اول اسم خود علامت بزنید.

۱۴- برای شویش DNA، ۵۰ μL بافر EB را به مرکز هر ستون اضافه کنید، یک دقیقه صبر کنید، سپس یک دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۱۵- برای تعیین غلظت و خلوص نمونه‌های DNA خود، از یک نانودراپ یا اسپکتروفتومتر استفاده کنید. دقت کنید که غلظت DNA (شامل واحدها) را یکراست روی ویال‌های میکروسانتتریفیوژ علامت‌دار بنویسید.

قابل توجه مربیان: شیوه‌نامه زیر برای آماده‌سازی نمونه برای ارسال به مرکز توالی‌یابی GENEWIZ ارائه شده است. تجهیزات توالی‌یابی مختلفی در سراسر جهان وجود دارد که در اختیار مؤسسه‌های علمی مختلف قرار گرفته است. در صورت استفاده از تجهیزات دیگر، شیوه‌نامه‌های آماده‌سازی نمونه‌ها برای آن تجهیزات را مطالعه کنید.

ب. آماده کردن نمونه‌ها برای توالی‌یابی

۱- سه ویال PCR با دیواره ظریف تهیه کنید، سپس واکنش‌های توالی‌یابی خود را در آن‌ها تنظیم کنید. مربی شما اطلاعات لازم در مورد علامت زدن ویال‌ها را در اختیار شما قرار خواهد داد.

۲- با استفاده از DNA Miniprep، حجم هر نمونه را به صورتی تنظیم کنید که مقدار DNA آن به ۱۰۰۰ng برسد. دستگاه توالی‌یابی مقدار تقریبی ۱۰ μL را پذیرش می‌کند. (توجه: اگر DNA شما غلظت کمتری دارد، از هر مقداری که در اختیار دارید، استفاده کنید).

۳- برای واکنش‌های توالی‌یابی، ما از یک آغازگر توالی‌یابی رایگان استفاده خواهیم کرد که در بیشتر مراکز توالی‌یابی در دسترس قرار دارد. این آغازگر مخصوص پروموتور U6 است. در وکتور pLentiCRISPR-E، پروموتور U6 انسانی بلافاصله در بالادست مکانی است که شما به صورت بالقوه sgRNA خود را در آن مکان کلون‌سازی خواهید کرد (شکل‌های ۲۳-۳ و ۲۳-۴). اندازه کوتاه قطعه sgRNA الحاقی شما این امکان را فراهم می‌کند که واکنش توالی‌یابی، تعدادی کافی از توالی‌ها (با کیفیت بالا) را تنها با استفاده یک آغازگر

توالی‌یابی تولید کند. توجه: اگر مرکز توالی‌یابی شما، فاقد یک آغازگر توالی‌یابی متصل شونده به پروموتور U6 باشد، می‌توانید از آن‌ها درخواست سنتز آغازگر زیر را برای استفاده در واکنش‌های توالی‌یابی خود داشته باشید:

5'GAC TAT CAT ATG CTT ACC GT 3'

۴- ویال‌ها را برای ارسال به GENEWIZ یا یک مرکز توالی‌یابی دیگر، به مربی خود تحویل دهید.

۵- پلازمید حاصل شده از کیت Miniprep را در فریزر -20°C نگهداری کنید.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- نقشه وکتور pLentiCRISPR-E را بررسی کنید (شکل ۲۵-۳). در کدام قسمت دیگر از وکتور می‌توان یک آغازگر توالی‌یابی را به‌منظور تأیید حضور sgRNA طراحی و متصل کرد؟
- ۲- pLentiCRISPR-E و pEGFP-N1 را مقایسه کنید. در صورت تلقیح سلول‌های ترادیدی شده با CRISPR توسط محیط LB/kan، چه اتفاقی رخ خواهد داد؟

کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و هشتم
CRISPR پیشرفته، بخش چهارم

کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و هشتم-الف CRISPR پیشرفته، بخش چهارم

۱- مقدمه

برای کسب اطلاعات بیشتر در مورد توالی‌یابی سانگر، به جلسات هفتم و هشتم مراجعه کنید.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

الف. تجزیه و تحلیل محاسباتی توالی DNA^۱

۱- برای مشاهده نتایج توالی‌یابی خود، به فایل‌های حاوی آن‌ها نیاز خواهید داشت. آن‌ها به‌طور معمول به‌صورت فایل‌های .abi ذخیره می‌شوند. با استفاده از برنامه‌های خاصی می‌توان این فایل‌ها را مشاهده کرد. شیوه‌نامه‌های ارائه شده در این جلسه آزمایشگاهی، مختص نرم‌افزار Chromas است که به‌صورت رایگان توسط Technelysium Pty Ltd^۲ ارائه شده است، اما کاربرد عمومی بیشتر آن‌ها مشابه است و می‌توانند عملکردهای مشابهی را در اختیار قرار دهند. در مورد کاربران مک، نرم‌افزار رایگان و محبوب Finch TV عملکرد مشابهی ارائه می‌دهد.

۲- کروماتوگرام را به‌صورت تصویری اسکن کنید تا طول توالی حاوی داده‌های با کیفیت بالا و بدون N (فقط چند N) را تعیین کنید. تجهیزات توالی‌یابی همچنین ممکن است مقادیر کیفی و طولی هر نمونه را در اختیار شما قرار دهد.

۳- مکان دقیق توالی الحاقی شما را نمی‌توان با جستجوی سایت BsmBI پیدا کرد، زیرا این قسمت در طول فرآیند کلون کردن از بین رفته است. به‌جای این عمل، می‌توان توالی الحاقی را با توجه به اندازه کوچک آن جست‌وجو کرد. برای جست‌جوی توالی نوکلئوتیدی، می‌توانید از گزینه Find در باند ابزار استفاده کنید. قابلیت تطابق توالی به‌دست‌آمده را با اولیگوی sgRNA سنس (۲۰ نوکلئوتید) طراحی شده توسط شما بررسی و تعیین کنید که هیچ نوکلئوتید مبهمی در این ناحیه وجود نداشته باشد. برای شناسایی انتهای ۵' اولیگوی sgRNA خود در فرآیند توالی‌یابی، توالی CACCG را جست‌جو کنید. توالی اوورهنک CACCG، بلافاصله در بالادست ۲۰ نوکلئوتید (MER۲۰) و در اولیگو sgRNA بالا، به‌منظور تولید انتهای مکمل برای وصل شدن به وکتور هضم شده با

1. Computational. analysis. of. DNA. sequences

2. <http://technelysium.com.au/wp/chromas/>

BsmBI، توسط شما مهندسی گردید. برای جست‌وجوی انتهای ۳' sgRNA الحاقی خود، داربست^۱ (اسکافولد) gRNA را جستجو کنید. همان‌طور که در شکل‌های ۲۳-۳ و ۲۵-۳ نشان داده شده است، این قسمت بخشی از وکتور pLentiCRISPR-E است. این توالی با GTTTT در رشته بالا شروع می‌شود. بررسی کنید که توالی ۲۰ نوکلئوتیدی موجود بین ۵' CACCG و ۳' GTTTT، با sgRNA طراحی شده توسط شما مطابقت داشته باشد. این تجزیه و تحلیل را با هر فایل توالی‌یابی دریافتی در گروه خود مقایسه کنید.

۴- یک BLAST نوکلئوتیدی را انجام دهید^۲ نتایج این قسمت نسبت به نتایج BLAST پیشین برای انجام توالی‌یابی تأیید کلون‌سازی ژن *egfp*، ممکن است متفاوت باشد. شما نیازی به انجام جستجوی BLAST برای نتایج توالی‌یابی خود با تمامی ژن‌ها را ندارید، زیرا این قطعه الحاقی را به صورتی طراحی کرده‌اید که مختص یک ژن معین باشد. در عوض، یک نوکلئوتید BLAST به شما این امکان را خواهد داد که دو توالی طراحی شده را هم‌ترازی کنید. از علامت زدن کادر «تراز دو یا چند توالی» - Align two or more sequences اطمینان حاصل کنید (شکل ۲۸-۱). در نتیجه این امر، این دو کادر نمایش داده می‌شود: «Query sequence» و «Subject sequence». نتایج توالی‌یابی خود را در کادر Query sequence و شماره یکتای ژن مورد نظر خود را در کادر subject sequence قرار دهید. انتخاب برنامه را در حالت «Megablast» قرار دهید. نتایج شما باید رشته‌های کوتاهی از توالی را نشان دهند که به میزان ۱۰۰ درصد با ژن مورد علاقه شما، هم‌تراز هستند. این تجزیه و تحلیل را با هر فایل توالی‌یابی دریافتی در گروه خود مقایسه کنید.

۵- نتایج BLAST نوکلئوتید خود را به مربی ارائه کنید. سپس مربی تأیید خواهد کرد که آیا نتایج توالی‌یابی شما، قطعه الحاقی صحیح (رشته sgRNA بالا) را نشان می‌دهد یا خیر. ممکن است تمامی سلول‌های ترادیدی شده که توالی‌یابی غربال شده‌اند، مثبت باشند. یکی از نمونه‌ها که بهترین نسبت A260/A280 (در جلسه ۲۷-ب) را به خود اختصاص داده بود، انتخاب کنید؛ زیرا برای ادامه آزمایش فقط به یک نمونه نیاز خواهید داشت. اگر در گروه شما خوانش‌های توالی‌یابی با کیفیت یا سلول‌های ترادیدی شده قطعه الحاقی

1. Scaffold

2https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&BLAST_SPEC=blast2seq

شما وجود نداشت، می‌توانید پس از مشورت با مربی، سلول‌های ترادیدی شده دیگر را غربال یا از DNA پلازمید گروه‌های دیگر استفاده کنید.

شکل ۲۸-۱: نمونه‌ای از BLAST نوکلئوتید در NCBI.

ب. شمارش و پلیت کردن سلول‌های پستانداران بیان کننده EGFP

هنگام کار با سلول‌ها در کشت، از تکنیک ضد عفونی استفاده کنید (برای مطالعه، به جلسه ۱۸ آزمایشگاه مراجعه کنید). توجه: اگر گروه شما بیش از یک sgRNA آزمایشی را تجزیه و تحلیل می‌کند، باید چاهک‌های بیشتری را بر مبنای آن‌ها پلیت کنید. شیوه‌نامه‌های زیر برای تهیه کنترل‌های مناسب و سه چاهک آزمایشی برای بهینه‌سازی ترادیدی یک sgRNA طراحی شده توسط شما، ارائه شده است.

۱- مشابه جلسه ۱۸ آزمایشگاه، پیش از آغاز کار با سلول‌ها، هود لامینار را روشن، تمیز و آماده کنید. تمام مواد و تجهیزات مصرفی مورد نیاز خود را برای این مراحل از پیش آماده کنید: سرسمپلر استریل، پایپت پاستور استریل، پایپت سرولوژیک استریل و یک پلیت استریل ۴۸ چاهکی. سمپلرها و پیتورها باید در هود لامینار باقی بمانند.

۲- یک پتری‌دیش یا فلاسک ۱۰ سانتی‌متر مربعی از سلول‌های HEK293 که توسط مربی شما فراهم شده است، تهیه کنید. تلقای و ریخت‌شناسی آن‌ها را مشاهده کنید و جزئیات را در دفترچه آزمایشگاه خود بنویسید. در صورت مشاهده هرگونه علائم آلودگی، بلافاصله

به مربی خود اطلاع دهید. همچنین به رنگ محیط رشد کشت سلولی (حاوی محیط رشد کامل) خود توجه کنید. محیط رشد کامل برای سلول‌های HEK293 محیط Dulbecco's Modified Eagle's Medium با گلوکز فراوان (4500 mg/L) است که حاوی ۱۰ درصد FBS، 1 mM آمینواسیدهای غیر ضروری، 2 mM ال-گلوتامین، 1 mM سدیم پیرووات، 1500 mg/L سدیم بی‌کربنات و ۱ درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین است. این محیط همچنین حاوی فنول قرمز است که نشانگر pH است. اگر رنگ محیط به زرد (اسیدی) یا بنفش (بازی) تغییر کرد، به مربی خود اطلاع دهید.

۳- با استفاده از پایپت پاستور استریل، محیط را از پتری‌دیش خارج کنید. این کار باید به آرامی انجام شود؛ ظرف را به سمت خود بچرخانید و نوک پایپت پاستور را در ته ظرف قرار دهید و تا زمانی که تمام محیط به داخل پایپت کشیده شود، آن را ظرف نگه دارید. نقطه‌ای را که در آن نوک پایپت قرار گرفت را به خاطر بسپارید. شما همیشه از این نقطه آسپیراسیون کنید تا از آسپیراسیون سلول‌ها از ظرف خود جلوگیری کنید.

۴- به آرامی در حدود 2 mL از $1 \times \text{PBS}$ استریل را به پتری‌دیش اضافه کنید و با دقت بچرخانید. هر زمان که سلول‌های خود را خارج یا به آن مایع اضافه می‌کنید، به حتم این کار را از همان مکان انجام دهید تا از جابجایی سلول‌ها جلوگیری کنید.

۵- PBS را از ظرف خارج کنید.

۶- مقدار $2/5 \text{ mL}$ از محلول $0/25$ درصد تریپسین-EDTA از پیش گرم شده را به ظرف اضافه کنید و برای اطمینان از پوشش کافی در کف، روی ظرف بچرخانید. ظرف را دوباره در انکوباتور قرار دهید و تایمر خود را برای ۲ تا ۳ دقیقه تنظیم کنید. تریپسین یک پروتئاز حاوی سرین است که وصل شدن سلولی و همچنین تماس‌های ایجاد شده بین سلول‌ها و ظرف پلاستیکی را با بریدن قسمت C ترمینال لیزین یا آرژنین از بین می‌برد. تریپسین شدن بیش از حد می‌تواند به سلول‌های شما آسیب وارد کند؛ بنابراین اطمینان حاصل کنید که آن را بیش از زمان مشخص شده تیمار نکنید. EDTA یک شلاته‌ساز^۱ فلزی دو ظرفیتی است. مولکول‌های چسبنده که متشکل از برهمکنش‌های سلول-سلول و ماتریکس-سلول هستند، به Ca^{2+} و Mg^{2+} نیاز دارند؛ بنابراین، EDTA می‌تواند این فعل و انفعالات را تضعیف و به ساده کردن جدا شدن توسط تریپسین کمک کند.

1. Chelator.

۷- سلول‌های خود را زیر میکروسکوپ مشاهده کنید. سلول‌های جدا شده در محیط شناور می‌شوند و گرد به نظر می‌رسند. ممکن است بخواهید به آرامی اما محکم روی یک سطح استریل ضربه بزنید تا به جدا شدن بیشتر سلول‌های خود کمک کنید. اگر هنوز ۵۰ درصد (بیشتر) از سلول‌های شما به ظرف چسبیده‌اند، آن را به مدت ۲ دقیقه دیگر در انکوباتور 37°C قرار دهید.

۸- پس از جدا شدن سلول‌ها، ۵mL از محیط رشد کامل (DMEM) از پیش گرم شده را اضافه کنید تا تریپسین غیرفعال شود. محیط را چندین بار به آرامی روی سطح لایه سلولی پایت کنید تا از جدا شدن اطمینان حاصل کنید. پایت کردن شدید می‌تواند باعث ایجاد آسیب سلولی شود، بنابراین مراقب باشید.

۹- به آرامی ظرف را بچرخانید تا مطمئن شوید که سلول‌ها به‌طور یکنواخت توزیع شده‌اند. اکنون آماده شمارش سلول‌های خود با استفاده از هماسیتومتر هستید. نکته برای صرفه‌جویی در زمان: می‌توان از یک شمارشگر سلولی خودکار مانند Cellometer از شرکت Nexcelom استفاده کرد.

هماسیتومترها دستگاه‌هایی هستند که برای شمارش سلول‌ها استفاده می‌شوند. روش ارائه شده در زیر برای هماسیتومترهای شیشه‌ای مناسب است، اگرچه می‌توان از نمونه‌های پلاستیکی یک‌بار مصرف نیز استفاده کرد.

۱۰- محفظه و لامل را با الکل ۷۰ درصد تمیز کنید. روکش را خشک کنید و در جای خود قرار دهید.

۱۱- سلول‌ها را به بالا و پایین پایت کنید تا مخلوط شوند. با استفاده از سرسمپلر استریل، ۲۰ μL از سوسپانسیون سلولی را با دقت خارج کنید. این ۲۰ μL را به هر محفظه هماسیتومتر اضافه کنید. این عمل را با آهسته پایت کردن سوسپانسیون سلولی بین لامل و هماسیتومتر انجام دهید، عمل مویینگی محلول را در یک لایه یکنواخت بین دو سطح پخش می‌کند. محفظه را بیش از حد پر نکنید.

۱۲- محفظه را در میکروسکوپ زیر یک شیئی $\times 10$ و با استفاده از کنتراست فاز و فوکوس مسیر/ ریز قرار دهید تا سلول‌ها و خطوط شبکه هماسیتومتر را تشخیص دهید.

۱۳- با استفاده از شمارنده دستی، سلول‌های موجود در یک مجموعه ۱۶ مربعی را بشمارید (شکل ۱۸-۳). هنگام شمارش، سلول‌هایی را که در مرزهای وسط، بالا و سمت راست قرار می‌گیرند، بگنجانید.

- ۱۴- هماسیتومتر را به مجموعه بعدی ۱۶ مربعی منتقل کنید و تا برآورد تعداد سلول‌های هر چهار مجموعه ۱۶ مربعی، شمارش را ادامه دهید. به حتم تعداد سلول‌های ثبت شده از هر مربع را در دفترچه آزمایشگاه خود ثبت کنید.
- ۱۵- میانگین تعداد سلول‌ها را از هر یک از مجموعه‌های ۱۶ مربعی برآورد و در ۱۰۰۰۰ ضرب کنید (۱۰^۴). عدد نهایی کل مقدار سلول به ازای هر میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی شما است.
- ۱۶- حجم سلول‌های مورد نیاز برای کاشت تراکم 4×10^5 سلول در یک چاهک از یک پلیت ۶ چاهکی را با استفاده از فرمول $C_1 V_1 = C_2 V_2$ محاسبه کنید:
- C_1 : غلظت سلول‌های شمارش شده (cells/mL):
- V_1 : حجم سوسپانسیون سلولی (mL) مورد نیاز (مجهول):
- C_2 : غلظت مطلوب سلول‌ها: $1/6 \times 10^5$ cells/mL
- V_2 : حجم کل مورد نظر: ۲/۵ mL
- ۱۷- حجم مناسبی از سوسپانسیون سلولی را به یک ویال مخروطی استریل ۱۵mL اضافه کنید. حجم کل را با محیط کامل به ۲/۵mL برسانید. خوب مخلوط کنید. با دقت پایت کنید (از تشکیل حباب جلوگیری کنید) و بلافاصله ۰/۲۵mL سوسپانسیون سلولی را به هر چاهک از پلیت ۴۸ چاهکی (در کل برای ۶ چاهک) خود اضافه کنید.
- ۱۸- در ادامه، مقدار ۰/۱۲۵mL از سوسپانسیون سلولی را به شش چاهک مختلف اضافه کنید.
- ۱۹- مقدار ۱۲۵μL از محیط کامل (DMEM) بدون آنتی‌بیوتیک‌ها را به منظور رساندن حجم کل چاهک‌ها به ۲۵۰μL به آن‌ها اضافه کنید. اکنون شما باید شش چاهک با 4×10^4 سلول و شش چاهک با نصف مقدار ذکر شده (2×10^4) سلول را در اختیار داشته باشید.
- ۲۰- اطلاعات دقیق مربوط به خود و همچنین تاریخ را روی درب پلیت درج کنید. پلیت را به انکوباتور بازگردانید. مربی به شما خواهد گفت که چگونه سلول‌های اضافی خود را دفع کنید.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- بیشتر موارد خوانش توالی‌یابی شما به ژن مورد نظر شما BLAST نمی‌شود. چرا؟
- ۲- محدودیت اصلی کلون‌سازی اولیگو متصل شده چیست؟ آیا از این روش می‌توانید به جای روش کلون‌سازی با PCR در جلسه سوم آزمایشگاه استفاده کنید؟ چرا؟

کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و هشتم-ب

جلسه موقت آزمایشگاه

ترادیسی با وکتورهای CRISPR

۱- مقدمه

اکنون که داده‌های توالی‌یابی گروه خود را تجزیه و تحلیل و تأیید کردید که یک sgRNA مورد نظر شما در pLentiCRISPR-E کلون شده است، می‌توانید آن پلازمیدها را به سلول‌های HEK293 منتقل کنید که به‌طور پایدار EGFP را بیان می‌کنند. این امر به سلول‌ها اجازه می‌دهد:

- ۱- sgRNA (های) مختص ژن مورد نظر خود را در ژنوم انسان رونویسی کنید.
- ۲- نوکلئاز Cas9 را رونویسی و ترجمه می‌کند که با sgRNA یک کمپلکس را به وجود می‌آورد. در نتیجه این امر، شکستگی‌های دو رشته‌ای در ژن مورد نظر شما ایجاد می‌شود تا مسیر NHEJ فعال شود. برای کسب اطلاعات بیشتر در مورد انتقال سلول‌های پستانداران، جلسه ۱۹ آزمایشگاه را مرور کنید.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

توجه: اگر گروه شما بیش از یک sgRNA آزمایشی را تجزیه و تحلیل می‌کند، باید چاهک‌های بیشتری را بر این مبنای آن‌ها پلیت کنید. شیوه‌نامه‌های زیر برای تهیه کنترل‌های مناسب و سه چاهک آزمایشی برای بهینه‌سازی ترادیسی یک sgRNA طراحی شده توسط شما، ارائه شده است. به‌منظور آشنایی بیشتر چارچوب کلی فرآیند انتقال، به شکل ۱۹-۳ مراجعه کنید. این روش از شیوه‌نامه مربوط معرف انتقال FuGENE HD Promega اصلاح و اقتباس شده است:

- ۱- معرف FuGENE HD را از یخچال 4°C خارج کنید و اجازه دهید به دمای اتاق برسد. پیش از استفاده به‌آرامی و با وارونه کردن ویال، معرف را مخلوط کنید.
 - ۲- در دفترچه یادداشت خود، جدولی مشابه جدول ۱-۲۸ ترسیم کنید.
- الف. کنترل‌های منفی شامل، تنها Opti-MEM (بدون پلازمید یا FuGENE HD) و pLentiCRISPR-E (که تنها حاوی Cas9 است و هیچ sgRNA را تولید نمی‌کند) خواهد بود.

ب. کنترل مثبت شما برای CRISPR یک sgRNA تأیید شده در برابر *egfp* خواهد بود. این کنترل، ژن مورد نظر شما را هدف قرار نمی‌دهد و توسط مربی شما ارائه می‌شود (ممکن است آن را از جلسه آزمایشگاه قبلی ذخیره کرده باشید).

پ. غلظت هر پلازمید pLentiCRISPR sgRNA که با Mini-prep تیمار شده است (جلسه ۲۷) را بررسی کنید. شما باید بر اساس نتایج توالی‌یابی، DNA پلازمید آزمایشی برای انتقال را انتخاب کنید. غلظت آن را در سه ردیف آخر جدول ۱-۲۸ (pLentiCRISPR-sgRNA) ثبت کنید.

۳- پلیت ۴۸ چاهکی حاوی سلول‌های HEK293 گروه خود را که روز قبل آماده شده بود آماده کنید. محیط را از هر چاهک خارج و با ۰/۲۵ mL سرم تازه حاوی محیط کامل (DMEM) و بدون هیچ‌گونه آنتی‌بیوتیک، جایگزین کنید.

۴- با استفاده از میکروسکوپ و عدسی شیئی ۱۰×، ریخت‌شناسی و تلاقی سلول‌های خود را در زیر نور سفید مشاهده و ثبت کنید. درصد تلاقی سلول‌های شما باید در محدوده ۶۰-۸۰ درصد و همراه تعداد اندکی سلول شناور در محیط باشد. شما سلول‌ها را با دو تراکم مختلف پلیت کردید. شما باید تراکمی را انتخاب کرده باشید که منجر به ایجاد سلول‌هایی با ۶۰-۸۰ درصد تلاقی خواهد شد؛ زیرا شما تنها آن شش چاهک را منتقل خواهید کرد. اگر متوجه هرگونه علائم آلودگی شدید یا اگر هیچ‌یک از سلول‌های شما در محدوده تلاقی ۶۰-۸۰ درصدی قرار نداشت، به مربی خود اطلاع دهید. پلیت خود را به انکوباتور کشت سلولی بازگردانید.

۵- در هود لامینار، شش ویال میکروسانتریفیوژ استریل را مطابق با جدول ۱-۲۸ علامت بزنید. برای بهینه‌سازی بازدهی انتقال و در نتیجه فرآیند ویرایش ژن، بهتر است مقادیر مختلفی از پلازمید را منتقل کنید؛ بنابراین، شما سه ترکیب انتقال مختلف را با افزایش مقادیر وکتور CRISPR نو ترکیب خود (pLentiCRISPR-sgRNA) آماده خواهید کرد: ۰/۲۸، ۰/۵۶ و ۰/۸۴ میکروگرم. ویال‌ها را طبق محتوی ترکیبات علامت بزنید. نسبت میکروولیتتر به میکروگرم FuGENE HD:DNA را به صورت ۵:۱ حفظ کنید.

CRISPR جدول ۲۸-۱: تنظیمات تجربی سرکوب ژن مورد نظر با واسطه CRISPR

ویال	پلازمید	غلظت (µg/µL)	حجم افزودنی (µL) برای ۲۸ پلازمید	حجم افزودنی (µL) برای ۵۶ پلازمید	حجم افزودنی (µL) برای ۸۴ پلازمید	Opti-MEM (µL)	FUGENE HD (µL)
تنها Opti-MEM (کنترل منفی)	بدون پلازمید	۰	۰	۰	۰	۱۲	۰
خالی (کنترل منفی)	pLentiCRISPR-E			N/A	N/A	بیش از ۱۲	۱/۴
<i>egfp</i> (کنترل منفی برای CRISPR)	pLentiCRISPRGFP			N/A	N/A	بیش از ۱۲	۱/۴
آزمایشی	pLentiCRISPRsgRNA			N/A	N/A	بیش از ۱۲	۱/۴
آزمایشی	pLentiCRISPRsgRNA		N/A	N/A	N/A	بیش از ۲۴	۲/۸
آزمایشی	pLentiCRISPRsgRNA		N/A	N/A		بیش از ۳۶	۴/۲

۶- مقدار مناسبی از هر DNA پلازمید را به ویال متناظر آن اضافه کنید. برای تمام ویال‌هایی که $0.28 \mu\text{g}$ از DNA پلازمید دریافت می‌کنند، OptiMEM را به منظور رساندن حجم کل به $12 \mu\text{L}$ اضافه کنید.

نکته برای صرفه‌جویی در هزینه: می‌توان به جای OptiMEM، از محیط‌های بدون سرم استفاده کرد.

۷- برای ویال‌های آزمایشی که $0.56 \mu\text{L}$ از DNA پلازمید دریافت می‌کنند، OptiMEM را به منظور رساندن حجم کل به $24 \mu\text{L}$ اضافه کنید.

۸- برای ویال‌های آزمایشی که $0.84 \mu\text{L}$ از DNA پلازمید دریافت می‌کنند، OptiMEM را به منظور رساندن حجم کل به $26 \mu\text{L}$ اضافه کنید (جدول ۱-۲۸).

۹- برای حفظ نسبت ۵:۱ FuGENE HD:DNA در برخی از نمونه‌ها که مقدار DNA افزایش پیدا می‌کند، حجم FuGENE HD نیز باید افزایش پیدا کند. حجم مشخص شده از معرف FuGENE HD را با دقت به DNA رقیق شده با Opti-MEM اضافه کنید (جدول ۱-۲۸). اجازه ندهید که معرف FuGENE HD یکراست با دیواره‌های پلاستیکی ویال تماس پیدا کند؛ زیرا این عمل بازدهی انتقال را به شدت کاهش می‌دهد. سر سمپلرها را برای هر نمونه عوض کنید. محتویات موجود در هر ویال را با پایپت کردن به بالا و پایین یا با ورتکس مختصر مخلوط کنید. ویال‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه در هود لامینار قرار دهید. این زمان به تشکیل ترکیب‌های DNA:FuGENE HD منجر می‌شود؛ بنابراین DNA را قادر می‌سازد تا وارد سلول‌ها شود.

۱۱- پلیت ۴۸ چاهکی گروه خود را از انکوباتور خارج کنید. چاهک‌های پلیت را بر اساس محتوای آن و طبق جدول ۱-۲۸ علامت بزنید.

۱۲- تمام حجم ترکیب‌های انتقال را به صورت قطره‌ای به چاهک مربوطه در پلیت ۴۸ چاهکی اضافه کنید. برای اطمینان از مخلوط شدن کامل ترکیب FuGENE HD:DNA در سرتاسر محیط، پلیت را به آرامی به جلو و عقب تکان دهید، سپس آن را به انکوباتور 37°C بازگردانید. در جلسه بعدی آزمایشگاه، gDNA را از این سلول‌های منتقل شده برداشت کنید تا ارزیابی ویرایش ژن با واسطه CRISPR را آغاز کنید.

کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و نهم

CRISPR پیشرفته: بخش پنجم

هدف: امروز شما سلول‌های منتقل شده با وکتورهای CRISPR را هضم می‌کنید و با استفاده از PCR، ناحیه DNA ژنومی (gDNA) را که قصد هدف قرار دادن آن با sgRNA های خود دارید، تکثیر می‌کنید.

۱- مقدمه

تمامی sgRNA ها در هدف قرار دادن یک ژن معین، به یک اندازه مؤثر نیستند. همان‌گونه که در جلسه‌های پیش نشان داده شد، یک الگوریتم رایانه‌ای برای کمک به طراحی sgRNA های شما و به منظور به حداکثر رساندن رخدادهای برشی در ژن مورد نظر شما، درعین حال به حداقل رساندن اثرات خارج از هدف استفاده شد. با توجه به این امر، پیشنهاد می‌شود که محققان sgRNA های متعددی را طراحی و آزمایش کنند. این استراتژی طراحی تجربی، شبیه به استراتژی RNAi است. حتی اگر یک sgRNA سبب ایجاد یک شکستگی دو رشته‌ای در ژن و منجر به الحاق یا حذف قطعات ژنی شود، باید سایر نتایج احتمالی را در نظر گرفت. انتقال وکتور CRISPR که sgRNA و Cas9 را کد می‌کند، هرگز به صورت ۱۰۰ درصد مؤثر نخواهد بود. علاوه بر این، از آنجایی که شما به طور موقت سلول‌ها را منتقل کرده‌اید، ناقل CRISPR فقط در یک زیر جمعیت از سلول‌ها تولید می‌شود. به منظور به حداکثر رساندن کارایی انتقال، به شما پیشنهاد شد که مقادیر متعددی از وکتور CRISPR را در سلول‌های انتقالی خود آزمایش کنید. حتی در سلول‌هایی که وکتور را دریافت کرده‌اند، sgRNA ها ممکن است تنها یکی از دو آلل را برای ژن مورد نظر شما هدف قرار دهند. این امر سبب ایجاد DSB های هتروزیگوت (نه هموزیگوت) خواهد شد؛ بنابراین، آزمایش‌های CRISPR نه تنها به بازدهی انتقال، بلکه به بازدهی برش نیز بستگی دارند.

یک محقق باید تأیید کند که یک sgRNA سبب ایجاد یک ایندل در مکان مورد نظر شده است. آزمایش CRISPR با هدف سرکوب *egfp* (جلسات آزمایشگاهی ۲۳ و ۲۴) از این نظر منحصر به فرد بود که یک فرآورده ژنی فلورسنت قابل ردیابی، مورد هدف قرار گرفته است. در بیشتر موارد، ژن مورد نظر شما با چشم قابل تشخیص نیست. به همین منظور، برای تجزیه و تحلیل دقت هدف‌گیری، باید از روش‌های بیوشیمیایی استفاده کرد. اندازه‌گیری کمی شکاف‌های حاصل از gDNA به شما این امکان را می‌دهد تا مؤثرترین sgRNA را برای پیشبرد آزمایش‌های ویرایش ژن با واسطه CRISPR انتخاب کنید. طرح شماتیک این جلسه و جلسه بعدی که به عنوان مبنای

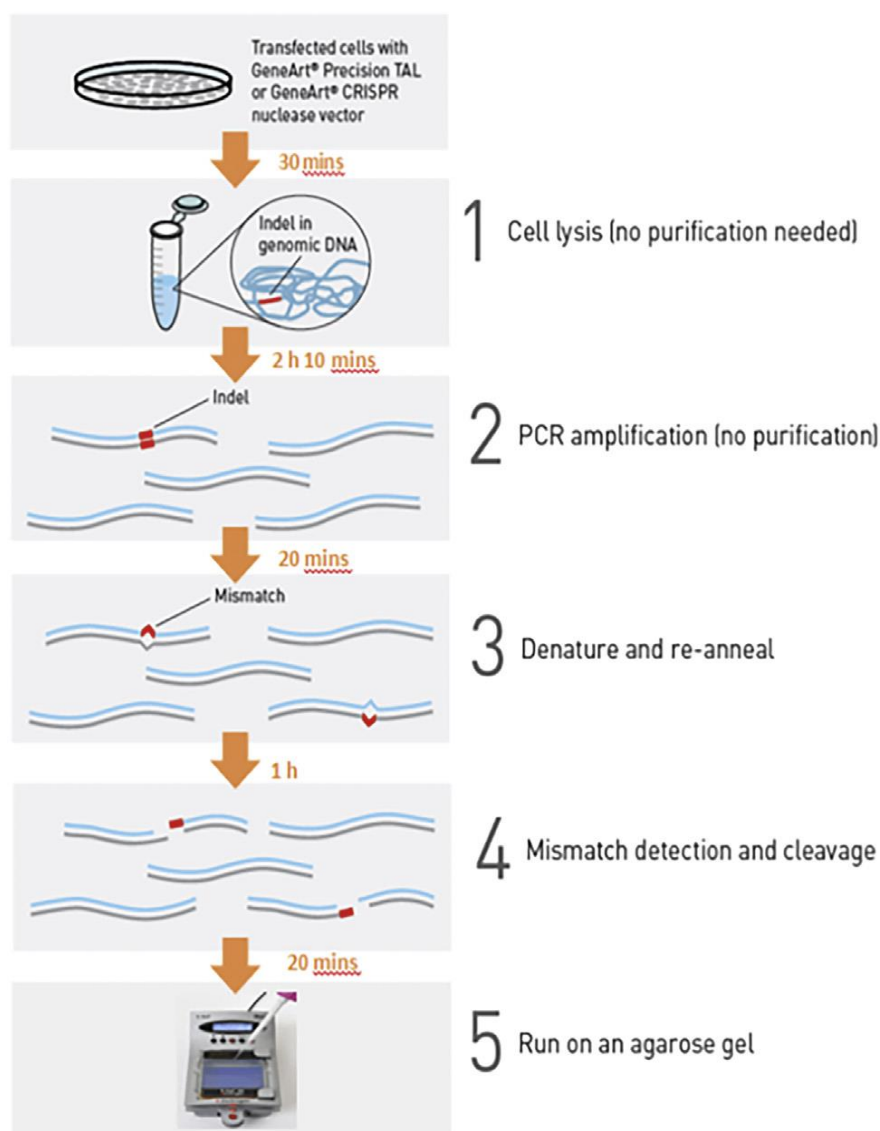
اولیه این انتخاب‌ها عمل خواهند کرد، در تصویر ۱-۲۹ ارائه شده است. امروز، شما gDNA را از سلول‌های منتقل شده با وکتور CRISPR جدا می‌کنید؛ زیرا این همان gDNA است که شما قصد مختل کردن آن را داشتید. سپس، شما از PCR برای تکثیر یک قطعه از gDNA که حاوی لکوس مورد نظر شما برای ایجاد شکستگی‌های دو رشته‌ای خواهد بود، استفاده خواهید کرد. توجه کنید که این قطعه بلافاصله در بالادست یک مکان PAM قرار گرفته است. در جلسه بعدی آزمایشگاه، شما رشته‌های فرآورده PCR را واسرشته و دوباره متصل می‌کنید و به‌منظور شناسایی عدم تطابق نوکلئوتیدها در DNA، یک آنزیم را اضافه خواهید کرد. عدم تطابق نشان خواهد داد که یک رشته DNA حاوی یک ایندل، دوباره به رشته‌ای که ایندل ندارد، یا ایندل متفاوتی دارد، متصل خواهد شد یا خیر (به شکل ۱-۲۹ مراحل ۳-۵ مراجعه کنید). با استفاده از این روش می‌توان تعیین کرد که هر کدام از sgRNA های مورد بررسی تا چه اندازه سبب ایجاد برش در جایگاه ژنومی شده‌اند.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

مراحل زیر از راهنمای GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit MAN0009849، ۲۰۱۴ اصلاح و اقتباس شده است. اگر از روش دیگری برای شناسایی ایندل‌ها استفاده می‌کنید، شیوه‌نامه‌های سازنده را بررسی کنید.

قابل توجه مربیان: سلول‌ها باید ۴۸ ساعت پس از انتقال برداشت شوند (کلاس آزمایشگاه: جلسه بیست و هشتم، CRISPR پیشرفته- قسمت چهارم). انکوباسیون طولانی‌تر باعث ایجاد سلول‌ها با درصد تلاقی بیش از حد می‌شود. در صورتی که فرآیند برداشت در طی ۴۸ ساعت پس از انتقال رخ نداد، مربیان باید کلاف‌ها را در دمای -80°C تا زمان استفاده بعدی نگهداری کنند. در صورت قصد دانشجویان مبنی بر حفظ وکتورهای CRISPR و با هدف تولید یک جمعیت کلونی (به مقدمه جلسه بعدی مراجعه شود)، تنها باید نیمی از سلول‌های موجود در هر چاهک برداشت و تجزیه و تحلیل شوند. نیمی دیگر از سلول‌ها را می‌توان به‌منظور تشخیص ایندل‌ها، در چاهک‌ها کشت داد. مقدمه جلسه‌ها ۲۹ و ۳۰ به‌صورتی نوشته شده که دانشجویان روش شناسایی ایندل را انجام ندهند. به‌علاوه، عصاره را تنها می‌توان با استفاده از pLentiCRISPR-EGFP (کنترل منفی برای هدف

قرار دادن ژن مورد نظر) تولید کرد؛ بنابراین، هر چاهک با sgRNApLentiCRISPR (آزمایشی) و برای چهار عصاره در هر گروه، منتقل خواهد شد.



شکل ۲۹-۱: مروری بر روش کار کیت تشخیصی GeneArt Genomic. جلسه ۲۹ آزمایشگاه شامل مراحل ۱-۲ این روش و جلسه ۳۰ آزمایشگاه شامل مراحل ۳-۵ این روش است.

الف. برداشت سلول‌ها

- ۱- پلیت ۴۸ چاهکی سلول‌های HEK293 گروه خود را که در جلسه ۲۸ آزمایشگاه منتقل شده‌اند، دریافت کنید.
- ۲- با استفاده از میکروسکوپ و عدسی شیئی ۱۰×، ریخت‌شناسی و تلاقی سلول‌های خود را در زیر نور سفید مشاهده و ثبت کنید. سلول‌های شما در این مرحله باید به شدت با هم تلاقی داشته باشند.
- ۳- پلیت سلول‌های منتقل شده خود را به روی میز کار ببرید. شما با آن‌ها در یک محیط استریل کار نخواهید کرد، زیرا سلول‌ها امروز هضم خواهند شد. توجه: اگر می‌خواهید این سلول‌ها را در کشت نگهداری کنید تا یک جمعیت کلونال ایجاد کنید، سلول‌ها فقط باید در هود لامینار دست‌کاری شوند.
- ۴- تمام محیط را با استفاده از یک وکیوم روی میز کار و یا یک پمپ آسپیراسیون، به داخل بکشید. هر زمان که مایع را از سلول‌های خود خارج یا به آن اضافه می‌کنید، به حتم این کار را از یک مکان انجام دهید تا از کشیده شدن سلول‌ها جلوگیری شود.
- ۵- اگر از یک پلیت ۴۸ چاهکی استفاده می‌کنید، به آرامی حدود ۲۰۰ μL از PBS ۱× را به چاهک‌ها اضافه کنید: pLentiCRISPR-EGFP و هر چاهک که با pLentiCRISPR-sgRNA منتقل شده است. پلیت را به آرامی تکان دهید. در نهایت آسپیره کنید.
- ۶- حدود ۲۰۰ μL تریپسین-EDTA ۰/۲۵ درصد از پیش گرم شده را به هر چاهک اضافه و روی محیط کار به مدت ۲ تا ۳ دقیقه انکوبه کنید.
- ۷- حدود ۲۰۰ μL از محیط کامل را به هر چاهک اضافه کنید.
- ۸- محلول را به منظور تشکیل یک سوسپانسیون سلولی به بالا و پایین پاپیت کنید.
- ۹- هر سوسپانسیون سلولی را به یک ویال میکروسانتریفیوژ علامت‌دار منتقل کنید.
- ۱۰- سلول‌ها را به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴°C با سرعت $200 \times g$ اسپین کنید.
- ۱۱- مایع رویی را با سرسمپلر به دقت خارج کنید و تمام مایع را در ظرف زباله حاوی ۱۰ درصد سفید کننده، بریزید. در این مرحله اقدام به آسپیره کردن نکنید، زیرا ممکن است کلاف سلولی را از دست بدهید!

ب. هضم و استخراج

- ۱- بافر هضم سلولی و تجزیه کننده پروتئین را در دمای اتاق ذوب کنید. شما باید ۵۰ μL بافر هضم سلولی را با ۲ μL تجزیه کننده پروتئین، به منظور تولید برای هر عصاره سلولی، ترکیب کنید. با توجه به وجود چهار هضم سلولی، حجم هر معرف مورد نیاز را محاسبه

کنید و با توجه به متغیر بودن فرآیند پاییت کردن، حجم کل را ۲۰ درصد بیشتر حساب کنید. مواد مذکور را در یک ویال میکروسانتریفیوژ استریل پاییت کنید و با پاییت کردن به بالا و پایین، آن‌ها را به‌خوبی مخلوط کنید.

۲- مقدار ۵۰ μL از مخلوط بافر هضم سلولی / تجزیه کننده پروتئین را به هر کلاف سلولی اضافه و با پاییت کردن به بالا و پایین، کلاف را دوباره معلق کنید.

۳- تمامی کلاف سلولی معلق شده را به یک ویال PCR برچسب‌دار منتقل کنید.

۴- این برنامه را در یک ترموسایکلر اجرا کنید:

۶۸°C به مدت ۱۵ دقیقه

۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه

۴°C - توقف*.

با وجود استفاده از ترموسایکلر در این مرحله، واکنش PCR رخ نمی‌دهد. افزایش دما به هضم سلولی کمک می‌کند. استفاده از این ابزار روشی مناسب برای انکوباسیون سلول‌ها در زمان‌ها و دماهای خاص است (همانند روش استفاده شده برای واکنش‌های رونویسی معکوس در قسمت چهارم این کتاب)؛ درحالی‌که سلول‌ها در حال هضم شدن هستند، شروع به آماده کردن ژل آگارز کنید؛ زیرا در جلسه بعدی برای تأیید موارد زیر، به سه ژل در هر گروه نیاز خواهد بود: (۱) PCR منجر به تولید یک فرآورده معین از ژن مورد نظر شما و با وزن مولکولی صحیح شد و (۲) یک ایندل در بخشی از سلول‌های شما شناسایی شد.

پ. آماده‌سازی و ریختن ژل آگارز

۱- هر گروه در هفته آینده به یک ژل آگارز نیاز دارد که دارای چاهک‌های کافی برای موارد زیر باشد:

الف. یک چاهک برای خط‌کش DNA.

ب. یک چاهک یک واکنش کنترل مثبت.

پ. یک چاهک برای هر عصاره (pLentiCRISPR-EGFP، pLentiCRISPR-sgRNA $\times 3$).

۲- هر گروه علاوه بر این، به چاهک‌های کافی برای موارد زیر نیاز خواهد داشت:

الف. یک چاهک برای خط‌کش DNA

ب. دو چاهک برای واکنش کنترل

* پس از تکمیل واکنش لایز، PCR را انجام دهید، یا ترکیب‌ها را در دمای ۲۰°C - نگهداری کنید.

- پ. دو چاهک برای هر عصاره (در کل هشت چاهک).
- ۳- امروز سه ژل آگارز مجزا تهیه کنید تا تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای هفته آینده را در خود جای دهد. شما باید محلول ژل آگارز ۲ درصد (۲ گرم آگارز در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر TBE) تهیه کنید. درصد بالاتر آگارز باعث ایجاد منافذ کوچک‌تر و به‌منظور تفکیک بهتر قطعات DNA با وزن مولکولی مشابه خواهد شد. شما همچنین استوک GelRed $\times 10000$ را به غلظت نهایی $\times 1$ تبدیل و اضافه خواهید کرد.
- ۴- پس از جامد شدن کامل، هر گروه می‌تواند تمام سینی، ژل و شانه را در پلاستیک قرار دهد و تا شروع جلسه بعدی آزمایشگاه، در دمای 4°C نگهداری کند.

ت. PCR

- ۱- پس از پایان برنامه ترموسایکلر، عصاره سلولی را به صورت کوتاه ورتکس کنید.
- ۲- علاوه بر عصاره خود، باید یک کنترل مثبت را نیز اجرا کنید که همراه کیت ارائه شده است (در مجموع پنج واکنش PCR). این کنترل شامل هر دو الگو DNA و ترکیبی از آغازگر رفت و برگشت در یک معرف است. آغازگر با عملکرد اختصاصی برای ژن‌ها در جلسه ۲۵ طراحی و سفارش داده شده است. پنج ویال PCR جدید را برای کنترل PCR و عصاره (۱-۴) علامت بزنید. علامت‌ها را مطابق با چاهک منتقل شده، علامت بزنید. اجزای زیر به یک ویال PCR اضافه خواهند شد.
- ۳- یک جدول در دفترچه یادداشت خود مانند جدول ۱-۲۹ برای یک مستر میکس حاوی حجم محاسبه شده از همه موارد مصرفی به جز هضم (آغازگرهای رفت و برگشت، AmpliTaq Gold 360 Master Mix و آب) ایجاد کنید. مستر میکس را ورتکس کنید. $48\ \mu\text{L}$ از مستر میکس را در هر ویال توزیع کنید، سپس $2\ \mu\text{L}$ از عصاره سلولی متناظر را اضافه کنید. واکنش کنترل را به‌صورت جداگانه برای الگو کنترل و آغازگرها، مستر میکس AmpliTaq Gold 360 و آب ایجاد و برای ترکیب کردن ورتکس کنید.

جدول ۲۹-۱: تنظیم تجربی واکنش PCR.

مقدار برای واکنش کنترلی (μL)	مقدار برای ۴ واکنش (μL)	مقدار هر واکنش (μL)	معرف
-		۲	عصاره سلولی (به عنوان DNA الگو عمل می کند)
-		۰/۵	آغازگر رفت مختص ژن (۱۰ μM)
-		۰/۵	آغازگر برگشت مختص ژن (۱۰ μM)
۱		-	الگو کنترل و آغازگرها (آماده شده در کیت)
۲۵		۲۵	مستر میکس AmpliTaq Gold 360
۲۴		۲۲	آب
۵۰		۵۰	کل

۴- ویال های خود را تا زمان آماده شدن گروه ها روی یخ نگهداری کنید.

۵- ترموسایکلر را با استفاده از برنامه نشان داده شده در جدول ۲۹-۲، اجرا کنید.

جدول ۲۹-۲: برنامه ترموسایکلر

چرخه ها	زمان	درجه حرارت (°C)	مرحله
۱×	۱۰ دقیقه	۹۵	فعال شدن آنزیم
۴۰×	۳۰ ثانیه	۹۵	واسرشته شدن
۴۰×	۳۰ ثانیه	۵۵-۶۰	متصل شدن
۴۰×	۳۰ ثانیه	۷۲	بسط یافتن
۱×	۷ دقیقه	۷۲	بسط نهایی
۱×	به صورت نامحدود	۴	توقف

پس از پایان برنامه، مربی شما ویال ها را تا جلسه بعدی آزمایشگاه، در فریزر ۲۰°C- نگهداری خواهد کرد.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- بافر هضم سلولی مورد استفاده در آزمایش تشخیص برش ژنومی چه تفاوتی با بافر مورد استفاده در آزمایش‌های خالص‌سازی پروتئین دارد؟
- ۲- اگر sgRNA های شما امکان هدف قرار دادن مکان ژنومی معین را نداشته باشند، آیا فرآورده PCR را خواهید داشت؟ چرا؟

کلاس آزمایشگاه: جلسه سی ام

CRISPR پیشرفته: بخش ششم

هدف: امروز شما ایندل ها را در ژن مورد نظر خود شناسایی و میزان اثربخشی هر sgRNA را تعیین می کنید.

۱- مقدمه

همان گونه که از آخرین جلسه آزمایشگاه به یاد دارید، شما با استفاده از PCR یک ناحیه ژنومی (لکوس) را تکثیر کردید؛ این لکوس حاوی مکانی بود که sgRNA شما باید یک DSB ایجاد می کرد. وجود این فرآورده های خاص، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز تأیید خواهند شد. یکی از روش های ترمیم DBS ها توسط سلول، ساخت ایندل است. به منظور شناسایی ایندل ها و فراوانی وقوع آن ها، فرآورده های PCR دو رشته ای خود را به حالت تک رشته ای واسرشته سازی خواهید کرد. در صورت کاهش دما به 25°C ، رشته ها به صورت تصادفی به یکدیگر متصل خواهد شد. در این حالت، عدم تطابق ها زمانی رخ خواهند داد که یک توالی یک رشته، مکمل توالی رشته مقابل نباشد (شکل ۲۹-۱). فرآورده های PCR که دوباره متصل شده اند، با آنزیمی که قادر به تشخیص این عدم تطابق ها است تیمار خواهد شد. این آنزیم سبب شکافت این فرآورده های غیر صحیح می شود، سپس روی ژل آگارز تجزیه و تحلیل می شوند. در نهایت، بازدهی اصلاح ژن با استفاده از NIH Image J اندازه گیری خواهد شد. توجه داشته باشید که تکمیل شدن فرآیند حذف کامل ژن با واسطه CRISPR در آزمایشگاه چندین ماه به طول خواهد انجامید. به همین دلیل، تمرین آزمایشگاهی ارائه شده در ادامه مبحث، چارچوب دقیقی را برای انجام موفقیت آمیز یک آزمایش CRISPR، در اختیار شما قرار می دهد. در صورت تمایل به تولید یک رده سلولی سرکوب شده، باید از قبل ابزارهایی را در اختیار داشته باشید: یک sgRNA برای هدف قرار دادن ژن شما با راندمان بالا (همان گونه که در جلسه آزمایشگاه امروز تعیین شد)، Cas9 بیان شده روی همان پلازمید و یک رده سلولی انسانی برای انتقال. در صورت تمایل برای بسط کلونی سلول های ویرایش شده توسط CRISPR، تکمیل گردش کار غربالگری زمان بیشتری را به خود اختصاص می دهد (شکل ۳۰-۱). با این حال، روش های پایه غربالگری، پیش از این در جلسه های توالی یابی DNA و وسترن بلات، در این کتاب راهنما ارائه شده است.

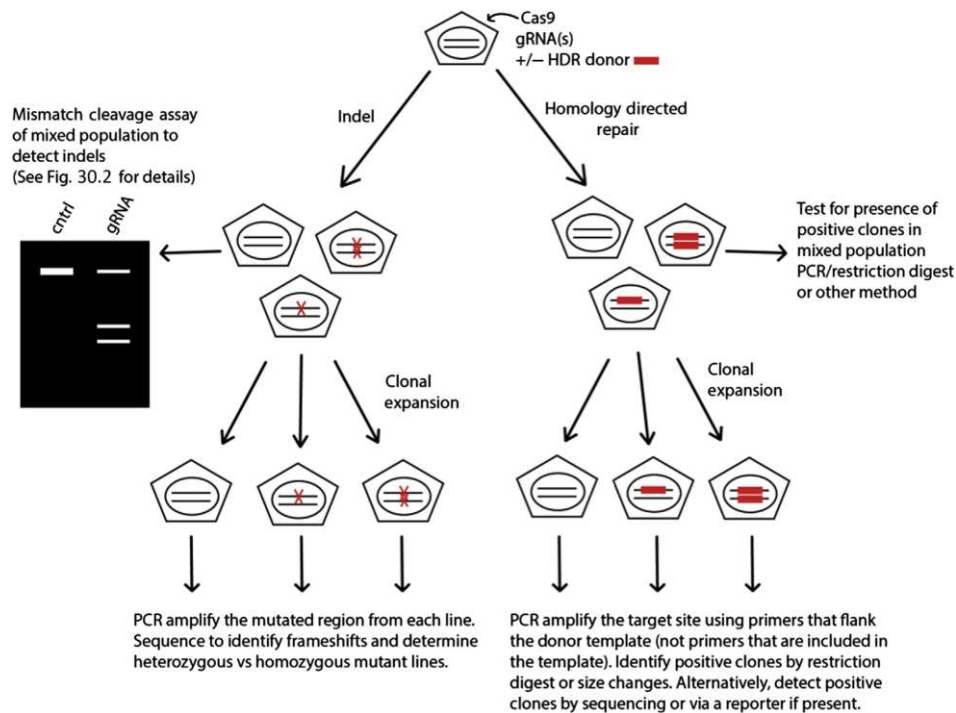
سنجش تشخیص ایندل (سنجش عدم تطابق برش) اولین گام در تأیید سرکوب ژن با واسطه CRISPR است. شکل ۳۰-۱ چارچوب کلی روش CRISPR را نشان می دهد. هدف ما حذف

عملکرد یک ژن از طریق مسیر NHEJ سلول است؛ بنابراین ما به سمت چپ شکل ۳۰-۱ توجه خواهیم کرد. سمت راست تصویر یک نمای کلی از چارچوب روش ترمیم هدایت شده همولوگ^۱ (HDR) و DNA دهنده^۲ را ارائه می‌دهد. در بالا، دو جزء اصلی سیستم CRISPR-Cas9 به یک سلول وارد می‌شوند: Cas9 و یک یا چند RNA راهنما. اگرچه این دو مؤلفه را می‌توان به‌صورت جداگانه منتقل کرد، اما وکتور pLentiCRISPR مورد استفاده توسط شما، هر مؤلفه را کد می‌کند. اگر NHEJ منجر به ایندیل در ژن مورد نظر شما شود، امروز آن‌ها را با روش عدم تطابق برش^۳ شناسایی خواهید کرد. این روش به‌عنوان یک غربال پایه عمل می‌کند و با تصویر ژل در شکل ۳۰-۱ نشان داده شده است. شما در حال تجزیه و تحلیل شرایط انتقال چندین sgRNA (چهار تا توالی‌های sgRNA متعدد) هستید؛ زیرا موفقیت CRISPR به دو نوع بازدهی بستگی دارد: بازدهی انتقال و بازدهی برش. شما از قبل با بازدهی انتقال، هنگام بیان EGFP در سلول‌های HEK293 آشنا شده‌اید (در صورت انجام تمرین‌های مربوطه). این نوع بازدهی، کمیت (بر حسب درصد) تعداد سلول‌های یوکاریوتی که یک اسید نوکلئیک را دریافت کرده‌اند، نشان می‌دهد. بازدهی برش عبارت است از کمی‌سازی تعداد مولکول‌های gRNA که از نظر ژنتیکی اصلاح شده‌اند. بازدهی برش می‌تواند متغیر باشد؛ اما مهم است که بدانیم با توجه با ۱۰۰ درصد نبودن بازدهی انتقال در یک جمعیت سلولی (خزانه)، بازدهی برش نیز ۱۰۰ درصد نخواهد بود. حتی اگر sgRNA شما در صورت نفوذ به سلول‌ها به‌خوبی کار کند (بازدهی برش بالا)، ممکن است در درصد زیادی از سلول‌های مورد تجزیه و تحلیل وجود نداشته باشد (بازدهی انتقال کم)؛ بنابراین، بهینه‌سازی سلول‌های انتقالی و آزمایش چندین sgRNA مختلف، در دستور کار قرار می‌گیرد. این راهکار شبیه طراحی چندین siRNA برای کاهش بیان یک فرآورده ژنی است؛ زیرا برخی از مولکول‌ها بهتر از بقیه عمل می‌کنند. دستیابی به بازدهی‌های بالا از انتقال و برش بسیار مهم است؛ زیرا در نهایت تعداد کمتری از کلون‌ها برای یافتن سلول‌هایی که هر دو نسخه از ژن شما در آن‌ها سرکوب شده‌اند، نیاز به غربالگری دارند. به‌عبارت‌دیگر، هر چه تعداد سلول‌های دریافت‌کننده وکتور CRISPR بیشتر، همچنین دارای ایندیل‌های ایجاد شده باشند، احتمال یافتن فرآیند سرکوب مورد نظر شما بیشتر خواهد بود.

1. Homology-Directed. Repair. (HDR)

2. Donor. DNA

3. Mismatch. cleavage. assay



شکل ۳۰-۱: طرح شماتیک استفاده از فناوری CRISPR در سلول‌های پستانداران.

به جای کار با یک جمعیت ترکیبی از سلول‌ها (مانند این آزمایش)، می‌توانید سپس سلول‌های منفردی را که با یک sgRNA منتقل شده‌اند تفکیک کنید و به آن‌ها اجازه گسترش دهید. همان‌گونه که در شکل ۳۰-۱ نشان داده شده است، این فرآیند بسط کلونی نامیده می‌شود. بر مبنای کارایی مولکول‌های sgRNA شما در هدف قرار دادن DNA، همچنین بازدهی انتقال (به‌دست‌آمده از غربال اولیه)، شما می‌توانید تعدادی از کلون‌های سلولی پستانداران را به منظور شناسایی یک ویرایش ژنومی هموزیگوت در جمعیت کلونی خود، غربالگری کنید (یک غربالگری ثانویه). این روش بیشتر وقت‌ها در ویرایش ژنوم هتروزیگوت ارجحیت دارد. در شکل ۳۰-۱، یک سلول را نشان داده شده است که هیچ ویرایشی برای هیچ‌یک از نسخه‌های یک ژن ندارد. سلول دوم یک ویرایش هتروزیگوت (یک X قرمز) و سلول سوم یک ویرایش هموزیگوت (دو X قرمز) را نشان می‌دهد. غربالگری ثانویه را می‌توان با استفاده از توالی‌یابی سانگر انجام داد. به این ترتیب، وضوح سطح نوکلئوتیدی ایندل ایجاد شده را به دست خواهید آورد. این داده‌ها ماهیت دقیق جهش را نشان می‌دهند. برای انجام این عمل، فرآورده‌های PCR ژن مورد علاقه شما که در جلسه

آزمایشگاه ۲۹ ایجاد شده است را می‌توان به صورت TA به وکتور طراحی شده برای توالی‌یابی فرآورده‌های PCR (به مقدمه جلسه ۳ آزمایشگاه مراجعه کنید) کلون و توالی‌یابی کرد. توالی‌های برگشتی^۱ در نهایت با توالی نوع وحشی ژن مورد نظر مقایسه می‌شوند. یک ویرایش موفقیت‌آمیز ژن در یک آزمایش سرکوب، تعداد بازهای حذف، یا الحاق شده در مکان‌های DBS را نشان می‌دهد. ویرایش‌های هتروزیگوت در مقابل هموزیگوت را می‌توان با تجزیه و تحلیل کروماتوگرام‌های به‌دست‌آمده تعیین کرد. علاوه بر توالی‌یابی، وسترن بلات می‌تواند نقصان فرآورده‌های پروتئینی را در رده‌های سلولی منتقل شده تأیید کند. در نهایت، برای کمک به شناسایی اثرات خارج از هدف، می‌توان از فرآیند توالی‌یابی کل ژنوم استفاده کرد؛ با این حال، استفاده از این روش بسیار هزینه‌بردار خواهد بود. در آزمایش‌های CRISPR، بازرسی‌های کافی هنگام سنتز sgRNAها به منظور پیش‌بینی عملکرد آن‌ها در رایانه انجام خواهد شد تا از این طریق اهداف خارج از هدف به کمترین مقدار ممکن برسد. این بهترین روش برای به کمینه رساندن ویرایش‌های خارج از هدف است. به علاوه، در صورت انجام آزمایش‌هایی با بیش از یک sgRNA که همان ژن را هدف قرار می‌دهد و اثرات بیوشیمیایی یکسانی را حاصل می‌کند، می‌توان دریافت که این sgRNAها عملکرد اختصاصی دقیق‌تری دارند. برای کسب جزئیات بیشتر در مورد روش CRISPR، به منابع زیر مراجعه کنید^۲.

۲- تمرین‌های آزمایشگاهی

الف. تأیید فرآورده PCR

۱- ژل آگارز ۲ درصد (در جلسه ۲۹ آزمایشگاه ساخته‌اید)، همچنین فرآورده‌های منجمد

PCR خود را آماده کنید.

۲- ویال‌های میکروسانتریفیوژ را مطابق با برچسب‌های استفاده شده برای فرآورده‌های PCR،

علامت بزنید.

۳- مقدار ۳ μL از هر فرآورده PCR را با آب و حجم مناسبی از رنگ دای DNA، مخلوط

کنید. دست‌کم حجم مورد استفاده ۱۰ μL است.

1. Returned. sequence

2. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/sanger-crispr_workflow-app-note.pdf

<http://www.genecopoeia.com/wp-content/uploads/2015/07/Downstream-work-07.pdf>

۴- مقدار ۱۵۰ ng از خط کش ۵۰ bp شرکت NEB (شماره کاتالوگ N3236) را بارگذاری کنید. این خط کش DNA برای مشاهده قطعات کمتر از ۵۰۰ bp جفت باز، مناسب تر از خط کش ۱ kb قبلی است.

۵- کل حجم آماده شده از رنگ دای و فرآورده PCR را روی ژل آگارز ۲ درصد قرار دهید. در صورت تمایل به توالی یابی واکنش های PCR، باید بقیه واکنش ها را در دمای 20°C - درجه سانتی گراد نگه دارید.

۶- ژل را با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت اجرا کنید. این کار را تا زمانی که قسمت جلویی رنگ سه چهارم ژل را طی کرد، ادامه دهید.

۷- تصویر ژل خود را در محفظه نور UV ثبت کنید. اگر یک باند با اندازه صحیح وجود داشت، به مرحله واسرشته کردن و وصل شدن مجدد (مرحله ب) وارد شوید.

توجه: وجود یک باند با اندازه مورد انتظار، برای تشخیص دقیق شکافت بسیار مهم است. به منظور رسیدن به فرآورده های PCR با کیفیت، می توان شرایط PCR را با تنظیم آغازگرها، دمای وصل شدن و حجم عصاره مورد استفاده، تنظیم کرد. از سویی، شما ممکن است باند فرآورده PCR مورد نظر خود را، دورتر از سایر باندها مشاهده و آن را روی ژل خالص سازی کنید. این فرآورده خالص سازی شده با ژل را می توان در مرحله واسرشته سازی و وصل شدن مجدد استفاده کرد.

ب. واکنش های واسرشته سازی و وصل شدن مجدد

در صورت در نظر گرفتن یک کنترل آنزیمی منفی برای هر نمونه، می توانید دقت کار خود را افزایش دهید. به عنوان مثال، می توان واکنش های وصل شدن مجدد مضاعف برای هر نمونه را به منظور تمایز باندهای پس زمینه از فرآورده برشی مورد انتظار، انجام داد.

۱- ویال های PCR استریل را تهیه و به طور مناسب علامت گذاری کنید. برای هر نمونه PCR به دو ویال (در کل ۱۰ ویال) نیاز خواهید داشت.

۲- مقدار ۳ μL از فرآورده های آزمایشی PCR را با ۱ μL از بافر تشخیص واکنش $10\times$ در یک ویال PCR ترکیب کنید. برای واکنش کنترل مثبت، از ۱ μL فرآورده کنترل PCR و ۱ μL از بافر تشخیص واکنش $10\times$ استفاده کنید.

۳- حجم هر واکنش را با استفاده از آب به ۹ μL برسانید.

۴- برای اطمینان از عدم وجود حباب، به طور مختصر سانتریفیوژ کنید.

۵- ویال های PCR را در یک ترموسایکلر قرار دهید و این برنامه را اجرا کنید:

جدول ۳۰-۱: برنامه واسرشته‌سازی و وصل شدن مجدد

مرحله	درجه حرارت (°C)	زمان	زمان/درجه حرارت
۱	۹۵	۵ دقیقه	-
۲	۹۵-۸۵	-	-۲°C/s
۳	۸۵-۲۵	-	-۰,۱°C/s
۴	۷	∞	توقف

توجه کنید که این روش، یک واکنش PCR نیست. شما از یک ترموسایکلر برای کنترل زمان و دمای هر مرحله از انکوباسیون برای واسرشته‌سازی و وصل شدن مجدد فرآورده‌های PCR استفاده می‌کنید.

پ. هضم آنزیمی

۱- مقدار ۱ μL آنزیم تشخیص را به تمام نمونه‌های آزمایشی، از جمله کنترل (نیمی از کل واکنش‌های خود) اضافه کنید. با پایپت کردن به بالا و پایین، محلول را به‌خوبی مخلوط کنید. رشته‌های DNA دناتوره شده، از طریق کاهش دما به 25°C ، امکان وصل شدن مجدد تصادفی را خواهند داشت. عدم تطابق زمانی رخ خواهد داد که توالی رشته الگو، مکمل رشته روبه‌رویی نباشد. فرآورده‌های PCR دوباره متصل و اکنون با آنزیمی تیمار می‌شوند که قادر به تشخیص رشته‌های غیر مکمل و شکستن مولکول‌های DNA غیر صحیح هستند که در نتیجه این امر، دو رشته تولید خواهد شد.

۲- مقدار ۱ μL آب را به تمام نمونه‌های کنترل منفی اضافه کنید (بدون آنزیم شناسایی). برای مخلوط کردن، محلول را به‌خوبی به بالا و پایین پایپت کنید.

۳- محلول را در حمام آب 37°C یا هات بلات به مدت ۱ ساعت انکوبه کنید. از سویی، می‌توانید ویال‌های خود را در یک ترموسایکلر که برای این زمان و دما برنامه‌ریزی شده است، قرار دهید.

۴- بعد از انجام یک ورتکس کوتاه، تمام ویال‌ها را به مدت چند ثانیه در یک میکروسانتریفیوژ اسپین کنید تا مایع در پایین ویال جمع شود. اگر اندازه ویال‌های PCR با میکروسانتریفیوژ تطابق نداشت، کافی است ویال را بر روی نیمکت ضربه زده تا بیشتر مایع در پایین جمع شود.

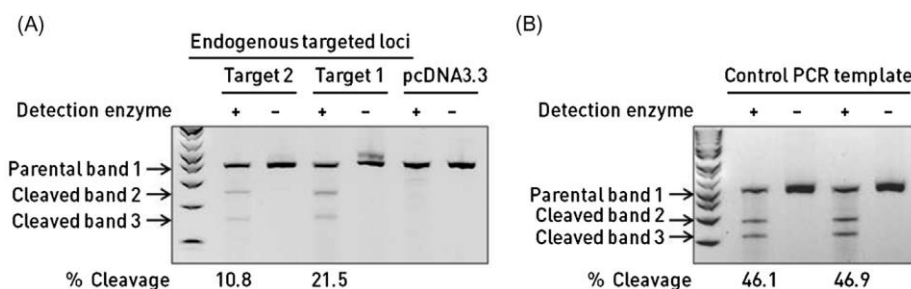
۵- یکراست وارد مرحله تجزیه و تحلیل ژل شوید. در صورتی که قرار است تجزیه و تحلیل ژل را در یک روز دیگر انجام دهید، ۱ μL از ۱۰۰ EDTA را به هر واکنش اضافه کنید تا هضم متوقف شود. نمونه‌ها را در دمای 20°C - نگه‌داری کنید.

ت. تجزیه و تحلیل ژل

- ۱- حجم مناسب رنگ بارگذاری DNA را به هر نمونه ۱۰ μL اضافه کنید.
- ۲- ژل (های) آگارز ۱ یا ۲ درصد ذخیره شده از جلسه ۲۹ آزمایشگاه را دریافت کنید. تعداد ژل‌های مورد نیاز برای قرار دادن ۱۰ نمونه امروز به اضافه یک خط‌کش، به اندازه ژل و شانه استفاده شده، بستگی دارد.
- ۳- مقدار ۱۵۰ ng از خط‌کش ۵۰ bp شرکت NEB (شماره کاتالوگ N3236) را بارگذاری کنید.
- ۴- هر نمونه را روی ژل آگارز ۲ درصد قرار دهید و نمونه کنترل منفی (بدون آنزیم تشخیص) را در کنار نمونه تیمار شده با آنزیم تشخیص مربوطه نگاه دارید.
- ۵- ژل را با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت اجرا کنید. این امر را تا زمانی که قسمت جلویی رنگ سه‌چهارم ژل را طی کرد، ادامه دهید. پیش از اینکه دستگاه ژل خود را از برق بکشید، به حتم منبع برق را خاموش کنید.
- ۶- ژل را با استفاده از یک UV transilluminator مشاهده کنید و تصویری از ژل خود را به صورت JPG یا TIFF برای تجزیه و تحلیل با استفاده از Image J ذخیره کنید. برای نمونه، به تصویر ژل در شکل ۲-۳۰ مراجعه کنید.
- ۷- از NIH Image J برای تعیین نسبت نسبی DNA موجود در هر باند استفاده کنید. اگر شکاف رخ داد، سه باند را مشاهده خواهید کرد: باند والدی، به علاوه دو باند شکاف. برای کسب اطلاعات بیشتر در مورد کمی‌سازی مناطق حاوی باند، به جلسه ۱۷ آزمایشگاه مراجعه کنید. برای انجام محاسبات، مقادیر خود را در مایکروسافت اکسل درج کنید.
- ۸- از این معادله برای محاسبه بازدهی برش استفاده کنید:

$$\text{Cleavage Efficiency} = 1 - \left[(1 - \text{fraction cleaved})^{1/2} \right]$$

توجه: هضم کنترل PCR از کنترل الگو و آغازگرها، باعث تولید دو فرآورده شکافت یافته در اندازه‌های ۲۵۵ و ۲۹۱ جفت باز خواهد شد (شکل ۲-۳۰-ب). همچنین توجه داشته باشید که بازدهی برش ممکن است رویدادهای واقعی را نادیده بگیرد، زیرا آنزیم تشخیصی مورد استفاده تنها ایندلهای یک نوکلئوتید را شناسایی نخواهد کرد.



شکل ۳۰-۲: (الف) تصویر ژل از روش تشخیص برش ژنومی با استفاده از سلول‌های منتقل شده.

سلول‌های 293 FT با GeneArt CRISPR All-In-One vectors و به منظور هدف قرار دادن (با استفاده از Lipofectamine 2000) مناطق مختلفی از جایگاه ژنومی AAVS1 انسان (هدف ۱ و ۲)، منتقل شده‌اند. همچنین، یک نمونه کنترل منفی برای اصلاح ژن از طریق انتقال pcDNA3.3، ایجاد شده است. این نمونه‌ها با استفاده از یک مجموعه آغازگری مشابه، تکثیر شده‌اند. پس از وصل شدن مجدد، نمونه‌ها با استفاده و بدون استفاده از آنزیم‌های تشخیصی تیمار و روی ژل آگارز ۲ درصد (E-Gel EX Gel) بارگذاری شدند. (ب) تصویر ژل از روش تشخیص شکافت ژنومی با استفاده از الگوی کنترل و آغازگرها. پس از وصل شدن مجدد، نمونه‌ها با استفاده و بدون استفاده از آنزیم‌های تشخیصی تیمار و روی ژل آگارز ۲ درصد (E-Gel EX Gel) بارگذاری شدند. تصویر با کسب اجازه از Thermo Fisher Scientific، اقتباس شده است.

۹- در مورد اینکه از کدام sgRNA در آزمایش‌های CRISPR آینده استفاده خواهید کرد، با مربی خود مشورت کنید. ممکن است بازدهی خود با سایر گروه‌هایی که همان ژن را مورد هدف قرار داده‌اند، مقایسه کنید.

منبع

1. Vouillot L, The'lie A, et al. Comparison of T7EI and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3* 2015;5(3):407_15.

پرسش‌های مباحثه‌ای

- ۱- این احتمال وجود دارد که بازدهی برش ژن مورد نظر شما ۱۰۰ نباشد. دست‌کم دو دلیل برای این موضوع ذکر کنید.
- ۲- در صورتی که آنزیم تشخیص به درستی کار نکند، در واکنش کنترلی حاوی کیت چه مواردی قابل مشاهده است.
- ۳- در صورتی که شما چندین sgRNA را بررسی کردید یا سایر گروه‌ها sgRNA های مختلف را با همان ژن مورد بررسی شما، آزمایش کردند، بازدهی sgRNA های مختلف را مقایسه کنید. همچنین امتیازهای هدف‌گیری را برای این sgRNA ها از جلسه ۲۵ آزمایشگاه مقایسه کنید. آیا بازدهی محاسبه شده با آن نمرات مطابقت دارند (هرچه امتیاز DESKGEN بالاتر باشد، بازده برش با این روش بیشتر است)؟ اگر پاسخ منفی است، دلیل آن را ذکر کنید.

پیوست

پیوست اول

تجهیزات

تجهیزات مشترک

- فریزر -80°C
- فریزر -20°C (در صورتی که فریزر دارای یخ‌زدای اتوماتیک است، تمامی آنزیم‌ها را در کانال خنک کننده داخل فریزر نگهداری کنید).
- یخچال 4°C
- سانتریفیوژ رومیزی
- میکروسانتریفیوژ
- انکوباتور شیکردار رومیزی برای کشت‌های باکتریایی ۱۰۰ میلی‌لیتری
- انکوباتور 37°C برای پلیت‌های باکتریایی و واکنش‌های آنزیمی
- همزن مغناطیسی و میله‌های مغناطیسی
- ماکروویو برای ذوب آگارز
- دستگاه سونیکاتور با سر میکروامرسیون (مانند Fisher Sonic Dismembrator 50)، برای هضم فیزیکی در جلسه ۱۱ آزمایشگاه، استخراج پروتئین نوترکیب از *Escherichia coli* با استفاده از ستون میل ترکیبی گلوپتاتینون.
- اسپکتروفتومتر نانودراپ (به دلیل استفاده از حداقل مقدار نمونه، استفاده از Nanodrop را پیشنهاد می‌کنیم؛ با این حال، اسپکتروفتومتر با کووت سازگار با اسید نوکلئیک که میزان جذب را در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌کند، در صورتی که نمونه‌ها به‌طور مناسب اندازه‌گیری شوند، می‌توانند مورد استفاده واقع شوند. از طرف دیگر، کووت‌های یک‌بار مصرف، مانند Eppendorf UVettes، $50\ \mu\text{L}$ ظرفیت دارند. نمونه‌ها را می‌توان پس از اسپکتروفتومتری دوباره استفاده کرد.
- خوانشگر میکروپلیت با قابلیت خوانش جذب (فلورسانس EGFP دارای دو حالت است: برانگیختگی: ۴۸۵ نانومتر؛ انتشار: ۵۲۸ نانومتر) یا اسپکتروفتومتر (های) با قابلیت خوانش تا طول‌موج ۵۹۵ نانومتر.
- شیکر اوربیتال
- Transilluminator UV با سیستم مستندسازی ژل (UV transilluminator در اتاق تاریک با دوربین)
- ترموسایکلر PCR (یک ترموسایکلر با قابلیت زمان واقعی، جز گزینه‌های اختیاری است)
- اتوکلاو

- حمام آب بزرگ برای گرم کردن محیط تا دمای 60°C و ویال‌های انکوباسیون
- ترازوی دقیق
- دستگاه یخ‌ساز
- هر گروه آزمایشگاهی باید مواردی را که در بازبینه (چک‌لیست) تجهیزات ارائه شده در جلسه اول، ذکر شده است، برای فعالیت‌های آزمایشگاهی داشته باشد.
- تجهیزات مورد نیاز برای بخش پنجم:
- انکوباتور CO_2 برای سلول‌های پستانداران
- چندین کابینت ایمنی بیولوژیکی BSL-2 کلاس II نوع A2 (هودهای لامینار)
- میکروسکوپ (های) فلورسانس معکوس
- - عدسی‌های $\times 10$ ، $\times 20$ و $\times 40$
- - دوربین

پیوست دوم

فهرست آماده‌سازی مواد و معرف‌ها

نکته‌هایی برای کارمندان آماده‌سازی

پلازمیدها و سویه‌های *Escherichia coli* میزبان

سه پلازمید مورد نیاز برای قسمت اول-چهارم عبارت‌اند از pET-41a (Novagen cat. no. 370556-3)، pEGFP-N1 و pBIT (درخواست از دکتر اسکات ویثرو از طریق switherow@ut.edu یا pEGFP-N1 pBIT). دو پلازمید مورد نیاز شما برای قسمت پنجم عبارت‌اند از pLentiCRISPR-E (Addgene plasmid #78852) و pLentiCRISPR-EGFP-2 (Addgene plasmid #51761). دو سویه میزبان مورد استفاده عبارت‌اند از: میزبان بیان کننده BL21(DE3) (Novagen cat. # 70235-3) و میزبان غیر بیان کننده NovaBlue (Novagen cat. # 70181-3). اعداد کاتالوگ این پلازمیدها برای سلول‌های شیمیایی شایسته است. اگر تصمیم به ساخت سلول‌های شایسته دارید، می‌توانید سلول‌های معمولی و غیر شایسته خریداری کنید. از سویی، سایر گونه‌های میزبان مشابه ممکن است از شرکت‌های دیگر خریداری شوند. به خاطر داشته باشید که برای جداسازی DNA، تنها به یک سویه نیاز دارید (مانند NovaBlue) و آن سویه نباید برای بیان پروتئین به‌صورت تخصصی عمل کند. برای این عمل، شما به یک سویه دوم نیاز خواهید داشت که امکان رونویسی از پروموتور T7 را فراهم کند. این بدان معنی است که سویه بیانی باید یک لیزوژن λ [مانند BL21(DE3)] باشد. پیش از آغاز دوره، به یک استوک فریزی از سویه‌های میزبان *Escherichia coli* (سویه‌های مشابه) حاوی پلازمیدهای فهرست شده در زیر نیاز دارید.

پیش از آغاز دوره، پیشنهاد می‌شود که مقادیر pET-41a و pEGFP-N1 (Maxiprep) را خالص‌سازی کنید. در عمل، تنها مقادیر pLentiCRISPR-E و pLentiCRISPR-EGFP-2 را خالص‌سازی کنید. در عمل، تنها مقادیر اندکی از pEGFP-N1 برای الگوی PCR (۱۰۰ نانوگرم در هر گروه) مورد نیاز است، اما در صورتی که قصد داشتید تا قسمت پنجم کتاب را ادامه دهید، به مقدار بیشتری نیاز خواهد بود. مقادیر مورد نیاز از pET-41a، باید توسط دانشجویان و در خلال خالص‌سازی پلازمید با Miniprep، تهیه شود. در صورتی که آزمایش‌ها طبق برنامه‌ریزی پیشروی نکنند، داشتن پلازمید خالص اضافی مفید واقع خواهد شد.

هدف	پلازمید	سویه میزبان <i>E. coli</i>
الگو PCR	pEGFP-N1	NovaBlue
تفکیک پلازمید	pET-41a	NovaBlue
کنترل منفی برای بیان پروتئین الحاقی	pET-41a	BL21(DE3)
کنترل مثبت برای بیان پروتئین الحاقی	pBIT	BL21(DE3)
کنترل مثبت برای اصلاح ژن با واسطه CRISPR مربوط به EGFP و ستون وکتور	pLentiCRISPR-E	Stbl3
برای کلون کردن sgRNA های طراحی شده		
آزمایشی - برای اصلاح ژن با واسطه CRISPR مربوط به EGFP	pLenti-CRISPR-EGFP-2	Stbl3

آنتی بیوتیک ها

برای انتخاب pEGFP-N1، pET-41a و pBIT از کانامایسین استفاده می شود. یک محلول استوک از کانامایسین با غلظت ۳۰ mg/mL در آب را تهیه، فیلتر و استریل کنید و در دمای ۲۰°C - نگهداری کنید. کانامایسین را با رقت ۱:۱۰۰۰ از محلول استوک (۱ mL در ۱ L) پس از اتوکلاو به محیط اضافه کنید. پیش از افزودن آنتی بیوتیک، بسیار مهم است که منتظر بمانید تا محیط به منظور رسیدن به درجه حرارت ۶۰°C، خنک شود. افزودن آنتی بیوتیک به محیط خیلی داغ، می تواند باعث غیرفعال شدن آنتی بیوتیک شود. همچنین، اطمینان از عملکرد موثر آنتی بیوتیک مورد استفاده، مهم است. این امر را می توان با تلقیح یک پلیت تازه LB/kan حاوی *E. coli* نوع وحشی (بدون مقاومت آنتی بیوتیکی حاوی پلازمید) آزمایش کرد. توجه: برای انتخاب pLentiCRISPR-E و pLentiCRISPR-EGFP-2 از آمپی سیلین^۱ استفاده می شود. پس از سفارش از Addgene، این پلازمیدها از قبل به عنوان یک استپ (سوزن) آگار^۲، به سویه Stbl3 منتقل و جهت رشد در آنها گنجانده شده اند. آزمایش های بخش پنجم نیاز به استفاده از محلول پنی سیلین / استرپتومایسین دارد که به عنوان محلول استریل ۱۰۰ × (۵۰۰۰ U/mL) (شماره کاتالوگ Gibco 15070063؛ بطری ۱۰۰ mL)، همچنین محلول G418 (۵۰ mg/mL) (به نام مستعار ژنتیکین) (Gibco catalog number 10131035) خریداری می شود.

1. Ampicillin
2. Agar, stab

تقسیمات

آنزیم‌های محدودکننده و بافرها باید پیش از استفاده شخصی تقسیم و سانتریفیوژ شوند. هر زمان که امکان‌پذیر شد، تقسیمات بیشتری از آنچه برای کلاس لازم است را ایجاد کنید. دانشجویان بیشتر وقت‌ها این قسمت‌ها را به‌صورت اشتباه استفاده می‌کنند یا نیاز به تکرار یک روش دارند. وجود مقادیر اضافی، مفید واقع می‌شود. علاوه بر این، حجم اضافی (به‌طور معمول در حدود ۱۰ درصد) در هر بخش گنجانده شده تا اطمینان حاصل شود که دانشجویان می‌توانند حجم کامل معرف را پایت کنند.

ضایعات باکتریایی

جامد

ضایعات باکتریایی جامد شامل ویال‌ها، سر سمپلرها، پلیت‌ها و غیره است که برای رشد باکتری‌ها استفاده می‌شود یا با هرگونه باکتری زنده/ پسماند خطرناک زیستی در تماس بوده‌اند. DNA نوترکیب نیز باید به عنوان عامل خطر زیستی^۱ در نظر گرفته شود. کارمندان آماده‌سازی باید چندین ظرف حاوی کیسه‌های خطر زیستی (BIOHAZARD) و با اندازه مناسب تهیه کنند (Fisher Scientific, cat # 03-411). کیسه‌ها را زمانی که کمی بیش از نیمه پر شد تعویض کنید. تمام کیسه‌های BIOHAZARD باید پیش از دور ریختن، اتوکلاو شوند؛ همچنین پیشنهاد می‌شود در صورت وجود نشی یا سوراخ شدن، از دو کیسه BIOHAZARD استفاده کنید. توجه: از قرار دادن زباله‌های معمولی در کیسه‌های BIOHAZARD خودداری کنید. این فرآیند می‌تواند بار اضافی را بر دوش کارمندان آماده‌سازی تحمیل کند. برای راحتی، دانشجویان باید در هر میز کار، همچنین در مرکز کشت سلولی، یک ظرف biohazard کوچک و با کیسه BIOHAZARD داشته باشند. این ظرف باید برای سمپلر و سایر موارد کوچک موجود در میز آزمایشگاه، استفاده شود. دانشجویان باید ظروف کوچک حاوی ضایعات خطرناک زیستی خود را در ظرف بزرگ مشترک در انتهای هر آزمایشگاه خالی کنند.

مایع

یک ظرف با برچسب «قبرستان باکتریایی»^۲ را تنها برای دفع ضایعات باکتریایی مایع آماده کنید. ظرف را با استفاده از وایتکس (۲۰-۱۵ درصد از حجم) تیمار کنید. اگر بقایای سلولی به ته ظرف افتاده باشد، باکتری‌ها مرده هستند.

1. Biohazardous.

2. Bacterial. graveyard

اتوکلاو

مواد اتوکلاو شده باید دست کم یک روز پیش از استفاده از آن‌ها، آماده باشند.

مایعات

بطری‌ها را فقط تا ۶۰ درصد حجم آن‌ها (مقداری کمتر یا بیشتر) پر کنید. درب ظرف‌ها باید شل باشند تا از افزایش فشار و ترکیدن جلوگیری شود. مایعات باید به مدت ۲۰ دقیقه استریلیزه شوند. درب ظرف‌ها را تا زمان رسیدن به دمای اتاق، به‌طور کامل ببندید.

ضایعات خطرناک زیستی

کیسه‌های BIOHAZARD باید مهر و موم و برچسب‌گذاری شوند. اگر نشستی مشکل‌ساز بود، استفاده از دو کیسه و یا افزودن مواد جاذب (مانند ورمیکولیت^۱، بنتونیت^۲ و غیره)، ضروری است.

تجهیزات خشک

تمام سر سمپلرها و ویال‌های میکروپیوژ باید قبل از استفاده اتوکلاو شوند، مگر اینکه به‌صورت استریل خریداری شده باشند. هنگام اجرای مراحل آزمایشی بخش‌های چهار و پنج، از سرسمپلر و ویال‌های میکروپیوژ دارای گواهی بدون RNase استفاده کنید. این تجهیزات در پلاستیک پیچیده و هرگز نباید اتوکلاو شوند.

آماده‌سازی آزمایشگاه

یک بخش را برای قرار دادن معرف‌ها و به‌منظور استفاده دانشجویان آماده کنید. مواد مورد نیاز برای یک جلسه آزمایشگاهی معین را، در یک قسمت قرار دهید. از کارت‌های یادداشت ۷×۵ اینچی برای برچسب زدن همه معرف‌ها استفاده کنید و اطلاعاتی مانند «برای جلسه هفتم-الف، مرحله ۲» را در آن درج کنید. عبارت‌هایی مانند «وقتی تمام شد برگردید»، «دور نریزید، با حروف اول اسم خود برچسب بزنید و در دمای ۴°C نگهداری کنید» یا «بعد از مصرف دور بریزید» را درج کنید. اطمینان حاصل کنید که هر مقدار مصرفی معین را نیز برچسب بزنید؛ زیرا دانشجویان بیشتر وقت‌ها ویال‌ها را با هم مخلوط می‌کنند! در صورت امکان، ارائه شیوه‌نامه‌های واضح به جلوگیری از بروز مشکلات و به‌ویژه به‌منظور مطمئن شدن از ایجاد یک محیط کار ایمن کمک می‌کند.

-
1. Vermiculite.
 2. Bentonite.

کیسه‌های BIOHAZARD را به‌صورت دوره‌ای بررسی کنید و پس از نیمه پر شدن، آن‌ها را برای اتوکلاو شدن بردارید. اطمینان حاصل کنید که ظروف TBE ۱× و اتانول ۷۰ درصد پر هستند.

دانشجویان

دانشجویان در اولین جلسات آزمایشگاهی، برای تهیه معرف‌های بیشتر، درخواست‌هایی را ارائه خواهد کرد. آماده‌سازی پیشرفته و داشتن مقادیر اضافی از معرف‌های در دسترس، به جلوگیری از بروز سردرگمی کمک خواهد کرد.

لوازم و معرف‌ها

در این پیوست لوازم و معرف‌های مورد استفاده برای هر هفته، بر اساس جلسه آزمایشگاهی ذکر شده است. حجم‌های فهرست شده برای معرف‌ها، به‌صورت معمول حاوی ۱۰ درصد حجم اضافی برای پوشش دادن خطای احتمالی در پایت کردن است. لوازم و معرف‌های معینی وجود دارند که باید همیشه در دسترس باشند. این موارد در هر جلسه آزمایشگاه ذکر نمی‌شوند، اما باید برای دانشجویان و کارمندان آماده‌سازی در هر جلسه آزمایشگاهی، در دسترس باشند.

لوازم و معرف‌ها برای استفاده عمومی

- عینک ایمنی در آزمایشگاه
- دستکش‌های غیر لاتکس (کوچک، متوسط، بزرگ و فوق‌العاده بزرگ)؛ دستکش‌های بدون پودر برای کار با غشاهای نیتروسلولزی ترجیح داده می‌شوند
- سر سمپلرهای استریل (تمامی سایزها)
- ویال‌های میکروسانتریفیوژ
- آب دیونیزه استریل
- اتانول ۹۵ درصد
- اتانول ۷۰ درصد
- آگارز
- پتری‌دیش (گرد و مربعی)
- ویال‌های مخروطی ۵۰ mL
- ویال‌های مخروطی ۱۵ mL
- ظروف توزین
- ویال‌های سانتریفیوژ با قابلیت سانتریفیوژ در $15000 \times g$

- خلال دندان استریل برای تلقیح کشت‌ها
- محیط کشت LB
- پلیت‌های LB/kan آگار (ذخیره شده در دمای 4°C)
- $1\times\text{TBE}$
- GelRed ($1000\times$)؛ باید در فویل نگهداری و نسبت به نور محافظت شود)
- صابون دست
- دستمال مرطوب کیم وایپ
- دستمال کاغذی

شیوه‌نامه برای استفاده عمومی

LB Agar و LB Broth

۱- مواد زیر را ترکیب کنید.

ماده	مقدار در لیتر
تریپتون	۱۰ g
NaCl	۱۰ g
عصاره مخمر	۵ g
آب دیونیزه	۱۰۰۰ mL

از طرف دیگر، یک پودر از پیش مخلوط شده (مانند Fisher Scientific به شماره کاتالوگ BP1426-500) را می‌توان خریداری کرد و یکراست با آب دیونیزه شده برای ایجاد غلظت 25g/L ، ترکیب کرد.

۲- به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 121°C تحت فشار حداقل ۱۵ psi اتوکلاو کنید.

۳- محلول را تا دمای 60°C سرد کنید و کانامایسین استریل فیلتر شده (غلظت نهایی $30\text{ }\mu\text{g/mL}$ ؛ می‌توانید از محلول استوک $1000\times$ استفاده کنید) یا IPTG استریل فیلتر شده (غلظت نهایی $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ ؛ از محلول استوک $1000\times$ استفاده کنید) را در صورت لزوم اضافه کنید. در صورت انجام آزمایش‌های قسمت پنجم، انجام و استفاده از وکتورهای CRISPR، آمپی‌سیلین استریل فیلتر شده (غلظت نهایی $100\text{ }\mu\text{g/mL}$) را اضافه کنید. برای تهیه LB آگار، LB broth را آماده، سپس مقدار 15 g/L آگار را اضافه کنید (از LB آگار از پیش مخلوط شده مانند Fisher Scientific به شماره کاتالوگ ۱۴۲۵-۵۰۰ استفاده کنید). ترکیب را اتوکلاو کنید، سپس در حمام آب 60°C قرار دهید. وقتی دما متعادل شد، محلول را روی

همزن مغناطیسی قرار دهید و در صورت لزوم کانامایسین، آمپی‌سیلین، یا IPTG را اضافه کنید. در هر ظرف پتری‌دیش مقدار ۲۰ mL از محلول را بریزید و مراقب باشید که حباب ایجاد نشود.

(۲۰ mg/mL) IPTG

مقدار ۱ g از IPTG را در ۵۰ mL آب دیونیزه حل کنید. فیلتر و استریلیزه کنید. این یک محلول استوک $\times 1000$ است. در دمای -20°C نگهداری کنید.

کانامایسین (۳۰ mg/mL)

مقدار ۱/۵ g از کانامایسین را در ۵۰ mL آب دیونیزه حل کنید. فیلتر و استریلیزه کنید. این یک محلول استوک $\times 1000$ است. در دمای -20°C نگهداری کنید.

آمپی‌سیلین (۱۰۰ mg/mL)

مقدار ۵ g از کانامایسین را در ۵۰ mL آب دیونیزه حل کنید. فیلتر و استریلیزه کنید. این یک محلول استوک $\times 1000$ است. در دمای -20°C نگهداری کنید.

استوک $5\times\text{TBE}$ (تریس، بوریک اسید، EDTA)

مقدار	معرف
۵۴ g	تریس
۲۷/۵ g	بوریک اسید
۴/۱۵ g (۲۰ mL از EDTA نیم مولار)	EDTA
تا یک لیتر	آب مقطر استریل

ظرف‌هایی را به منظور ایجاد استوک‌های $\times 1$ برای دانشجویان آماده کنید. در کل میزان ۶ L را برای گروه‌های ۲۰ عددی آماده کنید. از سویی، $\text{TBE} \times 10$ را می‌توان از شرکت‌های مختلف (Fisher Scientific با شماره کاتالوگ BP13334 یا Bio-Rad به شماره کاتالوگ 1610770) تأمین و به منظور استفاده دانشجویان، آن‌ها را رقیق کرد.

استوک GelRed ($\times 10000$)

هر گروه باید ۳۰ μL از این استوک را در ویال‌های میکروسانتریفیوژ رنگی یا بسته‌بندی شده با فویل آلومینیومی دریافت کند، زیرا GelRed به نور حساس است. دانشجویان باید GelRed (در دمای اتاق) را برای استفاده در تمرین‌های آزمایشگاهی متعدد ذخیره کنند.

آغازگرهای DNA

آغازگرهای DNA را می‌توان از بسیاری از شرکت‌های تجاری (به‌عنوان مثال، Integrated DNA Technologies) سفارش داد. آن‌ها را باید در حالت نمک‌زدایی شده سفارش داد، اما نیازی به تغییرات اضافی ندارند. پس از دریافت، با حل کردن آن در آب مقطر استریل تا رسیدن به غلظت نهایی $100 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ ($100 \mu\text{M}$) یک محلول استوک از آغازگر تهیه کنید.

جلسه آزمایشگاه	نام آغازگر	توالی آغازگر
۳	egfpNco	AAACCATGGTGAGCAAGGGCGA
۳	egfpNot	AAAGCGGCCGCTTTACTTGTACA
۶-پ	pBITfor	CAAGCTACCTGAAATGCTGA
۶-پ	pBITrev	CTTGTACAGCTCGTCCATGC
۷-ت	Sequencing primer	CGAACGCCAGCACATGGACAGC
۱۴	egfp14 F	CGACGGCAACTACAAGACC
۱۴	egfp14 R	GTCCTCCTTGAAGTCGATGC
۱۴	23S14 F	GACGGAGAAGGCTATGTTGG
۱۴	23S14 R	GTTGCTTCAGCACCGTAGTG
۱۶	egfp 16 F	CCTGAAGTTCATCTGCACCA
۱۶	egfp 16 R	TGCTCAGGTAGTGGTTGTGC
۱۶	23S 16 F	ACTGCGAATACCGGAGAATG
۱۶	23S 16 R	CCTGTTTCCCATCGACTACG
۲۶	نیاز به طراحی	
۲۹	نیاز به طراحی	

اولیگوهای siRNA

اولیگوهای siRNA را می‌توان توسط بسیاری از شرکت‌های تجاری مختلف (مانند Thermo Fisher Scientific) سفارش داد. پیشنهاد می‌شود که اولیگوهای siRNA را در مقیاس ۲۰ نانومول، در حالت نمک‌زدایی شده با اوورهنک‌های ۳' dTdT سفارش دهید. با استفاده از ظروف پلاستیکی استریل و بدون RNase و لحاظ کردن اقدامات احتیاطی، با استفاده از آب بدون نوکلئاز، یک استوک siRNA با غلظت $100 \mu\text{M}$ میکرومولار را تهیه کنید (Thermo Fisher Scientific). غلظت استوک را تا $10 \mu\text{M}$ برای استفاده فوری کاهش دهید، یا آن را در دمای -20°C نگهداری کنید.

جلسه اول آزمایشگاه

جهت‌گیری، تمرین با میکروپایپت‌ها

توجه: این تمرین توسط یک دانشجو انجام می‌شود و کاربرد گروهی ندارد.

دانشجویان به تجهیزات زیر نیاز خواهند داشت:

- ۱۰ μL آلبومین سرم گاوی (BSA)، با غلظت ۱۰ mg/mL، در دمای 20°C - نگهداری شود (Fisher catalog number FERB14 حاوی محلول ۲۰ mg/mL است که می‌تواند به نسبت ۱:۱ رقیق شود)

- غشاء نیتروسلولز با اندازه تقریبی ۳'' $\times$ ۲'' (یک غشاء به ازای هر گروه)
- کاغذ واتمن ۳MM با اندازه تقریبی ۳'' $\times$ ۲'' (یک کاغذ به ازای هر گروه)
- ظرف توزین

- پتری‌دیش مربعی، جعبه یا سینی مناسب دیگر برای رنگ‌آمیزی (۱ عدد در هر گروه)

لوازم زیر به صورت اشتراکی مورد استفاده واقع خواهند شد:

رنگ پانسو قرمز (همچنین به‌عنوان رنگ پانسو S نیز شناخته می‌شود) (Sigma-Aldrich Catalog number P7170) که به میزان تقریبی ۱۰ mL به ازای هر گروه نیاز است (از این رنگ چندین بار می‌توان استفاده کرد، سپس دور ریخت).

جلسه دوم آزمایشگاه

خالص‌سازی و هضم DNA پلازمید (وکتور)

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی:

دو روز پیش از آغاز جلسه آزمایشگاه، پلیت‌های LB/kan را با سویه *E. coli* کلون شده (مانند NovaBlue) حاوی پلازمید pET-41a، به‌صورت خطی بارور کنید.

۲- صبح روز پیش از آزمایشگاه، یک کلنی منفرد از پلیت LB/kan را انتخاب و یک کشت آغازین از محیط LB ۲-۵ میلی‌لیتری حاوی کانامایسین را تلقیح کنید. محیط را در دمای 37°C و با شیک کردن (با سرعت تقریبی ۳۰۰ rpm)، به مدت ۸ ساعت انکوبه کنید.

۳- بعد از ظهر روز پیش از آزمایشگاه، کشت آغازگر را به نسبت ۱:۵۰۰ در محیط LB/kan ۱۰۰ میلی‌لیتری رقیق کنید و در یک فلاسک ۵۰۰ میلی‌لیتری با دمای 37°C تکان دهید.

مواد زیر پیش از آغاز آزمایش باید آماده شوند:

- LB broth حاوی ۳۰ µg/mL کانامایسین
 - LB آگار حاوی ۳۰ µg/mL کانامایسین
 - سویه NovaBlue باکتری *E. coli* (سویه K12 دیگر) حاوی pET-41a
- دانشجویان از این لوازم و تجهیزات استفاده خواهند کرد:

- کیت QIAGEN QIAprep Spin Miniprep (شماره کاتالوگ ۲۷۱۰۴)

لوازم و معرفهای فهرست شده در کیت گنجانده شده است. هر کیت حاوی ستون‌ها و معرف‌هایی برای آماده‌سازی ۵۰ پلازمید است. به حتم شیوه‌نامه کیت را به‌منظور افزودن RNase همراه به بافر P1 و اتانول ۱۰۰ درصد به بافر PE دنبال کنید. سهم هر گروه:

- ۲۷۵ µL بافر P1، در دمای ۴°C نگهداری شود
- ۲۷۵ µL بافر P2
- ۳۸۵ µL بافر N3
- ۵۵۰ µL بافر PB
- ۸۰۰ µL بافر PE
- ۶۰ µL بافر EB

- ستون چرخشی QIAprep

مقدار مورد نیاز در هر گروه برای هضم محدود شوندگی:

- ۵/۵ µL بافر آنزیم محدود کننده ۱۰× CutSmart ارائه شده در زمان خرید آنزیم‌های محدود کننده از (NEB) New England Biolabs، در دمای ۲۰°C- نگهداری شود.
- ۵۵ µL آب استریل

دانشجویان همچنین به هر دو آنزیم NcoI-HF (شماره کاتالوگ NEB R3193) و NotI-HF (شماره کاتالوگ NEB R3189) نیاز دارند. برای هر واکنش، دانشجویان به ۱۰ واحد آنزیم نیاز دارند که ۰/۵ میکرولیتر از هر آنزیم، شامل آنزیم‌های NEB است. این مقدار برای هر گروه مقدار بسیار اندکی است؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود یک سهمیه مشترک برای همه گروه‌های دانش‌آموزی ایجاد کنند و روی یخ در آزمایشگاه قرار دهند تا دانشجویان از آن استفاده کنند. دانشجویان pET-41a خود را خالص‌سازی می‌کنند، اما در هر صورت DNA اضافی در اختیار دارند.

جلسه سوم آزمایشگاه

تکمیل آماده‌سازی وکتور و تکثیر *egfp* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز
لوازم و معرف‌های فهرست شده، در کیت QIAquick PCR Purification (شماره کاتالوگ
۲۸۱۰۴) موجود است. هر کیت حاوی ستون‌ها و معرف‌هایی برای خالص‌سازی ۵۰ DNA است.
مقادیر مورد استفاده برای دانشجو عبارت‌اند از:

- ۲۷۵ μL بافر PB
 - ۸۰۰ μL بافر PE
 - ۵۵ μL بافر EB
 - ۱ ستون QIAquick و ویال جمع‌آوری کننده ۲mL.
- هر گروه از دانشجویان به‌منظور اجرای ژل آگارز خود به موارد زیر نیاز دارد:
- ۳۰ μL استوک GelRed ($\times 10000$) دانشجویان باید این مقدار را برای جلسه‌های بعدی آزمایشگاه ذخیره کنند.
 - ۱mL بافر بارگذاری DNA (معروف به رنگ بارگذاری DNA). این مورد با خرید آنزیم‌های محدود کننده HF از NEB به‌عنوان محلول‌های $\times 6$ عرضه می‌شود و در صورت لزوم می‌توان آن را به‌طور جداگانه خریداری کرد (NEB کاتالوگ شماره B7024). دانشجویان باید این مقدار را برای جلسه‌های بعدی آزمایشگاه ذخیره کنند.
 - ۵۰ μL خط‌کش DNA ۱ kb از شرکت NEB (شماره کاتالوگ NEB N3232). استوک ۱۵ ng/ μL از این خط‌کش را تولید کنید. دانشجویان باید این مقدار را برای جلسه‌های بعدی آزمایشگاه ذخیره کنند. دستور تولید این استوک عبارت است از: ۳۰ μL N3232 + ۸۰۳ μL dH₂O + ۱۶۷ μL بافر بارگذاری DNA $\times 6$
- دانشجویان موارد زیر را به اشتراک خواهند گذاشت:
- آگارز (Bio-Rad catalog number 1613101)
 - بافر TBE $\times 1$
- دانشجویان از موارد زیر به‌منظور واکنش PCR استفاده خواهند کرد. نیازمندی‌های هر گروه عبارت است از:
- ۵۰ μL آب استریل
 - ۵/۵ μL بافر واکنش ترموفول $\times 10$ (هنگام خرید پلیمراز Vent ارائه و یا به صورت جداگانه خریداری می‌شود - NEB catalog number B9004).
 - ۱۰۰ ng از پلازمید pEGFP-N1 (به عبارتی ۲ μL از ۵۰ ng/ μL DNA)

- ۵/۵ μL از مخلوط dNTP (ارائه شده توسط بسیاری از شرکت‌های تأمین کننده همانند NEB با شماره کاتالوگ N0447)، در دمای 20°C - نگهداری شود
- ۱/۲ μL آغازگر egfpNot (AAAGCGGCCGCTTTACTTGTACA)؛ ۱۰۰ در آب استریل یا بافر TE (۱ $\times$)، در دمای 20°C - نگهداری شود
- ۱/۲ μL آغازگر egfpNco (AAACCATGGTGAGCAAGGGCGA)؛ ۱۰۰ در آب استریل یا بافر TE (۱ $\times$)، در دمای 20°C - نگهداری شود
- ۵/۵ μL پلیمرز Vent، در دمای 20°C - نگهداری شود
- ویال PCR

جلسه چهارم آزمایشگاه

آماده‌سازی DNA الحاقی (*egfp*) حاصل شده از PCR

دانشجویان از لوازم ذکر شده استفاده خواهند کرد. لوازم و معرف‌ها در کیت QIAGEN QIAquick PCR Purification (شماره کاتالوگ ۲۸۱۰۴) موجود است. سهم هر گروه:

- ۵۵۰ μL بافر PB
 - ۱/۷۵ mL بافر PE
 - ۱۱۰ μL بافر EB (همچنین برای صفر کردن نانودراپ نیز استفاده می‌شود)
 - دو ستون QIAquick و ویال جمع‌آوری کننده ۲mL.
- مقدار مورد نیاز در هر گروه برای هضم محدود شوندگی:
- ۵/۵ μL بافر آنزیم محدود کننده $10\times$ CutSmart ارائه شده در زمان خرید آنزیم‌های محدود کننده از (New England Biolabs (NEB)، در دمای 20°C - نگهداری شود.
 - ۵۵ μL آب استریل
- دانشجویان همچنین به هر دو آنزیم NcoI-HF (شماره کاتالوگ NEB R3193) و NotI-HF (شماره کاتالوگ NEB R3189) نیاز دارند. برای هر واکنش، دانشجویان به ۱۰ واحد آنزیم نیاز دارند که ۰/۵ میکرولیتر از هر آنزیم، شامل آنزیم‌های NEB است. این مقدار برای هر گروه مقدار بسیار اندکی است؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود یک سهمیه مشترک برای همه گروه‌های دانش‌آموزی ایجاد کنید و روی یخ در آزمایشگاه قرار دهید تا دانشجویان از آن استفاده کنند.

دانشجویان موارد زیر را به اشتراک خواهند گذاشت:

- آگارز (Bio-Rad catalog number 1613101)
- بافر ۱× TBE
- استوک GelRed (×۱۰۰۰۰)

جلسه پنجم آزمایشگاه

لیگاسیون DNA و ترادیسی *Escherichia coli*

دانشجویان از این تجهیزات استفاده خواهند کرد. سهم هر گروه:

● ۲/۵ μL بافر لیگاز ۱۰×، در دمای ۲۰°C - نگهداری شود

● ۱/۵ μL میکرولیتر DNA لیگاز T4، در دمای ۲۰°C - نگهداری شود

توجه: این شیوه‌نامه از DNA لیگاز T4 شرکت NEB با شماره کاتالوگ M0202L استفاده می‌کند. در صورت استفاده از DNA لیگاز T4 شرکت دیگر، شیوه‌نامه‌های سازنده را پیروی کنید. در نتیجه این عمل، زمان انکوباسیون ممکن است به‌طور قابل توجهی طولانی‌تر باشد.

● ۱۷۵ μL از سلول‌های *E. coli* BL21(DE3) شایسته (ارائه شده توسط تولید کنندگان گوناگون، مانند NEB با شماره کاتالوگ C2527) توجه: سلول‌های منجمد ذوب شده را پیش از استفاده، روی یخ ذوب کنید. سلول‌ها نباید بیش از چند دقیقه روی یخ قرار داده شوند.

● ۳ mL LB یا SOC. SOC همراه با سلول‌های NEB عرضه می‌شود، همچنین می‌توان آن را به صورت جداگانه تهیه یا خریداری کرد (NEB با شماره کاتالوگ B9020S)

● سه پلیت LB/kan

دانشجویان معرف‌های زیر را به اشتراک خواهند گذاشت:

- آگارز
- اتانول ۹۵ درصد برای پخش کردن در پلیت
- آب استریل
- ۱× TBE

دانشجویان باید موارد زیر را از جلسات آزمایشگاهی قبلی داشته باشند:

- pET-41a برش نخورده (معروف به هضم نشده)
- ۱۰۰ ng ژن *egfp* هضم و خالص‌سازی شده
- خط‌کش ۱ kb DNA

- بافر بارگذاری DNA ×۶
- استوک GelRed (×۱۰۰۰۰)

جلسه ششم آزمایشگاه-الف

جلسه موقت آزمایشگاه

شمارش ترادیدی شده‌ها، ایجاد پلیت مضاعف و تلقیح کشت‌های شبانه

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی: بعد از ظهر روز پیش از جلسه، pBIT را در سویه میزبان BL21(DE3) (کنترل مثبت) و pET-41a (کنترل منفی) روی چندین پلیت LB/kan پخش کنید. به منظور اطمینان از تولید کلونی‌های ایزوله، این عمل را در گوشه پلیت انجام دهید. داشتن پلیت‌های متعدد، فرآیند اشتراک‌گذاری در کلاس‌های بزرگ‌تر را ساده کردن می‌کند. دانشجویانی که هیچ سلول ترادیدی شده‌ای را در پلیت‌های خود به دست نیاورده‌اند، می‌توانند از ترانسفورماتورهای اضافی موجود در پلیت هم‌کلاسی‌های خود استفاده کنند یا می‌توانند با قرار دادن pBIT و pET-41a در سویه میزبان BL21(DE3) در همان پلیت، یک پلیت از «ترکیبات ناشناخته» را ایجاد کنند.

دانشجویان در هر گروه به این لوازم نیاز دارند:

- یک عدد پلیت LB/kan
- ۷ ویال کشت درب دار که هر کدام حاوی ۵ mL از LB/kan است
- برچسب شبکه‌ای
- خلال دندان یا سرسمپلر استریل
- ماژیک
- ظرف ضایعات خطرناک زیستی (برای خلال دندان که به منظور برداشت کلنی‌ها استفاده می‌شود)

- صفحات ترادیدی دانشجویان از جلسه قبل
- پارافیلیم (Bemis با شماره کاتالوگ PM999)

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی:

- ۱- لوله‌های کشت و پلیت مضاعف دانشجویان (با درب بسته) را تا بعد از ظهر پیش از جلسه آزمایشگاه، در یخچال قرار دهید.
- ۲- بعد از ظهر قبل از جلسه آزمایشگاه، پلیت مضاعف دانشجویان (با درب بسته) را در انکوباتور ۳۷°C و لوله‌های کشت را در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷°C قرار دهید.

جلسه ششم آزمایشگاه-ب

جداسازی DNA Miniprep از ترادیسی شده‌های بالقوه

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی: مستر میکس PCR را می‌توان یکرست توسط گروه‌های دانشجویی یا توسط کارمندان آماده‌سازی، به منظور صرفه‌جویی در زمان تهیه کرد.

لوازم و معرف‌های ذکر شده در کیت QIAGEN QIAprep Spin Miniprep (شماره کاتالوگ ۲۷۱۰۴) موجود است. هر کیت حاوی ستون‌ها و معرف‌هایی برای آماده‌سازی ۵۰ پلازمید است. به حتم شیوه‌نامه کیت را در افزودن RNase، همراه به بافر P1 و اتانول ۱۰۰ درصد به بافر PE پیروی کنید.

مواد و تجهیزات مورد استفاده برای هر گروه

- ۲ mL بافر P1، در دمای ۴°C نگهداری شود
- ۲ mL بافر P2
- ۲,۸ mL بافر N3
- ۴ mL بافر PB
- ۶ mL بافر PE
- ۴۰۰ μ L بافر EB
- هفت ستون چرخشی QIAprep

جلسه ششم آزمایشگاه-پ

غربالگری با استفاده از PCR

- هفت ویال PCR (لوله‌های باند PCR با کلاهک‌های مرتبط نیز ممکن است استفاده شود)
- مستر میکس PCR (۱۸۰ μ L در هر گروه) یا معرف‌ها را به مقدار کافی به منظور ایجاد مستر میکس، در اختیار دانشجویان قرار دهید

مقدار برای ۸ واکنش (۱۶۰ μ L) مورد نیاز برای هر گروه (۱۶۰ μ L)	غلظت نهایی	معرف
۱۳۸/۲		آب عاری از نوکلئاز
۳/۶	۰/۲ mM هر dNTP	مخلوط ۱۰ mM dNTP
۰/۷	۰/۴ μ M	آغازگر pBITrev (100 pmol/ μ L)
۰/۷	۰/۴ μ M	آغازگر pBITfor (100 pmol/ μ L)
۱۶	$\times 1$	بافر واکنش ترمویل $\times 10$
۰/۸	۴ U در کل	Taq پلیمرراز

توجه: اگر از بافر PCR دیگری استفاده می‌کنید که حاوی Mg^{2+} نیست، آن را طبق شیوه‌نامه سازنده اضافه کنید.

- pBITrev: CTTGTACAGCTCGTCCATGC (رقیق شده به $100 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ با آب استریل یا بافر TE $\times 1$)
- pBITfor: CAAGCTACCTGAAATGCTGA (رقیق شده به $100 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ با آب استریل یا بافر TE $\times 1$)

جلسه ششم آزمایشگاه-ت

مشاهده پروتئین فلورسنت سبز؛ بخش اول

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- یک پلیت LB/kan/IPTG
- یک برچسب شبکه‌ای
- دانشجویان تجهیزات زیر را به اشتراک خواهند گذاشت:
- پارافیلیم

جلسه هفتم آزمایشگاه-الف

هضم محدود کننده DNA

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- $16 \mu\text{L}$ بافر CutSmart $\times 10$
- دانشجویان همچنین به هر دو آنزیم NcoI-HF (شماره کاتالوگ NEB R3193) و NotI-HF (شماره کاتالوگ NEB R3189) نیاز دارند. برای هر واکنش، دانشجویان به 16 واحد آنزیم نیاز دارند که 0.8 میکرولیتر از هر آنزیم، شامل آنزیم‌های NEB است. این مقدار برای هر گروه مقدار بسیار اندکی است؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود یک سهمیه مشترک برای همه گروه‌های دانشجویی ایجاد کنید و روی یخ در آزمایشگاه قرار دهید تا دانشجویان از آن استفاده کنند.
- $100 \mu\text{L}$ آب استریل

جلسه هفتم آزمایشگاه-ب**تجزیه و تحلیل غربالگری PCR و هضم Miniprep**

دانشجویان تجهیزات زیر را به اشتراک خواهند گذاشت:

● آگارز (Bio-Rad catalog number 1613101)

● بافر TBE $\times 1$

● خط‌کش 1 kb DNA

● بافر بارگذاری DNA $\times 6$

● استوک GelRed ($\times 10000$)

توجه: برای این جلسه آزمایشگاه، هر گروه دانشجویی به دو ژل با یک شانه یا یک ژل با دو شانه نیاز خواهند داشت که یکی در بالا و دیگری در نقطه میانی ژل قرار گیرد.

جلسه هفتم آزمایشگاه-پ**تجزیه و تحلیل توالی DNA از یک کلون مثبت، بخش اول**

یک استوک از آغازگر توالی‌یابی pBIT (CGAACGCCAGCACATGGACAGC) با غلظت $100 \mu\text{M}$ بسازید (از طریق آب، یا TE $\times 1$). در نتیجه ترکیب کردن این استوک با آب و به نسبت ۱:۱۰، یک محلول با رقت $10 \mu\text{M}$ ایجاد کنید.

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

● $3 \mu\text{L}$ میکرولیتر آغازگر توالی‌یابی pBIT $10 \mu\text{M}$

● ۱ ویال PCR

● DNA پلازمید هضم نشده از Minipreps در جلسه ششم آزمایشگاه-ب

● آب استریل

جلسه هشتم آزمایشگاه**تجزیه و تحلیل توالی DNA از یک کلون مثبت، بخش دوم**

تمرین‌های مرتبط با بیوانفورماتیک به منظور بررسی داده‌های توالی‌یابی از جلسه هفتم آزمایشگاه-ب و یک رایانه با نرم‌افزار تجزیه و تحلیل کروماتوگرام، یا Chromas¹ به منظور انجام تجزیه و تحلیل‌های مربوطه.

1. <http://technelysium.com.au/wp/chromas/>

جلسه نهم آزمایشگاه-الف

جلسه موقت آزمایشگاه

تلقیح کشت برای SDS-PAGE

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- چهار ویال درب‌دار با ۱ میلی لیتر LB/kan
- قفسه برای ویال‌ها
- خلال دندان یا سرسمپلر استریل
- ماژیک
- پلیت مضاعف اصلی

جلسه نهم آزمایشگاه-ب

بیان پروتئین‌های مثبت، SDS-PAGE و وسترن بلات، بخش اول

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی

۱- یک روز پیش از جلسه آزمایشگاه، کشت‌های LB/kan broth دانشجویان را به مدت یک

شب در دمای 37°C انکوبه کنید.

۲- سه تا چهار ساعت پیش از آغاز جلسه آزمایشگاه، ۲mL از $2 \times \text{YT/kan/IPTG}$ را به هر

۱ mL از کشت دانشجویان اضافه کنید و در دمای 37°C به شیک کردن ادامه دهید.

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- کشت‌هایی که ۲-۳ ساعت از پیش از آغاز جلسه در $2 \times \text{YT/kan/IPTG}$ انکوبه شده‌اند.
- ۰/۹mL از B-PER معرف استخراج پروتئین کامل باکتریایی شامل DNase و لیزوزیم (Thermo Fisher Scientific شماره کاتالوگ ۸۹۸۲۲)
- ۱ ژل پلی‌آکریل‌آمید SDS KD، مانند Bio-Rad شماره کاتالوگ ۴۵۶۹۰۳۳ (حاوی ۱۰ ژل). این ژل‌ها با نمونه‌های پروتئینی در محدوده ۱۰-۲۰۰ کیلو دالتون کار می‌کنند.
- ۰/۲۵mL بافر نمونه SDS-PAGE $6 \times$ (بارگذاری) (Bioworld شماره کاتالوگ 105700212). دانشجویان باید مقادیر اضافه بافر SDS-PAGE $6 \times$ را برای جلسات بعدی، ذخیره کنند.
- ۱۰ μL میکرولیتر خط‌کش وزن مولکولی (recision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standards شماره کاتالوگ ۱۶۱۰۳۷۵)
- دو تکه کاغذ واتمن ۳ MM (GE Healthcare 3030221)

- یک قطعه نیتروسلولوز (Thermo Scientific) به شماره کاتالوگ ۸۸۰۱۴ که به اندازه ژل‌ها برش داده شده است (از سویی، Bio-Rad کاغذهای صافی ساندویچی از پیش برش داده شده/ نیتروسلولوز را برای وسترن بلات می‌فروشد؛ شماره کاتالوگ ۱۶۲۰۲۳۵)
- دو پد نخی (یک بار مصرف نیست)
- دانشجویان تجهیزات زیر را به اشتراک خواهند گذاشت:
- بافر تریس-گلیسین-SDS
- بی‌کربنات سدیم
- یک بسته پتری‌دیش یک بار مصرف مربعی (Fisher 08-757-11A)
- یک بسته ویال شیشه‌ای یا پایپت‌های یک بار مصرف

شیوه‌نامه

2× YT Broth

ماده	مقدار در لیتر
Bacto tryptone	۱۰ g
NaCl	۱۰ g
عصاره مخمر	۵ g
آب دیونیزه	۱۰۰۰ mL

اتوکلاو کنید و در دمای اتاق نگهداری کنید.

2× YT/Kan/IPTG

به ۱۰۰ mL از ۲×YT، ۱۰۰ μL کانامایسین (۳۰ mg/mL استوک) و ۱۰۰ μL از IPTG (۲۰ mg/mL استوک) اضافه کنید. غلظت نهایی کانامایسین ۳۰ μg/mL و غلظت نهایی IPTG ۲۰ μg/mL یا ۰/۰۸ mM است.

بافر تریس-گلیسین-SDS

شیوه‌نامه برای تولید استوک‌های ۱× و ۱۰×

	مقدار		غلظت نهایی	
	۱×	۱۰×	۱×	۱۰×
تریس	۶ g	۳۰ g	۲۵ mM	۰/۲۵ mM
گلیسین	۲۸/۸G	۱۴۱ g	۱۹۰ mM	۱/۹ mM
SDS	۲ g	۱۰ g	۰/۱ درصد	۱ درصد
آب دیونیزه	تا ۲۰۰۰ mL	تا ۱۰۰۰ mL		

جلسه دهم آزمایشگاه

بیان پروتئین‌های الحاقی از کلون‌های مثبت، SDS-PAGE و وسترن بلات، بخش دوم

دانشجویان تجهیزات زیر را به اشتراک خواهند گذاشت:

- ۱۰ mL محلول مسدود کننده (TBS-T) به اضافه ۵ درصد (w/v) شیرخشک، در دمای ۴°C نگهداری شود. شیرخشک بدون چربی را می‌توان از طریق فروشندگان تجهیزات علمی (LabScientific کاتالوگ شماره M0841) خریداری کرد، اما در بیشتر فروشگاه‌های مواد غذایی نیز موجود است.
- ۴ μL آنتی‌بادی α-EGFP (Takara Bio شماره کاتالوگ 632381)، در دمای ۲۰°C- ذخیره و چرخه‌های ذوب-انجماد را محدود کنید.
- ۸ μL از آنتی‌بادی GAMP (Sigma-Aldrich شماره کاتالوگ A3673)، در دمای ۴°C نگهداری شود.
- یک پلیت LB/kan
- خلال دندان یا سرسمپلر استریل
- این تجهیزات باید به اشتراک گذاشته شوند:
- رنگ پانسو قرمز (همچنین به عنوان رنگ پانسو S نیز شناخته می‌شود) (Sigma-Aldrich Catalog number P7170) که به میزان تقریبی ۱۰ mL به ازای هر گروه نیاز است (از این رنگ چندین بار می‌توان استفاده کرد، سپس دور ریخت).
- یک بسته پتری‌دیش یک بار مصرف مربعی (Fisher شماره کاتالوگ ۷۵۷-۰۸-۱۱) (A)
- حداقل ۲۵۰ mL TBS-T به ازای هر گروه.
- تشخیص رنگ سنجی:
- ۱۰ mL رنگ پراکسید (به صورت تازه از کلرونتول تهیه می‌شود، به شیوه‌نامه‌ها مراجعه کنید) (پراکسید هیدروژن باید کمتر از ۱ ماه عمر داشته باشد)
- لومینسانس شیمیایی تقویت شده:
- ۳/۵ mL معرف وسترن پراکسید
- ۳/۵ mL میلی‌لیتر معرف Western Luminol/Enhancer (معرف پراکسید و معرف لومینول با هم به عنوان معرف Bio-Rad Clarity ECL فروخته می‌شود، شماره کاتالوگ ۱۷۰۵۰۶۰)

شیوه‌نامه‌ها

بافر تریس سالین (pH ۷.۴)

غلظت نهایی	مقدار	ماده
۲۰ mM	۱۰ g	تریس
۱۳۷ mM	۱۰ g	NaCl
۱۰ درصد	۵ g	HCl (1 M), to pH 7.4
	۱۰۰۰ mL	آب دیونیزه

از سویی، محلول بافر TBS $\times 10$ را می‌توان از شرکت‌های متعددی همانند Fisher Scientific با شماره کاتالوگ BP24711، خریداری کرد.
TBS-T: TBS را با استفاده از ۲۰ Tween به غلظت نهایی ۰/۱ درصد برسانید.

محلول استوک کلروفتول

برای ایجاد این رنگ، از پراکسید استفاده می‌شود. از دستکش استفاده کنید زیرا کلروفتول سرطان‌زا است. ترکیبات ذکر شده را ترکیب کنید و در دمای 20°C - و در بطری محافظت شده از نور نگهداری کنید:

غلظت نهایی	مقدار	
۰/۳ درصد غلظت نهایی	۱۵۰ mg	۴-کلرو-فتول
	۵۰ mL	متانول سرد

رنگ پراکسید

این رنگ باید قبل از استفاده، به‌صورت تازه تهیه شود. هر ترم پراکسید هیدروژن جدید تهیه کنید.

غلظت نهایی	مقدار اضافه شده	
۰/۰۵ درصد	۱۷ mL	استوک کلروفتول
	۶۸۰ mL	آب دیونیزه
۵۰ mM	۵ mL	تریس ۱ مولار
۱۰۰ mM	۱۰ mL	NaCl ۱ مولار
۰/۰۲ درصد	۳۵ μL	H_2O_2 ۳۰ درصد

جلسه یازدهم آزمایشگاه-الف

جلسه موقت آزمایشگاه

تلقیح کشت‌هایی برای خالص‌سازی پروتئین
هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- خلال دندان یا سرسمپلر استریل
- ۱ ویال کشت درب دار با ۲mL از LB/kan
- ماژیک
- پلیت مضاعف از کلون مثبت دانشجویان
- رک برای ویال‌های کشت

جلسه یازدهم آزمایشگاه-ب

استخراج پروتئین نوترکیب از *Escherichia coli* با استفاده ستون میل ترکیبی
گلوکاتایون

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی

۱- بعد از ظهر روز پیش از آزمایشگاه، کشت‌های دانشجویان (که بعد از جلسه موقت آزمایشگاه در یخچال نگهداری می‌شدند) را در یک شب در دمای 37°C انکوبه کنید. همچنین *E. coli* سویه BL21(DE3) حاوی پلازمید pBIT را تلقیح و انکوبه کنید.

۲- سه تا چهار ساعت پیش از آغاز آزمایشگاه، کشت‌های ۲mL دانشجویان را در فلاسک‌های ۲۵۰ mL حاوی ۱۰۰mL YT/kan/IPTG $\times 2$ قرار دهید.

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- ویال‌های سانتریفیوژ ۲۵۰ mL که قادر به تحمل نیروی $\times 10000\text{g}$ هستند.
- ۱۰۰mL از ۲YT/kan/IPTG
- رزین گلوکاتایون سفاروز: ۷۵ mL / حجم از دانه‌های ته‌نشین شده در ویال مخروطی ۱۵mL (شماره کاتالوگ GE Healthcare 17513201) تا زمان استفاده در دمای 4°C نگهداری شود.

- ستون کروماتوگرافی و مخزن (Bio-Rad) با شماره کاتالوگ ۷۳۱۱۵۵۰ و ۷۳۲-۸۱۰۲
- ۲۰mL از PBS $\times 1$ (بافر سالین فسفات). شیوه‌نامه را مشاهده یا استوک $\times 10$ را خریداری کنید (Fisher Scientific با شماره کاتالوگ ۳۹۹۱)

- ۰/۵mL گلو تاتیون کاهش یافته ۱۰mM رقیق شده با PBS ۱× (Sigma-Aldrich) شماره کاتالوگ G4251)

علاوه بر این، دانشجویان برای هضم سلولی به معرف‌هایی نیاز دارند که می‌تواند به دو روش مختلف آماده شود:

● فراصوت

- ۸۰۰ μ L از ۱×PBS با Pefabloc، هیدروکلراید ۴-۲ آمینو اتیل) بنزن سولفونیل فلوراید، AEBSF (Sigma-Aldrich) شماره کاتالوگ ۷۶۳۰۷، محلول استوک ۰/۱ مولار (محلول استوک را با آب استریل و دیونیزه تهیه کنید و در دمای ۲۰°C -درجه سانتی‌گراد منجمد کنید)

- ۲۰ μ L لیزوزیم (۱۰mg/mL)، در دمای ۲۰°C -نگهداری شود (Spectrum Chemical، شماره کاتالوگ L3008-1GM)

● یخ خشک

● هضم شیمیایی

● معرف استخراج پروتئین کامل باکتریایی B-PER که شامل DNase و لیزوزیم است (Thermo Fisher Scientific شماره کاتالوگ ۸۹۸۲۲).

- Pefabloc، AEBSF (Sigma-Aldrich) شماره کاتالوگ ۷۶۳۰۷، محلول استوک ۰/۱ مولار (محلول استوک را با آب استریل و دیونیزه تهیه کنید و در دمای ۲۰°C -درجه سانتی‌گراد منجمد کنید)

توجه: مهارکننده پروتئاز (Pefabloc) فعالیت پروتئاز را کاهش می‌دهد و از تخریب پروتئین فیوژن جلوگیری می‌کند. در صورت حذف، طول فرآورده خالص‌سازی شده همچنان کامل، اما مقداری تخریب رخ می‌دهد.

دانشجویان تجهیزات زیر را به اشتراک خواهند گذاشت:

- LB برای تعلیق مجدد باکتری‌ها (چند بطری کوچک در هر آزمایشگاه یا یک ویال ۱/۳ mL در هر گروه)

- یک میکروسانتریفیوژ یخچال‌دار یا قرار دادن چندین میکروسانتریفیوژ در یخچال با دمای ۴°C

شیوه‌نامه‌ها

بافر فسفات هالین، pH ۷/۴

غلظت نهایی (mM)	مقدار افزوده شده (g)	
۱۳۷	۸	NaCl
۲/۷	۰/۲	KCl
۸	۱/۴۴	Na ₂ HPO ₄
۲	۰/۲۴	KH ₂ PO ₄

مواد فوق را در ۸۰۰ mL آب دیونیزه حل کنید، pH را با استفاده از HCl روی ۷/۴ تنظیم کنید و سپس حجم کل را به ۱ لیتر برسانید. با اتوکلاو استریل کنید.

بافر فسفات سالین با PEFABLOC

۱ mL از محلول استوک ۰/۱ مولار Pefabloc را به ۵۰ mL از ۱×PBS اضافه و مخلوط کنید و تا زمان استفاده در دمای ۴°C نگهداری کنید.

بافر فسفات سالین با ۱۰mM گلوکوتایون کاهش یافته (بافر شویش GST)

۱۵۴ mg گلوکوتایون کاهش یافته را به ۵۰ mL از ۱×PBS اضافه کنید.

جلسه دوازدهم آزمایشگاه-الف

تجزیه و تحلیل جزهای خالص‌سازی

همه دانشجویان باید تجزیه و تحلیل SDS-PAGE را انجام دهند. دانشجویان همچنین باید کمیت پروتئین خالص‌سازی شده را با استفاده از روش فلورسانس یا برادفورد تعیین کنند. فقط دانشجویانی که جلسه ۱۳ آزمایشگاه (خالص‌سازی mRNA کل) را انجام داده‌اند، نیاز به انجام یک پلیت مضاعف دارند.

دانشجویان باید موارد زیر را از هفته قبل داشته باشند:

- هضم سلولی و جزهای جمع‌آوری شده از خالص‌سازی SDS-PAGE
- ۱ ژل SDS بدون رنگ پلی آکریل آمید (به جلسه نهم آزمایشگاه مراجعه کنید)
- ۵ μL نشانگر مولکولی وزن Kaleidoscope برای SDS-PAGE
- تریس-گلیسین ۱×، شیوه‌نامه ساخت که در جلسه نهم آزمایشگاه توضیح داده شد
- بافر نمونه SDS-PAGE ۶×

- ۲۰ mL معرف رنگ‌آمیزی ژل (Pierce) Gelcode به شماره کاتالوگ ۲۴۵۹۴، در دمای ۴°C نگهداری شود. هر ترم سفارش دهید (اگر از ژل‌های معمولی SDS-PAGE استفاده می‌کنید، برای ژل‌های بدون لکه استفاده نمی‌شود).
- پتری‌دیش مربعی یا سینی برای رنگ‌آمیزی ژل

تجزیه و تحلیل فلورسانس

- ۷ mL از ۱× PBS، pH ۷/۴
- ۳۲/۲ μL EGFP نو ترکیب: ۱ mg/mL محلول در PBS
- پلیت با ۹۶ چاهک

تجزیه و تحلیل پروتئین برادفورد

- کیت سنجش پروتئین برادفورد ۴ (شماره کاتالوگ Bio-Rad 5000204)
- لوله‌های آزمایش یا کووت‌های یک بار مصرف

جلسه دوازدهم آزمایشگاه-ب

- ایجاد پلیت مضاعف (تنها در صورت انجام جلسه ۱۳ آزمایشگاه)
- ۱ پلیت LB/kan

جلسه سیزدهم آزمایشگاه-الف

تلقیح کشت‌ها برای خالص‌سازی RNA

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- سه ویال خالی درب دار
- سه ویال درب دار با ۳ mL از LB/kan
- خلال دندان استریل
- رک برای ویال‌ها
- ماژیک
- دسترسی به پلیت مضاعف از جلسه دوازدهم آزمایشگاه-ب

قابل توجه به کارمندان آماده سازی:

- ۱- ویال های خالی و تلقیح شده را تا بعد از ظهر روز پیش از جلسه بعدی آزمایشگاه در یخچال 4°C قرار دهید.
- ۲- بعد از ظهر روز پیش از جلسه آزمایشگاه، ویال های ۳ mL تلقیح شده را در انکوباتور شیکردار و در دمای 37°C قرار دهید.

جلسه سیزدهم آزمایشگاه-ب

خالص سازی RNA کل

قابل توجه کارمندان آماده سازی:

- ۱- دو ساعت پیش از آغاز جلسه آزمایشگاه، هر کشت ۳mL را همان گونه که در جلسه سیزدهم آزمایشگاه-ب، مراحل ۱-۳ توضیح داده شده است، القا کنید.
- ۲- هر ۱ یا ۲ گروه به یک جعبه سرسمپلر در تمامی اندازه ها نیاز دارند: P20, P200, P1000 و P10. این سرسمپلرها بسته بندی شده است و بدون DNase و RNase ارائه می شود. آن ها نباید اتوکلاو شوند. این سرسمپلرها در جلسه های آزمایشگاهی ۱۳، ۱۴، ۱۶، ۲۰ و ۲۱-ب و هر زمان دیگری که ممکن است با نمونه های RNA کار کنید، استفاده می شود. نیمکت ها و پایپت ها را با محلول سفیدکننده ۱۰ درصد برای هیدرولیز DNA پلازمید آلوده از آزمایش های قبلی، تیمار کنید. تجهیزات را با دستمال کاغذی پاک کنید تا خشک شود. هدف از انجام این تیمار هیدرولیز DNA است که ممکن است تکثیرهای بعدی را آلوده کند. این امر می تواند مشکل ساز شود، به خصوص زمانی که در طول چندین ترم با DNA پلازمید و در مکان راه اندازی PCR کار می کنید. همان طور که در شیوه نامه آورده شده است، آلودگی DNA پلازمید با تیمار DNase به حداقل مقدار ممکن می رسد، اما تیمار با وایتکس نیز به به حداقل رساندن این انتقال ناخواسته کمک می کند.
- ۳- پیشنهاد می شود که دانشجویان بلافاصله پیش از شروع جلسات آزمایشگاهی ۱۳، ۱۴، ۱۶ و ۲۱-ب، نیمکت ها و سمپلرها را با RNaseZAP (Ambion AM9780) پاک کنند.

شیوه نامه ها

لاکتوز (۲۰ mg/mL)

۱/۰ گرم آلفا لاکتوز مونوهیدرات را در ۵ mL آب دیونیزه حل کنید. تا زمان استفاده در دمای 4°C نگهداری شود.

×۲ YT/Kan/IPTG

به ۱۰۰ mL از ×۲ YT، ۱۰۰ µL کانامایسین (۳۰ mg/mL استوک) و ۱۰۰ µL از IPTG (۲۰ mg/mL استوک) اضافه کنید. غلظت نهایی IPTG ۲۰ µg/mL یا ۰/۰۸ mM است.

×۲ YT/Kan/Lac

به ۱۰۰ mL از ×۲ YT، ۱۰۰ µL کانامایسین (۳۰ mg/mL استوک) و ۱۴۴ µL لاکتوز (۲۰ mg/mL استوک) اضافه کنید. غلظت نهایی لاکتوز ۲۸/۸ µg/mL یا ۰/۰۸ mM است.

لیزوزیم (۴۰ mg/mL)

۰/۰۴ g لیزوزیم را در ۱ mL آب دیونیزه حل کنید. این یک استوک ×۱۰۰ است. سهم‌های µL ۱۰ را ایجاد کنید. هر گروه فقط به ۵ µL نیاز دارد. سهم‌ها و محلول باقیمانده را در دمای °C -۲۰ نگهداری کنید.

(۲,۷۳ Kunitz Units/L) DNaseI

۵۵۰ µL آب بدون RNase ارائه شده در کیت QIAGEN DNaseI به ویال اضافه کنید. درب ویال را ببندید و به منظور مخلوط کردن وارونه کنید. سهم‌های ۳۵ µL تهیه کنید. تا مدت ۹ ماه در دمای °C -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. این سهم‌ها یک بار مصرف هستند، پس از ذوب شدن دوباره منجمد نکنید.

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- ۱۰ µL استاک لیزوزیم ×۱۰۰

کیت QIAGEN RNeasy

- ۲/۳ mL بافر RLT (حاوی ۱ درصد بتا مرکاپتواتانول)

- ۳ ستون چرخشی QIAshredder (یاسی)

- ۱/۷ mL میلی‌لیتر اتانول ۱۰۰ درصد

- ۶ ستون چرخشی RNeasy (صورتی)

- ۲/۳ mL بافر RW1

- ۷ mL بافر RPE

- ۳۵۰ µL آب بدون RNase

مجموعه QIAGEN DNaseI

● مقدار ۳۵ μL از DNaseI آماده شده

● ۳۵ μL بافر RDD

● ۱۰۰ μL آب بدون RNase

دانشجویان موارد زیر را به اشتراک خواهند گذاشت:

آب اضافی بدون RNase از کیت QIAGEN RNeasy برای صفر کردن نانودراپ

جلسه چهاردهم آزمایشگاه

تجزیه و تحلیل سطوح mRNA ژن *gst::egfp* توسط RT-qPCR: قسمت اول

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی:

مربیان پیش از انجام qPCR، باید سمپلرها و سطوح نیمکت آزمایشگاهی را با محلول سفید کننده ۱۰ درصد تیمار کنند. هدف از انجام این تیمار هیدرولیز DNA است که ممکن است تکثیرهای بعدی را آلوده کند. این امر می‌تواند مشکل‌ساز شود، به‌ویژه زمانی که در طول چندین ترم با DNA پلازمید و در مکان راه‌اندازی qPCR کار می‌کنید. همان‌طور که در شیوه‌نامه آورده شده است، آلودگی DNA پلازمید با تیمار DNase به حداقل مقدار ممکن می‌رسد، اما تیمار با وایتکس نیز به‌به حداقل رساندن این انتقال ناخواسته کمک می‌کند.

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

● کیت سنتز cDNA انتخابی Bio-Rad iScript

● ۱۸ μL ترکیب آغازگری

● ۴/۵ μL از رونوشت بردار معکوس iScript

● ۳۵ μL از مخلوط واکنش iScript $\times 3$

● ۵۰ μL آب عاری از نوکلئاز

● ۱۸ ویال PCR بدون RNase. ۶ ویال برای رونویسی معکوس، ۱۲ ویال برای qPCR مورد

نیاز است (شماره کاتالوگ Bio-Rad TBS-0201)

● ۳ مجموعه ویال هشت عددی شفاف، برای پلیت‌های ۰/۲ mL (Bio-Rad TCS-0803).

ویال/صفحات مناسب را برای ترموسایکلر با قابلیت زمان واقعی خود انتخاب کنید

● ۶ μL از مخلوط آغازگرهای *egfp* (با غلظت ۱۰ pmol/ μL)

CGACGGCAACTACAAGACC: *egfp* 16 F

GTCCTCCTTGAAGTCGATGC: *egfp* 16 R

هر آغازگر اصلی و لیوفیل شده^۱ (خشک شده توسط انجماد سخت) را در آب استریل تا رسیدن به غلظت ۱۰۰ pmol/μL دوباره حل کنید.

- ۶ μL از مخلوط آغازگرهای 23S (با غلظت ۱۰ pmol/μL)

GACGGAGAAGGCTATGTTGG :23S 16 F

GTTGCTTCAGCACCGTAGTG :23S 16 R

- ۱۹۵ μL سوپر میکس سبز Bio-Rad iQ SYBR

- آب استریل

جلسه پانزدهم آزمایشگاه

تجزیه و تحلیل سطوح mRNA ژن *gst::egfp* توسط RT-qPCR: قسمت دوم

تجزیه و تحلیل داده‌های RT-qPCR به فایل odm ذخیره شده از جلسه چهاردهم آزمایشگاه نیاز دارد. هر مرحله نیاز به دسترسی به رایانه دارد. اگر رایانه دانشجویان فاقد نرم‌افزار Bio-Rad MyiQ (سایر نرم‌افزارهای اختصاصی) بود، مربیان می‌توانند مراحل ۱۷-۱ را قبل از جلسه آزمایشگاه تکمیل و از دانشجویان درخواست کنند که این تجزیه و تحلیل‌ها را در نرم‌افزار اکسل انجام دهند.

جلسه شانزدهم آزمایشگاه

تجزیه و تحلیل سطوح mRNA ژن *gst::egfp* توسط qPCR نیمه کمی: قسمت اول

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- کیت سنتز cDNA انتخابی Bio-Rad iScript

- ۱۸ μL ترکیب آغازگری

- ۴/۵ μL از رونوشت بردار معکوس iScript

- ۳۵ μL از مخلوط واکنش iScript ×۳

- ۵۰ μL آب عاری از نوکلئاز

- ۱۸ ویال PCR بدون RNase. ۶ ویال برای رونویسی معکوس، ۱۲ ویال برای qPCR مورد

نیاز است (شماره کاتالوگ Bio-Rad TBS-0201)

- ۳ مجموعه ویال هشت عددی شفاف، برای پلیت‌های ۰/۲ mL (Bio-Rad TCS-0803).

ویال/صفحات مناسب را برای ترموسایکلر با قابلیت زمان واقعی خود انتخاب کنید

1. Lyophilized.

- ۴ μL از مخلوط آغازگرهای ژن *egfp* (با غلظت $10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$)
- CGACGGCAACTACAAGACC :*egfp* 16 F
- GTCCTCCTTGAAGTCGATGC :*egfp* 16 R
- ۴ μL از مخلوط آغازگرهای ژن *23S* (با غلظت $10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$)
- GACGGAGAAGGCTATGTTGG :23S 16 F
- GTTGCTTCAGCACCGTAGTG :23S 16 R
- ۴۰ μL بافر Taq $\times 10$
- ۸ μL مخلوط dNTP (هر 10 mM dNTP)
- ۳ μL Taq ($5 \text{ U}/\mu\text{L}$)
- آب استریل

جلسه هفدهم آزمایشگاه

تجزیه و تحلیل سطوح mRNA ژن *gst::egfp* توسط qPCR نیمه کمی: قسمت دوم
 هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد: دانشجویان به موارد زیر از قبل دسترسی داشته باشند:

- خط کش DNA با اندازه ۱ kb
- بافر بارگذاری DNA $\times 6$
- GelRed (استوک $\times 10000$)
- نمونه های PCR از جلسه شانزدهم
- آگارز
- بافر TBE $\times 1$

تجزیه و تحلیل داده های نیمه کمی RT-PCR را می توان با استفاده از نرم افزار NIH Image J (سایر نرم افزارهای تصویربرداری) (در صورت وجود) انجام داد. هر دانشجو باید NIH Image J را از وبگاه مؤسسه ملی بهداشت دریافت کند (<https://imageJ.nih.gov/ij/download.html>) تعیین کمیت را می توان با استفاده از Microsoft Excel نیز انجام داد.

جلسه هجدهم آزمایشگاه**کشت سلول‌های پستانداران**

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی:

۱- حدوداً ۱-۲ هفته قبل از شروع آزمایشگاه، سلول‌های HEK293 را در محیط کامل ذوب

کنید و کشت دهید.

۲- آزمایش‌های کشت سلولی به یک جعبه سرسمپلر استریل و اتوکلاو شده در تمامی اندازه‌ها

P1000, P200, P20 و P10، برای هر گروه دانشجویی نیاز دارند؛ بنابراین، آن‌ها باید

همیشه به‌صورت استریل استفاده شوند و فقط برای کشت سلولی پستانداران در هود

لامینار استفاده شوند (مخصوص جلسات ۳۰-۱۸). از دانشجویان بخواهید که اقلام خود

برای استفاده شخصی را برچسب بزنند تا از احتمال انتقال آلودگی ممانعت به عمل آورند.

۳- در هر هود لامینار باید یک بطری الکل ۷۰ درصد، سیستم دفع مواد زائد زیستی، رک ویال،

سمپلرهای P1000, P200, P20 و P10، همچنین یک نشانگر وجود داشته باشد.

۴- هر معرف یا ظروف پلاستیکی مورد استفاده برای جلسات آزمایشگاهی ۳۰-۱۸، باید استریل

باشد.

۵- معرف‌های کشت سلولی استریل، مانند محیط، ۱۳PBS×، محلول تریپسین و غیره، باید در

هر جلسه آزمایشگاهی برای هر گروه تقسیم شوند. در صورت امکان باید آن‌ها را ذخیره

کرد تا هزینه‌ها کاهش یابند. پیشنهاد می‌شود به دانشجویان یادآوری کنید که معرف‌های

خود را فقط به‌صورت استریل جابه‌جا و آن‌ها را فقط در محیط استریل باز کنند، زیرا از

آن‌ها برای چندین جلسه آزمایشگاهی استفاده خواهند کرد.

شیوه‌نامه**محیط کامل**

محیط Eagle اصلاح شده Dulbecco با گلوکز بالا (DMEM) حاوی ال-گلوتامین (GlutaMAX-) I،

پیروات سدیم و گلوکز بالا (۴۵۰۰ mg/L) (شماره کاتالوگ Gibco 10569010؛ بطری

۵۰۰ mL)

یک بطری ۵۰۰ mL از DMEM با گلوکز بالا حاوی L-گلوتامین و سدیم پیروات را بردارید و

۵۰ mL از آن را برداشت کنید.

سپس این اجزا را به‌منظور رساندن به غلظت نهایی اضافه کنید:

- سرم جنین گاوی ۱۰ درصد (شماره کاتالوگ Gibco 16000044؛ بطری ۵۰۰ mL)

- ۰/۱ میلی‌مولار MEM اسیدهای آمینه غیر ضروری (۱۰۰×) (شماره کاتالوگ Gibco 11140050؛ بطری ۱۰۰ mL)
- پنی‌سیلین-استرپتومایسین ۱ درصد (۵۰۰ U/mL) (شماره کاتالوگ Gibco 15070063؛ بطری ۱۰۰ mL)
- بی‌کربنات سدیم ۱۵۰۰ mg/L (شماره کاتالوگ Gibco 25080094) ۱× PBS، pH ۷٫۴، اتوکلاو برای استریل کردن.

آماده‌سازی کشت سلولی

سلول‌های HEK293 را ذوب کنید (American Type Culture Collection catalog number CRL-1573). شیوه‌نامه‌های سازنده را برای کشت، نگهداری و ذخیره استوک‌های منجمد پیروی کنید. هنگامی که سلول‌ها به محدوده تلاقی ۸۰-۹۰ درصدی رسیدند، آن‌ها را با رقت ۱:۲ پاساژ کنید.

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- یک پلیت ۱۰ cm² از سلول‌های HEK293 با درصد تلاقی $\leq 50\%$
 - یک بطری با الکل ۷۰ درصد
 - مقدار ۵۰ mL از ۱× PBS در دمای اتاق نگهداری شود
 - محفظه استریل (Fisher Scientific catalog number ۱-۴۷۵-۰۳) شماره کاتالوگ
 - حاوی پایپت‌های پاستور شیشه‌ای، ذخیره و در جلسات بعدی آزمایشگاه استفاده شود
 - ۱۰ mL محلول تریپسین EDTA ۰/۲۵ درصد (Gibco) شماره کاتالوگ ۲۵۲۰۰۵۶؛ ذخیره و برای جلسات بعدی آزمایشگاه استفاده می‌شود، در دمای ۴°C نگهداری شود.
 - ۵۰ mL از محیط کامل، در دمای ۴°C نگهداری شود.
 - پلیت کشت سلولی استریل ۶ چاهکی
 - ویال مخروطی استریل ۵۰ mL
 - پایپت سرولوژیکی ۵، ۱۰ و ۲۵ میلی‌لیتری و از هر کدام ۵ عدد
- این تجهیزات باید به اشتراک گذاشته شوند:
- هماسیتومتر
 - شمارنده دستی
 - میکروسکوپ با زمینه روشن

جلسه نوزدهم آزمایشگاه-الف**جلسه موقت آزمایشگاه****انتقال گذرا pEGFP-N1 در سلول‌های HEK293 با استفاده از FuGENE HD**

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- پلیت ۶ چاهکی سلول‌های HEK293 (از جلسه هجدهم آزمایشگاه)
- سرسمپلر استریل، P10، P20، P200، P1000
- ۵ μL از پلازمید pEGFP-N1 با غلظت ۱ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ، در دمای اتاق یا ۴°C نگهداری کنید.
- ۵ μL از پلازمید pcDNA3 با غلظت ۱ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ، در دمای اتاق یا ۴°C نگهداری کنید
- ۵۰۰ μL از Opti-MEM، در دمای ۴°C نگهداری شود
- ۴ ویال میکرو سانتریفیوژ استریل
- ماژیک

این تجهیزات باید به اشتراک گذاشته شوند:

- میکروسکوپ با زمینه روشن
- معرف FuGENE HD

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی: FuGENE HD را نمی‌توان تقسیم کرد. این ماده باید در ویال شیشه‌ای اصلی که در آن ارسال می‌شود باقی بماند؛ بنابراین، پیشنهاد می‌کنیم که مربی، ویال را به هر گروهی که به آن نیاز دارند، تحویل دهد.

جلسه نوزدهم آزمایشگاه-ب**تجزیه و تحلیل بیان EGFP با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس**

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی: این جلسه از نرم‌افزار NIH Image J استفاده خواهد شد، پیشنهاد می‌کنیم دانشجویان این بسته را دریافت^۱ کنند. هیچ معرف مورد نیازی برای آماده‌سازی وجود ندارد.

جلسه نوزدهم آزمایشگاه-پ**تولید سلول‌های HEK293 با بیان پایدار EGFP**

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی: پیشنهاد می‌کنیم که منحنی کشتار باید دو هفته قبل از شروع جلسه هجدهم آزمایشگاه تکمیل شود تا زمان کافی برای انتخاب وجود داشته باشد. مربیان باید

1. <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>

سلول‌های HEK293 والدی را ۴۸-۲۴ ساعت قبل از جلسه نوزدهم-پ، با تراکم سلولی تقریبی 4×10^4 -۳ در هر چاهک یک پلیت ۶ چاهکی تریپسینه و پلیت کنید تا به درصد تلاقی ۲۰-۳۰ برسند. هر چاهک باید در مجموع حاوی ۲ mL محیط کامل باشد.

انجام منحنی کشتار

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- پلیت ۶ چاهکی سلول‌های HEK293 والدی با درصد تلاقی ۲۰-۳۰
- ۸۰ μ L از محلول G418 ۵۰ mg/mL (معروف به ژنتیکین) (Gibco) به شماره کاتالوگ ۱۰۳۱۰۳۵)، از نور محافظت کنید و در دمای ۴°C نگهداری کنید.
- ۵۰ mL محیط کامل، در دمای ۴°C نگهداری شود
- ۶ ویال مخروطی ۱۵ mL
- سرمپلر استریل، P10, P20, P200, P1000
- پایپت سرولوژیکی ۵، ۱۰ و ۲۵ میلی‌لیتری و از هر کدام ۵ عدد این تجهیزات باید به اشتراک گذاشته شوند:
- میکروسکوپ با زمینه روشن
- انتخاب سلول‌های پایدار
- ۸۰ μ L از G418، ذخیره و برای جلسات بعدی آزمایشگاه استفاده می‌شود
- ویال مخروطی استریل ۵۰ mL
- ۵۰ mL محیط کامل، ذخیره و برای جلسات بعدی آزمایشگاه استفاده می‌شود
- سرمپلر استریل، P10, P20, P200, P1000
- پایپت سرولوژیکی ۵، ۱۰ و ۲۵ میلی‌لیتری و از هر کدام ۵ عدد

جلسه بیستم آزمایشگاه

کاهش بیان EGFP با واسطه RNAi

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی: هنگام کار با RNA، به یاد داشته باشید که از سرمپلر و ویال‌های پایپت بدون RNase استفاده کنید. علاوه بر این، سطح میز کار، داخل هود لامینار و سرمپلرها را با RNaseZAP (Ambion AM9780) پاک کنید. پیشنهاد می‌شود اولیگوهای siRNA را در مقیاس ۲۰ نانومول، نمک‌زدایی شود و با اوورهنک ۳' dTdT (Thermo Fisher Scientific). سفارش دهید.

به‌منظور تعلیق مجدد siRNA:

- ۱- به‌صورت کوتاه ویال را سانتریفیوژ کنید تا مطمئن شوید که siRNA خشک شده در پایین لوله قرار خواهد گرفت.
- ۲- siRNA را در آب استریل و عاری از نوکلئاز برای رسیدن غلظت نهایی $100 \mu\text{M}$ تعلیق کنید. به‌خوبی و رتکس کنید تا تمام siRNA در محلول پخش شود.
- ۳- با استفاده از آب استریل و بدون نوکلئاز، محلول‌های استوک $10 \mu\text{M}$ ایجاد کنید.
- ۴- به‌خوبی و رتکس کنید.
- ۵- قسمت‌های $25 \mu\text{L}$ در هر ویال ایجاد کنید و تا زمان استفاده، در دمای 20°C - منجمد کنید. از انجماد و ذوب مکرر خودداری کنید.

جلسه بیست و یکم آزمایشگاه-الف

کاهش بیان EGFP با واسطه RNAi-بخش دوم

شمارش و پلیت کردن سلول‌های بیان‌کننده EGFP پستانداران

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- یک پتری‌دیش 10 cm^2 از سلول‌های HEK293 با درصد تلاقی $80 \leq$ درصد که به‌طور پایدار پروتئین EGFP را بیان می‌کنند (ایجاد شده از جلسه ۱۹ آزمایشگاه).
- 50 mL از $1 \times$ PBS استریل، در دمای اتاق نگهداری شود
- محفظه استریل پایت پاستور شیشه‌ای
- سرم‌پلرهای استریل P1000، P200 و P20
- 10 mL محلول تریپسین-EDTA 0.25% ، در دمای 4°C نگهداری شود
- 50 mL از محیط کامل بدون آنتی‌بیوتیک، در دمای 4°C نگهداری شود
- پلیت کشت سلولی استریل 6 چاهکی
- ویال مخروطی استریل 50 mL
- پایت سرولوژیکی 5 ، 10 و 25 میلی‌لیتری و از هر کدام 5 عدد
- این تجهیزات باید به اشتراک گذاشته شوند:
- هماسیتومتر
- شمارنده دستی
- میکروسکوپ با زمینه روشن

جلسه بیست و یکم آزمایشگاه-ب

جلسه موقت آزمایشگاه

انتقال گذرا siRNA

پیشنهاد می‌شود هنگام کار با RNA، به یاد داشته باشید که از سرسمپلر و ویال‌های پایت بدون RNase استفاده کنید. علاوه بر این، سطح میز کار، داخل هود لامینار و سرسمپلرها را با RNaseZAP (Ambion AM9780) پاک کنید.

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- یک پتری دیش 10 cm^2 از سلول‌های HEK293 با درصد تلاقی $\leq 50\%$ درصد که به طور پایدار پروتئین EGFP را بیان می‌کنند (ایجاد شده از جلسه ۲۱ آزمایشگاه-الف).
- یک جعبه از سرسمپلرهای استریل P1000، P200 و P20
- ۵۰ mL از ۱× PBS استریل، در دمای اتاق نگهداری شود
- محفظه استریل پایت پاستور شیشه‌ای
- ۱۰ mL محلول تریپسین-EDTA ۰/۲۵ درصد، در دمای 4°C نگهداری شود
- ۵۰ mL از محیط کامل بدون آنتی‌بیوتیک، در دمای 4°C نگهداری شود
- ویال مخروطی استریل ۵۰ mL عاری از RNase
- ۷ ویال میکروسانتریفیوژ عاری از RNase
- ۷۰۰ μL از Opti-MEM، در دمای 4°C نگهداری شود
- پایت سرولوژیکی ۵، ۱۰ و ۲۵ میلی‌لیتری و از هر کدام ۵ عدد
- ۲۵ μL از هر اولیگو (های) siRNA (آزمایشی و کنترل اسکرمل شده) طراحی، سنتز و سفارش داده شده از جلسه ۲۰ آزمایشگاه (در آب عاری از نوکلئاز با غلظت $10\text{ }\mu\text{M}$) تا زمان استفاده در دمای -20°C - درجه سانتی‌گراد نگهداری شود.
- ۵ μL از یک استوک اولیگو siRNA کنترل مثبت EGFP ۱۰ میکرومولاری (خاموش کننده siRNA (eGFP) GFP از Thermo Fisher Scientific شماره کاتالوگ AM4626). این siRNA به صورت محلول ۵۰ مولار ارائه شده است که باید در غلظت $10\text{ }\mu\text{M}$ و با آب بدون نوکلئاز رقیق شود. باقیمانده محلول را در دمای -20°C - درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید.

توجه: FuGENE HD را نمی‌توان تقسیم کرد. این ماده باید در ویال شیشه‌ای اصلی که در آن ارسال می‌شود باقی بماند؛ بنابراین، پیشنهاد می‌کنیم که مربی ویال را به هر گروهی که به آن نیاز دارند، تحویل دهد.

جلسه بیست و دوم آزمایشگاه

کاهش بیان EGFP با واسطه RNAi-بخش سوم

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی: هفتاد و دو ساعت پس از انتقال با اولیگونوکلوئوتیدهای siRNA که EGFP را در سلول‌های HEK293 هدف قرار داده‌اند (جلسه ۲۱-ب)، دانشجویان تصاویر زمینه روشن و فلورسانس هر چاهک را همان‌گونه که پیشتر در جلسه ۱۹-ب آزمایشگاه توضیح داده شد، به دست می‌آورند و ذخیره می‌کنند.

جلسه بیست و سوم آزمایشگاه

سرکوب بیان EGFP با واسطه CRISPR-بخش اول

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی: دست‌کم ۳ روز پیش از جلسه ۲۳ آزمایشگاه، کشت‌های زیر را روی پلیت LB/amp پخش کنید: pLentiCRISPR-E و pLenti-CRISPR-EGFP-2. پلیت‌ها باید یک شب در دمای 37°C انکوبه شوند. صبح روز بعد، پلیت‌ها باید تا بعد از ظهر در دمای 4°C سانتی‌گراد قرار گرفته شوند. یک کلنی جدا شده از هر پلیت باید در ۱۰۰ mL از LB/amp تلقیح شود و با شیک کردن در سرعت تقریبی ۲۵۰ rpm، در طول شب و در دمای 37°C رشد کند. صبح روز بعد، یک کیت Maxiprep باید برای خالص‌سازی DNA پلازمید از هر کشت استفاده شود. این پلازمیدها باید کمی‌سازی و در بین گروه‌ها به اشتراک گذاشته شوند. تنها به تعداد $1/8 \times 10^5$ از سلول‌های HEK293 به ازای هر گروه نیاز است. برای اینکه گروه‌ها در این شیوه‌ها تجربه کسب کنند، پیشنهاد می‌شود برای هر گروه یک فلاسک یا پلیت، قبل از موعد کشت داده شود؛ بنابراین، جزئیات تمرین آزمایشگاهی و لیست آماده‌سازی با این فرض نوشته شده است که هر گروه فلاسک یا پتری‌دیش سلولی خود را دارد.

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- مقدار ۲/۵ mL از PBS ۱×؛ در دمای اتاق نگهداری شود.
- محفظه استریل (حاوی پایپت‌های پاستور شیشه‌ای، ذخیره و در جلسات بعدی آزمایشگاه استفاده شود).
- ۸ mL محلول تریپسین EDTA ۰/۲۵٪، در دمای 4°C نگهداری شود.
- ۵ عدد پایپت سرولوژیکی ۵ میلی‌لیتری.
- سرسمپلرهای استریل P200، P1000 و P20.
- ۸ mL از محیط کامل DMEM بدون آنتی‌بیوتیک، در دمای 4°C نگهداری کنید.
- یک پلیت استریل با ۴۸ چاهک.
- سلول‌های HEK293 با بیان پایدار EGFP.

این تجهیزات باید به اشتراک گذاشته شوند:

- هماسیتومتر
- شمارنده دستی
- میکروسکوپ با زمینه روشن

جلسه بیست و سوم آزمایشگاه-ب

جلسه موقت آزمایشگاه

انتقال وکتورهای CRISPR

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- ۱۲۰ μL از Opti-MEM، در دمای 4°C نگهداری شود
 - حداقل ۲ μL از وکتور pLentiCRISPR-E خالص سازی شده ($0.85 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Addgene Plasmid #78852)، در دمای 4°C نگهداری شود
 - حداقل ۲ μL از وکتور pLentiCRISPR-EGFP-2 خالص سازی شده ($0.85 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Addgene Plasmid #51761)، در دمای 4°C نگهداری شود
 - سرمپلرهای استریل P1000، P200 و P20
 - پلیت ۴۸ چاهکی از سلول های HEK293 بیان کننده EGFP
 - ۳ ویال میکروسانتریفوژ استریل
- این تجهیزات باید به اشتراک گذاشته شوند:
- میکروسکوپ با زمینه روشن

جلسه بیست و سوم آزمایشگاه-پ

جلسه موقت آزمایشگاه

گسترش سلول های منتقل شده

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- مقدار ۴۰۰ μL از PBS $\times 1$ ؛ در دمای اتاق نگهداری شود
- ۴۰۰ μL محلول تریپسین EDTA ۰/۲۵ درصد، در دمای 4°C نگهداری شود.
- ۳-۵ عدد پایت سرولوژیکی ۵ میلی لیتری
- سرمپلرهای استریل P1000، P200 و P20
- ۸ mL از محیط کامل DMEM بدون آنتی بیوتیک، در دمای 4°C نگهداری کنید

- یک پلیت استریل با ۶ چاهک
- محفظه استریل پایت پاستور شیشه‌ای

جلسه بیست و چهارم آزمایشگاه

سرکوب بیان EGFP با واسطه CRISPR-بخش اول

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی: این جلسه از نرم‌افزار NIH Image J استفاده خواهد شد، پیشنهاد می‌کنیم دانشجویان این بسته را دریافت^۱ کنند. هیچ معرف مورد نیازی برای آماده‌سازی وجود ندارد.

جلسه بیست و پنج آزمایشگاه

CRISPR پیشرفته: بخش اول

طراحی و تجزیه و تحلیل sgRNA

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی:

در این جلسه از بسته نرم‌افزاری DESKGEN Cloud استفاده می‌شود^۲. دانشجویان می‌توانند یک حساب کاربری رایگان ایجاد کنند، یا از یکی از حساب‌های ایجاد شده توسط مربی استفاده کنند. مراحل بخش الف را می‌توان در کلاس یا خارج از کلاس به‌عنوان یک تکلیف انجام داد. آغازگرهای طراحی شده در این قسمت برای استفاده در جلسه بیست و ششم هستند؛ بنابراین پیشنهاد می‌کنیم دست‌کم یک هفته پیش از انجام جلسه مذکور، آن‌ها را سفارش دهید.

طراحی آغازگر

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی

بخش ب نیز شامل طراحی آغازگر برای جلسه بیست و نهم آزمایشگاه است. آغازگرهای طراحی شده در بخش الف، همچنین بخش ب، باید با هم در یک زمان سفارش داده شوند. اولیگوهای استاندارد و نمک‌زدایی شده (به‌طور معمول ارزانترین سنتزها)، کافی هستند. اگر پیشتر معلق نشده است، هر اولیگو را تا غلظت $100 \mu\text{M}$ در آب یا TE استریل رقیق کنید. بیشتر شرکت‌ها حجم‌های از پیش محاسبه‌شده را برای تعلیق مجدد ارائه می‌دهند. مربی باید رشته‌های اولیگو و آغازگرهای PCR را به‌منظور طراحی، هم‌تراز کند. دلیلی برای سفارش آغازگرهای مشابه و یا همپوشان وجود

1. <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>

2. <https://www.deskgen.com/landing/cloud.html>

ندارد. یک جفت آغازگر ممکن است برای ارزیابی sgRNA های متعدد، بسته به توالی هدف آن‌ها، کارایی داشته باشد. به دانشجویان پیشنهاد می‌شود که یک سند Word (شکل ۲۶-۵-ب) برای مشخص کردن این توالی‌ها آماده کنند. جمع‌آوری این اسناد یا ایجاد یک سند اصلی برای کلاس مفید است؛ این امر از انتخاب آغازگرهای اضافی جلوگیری به عمل می‌آورد.

هضم محدود کننده و دفسفرولاسیون وکتور CRISPR

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- حداقل ۲ μL از ۵ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ پلازمید pLentiCRISPR-E، در دمای 20°C - نگهداری شود
- ۷ μL بافر ۳/۱ NEB $\times 10$ ، در دمای 20°C - نگهداری شود
- ۴ μL NEB BsmBI (10 U/ μL)، در دمای 20°C - نگهداری شود
- ۱ μL Calf Intestinal Phosphatase (CIP) (۱۰ U/ μL) شرکت NEB

الکتروفورز ژل آگارز و استخراج ستون وکتور CRISPR هضم شده از ژل

لوازم و معرف‌های ذکر شده، در کیت استخراج ژل QIAQEN QIAquick (شماره کاتالوگ ۲۸۷۰۴) موجود است. هر کیت حاوی ستون‌ها و معرف‌هایی برای استخراج ۵۰ ژل است. به حتم شیوه‌نامه کیت را در افزودن اتانول ۱۰۰ درصد به بافر PE دنبال کنید.

- ۶۰۰ μL بافر QG، در دمای اتاق نگهداری شود
- ۱ ستون چرخشی QIAquick، در دمای اتاق نگهداری شود
- ویال جمع‌آوری کننده ۱-۲ mL، در دمای اتاق نگهداری شود
- ۱ mL بافر PE، در دمای اتاق نگهداری شود
- ۴۰ μL بافر EB، در دمای اتاق نگهداری شود
- ۳۰۰ μL ایزوپروپانول، در دمای اتاق نگهداری شود

این تجهیزات باید به اشتراک گذاشته شوند:

- آگارز
 - بافر TBE $\times 1$
 - تیغ‌های جدید برای برداشتن باندها
 - استات سدیم ۳ مولار pH 5
 - خط‌کش DNA (NEB Quick-Load 1 kb)، در دمای 20°C - نگهداری شود
- در ژل‌های آگارز و هنگام استفاده از GelRed، خط‌کش DNA را تا ۱۲/۵ ng/ μL رقیق کنید و مقدار ۱۵۰ ng را به ازای هر چاهک و به‌منظور رسیدن حجم کل به ۱۲ μL بارگیری کنید. برای

رقیق کردن تا $12/5 \text{ ng}/\mu\text{L}$: $30 \mu\text{L}$ از خط‌کش Quick-Load 1 kb + $70 \mu\text{L}$ آب استریل + $20 \times$ از رنگ دای ۶×

دانشجویان باید موارد زیر را از قبل داشته باشند:

- بافر بارگذاری DNA ۶×
- GelRed (استوک $\times 10000$)

جلسه بیست و ششم آزمایشگاه

CRISPR پیشرفته: قسمت دوم

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی:

اولیگوهای از پیش طراحی شده در این جلسه مورد نیاز خواهند بود. قرار بود آن‌ها را حداقل یک هفته قبل از این جلسه طراحی و سفارش دهید. اگر آن‌ها دریافت نشده باشند، دانشجویان نمی‌توانند اولیگوهای متصل شده را کلون کنند. پیشنهاد می‌شود که کارمندان آماده‌سازی (به جای دانشجویان) اولیگوها را در dH_2O یا TE استریل به غلظت نهایی $100 \mu\text{M}$ تعلیق و در دمای 20°C - سانتی‌گراد نگهداری کنند. تمرین‌های آزمایشگاهی و فهرست آماده‌سازی با این فرض نوشته شده‌اند که هر گروه در حال کلون کردن اولیگوهای متصل شده با یک جفت از اولیگوها و با هدف تولید یک sgRNA است. اگر بیش از یک sgRNA در هر گروه وجود داشت، معرف‌ها باید بر اساس آن محاسبه شوند.

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد، سهم هر گروه:

- اولیگوهای طراحی شده توسط دانشجویان، در دمای 20°C - نگهداری شود
 - $2 \mu\text{L}$ اولیگو ۱ ($100 \mu\text{M}$)
 - $2 \mu\text{L}$ اولیگو ۲ ($100 \mu\text{M}$)
 - $8 \mu\text{L}$ بافر DNA لیگاز T4 $\times 10$ ، در دمای در دمای 20°C - نگهداری شود
 - $1 \mu\text{L}$ از T4 PNK شرکت NEB (پلی‌نوکلئوتید کیناز، شماره کاتالوگ M0201S)، در دمای در دمای 20°C - نگهداری شود
 - 50 ng از pLenti-CRISPR-E برش نخورده، در دمای 20°C - نگهداری شود
- توجه: این شیوه‌نامه از DNA لیگاز T4 شرکت NEB، شماره کاتالوگ M0202L استفاده می‌کند. اگر از DNA لیگاز T4 یک شرکت دیگر استفاده می‌کنید، از شیوه‌نامه‌های سازنده پیروی کنید. زمان انکوباسیون ممکن است به‌طور قابل توجهی طولانی‌تر باشد.
- چهار سهم $50 \mu\text{L}$ میکرولیتری از *E. coli* سویه Invitrogen One-Shot Stbl3 با قابلیت صلاحیت انتقال شیمیایی (شماره کاتالوگ علمی Thermo Fisher C737303)

توجه: این سلول‌های شایسته نسبت به سلول‌های مورد استفاده در جلسه پنجم آزمایشگاه، متفاوت هستند. سویه Stb13 رویدادهای نو ترکیبی احتمالی در پلازمیدهای لنتی ویروس را به حداقل می‌رساند. تنها بلافاصله پیش از استفاده، سلول‌های منجمد را ذوب کنید. سلول‌ها نباید بیش از چند دقیقه روی یخ قرار داده شوند. سلول‌ها نباید در هیچ بازه زمانی در دمای اتاق قرار داده شوند.

نکته برای صرفه‌جویی در هزینه: سلول‌های Stb13 ارسالی از شرکت، در مقادیر ۵۰ μL ارائه می‌شوند. می‌توانید برای افزایش تعداد سلول‌های ترادیسی شده ممکن، سهم‌های ۲۵ μL برای دانشجویان تهیه کنید.

● ۱/۲ mL SOC یا LB از پیش گرم شده در دمای اتاق

● ۴ پلیت آگار LB/amp

این تجهیزات باید به اشتراک گذاشته شوند:

● اتانول ۹۵

● آب استریل

دانشجویان باید موارد زیر را از قبل داشته باشند:

PLentiCRISPR-E هضم شده با BsmBI، تیمار شده با CIP، خالص‌سازی شده با ژل از جلسه بیست و پنجم آزمایشگاه

جلسه بیست و هفتم آزمایشگاه-الف

CRISPR پیشرفته: قسمت سوم

شمارش سلول‌های ترادیسی شده و تلقیح کشت‌ها برای Miniprep DNA

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

● ۱ پلیت LB/amp آگار با برجسب شبکه‌ای (شبکه ۳۲ مربعی پتری‌دیش Diversified

Biotech شماره کاتالوگ PSTK-1000)

● ۳ ویال کشت حاوی ۲ mL از LB/amp

جلسه بیست و هفتم آزمایشگاه-ب

CRISPR پیشرفته: قسمت سوم

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

● کیت QIAGEN QIAprep Spin Miniprep (شماره کاتالوگ ۲۷۱۰۴)

لوازم و معرف‌های فهرست شده، در کیت QIAGEN QIAprep Spin Miniprep گنجانده شده است. هر کیت حاوی ستون و معرف برای آماده‌سازی ۵۰ پلازمید است. در افزودن RNase و اتانول ۱۰۰ درصد به بافر PE ارائه شده در کیت، به بافر P1 به حتم از شیوه‌نامه پیروی کنید. سهم هر گروه:

- ۱ mL بافر P1، در دمای ۴°C نگهداری شود
- ۱ mL بافر P2، در دمای اتاق نگهداری شود
- ۱/۲ mL بافر N3، در دمای اتاق نگهداری شود
- ۳ ستون چرخشی QIAprep، در دمای اتاق نگهداری شود
- ۳ ویال جمع‌آوری کننده، در دمای اتاق نگهداری کنید
- ۲/۵ mL بافر PE، در دمای اتاق نگهداری شود
- ۲۰۰ µL بافر EB، در دمای اتاق نگهداری شود
- ۳ ویال PCR برای حمل نمونه به‌منظور توالی‌یابی

جلسه بیست و هشتم آزمایشگاه-الف

CRISPR پیشرفته: قسمت چهارم

تمرین‌های مرتبط با بیوانفورماتیک به‌منظور بررسی داده‌های توالی‌یابی از جلسه بیست و هفتم آزمایشگاه و یک رایانه با نرم‌افزار تجزیه و تحلیل کروماتوگرام، یا Chromas^۱ به‌منظور انجام تجزیه و تحلیل‌های مربوطه.

تنها به ۳/۶×۱۰^۵ از سلول HEK293 بیان کننده EGFP در هر گروه نیاز است. برای اینکه گروه‌های دانشجویی در این شیوه‌ها تجربه کسب کنند، پیشنهاد می‌کنیم یک فلاسک یا پتری‌دیش از سلول‌های HEK293 که EGFP را به‌طور پایدار بیان می‌کنند، زودتر از موعد مقرر برای هر گروه کشت داده شود؛ بنابراین، جزئیات تمرین‌های آزمایشگاهی و لیست آماده‌سازی با این فرض نوشته می‌شود که هر گروه فلاسک یا ظرف سلولی مختص به خود را دارد.

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- مقدار ۲/۵ mL از ۱× PBS؛ در دمای اتاق نگهداری شود
- محفظه استریل حاوی پایپت‌های پاستور شیشه‌ای؛
- ۸ mL محلول تریپسین EDTA ۰/۵ درصد، در دمای ۴°C نگهداری شود.
- ۵ عدد پایپت سرولوژیکی ۵ میلی‌لیتری

1. <http://technelysium.com.au/wp/chromas/>

- سرمپلرهای استریل P20 و P200، P1000
- ۸ mL از محیط کامل DMEM بدون آنتی-بیوتیک، در دمای ۴°C نگهداری کنید
- یک پلیت استریل با ۴۸ چاهک
- سلول‌های HEK293 با بیان پایدار EGFP
- این تجهیزات باید به اشتراک گذاشته شوند:
- هماسیتومتر
- شمارنده دستی

جلسه بیست و هشتم آزمایشگاه

جلسه موقت آزمایشگاه

انتقال وکتورهای CRISPR

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

- ۱۲۰ μ L از Opti-MEM، در دمای ۴°C نگهداری شود
- حداقل ۲ μ L از وکتور pLentiCRISPR-E خالص‌سازی شده (۰/۸۵ μ g/ μ L)
- (Addgene Plasmid #78852)، در دمای ۴°C نگهداری شود
- حداقل ۲ μ L از وکتور pLentiCRISPR-EGFP-2 خالص‌سازی شده (۰/۸۵ μ g/ μ L)
- (Addgene Plasmid #51761)، در دمای ۴°C نگهداری شود.
- این تجهیزات باید به اشتراک گذاشته شوند:
- معرف FuGENE
- حداقل ۲ μ g pLenti-CRISPR-sgRNA حاصل شده از Miniprep DNA در
- جلسه بیست و هفتم-ب

جلسه بیست و نهم آزمایشگاه

CRISPR پیشرفته: قسمت پنجم

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی

حجم‌های معرف فهرست شده در این قسمت، فرض می‌کنند که چهار هضم در هر گروه پردازش می‌شوند.

مابغ خطرناک زیستی از سلول‌های پلت شده، در خارج از آزمایشگاه کشت سلولی معدوم خواهند شد؛ بنابراین لازم است ظروف مخصوص آن حاوی ۱۰ درصد سفیدکننده باشند. دانشجویان از لوازم و معرف‌های ذکر شده استفاده خواهند کرد.

- مقدار ۱ mL از ۱× PBS؛ در دمای اتاق نگهداری شود
- ۱ mL محلول تریپسین EDTA ۰/۲۵ درصد، در دمای ۴°C نگهداری شود.
- ۱ mL از محیط کامل DMEM، در دمای ۴°C نگهداری کنید
- ۲ μL از اولیگوی رفت و برگشت که در جلسه ۲۵ آزمایشگاه طراحی و سفارش داده شده و از قبل در آب استریل یا ۱× TE به غلظت نهایی ۱۰۰ μM معلق شده است.
- ۹ ویال PCR

معرف‌های فهرست شده در کیت Invitrogen GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit (Invitrogen شماره کاتالوگ LSA24372) یافت می‌شوند. اگر از روش تشخیص ایندیل متفاوتی استفاده می‌کنید، به شیوه‌نامه‌های سازنده مراجعه کنید.

- ۲۲۰ μL بافر هضم سلولی، در دمای ۲۰°C- نگهداری شود
- ۱۰ μL تجزیه کننده پروتئین، در دمای ۲۰°C- نگهداری شود
- ۱/۵ μL آغازگرهای الگو و کنترل، در دمای ۲۰°C- نگهداری شود
- ۱۵۰ μL از AmpliTaq Gold، در دمای ۲۰°C- نگهداری شود

این تجهیزات باید به اشتراک گذاشته شوند:

- آگارز
- ۱× TBE

دانشجویان باید از پیش به موارد زیر دسترسی داشته باشند:

- استوک GelRed (۱۰۰۰×)

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی

شیوه‌نامه از هر گروه می‌خواهد که سه ژل آگارز ۲ درصد را تهیه کند. این مورد بر اساس یک ژل «mini» معمولی با یک شانه ۸ چاهکی است؛ زیرا هر گروه باید نمونه‌های فهرست شده در جلسه ۳۰ آزمایشگاه را اجرا کند: هر گروه به شش چاهک در ژل برای تأیید فرآورده PCR نیاز دارد:

۱ خط‌کش DNA

۱ واکنش کنترل مثبت

۱ چاهک برای هر هضم

هر گروه به ۱۱ چاهک اضافه برای مشاهده شکافت نیاز دارد:

۱ خط‌کش DNA

۲ چاهک برای واکنش کنترل

۲ چاهک برای هر هضم (در مجموع ۸)

ژل‌های جلسه بیست و نهم آزمایشگاه باید در سلفون بسته‌بندی شوند و به‌منظور استفاده در جلسه سی‌ام آزمایشگاه، در دمای 4°C ذخیره شوند.

نکته برای صرفه‌جویی در زمان: می‌توانید ژل‌های آگارز ۲ از پیش‌ساخته شده را از تعدادی تولید کننده سفارش دهید.

جلسه سی‌ام آزمایشگاه

CRISPR پیشرفته: قسمت ششم

قابل توجه کارمندان آماده‌سازی

حجم‌های معرف فهرست شده در این قسمت، فرض می‌کنند که چهار هضم در هر گروه پردازش می‌شوند. معرف‌های فهرست شده در کیت Invitrogen GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit (Invitrogen شماره کاتالوگ LSA24372) یافت می‌شوند. اگر از روش تشخیص ایندل متفاوتی استفاده می‌کنید، به شیوه‌نامه‌های سازنده مراجعه کنید.

● ۱۲ μL بافر تشخیص واکنش $10\times$ ، در دمای 20°C - نگهداری شود

● ۸ μL آنزیم تشخیص، در دمای 20°C - نگهداری شود

● ۶۰ μL آب، در دمای اتاق نگهداری شود

هر گروه از مواد و تجهیزات زیر استفاده خواهند کرد:

● ۱۰ ویال PCR

● خط‌کش DNA ۵۰bp شرکت NEB (شماره کاتالوگ N3236)، (غلظت $15\text{ ng}/\mu\text{L}$) در

دمای 20°C - نگهداری شود

● شیوه‌نامه محلول استوک $15\text{ ng}/\mu\text{L}$ خط‌کش ۱ kb شرکت NEB. ۳۰ μL N3236 + μL

۸۰۳ آب استریل + ۱۶۷ μL بافر بارگذاری DNA $6\times$

این تجهیزات باید به اشتراک گذاشته شوند:

● آگارز

اگر تجزیه و تحلیل ژل در طول این جلسه آزمایشگاه اتفاق نیفتد، به دانشجویان پیشنهاد می‌شود که ۱ μL از ۱۰۰ μM EDTA را به هر واکنش اضافه کنند تا هضم متوقف شود و نمونه‌ها در دمای -20°C نگهداری شوند.

● بافر بارگذاری DNA $\times 6$

● آگارز ۲ درصد ذخیره شده از جلسه بیست و نهم

پیوست سوم

آماده‌سازی سلول‌های *Escherichia coli* شایسته

مقدمه

باکتری *E. coli* را می‌توان با تیمار با کاتیون‌های دو ظرفیتی برای جذب DNA مناسب تولید و همچنین می‌توان آن‌ها را در این حالت به‌طور نامحدود در دمای -80°C درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. بخش‌های زیادی از فرآیند ساخت سلول‌های شایسته برای به دست آوردن سلول‌هایی با راندمان تبدیل بالا دارای اهمیت است. سلول‌ها باید در فاز لگاریتمی برداشت شوند و بعد از سرد شدن نباید در دمای اتاق قرار گیرند چون در این صورت توانایی خود را از دست خواهند داد. برای بازده تبدیل بهینه سلول‌ها باید در یک اتاق سرد تقسیم شوند. در صورت نداشتن اتاق سرد، سلول‌ها را می‌توان با دقت فراوان روی یخ توزیع کرد تا از گرم شدن سلول‌ها جلوگیری شود. از آنجایی که ناقل بیان باکتریایی مورد استفاده ما، pET-41a، دارای یک پروموتور T7 است که رونویسی ژن مورد نظر را هدایت می‌کند، سویه میزبان *E. coli* باید یک لیزوژن λDE3 باشد تا یک RNA پلیمراز T7 برای وصل شدن به پروموتور داشته باشد. برای بیان سویه BL21(DE3) مناسب است.

شیوه‌نامه

آماده‌سازی سلول‌های شیمیایی مناسب با تیمار کلرید کلسیم

به یاد داشته باشید که در این روش از آنتی‌بیوتیک استفاده نمی‌کنید. از تکنیک استریل استفاده کنید و از استریل بودن بطری‌های سانتریفیوژ مطمئن شوید. مراحل زیر از Chung et al. 1 اصلاح شده است.

۱. کشت یک‌شبه *E. coli* را با استفاده از یک حلقه تلقیح استریل برای خراش دادن سلول‌ها از یک کلونی به میزان ۲ میلی‌لیتر (LB) Luria-Bertani در یک ویال پلی‌پروپیلن با درپوش شروع کنید. (توجه: آنتی‌بیوتیک اضافه نمی‌شود) و اجازه دهید در دمای 37°C یک شب در انکوباتور شیکردار انکوباسیون شود.

۲. صبح روز بعد، کشت ۱۰۰ میلی‌لیتر *E. coli* BL21(DE3) را با کشت تازه یک‌شبه به‌عنوان تلقیح شروع کنید. بر اساس تعداد دانشجویان کلاس خود، چند فلاسک ۱ لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر LB را با ۰/۱ میلی‌لیتر کشت شبانه تلقیح کنید. باید نزدیک به یک کشت ۱۰۰ میلی‌لیتری را در هر ۱۰ گروه آزمایشگاهی شروع کنید.

۳. فلاسک را با تکان دادن در دمای 37°C انکوباسیون کنید. باکتری‌ها را تا فاز لگاریتمی رشد دهید که با مقدار OD600 بین $0/3$ تا $0/5$ نشان داده می‌شود. $2/5$ ساعت طول می‌کشد تا کشت به مرحله مناسب برای ساخت سلول‌های شایسته برسد. از روش استریل (از جمله پایپت‌های استریل) برای خارج کردن نمونه‌ها از کشت برای اندازه‌گیری OD600 آن‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر استفاده کنید. هنگامی که کشت‌ها کدر به نظر می‌رسند، در فاز لگاریتمی رشد هستند و OD600 آن‌ها به سرعت افزایش می‌یابد.
۴. هنگامی که به چگالی نوری مناسب رسید، کشت را در دو ویال سانتریفیوژ بزرگ استریل از پیش سرد شده بریزید. ویال‌ها را متعادل کنید و سپس به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار دهید. از این به بعد، مهم است که سلول‌ها هرگز در دمای اتاق قرار نگیرند.
۵. سلول‌ها را با سانتریفیوژ در 6000 دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 4°C برداشت کنید. مطمئن شوید که موتور دستگاه از قبل سرد شده است.
۶. مایع رویی را دور بریزید و سلول‌ها را روی یخ نگه‌دارید، محیط LB اضافی را با یک پایپت پاستور استریل یا یک سمپلر ۱ میلی‌لیتری بردارید. سلول‌ها را به آرامی از طریق پایپت کردن به بالا و پایین در ۱ mL محلول ذخیره‌سازی، دوباره تعلیق کنید.
۷. محتویات یک ویال را به ویال دیگر منتقل کنید تا سلول‌ها تثبیت شوند. در این زمان باید بسیار ملایم باشید زیرا سلول‌ها در این مرحله شکننده هستند. TSS حاوی 50 mM MgCl_2 است. سایر روش‌ها از 50 mM CaCl_2 استفاده می‌کنند. اگر قصد منجمد کردن برخی از سلول‌ها را دارید، دی متیل سولفوکسید (DMSO) موجود در TSS ضروری است. از آنجایی که بازده تبدیل اندکی کاهش می‌یابد، فریز کردن سلول‌های اضافی همیشه مفید است.
۸. مقدار $50\text{ }\mu\text{L}$ را به سرعت در ویال‌های میکروسانتریفیوژ سرد روی یخ پایپت کنید. این سلول‌ها را می‌توان بلافاصله استفاده یا در دمای -80°C منجمد کرد. شما باید ویال را برای سنجش ترادیدی روی یخ نگه دارید و بقیه را فریز کنید. برای جلسه ۵ آزمایشگاه به ۳ واحد $50\text{ }\mu\text{L}$ سلول‌های منجمد در هر گروه آزمایش نیاز دارید.
۹. برای منجمد کردن سلول‌های مناسب، سطل یخ خود را به یک حمام یخ خشک/ اتانول در نزدیکی فریزر -80°C ببرید. با استفاده از یک نگه‌دارنده ویال میکروسانتریفیوژ از قبل خنک شده، ویال‌ها را غوطه‌ور کنید. لوله‌ها را در یک جعبه مقوایی برچسب دار یا استایروفوم برگردانید و بلافاصله در دمای -80°C قرار دهید.

کنترل ترادیسی

بازده تبدیل با تعیین تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی $\text{cfu}/\mu\text{g DNA}$ اندازه گیری می شود. فقط باید از DNA سوپر کوپل استفاده شود (DNA خطی به طور مؤثر ترادیسی نمی شود). در این بخش از ۱۰ نانوگرم DNA pET-41a برش نخورده برای تأیید صلاحیت سلول ها استفاده خواهید کرد.

۱. روی دو ویال میکروسانتریفیوژ استریل از قبل سرد شده را با یک علامت برای تیمارهای زیر برچسب بزنید: pET-41a, TE.

۲. $20 \mu\text{L}$ از سلول های شایسته را به هر ویال تقسیم کنید. به یاد داشته باشید که سلول ها را در تمام مدت روی یخ نگه دارید.

۳. به ویال مناسب اضافه کنید:

الف. $2 \mu\text{L}$ TE.

ب. $2 \mu\text{L}$ از $5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ pET-41a را به آرامی مخلوط کنید و به مدت ۵ دقیقه روی یخ بگذارید.

۴. شوک حرارتی سلول ها به مدت ۳۰ ثانیه در دمای 42°C .

۵. ویال ها را به مدت ۲ دقیقه روی یخ انکوباسیون کنید.

۶. $80 \mu\text{L}$ محیط مایع (LB یا SOC) اضافه کنید، ویال ها را به آرامی برعکس کنید تا مخلوط شوند و با تکان دادن در دمای 37°C ، ۲۲۵ دور در دقیقه به مدت ۴۵ دقیقه انکوباسیون کنید.

۷. کل حجم ($100 \mu\text{L}$) را روی یک محیط انتخابی (LB/kan) قرار دهید.

۸. پلیت ها را یک شب در دمای 37°C انکوباسیون کنید.

۹. پلیت ها را تحت نظر داشته باشید. کنترل TE نباید کلنی داشته باشد. کنترل pET-41a باید دارای کلنی های متعدد باشد.

۱۰. راندمان تبدیل سلول ها را با شمارش تعداد سلول های صفحه کنترل pET-41a خود محاسبه کنید. اگر تعداد سلول های کل صفحه برای شمارش زیاد است، می توانید کسری^۱ از صفحه را بشمارید ($1/2$ یا $1/8$) و تعداد سلول های آن بخش را در عدد مناسب ضرب کنید تا تعداد کل کلنی ها در کل پلیت تخمین زده شود.

منبع

1. Chung CT, Nienela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2172_5.

پرسش‌های پیش از آغاز جلسه‌های آزمایشگاهی

جلسه اول آزمایشگاه

۱. رشته (ها)/گرایش شما چیست (دانشجویان مقطع کارشناسی، کارشناسی ارشد و دکتری: در صورت انتخاب، محقق اصلی شما کیست)؟
۲. چه مواردی را در این کلاس فرا خواهید گرفت؟
۳. اهداف شغلی شما چیست؟
۴. آیا تجربه قبلی در زمینه زیست‌شناسی / بیوشیمی مولکولی داشته‌اید؟ اگر چنین است، چه کاری (تجربه درسی/تحقیق مرتبط) انجام داده‌اید؟

جلسه دوم آزمایشگاه

۱. محدوده حجم (حداکثر و حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری) سمپلرهای زیر چقدر است؟

الف. آ. P10

ب. P20

ج. P200

د. P1000

۲. حجم پایپت شده (برحسب میکرولیتر) و طبق موارد زیر، چقدر است؟

۰	۱	۰
۵	۵	۶
۰	۴	۴
(P200)	(P20)	(P1000)

a _____ b _____ c _____

۳. از چه روشی برای جدا کردن پلازمید از DNA کروموزومی استفاده خواهد شد؟

آ. آنزیم آلکالاین

ب. جذب سیلیکا

ج. نانودراپ / اسپکتروفتومتری

د. هضم محدود کننده

۴. نسبت A260/280 _____ نشان دهنده خلوص مطلوب DNA دو رشته‌ای است.

۵. چرا از دو آنزیم محدود کننده مختلف برای برش ناقل pET-41a استفاده می‌کنید؟

- آ. در صورتی که یکی از آنزیم‌ها توانایی برش را نداشته باشد
 ب. زیرا این دو آنزیم دارای انتهای چسبنده سازگار هستند
 ج. زیرا برش وکتور با دو آنزیم که انتهای ناسازگار را تولید کرده است، سپس برش ژن
 الحاقی با همان دو آنزیم هنگام شبیه‌سازی، ژن الحاقی را وادار به جهت‌گیری صحیح
 می‌کند
 د. الف و ب

جلسه سوم آزمایشگاه

۱. کدام DNA به‌عنوان الگو برای تکثیر *egfp* در PCR جلسه امروز عمل می‌کند؟
 آ. pET-41a
 ب. *egfpNco*
 ج. *egfpNot*
 د. pEGFP-N1
 ه. ب و ج
۲. مبنای انتخاب دمای وصل شدن برای استفاده در یک واکنش PCR معین چیست؟
 آ. طول و محتوای GC آغازگرها
 ب. طول و محتوای GC فرآورده PCR مورد نظر
 ج. سایت‌های محدود شونده در آغازگرهای مهندسی شده
 د. دمای واکنش ایده‌آل پلیمراز
 ه. هدف از به‌کارگیری وکتور هضم شده در ستون چرخشی چیست؟
۳. آ. برای حذف *E. coli* زنده که ممکن است در نمونه مخلوط شود.
 ب. برای حذف آنزیم‌های هضم محدود کننده.
 ج. برای حذف نمک‌های ناخواسته قبل از وصل شدن.
 د. الف، ب و ج.
 ه. ب و ج.
۴. در الکتروفورز DNA با آگارز، چاهک‌ها باید به کدام قسمت دستگاه نزدیک‌تر باشد؟
 آ. سمت سیاه (کاتد)
 ب. سمت قرمز (آند)

۵. از آنجایی که یک قطعه ۷۳ جفت بازی از pET-41a در طول هضم حذف می‌شود، وکتور برش نخورده باید همیشه از ژل آگارز کندتر از وکتور بریده/ هضم شده عبور کند.
- آ. درست
ب. نادرست

جلسه چهارم آزمایشگاه

۱. اندازه تقریبی مورد انتظار شما از باندهای فرآورده‌های PCR روی ژل چقدر است؟
- آ. ۷۰۰ kb
ب. ۵ kb
ج. ۶ kb
د. ۱ kb
ه. ۷۰۰ bp
۲. اگر عدد نانودراپ شما ۷۵ ng/μL بود، چه حجمی از فرآورده PCR باید به واکنش هضم محدودکننده اضافه کنید؟
- آ. ۰/۱۵ μL
ب. ۶/۶۷ μL
ج. ۱۵۰ μL
د. ۶۶۷۰ μL
۳. هدف از خوانش عدد نانودراپ فرآورده PCR شما چیست؟
- آ. برای تعیین غلظت DNA
ب. برای تعیین حجم DNA
ج. برای تعیین شدت فلورسانس *egfp*
د. برای تعیین اینکه آیا فرآورده‌های PCR غیر اختصاصی دارید یا خیر.
۴. اگر فرآورده *egfp* خالص و هضم شده حاصل از PCR دارای غلظت ۷ ng/μL باشد، برای واکنش لیگاسیون در هفته بعد باید از چه حجمی استفاده کنید تا ۲۱ ng داشته باشید (از معادله داده شده در پایان جلسه آزمایشگاه استفاده کنید)؟
۵. اگر مقدار کمی آنزیم دارید و نمی‌توانید کل حجم ماده را از ویال با استفاده از پایپت کردن خارج کنید، کدام عمل را انجام خواهید داد؟
- آ. سعی کنید مایع را به مدت ۵ ثانیه سانتریفیوژ کنید.
ب. ورتکس کردن

- ج. به‌عنوان اولین راه‌حل از مربی خود شکایت کنید.
د. گریه کن برو خونه (:)

جلسه پنجم آزمایشگاه

۱. DNA خطی در *E. coli* تکثیر نخواهد شد حتی اگر داخل سلول برده شود.
 - آ. درست
 - ب. نادرست
۲. بافر لیگاز در زمانی که استفاده نمی‌شود نیازی به نگهداری روی یخ ندارد زیرا در دمای اتاق فعال است.
 - آ. درست
 - ب. نادرست
۳. برای آزمایش امروز، نسبت وکتور به ژن الحاقی که از آن استفاده خواهید کرد چقدر است؟
 - آ. ۱:۱
 - ب. ۵:۱
 - ج. ۱:۵
 - د. ۱:۱۰
۴. چه اقداماتی را برای اطمینان از صحت شایستگی سلول‌های خود در نظر خواهید گرفت؟

آ. pET-41a برش نخورده

ب. وکتور هضم شده با ژن الحاقی

ج. وکتور هضم شده بدون ژن الحاقی

د. هیچ‌کدام از موارد بالا
۵. پیش از استفاده برای انتقال، سلول‌های شایسته را با تکان دادن ویال به جای ورتکس کردن آن‌ها به آرامی مخلوط کنید.
 - آ. درست
 - ب. نادرست

جلسه ششم آزمایشگاه

۱. هنگام انجام یک Miniprep، باید نمونه‌های خود را به‌خوبی هم بزنید تا پس از افزودن بافر P2 از اختلاط کامل اطمینان حاصل کنید.
 - آ. درست
 - ب. نادرست
۲. شیوه‌نامه Miniprep برای خالص‌سازی DNA پلازمید از هضم قلیایی استفاده می‌کند.
 - آ. درست
 - ب. نادرست
۳. هدف از انجام Minipreps در آزمایشگاه امروز خالص‌سازی DNA _____ است.
 - آ. برای دیدن اینکه آیا در معرض نور UV سبز می‌درخشد یا خیر.
 - ب. برای استفاده در واکنش‌های هضم محدود کننده.
 - ج. برای ارسال توالی‌یابی DNA
 - د. ب و ج
۴. در غربال PCR، آغازگرها چگونه طراحی می‌شوند؟
 - آ. هر دو برای وصل شدن به انتهای مخالف ژن الحاقی طراحی شده‌اند.
 - ب. هر دو به‌گونه‌ای طراحی شده‌اند که به DNA ناقل، در طرف مقابل ژن الحاقی متصل شوند.
 - ج. هر دو برای وصل شدن به DNA ناقل در یک سمت ژن الحاقی طراحی شده‌اند.
 - د. یکی برای وصل شدن DNA ژن الحاقی و دیگری برای وصل شدن DNA ناقل مجاور طراحی شده است.
۵. اگر یک کلونی را هنگام تکثیر به پلیت LB/kan به‌جای پلیت LB/kan/IPTG منتقل کنید، انتظار دارید هفته آینده هنگام بررسی سلول‌ها چه چیزی را ببینید؟
 - آ. باکتری‌ها روی پلیت رشد نمی‌کنند.
 - ب. باکتری‌ها روی صفحه پلیت رشد می‌کنند، اما ژن *egfp* در آن‌ها وجود ندارد؛ بنابراین بیان پروتئین EGFP وجود ندارد.
 - ج. باکتری‌های حاوی ژن *egfp* رشد می‌کنند، اما پروتئین EGFP بیان نمی‌شود.
 - د. باکتری‌هایی با سطوح بالای بیان EGFP رشد می‌کنند.

جلسه هفتم آزمایشگاه

۱. هدف از آماده‌سازی یک مستر میکس چیست؟

آ. به حداقل رساندن خطای احتمالی در پایت کردن حجم‌های کوچک‌تر

ب. تنوع بین نمونه‌ها را کاهش می‌دهد

ج. باعث صرفه‌جویی در زمان می‌شود

د. همه موارد فوق

۲. اگر یک کلون منفی (کلون بدون ژن الحاقی) داشته باشید، در واکنش غربالگری با PCR، وقتی

فرآورده PCR خود را روی ژل تجزیه و تحلیل می‌کنید، انتظار دارید چه چیزی را ببینید؟

آ. بدون باند روی ژل

ب. یک باند حدود ۷۵۰ bp

ج. یک باند حدود ۱۲۰۰ bp

د. دو باند

۳. در واکنش غربالگری با PCR، در صورت داشتن یک کلون مثبت (یک کلون با ژن الحاقی *egfp*)

وقتی فرآورده PCR خود را روی ژل تجزیه و تحلیل می‌کنید، انتظار دارید چه چیزی را

ببینید؟

آ. بدون باند روی ژل

ب. یک باند حدود ۷۵۰ bp

ج. یک باند حدود ۱۲۰۰ bp

د. دو باند

۴. در تجزیه و تحلیل هضم محدود شونده، در صورت داشتن یک کلون منفی، انتظار دارید وقتی

هضم‌های خود را روی ژل تجزیه و تحلیل می‌کنید، چه چیزی را ببینید؟

آ. بدون باند روی ژل

ب. یک باند حدود ۷۵۰ bp

ج. یک باند حدود ۶۰۰۰ bp

د. دو باند، در اندازه‌های تقریبی ۷۵۰ و ۶۰۰۰ جفت باز

۵. آغازگرهای توالی‌یابی باید طوری طراحی شوند که به کجا متصل شوند؟

آ. نزدیک به ۶۰ نوکلئوتید در بالادست ابتدای منطقه‌ای که باید توالی‌یابی شود

ب. نزدیک به ۵ نوکلئوتید در بالادست ابتدای منطقه‌ای که باید توالی‌یابی شود

ج. نزدیک به ۵ نوکلئوتید در پایین‌دست ابتدای منطقه‌ای که باید توالی‌یابی شود

د. تا زمان وصل شدن آغازگر به نقطه آغاز توالی‌یابی، مهم نیست به‌طور دقیق کجا طراحی شده است.

جلسه هشتم آزمایشگاه

۱. هر پیک در کروماتوگرام مربوط است به:

آ. یک تری فسفات دئوکسی نوکلئوتید فلورسنت (dNTP) که از یک قطعه DNA آزاد و منجر به پایان سنتز می‌شود.

ب. یک تری فسفات دئوکسی نوکلئوتید فلورسنت (dNTP) که در یک قطعه DNA ادغام و منجر به پایان سنتز می‌شود.

ج. یک دی اکسی نوکلئوتید تری فسفات فلورسنت (ddNTP) که از یک قطعه DNA آزاد و منجر به پایان سنتز می‌شود.

د. یک دی اکسی نوکلئوتید تری فسفات فلورسنت (ddNTP) که در یک قطعه DNA گنجانده و منجر به پایان سنتز می‌شود.

۲. یک فرآیند خوانش توالی رایج، به‌صورت معمول تعداد _____ از نوکلئوتیدها را بدون ابهام خوانش می‌کند.

آ. ۸۰-۱۰۰

ب. ۳۰۰-۵۰۰

ج. ۸۰۰-۱۰۰۰

د. ۳۰۰۰-۵۰۰۰

۳. انتظار دارید در قسمت توالی خوانده‌شده خود «N» های چندگانه را ببینید؟

آ. در ابتدای توالی (۲۵ نوکلئوتید اول)

ب. وسط توالی مورد نظر

ج. در پایان توالی (۲۵ نوکلئوتید آخر)

د. آ و ب

ه. آ و ج

۴. از کدام ابزار برای جستجوی شباهت بین داده‌های توالی‌یابی و توالی pBIT مورد انتظار استفاده می‌کنید؟

آ. BLAST

ب. توالی‌یابی Sanger

ج. بسته Chromas Lite

د. Genbank

۵. اگر یک جهش در توالی *egfp* وجود داشته باشد، جهش به احتمال زیاد توسط _____ القاء شده است.

آ. آنزیم در طی PCR

ب. باکتری در مرحله انتقال

ج. خطای دانشجو در یکی از مراحل قبلی

د. تکثیر اشتباه باکتری‌ها در حین تکثیر DNA

جلسه نهم آزمایشگاه

۱. در SDS-PAGE از چه ماده شیمیایی برای اطمینان از پوشیده شدن تمام مولکول‌های پروتئین با بار منفی استفاده می‌شود؟

آ. IPTG

ب. β -Mercaptoethanol

ج. SDS

د. X-gal

۲. در SDS-PAGE از چه ماده شیمیایی برای اطمینان از شکسته شدن پیوندهای دی سولفیدی پروتئین‌ها استفاده می‌شود؟

آ. IPTG

ب. β -Mercaptoethanol

ج. SDS

د. X-gal

۳. مزیت انجام ژل پروتئینی ناپیوسته به جای ژل پیوسته چیست؟

آ. پروتئین‌ها را می‌توان تنها بر اساس اندازه جدا کرد، نه اینکه به اندازه، شکل و بار بستگی داشته باشند.

ب. برای وضوح بهتر باندهای پروتئینی.

ج. ژل سریع‌تر اجرا می‌شود.

د. الف و ب

ه. هیچ‌کدام از موارد بالا.

۴. مزیت تیمار نمونه‌های پروتئینی با SDS و β -Mercaptoethanol چیست؟

آ. پروتئین‌ها را می‌توان تنها بر اساس اندازه جدا کرد، نه اینکه به اندازه، شکل و بار بستگی داشته باشند.

ب. برای وضوح بهتر باندهای پروتئینی.

ج. ژل سریع‌تر اجرا می‌شود.

د. الف و ب

ه. هیچ‌کدام از موارد بالا

۵. اشکال غیر پلیمریزه آکریل آمید (پودر و مایع) بسیار خطرناک‌تر از پلی آکریل آمید پلیمریزه شده (جامد شده) است.

آ. درست

ب. نادرست

جلسه دهم آزمایشگاه

۱. هدف از رنگ‌آمیزی با قرمز پانسو (Ponceau) چیست؟

آ. برای مشاهده نشانگرهای وزن مولکولی.

ب. برای تأیید بیان پروتئین الحاقی معین GST::EGFP

ج. برای مسدود کردن مکان‌های غیر اختصاصی روی غشاء پیش از افزودن آنتی‌بادی اولیه برای وسترن بلات.

د. برای تأیید اینکه پروتئین‌ها، به‌طور کلی، از ژل به نیتروسلولز منتقل شده‌اند.

۲. هنگام انجام رنگ‌آمیزی پانسو، ممکن است یک باند در اندازه تقریبی ۲۵ kD در کنترل منفی خود مشاهده کنید که در کنترل مثبت یا سایر کلون‌های مثبت وجود ندارد. این گروه چه چیزی را نشان می‌دهد؟

آ. GST تجزیه شده: پروتئین فیوژن EGFP

ب. جزء زنجیره سبک آنتی‌بادی مورد استفاده برای رنگ‌آمیزی

ج. پروتئین GST به تنهایی (بدون EGFP مرتبط)

د. LacI

۳. در پایان وسترن بلات، چه چیزی را روی غشاء خواهید دید؟

آ. نشانگرهای وزن مولکولی

ب. فقط پروتئین الحاقی GST::EGFP

ج. تمامی پروتئین‌های بیان شده توسط *E. coli* در باندهایی که توسط عصاره سلولی بازگیری شده‌اند

د. الف و ب

ه. الف و ج

۴. اندازه تقریبی پروتئین فیوژن GST::EGFP چقدر خواهد بود؟

آ. ۲۵ kDa

ب. ۳۰ kDa

ج. ۶۰ kDa

د. ۶۶۵۳ kDa

۵. برای ایجاد رقت ۱:۵۰۰۰ از یک آنتی‌بادی، چه حجمی از آنتی‌بادی باید به ۱۰ mL محلول TBS-T اضافه شود؟

آ. ۲ μ L

ب. ۵ μ L

ج. ۲۰ μ L

د. ۵۰ μ L

جلسه یازدهم آزمایشگاه

۱. هدف از وجود بخش GST در پروتئین الحاقی چیست؟

آ. پروتئین را سبز فلورسانس می‌کند.

ب. مسئول القای پروتئین IPTG است.

ج. این امکان را برای خالص‌سازی پروتئین با استفاده از ستون میل ترکیبی گلوپاتایون فراهم می‌کند.

د. اجازه می‌دهد تا پروتئین فیوژن به دو قطعه تقسیم شود.

۲. ژن *gst* از کجا آمده است؟

آ. پیشتر در وکتور بیانی pET-41a مهندسی شده بود.

ب. فلورسنت عروس دریایی

ج. آن را پس از خالص‌سازی در ژل، در وکتور pET-41a کلون کردیم.

د. هر دو آ و ج

۳. کدام بخش از آزمایش خالص‌سازی کروماتوگرافی میل ترکیبی، دارای بیشترین مقدار کل پروتئین مورد نظر است؟

آ. هضم سلولی (عصاره‌گیری سلولی)

ب. جریان عبوری (بدون محدودیت)

ج. شستشو

د. شویش

۴. شویش پروتئین الحاقی شما از ستون با افزودن گلوکاتینون کاهش یافته، صورت می‌گیرد. گلوکاتینون چگونه این عمل را انجام می‌دهد؟

آ. رقابت برای محل‌های وصل شدن روی ستون، باعث حذف پروتئین الحاقی می‌شود

ب. وصل شدن به بخش GST پروتئین الحاقی که باعث می‌شود پروتئین فیوژن قادر به وصل شدن به ستون نباشد.

ج. وصل شدن به بخش EGFP پروتئین فیوژن که باعث می‌شود پروتئین فیوژن قادر به وصل شدن به ستون نباشد.

۵. آنزیم لایزوزایم چه عملی را انجام می‌دهد؟

آ. دیواره سلولی باکتری را می‌شکند

ب. DNA را برای ساده کردن خالص‌سازی پروتئین تجزیه می‌کند

ج. RNA را برای ساده کردن خالص‌سازی پروتئین تجزیه می‌کند

د. هر دو ب و ج

ه. همه موارد بالا

جلسه دوازدهم آزمایشگاه

۱. ما باید از یک آنتی‌بادی اختصاصی EGFP استفاده کنیم تا ارزیابی کنیم که آیا پروتئین الحاقی خود را با موفقیت از آلاینده‌ها پاک‌سازی کرده‌ایم یا خیر.

آ. درست

ب. نادرست

۲. باندهای اضافی در جزه‌های شویش، به‌عنوان مثال به غیر از باندی که پروتئین همجوشی GST::EGFP را نشان می‌دهد، می‌تواند ناشی از:

آ. آلاینده‌های موجود در نمونه شما (به‌عنوان مثال ستون به‌خوبی شسته نشده است)

ب. تخریب پروتئین الحاقی

ج. عدم توانایی پروتئین الحاقی در وصل شدن به ستون

د. هر دو آ و ب

ه. همه موارد بالا

۳. فرض کنید شما سه جز شویش دارید که هر کدام $500 \mu\text{L}$ حجم دارد. غلظت (مقدار کل) از

GST::EGFP در جزیهای شویش به شرح زیر است:

شویش ۱: 0.1 میکروگرم در میلی‌لیتر ($0.1/0.5 \mu\text{g}$)

شویش ۲: 0.4 میکروگرم در میلی‌لیتر ($0.4/2 \mu\text{g}$)

شویش ۳: 0.5 میکروگرم در میلی‌لیتر ($0.5/25 \mu\text{g}$)

اگر بخش‌های حاصل شویش با هم ترکیب شوند، مقدار کل GST::EGFP چقدر خواهد بود؟

آ. $0.5 \mu\text{g}$

ب. $1/0 \mu\text{g}$

ج. $1/5 \mu\text{g}$

د. $500 \mu\text{g}$

ه. $750 \mu\text{g}$

۴. معرف GelCode Blue کدام یک از موارد زیر را رنگ‌آمیزی می‌کند؟

آ. فقط خط‌کش وزن مولکولی

ب. فقط پروتئین‌های GST::EGFP

ج. همه پروتئین‌ها به جز پروتئین‌های GST::EGFP

د. تمام پروتئین‌های موجود در ژل

۵. انتظار دارید کدام جز کمترین غلظت پروتئین کل را داشته باشد که با سنجش پروتئین برادفورد

اندازه‌گیری می‌شود؟

آ. هضم سلولی

ب. آخرین جز جریان

ج. فلورسنت‌ترین جز شویش

جلسه سیزدهم آزمایشگاه

۱. دو دلیل برای همگن سازی (هموژینه کردن) *E. coli* را ذکر کنید.
۲. چرا از دومین مرحله ستون چرخشی RNeasy بعد از مرحله DNase استفاده می کنید؟
 - آ. برای خالص سازی RNA اضافی که در ستون اول خالص سازی نشده است.
 - ب. برای غیرفعال کردن DNase.
 - ج. برای حذف نمک ها
 - د. هر دو آ و ج
 - ه. هر دو ب و ج
۳. چه نوکلئیک اسیدی را از *E. coli* خالص سازی خواهید کرد؟
 - آ. DNA ژنومی (gDNA)
 - ب. DNA مکمل (cDNA)
 - ج. RNA پیام رسان (mRNA)
 - د. کل RNA
۴. ضریب جذب RNA چقدر است؟
۵. اگر میزان جذب نمونه های خود را بخوانید و نسبت A_{260}/A_{280} ۱/۵ باشد، محتمل ترین آلاینده کدام است؟

جلسه چهاردهم

۱. چه نوع آنزیمی برای تبدیل RNA به cDNA استفاده خواهد شد؟
 - آ. Transcriptase معکوس
 - ب. RNA پلیمراز
 - ج. لیگاز
 - د. Oligo-dT
۲. در qPCR، از کدام مورد برای تعیین کمیت DNA تکثیر شده استفاده می شود؟
 - آ. اسپکتروفتومتری
 - ب. الکتروفورز ژل
 - ج. فلورسانس
 - د. لومینسانس

۳. چرا یک واکنش بدون RT آماده می‌شود؟
 آ. برای کمک به تعیین کمیت سطح ژن مرجع
 ب. برای کنترل آلودگی پروتئین
 ج. برای کنترل آلودگی DNA
 د. همه موارد بالا.
۴. دو کیفیت مورد نیاز یک ژن مرجع چیست؟
۵. چند مستر میکس را برای مرحله رونویسی معکوس آماده خواهید کرد؟
 آ. یک
 ب. دو
 ج. سه
 د. چهار

جلسه پانزدهم آزمایشگاه

۱. چرخه‌ای که در آن نمودار تکثیر از آستانه عبور می‌کند، چه می‌نامید؟
 آ. چرخه نمایی
 ب. چرخه آستانه
 ج. چرخه پایه
 د. چرخه ثابت
۲. با فرض اینکه یک آستانه به درستی تنظیم شده باشد. اگر آمپلیکون A دارای مقدار $C_T:22$ و آمپلیکون B دارای مقدار $C_T:23$ باشد:
 آ. نزدیک به دو برابر آمپلیکون B نسبت به آمپلیکون A در نمونه وجود دارد.
 ب. نزدیک به دو برابر آمپلیکون A نسبت به آمپلیکون B در نمونه وجود دارد.
 ج. آمپلیکون B کمی بیشتر از آمپلیکون A در نمونه وجود دارد.
 د. آمپلیکون A فقط کمی بیشتر از آمپلیکون B در نمونه وجود دارد.
۳. در این جلسه آزمایشگاه، کدام مورد به‌عنوان کالیبراتور شما عمل می‌کند؟
 آ. *egfp*
 ب. *S23*
 ج. بدون القاء
 د. القای IPTG

۴. در این جلسه آزمایشگاه، کدام مورد به عنوان مرجع شما عمل خواهد کرد؟

آ. *egfp*

ب. *S23*

ج. بدون القاء

د. القای IPTG

۵. یکی از نگرانی‌های تعیین آستانه در مقادیر بسیار پایین چیست؟

آ. شما می‌توانید تکثیر را در فاز ثابت تجزیه و تحلیل کنید.

ب. شما می‌توانید تکثیر را در فاز نمایی تحلیل کنید.

ج. شما می‌توانید سیگنال‌های پس زمینه را تجزیه و تحلیل کنید.

د. هر دو آ و ب

جلسه شانزدهم آزمایشگاه

۱. کدام یک از موارد زیر ویژگی‌های هر دو PCR نیمه کمی و qPCR هستند؟

آ. آن‌ها روش‌های «نقطه پایانی» هستند.

ب. آن‌ها نیاز به یک مرحله ژل الکتروفورز دارند.

ج. آن‌ها می‌توانند تغییرات بزرگ (۱۰ برابری) در بیان ژن را تشخیص دهند.

د. الف، ب و ج

۲. چند مستر میکس را برای مرحله رونویسی معکوس آماده خواهید کرد؟

آ. یک

ب. دو

ج. سه

د. چهار

۳. چگونه می‌توانید تمایل آمپلیکون‌های کوچک‌تر را کنترل کنید که به طور مؤثرتری نسبت به

آمپلیکون‌های بزرگ‌تر تکثیر شوند؟

آ. جفت آغازگرها برای هر دو آمپلیکون در یک ویال ترکیب می‌شوند.

ب. طول آغازگرها یکسان خواهد بود.

ج. طول آمپلیکون‌ها یکسان خواهد بود.

د. زمان‌های بسط یکسان خواهند بود.

۴. چگونه از تجزیه و تحلیل سطوح در فاز ثابت تکثیر جلوگیری می‌کنید؟
- آ. اعداد چرخه مربوط به فاز نمایی بیشتر تعیین شده بودند.
 - ب. بخش‌های جزئی هر نمونه در چرخه‌های اولیه برنامه حذف خواهد شد.
 - ج. غلظت‌های معرف‌ها به اندازه‌ای بالا خواهد بود که محدود نمی‌شوند.
 - د. برنامه ترموسایکلر تنها ۱/۵ ساعت اجرا می‌شود و اطمینان حاصل می‌کند که به سطح ثابت دسترسی ندارید.
۵. چرا 23S rRNA تکثیر می‌شود؟
- آ. به‌عنوان یک کنترل بارگذاری عمل می‌کند.
 - ب. پیش‌بینی می‌شود که سطح آن با القای IPTG و/یا لاکتوز تغییر کند.
 - ج. هر دو آ و ب
 - د. هیچ‌کدام از موارد بالا

جلسه هفدهم آزمایشگاه

- چه نوع نوکلئیک اسیدی را روی ژل آگارز متصور می‌شوید؟
- آ. DNA ژنومی
 - ب. DNA مکمل
 - ج. RNA پیام‌رسان
 - د. کل RNA
- اگر واکنش‌های «+RT» همان‌گونه که انتظار می‌رود پیش بروند، چند باند در هر یک از باندهای ژل قابل مشاهده خواهد بود؟
- آ. صفر
 - ب. یک
 - ج. دو
 - د. سه
- اگر واکنش‌های «-RT» همان‌طور که انتظار می‌رود پیش بروند، چند باند در هر یک از خطوط ژل قابل مشاهده خواهد بود؟
- آ. صفر
 - ب. یک
 - ج. دو
 - د. سه

۴. در باندهای +RT، اگر تعداد آمپلیکون‌های 23S از باندی به باند دیگر متفاوت باشد، محتمل‌ترین دلیل چیست؟
- خطای بارگیری ژل وجود داشت.
 - مقادیر مختلفی از RNA رونویسی معکوس شد.
 - القاگرهای مختلف آزمایش شده بیان ژن S23 را به درجات مختلف القا کردند.
 - هر دو آ و ب
 - هر دو آ و ج
۵. در خطوط +RT، اگر تعداد آمپلیکون‌های S23 از باندی به باند دیگر متفاوت نباشد و آمپلیکون‌های *egfp* متفاوت باشند، چه نتیجه‌ای می‌توان گرفت؟
- خطای بارگیری ژل وجود داشت.
 - مقادیر مختلفی از RNA رونویسی معکوس شد.
 - القاگرهای مختلف بیان ژن *egfp* را به درجات مختلف مورد آزمایش قرار دادند.
 - هر دو آ و ب
 - هیچ‌کدام از موارد بالا.

جلسه هجدهم آزمایشگاه

- یک لاین سلولی منتقل شده فقط برای مدت زمان محدود رشد می‌کند.
 - درست
 - نادرست
- تلاقی را می‌توان به صورت زیر تعریف کرد:
 - حضور سلول‌ها
 - یک نوع سلول خاص
 - درصد مساحت سطح اشغال شده توسط سلول‌ها
 - یک سلول چسبنده یا شناور
- نشانه‌های سلول‌های چسبنده ناسالم یا آلوده عبارت‌اند از:
 - محیط کشت ابری
 - جداسازی
 - انقباض سلولی
 - بدنه سلولی کشیده شده

۴. محلول Trypsin-EDTA چیست و عملکرد آن چگونه است؟
۵. اگر محیط کشت سلول‌ها به‌طور کامل زرد شود، نشانه چه چیزی می‌تواند باشد؟
- آ. آلودگی
- ب. تجمع بیش از حد سلول‌ها
- ج. محیط کشت اسیدی
- د. همه موارد بالا

جلسه نوزدهم آزمایشگاه

۱. کدام یک از روش‌های (های) زیر را می‌توان برای وارد کردن اسیدهای نوکلئیک به سلول‌های پستانداران استفاده کرد؟
- آ. شیمیایی
- ب. فیزیکی
- ج. لیپید کاتیونی
- د. همه موارد بالا
- ه. هیچ کدام از موارد بالا
۲. لیپیدهای کاتیونی مولکول‌هایی دو فاز با گروه‌های دارای بار منفی هستند که با اسیدهای نوکلئیک دارای بار مثبت در تعامل هستند تا موجب ساده کردن ورود آن‌ها از طریق دولایه لیپیدی سلول شوند.
- آ. درست
- ب. نادرست
۳. انتقال پایدار یک اسید نوکلئیک در سلول پستانداران:
- آ. نیاز به DNA خارجی برای ادغام در ژنوم دارد
- ب. DNA را قادر می‌سازد تا برای مدت کوتاهی بیان شود
- ج. DNA را قادر می‌سازد تا برای مدت‌زمان نامحدودی بیان شود
- د. نیازی به ادغام با DNA خارجی در ژنوم ندارد
- ه. هر دو آ و ج
- ف. هر دو ب و د
۴. طیف تحریک/انتشار برای EGFP چیست؟ چرا پیش از استفاده از فلورسانس مانند میکروسکوپ، دانستن این ویژگی‌ها مهم است؟

۵. نور رنگ بری (Photobleaching) یعنی:

- آ. هنگامی که یک فلوروفور با اکسیژن مولکولی واکنش می‌دهد
- ب. ناشی از قرار گرفتن مداوم در معرض نور تحریک کننده است
- ج. هنگامی که یک نمونه ثابت یا زنده به تدریج فلورسانس خود را از دست می‌دهد
- د همه موارد بالا

جلسه بیستم آزمایشگاه

۱. کدام یک از RNA های کوچک غیر کد کننده زیر ۱۰۰ درصد مکمل mRNA هدف خود است

و منجر به تخریب آن می‌شود؟

آ. piRNA

ب. miRNA

ج. siRNA

د. rasiRNA

۲. کدام آنزیم مرتبط با RNAi به عنوان ریبونوکلئاز RNase II عمل می‌کند؟

آ. AGO

ب. RISC

ج. Exportin 5

د. Dicer

۳. سه راه کنترل آزمایش‌های siRNA فهرست کنید.

۴. هدف از استفاده از BLAST در هنگام طراحی مولکول‌های siRNA مؤثر چیست؟

۵. کدامیک از موارد زیر را می‌توان اثر خارج از هدف خاموشی ناشی از siRNA در نظر گرفت؟

آ. فعال شدن پاسخ اینترفرون

ب. تخریب mRNA هدف

ج. siRNA به دسته‌ای از mRNA های مشابه متصل می‌شود

د. نابودی کوتاه‌مدت

ه. هر دو مورد آ و ج

ف. هر دو ب و د

جلسه بیست و یکم آزمایشگاه

۱. چرا تعیین غلظت siRNA در آزمایش‌های شما مهم است؟
 - آ. برای اطمینان از نابودی mRNA هدف
 - ب. برای جلوگیری از نابودی mRNA های غیر هدف
 - ج. برای جلوگیری از سمیت سلولی
 - د. هر دو آ و ب
 - ه. همه موارد بالا
۲. حجم ۵۰ میلی مولار siRNA مورد نیاز برای دستیابی به غلظت نهایی ۲۰ نانومولار در ۳ میلی‌لیتر محیط کشت را محاسبه کنید.
۳. چرا بعد از ترانسفکشن با siRNA oligos چند روز طول می‌کشد تا تخریب مشاهده شود؟
۴. سلول‌های بیان کننده HEK293 EGFP خود را با siRNA انتخابی برای *egfp* ترانسفکشن کنید. روش‌هایی که می‌توانید برای تأیید اثربخشی siRNA خود به کار ببرید چیست؟
 - آ. میکروسکوپ فلورسانس
 - ب. SDS-PAGE و به دنبال آن وسترن بلات
 - ج. RT-qPCR
 - د. ELISA
 - ه. همه موارد بالا
۵. چرا به‌طور معمول تخریب با استفاده از RNAi حداکثر فقط ۹۰ درصد مؤثر است؟
 - آ. RNAi رونوشت را هدف قرار می‌دهد نه ژن
 - ب. RNAi پروتئین را هدف قرار می‌دهد نه ژن
 - ج. RNAi عملکرد ریبوزوم را هدف قرار می‌دهد
 - د. RNAi ژن را هدف قرار می‌دهد نه رونوشت را
 - ه. RNAi پروتئین را هدف قرار می‌دهد نه رونوشت

جلسه بیست و دوم آزمایشگاه

۱. تجزیه و تحلیل Image J برنامه‌ای است که از مؤسسه ملی بهداشت در دسترس است و می‌توان از آن برای انجام عملکردهای مختلفی از جمله الکتروفورز و تعیین کمیت فلورسانس استفاده کرد.
 - آ. درست
 - ب. نادرست

۳. آیا انتظار دارید همه سلول‌های بیان کننده HEK293 EGFP که با کنترل مثبت eGFP siRNA ترانسفکت شده‌اند، تخریب فلورسانس را نشان دهند؟

آ. بله، این یک siRNA تأیید شده است که به‌طور انتخابی و قوی EGFP را از بین می‌برد.

ب. بله، این siRNA می‌تواند وارد تمام سلول‌ها شود.

ج. خیر، تعداد کمی از siRNA ها (در صورت وجود) وجود دارند که به شکست کامل می‌رسند.

د. خیر، حتی با siRNA های انتخابی، بازده انتقال از رده سلولی به رده سلولی دیگر متفاوت است.

ه. هر دو آ و ب

ف. ج و د

۴. انحراف معیار مجموعه اعداد زیر را محاسبه کنید:

۲۰۸۲۹۵۲۳۰

۱۶۰۴۵۸۴۳۵

۱۵۴۱۲۵۴۳۲

۴۶۸۳۹۱۲۰۷

۱۰۰۴۹۸۲۷۰

۵. برخی از سلول‌ها در نمونه‌های آزمایشی تیمار شده با RNAi شما ممکن است همچنان فلورسانس با واسطه EGFP را نشان دهند. از آنجایی که با فرضیه شما برای نحوه عملکرد RNAi هدایت شده به *egfp* mRNA مطابقت ندارد، نباید آن سلول‌ها را در تجزیه و تحلیل محاسباتی خود برای کل فلورسانس وارد کنید.

آ. درست

ب. نادرست

جلسه بیست و سوم آزمایشگاه

۱. CRISPR می‌تواند برای انجام تمام موارد زیر استفاده شود:

آ. حذف یک ژن

ب. اضافه کردن یک ژن

ج. ویرایش توالی ژن

د. همه موارد بالا

۲. Cas9 چه نوع آنزیمی است؟

آ. DNA پلیمراز

ب. DNA لیگاز

ج. یک اندونوکلاز

د. یک اگزونوکلاز

۳. چه نوع مولکولی با Cas9 کمپلکس می‌شود؟

آ. ssDNA

ب. dsDNA

ج. ssRNA

د. dsRNA

۴. مسیر NHEJ به یک توالی DNA اهداکننده همولوگ برای ترمیم DSB نیاز دارد.

آ. درست

ب. نادرست

۵. چرا تعداد سلول‌ها در هر چاهک در جلسه ۲۳ آزمایشگاهی با شیوه‌نامه جلسه ۱۸ آزمایشگاه

متفاوت است؟

آ. نوع متفاوتی از پلیت‌ها استفاده می‌شود.

ب. یک لاین سلولی متفاوت استفاده می‌شود.

ج. تعداد روزهای متفاوتی قبل از ترانسفکشن می‌گذرد.

د. همه موارد بالا

جلسه بیست و چهارم آزمایشگاه

۱. کدام چاهک در این آزمایش کنترل منفی در نظر گرفته می‌شود؟

آ. فقط Opti-MEM

ب. pLentiCRISPR-E

ج. pLentiCRISPR-EGFP

د. هر دو آ و ب

۲. کدام ابزار در باند ابزار برنامه Image J برای ترسیم کلی هر سلول تجزیه و تحلیل شده استفاده

می‌شود؟

۳. کدام مورد به عنوان پس زمینه برای خوانش فلورسانس عمل می کند؟

- آ. درخشان ترین ناحیه سلولی که می توانید پیدا کنید
- ب. کم نورترین ناحیه سلولی که می توانید پیدا کنید
- ج. یک منطقه غیر سلولی به طور تصادفی انتخاب شده است
- د. ناحیه ای به اندازه سلول مورد تجزیه و تحلیل شما با همان فلورسانس تقریبی
- ۴. اندازه گیری های شما اندازه سلول را محاسبه می کند.
- آ. درست
- ب. نادرست

۵. برای محاسبه میانگین و انحراف معیار از کدام مورد استفاده خواهید کرد؟

- آ. برنامه اکسل
- ب. برنامه Image J
- ج. محاسبه دستی
- د. هر یک از موارد فوق

جلسه بیست و پنجم آزمایشگاه

۱. از کدام ابزار برای طراحی sgRNA استفاده می شود؟

- آ. برنامه Image J
- ب. نوکلئوتید BLAST
- ج. DESKGEN
- د. برنامه اکسل
- ۲. این عدد فعالیت هدف یک sgRNA خاص را پیش بینی می کند:
- آ. امتیاز فعالیت
- ب. امتیاز خارج از هدف
- ج. P-value
- د. Tm

۳. در این جلسه چه نوع نوکلئیک اسیدهایی برای استفاده در کلون کردن وصل شدن اولیگو به کار می رود؟

- آ. دو dsDNA
- ب. یک dsDNA
- ج. دو ssDNA
- د. یک ssDNA

۴. کدام آنزیم برای دفسفریله کردن pLentiCRISPR-E استفاده خواهد شد؟

آ. BsmBI

ب. NcoI

ج. PNK

د. CIP

۵. اندازه تقریبی باند DNA که از ژل آگارز جدا می‌کنید چقدر است؟

آ. ۱۳kb

ب. ۲ kb

ج. ۷۰۰ bp

د. ۲۰ bp

جلسه بیست و ششم آزمایشگاه

۱. کدام آنزیم برای فسفریله کردن اولیگو استفاده می‌شود؟

آ. BsmBI

ب. NcoI

ج. PNK

د. CIP

۲. وکتور تهیه شده نیز فسفریله می‌شود.

آ. درست

ب. نادرست

۳. چگونه به وصل شدن بین اولیگوها دست خواهید یافت؟

آ. از T4 DNA لیگاز استفاده خواهید کرد.

ب. به آرامی دمای واکنش را افزایش خواهید داد.

ج. به آرامی دمای واکنش را کاهش خواهید داد.

د. اولیگوها را به *E. coli* منتقل خواهید کرد.

۴. چرا یک انتقال کنترل شده را تنها با برش pLentiCRISPR-E آماده می‌کنید؟

آ. می‌خواهید هر انتقالی را که از وکتور برش نخورده باقی‌مانده است ببینید.

ب. می‌خواهید ببینید که چقدر از سلول‌ها زنده هستند.

ج. می‌خواهید هر انتقالی را که در چرخه مجدد وکتور به وجود می‌آید را ببینید.

د. می‌خواهید هر تغییر شکلی را ببینید.

۵. چرا پلیت‌های آگار استفاده شده در این جلسه حاوی آمپی‌سیلین هستند؟
 آ. اولیگوها مقاومت آمپی‌سیلین را رمزگذاری می‌کنند.
 ب. pLentiCRISPR-E مقاومت آمپی‌سیلین را رمزگذاری می‌کند.
 ج. آمپی‌سیلین از آلودگی‌های ناخواسته جلوگیری می‌کند.
 د. به جای کانامایسین می‌توان از آمپی‌سیلین استفاده کرد.

جلسه بیست و هفتم آزمایشگاه

۱. کدام پلیت انتقال باید حاوی تعداد کمی کلنی باشد؟
 آ. فقط وکتور بدون برش
 ب. فقط وکتور برش خورده
 ج. برش وکتور فقط با لیگاز
 د. هر دو ب و ج
۲. برای انجام توالی‌یابی Sanger روی پلازمیدهای جدا شده از چند آغازگر توالی‌یابی استفاده می‌شود؟
 آ. یکی
 ب. دو
 ج. سه
 د. چهار
۳. بافر P1 در شیوه‌نامه پیش تست چه هدفی دارد؟
 آ. سلول‌ها را دوباره معلق می‌کند.
 ب. تجزیه سلولی را خنثی می‌کند.
 ج. عصاره را خنثی می‌کند.
 د. gDNA را رسوب می‌دهد.
۴. بافر P2 در شیوه‌نامه Miniprep چه هدفی دارد؟
 آ. سلول‌ها را دوباره معلق می‌کند.
 ب. تجزیه سلولی را خنثی می‌کند.
 ج. عصاره را خنثی می‌کند.
 د. gDNA را رسوب می‌دهد.

۵. کیفیت نتایج توالی‌یابی با Sanger مستقل از خلوص DNA پلازمید است.

آ. درست

ب. نادرست

جلسه بیست و هشتم آزمایشگاه

۱. از چه ابزار (هایی) برای تجزیه و تحلیل نتایج توالی‌یابی خود استفاده خواهید کرد؟

آ. Chromas

ب. NCBI نوکلئوتید BLAST

ج. هر دو مورد بالا

د. هیچ‌کدام از موارد بالا

۲. طول تقریبی ژن الحاقی را که باید در نتایج توالی‌یابی پیدا کنید چقدر است؟

آ. ۱۳kb

ب. ۲kb

ج. ۷۰۰bp

د. ۲۰bp

۳. چرا باید «CACCG» بلافاصله در بالادست توالی sgRNA مشاهده شود؟

۴. با استفاده از هماسیتومتر، در مجموع ۱۳۷ سلول را در میان ۴ مجموعه ۱۶ مربعی شمارش

می‌کنید. غلظت سوسپانسیون سلولی چیست؟

آ. $3/43 \times 10^5$ cells/mL

ب. $1/37 \times 10^4$ cells/mL

ج. $8/56 \times 10^4$ cells/mL

د. $6/85 \times 10^3$ cells/mL

۵. هدف از PBS چیست؟

آ. این سلول‌ها را از نظر شیمیایی از پلیت جدا می‌کند.

ب. فاکتورهای رشد را به سلول‌ها می‌رساند.

ج. این ماده باقی‌مانده محیط کشت را از بین می‌برد.

د. از آلودگی در کشت‌های سلولی شما جلوگیری می‌کند.

جلسه بیست و نهم آزمایشگاه

۱. تعریف راندمان ترانسفکشن چیست؟

آ. درصد سلول‌هایی که زنده هستند.

ب. درصد سلول‌هایی که یک اسید نوکلئیک معرفی شده را جذب کرده‌اند.

ج. درصد سلول‌هایی که DSB های القایی CRISPR-Cas9 را نشان می‌دهند.

د. درصد سلول‌هایی که از صفحه جدا شده‌اند.

۲. چه ماده‌ای به‌عنوان الگو در این PCR استفاده خواهد شد؟

آ. DNA پلازمید

ب. DNA ژنومی

ج. DNA مکمل

د. همه موارد بالا

۳. PCR کدام مورد را در این جلسه تکثیر خواهد کرد؟

آ. توالی sgRNA توالی هدف ۲۰ جفت باز

ب. ناحیه‌ای از ژن مورد نظر ۴۰۰-۵۰۰ جفت باز حاوی توالی هدف sgRNA

ج. توالی Cas9

د. توالی PAM ۳ جفت باز

۴. ژل DNA آگارز در جلسه بعدی برای کدامیک از موارد زیر استفاده می‌شود:

آ. تأیید PCR امروز یک باند خاص با اندازه صحیح تولید کرد

ب. شناسایی ایندل‌ها در نسبتی از سلول‌های شما

ج. تجسم سطوح EGFP

د. هر دو مورد آ و ب

۵. در این جلسه آزمایشگاهی چند عصاره سلولی تهیه خواهید کرد؟

آ. دو

ب. چهار

ج. هشت

د. هیچ‌یک از موارد فوق

جلسه سی‌ام آزمایشگاه

۱. واسرشته شدن فرآورده‌های PCR چه نوع مولکولی را ایجاد می‌کند؟

آ. ssRNAs

ب. dsRNAs

ج. ssDNAs

د. dsDNAs

۲. علاوه بر دو باند احتمالی روی ژل آگارز، چه باند دیگری را شناسایی خواهید کرد؟

آ. قطعه Stuffer

ب. باند دختری

ج. گروه والدین

د. همه موارد بالا

۳. سنجش عدم تطابق به‌عنوان یک پلیت مضاعف اصلی عمل می‌کند.

آ. درست

ب. نادرست

۴. چرا پیش از اینکه به واکنش‌های واسرشته‌سازی و وصل شدن مجدد بپردازید فرآورده‌های PCR

را روی ژل آگارز تجزیه و تحلیل می‌کنید؟

۵. فرآورده‌های با چه اندازه‌ای از کیت کنترل ارائه شده جدا می‌شوند؟

آ. ۲۰ و ۴۰ جفت باز

ب. ۴۰۰ و ۵۰۰ جفت باز

ج. ۲ و ۱۳ کیلوباز

د. ۲۲۵ و ۲۹۱ جفت باز

نمایه

B
۳۱ BamHI ۴۲۰ , ۴۱۵ , ۱۶۷ , ۱۵۸ , ۱۵۷ , ۱۴۰ , ۱۳۲ B-PER
C
۳۰ CCATGG. توالی تشخیص ۲۰۷ cDNA تولید شده ۴۵۵ , ۴۴۰ , ۴۱۴ , ۳۶۶ , ۱۱۶ , ۱۱۰ Chromas ۴۷۴ ۲۴۷ , ۲۴۶ , ۷ , ۶ , ۵ , ۴ , ۳ , ۲ , ۱ , ۰ , ۳۰۹ , ۳۰۷ , ۳۱۹ , ۳۱۷ , ۳۱۲ , ۳۱۱ , ۳۱۰ , ۳۰۹ , ۳۰۷ , ۳۲۱ , ۳۲۳ , ۳۲۵ , ۳۲۷ , ۳۲۸ , ۳۳۰ , ۳۳۱ , ۳۳۲ , ۳۳۳ , ۳۳۴ , ۳۳۷ , ۳۳۸ , ۳۴۳ , ۳۴۵ , ۳۴۷ , ۳۵۱ , ۳۵۲ , ۳۶۰ , ۳۶۴ , ۳۶۵ , ۳۶۶ , ۳۷۳ , ۳۷۴ , ۳۷۶ , ۳۷۷ , ۳۷۸ , ۳۸۵ , ۳۸۶ , ۳۸۷ , ۳۸۸ , ۳۹۲ , ۳۹۸ , ۳۹۹ , ۴۰۳ , ۴۳۴ , ۴۳۵ , ۴۳۶ , ۴۳۷ , ۴۳۸ , ۴۳۹ , ۴۴۰ , ۴۴۱ , ۴۴۳ , ۴۶۹ , ۴۷۵
D
۴۵۵ , ۱۰۹ , ۱۰۳ , ۱۰۲ ddNTP ۳۷۴ , ۳۷۱ , ۳۷۰ , ۳۱۶ , ۳۱۴ , ۲۷۹ DMEM ۴۴۲ , ۴۴۱ , ۴۳۵ , ۴۳۴ , ۴۲۸ ۳۶۰ , ۹۵ , ۷۵ , ۷۴ DNA Miniprep ۵۱ , ۵۰ DNA ابر مارپیچ ۵۱ , ۴۹ , ۳۸ , ۳۴ , ۲۴ , ۲۳ , ۲۲ , ۲۱ , ۲۰ , ۱۹ , ۱۸ , ۱۷ , ۱۶ , ۱۵ , ۱۴ , ۱۳ , ۱۲ , ۱۱ , ۱۰ , ۹ , ۸ , ۷ , ۶ , ۵ , ۴ , ۳ , ۲ , ۱ , ۰ , ۳۰۹ , ۳۰۷ , ۳۱۹ , ۳۱۷ , ۳۱۲ , ۳۱۱ , ۳۱۰ , ۳۰۹ , ۳۰۷ , ۳۲۱ , ۳۲۳ , ۳۲۵ , ۳۲۷ , ۳۲۸ , ۳۳۰ , ۳۳۱ , ۳۳۲ , ۳۳۳ , ۳۳۴ , ۳۳۷ , ۳۳۸ , ۳۴۳ , ۳۴۵ , ۳۴۷ , ۳۵۱ , ۳۵۲ , ۳۶۰ , ۳۶۴ , ۳۶۵ , ۳۶۶ , ۳۷۳ , ۳۷۴ , ۳۷۶ , ۳۷۷ , ۳۷۸ , ۳۸۵ , ۳۸۶ , ۳۸۷ , ۳۸۸ , ۳۹۲ , ۳۹۸ , ۳۹۹ , ۴۰۳ , ۴۳۴ , ۴۳۵ , ۴۳۶ , ۴۳۷ , ۴۳۸ , ۴۳۹ , ۴۴۰ , ۴۴۱ , ۴۴۳ , ۴۶۹ , ۴۷۵

،۴۷۲ ،۴۷۰ ،۴۶۶ ،۴۶۴ ،۴۶۲ ،۴۶۱ ،۴۵۹ ،۴۵۶ ،۴۵۵ ،۴۵۴ ،۴۵۳ ،۴۵۲ ،۴۵۱ ،۴۵۰ ،۴۴۹ ،۴۴۸ ،۴۴۷ ،۴۴۶ ،۴۴۵ ،۴۴۴ ،۴۴۳ ،۴۴۲ ،۴۴۱ ،۴۴۰ ،۴۳۹ ،۴۳۸ ،۴۳۷ ،۴۳۶ ،۴۳۵ ،۴۳۴ ،۴۳۳ ،۴۳۲ ،۴۳۱ ،۴۳۰ ،۴۲۹ ،۴۲۸ ،۴۲۷ ،۴۲۶ ،۴۲۵ ،۴۲۴ ،۴۲۳ ،۴۲۲ ،۴۲۱ ،۴۲۰ ،۴۱۹ ،۴۱۸ ،۴۱۷ ،۴۱۶ ،۴۱۵ ،۴۱۴ ،۴۱۳ ،۴۱۲ ،۴۱۱ ،۴۱۰ ،۴۰۹ ،۴۰۸ ،۴۰۷ ،۴۰۶ ،۴۰۵ ،۴۰۴ ،۴۰۳ ،۴۰۲ ،۴۰۱ ،۴۰۰ ،۳۹۹ ،۳۹۸ ،۳۹۷ ،۳۹۶ ،۳۹۵ ،۳۹۴ ،۳۹۳ ،۳۹۲ ،۳۹۱ ،۳۹۰ ،۳۸۹ ،۳۸۸ ،۳۸۷ ،۳۸۶ ،۳۸۵ ،۳۸۴ ،۳۸۳ ،۳۸۲ ،۳۸۱ ،۳۸۰ ،۳۷۹ ،۳۷۸ ،۳۷۷ ،۳۷۶ ،۳۷۵ ،۳۷۴ ،۳۷۳ ،۳۷۲ ،۳۷۱ ،۳۷۰ ،۳۶۹ ،۳۶۸ ،۳۶۷ ،۳۶۶ ،۳۶۵ ،۳۶۴ ،۳۶۳ ،۳۶۲ ،۳۶۱ ،۳۶۰ ،۳۵۹ ،۳۵۸ ،۳۵۷ ،۳۵۶ ،۳۵۵ ،۳۵۴ ،۳۵۳ ،۳۵۲ ،۳۵۱ ،۳۵۰ ،۳۴۹ ،۳۴۸ ،۳۴۷ ،۳۴۶ ،۳۴۵ ،۳۴۴ ،۳۴۳ ،۳۴۲ ،۳۴۱ ،۳۴۰ ،۳۳۹ ،۳۳۸ ،۳۳۷ ،۳۳۶ ،۳۳۵ ،۳۳۴ ،۳۳۳ ،۳۳۲ ،۳۳۱ ،۳۳۰ ،۳۲۹ ،۳۲۸ ،۳۲۷ ،۳۲۶ ،۳۲۵ ،۳۲۴ ،۳۲۳ ،۳۲۲ ،۳۲۱ ،۳۲۰ ،۳۱۹ ،۳۱۸ ،۳۱۷ ،۳۱۶ ،۳۱۵ ،۳۱۴ ،۳۱۳ ،۳۱۲ ،۳۱۱ ،۳۱۰ ،۳۰۹ ،۳۰۸ ،۳۰۷ ،۳۰۶ ،۳۰۵ ،۳۰۴ ،۳۰۳ ،۳۰۲ ،۳۰۱ ،۳۰۰ ،۲۹۹ ،۲۹۸ ،۲۹۷ ،۲۹۶ ،۲۹۵ ،۲۹۴ ،۲۹۳ ،۲۹۲ ،۲۹۱ ،۲۹۰ ،۲۸۹ ،۲۸۸ ،۲۸۷ ،۲۸۶ ،۲۸۵ ،۲۸۴ ،۲۸۳ ،۲۸۲ ،۲۸۱ ،۲۸۰ ،۲۷۹ ،۲۷۸ ،۲۷۷ ،۲۷۶ ،۲۷۵ ،۲۷۴ ،۲۷۳ ،۲۷۲ ،۲۷۱ ،۲۷۰ ،۲۶۹ ،۲۶۸ ،۲۶۷ ،۲۶۶ ،۲۶۵ ،۲۶۴ ،۲۶۳ ،۲۶۲ ،۲۶۱ ،۲۶۰ ،۲۵۹ ،۲۵۸ ،۲۵۷ ،۲۵۶ ،۲۵۵ ،۲۵۴ ،۲۵۳ ،۲۵۲ ،۲۵۱ ،۲۵۰ ،۲۴۹ ،۲۴۸ ،۲۴۷ ،۲۴۶ ،۲۴۵ ،۲۴۴ ،۲۴۳ ،۲۴۲ ،۲۴۱ ،۲۴۰ ،۲۳۹ ،۲۳۸ ،۲۳۷ ،۲۳۶ ،۲۳۵ ،۲۳۴ ،۲۳۳ ،۲۳۲ ،۲۳۱ ،۲۳۰ ،۲۲۹ ،۲۲۸ ،۲۲۷ ،۲۲۶ ،۲۲۵ ،۲۲۴ ،۲۲۳ ،۲۲۲ ،۲۲۱ ،۲۲۰ ،۲۱۹ ،۲۱۸ ،۲۱۷ ،۲۱۶ ،۲۱۵ ،۲۱۴ ،۲۱۳ ،۲۱۲ ،۲۱۱ ،۲۱۰ ،۲۰۹ ،۲۰۸ ،۲۰۷ ،۲۰۶ ،۲۰۵ ،۲۰۴ ،۲۰۳ ،۲۰۲ ،۲۰۱ ،۲۰۰ ،۱۹۹ ،۱۹۸ ،۱۹۷ ،۱۹۶ ،۱۹۵ ،۱۹۴ ،۱۹۳ ،۱۹۲ ،۱۹۱ ،۱۹۰ ،۱۸۹ ،۱۸۸ ،۱۸۷ ،۱۸۶ ،۱۸۵ ،۱۸۴ ،۱۸۳ ،۱۸۲ ،۱۸۱ ،۱۸۰ ،۱۷۹ ،۱۷۸ ،۱۷۷ ،۱۷۶ ،۱۷۵ ،۱۷۴ ،۱۷۳ ،۱۷۲ ،۱۷۱ ،۱۷۰ ،۱۶۹ ،۱۶۸ ،۱۶۷ ،۱۶۶ ،۱۶۵ ،۱۶۴ ،۱۶۳ ،۱۶۲ ،۱۶۱ ،۱۶۰ ،۱۵۹ ،۱۵۸ ،۱۵۷ ،۱۵۶ ،۱۵۵ ،۱۵۴ ،۱۵۳ ،۱۵۲ ،۱۵۱ ،۱۵۰ ،۱۴۹ ،۱۴۸ ،۱۴۷ ،۱۴۶ ،۱۴۵ ،۱۴۴ ،۱۴۳ ،۱۴۲ ،۱۴۱ ،۱۴۰ ،۱۳۹ ،۱۳۸ ،۱۳۷ ،۱۳۶ ،۱۳۵ ،۱۳۴ ،۱۳۳ ،۱۳۲ ،۱۳۱ ،۱۳۰ ،۱۲۹ ،۱۲۸ ،۱۲۷ ،۱۲۶ ،۱۲۵ ،۱۲۴ ،۱۲۳ ،۱۲۲ ،۱۲۱ ،۱۲۰ ،۱۱۹ ،۱۱۸ ،۱۱۷ ،۱۱۶ ،۱۱۵ ،۱۱۴ ،۱۱۳ ،۱۱۲ ،۱۱۱ ،۱۱۰ ،۱۰۹ ،۱۰۸ ،۱۰۷ ،۱۰۶ ،۱۰۵ ،۱۰۴ ،۱۰۳ ،۱۰۲ ،۱۰۱ ،۱۰۰ ،۹۹ ،۹۸ ،۹۷ ،۹۶ ،۹۵ ،۹۴ ،۹۳ ،۹۲ ،۹۱ ،۹۰ ،۸۹ ،۸۸ ،۸۷ ،۸۶ ،۸۵ ،۸۴ ،۸۳ ،۸۲ ،۸۱ ،۸۰ ،۷۹ ،۷۸ ،۷۷ ،۷۶ ،۷۵ ،۷۴ ،۷۳ ،۷۲ ،۷۱ ،۷۰ ،۶۹ ،۶۸ ،۶۷ ،۶۶ ،۶۵ ،۶۴ ،۶۳ ،۶۲ ،۶۱ ،۶۰ ،۵۹ ،۵۸ ،۵۷ ،۵۶ ،۵۵ ،۵۴ ،۵۳ ،۵۲ ،۵۱ ،۵۰ ،۴۹ ،۴۸ ،۴۷ ،۴۶ ،۴۵ ،۴۴ ،۴۳ ،۴۲ ،۴۱ ،۴۰ ،۳۹ ،۳۸ ،۳۷ ،۳۶ ،۳۵ ،۳۴ ،۳۳ ،۳۲ ،۳۱ ،۳۰ ،۲۹ ،۲۸ ،۲۷ ،۲۶ ،۲۵ ،۲۴ ،۲۳ ،۲۲ ،۲۱ ،۲۰ ،۱۹ ،۱۸ ،۱۷ ،۱۶ ،۱۵ ،۱۴ ،۱۳ ،۱۲ ،۱۱ ،۱۰ ،۹ ،۸ ،۷ ،۶ ،۵ ،۴ ،۳ ،۲ ،۱ ،۰ ،-۱ ،-۲ ،-۳ ،-۴ ،-۵ ،-۶ ،-۷ ،-۸ ،-۹ ،-۱۰ ،-۱۱ ،-۱۲ ،-۱۳ ،-۱۴ ،-۱۵ ،-۱۶ ،-۱۷ ،-۱۸ ،-۱۹ ،-۲۰ ،-۲۱ ،-۲۲ ،-۲۳ ،-۲۴ ،-۲۵ ،-۲۶ ،-۲۷ ،-۲۸ ،-۲۹ ،-۳۰ ،-۳۱ ،-۳۲ ،-۳۳ ،-۳۴ ،-۳۵ ،-۳۶ ،-۳۷ ،-۳۸ ،-۳۹ ،-۴۰ ،-۴۱ ،-۴۲ ،-۴۳ ،-۴۴ ،-۴۵ ،-۴۶ ،-۴۷ ،-۴۸ ،-۴۹ ،-۵۰ ،-۵۱ ،-۵۲ ،-۵۳ ،-۵۴ ،-۵۵ ،-۵۶ ،-۵۷ ،-۵۸ ،-۵۹ ،-۶۰ ،-۶۱ ،-۶۲ ،-۶۳ ،-۶۴ ،-۶۵ ،-۶۶ ،-۶۷ ،-۶۸ ،-۶۹ ،-۷۰ ،-۷۱ ،-۷۲ ،-۷۳ ،-۷۴ ،-۷۵ ،-۷۶ ،-۷۷ ،-۷۸ ،-۷۹ ،-۸۰ ،-۸۱ ،-۸۲ ،-۸۳ ،-۸۴ ،-۸۵ ،-۸۶ ،-۸۷ ،-۸۸ ،-۸۹ ،-۹۰ ،-۹۱ ،-۹۲ ،-۹۳ ،-۹۴ ،-۹۵ ،-۹۶ ،-۹۷ ،-۹۸ ،-۹۹ ،-۱۰۰ ،-۱۰۱ ،-۱۰۲ ،-۱۰۳ ،-۱۰۴ ،-۱۰۵ ،-۱۰۶ ،-۱۰۷ ،-۱۰۸ ،-۱۰۹ ،-۱۱۰ ،-۱۱۱ ،-۱۱۲ ،-۱۱۳ ،-۱۱۴ ،-۱۱۵ ،-۱۱۶ ،-۱۱۷ ،-۱۱۸ ،-۱۱۹ ،-۱۲۰ ،-۱۲۱ ،-۱۲۲ ،-۱۲۳ ،-۱۲۴ ،-۱۲۵ ،-۱۲۶ ،-۱۲۷ ،-۱۲۸ ،-۱۲۹ ،-۱۳۰ ،-۱۳۱ ،-۱۳۲ ،-۱۳۳ ،-۱۳۴ ،-۱۳۵ ،-۱۳۶ ،-۱۳۷ ،-۱۳۸ ،-۱۳۹ ،-۱۴۰ ،-۱۴۱ ،-۱۴۲ ،-۱۴۳ ،-۱۴۴ ،-۱۴۵ ،-۱۴۶ ،-۱۴۷ ،-۱۴۸ ،-۱۴۹ ،-۱۵۰ ،-۱۵۱ ،-۱۵۲ ،-۱۵۳ ،-۱۵۴ ،-۱۵۵ ،-۱۵۶ ،-۱۵۷ ،-۱۵۸ ،-۱۵

۱۴۵..... EGFP (ضد α -EGFP)
 ۴۱۷, ۱۴۵, ۱۴۳, ۱۴۲..... α -EGFP
 آب استریل‌ک, ۳۷, ۳۸, ۶۰, ۹۵, ۱۳۹, ۲۰۸, ۲۱۹,
 ۲۳۷, ۳۴۶, ۳۵۳, ۴۰۷, ۴۰۸, ۴۰۹, ۴۱۰,
 ۴۱۳, ۴۱۴, ۴۲۰, ۴۲۶, ۴۲۷, ۴۳۲, ۴۳۸,
 ۴۳۹, ۴۴۲, ۴۴۳

آ

آب دیونیزه شده ۱۲, ۴۰۳
 آرگونوت ۲۸۳
 آزمایش CRISPR با هدف سرکوب *egfp* ۳۷۷
 آزمایش‌ذ, ص, ک, ۵, ۸, ۱۱, ۱۲, ۳۳, ۴۱, ۵۵,
 ۶۴, ۶۵, ۶۶, ۷۲, ۷۴, ۷۷, ۷۸, ۸۲, ۸۳, ۸۶,
 ۹۱, ۹۵, ۱۰۴, ۱۰۷, ۱۰۹, ۱۱۱, ۱۱۶, ۱۱۷,
 ۱۱۹, ۱۲۳, ۱۲۴, ۱۳۵, ۱۴۱, ۱۴۲, ۱۵۱,
 ۱۵۳, ۱۵۵, ۱۶۶, ۱۶۸, ۱۸۸, ۱۹۰, ۲۰۰,
 ۲۰۱, ۲۰۲, ۲۰۳, ۲۲۰, ۲۲۱, ۲۲۳, ۲۲۶,
 ۲۲۷, ۲۳۳, ۲۳۸, ۲۴۱, ۲۵۴, ۲۵۵, ۲۶۶,
 ۲۷۶, ۲۷۷, ۲۸۲, ۲۸۵, ۲۸۶, ۲۹۳, ۲۹۷,
 ۳۰۲, ۳۰۶, ۳۰۷, ۳۱۷, ۳۲۲, ۳۲۸, ۳۳۰,
 ۳۳۱, ۳۳۲, ۳۳۳, ۳۳۸, ۳۵۱, ۳۵۲, ۳۵۶,
 ۳۶۷, ۳۷۷, ۳۸۴, ۳۸۵, ۳۸۶, ۳۸۷, ۳۹۳,
 ۳۹۹, ۴۰۷, ۴۲۲, ۴۴۶, ۴۵۲, ۴۵۹, ۴۶۵, ۴۷۰,
 آلبومین سرم گاوی ۱۷, ۱۸, ۱۴۲, ۱۶۷, ۴۰۶
 آماده کردن نمونه‌ها برای توالی‌یابی ۳۶۲
 آماده‌سازی دستگاه ژل ۱۳۳
 آماده‌سازی سلول‌های شیمیایی مناسب با تیمار
 کلرید کلسیم ۴۴۵
 آماده‌سازی نمونه ۱۳۲, ۱۸۸, ۱۹۲, ۳۶۲

R

۲۲۱, ۲۰۸, ۲۰۷, ۲۰۶, ۲۰۴, ۲۰۲rRNA S۲۳,
 ۲۲۵, ۲۲۶, ۲۳۳, ۲۳۴, ۲۳۵, ۲۳۶, ۲۳۸,
 ۲۳۹, ۴۶۴
 RNA پیام‌رسان (mRNA) ۴۶۱
 RNA راهنمای منفرد (sgRNA یا gRNA)
 ۳۰۷
 RNA های دو رشته‌ای (dsRNAs) ۲۸۲
 RNA های کوچک غیر کد کننده پروتئین ۲۸۲
 RNA های مرتبط با تکرار (rasiRNA) ۲۸۳
 ۱۸۷RNeasy, ۱۸۸, ۱۸۹, ۱۹۲, ۱۹۳, ۱۹۴,
 ۱۹۵, ۱۹۷, ۴۲۴, ۴۲۵, ۴۶۱
 RT-PCR ص, ۱۹۹, ۲۰۰, ۲۰۱, ۲۰۳, ۲۳۳,
 ۲۳۴, ۳۳۷
 RT-qPCR, ۱۹۹, ۲۰۰, ۲۰۲, ۲۰۳, ۲۲۳,
 ۲۲۴, ۲۲۷, ۲۳۳, ۲۳۴, ۲۴۶, ۲۹۳, ۴۲۵,
 ۴۲۶, ۴۶۸
 SDS-PAGE غ, ل, ۸, ۱۰, ۱۲۲, ۱۲۷, ۱۲۸,
 ۱۲۹, ۱۳۰, ۱۳۲, ۱۳۴, ۱۴۰, ۱۴۱, ۱۴۳,
 ۱۴۴, ۱۴۷, ۱۵۶, ۱۵۹, ۱۶۰, ۱۶۱, ۱۶۳, ۱۶۴,
 ۱۶۶, ۱۶۸, ۱۷۰, ۱۷۷, ۱۸۷, ۴۱۵, ۴۱۷,
 ۴۲۱, ۴۲۲, ۴۵۶, ۴۶۸
 siRNA, ۲۴۶, ۲۸۲, ۲۸۳, ۲۸۵, ۲۸۶, ۲۸۷,
 ۲۸۸, ۲۸۹, ۲۹۰, ۲۹۱, ۲۹۲, ۲۹۳, ۲۹۵,
 ۲۹۷, ۲۹۸, ۲۹۹, ۳۰۱, ۳۰۲, ۳۰۴, ۳۰۶,
 ۳۲۷, ۳۲۹, ۳۸۶, ۴۰۵, ۴۳۱, ۴۳۲, ۴۳۳,
 ۴۳۴, ۴۶۷, ۴۶۸, ۴۶۹

T

DNA Taq ۵۷, ۴۳
 TaqMan ۲۰۲
 Tms ۳۳۷, ۲۰۲
 TSS ۴۴۶

α

- آمانده سازی ج، ذ، ز، ۳۷، ۴۱، ۵۲، ۵۳، ۵۹، ۸۳، ۱۰۱، ۱۰۵، ۱۳۰، ۱۳۲، ۱۳۳، ۱۵۷، ۱۸۸، ۱۹۲، ۲۴۹، ۳۶۰، ۳۶۲، ۳۸۱، ۳۹۸، ۴۰۰، ۴۰۱، ۴۰۲، ۴۰۶، ۴۰۷، ۴۰۸، ۴۰۹، ۴۱۱، ۴۱۲، ۴۱۵، ۴۱۹، ۴۲۳، ۴۲۵، ۴۲۸، ۴۲۹، ۴۳۰، ۴۳۱، ۴۳۴، ۴۳۶، ۴۳۸، ۴۴۰، ۴۴۱، ۴۴۲، ۴۴۳، ۴۴۵، ۴۵۴
- آمپی سیلین ۳۹۹، ۴۰۳، ۴۰۴، ۴۷۳
- آنالیز ژل ۶۰، ۷۵، ۹۷، ۱۶۱، ۳۹۰، ۴۴۴
- آنتی بادی ثانویه ۱۴۲، ۱۴۳، ۱۴۵
- آنتی بیوتیک ۲۵، ۷۰، ۸۱، ۲۶۳، ۲۷۸، ۲۸۰، ۲۹۶، ۳۱۴، ۳۱۶، ۳۷۴، ۳۹۹، ۴۳۲، ۴۳۳، ۴۳۴، ۴۳۵
- آنزیم دایسر ۲۸۳
- آنزیم محدود کننده ۲۹، ۳۱، ۳۶، ۴۹، ۵۰، ۶۰، ۶۳، ۹۴، ۹۵، ۳۳۶، ۳۴۵، ۳۴۶، ۴۰۷، ۴۰۹، ۴۴۹
- آنزیم ظ، غ، ۲۶، ۲۷، ۲۹، ۳۱، ۳۵، ۳۶، ۳۷، ۳۸، ۳۹، ۴۲، ۴۳، ۴۴، ۴۵، ۴۹، ۵۰، ۵۷، ۵۹، ۶۰، ۶۳، ۷۶، ۸۶، ۹۴، ۹۵، ۱۴۱، ۱۴۲، ۱۵۵، ۲۰۰، ۲۰۱، ۲۵۷، ۲۸۳، ۳۱۷، ۳۳۲، ۳۳۴، ۳۳۶، ۳۴۵، ۳۴۶، ۳۵۱، ۳۵۲، ۳۵۳، ۳۵۶، ۳۷۸، ۳۸۳، ۳۸۵، ۳۹۰، ۳۹۱، ۳۹۳، ۴۰۷، ۴۰۹، ۴۱۳، ۴۴۳، ۴۴۹، ۴۵۰، ۴۵۱، ۴۵۶، ۴۵۹، ۴۶۷، ۴۷۲
- ابزارهای هم ترازی توالی ۱۱۵
- ابزار Freehand ۳۰۲، ۳۲۸
- ابزار جست و جو هم ترازی موضعی ۱۱۵
- اپراتور *lac* ۲۷، ۱۸۷، ۲۴۴
- اپیتلیال ۲۵۲، ۲۵۷، ۲۷۵
- اتانول، ۲۴، ۴۷، ۴۸، ۱۸۲، ۱۸۷، ۱۹۳، ۱۹۴، ۱۹۵، ۲۵۳، ۲۵۴، ۲۵۶، ۳۴۹، ۴۰۲، ۴۰۷، ۴۱۰، ۴۱۲، ۴۲۴، ۴۳۷، ۴۳۹، ۴۴۰، ۴۴۶
- اتصال انتهایی غیر همولوگ (NHEJ) ۳۱۰
- اتوکلاوک، ک، ۱۲، ۵۲، ۱۸۲، ۲۰۸، ۲۵۳، ۲۵۵، ۳۹۶، ۳۹۹، ۴۰۰، ۴۰۱، ۴۰۲، ۴۰۳، ۴۱۶، ۴۲۱، ۴۲۳، ۴۲۸، ۴۲۹
- اتیديوم برومايد ۵۱، ۱۸۹، ۲۰۳، ۲۳۴
- اثرات خ، ۲۸۲، ۲۸۵، ۲۸۶، ۲۸۷، ۲۹۳، ۳۰۶، ۳۱۱، ۳۱۷، ۳۳۲، ۳۴۱، ۳۷۷، ۳۸۸
- اسپكتروفوتومتر ۱۷۴، ۱۷۵، ۱۹۰، ۱۹۱، ۱۹۵، ۱۹۶، ۱۹۷، ۳۴۹، ۳۶۲، ۳۹۶، ۴۴۶
- استخراج پروتئين نو ترکیب... ۱۴۹، ۱۵۱، ۳۹۶، ۴۱۹
- استخراج ج، ظ، ۲۳، ۱۴۹، ۱۵۱، ۱۵۸، ۳۴۷، ۳۴۹، ۳۹۶، ۴۱۵، ۴۱۹، ۴۲۰، ۴۳۷
- استفاده از نانودراپ ۳۴، ۴۹، ۶۱، ۹۵، ۱۹۰، ۱۹۵
- استوک GelRed ۳۸۲، ۴۰۴، ۴۰۸، ۴۱۰، ۴۱۱، ۴۱۴، ۴۴۲
- استوک ۱۶، ۱۹، ۳۸، ۵۲، ۵۵، ۸۰، ۸۸، ۹۵، ۱۰۶، ۱۷۰، ۱۹۲، ۱۹۴، ۳۵۹، ۳۸۲، ۳۹۸، ۳۹۹، ۴۰۳، ۴۰۴، ۴۰۵، ۴۰۸، ۴۱۰، ۴۱۱، ۴۱۴، ۴۱۶، ۴۱۸، ۴۱۹، ۴۲۰، ۴۲۱، ۴۲۴، ۴۲۷، ۴۳۲، ۴۳۳، ۴۳۸، ۴۴۲، ۴۴۳
- اسیدهای نوکلئیک ۴۲، ۲۶۴، ۲۶۶، ۲۸۱، ۲۸۲، ۲۸۳، ۳۱۹، ۴۶۶
- اصول طراحی پرایمر PCR ۳۳۷
- الکتروفورز ج، ع، ۸، ۱۰، ۴۴، ۴۹، ۵۰، ۵۲، ۷۰، ۷۶، ۸۳، ۸۹، ۹۳، ۱۰۳، ۱۲۲، ۱۲۳، ۱۲۷، ۱۲۹، ۱۳۳، ۱۳۴، ۱۳۵، ۱۶۳، ۱۶۸، ۱۸۲، ۱۸۸، ۱۹۰، ۱۹۱، ۲۰۳، ۲۳۳، ۲۳۴، ۲۳۹، ۳۴۶، ۳۴۷، ۳۸۵، ۴۳۷، ۴۵۰، ۴۶۱، ۴۶۳، ۴۶۸
- امتیاز فعالیت ۳۳۳، ۴۷۱
- امتیاز ۳۳۳، ۳۴۱، ۳۹۳، ۴۷۱

اولیگو متصل شده ۳۷۲, ۳۶۰, ۳۵۳, ۳۳۴, ۳۳۱
 اولیگوز. ۴۲, ۲۸۸, ۳۳۱, ۳۳۴, ۳۴۲, ۳۵۱, ۳۵۲, ۳۵۳
 ۴۷۲, ۳۶۰, ۳۶۶, ۳۷۲, ۴۳۳, ۴۳۶, ۴۳۸, ۴۷۱

اولیگونوکلئوتید ۲۹۸, ۴۲
 اولیگونوکلئوتیدها ۴۲
 اولیگونوکلئوتیدهای siRNA ۲۸۵, ۲۸۲
 اولیگوها ۳۳۴, ۳۳۵, ۳۳۷, ۳۴۵, ۳۵۱, ۳۵۲, ۳۵۶, ۴۳۸, ۴۷۲, ۴۷۳

اولیگوهای فسفریله شده ۳۵۲, ۳۵۱
 ایزوپروپیل- β -D-تیوگالاکتوپیرانوسید (IPTG)
 ایمونوبللات ۱۴۰, ۱۳۰, ۱۲۹
 ایمونوفلورسانس ۱۴۱
 ایندل ها ۴۷۵, ۳۸۵, ۳۷۸, ۳۳۳, ۳۳۲, ۳۱۱

ب

با NcoI و NotI ۳۷
 با استفاده RT-PCR ۱۹۶
 بارگذاری نمونه در ژل ۲۴۰
 بازدهی ۵۷, ۶۵, ۶۸, ۷۹, ۹۹, ۱۰۱, ۱۰۹, ۱۵۹, ۱۶۰, ۱۶۴, ۱۶۶, ۲۲۶, ۲۳۴, ۲۸۰, ۲۸۳, ۲۸۵, ۲۸۶, ۲۸۷, ۳۰۱, ۳۲۰, ۳۲۷, ۳۳۰, ۳۴۱, ۳۴۸, ۳۷۴, ۳۷۶, ۳۷۷, ۳۸۵, ۳۸۶, ۳۸۷, ۳۹۱, ۳۹۳

بافر ۱۰× CutSmart Buffer ۳۸
 بافر تریس سالین ۴۱۸
 بافر سالین فسفات ۴۱۹
 بافر فسفات سالین با PEFABLOC ۴۲۱
 باقی مانده ۳۰۹, ۲۹۳, ۲۸۰, ۲۶۵, ۸۴
 برانگیختگی ۹۹, ۱۶۶, ۱۷۱, ۲۰۱, ۲۷۱, ۲۷۲, ۲۷۳, ۲۷۶, ۳۹۶

برای استفاده عمومی ۴۰۳, ۴۰۲, ۱۸۲
 برداشت سلول ها ۳۸۰

انتقال به نیتروسولوز ۱۳۵
 انتقال به ۳۵۴, ۳۵۲, ۱۳۵
 انتقال پایدار ۴۶۶, ۲۷۸, ۲۶۶
 انتقال گذرا ۲۶۹, ۲۷۱, ۲۷۴, ۲۷۷, ۲۷۹, ۲۸۱, ۲۹۵, ۲۹۶, ۲۹۷, ۳۰۱, ۴۳۳, ۴۳۰

انتقال گذرای سلول‌های پستانداران ۲۴۸
 انتقال ج. غ. ۲, ۷, ۹۰, ۱۳۰, ۱۳۲, ۱۳۳, ۱۳۵
 ۱۳۶, ۱۳۷, ۱۳۸, ۱۴۱, ۱۶۱, ۱۸۲, ۱۹۳, ۱۹۵, ۲۳۶, ۲۴۶, ۲۴۷, ۲۴۸, ۲۴۹, ۲۵۲, ۲۵۳, ۲۵۵, ۲۵۶, ۲۵۷, ۲۶۳, ۲۶۴, ۲۶۵, ۲۶۶, ۲۶۷, ۲۶۸, ۲۶۹, ۲۷۱, ۲۷۴, ۲۷۷, ۲۷۸, ۲۷۹, ۲۸۰, ۲۸۱, ۲۸۷, ۲۹۵, ۲۹۶, ۲۹۷, ۲۹۸, ۲۹۹, ۳۰۱, ۳۱۷, ۳۱۹, ۳۲۰, ۳۲۲, ۳۲۳, ۳۲۴, ۳۲۷, ۳۳۰, ۳۳۱, ۳۵۲, ۳۵۴, ۳۷۳, ۳۷۴, ۳۷۶, ۳۷۷, ۳۷۸, ۳۸۵, ۳۸۶, ۳۸۷, ۳۹۲, ۴۲۳, ۴۲۵, ۴۲۸, ۴۳۰, ۴۳۳, ۴۳۴, ۴۳۵, ۴۳۸, ۴۴۱, ۴۵۲, ۴۵۶, ۴۶۶, ۴۶۹, ۴۷۲, ۴۷۳

انحراف معیار ۴۷۱, ۴۶۹, ۳۲۹, ۳۰۵, ۳۰۴
 انکوباتورل. ۳۹, ۶۰, ۷۰, ۸۱, ۱۳۳, ۱۴۶, ۱۵۰, ۱۷۷, ۱۸۶, ۱۹۲, ۲۵۰, ۲۵۶, ۲۵۸, ۲۶۱, ۲۶۷, ۲۶۹, ۲۷۴, ۲۹۷, ۲۹۸, ۲۹۹, ۳۱۳, ۳۱۶, ۳۲۰, ۳۲۱, ۳۲۳, ۳۲۴, ۳۶۹, ۳۷۰, ۳۷۱, ۳۷۴, ۳۷۶, ۳۹۶, ۳۹۷, ۴۱۱, ۴۲۳, ۴۴۵

انکوباتورها و میکروسکوپ‌ها در یک مرکز کشت سلولی ۲۵۶
 انکوباتورها و میکروسکوپ‌ها ۲۵۶
 انکوباسیون با α -EGFP (آنتی‌بادی اولیه) ۱۴۵
 انکوباسیون ذ. ل. ۳۶, ۳۷, ۶۷, ۶۸, ۶۹, ۷۰, ۸۱, ۹۱, ۹۶, ۱۳۲, ۱۴۴, ۱۴۵, ۱۴۶, ۱۷۴, ۱۷۵, ۱۷۷, ۱۹۲, ۳۴۵, ۳۴۸, ۳۵۲, ۳۷۸, ۳۸۱, ۳۹۰, ۳۹۷, ۴۱۰, ۴۳۸, ۴۴۵, ۴۴۶, ۴۴۷

اوپران *lac* س

پرایمرها، ۷، ۴۲، ۴۴، ۴۵، ۴۶، ۵۷، ۸۶، ۸۷، ۱۰۴،
۲۰۰، ۲۰۲، ۲۰۳، ۲۰۶، ۲۲۶، ۳۳۷، ۳۳۸،
۳۴۳، ۳۴۵، ۳۸۲، ۳۸۳، ۳۸۹، ۳۹۱، ۳۹۲،
۴۵۰، ۴۵۳، ۴۶۳

پرایمرهای DNA ۴۰۵، ۴۲

پرایمرهای Oligo-dT ۲۰۰

پروتئولیز ۱۶۵، ۱۲۷

پروتئین الحاقی تخلیص شده ۱۶۸، ۱۶۵

پروتئین الحاقی غ، ۵، ۸، ۲۷، ۳۱، ۳۵، ۵۹، ۷۴، ۹۹،

۱۰۱، ۱۲۲، ۱۲۴، ۱۲۵، ۱۲۷، ۱۲۹، ۱۳۰،

۱۳۱، ۱۳۴، ۱۳۷، ۱۴۱، ۱۴۲، ۱۴۶، ۱۴۹،

۱۵۱، ۱۵۲، ۱۵۳، ۱۵۴، ۱۵۶، ۱۵۷، ۱۶۰،

۱۶۱، ۱۶۲، ۱۶۳، ۱۶۴، ۱۶۵، ۱۶۶، ۱۶۸، ۱۷۴،

۱۸۰، ۳۹۹، ۴۱۵، ۴۱۷، ۴۵۷، ۴۵۸، ۴۵۹، ۴۶۰

پروتئین فلورسنت سبز (GFP) ۳۲۲، ۴۱

پروتئین فلورسنت سبز بهبود یافته، ر، ۴۱، ۷۸، ۹۹

پروتئین فلورسنت، ر، س، ص، ۲، ۴۱، ۷۸، ۹۰، ۹۳،

۹۹، ۱۰۰، ۱۴۱، ۱۶۶، ۲۷۱، ۳۲۲، ۴۱۳

پروتئین نوترکیب EGFP ۱۷۶، ۱۷۴

پروتئین‌های نوترکیب، ر، ع، ۲، ۵، ۱۲۱، ۱۲۳،

۱۵۲

پروموتور T7 ۴۴۵، ۳۹۸، ۹۰، ۶۵، ۲۷

پروموتور U6 انسانی ۳۶۲

پلازمیدها، ۸۲، ۲۶۴، ۳۳۷، ۳۵۲، ۳۷۳، ۳۹۸، ۳۹۹،

۴۳۴

پلی آکریل آمید ۱۲۲، ۱۲۷، ۱۲۹، ۱۶۸، ۴۲۱، ۴۵۷،

پلیت LB/kan/IPTG را با استفاده از نور UV ۹۹

پلیت مضاعف کلون مثبت ۱۴۶

پلیت مضاعف ۷۹، ۸۱، ۸۸، ۹۰، ۹۹، ۱۴۶، ۱۶۳،

۱۷۷، ۳۵۸، ۴۱۱، ۴۱۵، ۴۱۹، ۴۲۱، ۴۲۲، ۴۷۶،

پلی‌مراز، ۲۶، ۲۸، ۴۲، ۴۳، ۴۴، ۴۵، ۵۵، ۵۷، ۶۵،

۱۰۲، ۱۸۰، ۴۰۸، ۴۰۹، ۴۱۲، ۴۴۵، ۴۵۰،

۴۶۱، ۴۷۰

بسته نرم‌افزاری DESKGEN Cloud ۴۳۶

بلثومایسین ۲۷۸

بیان ژن، ج، خ، ذ، ر، ش، ص، غ، ۵، ۸، ۲۶، ۲۷، ۱۸۰،

۱۸۷، ۲۰۲، ۲۰۳، ۲۲۳، ۲۲۵، ۲۳۳، ۲۴۵،

۲۴۶، ۲۴۷، ۲۸۱، ۲۸۲، ۲۸۴، ۲۸۷، ۲۹۳،

۲۹۹، ۳۰۶، ۳۱۲، ۳۱۷، ۳۳۱، ۳۳۳، ۴۶۳، ۴۶۵

بیان، ج، خ، ذ، ر، ش، س، ص، ع، غ، ۲، ۵، ۸، ۲۶، ۲۷،

۳۰، ۳۷، ۴۱، ۶۵، ۷۲، ۷۴، ۷۸، ۹۰، ۹۱، ۹۹،

۱۰۰، ۱۲۱، ۱۲۲، ۱۲۳، ۱۲۷، ۱۲۹، ۱۳۰،

۱۳۲، ۱۴۱، ۱۴۲، ۱۴۹، ۱۵۱، ۱۵۲، ۱۵۳،

۱۵۶، ۱۶۴، ۱۸۰، ۱۸۷، ۲۰۰، ۲۰۲، ۲۰۳،

۲۰۷، ۲۲۳، ۲۲۵، ۲۲۷، ۲۲۹، ۲۳۳، ۲۴۵،

۲۴۶، ۲۴۷، ۲۶۳، ۲۶۴، ۲۶۶، ۲۶۹، ۲۷۱، ۲۷۴،

۲۷۶، ۲۷۸، ۲۷۹، ۲۸۰، ۲۸۱، ۲۸۲، ۲۸۳،

۲۸۵، ۲۸۷، ۲۸۸، ۲۹۳، ۲۹۵، ۲۹۶، ۲۹۷،

۲۹۹، ۳۰۱، ۳۰۲، ۳۰۳، ۳۰۶، ۳۰۷، ۳۰۹،

۳۱۱، ۳۱۲، ۳۱۳، ۳۱۷، ۳۱۸، ۳۲۰، ۳۲۱،

۳۲۲، ۳۲۳، ۳۲۷، ۳۲۸، ۳۲۹، ۳۳۱، ۳۳۳،

۳۵۰، ۳۵۲، ۳۶۸، ۳۷۳، ۳۸۵، ۳۸۶، ۳۹۸،

۳۹۹، ۴۱۵، ۴۱۷، ۴۳۰، ۴۳۱، ۴۳۲، ۴۳۳،

۴۳۴، ۴۳۵، ۴۳۶، ۴۴۰، ۴۴۱، ۴۴۵، ۴۵۳،

۴۵۷، ۴۵۸، ۴۶۳، ۴۶۵، ۴۶۶، ۴۶۸، ۴۶۹

پ

پایپت کردن، ۵۵، ۸۴، ۹۴، ۹۵، ۱۳۴، ۱۴۶، ۱۵۷،

۱۵۸، ۱۷۳، ۱۹۲، ۱۹۳، ۱۹۵، ۲۰۴، ۲۰۵،

۲۰۸، ۲۳۴، ۲۳۶، ۲۵۹، ۲۶۸، ۲۹۸، ۳۱۳،

۳۱۴، ۳۴۶، ۳۶۱، ۳۷۰، ۳۷۶، ۳۸۱، ۳۹۰،

۴۰۲، ۴۴۶، ۴۵۱، ۴۵۴

پایپت‌های پاستور ۴۴۰، ۴۳۴، ۴۲۹، ۲۵۵

پرایمر رفت، ۴۳، ۵۵، ۶۲، ۸۷، ۱۰۸، ۳۴۴، ۳۸۲،

۳۸۳

۱۶۴، ۱۶۵، ۱۶۸، ۱۷۰، ۱۷۱، ۱۷۴، ۱۷۵، ۱۷۶،
 ۱۷۷، ۱۸۰، ۱۸۲، ۱۸۳، ۱۸۵، ۱۸۷، ۱۸۸،
 ۱۸۹، ۱۹۰، ۱۹۲، ۱۹۹، ۲۰۱، ۲۳۳، ۲۴۶،
 ۳۰۹، ۳۳۶، ۳۴۷، ۳۴۹، ۳۵۰، ۳۵۳، ۳۵۸،
 ۳۶۰، ۳۸۹، ۳۹۸، ۴۰۶، ۴۰۷، ۴۰۸، ۴۱۰،
 ۴۱۹، ۴۲۰، ۴۲۱، ۴۲۲، ۴۲۳، ۴۳۴، ۴۳۵،
 ۴۳۹، ۴۴۱، ۴۵۸، ۴۵۹، ۴۶۱

ترادیزی از طریق کاتیون دو ظرفیتی ۶۸
 ترادیزی شده‌ها ۴۱۱
 ترادیزی ۶۳، ۶۴، ۶۵، ۶۶، ۶۷، ۶۸، ۶۹، ۷۰، ۷۳،
 ۷۴، ۷۵، ۷۸، ۷۹، ۸۱، ۸۲، ۸۷، ۹۰، ۹۱، ۹۳،
 ۹۴، ۹۹، ۱۰۱، ۱۰۷، ۱۰۸، ۱۲۸، ۱۳۴، ۱۶۴،
 ۱۸۵، ۱۸۸، ۲۴۹، ۲۶۴، ۳۳۷، ۳۵۱، ۳۵۲،
 ۳۵۵، ۳۵۶، ۳۵۸، ۳۵۹، ۳۶۰، ۳۶۴، ۳۶۷، ۳۶۸،
 ۳۷۳، ۴۱۰، ۴۱۱، ۴۱۲، ۴۳۹، ۴۴۶، ۴۴۷

ترانس بلات ۱۳۳، ۱۲
 ترانس کریپتاز معکوس ۲۰۱، ۲۰۵، ۲۴۴
 ترسیب ایمنی ۱۴۱
 تری فسفات دئوکسی نوکلئوتید فلورسنت (dNTP)
 ۴۵۵

تری فسفات‌های دئوکسی نوکلئوتید (ddNTPs)
 ۱۰۲
 تری فسفات‌های دئوکسی نوکلئوتید (dNTPs)
 ۱۰۲
 تریپسین ۱۲۵، ۲۵۷، ۲۵۸، ۲۶۲، ۳۱۴، ۳۲۳، ۳۶۹،
 ۳۷۰، ۳۸۰، ۴۲۸، ۴۲۹، ۴۳۲، ۴۳۳، ۴۳۴،
 ۴۳۵، ۴۴۰، ۴۴۲

تریس/بورات/EDTA (TBE) ۱۲
 تشخیص رنگ سنجی ۴۱۷، ۱۴۵
 تشخیص فعالیت پراکسیداز ۱۴۵
 تعدیل و اصلاح ۵
 تعیین کمیت پروتئین ر. ۱۶۴، ۱۶۵، ۱۶۶، ۱۷۰،

۱۷۴

پلیمرازها ۳۱۰
 پنی سیلین-استرپتومایسین ۲۵۷، ۳۶۹، ۴۲۹
 پورومایسین ۲۷۸
 پیشرفته‌خ. ر. ۵، ۶، ۷، ۷۴، ۷۵، ۱۲۳، ۲۴۶، ۳۳۱،
 ۳۵۱، ۳۶۰، ۳۶۵، ۳۶۶، ۳۷۷، ۳۷۸، ۳۸۵، ۴۰۲،
 ۴۳۶، ۴۳۸، ۴۳۹، ۴۴۰، ۴۴۱، ۴۴۳

ت

تجزیه و تحلیل بیان EGFP با استفاده از
 میکروسکوپ فلورسانس ۲۷۱، ۴۳۰
 تجزیه و تحلیل توالی DNA از یک کلون مثبت
 ۱۰۱، ۴۱۴
 تجزیه و تحلیل محاسباتی توالی DNA ۳۶۶
 تجزیه و تحلیل
 تجهیزات مشترک ۲۵۱، ۳۹۶
 تجهیزات ج. ف. ق. ک. ۱۱، ۳۴، ۱۳۳، ۱۹۵، ۲۲۷،
 ۲۵۱، ۲۵۲، ۲۵۶، ۲۶۷، ۲۷۴، ۲۷۵، ۲۹۷،
 ۳۶۲، ۳۶۶، ۳۶۸، ۳۹۶، ۳۹۷، ۴۰۱، ۴۰۶، ۴۰۷،
 ۴۱۰، ۴۱۲، ۴۱۳، ۴۱۴، ۴۱۵، ۴۱۶، ۴۱۷،
 ۴۱۹، ۴۲۰، ۴۲۲، ۴۲۳، ۴۲۴، ۴۲۵، ۴۲۶،
 ۴۲۷، ۴۲۹، ۴۳۰، ۴۳۱، ۴۳۲، ۴۳۳، ۴۳۴،
 ۴۳۵، ۴۳۷، ۴۳۸، ۴۳۹، ۴۴۰، ۴۴۱، ۴۴۲،
 ۴۴۳، ۴۴۴

تخلیص RNA کل غ. ۱۸۳، ۱۸۵، ۱۸۷، ۱۹۲، ۴۲۳،
 تخلیص پروتئین ج. غ. ۲۷، ۱۲۲، ۱۲۳، ۱۲۴، ۱۲۵،
 ۱۵۰، ۱۵۱، ۱۵۶، ۱۵۹، ۱۶۲، ۱۶۴، ۱۶۶، ۱۶۹،
 ۴۵۸، ۴۵۹

تخلیص ج. غ. ۵، ۷، ۸، ۲۳، ۲۴، ۲۵، ۲۷، ۳۲، ۳۳،
 ۳۴، ۳۵، ۳۷، ۴۷، ۴۸، ۴۹، ۵۰، ۵۱، ۵۳، ۵۹،
 ۶۰، ۶۱، ۶۲، ۷۱، ۷۴، ۷۵، ۷۷، ۷۸، ۸۲، ۸۳،
 ۹۰، ۹۳، ۹۴، ۱۰۶، ۱۲۱، ۱۲۲، ۱۲۳، ۱۲۴،
 ۱۳۰، ۱۳۳، ۱۴۱، ۱۴۹، ۱۵۰، ۱۵۱، ۱۵۲،
 ۱۵۳، ۱۵۵، ۱۵۶، ۱۵۹، ۱۶۰، ۱۶۱، ۱۶۲، ۱۶۳،

چارچوب خوانش ۳۰, ۳۱
 چرخه آستانه ۴۶۲

خ

خارج از هدف ۲۸۵, ۲۸۶, ۲۸۷, ۳۰۶, ۳۱۱, ۳۱۷,
 ۳۳۲, ۳۳۳, ۳۴۱, ۳۴۲, ۳۷۷, ۳۸۸, ۴۶۷,
 خاموش کردن... ۲۸۲, ۲۸۳, ۲۸۵, ۲۹۳, ۲۹۵, ۲۹۸,
 خاموش کننده القاء شده با RNA (RISC) ۲۸۳
 خط کش DNA شرکت NEB Quick-Load
 1 kb ۳۴۶
 خوانش ۲۴, ۲۸, ۳۰, ۳۱, ۴۰, ۱۱۱, ۱۱۲, ۱۱۴,
 ۱۱۵, ۱۱۷, ۱۶۷, ۱۷۰, ۱۷۱, ۱۷۳, ۱۹۵,
 ۲۱۹, ۳۰۲, ۳۲۸, ۳۷۲, ۳۹۶, ۴۵۱, ۴۵۵, ۴۷۱

د

داده‌های توالی‌یابی pBIT ۱۱۱, ۱۱۲, ۱۱۳
 داده‌های توالی‌یابی ۸, ۱۱۱, ۱۱۲, ۱۱۳, ۱۱۵, ۱۱۹,
 ۳۷۳, ۴۱۴, ۴۴۰, ۴۵۵
 دایمرهای تیمیدین ۵۱
 در فرآیند لیگاسیون ۷۹
 درمان خ, ۱۵۷, ۲۰۴
 دروشا ۲۸۳, ۲۸۴
 درون‌زاد ۵۰
 دست‌کاری, ظ, ا, ۳, ۵, ۶, ۱۳, ۷۴, ۱۲۲, ۲۴۶,
 ۲۴۹, ۲۵۳, ۲۶۴, ۲۶۶, ۳۳۳, ۳۸۰
 دما ۴۲, ۶۹, ۷۰, ۲۰۳, ۲۰۴, ۲۰۶, ۲۵۰, ۳۵۱,
 ۳۵۲, ۳۵۴, ۳۸۱, ۳۸۵, ۳۹۰, ۴۰۳
 دماسنج ۶۹, ۳۵۴
 دمای ذوب Tm آمپلیکون rRNA S۲۳ ۲۰۳
 دی متیل سولفوکسید (DMSO) ۴۴۶
 دی‌تیوتریتول ۱۳۰

ر

راندمان ۷۸, ۷۹, ۲۳۴, ۲۶۶, ۲۶۸, ۲۹۸, ۳۴۱,
 ۳۸۵, ۴۴۵, ۴۴۷, ۴۷۵

تکثیر *egfp* در PCR ۴۵۰
 تکنیک استریل ۴۴۵
 تکنیک ضد عفونی ۸۰, ۲۴۷, ۲۵۷, ۳۱۹
 تلقای سلول‌ها ۲۵۱
 تلقیح شبانه کشت‌ها ۷۸, ۷۹
 تلقیح کشت‌ها برای MINIPREP DNA ۳۵۸
 تلقیح کشت‌ها برای ۸۰, ۱۵۰, ۳۵۸, ۴۲۲, ۴۳۹
 تمرین آزمایشگاهی ۱۲۰, ۱۴۴, ۲۸۸, ۳۸۵, ۴۳۴
 تمرینات آزمایشگاهی ج
 توالی DNA, ۲, ۴۷, ۷۴, ۷۵, ۷۷, ۸۲, ۸۶, ۱۰۱,
 ۱۰۳, ۱۰۴, ۱۰۹, ۱۱۵, ۱۵۲, ۳۰۷, ۳۱۱,
 ۳۳۳, ۳۴۰, ۴۱۴, ۴۷۰

توالی مورد نظر ۱۱۱, ۱۱۴, ۴۵۵
 توالی‌ها ۱۱۶, ۱۲۲, ۳۴۳, ۳۴۴, ۳۴۵, ۳۶۲, ۴۳۷
 توالی‌های همولوگ ۳۰۹
 توالی‌یابی خودکار DNA ۱۰۳, ۱۰۹
 توالی‌یابی سانگر ۹۳, ۱۰۱, ۱۰۲, ۱۰۹, ۳۳۱, ۳۶۰,
 ۳۸۷, ۳۶۶

توالی‌یابی کل ژنوم ۱۰۲, ۳۸۸
 تیمار کردن ۶۵
 تیوگالاکتوپیرانوسید ع, ۲۷, ۱۲۷, ۱۴۹

ج

جداسازی DNA Miniprep ۴۱۲
 جذب سیلیکایی ۲۳, ۲۴, ۳۲
 جریان عبوری ۱۶۱, ۴۵۹
 جلسه موقت آزمایشگاه ۱۲۸, ۱۵۰, ۱۸۶, ۲۶۴,
 ۲۹۷, ۳۱۷, ۳۱۹, ۳۲۳, ۳۵۷, ۳۵۸, ۳۷۳,
 ۴۱۱, ۴۱۵, ۴۱۹, ۴۳۰, ۴۳۳, ۴۳۵, ۴۴۱
 جلسه موقت آزمایشگاهی ۷۷, ۳۶۰
 جهت‌گیری ۱۱, ۲۸, ۲۹, ۴۳, ۷۴, ۸۶, ۱۴۴, ۱۵۲,
 ۱۵۳, ۴۰۶, ۴۵۰

چ

۶۷, ۷۰, ۷۱, ۷۵, ۸۲, ۸۳, ۸۶, ۸۹, ۹۳, ۹۴,
 ۹۶, ۹۷, ۹۸, ۱۰۳, ۱۰۸, ۱۲۲, ۱۲۳, ۱۲۴,
 ۱۲۷, ۱۲۹, ۱۳۰, ۱۳۲, ۱۳۳, ۱۳۴, ۱۳۵,
 ۱۳۶, ۱۳۷, ۱۳۸, ۱۳۹, ۱۴۰, ۱۶۱, ۱۶۳, ۱۶۵,
 ۱۶۸, ۱۶۹, ۱۷۰, ۱۸۲, ۱۸۸, ۱۸۹, ۱۹۰,
 ۱۹۱, ۱۹۹, ۲۰۱, ۲۰۳, ۲۲۵, ۲۳۳, ۲۳۴,
 ۲۳۹, ۲۴۰, ۲۴۱, ۲۴۳, ۲۴۴, ۲۴۶, ۲۴۷,
 ۲۴۸, ۲۴۹, ۲۵۰, ۲۵۳, ۳۶۰, ۳۸۱,
 ۳۸۲, ۳۸۵, ۳۸۶, ۳۸۸, ۳۸۹, ۳۹۰, ۳۹۱,
 ۳۹۲, ۳۹۶, ۴۰۸, ۴۱۴, ۴۱۵, ۴۲۱, ۴۲۲,
 ۴۳۷, ۴۳۹, ۴۴۲, ۴۵۱, ۴۵۴, ۴۵۶, ۴۵۷,
 ۴۵۸, ۴۶۰, ۴۶۱, ۴۶۳, ۴۶۴, ۴۶۵, ۴۷۲, ۴۷۵,
 ۴۷۶

ژل‌های آگارز دناتوره کننده ۱۸۸
 ژن *lacI* ۲۷
 ژن مرجع ۱۹۹, ۲۰۲, ۲۰۷, ۲۲۱, ۲۲۶, ۲۲۷, ۲۳۳,
 ۲۳۸, ۴۶۲

ژن مقاومت ۶۵, ۲۷
 ژن *rrn*, *rrs*, *ssrA*, *ssrB*, *ssrC*, *ssrD*, *ssrE*, *ssrF*, *ssrG*, *ssrH*, *ssrI*, *ssrJ*, *ssrK*, *ssrL*, *ssrM*, *ssrN*, *ssrO*, *ssrP*, *ssrQ*, *ssrR*, *ssrS*, *ssrT*, *ssrU*, *ssrV*, *ssrW*, *ssrX*, *ssrY*, *ssrZ*, *ssrAA*, *ssrAB*, *ssrAC*, *ssrAD*, *ssrAE*, *ssrAF*, *ssrAG*, *ssrAH*, *ssrAI*, *ssrAJ*, *ssrAK*, *ssrAL*, *ssrAM*, *ssrAN*, *ssrAO*, *ssrAP*, *ssrAQ*, *ssrAR*, *ssrAS*, *ssrAT*, *ssrAU*, *ssrAV*, *ssrAW*, *ssrAX*, *ssrAY*, *ssrAZ*, *ssrBA*, *ssrBB*, *ssrBC*, *ssrBD*, *ssrBE*, *ssrBF*, *ssrBG*, *ssrBH*, *ssrBI*, *ssrBJ*, *ssrBK*, *ssrBL*, *ssrBM*, *ssrBN*, *ssrBO*, *ssrBP*, *ssrBQ*, *ssrBR*, *ssrBS*, *ssrBT*, *ssrBU*, *ssrBV*, *ssrBW*, *ssrBX*, *ssrBY*, *ssrBZ*, *ssrCA*, *ssrCB*, *ssrCC*, *ssrCD*, *ssrCE*, *ssrCF*, *ssrCG*, *ssrCH*, *ssrCI*, *ssrCJ*, *ssrCK*, *ssrCL*, *ssrCM*, *ssrCN*, *ssrCO*, *ssrCP*, *ssrCQ*, *ssrCR*, *ssrCS*, *ssrCT*, *ssrCU*, *ssrCV*, *ssrCW*, *ssrCX*, *ssrCY*, *ssrCZ*, *ssrDA*, *ssrDB*, *ssrDC*, *ssrDD*, *ssrDE*, *ssrDF*, *ssrDG*, *ssrDH*, *ssrDI*, *ssrDJ*, *ssrDK*, *ssrDL*, *ssrDM*, *ssrDN*, *ssrDO*, *ssrDP*, *ssrDQ*, *ssrDR*, *ssrDS*, *ssrDT*, *ssrDU*, *ssrDV*, *ssrDW*, *ssrDX*, *ssrDY*, *ssrDZ*, *ssrEA*, *ssrEB*, *ssrEC*, *ssrED*, *ssrEE*, *ssrEF*, *ssrEG*, *ssrEH*, *ssrEI*, *ssrEJ*, *ssrEK*, *ssrEL*, *ssrEM*, *ssrEN*, *ssrEO*, *ssrEP*, *ssrEQ*, *ssrER*, *ssrES*, *ssrET*, *ssrEU*, *ssrEV*, *ssrEW*, *ssrEX*, *ssrEY*, *ssrEZ*, *ssrFA*, *ssrFB*, *ssrFC*, *ssrFD*, *ssrFE*, *ssrFF*, *ssrFG*, *ssrFH*, *ssrFI*, *ssrFJ*, *ssrFK*, *ssrFL*, *ssrFM*, *ssrFN*, *ssrFO*, *ssrFP*, *ssrFQ*, *ssrFR*, *ssrFS*, *ssrFT*, *ssrFU*, *ssrFV*, *ssrFW*, *ssrFX*, *ssrFY*, *ssrFZ*, *ssrGA*, *ssrGB*, *ssrGC*, *ssrGD*, *ssrGE*, *ssrGF*, *ssrGG*, *ssrGH*, *ssrGI*, *ssrGJ*, *ssrGK*, *ssrGL*, *ssrGM*, *ssrGN*, *ssrGO*, *ssrGP*, *ssrGQ*, *ssrGR*, *ssrGS*, *ssrGT*, *ssrGU*, *ssrGV*, *ssrGW*, *ssrGX*, *ssrGY*, *ssrGZ*, *ssrHA*, *ssrHB*, *ssrHC*, *ssrHD*, *ssrHE*, *ssrHF*, *ssrHG*, *ssrHH*, *ssrHI*, *ssrHJ*, *ssrHK*, *ssrHL*, *ssrHM*, *ssrHN*, *ssrHO*, *ssrHP*, *ssrHQ*, *ssrHR*, *ssrHS*, *ssrHT*, *ssrHU*, *ssrHV*, *ssrHW*, *ssrHX*, *ssrHY*, *ssrHZ*, *ssrIA*, *ssrIB*, *ssrIC*, *ssrID*, *ssrIE*, *ssrIF*, *ssrIG*, *ssrIH*, *ssrII*, *ssrIJ*, *ssrIK*, *ssrIL*, *ssrIM*, *ssrIN*, *ssrIO*, *ssrIP*, *ssrIQ*, *ssrIR*, *ssrIS*, *ssrIT*, *ssrIU*, *ssrIV*, *ssrIW*, *ssrIX*, *ssrIY*, *ssrIZ*, *ssrJA*, *ssrJB*, *ssrJC*, *ssrJD*, *ssrJE*, *ssrJF*, *ssrJG*, *ssrJH*, *ssrJI*, *ssrJJ*, *ssrJK*, *ssrJL*, *ssrJM*, *ssrJN*, *ssrJO*, *ssrJP*, *ssrJQ*, *ssrJR*, *ssrJS*, *ssrJT*, *ssrJU*, *ssrJV*, *ssrJW*, *ssrJX*, *ssrJY*, *ssrJZ*, *ssrKA*, *ssrKB*, *ssrKC*, *ssrKD*, *ssrKE*, *ssrKF*, *ssrKG*, *ssrKH*, *ssrKI*, *ssrKJ*, *ssrKK*, *ssrKL*, *ssrKM*, *ssrKN*, *ssrKO*, *ssrKP*, *ssrKQ*, *ssrKR*, *ssrKS*, *ssrKT*, *ssrKU*, *ssrKV*, *ssrKW*, *ssrKX*, *ssrKY*, *ssrKZ*, *ssrLA*, *ssrLB*, *ssrLC*, *ssrLD*, *ssrLE*, *ssrLF*, *ssrLG*, *ssrLH*, *ssrLI*, *ssrLJ*, *ssrLK*, *ssrLL*, *ssrLN*, *ssrLO*, *ssrLP*, *ssrLQ*, *ssrLR*, *ssrLS*, *ssrLT*, *ssrLU*, *ssrLV*, *ssrLW*, *ssrLX*, *ssrLY*, *ssrLZ*, *ssrMA*, *ssrMB*, *ssrMC*, *ssrMD*, *ssrME*, *ssrMF*, *ssrMG*, *ssrMH*, *ssrMI*, *ssrMJ*, *ssrMK*, *ssrML*, *ssrMN*, *ssrMO*, *ssrMP*, *ssrMQ*, *ssrMR*, *ssrMS*, *ssrMT*, *ssrMU*, *ssrMV*, *ssrMW*, *ssrMX*, *ssrMY*, *ssrMZ*, *ssrNA*, *ssrNB*, *ssrNC*, *ssrND*, *ssrNE*, *ssrNF*, *ssrNG*, *ssrNH*, *ssrNI*, *ssrNJ*, *ssrNK*, *ssrNL*, *ssrNM*, *ssrNN*, *ssrNO*, *ssrNP*, *ssrNQ*, *ssrNR*, *ssrNS*, *ssrNT*, *ssrNU*, *ssrNV*, *ssrNW*, *ssrNX*, *ssrNY*, *ssrNZ*, *ssrOA*, *ssrOB*, *ssrOC*, *ssrOD*, *ssrOE*, *ssrOF*, *ssrOG*, *ssrOH*, *ssrOI*, *ssrOJ*, *ssrOK*, *ssrOL*, *ssrOM*, *ssrON*, *ssrOO*, *ssrOP*, *ssrOQ*, *ssrOR*, *ssrOS*, *ssrOT*, *ssrOU*, *ssrOV*, *ssrOW*, *ssrOX*, *ssrOY*, *ssrOZ*, *ssrPA*, *ssrPB*, *ssrPC*, *ssrPD*, *ssrPE*, *ssrPF*, *ssrPG*, *ssrPH*, *ssrPI*, *ssrPJ*, *ssrPK*, *ssrPL*, *ssrPM*, *ssrPN*, *ssrPO*, *ssrPP*, *ssrPQ*, *ssrPR*, *ssrPS*, *ssrPT*, *ssrPU*, *ssrPV*, *ssrPW*, *ssrPX*, *ssrPY*, *ssrPZ*, *ssrQA*, *ssrQB*, *ssrQC*, *ssrQD*, *ssrQE*, *ssrQF*, *ssrQG*, *ssrQH*, *ssrQI*, *ssrQJ*, *ssrQK*, *ssrQL*, *ssrQM*, *ssrQN*, *ssrQO*, *ssrQP*, *ssrQQ*, *ssrQR*, *ssrQS*, *ssrQT*, *ssrQU*, *ssrQV*, *ssrQW*, *ssrQX*, *ssrQY*, *ssrQZ*, *ssrRA*, *ssrRB*, *ssrRC*, *ssrRD*, *ssrRE*, *ssrRF*, *ssrRG*, *ssrRH*, *ssrRI*, *ssrRJ*, *ssrRK*, *ssrRL*, *ssrRM*, *ssrRN*, *ssrRO*, *ssrRP*, *ssrRQ*, *ssrRR*, *ssrRS*, *ssrRT*, *ssrRU*, *ssrRV*, *ssrRW*, *ssrRX*, *ssrRY*, *ssrRZ*, *ssrSA*, *ssrSB*, *ssrSC*, *ssrSD*, *ssrSE*, *ssrSF*, *ssrSG*, *ssrSH*, *ssrSI*, *ssrSJ*, *ssrSK*, *ssrSL*, *ssrSM*, *ssrSN*, *ssrSO*, *ssrSP*, *ssrSQ*, *ssrSR*, *ssrSS*, *ssrST*, *ssrSU*, *ssrSV*, *ssrSW*, *ssrSX*, *ssrSY*, *ssrSZ*, *ssrTA*, *ssrTB*, *ssrTC*, *ssrTD*, *ssrTE*, *ssrTF*, *ssrTG*, *ssrTH*, *ssrTI*, *ssrTJ*, *ssrTK*, *ssrTL*, *ssrTM*, *ssrTN*, *ssrTO*, *ssrTP*, *ssrTQ*, *ssrTR*, *ssrTS*, *ssrTT*, *ssrTU*, *ssrTV*, *ssrTW*, *ssrTX*, *ssrTY*, *ssrTZ*, *ssrUA*, *ssrUB*, *ssrUC*, *ssrUD*, *ssrUE*, *ssrUF*, *ssrUG*, *ssrUH*, *ssrUI*, *ssrUJ*, *ssrUK*, *ssrUL*, *ssrUM*, *ssrUN*, *ssrUO*, *ssrUP*, *ssrUQ*, *ssrUR*, *ssrUS*, *ssrUT*, *ssrUU*, *ssrUV*, *ssrUW*, *ssrUX*, *ssrUY*, *ssrUZ*, *ssrVA*, *ssrVB*, *ssrVC*, *ssrVD*, *ssrVE*, *ssrVF*, *ssrVG*, *ssrVH*, *ssrVI*, *ssrVJ*, *ssrVK*, *ssrVL*, *ssrVM*, *ssrVN*, *ssrVO*, *ssrVP*, *ssrVQ*, *ssrVR*, *ssrVS*, *ssrVT*, *ssrVU*, *ssrVV*, *ssrVW*, *ssrVX*, *ssrVY*, *ssrVZ*, *ssrWA*, *ssrWB*, *ssrWC*, *ssrWD*, *ssrWE*, *ssrWF*, *ssrWG*, *ssrWH*, *ssrWI*, *ssrWJ*, *ssrWK*, *ssrWL*, *ssrWM*, *ssrWN*, *ssrWO*, *ssrWP*, *ssrWQ*, *ssrWR*, *ssrWS*, *ssrWT*, *ssrWU*, *ssrWV*, *ssrWW*, *ssrWX*, *ssrWY*, *ssrWZ*, *ssrXA*, *ssrXB*, *ssrXC*, *ssrXD*, *ssrXE*, *ssrXF*, *ssrXG*, *ssrXH*, *ssrXI*, *ssrXJ*, *ssrXK*, *ssrXL*, *ssrXM*, *ssrXN*, *ssrXO*, *ssrXP*, *ssrXQ*, *ssrXR*, *ssrXS*, *ssrXT*, *ssrXU*, *ssrXV*, *ssrXW*, *ssrXX*, *ssrXY*, *ssrXZ*, *ssrYA*, *ssrYB*, *ssrYC*, *ssrYD*, *ssrYE*, *ssrYF*, *ssrYG*, *ssrYH*, *ssrYI*, *ssrYJ*, *ssrYK*, *ssrYL*, *ssrYM*, *ssrYN*, *ssrYO*, *ssrYP*, *ssrYQ*, *ssrYR*, *ssrYS*, *ssrYT*, *ssrYU*, *ssrYV*, *ssrYW*, *ssrYX*, *ssrYY*, *ssrYZ*, *ssrZA*, *ssrZB*, *ssrZC*, *ssrZD*, *ssrZE*, *ssrZF*, *ssrZG*, *ssrZH*, *ssrZI*, *ssrZJ*, *ssrZK*, *ssrZL*, *ssrZM*, *ssrZN*, *ssrZO*, *ssrZP*, *ssrZQ*, *ssrZR*, *ssrZS*, *ssrZT*, *ssrZU*, *ssrZV*, *ssrZW*, *ssrZX*, *ssrZY*, *ssrZZ*

رده سلولی چسبنده کلیه انسان ۳۰۷
 رزین میل ترکیبی ۱۵۳, ۱۵۴, ۱۵۵, ۱۵۶, ۱۵۹,
 ۱۶۰, ۱۶۵
 رزین ۱۲۵, ۱۲۶, ۱۵۳, ۱۵۴, ۱۵۵, ۱۵۹, ۱۶۰,
 ۱۶۲, ۱۶۵, ۴۱۹
 رشته‌ها ۳۸۵, ۳۳۸, ۶۴, ۴۲, ۲۴, ۶
 رقت‌ها ۱۷۵, ۱۷۱, ۱۷۰, ۱۸
 رنگ پانسو ۴۱۷, ۴۰۶, ۱۴۴, ۱۴۱, ۱۳۱, ۱۳۰
 رنگ پراکسید ۴۱۸, ۴۱۷
 رنگ فلورسنت حساس ۲۰۳
 رنگ نقره‌ای ۱۳۰
 روش C_T مقایسه‌ای ۲۲۹, ۲۲۶
 روش منحنی استاندارد نسبی ۲۲۶
 رونویسی معکوس ۱۸۰, ۱۸۱, ۱۸۳, ۱۹۰, ۱۹۹,
 ۲۰۰, ۲۰۴, ۲۰۵, ۲۰۸, ۲۲۱, ۲۳۳, ۲۳۵,
 ۲۳۸, ۳۸۱, ۴۲۵, ۴۲۶, ۴۶۲, ۴۶۳, ۴۶۵
 ریبوزومی ۲۳۸, ۲۲۱, ۱۸۱, ۱۸۰

ز

زیست‌شناسی مولکولی
 زیست‌فناوری
 ژنوسین ۲۷۸

ژ

ژل آگارز, ۷, ۸, ۱۱, ۴۴, ۴۹, ۵۰, ۵۱, ۵۲, ۵۷,
 ۶۰, ۶۱, ۶۴, ۶۵, ۶۷, ۷۰, ۷۵, ۷۶, ۸۶, ۸۹,
 ۹۳, ۹۶, ۹۷, ۱۲۳, ۱۲۹, ۱۶۹, ۱۸۸, ۱۸۹,
 ۱۹۰, ۱۹۱, ۱۹۹, ۲۰۱, ۲۰۳, ۲۲۵, ۲۳۳,
 ۲۳۴, ۲۳۹, ۲۴۰, ۲۴۴, ۲۴۶, ۲۴۷,
 ۳۴۸, ۳۴۹, ۳۶۰, ۳۸۱, ۳۸۲, ۳۸۵, ۳۸۸, ۳۸۹,
 ۳۹۱, ۳۹۲, ۴۰۸, ۴۳۷, ۴۴۲, ۴۵۱, ۴۶۴,
 ۴۷۲, ۴۷۶
 ژل ز, ع, ق, ل, ۵, ۷, ۸, ۹, ۱۱, ۱۲, ۴۴, ۴۹, ۵۰,
 ۵۱, ۵۲, ۵۳, ۵۴, ۵۷, ۶۰, ۶۱, ۶۲, ۶۴, ۶۵

۳۷۴, ۳۸۵, ۳۸۶, ۳۸۷, ۴۱۱, ۴۴۰, ۴۵۲, ۴۶۵, ۴۶۶, ۴۷۰, ۴۷۱, ۴۷۴
سلول‌هاذ, ک, ۲۴, ۲۵, ۵۱, ۶۴, ۶۵, ۶۸, ۶۹, ۷۰, ۷۹, ۸۰, ۸۱, ۸۶, ۱۲۲, ۱۳۲, ۱۵۱, ۱۵۷, ۱۸۰, ۱۸۵, ۱۹۲, ۲۴۷, ۲۴۹, ۲۵۰, ۲۵۱, ۲۵۲, ۲۵۴, ۲۵۶, ۲۵۷, ۲۵۸, ۲۵۹, ۲۶۰, ۲۶۱, ۲۶۲, ۲۶۹, ۲۷۴, ۲۷۵, ۲۷۶, ۲۷۸, ۲۷۹, ۲۸۰, ۲۸۵, ۲۹۶, ۲۹۸, ۲۹۹, ۳۰۱, ۳۰۳, ۳۰۶, ۳۰۷, ۳۰۸, ۳۱۰, ۳۱۳, ۳۱۴, ۳۱۶, ۳۱۵, ۳۱۷, ۳۲۰, ۳۲۳, ۳۲۴, ۳۲۷, ۳۲۹, ۳۳۰, ۳۳۱, ۳۴۳, ۳۵۳, ۳۵۴, ۳۵۵, ۳۵۹, ۳۶۰, ۳۶۸, ۳۶۹, ۳۷۰, ۳۷۱, ۳۷۳, ۳۷۴, ۳۷۶, ۳۷۷, ۳۷۸, ۳۸۰, ۳۸۱, ۳۸۶, ۳۸۷, ۴۱۰, ۴۲۹, ۴۳۹, ۴۴۵, ۴۴۶, ۴۴۷, ۴۴۸, ۴۵۳, ۴۶۵, ۴۶۶, ۴۶۹, ۴۷۰, ۴۷۲, ۴۷۳, ۴۷۴
سلول‌های HEK293, ز, غ, ۲۴۶, ۲۴۷, ۲۴۸, ۲۴۹, ۲۵۷, ۲۶۳, ۲۶۴, ۲۶۷, ۲۶۹, ۲۷۴, ۲۷۷, ۲۷۸, ۲۸۱, ۲۸۷, ۲۹۵, ۲۹۶, ۲۹۷, ۳۰۱, ۳۰۷, ۳۰۹, ۳۱۳, ۳۱۷, ۳۲۰, ۳۲۱, ۳۲۷, ۳۳۱, ۳۴۳, ۳۶۸, ۳۷۳, ۳۷۴, ۳۸۰, ۳۸۶, ۴۲۸, ۴۲۹, ۴۳۰, ۴۳۱, ۴۳۲, ۴۳۳, ۴۳۴, ۴۳۵, ۴۴۰, ۴۴۱
سلول‌های باکتریایی, ۳۳, ۶۵, ۷۰, ۸۱, ۸۴, ۱۵۱, ۱۵۲, ۱۵۷, ۲۷۸, ۳۶۱
سلول‌های پستانداران, ج, خ, ر, ص, ل, ۲۴۷, ۲۴۸, ۲۴۹, ۲۵۱, ۲۶۳, ۲۶۴, ۲۶۶, ۲۶۸, ۲۷۸, ۲۸۱, ۲۹۵, ۲۹۶, ۲۹۷, ۳۰۱, ۳۰۹, ۳۱۳, ۳۲۷, ۳۳۶, ۳۳۷, ۳۸۷, ۳۹۷, ۴۲۸, ۴۶۶
سلول‌های پیر ۲۴۹
سلول‌های ترادیدی شده, ۶۷, ۷۳, ۷۴, ۷۸, ۸۲, ۸۷, ۹۰, ۹۱, ۹۳, ۹۴, ۹۹, ۱۰۷, ۲۵۰, ۳۳۷, ۳۵۸, ۳۶۰, ۳۶۴, ۳۶۷, ۴۳۹
سلول‌های شبه لنفوبلاست ۲۵۲

۳۸۶, ۳۸۷, ۳۹۲, ۳۹۳, ۳۹۹, ۴۱۰, ۴۲۵, ۴۲۶, ۴۲۷, ۴۴۵, ۴۵۰, ۴۵۲, ۴۵۳, ۴۵۴, ۴۵۸, ۴۶۲, ۴۶۸, ۴۶۹, ۴۷۴, ۴۷۵
ژن‌های کشنده ۳۳۲
ژن‌های مرتبط با CRISPR ۳۰۹
ژنومی, ۲۰۱, ۳۳۲, ۳۳۵, ۳۳۸, ۳۴۰, ۳۴۱, ۳۴۳, ۳۷۸, ۳۸۴, ۳۸۵, ۳۸۷, ۳۹۲

س

ساندویچ ژل ۱۳۷
ستون چرخشی, ۳۷, ۴۷, ۴۸, ۴۹, ۵۹, ۶۱, ۸۴, ۸۵, ۱۹۳, ۱۹۴, ۱۹۵, ۳۴۷, ۳۴۸, ۳۶۱, ۴۰۷, ۴۱۲, ۴۲۴, ۴۳۷, ۴۴۰, ۴۵۰, ۴۶۱
ستون‌ها غ, ۸۵, ۴۰۷, ۴۰۸, ۴۱۲, ۴۳۷
سرسمپلرف, ک, ۱۱, ۱۸, ۷۸, ۸۰, ۸۸, ۹۰, ۱۲۸, ۱۳۴, ۱۴۶, ۱۵۰, ۱۷۰, ۱۸۶, ۲۰۴, ۲۰۶, ۲۰۸, ۲۱۹, ۲۳۵, ۲۵۵, ۲۵۹, ۲۹۸, ۳۱۳, ۳۱۴, ۳۲۰, ۳۵۸, ۳۶۸, ۳۷۰, ۳۸۰, ۴۰۱, ۴۱۱, ۴۱۵, ۴۱۷, ۴۱۹, ۴۲۳, ۴۲۸, ۴۳۰, ۴۳۱, ۴۳۳

سرکوب بیان پروتئین EGFP به واسطه RNAi ۳۰۱, ۲۹۶, ۲۹۵, ۲۸۲
سرکوب ژن, ۲۷۷, ۲۸۵, ۳۰۷, ۳۲۲, ۳۳۰, ۳۳۳, ۳۸۵

سرم جنین گاوی ۴۲۸, ۲۵۰
سفاروز ۱۲۵, ۱۲۶, ۱۵۴, ۱۵۹, ۱۶۲, ۴۱۹
سلول پستانداران غیرانسانی ۳۳۸
سلول, ۲, ۳, ۲۳, ۲۴, ۳۳, ۶۹, ۱۰۱, ۱۲۲, ۱۳۵, ۱۴۱, ۱۸۰, ۱۸۱, ۱۸۷, ۱۹۳, ۲۰۱, ۲۵۰, ۲۵۸, ۲۵۹, ۲۶۰, ۲۶۲, ۲۶۶, ۲۶۷, ۲۸۳, ۳۰۲, ۳۰۳, ۳۰۴, ۳۰۵, ۳۱۴, ۳۱۵, ۳۱۶, ۳۲۰, ۳۲۸, ۳۲۹, ۳۳۳, ۳۳۸, ۳۵۱, ۳۶۹, ۳۷۱

طراحی sgRNA: ۳۳۲, ۳۳۳, ۳۳۴, ۳۳۸, ۳۵۰, ۳۷۷, ۴۷۱

طراحی ذره ز. ص. ۵, ۶, ۷, ۲۵, ۳۰, ۶۴, ۷۲, ۷۴, ۷۶, ۹۱, ۱۰۴, ۱۱۱, ۱۲۳, ۱۳۴, ۱۴۱, ۱۴۲, ۱۵۵, ۱۸۲, ۲۰۱, ۲۰۲, ۲۴۶, ۲۴۷, ۲۸۲, ۲۸۵, ۲۸۷, ۲۸۸, ۲۸۹, ۲۹۰, ۲۹۳, ۲۹۷, ۲۹۹, ۳۰۷, ۳۳۱, ۳۳۲, ۳۳۳, ۳۳۴, ۳۳۵, ۳۳۷, ۳۳۸, ۳۳۹, ۳۴۲, ۳۴۳, ۳۴۴, ۳۴۵, ۳۵۰, ۳۵۱, ۳۵۲, ۳۶۰, ۳۶۴, ۳۶۶, ۳۶۷, ۳۶۸, ۳۷۳, ۳۷۷, ۳۸۲, ۳۸۶, ۳۸۸, ۳۹۹, ۴۰۵, ۴۳۳, ۴۳۶, ۴۳۸, ۴۴۲, ۴۵۳, ۴۵۴, ۴۵۵, ۴۶۷, ۴۷۱

ظ

ظرفیت ستون ۱۵۵, ۱۶۲

ع

عروس دریایی ص. ظ. ۲, ۴۱, ۴۵۸
عصاره سلولی ۱۵۹, ۱۶۵, ۱۶۸, ۱۷۱, ۳۸۰, ۳۸۲, ۴۷۵, ۴۵۸, ۳۸۳

غ

غربالگری PCR ۷۵, ۷۶, ۹۸
غشاء QIAquick ۳۴۹

ف

فراصوت و انجماد - ذوب ۱۵۷
فراصوت ق. ۱۵۱, ۱۵۷, ۴۲۰
فرآیند اتصال ۷, ۳۰, ۶۳, ۶۵, ۳۵۱
فرآیند ص. ع. ق. ک. ۲, ۵, ۶, ۷, ۸, ۹, ۲۳, ۲۴, ۲۵, ۲۶, ۲۸, ۳۰, ۳۳, ۴۲, ۴۴, ۴۷, ۴۹, ۵۰, ۵۲, ۵۹, ۶۱, ۶۲, ۶۳, ۶۴, ۶۵, ۶۶, ۷۰, ۷۱, ۷۴, ۷۵, ۷۹, ۸۲, ۸۳, ۸۶, ۱۰۲, ۱۰۹, ۱۱۵, ۱۲۳, ۱۳۰, ۱۳۲, ۱۵۵, ۱۶۴, ۱۶۸, ۱۷۰, ۱۸۸, ۱۹۹, ۲۵۷, ۲۶۳, ۲۶۴, ۲۶۶, ۲۶۷, ۲۷۸, ۲۷۹, ۲۸۰, ۲۸۲, ۳۱۰, ۳۱۱, ۳۱۹, ۳۲۳

سلول‌های منتقل شده با وکتور CRISPR ۳۷۸
سلول‌های منتقل شده ۳۲۳, ۳۷۶, ۳۷۷, ۳۷۸, ۳۸۰, ۳۹۲, ۴۳۵

سنتز کننده ۴۲
سنجاق سری کوتاه (shRNA) ۲۸۵
سنجش پروتئین ۱۶۴, ۱۶۶, ۱۷۴, ۴۲۲, ۴۶۰
سنجش تشخیص ۳۸۵
سویه BL21(DE3) ۳۵۲, ۴۱۹, ۴۴۵
سویه میزبان ۳۹۸, ۳۹۹, ۴۱۱, ۴۴۵
سویه‌های میزبان ۳۹۸
سیتوپلاسم ۲۶۵, ۲۷۴, ۲۸۴
سیستم‌های خشک و نیمه‌خشک ۱۳۶

ش

شکستگی تک‌رشته‌ای ۵۰
شکستگی‌های دو رشته‌ای (DSBs) ۳۰۹
شمارش و پلیت کردن سلول‌های پستانداران بیان کننده EGFP ۲۹۶, ۳۶۸
شمارش ۷۷, ۷۸, ۷۹, ۲۲۴, ۲۵۷, ۲۵۹, ۲۹۶, ۳۰۹, ۳۱۴, ۳۱۵, ۳۵۸, ۳۶۸, ۳۷۰, ۳۷۱, ۴۱۱, ۴۳۲, ۴۳۹, ۴۴۷, ۴۷۴

شیوه‌نامه تخلیص ۱۵۵
شیوه‌نامه ج. ۷, ۸, ۹, ۱۳, ۱۷, ۱۸, ۲۳, ۳۴, ۳۵, ۳۶, ۴۷, ۴۸, ۵۵, ۶۰, ۶۱, ۶۷, ۶۸, ۶۹, ۸۳, ۱۳۲, ۱۳۳, ۱۵۵, ۱۶۸, ۱۷۴, ۲۰۴, ۲۰۷, ۲۶۷, ۲۸۷, ۲۹۷, ۳۱۹, ۳۴۷, ۳۶۰, ۳۷۳, ۴۱۰, ۴۱۲, ۴۵۳

ص

صحت عملکرد بالا ۳۶

ض

ضایعات باکتریایی ۴۰۰
ضایعات ۲۳, ۴۰۰, ۴۰۱, ۴۱۱

ط

کروماتوگرام ۱۰۳, ۱۰۴, ۱۰۹, ۱۱۰, ۱۱۱, ۱۱۲, ۱۱۳, ۱۱۴, ۱۱۵, ۱۱۶, ۱۱۷, ۱۱۹, ۳۶۶, ۴۱۴, ۴۴۰, ۴۵۵

کسر ۱۵۸
کشت بافت ۲۴۹, ۲۵۲, ۲۵۶, ۲۶۲, ۲۷۴
کشت ج.خ.ذ.ر.ص.ع.ق.ل.۲, ۱۱, ۳۳, ۷۰, ۷۵, ۷۹, ۸۰, ۸۱, ۸۳, ۸۴, ۸۸, ۱۲۲, ۱۲۸, ۱۳۲, ۱۴۹, ۱۵۲, ۱۵۳, ۱۵۶, ۱۸۶, ۱۹۲, ۱۹۳, ۲۴۶, ۲۴۷, ۲۴۸, ۲۴۹, ۲۵۰, ۲۵۱, ۲۵۲, ۲۵۴, ۲۵۶, ۲۵۷, ۲۶۲, ۲۶۶, ۲۶۷, ۲۷۴, ۲۸۰, ۲۹۶, ۲۹۷, ۳۰۹, ۳۱۳, ۳۱۶, ۳۲۰, ۳۲۳, ۳۲۴, ۳۵۸, ۳۵۹, ۳۶۱, ۳۶۸, ۳۶۹, ۳۷۴, ۳۷۸, ۳۸۰, ۴۰۰, ۴۰۳, ۴۰۶, ۴۱۱, ۴۱۵, ۴۱۹, ۴۲۳, ۴۲۸, ۴۲۹, ۴۳۲, ۴۳۴, ۴۳۹, ۴۴۰, ۴۴۲, ۴۴۵, ۴۴۶, ۴۶۵, ۴۶۶, ۴۶۸, ۴۷۴
کلون کردن با PCR.....ظ. ۴۱, ۴۴, ۱۰۱, ۳۳۷
کلون کردن خ.ر.ظ. ۲, ۳, ۵, ۷, ۸, ۲۵, ۲۸, ۲۹, ۴۱, ۴۴, ۴۵, ۴۷, ۵۲, ۵۵, ۵۹, ۶۱, ۶۲, ۷۴, ۷۵, ۹۴, ۱۰۱, ۱۰۹, ۱۱۳, ۱۲۲, ۳۳۷, ۳۶۶, ۳۹۹, ۴۳۸, ۴۷۱

کلون مثبت ۷۴, ۱۰۹, ۱۱۹, ۱۲۸, ۱۴۷, ۱۵۰, ۱۸۰, ۱۸۶, ۲۰۷, ۲۲۷, ۲۳۵, ۳۶۰, ۴۱۹, ۴۵۴
کلونینگ ۲۵, ۲۷, ۲۹, ۳۰, ۳۱, ۸۶, ۱۵۳
کمیت نسبی ۲۲۸
کمی سازی مطلق ۲۲۵
کمی سازی نسبی ۲۲۶, ۲۲۵
کمی سازی ۱۶۷, ۱۸۰, ۱۹۵, ۲۰۱, ۲۷۱, ۳۲۷
کنترل ترادیدی ۴۴۷
کیت QIAGEN QIAprep Spin Miniprep ۴۰۷, ۴۱۲, ۴۳۹, ۴۴۰
کیت RNeasy Protect Bacteria Mini Kit ۱۹۲
کیت تخلیص QIAGEN QIAquick PCR ۴۷

۳۳۱, ۳۳۲, ۳۳۳, ۳۳۷, ۳۳۹, ۳۴۵, ۳۵۱, ۳۵۲, ۳۵۴, ۳۵۶, ۳۶۰, ۳۶۱, ۳۶۶, ۳۷۳, ۳۷۴, ۳۷۸, ۳۸۱, ۳۸۵, ۳۸۶, ۳۸۷, ۴۰۰, ۴۱۱, ۴۴۵, ۴۴۵
فسفوریلایسیون ۳۵۲
فعالیت ستارهای ۳۶, ۳۸
فعالیت ث.ف. ۳, ۲۸, ۳۵, ۳۶, ۳۸, ۴۳, ۴۴, ۶۰, ۶۳, ۱۰۱, ۱۲۳, ۱۴۵, ۲۸۳, ۳۱۰, ۳۳۳, ۳۴۱, ۳۴۵, ۳۴۵, ۴۲۰, ۴۷۱
فلورسانس ظ. ۴۱, ۵۱, ۷۲, ۷۴, ۷۷, ۸۱, ۸۳, ۹۰, ۹۹, ۱۰۳, ۱۰۷, ۱۰۸, ۱۴۱, ۱۵۹, ۱۶۰, ۱۶۱, ۱۶۴, ۱۶۵, ۱۶۶, ۱۶۸, ۱۷۰, ۱۷۱, ۱۷۳, ۱۷۷, ۲۰۱, ۲۰۳, ۲۰۴, ۲۱۹, ۲۲۳, ۲۲۴, ۲۲۷, ۲۳۳, ۲۳۴, ۲۳۶, ۲۶۳, ۲۶۹, ۲۷۱, ۲۷۲, ۲۷۳, ۲۷۴, ۲۷۵, ۲۷۶, ۲۷۷, ۲۸۰, ۲۸۱, ۲۹۷, ۲۹۹, ۳۰۱, ۳۰۲, ۳۰۳, ۳۰۴, ۳۰۶, ۳۲۴, ۳۲۷, ۳۲۸, ۳۲۹, ۳۳۰, ۳۳۱, ۳۹۶, ۳۹۷, ۴۲۱, ۴۲۲, ۴۳۴, ۴۵۱, ۴۵۸, ۴۶۱, ۴۶۶, ۴۶۷, ۴۶۸, ۴۶۹, ۴۷۱
فلورسنت سبزر. س. ص. ۲, ۴۱, ۷۸, ۹۰, ۹۹, ۱۰۰, ۳۲۲, ۴۱۳
فناوری ج.خ.ذ. ۳۶, ۱۰۱, ۳۰۷, ۳۰۹, ۳۱۰, ۳۳۱, ۳۳۲, ۳۵۸, ۳۸۷

ق

قبرستان باکتریایی ۱۵۶, ۴۰۰

ک

کانامایسین ۲۷, ۳۳, ۶۵, ۷۰, ۷۲, ۹۰, ۳۹۹, ۴۰۳, ۴۰۴, ۴۰۶, ۴۰۷, ۴۱۶, ۴۲۴, ۴۷۳
کدون آغاز ترجمه ۲۶
کروماتوگرافی میل ترکیبی ۱۲۲, ۱۴۹, ۱۵۱, ۱۵۲, ۱۵۳, ۱۵۴, ۱۵۹, ۱۶۰, ۱۶۲, ۱۶۷, ۴۵۹
کروماتوگرام توالی pBIT ۱۱۰

محصولات PCR دو رشته‌ای ۳۸۵
محصولات خ. س، ۲، ۴۵، ۵۷، ۶۱، ۶۳، ۶۷، ۷۰، ۸۲، ۸۹، ۱۲۲، ۲۰۱، ۲۰۳، ۲۳۴، ۲۴۰، ۳۴۵، ۳۸۵، ۳۸۷، ۳۸۸، ۳۸۹، ۳۹۰، ۴۵۱، ۴۷۶

محل اتصال ریبوزوم ۲۵
محلول استوک کلروفتول ۴۱۸
محلول تریپسین EDTA ۴۲۹، ۴۳۴، ۴۳۵، ۴۴۰، ۴۴۲

محیط Dulbecco's Modified Eagle's
Medium ۳۶۹، ۲۵۷
محیط رشد کامل ۲۵۷، ۲۵۸، ۲۹۶، ۳۱۳، ۳۱۴، ۳۶۹، ۳۷۰

مرحله ج. ذ، ۱۷، ۲۴، ۲۵، ۳۳، ۳۶، ۴۶، ۴۷، ۴۹، ۶۰، ۶۱، ۶۳، ۶۷، ۶۸، ۶۹، ۷۰، ۷۹، ۸۰، ۸۳، ۸۴، ۸۷، ۸۹، ۹۰، ۹۷، ۱۰۱، ۱۱۶، ۱۲۵، ۱۲۸، ۱۳۰، ۱۳۳، ۱۳۵، ۱۳۷، ۱۴۲، ۱۴۴، ۱۵۱، ۱۵۷، ۱۶۰، ۱۶۱، ۱۶۹، ۱۷۵، ۱۸۰، ۱۸۷، ۱۸۸، ۱۹۰، ۱۹۲، ۱۹۳، ۱۹۴، ۱۹۵، ۱۹۹، ۲۰۰، ۲۰۴، ۲۰۵، ۲۰۸، ۲۲۰، ۲۲۳، ۲۲۵، ۲۲۶، ۲۲۷، ۲۲۹، ۲۳۳، ۲۳۴، ۲۳۵، ۲۳۷، ۲۴۶، ۲۴۷، ۲۴۲، ۲۶۳، ۲۸۳، ۳۰۹، ۳۱۶، ۳۲۳، ۳۴۳، ۳۴۴، ۳۴۵، ۳۵۱، ۳۶۱، ۳۸۰، ۳۸۱، ۳۸۳، ۳۸۹، ۳۹۰، ۴۰۱، ۴۲۶، ۴۴۶، ۴۵۶، ۴۶۱، ۴۶۲، ۴۶۳

مستر میکس ۸۷، ۸۸، ۹۴، ۹۵، ۲۰۵، ۲۰۶، ۲۰۸، ۲۱۹، ۲۳۶، ۲۳۷، ۲۸۲، ۲۸۳، ۴۱۲، ۴۵۴، ۴۶۲، ۴۶۳

مسدود کردن ۴۵۷، ۱۴۴
مسیر ۸۲، ۲۴۰، ۲۴۷، ۲۵۵، ۲۵۹، ۲۷۵، ۲۷۶، ۲۸۲، ۲۸۳، ۲۸۴، ۳۰۹، ۳۱۴، ۳۲۷، ۳۳۱، ۳۷۰، ۳۷۳، ۳۸۶، ۴۷۰

معرف استخراج پروتئین باکتریایی، B ۱۵۸
معرف استخراج پروتئین باکتریایی، B-PER ۱۵۸

کیت سنتز cDNA انتخابی Bio-Rad iScript
۴۲۶، ۴۲۵

گ

گالاکتوزیداز ۲۷، ۲۵
گاما گلوبولین گاوی ۱۷۴، ۱۶۷
گروه هیدروکسیل ۳' ۱۰۲
گلوکاتیون س، ۱۲۵، ۱۴۹، ۱۵۱، ۱۵۳، ۱۵۴، ۱۵۵، ۱۵۹، ۱۶۰، ۱۶۱، ۱۶۲، ۱۶۸، ۳۹۶، ۴۱۹، ۴۲۰، ۴۲۱، ۴۵۸، ۴۵۹

گلوکاتیون-S-ترانسفراز (GST) ۱۵۱

ل

لایز قلیایی ۴۵۳، ۵۱، ۴۰
لایز کردن ۱۵۱، ۱۴۰، ۱۳۲
لایز و استخراج ۳۸۰
لومینسانس شیمیایی بهبود یافته ۱۴۶
لیپوزوم مصنوعی ۲۶۴
لیپید-کاتیونی ۲۶۴
لیگاز باکتریوفاژ T4 ۶۳
لیگاز ط، ۶۳، ۶۴، ۶۵، ۶۷، ۷۰، ۷۱، ۷۲، ۳۵۴، ۳۵۶، ۴۱۰، ۴۳۸، ۴۵۲، ۴۶۱، ۴۷۰، ۴۷۲، ۴۷۳
لیگاسیون ۴۷، ۵۹، ۶۱، ۶۲، ۶۳، ۶۴، ۶۵، ۶۶، ۶۷، ۶۸، ۷۰، ۷۱، ۷۲، ۷۸، ۸۰، ۸۱، ۸۲، ۸۸، ۳۱۰، ۳۵۱، ۳۵۲، ۳۵۳، ۳۵۴، ۳۵۵، ۳۵۶، ۳۵۸، ۴۱۰، ۴۵۱

لیگاند زیست اختصاصی رزین میل ترکیبی ۱۵۵

م

محاسبات ۳۹۱، ۲۲۹، ۱۹۵، ۱۷۳، ۶۲، ۹
محاسبه کمیت نسبی ۲۲۹، ۲۲۷
محصول PCR ۴۵، ۴۶، ۴۷، ۵۵، ۵۹، ۶۰، ۶۱، ۶۲، ۸۶، ۸۷، ۹۱، ۱۰۱، ۱۰۸، ۱۸۰، ۱۹۹، ۲۴۰، ۳۴۳، ۳۷۸، ۳۸۴، ۳۸۸، ۳۸۹، ۴۴۲، ۴۵۰، ۴۵۱، ۴۵۴

نوکلئاز Cas9..... ۳۷۳
 نوکلئوتید BLAST..... ۴۷۴, ۴۷۱, ۳۶۷
 نوکلئوتید اولیه در یک کروماتوگرام..... ۱۱۰
 نوکلئوتیدها..... ۴۵۵, ۳۷۸, ۳۳۴, ۳۱۰, ۱۱۳, ۹۸
 نوکلئوتیدهای مبهم..... ۱۱۵
 نیتروسولولز..... ۱۳۷, ۱۳۶, ۱۳۵, ۱۳۰, ۱۲۷, ۲۰, ۱۳۹, ۱۳۸, ۴۵۷, ۴۱۶, ۴۰۶, ۱۴۱

ه

هسته..... ۲۸۴, ۲۶۵, ۲۵۱, ک
 هضم DNase..... ۱۹۴, ۱۹۱, ۱۹۰, ۱۸۸, ۱۸۳
 هضم آنزیمی..... ۳۹۰, ۹۵
 هضم محدود کننده..... ۸۲, ۷۵, ۶۵, ۶۱, ۶۰, ۵۹, ۳۷
 ۸۸, ۱۰۷, ۱۰۸, ۴۱۳, ۴۳۷, ۴۴۹, ۴۵۰, ۴۵۳
 هضم و تخلیص..... ۶۱
 هضم یا لایز قلیایی..... ۲۳
 هضم ظ, ل, ۵, ۷, ۲۳, ۲۴, ۲۹, ۳۲, ۳۵, ۳۶, ۳۷, ۳۹, ۴۶, ۴۷, ۴۸, ۴۹, ۵۰, ۵۱, ۵۳, ۵۵, ۵۹, ۶۰, ۶۱, ۶۲, ۶۳, ۶۴, ۶۵, ۷۰, ۷۱, ۷۲, ۷۵, ۷۷, ۸۲, ۸۳, ۸۸, ۹۰, ۹۳, ۹۴, ۹۵, ۹۷, ۱۰۶, ۱۰۷, ۱۰۸, ۱۸۳, ۱۸۸, ۱۹۰, ۱۹۱, ۱۹۴, ۱۹۵, ۳۳۴, ۳۳۵, ۳۳۷, ۳۴۵, ۳۴۶, ۳۴۷, ۳۵۱, ۳۵۲, ۳۵۳, ۳۶۰, ۳۶۶, ۳۹۰, ۳۹۱, ۴۰۶, ۴۰۷, ۴۰۹, ۴۱۰, ۴۱۳, ۴۱۴, ۴۳۷, ۴۳۹, ۴۴۴, ۴۴۹, ۴۵۰, ۴۵۱, ۴۵۲, ۴۵۳, ۴۵۴
 هضم‌های Miniprep..... ۹۸, ۹۷
 هماسیتومترها..... ۳۷۰, ۲۵۹
 هم‌ترازی توالی بین توالی ورودی و pBIT..... ۱۱۸
 هموژنایزر QIAshredder..... ۱۸۷
 هود لامینار..... ۲۹۷, ۲۶۸, ۲۶۷, ۲۵۶, ۲۵۴
 ۲۹۸, ۳۱۳, ۳۲۰, ۳۲۳, ۳۶۸, ۳۷۴, ۳۷۶
 ۳۸۰, ۴۲۸, ۴۳۱, ۴۳۳
 هورس‌رادی‌ش پراکسیداز..... ۱۴۳, ۱۴۲

مقایسه با کالبراتور..... ۲۲۷
 مکان کلونینگ چندگانه..... ۱۵۳
 مکان‌های محدود شونده..... ۹۴, ۵۹, ۴۶, ۴۵, ۴۴, ۲۵
 مکمل..... ۲۴, ۴۶, ۶۴, ۶۶, ۱۰۲, ۱۰۳, ۱۱۵, ۱۵۵
 ۱۶۴, ۱۶۵, ۱۸۰, ۱۸۱, ۱۸۸, ۱۹۹, ۲۸۲
 ۲۸۳, ۲۸۷, ۳۰۷, ۳۱۰, ۳۳۴, ۳۳۸, ۳۴۲
 ۳۵۱, ۳۶۶, ۳۸۵, ۳۹۰, ۴۶۱, ۴۶۴, ۴۶۷, ۴۷۵
 منابع, س, ۵۷, ۶۴, ۱۰۸, ۱۲۰, ۱۳۸, ۱۴۷, ۱۸۲
 ۲۰۴, ۲۲۷, ۲۳۱, ۲۳۴, ۲۵۲, ۲۷۲, ۲۷۴
 ۲۸۱, ۲۹۳, ۳۲۵, ۳۳۰, ۳۵۰, ۳۸۸, ۳۹۳, ۴۴۸
 منحنی ذوب..... ۲۰۴, ۲۰۳
 منطقه مورد نظر (ROI)..... ۳۲۹, ۳۰۳
 مولکول DNA..... ۴۲, ۴۴, ۴۷, ۵۱, ۶۳, ۶۹, ۱۰۹
 ۱۲۹, ۱۸۰, ۱۹۱, ۲۰۱, ۲۳۳, ۳۳۴, ۳۴۵
 میانگین فلورسانس CTCF..... ۳۲۹, ۳۰۴
 میکروسکوپ فلورسانس..... ۲۴۶, ۲۷۲, ۲۷۴, ۲۹۷
 ۳۲۷
 میکروسکوپ..... ۲۴۶, ۲۵۱, ۲۵۶, ۲۵۸, ۲۵۹, ۲۶۳
 ۲۶۷, ۲۶۹, ۲۷۱, ۲۷۲, ۲۷۴, ۲۷۵, ۲۷۹
 ۲۸۰, ۲۸۱, ۲۹۷, ۲۹۹, ۳۰۱, ۳۱۳, ۳۱۴
 ۳۲۰, ۳۲۴, ۳۲۷, ۳۳۱, ۳۷۰, ۳۷۴, ۳۸۰
 ۳۹۷, ۴۲۹, ۴۳۰, ۴۳۱, ۴۳۲, ۴۳۵, ۴۶۶, ۴۶۸

ن

نانودراپ..... ۳۴, ۶۰, ۶۱, ۳۴۹, ۳۶۲, ۳۹۶, ۴۰۹, ۴۲۵, ۴۴۹, ۴۵۱
 نرم‌افزار MyiQ..... ۲۲۷
 نقشه وکتور LentiCRISPR-E..... ۳۱۷, ۳۱۸
 ۳۳۶, ۳۶۴
 نمودار تکثیر..... ۴۶۲, ۲۲۴, ۲۲۳
 نور UV..... ۲۵, ۹۹, ۱۳۳, ۱۶۱, ۱۶۸, ۱۸۷, ۱۹۰
 ۱۹۱, ۳۴۷, ۳۸۹, ۴۵۳
 نورتن بلات..... ۱۹۹, ۱۸۸

هیگرومایسین ۲۷۸

و

واکنش زنجیره‌ای پلیمرازط، غ، ۴۱، ۴۳، ۴۴، ۵۵،

۴۰۸، ۲۳۳، ۱۰۱

واکنش کیناز ۳۵۶، ۳۵۲، ۳۵۱

واکنش‌های هضمی ۹۷، ۹۴، ۳۹

وبسایت BLOCK-iT RNAi ۲۸۷

وزن مولکولی ۷۰، ۸۲، ۸۳، ۱۲۵، ۱۲۹، ۱۳۱، ۱۳۶،

۱۴۲، ۱۴۴، ۱۴۶، ۱۶۸، ۱۸۷، ۱۸۸، ۳۸۱،

۴۶۰، ۴۵۷، ۴۱۵، ۳۸۲

وستر بلات، ع، ۸، ۱۲۲، ۱۲۳، ۱۲۴، ۱۲۷، ۱۲۹،

۱۳۰، ۱۳۱، ۱۳۲، ۱۳۵، ۱۴۰، ۱۴۱، ۱۴۲،

۱۴۳، ۱۴۴، ۱۸۷، ۲۹۳، ۳۸۵، ۳۸۸، ۴۱۵،

۴۶۸، ۴۵۷، ۴۱۷، ۴۱۶

وکتور CRISPR هضم شده با BsmBI ۳۳۴

وکتور pET-41a هضم شده ۷۲، ۵۳

وکتورها، ۷، ۲۵، ۳۱، ۶۶، ۱۲۴، ۳۱۷، ۳۱۹، ۳۵۱،

۳۵۸

وکتورهای بیانی پستانداران ۳۱۷

وکتورهای بیانی ۳۱۷، ۱۵۲، ۳۰، ۲۷، ۲۶، ۲۵

ویال میکرو سانتریفیوژ استریل ۴۳۰، ۶۹

ویرایش ژن *egfp* را از طریق سیستم CRISPR-

Cas9 ۳۰۹

ویرایش ژنوم هتروزیگوت ۳۸۷

University of Guilan Press

Molecular Biology Techniques

A classroom Laboratory Manual

Fourth Edition

By:

Susan Carson Heather B. Miller D. Scott Witherow Melissa C. Srougi

Translated by:

Majidreza Khoshkholgh, Ph. D

Mahdieh Rahbar, Ph. D Student