دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز

ورودی ۹۲

Genetics

ژنتیک

Professor دکتر منصوری

session جلسه ۱۰

scrivener آیلار صفری

500

PARS COPY
موسسه پارس کپی
ابتدای خیابان ایرانسل
۰۹۱۴ ۳۱۹ ۰۰۲۳

Subject:
Year. Month. Date. ( )

به نام خدا ژنتیک - جلسه 10

DMD...

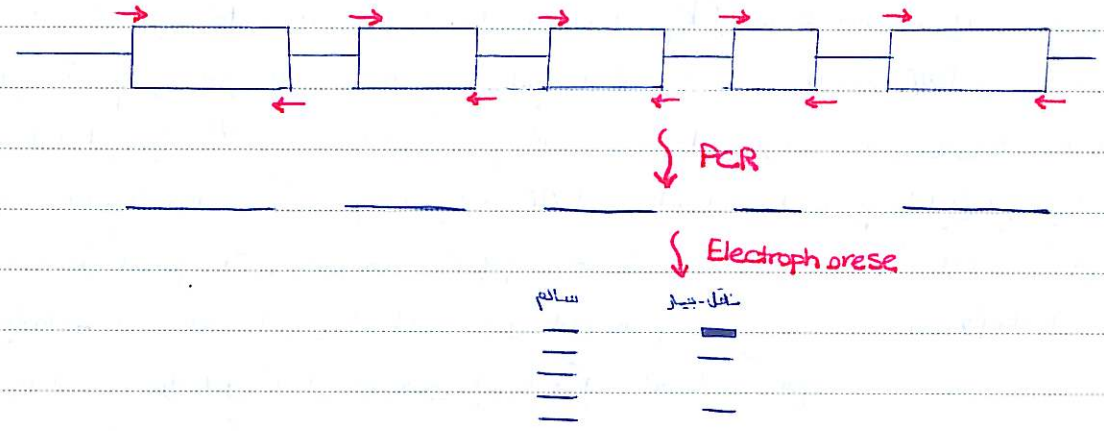
برای شناسایی ناقلین، که همون مادرها هستند، آنزیم Creatin kinase, CK را اندازه گیری می‌کنیم. این آنزیم در مواقعی که لیز عضلانی وجود داشته باشد، بالا می‌رود. علاوه بر DMD در بیماری‌هایی مثل سکته قلبی یا MI نیز مقدار این آنزیم بالا می‌رود. در کل مقدار این آنزیم وقتی که تخریب DNA وجود دارد بالا خواهد رفت. برگردیم به بیماری DMD، متاسفانه فقط تو ۲/۳ ناقلین این بیماری، حالت افزایش آنزیم CK رو داریم ⇐ روش دوم برای تشخیص ناقلین، روش آنالیز بیوشیمی - Linkage analysis - است که در این روش با خود جهش کاری نداریم و هدف شناسایی کروموزوم Xای است که دارای جهش است. برای این کار از مارکرهای پلی مورفیک استفاده می‌کنیم.

افراد مختلف جهت سکانس‌های متفاوتی در نواحی خاص نشان می‌دهند. این نواحی خاص در هر فرد متفاوت است، مثلاً در بعضی افراد C، بعضی‌ها A و بعضی‌ها G و بعضی‌ها T (منظور استاد سیتوزین، آدنین، گوانین و تیمین هست 😁) حالا سوال اینجاست که چطوری می‌تونیم از این جهش‌ها برای شناسایی افراد ناقل استفاده کنیم؟! ⇐ فرد بیمار رو مطالعه می‌کنیم، فرضاً سه تا پلی مورفیک رو می‌بینیم و چون بیمار فرد مذکر است و یک کروموزوم X را دارد، می‌دونیم در همان جایگاه پلی مورفیک این فرد G رو دارد. بعد خواهر (مثلاً) فرد بیمار رو بررسی می‌کنیم که ببینیم فرد ناقل هست یا نه، میان ۲ تا کروموزوم X خواهر رو بررسی می‌کنیم که مثل برادرش دارای G تو اون جایگاه پلی مورفیک باشه، ناقل هست ولی اگه مارکر متفاوت باشد یعنی اگه شونیم جایگاه پلی مورفیک مثل برادرش پیدا نکنیم، خواهر سالم هست.

پس این روش سند Linkage analysis که با خود mutation یا جهش کاری نداریم و می‌خوایم کروموزومی که حاوی اون جهش هست رو شناسایی کنیم و ببینیم آیا کروموزوم X جهش‌دار رو فرد به ارث برده یا نه! یعنی مواقع ما با خود موتاسیون کار داریم. اگه یادتون باشه ژن DMD ژن بزرگی بود و حدود ۷۲ تا اگزون داشت و موتاسیون‌ها در هر کدوم از این‌ها می‌تونست اتفاق بیفته. برای شناسایی موتاسیون واسه هر اگزون یک PCR مخصوص قرار می‌دیم و بعد الکتروفورز می‌کنیم که ببینیم آیا اون اگزون وجود داشته یعنی amplify شده یا نه، و از روی این قضیه می‌تونیم بگیم که موتاسیون کجای ژن قرار داشته! در سکانس صفحه بعد، مستطیل‌ها هر کدوم نشون دهنده ۱ اگزون و خط‌ها پرایمرهای رو نشون می‌ده (بعداً در مورد این روش‌ها مخصوصاً PCR صحبت خواهیم کرد ☺) جفت پرایمرها باعث تکثیر

روبروی دانشکده تغذیه 09143190023 صادقی

آلزون ها می‌شوند بعد الکتروفورز می‌کنیم. اگر آلزون داریم، استثنا داریم در مرد نرمال که باند DNA را روی ژل ببینیم درحالیکه در افرادی ممکن است بعضی باندها نباشد و نشان می‌دهد آلزون ها وجود نداشتند و ما توانستیم با موتاسیون هتق این فرد پی ببریم



یا لینکیج ای راجب Linkage analysis ← مارکرهای متفاوتی می‌شه استفاده کرد

ها RFLP

ها Microsattelite ← مناطقی در هسته های خاص کروموزوم‌ها که تکرار می‌شوند ← مثلاً C.A که بارتکرار می‌شود و در یک فرد دیگر ممکن است 6 بار تکرار شود و یا هر بار تکرار شود.

ها SNP (single nucleotide polymorphism) ← همون سوزنی که قبلا صحبت شد. یعنی در یک جایگاه حاص ، نوکلئوتید ها در افراد مختلف ممکن است متفاوت باشد.

پس این ها ناحیه های پلی مورف هستند که می‌توانیم کروموزم موتانت را شناسایی کنیم

درمان

گفتیم DMD بیماری است که تا ۲۰ سالگی فرد به مرحله مرگ می‌رسد. روش ① روشی Gene Therapy است که به صورت تحقیقاتی. کارمکنن وسعی می‌کنن ژن DMD روبه صورت لوجل میده داخل ویروس‌های ویروسی یا غیر ویروسی (بالازمیدها) قرار بدن و بعد این وکتور را وارد سلول های stemcell می‌کنن تا عملات این افراد کارکرد خود را از سر بگیرند

روش ② Cell Therapy روشی است که میو بلاست سالم از افراد سالم که HLA match هستند (یا stem cell ها) به داخل عضلات افراد بیمار تزریق می‌کنند و عضله اصلاح می‌شود

روبروی دانشکده تغذیه 09143190023 صادقی

Subject:
Year. Month. Date. ( )

③

در درمان های Pharmacobgical از آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی استفاده می کنند
یک داروی دیگر با نام PTC-124 وجود دارد که باعث می شود کدهشی وجود دارد ریبوزوم آن را نبیند و از روی آن بدون رد شود

از کلسیم هوستاز ها نیز می توان استفاده کرد. گفتیم که علت لیز شدن فیبرهای عضلانی این است که دیستروفین وجود ندارد و کلسیم وارد سلول می شود. با استفاده از کلسیم هوستازها می توان حالت لیز را کاهش داد.

از مواد ضد التهابی مثل Prednisone و Deflazacort استفاده نمیم

مواد افزایش دهنده قدرت عضلانی مثل IGF-1 و مهارکننده میوستاتین نیز قابل استفاده هستند

و یا می توان از داروهایی استفاده کرد که باعث افزایش بیان ژن Utrophin می شوند. این ماده درعضای سارکولم شبیه دیستروفین عمل می کند با افزایش Utrophin به مقدار کمبود دیستروفین جبران می شود.

هموفیلی

این بیماری خیلی شایع تر است و از دسته بیماری های وراثتی خونریزی دهنده است. شایع ترین نوع آن A و بعد نوع B است

بیماری Von willebrand جزو بیماری های وراثتی خونریزی دهنده است که این بیماری بر روی کروموزوم ۱۲ قرار دارد و غیر وابسته به جنس است.

درصورتیکه فاکتورهای مسیر انعقادی دچار مشکل شوند ممکن است یکسری بیماری های دیگر ایجاد کنند. پس بیماری های خونریزی دهنده وراثتی فقط محدود به هموفیلی نیستند اما شایع ترین نوع آن هموفیلی است.

هموفیلی A در اثر موتاسیون در ژن فاکتور VIII بوجود می آید و فراوانی آن ۱ در ۵۰۰۰ متولد پسر می باشد
هموفیلی B باعلت موتاسیون در فاکتور IX بوجود می آید و شیوع آن ۱ در ۴۰،۰۰۰ متولد پسر است و شیوع خیلی پایین تری نسبت به هموفیلی A دارد

از لحاظ علائم بالینی نمی توان این ۲ نوع هموفیلی را تشخیص داد زیرا علائم یکسان است

این بیماری بر روی کروموزوم X قرار دارد و شدت بیماری در افراد بیمار خانواده یکسان است (ممکن است متفاوت نباشد) در بعضی موارد پسر خانواده مبتلا به این بیماری است اما مادر دارای هیچ موتاسیون منفی موتاسیون به صورت جدید در خود فرد صورت گرفته است که 30٪ مواقع به این صورت است.

روبروی دانشکده تغذیه 09143190023 صادقی

موسسه پارس کپی 33359914

Subject:

Year. Month. Date. ( )

هموفیلی در زنان همتاس اتفاق می افتد که فرد یک عدد کروموزوم X داشته باشد (مبتلا به Turner) و یا پدر بیمار و مادر حامل باشد و یا حالتی بسیار نادر یعنی X- فرد یک بیماری دیگر دارد (VW) و به همین علت گاه بیماری خونریزی دهنده دیده می شود [این حالت برای بیماری های خونریزی دهنده است و مسائل هموفیلی بین نمی شود و خوب نیست مثالش رو اینجا بیاریم ---]

شدت بیماری به ۳ حالت است:

Severe ← در این حالت مقدار فاکتور ۸ کمتر از ۱٪ است و در ۴۰٪ افراد مبتلا است. دوران کودکی حتی بدون این که زمینه وجود بیاید خونریزی صورت می گیرد.

Moderate ← در این حالت مقدار فاکتور ۵-۱٪ است و در ۱۰٪ افراد مبتلا دیده می شود. مواقعی که ضربه کوچک باعث خونریزی زیرپوستی شود و یک زخم کوچک باعث خونریزی زیادی شود.

Mild ← مقدار فاکتور ۳۰-۵٪ است و بیشترین شیوع را دارد. ۵۰٪ در مواقعی که در جراحی ها یا کشیدن دندان خونریزی صورت گیرد.

برای تشخیص بیماری در ۷۰٪ مواقع از تاریخچه بیماری، علائم و تست های آزمایشگاهی استفاده می شود.

"علائم بیماری"

خونریزی های زیرپوستی، خونریزی در بافت های نرم (عضله، مفاصل و ...)

خونریزی در دستگاه ادراری و حتی در CNS نیز ممکن است صورت گیرد. زمانی که در افراد مبتلا به هموفیلی در سن کم ایجاد شود، و یا در گردن و داخل جمجمه باشد که حالت اورژانسی و خطرناک است.

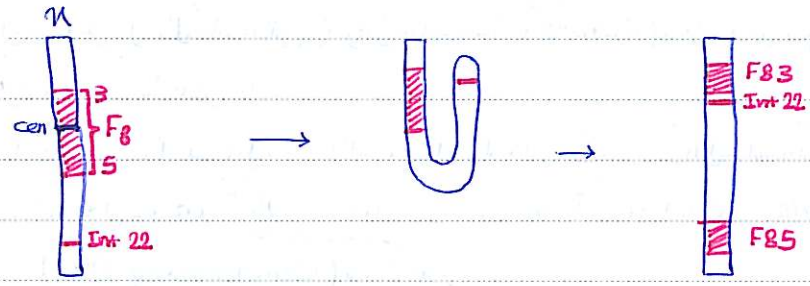
"از لحاظ ژنتیکی"

گفتیم که معمولاً موتاسیون در فاکتور VIII ایجاد شده است. نکته این جاست که دو نوع موتاسیونی می گیریم. مثلاً گفتیم در تالاسمی دو نوع موتاسیون نقطه ای و در DMD دو نوع حذف های بزرگ می گیریم. شایع ترین حالت موتاسیون به همون دو نوع شدید inversion هاهستند یعنی یکی از قطعات کروموزوم X دچار وارونگی شده است. در حدود ۵٪ موارد deletion نیز وجود دارد. حالت Hissence (عوض شدن یک نوکلئوتید = عوض شدن کدون) و non-sense نیز مشاهده می شود. ولی گفتیم که بیشتر همان inversion هامی گیریم.

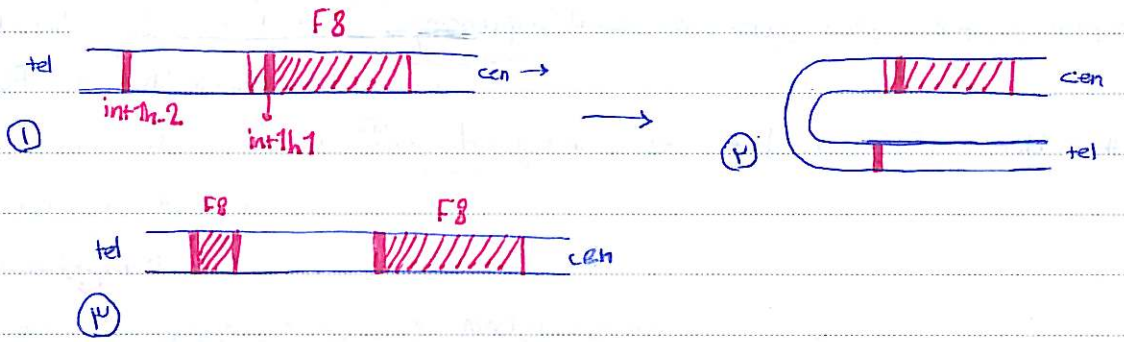
روبروی دانشکده تغذیه 09143190023 صادقی

Subject:
Year. Month. Date. ( )

۴ مرحله در inversion صورت می‌گیرد که شایع‌ترین آن در داخل اینترون ۲۲ است. در شکل یک ناحیه هالتور ۸ قرار دارد و در یک ناحیه اینترون ۲۲ قرار دارد. در اینترون ۲۲ حدود ۱۰۰-۲۰۰ نوکلئوتید وجود دارد که کاملاً شبیه هستی است که F8 قرار دارد. DNA همانیتی دارد که به‌دنبال مکمل است و به‌دلیل همین هموتوزی خم‌شدگی در DNA صورت می‌گیرد و وقتی که کنار هم قرار گرفتند قطعات را با هم عوض می‌کنند یعنی بخشی از هالتور ۸ در انتها قرار می‌گیرد یعنی بین توالی‌ها فاصله می‌افتد. به‌این حالت F8 Intron 22 Inversion گفته می‌شود



یک inversion خفیف‌تر نیز وجود دارد که F8 Intron 1 Inversion نامیده می‌شود. دوباره به‌علت خم‌شدگی ممکن است کراسینگ اور صورت بگیرد و باز هم inversion رخ دهد.



آنالیزهایی که صورت می‌گیرد مثلاً PND یا ازنوعی است که خود موتاسیون را مستقیماً در خلر بلیرم و یا به حالت Linkage analysis افراد بیمار را از روی افراد سالم خانواده تشخیص بدهیم که فرد حامل کروموزوم mutant است یا نه. در روش PCR ۳۵ عدد PCR لازم است برای آنزون هالتور ۸ و برای هالتور ۹، ۱۰ تا ۱۸ PCR کافیست

سایت HAMSTERS دارای تمامی اطلاعات مربوط به‌جهش‌های هالتور ۸ است.

موسسه پارس کپی 33359914

Subject:
Year. Month. Date. ( )

حالا میرسیم به مطالب جلسه ما (تا این جا ادامه جلسه ما بود ☺)

«روش های ژنتیکی یا مولکولی هستند و یا سلولی»

روش های سلولی (مثل کاریوتایپ) روش هایی هستند که کروموزوم ها را می بینیم و اختلالاتی مثل سندرم Turner و داون را می توان تشخیص داد.

برای بیماری هایی مثل هموفیلی، تالاسمی ها باید از روش های مولکولی استفاده کنیم. در این روش ها اولین کار این است که از نمونه فرد DNA (1) را استخراج می کنیم. بعضاً ممکن است RNA را استخراج کرده و از روی آن CDNA (Complementary DNA) سنتز کنیم

یکی از شایع ترین روش های مورد استفاده (بعد از استخراج DNA) PCR (2) است که خود آن انواع مختلفی دارد

PCR - RFLP که از آنزیم ها برروی محصول PCR استفاده می کنیم

ARMS-PCR

Real time-PCR

یک روش بسیار خوب دیگر، روش Sequencing (3) است. یعنی تعیین توالی می کنیم و می فهمیم هر جهش PCR توالی نوکلئوتیدها چه جوری است.

روش بعدی برای تشخیص مولکولی Hybridization (4) است که Southern blot و Northern blot جزو این دسته هستند.

(1) استخراج DNA

می خواهیم ببینیم از چه نمونه هایی می توان DNA را استخراج کرد؟

خون کامل ← خونی که از رگ گرفته شود

بافت های جامد ← پوست، کبد، کلیه و...

سرم و پلاسما ← DNA آزاد در این مایع وجود دارد (اما روش معمول نیست چون مقدار DNA بسیار کم است)

ادرار ← سلول های مجاری ادراری می ریزند و داخل ادرار می ریزند

مغز استخوان ← پیش ساز سلول است

در دسترس ترین حالت، استفاده از خون کامل است. حدود ۵-۱ خون کافیست (حتی احتیاج به هم نیست!)

P4PCO

روبروی دانشکده تغذیه 09143190023 صادقی

موسسه پارس کپی 33359914

Subject:
Year. Month. Date. ( )

البته این خون حتماً باید در لوله‌های حاوی EDTA یا ACD (سیتراته) باشد. یکسری لوله‌های هپارینه نیز داریم که از این‌ها اصلاً نباید در این مورد استفاده کنیم چون هپارین اجازه نمی‌دهد که آنزیم‌های بعدی به‌درستی عمل کنند. از لوله‌های هپارینه در کاریوتایپ استفاده می‌شود.

برای انتقال لازم نیست که حتماً سلول‌ها را فریز کنیم. دمای ۴ تا ۲۵ مناسب است. برای نگهداری می‌توان در ۲۰- آن را فریز کنیم.

اولین مرحله برای استخراج DNA، سانتریفیوژ است زیرا همانطور که گفتیم buffy coat است و RBC و... به‌دردمان نمی‌خورند چون هسته ندارند و از طرفی دیگر هم موجود در هموگلوبین سلول‌ها را عمل می‌کند و مانع عملکرد آنزیم‌ها می‌شود.

یک ماده لیز کننده به بافت اضافه می‌کنیم. چون می‌دانیم که سلول و هسته دارای غشا هستند و این‌ها باید شکسته بشوند تا DNA موجود در هسته بیرون بریزد. بعد از این مرحله پروتئازها را اضافه می‌کنیم تا پروتئین‌ها به همراه هیستون‌ها که روی DNA سوار گرفته‌اند، هضم شوند و DNA آزاد شود. حالا که به این مرحله‌ای رسیدیم که DNA آزاد داریم الکل سرد همراه با کمی نمک ریخته و DNA به حالت جلد درمی‌آید و ما می‌توانیم با یک لوپ یا سیم آن را برداریم.

گاهاً می‌خواهیم به‌جای DNA، RNA را جدا کنیم که روش جداسازی آن هم مشابه جداسازی DNA است. فقط نکته‌ای که وجود دارد این است که DNA در تمامی سلول‌ها چه سلول خونی، مغزی، کبدی و... یکسان است. ولی RNA متفاوت است یعنی سلول کبدی یک نوع RNA، مغزی یک نوع و سلول خونی یک جور RNA دیگر دارد. مثلاً اگر دنبال RNA پروتئین‌ساز می‌گردیم فقط می‌توانیم در ریبوزوم‌ها پیدا کنیم پس باید نسبت به بافت عمل کنیم.

مثل را اضافه می‌کنیم و بعد ۵ دقیقه اضافه می‌شود تا مثل جذب شود و دوباره با ریختن الکل سرد RNA را جدا می‌کنیم (بعد از ریختن مثل و انجام shaking ۲ دقیقه ایجاد می‌شود فاز آلی و غیرآلی که ما می‌توانیم از فاز آلی RNA را استخراج کنیم. اگر بخواهیم mRNA را استخراج کنیم باید از یک ستون oligo-dT استفاده کنیم که فقط از T تشکیل شده است چون در mRNA ها A وجود دارد پس می‌توان با این روش mRNA را به حالت خالص بدست بیاوریم. حالا که روی RNA بدست آمده آنزیم Reverse transcriptase بریزیم، cDNA ساخته خواهد شد

بعد استخراج DNA به حالت جامد همیشه آن را داخل مایع حل می‌کند و به حالت مایع نگهداری می‌کنند بعد حل کردن DNA دیده می‌شود برای دیده شدن آن ژل هایی با چاهک درست می‌کنند و DNA را داخل این چاهک می‌ریزیم و آن را در فیلد الکتریکی قرار می‌دهند و اجازه می‌دهیم الکترون‌ها حرکت کنند. جداسازی براساس اندازه صورت می‌گیرد و ما باندهای مختلفی می‌بینیم که هرکدام DNA است بعد

PaPCO

روبروی دانشکده تغذیه 09143190023 صادقی

موسسه پارس کپی 33359914

Subject:

Year. Month. Date. ( )

آن ماده‌ای مثل اتیدیوم بروماید اضافه می‌شود که وقتی نور UV به آن تابانده شود (چون به DNA ها چسبیده است) نور سرخی ساطع می‌کند و ما DNA را به رنگ مدوری بفش می‌بینیم.

برای کارهای تشخیصی مراحل دیگری هم باید انجام دهیم

یکی از این کارها بریدن این قطعات است یا می‌توانیم بگوییم از آنزیم‌های restriction endonuclease استفاده می‌کنیم یعنی نوکلئوتیدها را داخل DNA می‌برد (endo) این آنزیم‌ها از داخل باکتری‌ها پیدا شده‌اند باکتری‌ها با استفاده از این آنزیم‌ها از ورود باکتریوفاژها جلوگیری می‌کردند (restriction)

با استفاده از این آنزیم‌ها ① Fragment های مختلفی بدست می‌آوریم. یکی از استفاده‌ها از این Fragment ها برای DNA fingerprinting ② است که در تشخیص عوامل جنایی و paternity (پدربودن) از آن استفاده می‌شود

استفاده دیگر از این قطعات، برای تکنولوژی نوترکیب ③ DNA است. بعد کشف این آنزیم‌ها دیدند که کلونینگ ابداع شد. مثلاً این که ژن انسولین و پلاسمید را ببریم و بهم بچسبانیم و وارد باکتری کنیم تا باکتری برای ما انسولین تولید کند. تمام پروتئین‌های نوترکیب با این تکنولوژی تولید می‌شوند

④ برای مطالعه ژن‌های پلی مورفیسم (مثلاً در Linkage analysis) و یا برای تشخیص بیماری‌ها استفاده کنیم مثلاً در بیماری آنمی داسی شکل GAG به GTG تبدیل شده است آنزیم درصورت GAG بودن می‌برد ولی اگر GTG باشد بریده نمی‌شود و توانستیم بیماری را تشخیص دهیم. در تشخیص ⑤ Prenatal نیز مورد است یعنی از سلول‌های جنینی استفاده کنیم و تمام این اعمال را روی آن انجام دهیم.

این آنزیم‌ها که از باکتری‌ها استخراج می‌شوند هرکدام اسامی دارند مثلاً EcoRI که فقط توالی خاص GAATTC را می‌تواند ببرد. بعد از برش ۲ انتهای چسبنده ایجاد می‌شود. چون پلیمریزاسیون رشته‌ای است چسبنده گفته می‌شود این انتهای چسبنده هرجا یک رشته‌ای دیگر بیاید سریعاً می‌چسبد و باند هیدروژنی تشکیل می‌دهد به این توالی‌ها گفتیم که Sticky end گفته می‌شود. درمقابل این آنزیم‌هایی داریم که جایگاه‌ها را بطحائی می‌برند که blunt end ایجاد می‌شود

به این توالی‌ها توالی‌های palindromic گفته می‌شود زیرا GAA است و در ادامه معکوس و برعکس است یعنی TTC، پس در توالی‌های پالیندرون که ۳ تا نوکلئوتید اول را داشته باشیم، ۳تای بعدی را هم تشخیص می‌دهیم

5'- GAATTC -3'
3'- CTTAAG -5'

→

5'- G AATTC -3'
3'- CTTAA G -5'

↓
sticky ends
= staggered ends

روبروی دانشکده تغذیه 09143190023 صادقی

Subject:
Year. Month. Date. ( )

در blunt end توانی از وسط بریده می شود

5'-GAATTC-3' → 5'-GAA TTC-3'
3'-CTTAAG-5' → 3'-CTT AAG-5'

Amplification

۲روش تقسیم برای DNA وجود دارد:

۱- cell based method (cloning) ۲- PCR

cell based method

در این روش به آنزیم های restriction ، آنزیم لیگاز ، ناقل و یک میزبان مانند زنده مثل E.coli نیاز داریم.

انواع ناقل:

۱- پلازمید

مولکول های DNA حلقوی ۲رشته ای در باکتری هستند. در هر پلازمید یک قسمت مهم Origin of replication باید وجود داشته باشد زیرا پلازمید بصورت مستقل از تقسیم سلول باکتری و با حالت خودکار می تواند تکثیر پیدا کند که این کار توسط همین قسمت مهم صورت می گیرد

علاوه بر این باید دارای یک جایگاه قابل برش با آنزیم باشند.

بعد این که با آنزیم EcoRI برش دادیم و ژن مورد نظر را قرار دادیم و با آنزیم چسباندیم ، به این پلازمید نوترکیب یا recombinant گفته می شود

سایز ژنی که وارد می کنیم (insert) نباید بیشتر از 10 kb باشد (در مورد پلازمید اینطور است در انواع دیگر ناقل سایزهای بزرگتر ژن را نیز جای می گیرند)

مثل ← PBR 322 و PBR 3

۲- باکتریوفاژ

قسمت های غیر لازم ژنوم باکتریوفاژ را خارج کرده و ژن مورد نظر خودمان را وارد می کنیم و بعد مواد لازم برای باکتریوفاژ برای ساخت کپسید و ... را هم اضافه می کنیم تا بتواند داخل باکتری تکثیر پیدا کند. تا حدود 20kb را می تواند در خود جای دهد. مثل ← باکتریوفاژ Lambda

روبروی دانشکده تغذیه 09143190023 صادقی

موسسه پارس کپی 33359914

Subject:

Year. Month. Date. ( )

۳- Cosmid ها

ترکیبی از پلازمید و باکتریوفاژها هستند. یعنی هم دارای origin of replication و هم هستند cossite هستند. اگر آن ناحیه را از Lambda جدا کنیم و روی پلازمید قرار دهیم به این وکتور Cosmid گفته می‌شود که این وکتورها می‌توانند تا 50 kb insert را در خود جای دهند

۴- Yeast Artificial chromosome

از این وکتورها برای سایزهای بسیار بزرگ insert ها استفاده می‌شود 100-1000 kb

از بین همه این‌ها پلازمیدها بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند.

سوال؟ حضوری می‌فهمیم که باکتری حاوی پلازمید هست؟ باکتری‌ها را داخل محیطی می‌ریزیم که مثلاً نوعی آنتی بیوتیک آمپی سیلین در آن محیط ریخته‌ایم. باکتری‌هایی که پلازمید ندارند، می‌میرند زیرا آن مقاومت ندارند (آن مقاومت به آنتی بیوتیک بروی پلازمید باید باشد)

پس ابتدا آن مورد نظر و وکتور را باید آنزیم محدودکننده restriction ببریم تا انتهاهای چسبنده عین هم شوند. این ۲ را در لیگاز ریخته و آنزیم لیگاز اضافه می‌کنیم، مولکول recombinant ایجاد می‌شود. این مولکول را به داخل میکروارگانیسم می‌فرستیم تا آن مورد نظر تکثیر شود و با پاره کردن سلول باکتری آن را استخراج کنیم.

گاهاً بعضی باکتری‌ها عناصری دارند که می‌توانند از زنی که قرار داده‌ایم RNA بسازند و آن را به پروتئین تبدیل کند و ما پروتئین را استخراج می‌کنیم به این نوع وکتورها، وکتورهای بیانی گفته می‌شود

پس اگر هدف ما فقط تکثیر باشد از وکتورهای cloning استفاده می‌کنیم. حالا اگر هدف تولید پروتئین باشد باید وکتورمان ویژگی‌های لازم برای بیان را هم داشته باشد

PCR

این روش توسط Kary B. Mullis در سال ۱۹۸۵ کشف شد. با این روش قطعه خاصی از DNA را زیاد می‌کنیم. برای انجام این روش به DNA الگو، پرایمر و آنزیم‌های الیگونوکلئوتیدی، آنزیم DNA پلیمراز، بافر مناسب و دستگاه PCR نیاز داریم.

روبروی دانشکده تغذیه 09143190023 صادقی

Subject:
Year. Month. Date. ( )

DNA استخراج شده از فرد همراه با موادی که نیاز داریم در لوله‌ای ریز و در دستگاه PCR قرار می‌دهیم

"در مرحله اول" تا دمای 95°C را دستگاه ایجاد می‌کند تا پرایمرها و DNA از هم باز شوند.

"مرحله دوم" در این مرحله پرایمرها با DNA تک رشته‌ای جفت می‌شوند. در واقع ما پرایمرها را طوری می‌سازیم که به قسمت‌هایی از DNA می‌چسبند که نقطه آغاز و پایان قسمتی از DNA است که مد نظر ما است. (یکی از پرایمرها حالت reverse پرایمر دیگر است) در این مرحله دما حدود 60-50 است.

"مرحله سوم" در این مرحله دما دوباره افزایش پیدا خواهد کرد و توسط پرایمرها مورد هجوم آنزیم DNA یابی قرار می‌گیرد. این آنزیم قادر به مقاومت می‌باشد (72°C)

آنزیم DNA یابی قرار همینطا به قسمت 3' می‌چسبد و هیچوقت به 5' نمی‌چسبد

"پایان سیکل اول"

بعد از ساخته شدن قطعه جدید از DNA، این قطعه نیز می‌تواند الگو قرار گیرد.

اگر سیکل گفته شده مثلاً 30 بار تکرار شود 2^{30} عدد از این قطعه ساخته می‌شود. سیکل اول 2 تا، سیکل دوم 4 تا و به همین ترتیب افزایش می‌یابد یعنی 2^n عدد که n تعداد سیکل‌های انجام شده در دستگاه PCR است.

بعد از ساخته شدن DNA، می‌توان آن را در حافظه قرار داد و الکتروفورز کرد. می‌توان از حفظ شدن مارکر سایز های DNA برای اندازه‌گیری اندازه قطعات استفاده کرد تا ببینیم آیا سایز قطعات همان سایز هدف بوده است یا نه!

Sequencing

با این روش می‌فهمیم که توالی نوکلئوتیدها به چه صورت است. در سال ۱۹۷۷ ۲ روش جداگانه برای تعیین توالی ایجاد شد:

① Chain termination method یا cycle sequencing

② Maxam-Gilbert sequencing یا Chemical degradation ← منسوخ شده

"بیشتر Chain termination" ← مشابه PCR

در این روش الگو را می‌ریزند و فقط 1 عدد از dNTP (یکی جفت) پرایمر اضافه می‌کنند. آنزیم‌ها و بافر های لازم را هم اضافه می‌کنند. یک نوکلئوتید DNA خاصی هم می‌ریزند که بعد از چسبیدن این نوکلئوتید

روبروی دانشکده تغذیه 09143190023 صادقی

موسسه پارس کپی 33359914

Subject:

Year. Month. Date. ( )

به رشته ای که ساخته می شود ، نوکلئوتید دیگری می تواند بچسبد و ساخت رشته ادامه پیدا می کند

در حالت عادی که نوکلئوتید طبیعی است در جایگاه کربن ۳ ، OH داریم که می تواند پیوند بدهد مسعودی است

با نوکلئوتید بعدی ایجاد کند در حالت dideoxy ، کربن شماره ۳ ، H دارد یعنی نمی تواند پیوند

مسعودی استر تشکیل دهد و در نتیجه زنجیره دیگر ساخته نمی شود

ما هم ۲ نوع dNTP (عادی) و dideoxyNTP را با هم در لوله ریخته ایم و وقتی رشته ساخته می شود

در سیل های مختلف ، بسته به این که جایگزینی dideoxyNTP استفاده شود ، اهمیت خواهد کرد

بنابراین طول رشته ها متفاوت خواهد بود

برای اندازه گیری رشته ها از محل قرار گرفتن آن ها بعد از الکتروفورز می توان استفاده کرد

امروزه به dideoxy ها خاصیت فلورسنت نیز اضافه کرده اند

A ← سبز G ← سیاه T ← قرمز C ← آبی

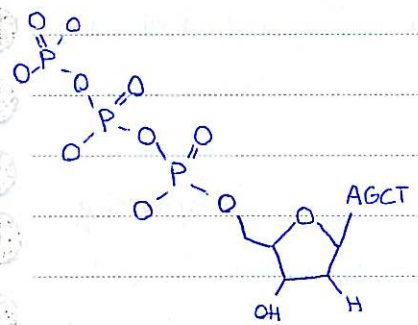
در مقطعات ، مثلاً اول مقطعه برابر + نوکلئوتید ، برابر + ۲ نوکلئوتید و ... قرار خواهند گرفت (طول های

متفاوت) با رنگ نوکلئوتید ها نوع آن ها مشخص می شوند

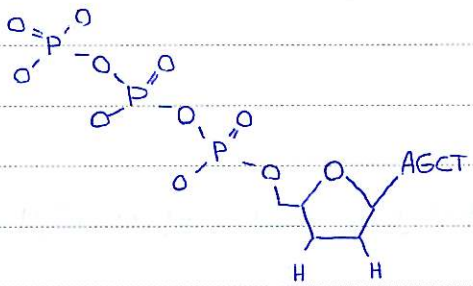
در این روش از دستگاه سکانس استفاده می شود که نتیجه را به صورت پیک می دهد .

در صورتیکه در یک نقطه ۲ پیک داشته باشیم یعنی هی ؟ یعنی ۲ تا مقطعه داشتیم که هر کدام ۱ پیک دارند ← یعنی فرد

هتروزیگوت است .



dNTP



dideoxy-NTP

The End

روبروی دانشکده تغذیه 09143190023 صادقی

موسسه پارس کیا