



انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، شماره ۲۱۰

راهنمای تکثیر و شبیه‌سازی ژن (در سیستم‌های پروکاریوت)

تألیف:

دکتر زهرا مشکات

استادیار و بیروس‌شناسی پزشکی دانشکده پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی مشهد

آیدا قلوبی

دانشجوی دکتری PhD پزشکی مولکولی دانشکده پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی مشهد

سرشناسه:	مشکات، زهرا، ۱۳۵۳ -
عنوان و نام پدیدآور:	راهنمای تکثیر و شبیه سازی ژن (در سیستم های پروکاریوت) تألیف زهرا مشکات، آیداقلوبی.
مشخصات نشر:	مشهد: دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مشهد، ۱۳۹۰.
مشخصات ظاهری:	۴۵۰ ص. مصور، جدول.
فروست:	(انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد؛ شماره ۲۱۰).
شابک:	(ISBN: 978-600-6331-01-0)
وضعیت فهرست نویسی:	فیا.
یادداشت:	واژه نامه.
موضوع:	ممتاسازی مولکولی.
موضوع:	پیش هسته ها.
موضوع:	ژنتیک -- ناقل ها.
موضوع:	دی. ان. ا.
موضوع:	آر. ان. ا.
موضوع:	واکنش زنجیره ای پلیمراز.
شناسه افزوده:	قلوبی، آیدا، ۱۳۵۳ -
شناسه افزوده:	دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مشهد.
رده بندی کنگره:	۱۳۹۰ ر ۵ م / ۲۴۴۲ QH۲
رده بندی دیویی:	۵۷۲/۸۶۳۳
شماره کتابخانه ملی:	۲۴۰۵۱۹۹



دانشگاه علوم پزشکی مشهد

انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، شماره ۲۱۰

راهنمای تکثیر و شبیه سازی ژن (در سیستم های پروکاریوت)

تألیف

دکتر زهرا مشکات - آیداقلوبی

وزیری، ۴۵۰ صفحه، ۳۲۰ نسخه، چاپ اول، پاییز ۱۳۹۰

امور فنی و چاپ: مؤسسه چاپ و انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد

بها: ۹۰۰۰۰ ریال

بسمه تعالی

انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد - به عنوان یک نهاد علمی - فرهنگی، چاپ و نشر، کتابهای مورد استفاده استادان و دانشجویان رشته‌های علوم پزشکی را از وظایف اساسی خود می‌داند و بر آن است تا با انتشار متون مربوط به علوم پزشکی، هم بر اعتبار و اعتلای آنها بیفزاید و هم موجبات دل‌گرمی و شوق و نشاط امر تحقیق را در پی‌جوییهای علمی فراهم آورد. به یقین چاپ و نشر آثار معتبر علمی، امکان دستیابی اهل تحقیق را به منابع مختلف و گوناگون علمی مورد نیاز به بهترین صورتی میسر و ممکن خواهد ساخت و راه را برای تحقیقات بعدی هموار خواهد کرد.

باید گفته شود که گستردگی فعالیتهای مربوط به نشر، در قلمرو ناشران خصوصی، نه تنها از مسئولیت مراکز معتبر دانشگاهی، به کوشش در این زمینه‌ها با تکیه بر جنبه‌های علمی و فرهنگی موضوع نمی‌کاهد، بلکه به دلایل گوناگون، از جمله لزوم بررسیهای دقیق کارشناسی، ویرایشهای علمی و فنی، و نیز توجه حداکثر به توان مالی مخاطبان آثار، به‌ویژه دانشجویان، ایجاب می‌کند که دانشگاههای دولتی دامنه خدمات خود را با تکیه بر جنبه‌های کیفی، و گاه صرف‌نظر از بازده اقتصادی گسترش دهند.

مسئولان انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، با اشتیاق و اخلاص تمام می‌خواهند تا جدیدترین آثار مربوط به دانشهای پزشکی را به بهترین شیوه فراهم آورند و بکوشند تا آثار منتشر شده با کیفیت مطلوب عرضه گردد. در عین حال انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مترصد دریافت نظرها و انتقادهای به‌جا و سازنده اهل نظر می‌باشد تا از این طریق بتواند بر کمال آثار منتشره خویش بیفزاید.

معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد با استعانت از الطاف خداوندی امیدوار است که نشر این اثر همانند دیگر آثار انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد با نظارت همه‌جانبه این معاونت، و با تکیه بر ابتکار و کوشش اعضا و کارشناسان دانش‌آموخته خویش و نیز ایجاد ارتباط محکم و پایدار با جامعه پزشکی و دانشجویان پژوهشگر، در جهت ارتقای کیفی و تنوع موضوعات مورد نیاز دانش‌پژوهان رشته‌های علوم پزشکی گامهای مؤثر بردارد تا مورد استفاده دانشجویان و مقبول طبع صاحب‌نظران و دانشگاهیان نکته‌بین قرار بگیرد.

انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد

فهرست مطالب

مقدمه	۱۱
فصل ۱: DNA و روش های استخراج آن	۱۳
مقدمه	۱۳
۱-۱- جداسازی DNA با وزن مولکولی بالا از سلول های تک لایه کشت شده پستانداران با استفاده از پروتئیناز K و فنل	۱۸
۲-۱- جداسازی DNA با وزن مولکولی بالا از سلول های سوسپانسیون کشت شده پستانداران با استفاده از پروتئیناز K و فنل	۲۳
۳-۱- جداسازی DNA با وزن مولکولی بالا از سلول های خون با استفاده از پروتئیناز K و فنل	۲۵
۴-۱- جداسازی DNA با وزن مولکولی بالا از سلول های بافت تازه پستانداران با استفاده از پروتئیناز K و فنل	۲۸
۵-۱- روش های مختلف پارافین زدایی و استخراج DNA از بافت های پارافینه	۳۰
۶-۱- جداسازی DNA با وزن مولکولی بالا از سلول های تک لایه کشت شده پستانداران با استفاده از تریسین	۳۷
۷-۱- جداسازی DNA با وزن مولکولی بالا از سلول های پستانداران با استفاده از فوراماید	۳۹
۸-۱- جداسازی DNA از سلول های پستانداران کشت شده در میکروپلیت ۹۶ چاهکی	۴۱
۹-۱- بهینه سازی DNA ژنومی استخراج شده جهت استفاده در PCR	۴۴
۱۰-۱- تهیه DNA ژنومی از دم موش و سایر نمونه های کوچک	۴۶
۱۱-۱- تهیه DNA ژنومی از دم موش بدون استخراج با حلال های آلی	۵۰
۱۲-۱- روش سریع جداسازی DNA پستانداران	۵۲
۱۳-۱- استخراج سریع DNA از بافت های نرم و خون	۵۶
۱۴-۱- استخراج سریع DNA از سلول های B. Buccal	۵۷
۱۵-۱- روش سریع جداسازی DNA از مخمر	۵۸
۱۶-۱- تهیه DNA مخمر در مقیاس کم	۶۰
۱۷-۱- جداسازی DNA ژنومی باکتری	۶۲
۱۸-۱- جداسازی DNA ژنومی باکترهای گرم مثبت	۶۵
۱۹-۱- تهیه DNA ژنومی از بافت گیاهی	۶۷
۲۰-۱- اندازه گیری مقدار DNA با روش اسپکتروفتومتری	۶۹
۲۱-۱- اندازه گیری مقدار DNA با روش فلورومتری با استفاده از Hoechst 33258	۷۱

فصل ۲: RNA و روش‌های استخراج آن.....	۷۳
مقدمه.....	۷۳
۱-۲- جداسازی RNA تام از سلول‌های کشت شده یوکاریوتی با روش گوانیدین ایزوتیوسیانات.....	۷۶
۲-۲- جداسازی RNA تام از بافت‌های موش با روش گوانیدین ایزوتیوسیانات.....	۷۹
۳-۲- جداسازی هم زمان DNA و RNA از سلول‌های کشت شده یوکاریوتی با روش گوانیدین ایزوتیوسیانات.....	۸۲
۴-۲- جداسازی هم زمان DNA و RNA از بافت‌های موش با روش گوانیدین ایزوتیوسیانات.....	۸۷
۵-۲- روش سریع استخراج RNA.....	۸۹
۶-۲- تخلیص RNA از سلول‌های کشت شده به وسیله استخراج با اسید فتل-گوانیدیوم تیوسیانات-کلروفرم.....	۹۲
۷-۲- تخلیص RNA از بافت به وسیله استخراج با اسید فتل-گوانیدیوم تیوسیانات-کلروفرم.....	۹۷
۸-۲- روش یک مرحله ای استخراج هم زمان DNA، RNA و پروتئین از سلول‌ها و بافت‌ها.....	۹۹
۹-۲- استخراج سریع RNA تام با استفاده از معرف تریزول.....	۱۰۳
۱۰-۲- جداسازی RNA تام از باکتری‌ها.....	۱۰۵
۱۱-۲- روش‌های نگهداری و ذخیره‌سازی RNA استخراج شده.....	۱۱۱
۱۲-۲- روش حذف DNA از RNA استخراج شده.....	۱۱۳
۱۳-۲- روش تهیه آب DEPC و آماده‌سازی و تیمار وسایل با DEPC.....	۱۱۵
فصل ۳: تکنیک‌های شناسایی DNA و RNA.....	۱۱۷
مقدمه.....	۱۱۷
۱-۳- الکتروفورز DNA در ژل آگاروز.....	۱۱۹
۲-۳- رنگ آمیزی ژل آگاروز با اتیدیوم بروماید قبل از الکتروفورز.....	۱۳۲
۳-۳- رنگ آمیزی ژل آگاروز با اتیدیوم بروماید بعد از الکتروفورز.....	۱۳۴
۴-۳- رنگ آمیزی ژل آگاروز با سایبرسیف قبل از الکتروفورز.....	۱۳۶
۵-۳- رنگ آمیزی ژل آگاروز با سایبرسیف بعد از الکتروفورز.....	۱۳۹
۶-۳- رنگ آمیزی ژل آگاروز با متیلن بلو بعد از الکتروفورز.....	۱۴۱
۷-۳- رنگ آمیزی ژل آگاروز با سایبرگلد.....	۱۴۳
۸-۳- روش حذف سایبرگلد از اسیدهای نوکلئیک.....	۱۴۶
۹-۳- الکتروفورز DNA در ژل پلی آکریل آمید خنثی.....	۱۴۸
۱۰-۳- رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید با اتیدیوم بروماید.....	۱۵۹
۱۱-۳- رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید با سایبرگلد.....	۱۶۱
۱۲-۳- رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید با نیرات نقره.....	۱۶۳
۱۳-۳- رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید با نیرات نقره با استفاده از نیتریک اسید.....	۱۶۵
۱۴-۳- رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید با متیلن بلو.....	۱۶۷
۱۵-۳- عکسبرداری DNA موجود در ژل.....	۱۶۸
فصل ۴: کلون کردن ژن در وکتور پلاسمیدی.....	۱۶۹
پلاسمید.....	۱۶۹

۱۶۹	ویژگی های پلاسمیدها
۱۷۰	ریپلکون پلاسمیدها
۱۷۱	سنتر DNA پلاسمیدی
۱۷۲	فاکتورهای Rom و Rep
۱۷۳	عدم سازگاری پلاسمیدها
۱۷۳	وکتورهای پلاسمیدی
۱۷۷	اصول کلی کلون سازی ژن در پلاسمیدها
۱۷۹	۴-۱- تکثیر و تخلیص پلاسمیدها با روش لیز قلیایی در مقیاس کم
۱۸۴	۴-۱- تکثیر و تخلیص پلاسمیدها با روش لیز قلیایی در مقیاس متوسط
۱۸۹	۴-۳- تکثیر و تخلیص پلاسمیدها با روش لیز قلیایی در مقیاس زیاد
۱۹۴	۴-۴- تکثیر و تخلیص پلاسمیدها با روش جوشاندن در مقیاس کم
۱۹۹	۴-۵- تکثیر و تخلیص پلاسمیدها با روش جوشاندن در مقیاس زیاد
۲۰۴	۴-۶- تکثیر و تخلیص پلاسمیدها با روش SDS
۲۰۸	۴-۷- خالص سازی DNA پلاسمیدی استخراج شده با روش پلی اتیلن گلیکول
۲۱۰	۴-۸- خالص سازی DNA پلاسمیدی استخراج شده با روش پلی اتیلن گلیکول و لیتیم کلراید
۲۱۴	۴-۹- حذف قطعات کوچک اسید نوکلئیک از DNA پلاسمیدی تخلیص شده با استفاده از NaCl
	۴-۱۰- کلون سازی قطعه DNA مورد نظر درون وکتور پلاسمیدی با استفاده از آنزیم های محدودگر و ایجاد انتهای چسبنده
۲۱۷	
۲۲۸	۴-۱۱- حذف فسفر انتهایی از DNA پلاسمیدی
۲۳۱	۴-۱۲- استفاده از وکتورهای TA جهت کلون سازی قطعات DNA
۲۳۳	۴-۱۳- روش تهیه باکتری های مستعد با استفاده از کلسیم کلراید و ترانسفورم کردن آنها با شوک حرارتی
	۴-۱۴- روش تهیه باکتری های مستعد با استفاده از کلسیم کلراید و منیزیم کلراید و ترانسفورم کردن آنها با شوک حرارتی
۲۳۷	
۲۴۲	۴-۱۵- روش تهیه باکتری های مستعد با استفاده از الکتروپوریشن و ترانسفورم کردن آنها
۲۴۶	۴-۱۶- روش تهیه باکتری های مستعد با استفاده از PIPES و ترانسفورم کردن آنها
۲۵۰	۴-۱۷- روش تهیه باکتری های مستعد با استفاده از MES و ترانسفورم کردن آنها
۲۵۵	۴-۱۸- غربالگری کلونی های باکتری های ترانسفورم شده با استفاده از IPTG و X-gal
۲۵۹	فصل ۵: کلون کردن ژن در باکتریوفاژ لاند
۲۶۶	۵-۱- کشت باکتریوفاژ لاند
۲۷۰	۵-۲- برداشت پلاک های باکتریوفاژ لاند
۲۷۲	۵-۳- آماده سازی ذخیره باکتریوفاژ لاند با استفاده از لیز کشت پلیت و شستشوی آن
۲۷۵	۵-۴- آماده سازی محلول های ذخیره باکتریوفاژ لاند توسط کشت مایع با حجم کم
۲۷۷	۵-۵- رشد باکتریوفاژ لاند در حجم زیاد: عفونت زایی در مقدار کم
۲۸۰	۵-۶- رسوب دهی ذرات باکتریوفاژ لاند از لیزات حجم بالا

- ۷-۵- اندازه‌گیری محتوای DNA ذخیره و لیزات باکتریوفاژ لاند: توسط ژل الکتروفورز ۲۸۲
- ۸-۵- تخلیص ذرات باکتریوفاژ لاند: توسط سانتریفوز و گرادیان گلیسرول ۲۸۴
- ۹-۵- استخراج DNA باکتریوفاژ لاند: از کشت‌های با حجم بالا با استفاده از پروتئیناز K و SDS ۲۸۶
- ۱۰-۵- تهیه DNA باکتریوفاژ لاند: به عنوان یک وکتور کلون‌سازی با استفاده از یک آنزیم محدودگر ۲۸۹
- ۱۱-۵- تیمار DNA وکتور باکتریوفاژ لاند: با آلکالین فسفاتاز ۲۹۲
- ۱۲-۵- هضم ناکامل DNA یوکاریوتی برای استفاده در کتابخانه‌های ژنی ۲۹۶
- ۱۳-۵- لایگیشن بازوهای باکتریوفاژ لاند: به قطعات DNA ژنومی خارجی ۲۹۸
- ۱۴-۵- بررسی سریع سویه‌های باکتریوفاژ لاند: تخلیص DNA لاند از لیزات پلید ۳۰۱

فصل ۶: روش‌های مختلف PCR ۳۰۵

- مقدمه ۳۰۵
- ترکیبات مورد نیاز در PCR ۳۰۶
- آنزیم‌های DNA پلیمراز مقاوم به حرارت ۳۱۱
- دقت آنزیم‌های Taq DNA polymerase ۳۱۸
- DNA پلیمرازهای مقاوم به حرارت دارای فعالیت تصحیح‌کنندگی ۳۱۸
- آنزیم Tth DNA polymerase با فعالیت نسخه‌برداری معکوس ۳۲۱
- محلول‌ها و پلیمرازهای رنگی ۳۲۲
- پرایمر ۳۲۲
- محاسبه T_m پرایمرها ۳۲۷
- غلظت پرایمر و روش محاسبه آن ۳۲۸
- برنامه‌ریزی PCR ۳۳۰
- بهینه‌سازی PCR ۳۳۳
- تقویت‌کننده‌های PCR ۳۳۵
- مهارکننده‌های PCR ۳۳۵
- عیب‌یابی PCR ۳۳۶
- مشکلات آلودگی در PCR ۳۴۱
- ۱-۶- روش PCR ساده ۳۴۶
- ۲-۶- روش‌های مختلف Hot-start PCR ۳۵۱
- ۳-۶- روش Touchdown PCR ۳۵۷
- ۴-۶- روش Stepdown (SD) PCR ۳۶۲
- ۵-۶- روش Booster PCR ۳۶۶
- ۶-۶- روش Multiplex PCR ۳۷۰
- ۷-۶- روش Nested PCR ۳۷۴
- ۸-۶- روش PCR کمی و Real Time PCR ۳۸۰
- ۹-۶- روش PCR معکوس (IPCR) ۳۹۳
- ۱۰-۶- روش PCR با نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR) ۳۹۹

فصل ۷: روش‌های تعیین توالی DNA	۴۰۷
۷-۱- تعیین توالی به روش شیمیایی	۴۰۹
۷-۲- تعیین توالی DNA به روش دی‌داکسی با استفاده از Taq DNA پلی‌مراز	۴۱۲
ضمیمه ۱: بافرها، محلول‌ها، محیط کشت‌ها و آنزیم‌ها	۴۱۵
ضمیمه ۲: مواد زیان‌آور و موارد احتیاط کنار با هر یک از آن‌ها	۴۲۹
منابع	۴۳۱
نمایه	۴۴۵

www.ketab.ir

مقدمه

سپاس و ستایش بی‌پایان به درگاه لایزال الهی که توفیق خدمتی هر چند اندک را به تشنگان طریقت علم و دانش و مشتاقان تحقیق و پژوهش به ما عطا نمود تا تجربیات ناقص و اندک خود را در زمینه تحقیقات مولکولی ارائه نماییم.

امروزه با پیشرفت فناوری‌های نوین در زمینه علوم مختلف و علاقه روزافزون محققان، پژوهشگران و دانشجویان کشور در جهت دستیابی و به روز رسانی این علوم، بیش از گذشته نیاز به روش‌های عملی آسان و کم هزینه در زمینه تحقیقات مولکولی احساس می‌شود.

هدف اصلی از نگارش این کتاب، ارائه راهنمای عملی جهت تکثیر ژن با روش‌های مختلف و کلون‌سازی قطعه تکثیر یافته در وکتورها می‌باشد. نظر به پیشرفت روزافزون در زمینه علوم مختلف و سرعت بیشتر آن در علوم مولکولی، ارائه همه روش‌ها در یک کتاب اگر غیر ممکن نباشد، بسیار دشوار است، با این حال در این کتاب سعی شده است با توجه به تجربیات عملی نگارندگان در این زمینه، کارآمدترین، قابل اجراترین و در عین حال ساده‌ترین روش‌ها انتخاب و در اختیار دانشجویان، محققان و مشتاقان علوم مختلف پایه قرار گیرد. همچنین در این کتاب سعی شده است روش کارهایی ارائه شود که با حداقل امکانات موجود در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی قابل انجام باشد.

یادآوری این نکته را ضروری می‌دانیم که این کتاب، خالی از اشکال نبوده و نظرات ارزشمند و تجربیات ارزنده شما یاربرگر ما در بر طرف نمودن نقایص و تکمیل و ارائه مجموعه کامل‌تر در آینده خواهد بود.

در پایان بر خود لازم می‌دانیم که از کلیه اساتید محترمی که در طی سالیان با آموزش‌های علمی، عملی و اخلاقی خود، راهنمای تحقیق، پژوهش و زندگی ما بوده‌اند، قدردانی نماییم. همچنین از کلیه دوستان، دانشجویان، همکاران و عزیزانی که تجربیات علمی و عملی ارزنده خود را بی‌منت و بی‌کاستی در اختیار ما قرار داده‌اند، تشکر ویژه داریم.

دکتر زهرا مشکات-آیدا قلوبی

پاییز ۱۳۸۹