

روش‌های میکروپزشناسی مهاکولی در آزمایشگاه

مؤلفین:

دکتر محمد نیاکان

(عضویت علمی دانشگاه شاهد)

دکتر بابا اقا بزرگی

(عضویت علمی دانشگاه آزاد گرمسار)

جواد ده‌دگر

(کارشناس ارشد میکروپزشناسی)

انتشارات خسروی

۱۳۹۱

سرشناسه :	نیاکان، محمد، ۱۳۳۸ -
عنوان و نام پدیدآور :	روش‌های میکروبیشناسی مولکولی در آزمایشگاه / مولفین محمد نیاکان، سهراب آقا بزرگی، جواد دادگر پاکدل.
مشخصات نشر :	تهران: خسروی ، ۱۳۹۰.
مشخصات ظاهری :	۱۲۲ ص: مصور، جدول، نمودار.
شابک :	978-600-209-081-2
روایت فهرست نویسی :	فربا
موضوع :	میکروبیشناسی مولکولی - دستنامه‌های آزمایشگاهی
موضوع :	میکروبیشناسی پزشکی - دستنامه‌های آزمایشگاهی
شناسه افزوده :	آقابزرگی، سهراب، ۱۳۲۲ -
شناسه افزوده :	دادگر پاکدل، جواد، ۱۳۵۷ -
کتابشناسی :	۱۳۹۰ ۵۷۲/۸۲۹ QR۷۲/۵۹۹
رده بندی :	۵۷۲/۸۲۹
آماره کتابشناسی ملی :	۲۲۲۱۳۷۲



عنوان کتاب:	روش‌های میکروبیشناسی مولکولی در آزمایشگاه
مؤلفین:	دکتر محمد نیاکان - دکتر سهراب آقا بزرگی جواد دادگر پاکدل
ناشر:	انتشارات خسروی
قطع:	وزیری
نوبت چاپ:	اول - ۱۳۹۱
تیراژ:	۱۰۰۰ نسخه
شابک:	۹۷۸-۶۰۰-۲۰۹-۰۸۱-۲
قیمت:	۱۵۰ تومان

مرکز پخش: انتشارات خسروی، خیابان انقلاب، بین وصال و قدس، کوچه است

ساختمان شماره ۲۳، واحد ۵ تلفن: ۶۶۴۹۰۷۱۹-۲۰

هوالعزیز

مقدمه مولفین

امروزه فن آوری های علوم کاربردی در زمینه میکرو ب شناسی، زیست شناسی و دیگر رشته های وابسته که بتواند به مطالعه پدیده های دقیق بپردازد از اهمیت خاصی برخوردار است. تکنیک های ملکولی توانسته است به عنوان یک رویکرد جدید در اکثر رشته ها کاربرد داشته باشد. در واقع با استفاده از راه های ملکولی دقیق می توان از نتایج روش های کاربردی بهره مناسی کسب نمود.

علوم میکرو بیولوژی ملکولی توسعه بسیاری یافته و در بین رشته های علوم پایه محبوبیت بین رشته ای ویژه ای یافته است. طراحی ایده ها و استفاده از مفاهیم در مقیاس ژن و ملکول بین فن آوری علوم زیستی، تحقیقات و تشخیص پزشکی، درمان و کنترل بیماری ها نیز از اهمیت به سزایی برخوردار است.

با توجه به ماهیت اینگونه آزمایش ها روش ساده است روش ها با بیانی ساده، عمومی و کاربردی ارائه شود تا به عنوان یکی از منابع کاربرد در معادله دانش پژوهان این رشته قرار گیرد.

هدف از تدوین این کتاب معرفی روش های کاربردی و اجرایی در میکرو ب شناسی ملکولی می باشد که بر مبنای اصول ساده علمی و معرفی تکنیک ها بیان شده است. بهیچ وجه بسیاری از اطلاعات و واژه های متداول در این رشته ها به دلیل جدید بودن تاکنون معادل فارسی نداشته ولی تلاش شده است تا حد امکان از اصطلاحات نامتعارف پرهیز شود. به هر حال مجموعه حاضر خالی از اشکال نبوده و منتظر نظریات و ارشادات اساتید و دانشجویان گرامی هستیم.

بر خود لازم می دانیم از افرادی که ما را در نگارش این کتاب یاری نمودند به سیمانه تشکر نماییم.

در ابتدا از خانم سارا نیاکان به لحاظ ویرایش عمومی و جناب آقای خسروی بهیر محترم موسسه انتشاراتی خسروی در مساعدت چاپ کتاب کمال تشکر و قدر دانی به عمل می آید.

مولفین بهار ۱۳۹۱

تقدیرم به ستاره پر فروغ خلقت

ابوالعلم امیرالمومنین علی بن ابی طالب (ع)



این کتاب با همکاری و مساعدت مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرم‌خیزی
دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به انجام رسیده است که جای تقدیر دارد.

فهرست مطالب

۲	مقدمه مولفین
۹	فصل ۱: استخراج DNA باکتری و روش ساترن
۹	مقدمه
۱۲	مرحله اول: جداسازی DNA باکتریایی و هضم آن توسط آنزیمهای محدودالانر
۱۲	مواد مصرفی
۱۲	تجهیزات
۱۴	مرحله دوم: الکتروفورز قفسه‌ای آگارز، رنگ آمیزی و روش انتقال ساترن
۱۵	تجهیزات
۱۶	مرحله سوم: آماده سازی پروب دوره سلولی ساترن
۱۷	تجهیزات
۱۸	روش کار
۲۱	مرحله دوم:
۲۸	آماده سازی سومین مرحله: جداسازی ساندهای از نشاء
۲۹	مرحله سوم: آماده سازی پروب و هیبرید یزاسیون ساترن
۳۱	مرحله چهارم: مرحله شستشو و اتمام لکه گذاری
۳۴	فصل ۲: جداسازی پلاسمید و رسم نقشه ژنی
۳۴	مقدمه
۳۸	مرحله اول: جداسازی پلاسمید (تهیه پلاسمید در مقیاس کوچک) و اتمام
۳۹	مواد مصرف
۳۹	تجهیزات
۳۹	مرحله دوم: الکتروفورز ژل آگارز
۳۹	تجهیزات
۴۰	روش

مرحله اول : جداسازی پلاسمید و ایجاد برشهای آنزیمی	۴۰
مرحله دوم : الکتروفورز ژل آگارز	۴۲
فصل ۳ : انتقال ژن مقاومت آنتی بیوتیکی از باکتری به روش ترانسفورماسیون	۴۸
مقدمه	۴۸
مواد مورد نیاز کشت	۵۳
مواد معرف	۵۴
تجهیزات	۵۴
روش کار	۵۵
ترانسفورماسیون باکتری <i>E.coli</i> کارآمد توسط pBR322	۵۶
فصل ۴ : سبب مقایسه آنتی بیوتیکی از طریق کونژوگاسیون باکتریایی	۵۹
مقدمه	۵۹
مواد مورد نیاز	۶۱
محیط کشت	۶۱
مواد معرف	۶۱
روش کار	۶۲
فصل ۵ : تهیه DNA پلاسمیدی به روش تهیه حرارتی	۶۴
مقدمه	۶۴
روش کار	۶۴
طرز تهیه :	۶۶
محیطهای کشت حاوی آگار یا آگارز	۶۸
فصل ۶ : استخراج سریع DNA ژنومی (کروموزومال) از باکتری	۷۴
روش اجرا	۷۴
روش کار	۷۷
ژل الکتروفورز DNA در میدان ضرباندار (Pulsefield)	۸۱
EDTA	۸۶
فصل ۷ : تهیه انواع بافر و مواد مورد نیاز آزمایشهای مولکولی	۸۷
اتیدیوم بروماید	۸۷
فایکول ۴۰۰ (۲۰٪ وزنی - حجمی)	۸۸
گلیسرول	۸۸

۸۸.....	طرز تهیه ۱۰ NaOH نرمال.....
۸۹.....	SYBER Gold™.....
۸۹.....	طرز تهیه بافر TAE.....
۹۱.....	روش رنگ آمیزی قطعات DNA پس از انجام الکتروفورز.....
۹۳.....	شکارسازی DNA با رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید.....
۹۴.....	طرز تهیه ژل پلی آکریل آمید.....
۹۴.....	اسیدهای نوکلئیک و الیگونوکلوئتیدها.....
۱۰۱.....	محلول برای الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید.....
۱۰۲.....	محلول KOH /.....
	تست آمپلیفیکاسیون DNA در آزمایشگاه با استفاده از تکنیک واکنش
۱۰۲.....	زنجیره پلی پیرامین (PCR).....
۱۰۳.....	روش کار.....
۱۰۵.....	طرز تهیه محلول برای PCR.....
۱۰۶.....	KCl.....
۱۰۶.....	Tris-Cl.....
۱۰۶.....	محلول dNTPs.....
۱۰۷.....	مهندسی ژنتیک به کمک PCR.....
۱۰۸.....	مواد مورد نیاز.....
۱۰۸.....	وکتورها.....
۱۰۸.....	روش کار.....
۱۱۱.....	مواد مورد نیاز.....
۱۱۲.....	تعیین توالی DNA.....
۱۱۲.....	مواد مورد نیاز.....
۱۱۳.....	روش کار.....
۱۱۵.....	طرز تهیه.....
۱۱۵.....	استات آمونیوم.....
۱۱۵.....	DMSO.....
۱۱۵.....	فنول.....
۱۱۷.....	آماده سازی ژل پلی آکریل آمید با خاصیت واسرشته کردن DNA.....

۱۱۷	مواد مورد نیاز
۱۱۸	روش کار
۱۲۲	طرز تهیه
۱۲۳	آماده سازی ژل پلی آکریل آمید حاوی فورمامید
۱۲۴	مواد مورد نیاز
۱۲۴	روش کار
۱۲۵	مواد مورد نیاز
۱۲۶	فصل ۸: بیان ژن کلون شده در باکتری اشرشیاکلی
۱۲۶	مواد مورد نیاز
۱۲۷	میکتوبها و سببهای باکتریایی
۱۲۷	روش کار
۱۳۰	طرز تهیه
۱۳۱	SDS
۱۳۳	فصل ۹: تعیین کمی میزان بیان ژن توسط Real time PCR
۱۳۳	مقدمه
۱۳۴	مواد مورد نیاز
۱۳۵	تجهیزات
۱۳۵	روش کار
۱۳۷	تعیین مقدار RNA
۱۳۷	تیمار نمودن DNase
۱۳۸	مواد مورد نیاز به ازای هر مرحله واکنشی و برای هر تعداد واکنش
۱۳۸	سنتز cDNA
۱۳۹	SYBR Green
۱۴۰	Real time PCR
۱۴۰	مواد مورد نیاز به ازای هر مرحله واکنشی و برای هر تعداد واکنش
۱۴۱	منابع