بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

مرکز مطالعات و توسعه آموزش پزشکی

راهنمای پادگیری

دانشکده: پیراپزشکی

نام درس: تکنیکهای مولکولی و پیشرفته آزمایشگاهی

مدرس: امیرآتشی/ منصوره عجمی

تعداد واحد: ۲واحد نظری و عملی (یک واحد جهت هر استاد)

رشته: علوم آزمایشگاهی

ترم: ۶

نیمسال اول ☐ دوم ☒ سال تحصیلی: ۱۴۰۳-۱۴۰۲

مقدمه:

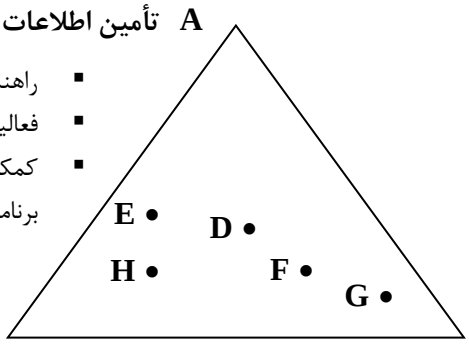
در طی چند دهه گذشته آموزش علوم پزشکی در کشورمان شاهد تجلی اراده‌ای راسخ برای تغییرات بنیادین و زیربنایی، چه به لحاظ ساختاری و چه به لحاظ محتوا بوده است. گرایش رشته‌های مختلف علوم پزشکی به سمت فراگیر محوری و یادگیری مستقل به روشنی آشکار است. در بین تمامی تلاش‌های انجام شده در این راه پر فراز و نشیب، جای خالی "راهنمای یادگیری" احساس می‌شد.

همانند راهنمای سفر که منبعی مناسب برای هر مسافر تلقی می‌شود، راهنمای یادگیری همان نقش را در ارتباط با دانشجویان ایفاء می‌نمایند. با استفاده از آن، دانشجویان تشویق می‌گردند تا مهارت‌های مطالعه مؤثر را رشد و پرورش دهند و فراگیری مستقل را بیاموزند.

راهنمای یادگیری را نباید با کتاب درسی اشتباه گرفت.

تأکید راهنمای یادگیری بر "فرآیند یادگیری" است و نه بر محتوا. اگر چه ممکن است در موقعیت هایی لازم شود متن و محتوا نیز مستقیماً در اختیار دانشجو قرار داده شود.

راهنمای یادگیری را می‌توان از طریق یک مثلث متساوی‌الاضلاع معرفی نمود. سه رأس این مثلث نشانگر سه نوع عملکرد آن می‌باشد. نقطه A نشانگر عملکرد راهنمای یادگیری برای ارائه اطلاعات به دانشجویان می‌باشد. نقطه B نشانگر عملکرد راهنمای یادگیری برای مدیریت یادگیری دانشجویان است. نقطه C در راهنمای یادگیری، توصیف کننده فعالیت‌های دانشجویان می‌باشد. همانطور که مشخص است بهترین راهنمای یادگیری راهنمایی است که مجموعه ای از این عملکردها را محقق سازد.



A تأمین اطلاعات محتوایی

- راهنما شامل محتوای داده‌ها می باشد.
- فعالیت دانشجو منظور نمی‌شود.
- کمکی به یادگیری صورت نمی گیرد و آشنایی با برنامه ارائه نمی‌شود.

B مدیریت یادگیری

- راهنما بر اساس یادگیری و برنامه استوار است.
- محتوای برنامه ارائه نمی‌شود.
- فعالیت دانشجو منظور نمی‌شود.

C فعالیت دانشجو

- راهنما بر اساس فعالیت دانشجو است.
- محتوای برنامه ارائه نمی‌شود.
- کمکی به یادگیری صورت نمی‌گیرد و آشنایی با برنامه ارائه نمی‌شود.

مثلث راهنمای یادگیری

الگوی پیشنهادی راهنمای یادگیری:

لازم به ذکر است تألیف راهنمای یادگیری شما بر اساس مثلث فوق انتخابی می باشد.

در صورت تمایل می توانید از راهنماهای یادگیری تألیف شده بر روی وب گاه مرکز مطالعات دیدن فرمائید.

شرح مختصردوره:

مطالعات گسترده چند دهه گذشته در کشف فرایندهای مولکولی درون و برون سلولی موجودات زنده سبب افزایش دانش شده و تلاش جهت تقلید از این فرایندها در محیط آزمایشگاهی سبب تحول در علوم و فناوری‌های مختلف گردیده است. حاصل این دستاوردها، انقلابی را در زمینه زیست‌فناوری (بیوتکنولوژی) ایجاد نموده است به نحوی که قرن حاضر را عصر تسخیر فناوری‌های مولکولی، نوترکیبی DNA (مهندسی ژنتیک) و سایر علوم و فناوری‌های کلیدی چون نانوتکنولوژی و نانوبیوتکنولوژی نامیده‌اند. به جرأت می‌توان گفت روش‌های مولکولی با گذشت نزدیک به سه دهه از ابداعشان، مرزهای دانشی موجود را در هم نوردیده و امروزه جزو پایه‌های مهم تشخیص در علوم پزشکی قرار گرفته‌اند. تکنیکهای مولکولی و پیشرفته آزمایشگاهی ، درسی ۲ واحدی است و در آن عناوین مهمی از روش های استخراج RNA/DNA ، روش های سنتز cDNA، آشنایی با ویژگی ها و طراحی پرایمر، انواع تکنیک های PCR و کاربرد آنها در تشخیص آزمایشگاهی، کار با الکتروفورز و تفسیر نتایج حاصل، PCR-Time Real و کاربرد آنها در تشخیص آزمایشگاهی، اصول و کاربردهایRNA Micro ، Probها و FISH ، اصول و کاربردهای تعیین توالی DNAو میکروآرایه ها و تراشه در آزمایشگاه، اصول و کاربردهای نانوبیوتکنولوژی در روش های آزمایشگاهی و طراحی و ساخت کیت های آزمایشی و سایر محصولات آزمایشگاهی مورد بحث قرار می گیرد. در این دوره به شما دانشجویان طی ۱۶ جلسه (معادل دو واحد) آموزش کلیات و مباحث نظری و عملی مربوط به تکنیکهای مولکولی و پیشرفته آزمایشگاهی ارائه داده خواهد شد.

اطلاعات آموزشی:

مکان آموزش: حضوری در محل کلاس ۱۰۴- دانشکده پزشکی

زمان آموزش: دوشنبه ۱۶-۱۴

مدت دوره : از تاریخ ۱۴۰۲/۱۱/۲۸ به مدت ۱۶ هفته

شماره تماس مسئول: ۰۲۳۳۲۳۹۵۰۵۴ - داخلی ۵۲۸

حضور فیزیکی و آدرس دفتر کار: شاهرود- میدان ۷ تیر- دانشکده پزشکی- طبقه همکف - اتاق ۱۱۰

پست الکترونیک مدرس: minoo.ajami@gmail.com و ajami.m@shmu.ac.ir

قرارداد یادگیری:

حضور فعال و منظم دانشجو در کلاس درس، مرور مطالب و اسلاید های مربوط به جلسات قبل بخصوص مطالب پایه ای و پیوسته و شرکت فعال در پرسش و پاسخ ها لازمه درک درست و کامل مطالب می باشد. شما دانشجوی گرامی می بایست رأس ساعت در کلاس حاضر شده و آمادگی لازم جهت ارزیابی مطالب جلسه گذشته به صورت پرسش و پاسخ را داشته باشید و در صورتی که بیش از ۱۰ دقیقه بعد از شروع کلاس حضور یابید نمره کامل حضور و غیاب را دریافت نخواهید کرد. دانشجویان می توانند به ازای هر واحد یعنی ۸ جلسه دو غیبت موجه داشته باشند.۱۵ درصد از کل نمره نهایی این درس جهت حضور و غیاب، پاسخ به پرسش های اول کلاس مرتبط با مطالب جلسه گذشته، حضور فعال در مباحث کلاسی نمره میان ترم و انجام تکالیف محوله اختصاص خواهد داشت. جهت بهتر آموختن این واحد درسی، مطالب هر جلسه را خوب مطالعه نموده و برای یادگیری بهتر مطالب آن ها را به صورت دسته بندی شده مطالعه نمائید. ۸۵ درصد از نمره نهایی به

امتحان پایان ترم اختصاص دارد که به صورت سوالات تستی، جواب کوتاه، جای خالی و یک تا دو سؤال تشریحی برگزار خواهد شد.

پیشنیاز: ژنتیک

مروری بر عناوین برنامه آموزشی :

- آشنایی با روش های استخراج RNA/DNA و کار با یک روش
- آشنایی با روش های سنتز cDNA و کار با یک روش
- آشنایی با طراحی پرایمر
- آشنایی با انواع تکنیک های PCR و کاربرد آنها در تشخیص آزمایشگاهی
- آشنایی و کار با الکتروفورز و تفسیر نتایج حاصل
- آشنایی با PCR-Time Real و کاربرد آنها در تشخیص آزمایشگاهی
- معرفی و آشنایی با اصول و کاربردهای RNA Micro، Prob ها و FISH و انواع بالتینگ
- معرفی و آشنایی با اصول و کاربردهای تعیین توالی DNA و میکروآرایه ها و تراشه در آزمایشگاه و ...
- معرفی و آشنایی با اصول و کاربردهای نانوبیوتکنولوژی در روش های آزمایشگاهی
- آشنایی با طراحی و ساخت کیت های آزمایشی و سایر محصوالت آزمایشگاهی

اهداف اختصاصی (در حیطه های شناختی، روانی – حرکتی، عاطفی):

دانشجو قادر باشد:

-انواع روشهای لیز سلول را توضیح دهد.

- استخراج RNA در آزمایشگاه را به روش دستی و توسط کیت شرح دهد.

-استخراج DNA در آزمایشگاه را روش دستی و توسط کیت شرح دهد.

-مزایا و محدودیت استفاده از پرایمر (oligo(dt را بیان نماید

-مزایا و محدودیت استفاده از پرایمر Random hexamer را بیان نماید

-اصول PCR را توضیح دهد.

- اجزاء PCR را توضیح دهد.

- انواع PCR را نام ببرد.

- کاربردهای PCR را بیان کند.

-توالی نوکلئوتیدی رشته DNA ژن مورد بررسی را از پایگاه های اطلاعاتی استخراج نماید.

-توالی نوکلئوتیدی رشته RNA حاصل از بیان ژن مورد بررسی را از پایگاه های اطلاعاتی استخراج نماید.

-مشخصات یک پرایمر ایده آل را عنوان نماید.

-با نرم افزارهای موجود کیفیت یک پرایمر را بررسی کند.

-با توجه به سایز محصول PCR و اندازه ژل مورد نظر مقدار مناسب از آگار را محاسبه نماید.

-اصول و مکانسیم حرکت و قرار گیری باند ها را شرح دهد.

-دلیل استفاده از Loading Dyeو Safe DNA Gel stain را بیان نماید.

-از عهده کار با دستگاه هایی مانند سانتریفیوژ (تنظیم سرعت و دما و برودت و brake accelerator) برآید.
-خوانش کیت و عمل به نکات اشاره شده در تئوری جهت بهبود میزان و کیفیت محصول استخراج شده
-لایه های جداشده در حین استخراج را تشخیص و جداسازی نماید.
-از عهده کار با دستگاه هایی مانند نانودراپ برآید.
-غلظت لازم از RNA، جهت ساخت cDNA را محاسبه نماید.
-برنامه ساخت cDNA را در دستگاه ترمال سایکلر ایجاد و اجرا کند.
-برنامه ساخت cDNA را در دستگاه ترمال سایکلر ایجاد و اجرا کند.
-ژل آگارز برای الکتروفورز تهیه کند.
-نمونه ها را در چاهک ژل الکتروفورز لود کند.
-باندهای الکتروفورز تفسیرنمایند.
- مکانیسم کار دستگاه ریل تایم PCR را شرح دهد.
- انواع روش های ریل تایم PCR را شرح دهد.
- اپراتوری دستگاه ریل تایم PCR را شرح دهد.
- نحوه استخراج داده ها را بیان کند.
- آنالیز اولیه نتایج را با نرم افزار دستگاه شرح دهد.
- متد ملکولی Microarray را شرح دهد.
- روش FISH بعنوان شناساگر و کاربردهای آن را در حیطه های مرتبط را شرح دهد.
-انواع پروب های ملکولی، پروب های مرتبط با ریل تایم PCR را شرح دهد.
- مکانیسم و اصول کار دستگاه های مختلف تعیین توالی آشنایی را شرح دهد.
- کاربردهای تعیین توالی را شرح دهد.
- با نرم افزارهای مرتبط با تعیین توالی کار کند.
- انواع کاربردهای نانوتکنولوژی را در بیولوژی ملکولی را شرح دهد.
- مثالهایی از انواع روشهای مبتنی بر نانو فراگیری را بیان کند.
-اصول کلی طراحی کیتهای ملکولی و چالش های آن را شرح دهد.
- کارکرد اصلی تست وسترن بلات را فراگیری کند و بتواند از بین دیگر تستهای مشابه در موارد لازم آن را شرح دهد.
- مکانیسم و روش کار را با جزئیات را شرح دهد.

روش ارزشیابی:

شامل:
ارزشیابی پایانی شامل امتحان کتبی ۱۷ نمره
ارزشیابی تکوینی شامل حضور و غیاب ۱ نمره
و پاسخ به پرسشهای مرتبط با جلسه فعلی و درس قبل و انجام تکالیف محوله ۲ نمره

فهرست منابع اصلی مورد استفاده در این درس به طور کامل:

1. Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology A Practical Lab ManualAuthors: Khalid Z.Masoodi, Sameena Maqbool Lone and Rovidha Saba Rasool 2021
2. Principles of gene manipulation and genomics. Primrose- 2016
3. Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction, 8th Edition. T. A. Brown, ISBN: 978-1-119-64078-3 2020
4. کتاب تکنیک های پیشرفته مولکولی انتشارات جعفری نوین ۱۳۹۵

جدول زمان بندی

جلسه	تاریخ برگزاری	موضوع جلسه
جلسه اول	۱۴۰۲/۱۱/۳۰	اصول و روش های استخراج RNA and DNA
جلسه دوم	۱۴۰۲/۱۲/۰۷	اصول و روش های استخراج RNA and DNA
جلسه سوم	۱۴۰۲/۱۲/۱۴	اصول و روش های سنتز cDNA
جلسه چهارم	۱۴۰۲/۱۲/۲۱	اصول و مبانی PCR و انواع PCR
جلسه پنجم	۱۴۰۳/۰۱/۲۰	اصول و مبانی PCR و انواع PCR
جلسه ششم	۱۴۰۳/۰۱/۲۷	طراحی پرایمر و بررسی انواع پرایمرها
جلسه هفتم	۱۴۰۳/۰۲/۰۳	الکتروفورز ژل
جلسه هشتم	۱۴۰۳/۰۲/۱۰	استخراج RNA به روش دستی واستخراج DNAتوسط کیت

جلسه اول : اصول و روش های استخراج RNA and DNA

استخراج آرانای فرآیندی است که طی آن آرانای (RNA) کل موجود در یک نمونه هموژنیزه شده سلولی جدا و تصفیه می‌شود. این روش آزمایشگاهی در بیوتکنولوژی، مهندسی ژنتیک و... کاربرد ویژه‌ای دارد و یکی از پیشنیازهای ضروری در فرآیندهایی همچون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و RT-PCR ، نورترن بلاتینگ و دیگر روشها می‌باشد.

مراحل استخراج

۱. برداشت بافت

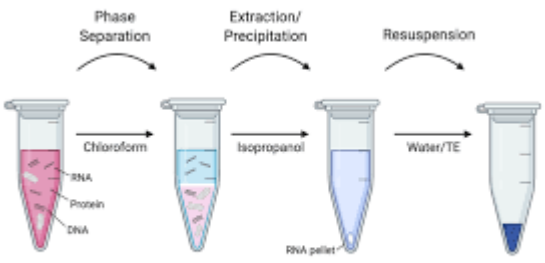
۲. همگن سازی

۳. جداسازی فازها

۴. رسوب سازی

۵. شستشو

۶. محلول سازی



واژگان نا آشنا :

Integrity ،Aqueous phase ،Lysis buffer

فعالیتهای دانشجو در ارتباط با یادگیری:

برای مطالعه بیشتر به کتاب Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology A Practical Lab صفحات ۳۵ الی ۴۲ و کتاب تکنیک های پیشرفته مولکولی صفحات ۲۹ الی ۳۳ رجوع کن سپس به سوالات زیر پاسخ بده.

- حداقل سلول مورد نیاز جهت یک استخراج RNA چند سلول می باشد؟
- بیشترین نوع از RNA های سلولی را نام برید؟

برای آزمودن خودت در این درس از کتاب تست بانک سوالات ایران (IQB) خون شناسی گروه تألیفی دکتر خلیلی کمک بگیر.

_ دلیل اضافه کردن کلروفورم حین استخراج RNA چیست؟

_ اضافه کردن کدام ماده حین استخراج دستی سبب رسوب نهاییRNA می شود؟

به خاطر داشته باشید:

مرحله over night در طی مراحل استخراچ RNA سبب بالا بردن کیفیت و مقدار RNA استخراج شده می باشد.

در صورت کم بودن حجم RNA می توان جهت استخراج از گلیکوژن استفاده کرد.

یادداشت های دانشجو:

.....

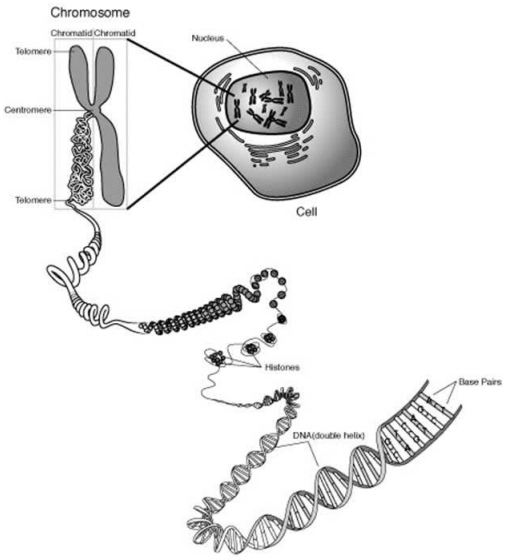
جلسه دوم : اصول و روش های استخراج RNA and DNA

استخراج DNA برای آنالیز ژنتیکی آن به منظور اهداف علمی، پزشکی و جنایی، ضروری است. دانشمندان از DNA استخراج شده در مواردی همچون وارد کردن DNA بیگانه به درون سلول‌ها و یا در تشخیص استفاده می‌کنند. در پزشکی این کار ارزش تشخیصی دارد. در امور جنایی از DNA استخراج شده در تعیین هویت افراد استفاده می‌شود.

شامل دو روش:

روش های مبتنی بر محلول با استفاده از حلال های آلی

روش های مبتنی بر روش نمک زدایی



واژگان نا آشنا :

Purification ،ion-exchange chromatography ،Precipitation

فعالیتهای دانشجو در ارتباط با یادگیری:

برای مطالعه بیشتر به کتاب Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology A Practical Lab صفحات ۱۸ الی ۳۵ و کتاب تکنیک های پیشرفته مولکولی صفحات ۲۴ الی ۲۸ رجوع کن سپس به سوالات زیر پاسخ بده.

- حداقل سلول مورد نیاز جهت یک استخراج DNA چند سلول می باشد؟
- دمای مناسب برای انجام مراحل کار و نگهداری نهایی DNA و RNA چقدر است؟

برای آزمودن خودت در این درس از کتاب تست بانک سوالات ایران (IQB) خون شناسی گروه تألیفی دکتر خلیلی کمک بگیر.

_ دلیل اضافه کردن دترجنت ها حین استخراج DNAچیست؟

_ جذب متفاوت در برار نور UVچگونه می تواند در کنترل کیفی محصول نهایی کمک کننده باشد؟

به خاطر داشته باشید:

مواد شیمیایی مانند EDTAیون های Mg2 را که برای حفظ ساختار کلی غشای سلولی ضروری هستند، از بین می برد. بهترین نمونه برای جداسازی DNA نمونه خون تام منعقد نشده بوده که از EDTA10% بعنوان ضد انعقاد استفاده شده باشد

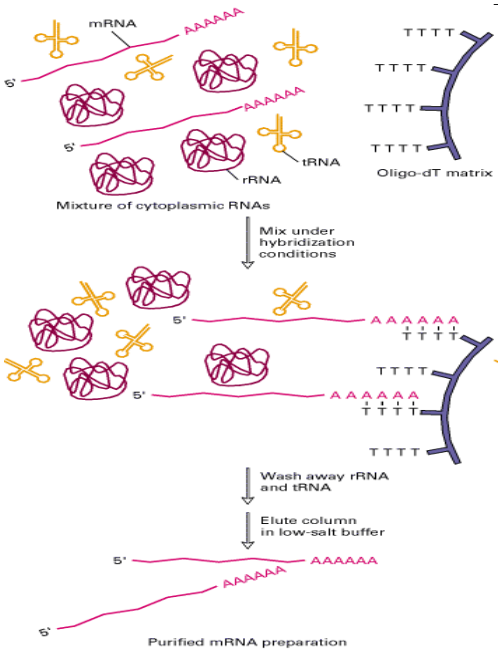
یادداشت های دانشجو:

.....

جلسه سوم : اصول و روش های سنتز cDNA

اولین مرحله بیان ژن رونویسی یا به عبارتی دیگر transcription نامیده میشود که بخشی از یک رشته RNA از رشته الگوی DNA ساخته می‌شود. این واکنش توسط آنزیمی به نام RNA پلیمراز کاتالیز می‌شود. رشته RNA سنتز شده به صورت موازی، معکوس و مکمل DNA رشته الگو است. بخش‌هایی از رشته DNA که توالی RNA را رمز گذاری می‌کنند، تحت عنوان واحدهای رونویسی شناخته می‌شوند که می‌توانند بیش از یک ژن را در بر داشته باشند. رونوشت RNA می‌تواند به صورت RNA پیام رسان در مکانیسم‌های سنتز پروتئین استفاده شود یا در سایر مکانیسم‌های متفاوت سلولی وارد عمل شودRNA .های عملکردی و غیر کد کننده می‌توانند به صورتRNA های انتقال دهنده یا RNA های ریبوزومی فعالیت کنند یا تبدیل بهRNA های تنظیمی مانند RNAi یا RNA مداخله کننده برای تنظیم بیان ژن و تشکیل هتروکروماتین شوند. هتروکروماتین‌ها ساختاری متراکم از DNA هستند که در این حالت رونویسی از DNA انجام نمی‌شود .مراحل سنتز cDNA به این صورت است که ابتدا نمونه های حاوی RNA به داخل تیوب برده می شوند در حلال آبی که RNA حل می شود نباید RNAase وجود داشته باشد. سپس به تیوب ها پرایمرها اضافه می شوند. در مرحله بعد باید نمونه ها در دستگاه های سیکل حرارتی و به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گیرند.

.



واژگان نا آشنا :

Normalization ،Random hexamer ،Oligo Dt

فعالیتهای دانشجو در ارتباط با یادگیری:

برای مطالعه بیشتر به کتاب Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology A Practical Lab صفحات ۳۸ الی ۴۵ و کتاب تکنیک های پیشرفته مولکولی صفحات ۳۰ الی ۳۹ رجوع کن سپس به سوالات زیر پاسخ بده.

- مزایا و محدودیت استفاده از پرایمر oligo(dt) را بیان نمایید؟
- مزایا و محدودیت استفاده از پرایمر hexamer Random را بیان نماید؟

برای آزمودن خودت در این درس از کتاب تست بانک سوالات ایران (IQB) خون شناسی گروه تألیفی دکتر خلیلی کمک بگیر.

_ چگونه می توان در حین سنتز DNA فقط mRNA ها رابه DNAتبدیل کرد؟

_ chill on ice حین سنتز cDNA چه کابردی دارد؟

به خاطر داشته باشید:

بهتر است سنتز cDNA بلافاصله بعد از استخراج RNA انجام گیرد.

مراحل سنتز بهتر است مطابق بادستور العمل شرکت سازنده cDNA انجام گیرد. .

یادداشت های دانشجو:

.....

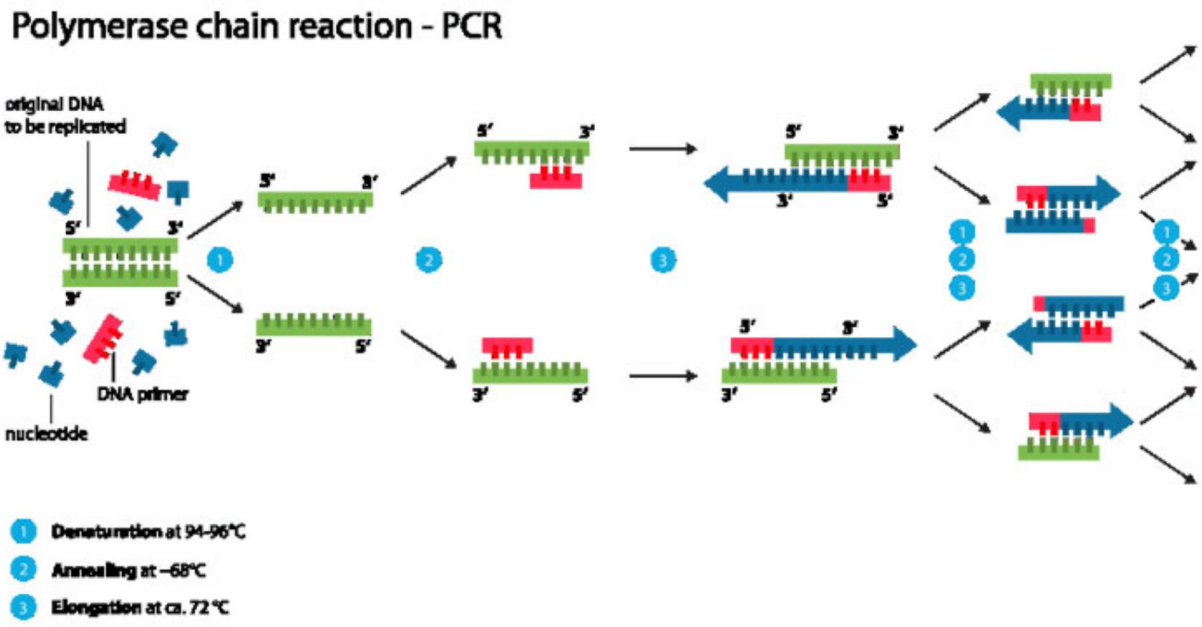
جلسه چهارم : اصول و مبانی PCR و انواع PCR

تکنیک پی سی آر چیست؟

واکنش زنجیره ای پلی مراز یا به طور خلاصه پی سی آر تکنیکی است که با استفاده از آن می توان در مدت زمان کوتاهی قطعه خاصی از مولکول DNA را در شرایط آزمایشگاهی میلیونها بار تکثیر نمود این قطعه DNA ممکن است یک ژن بخشی از یک کروموزوم یا بخشهایی از ژنوم یک موجود باشد. اگر واکنش پلیمریزاسیون در محیط آزمایشگاه در حضور آنزیم پلیمراز صورت بگیرد و منجر به تولید قطعه ای بزرگتر از ۵ نوکلئوتید شود به آن PCR اطلاق میشود البته در تکثیر DNA با روش PCR محدودیتهایی نیز وجود دارد مهم ترین آن اندازه قطعات قابل تکثیر میباشد. به طوری که حداکثر اندازه قطعه هایی که با روش PCR معمولی تکثیر می،گردد ۵ هزار نوکلئوتید (kb۵) و در روشهای بهینه شده تا ۲۰ هزار نوکلئوتید (kb۲۰) میباشد

تاریخچه تکنیک پی سی آر

در سال ۱۹۷۱ خورانا و همکارانش روشی را برای همانند سازی یک ناحیه از DNA دو رشته ای با استفاده از دو پرایمر ساخت DNA گزارش نمودند که در آن انتهای دو پرایمر به سمت یکدیگر طراحی شده بود . ولی ایده استفاده از این خاصیت به صورت چرخه های تکراری در یک واکنش تکثیر تا ۱۲ سال بعد ارائه نشد.



واژگان نا آشنا :

Extension ،Anneling ،Denatration

فعالیتهای دانشجو در ارتباط با یادگیری:

برای مطالعه بیشتر به کتاب Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology A Practical Lab صفحات ۴۶ الی ۹۶ و کتاب تکنیک های پیشرفته مولکولی صفحات ۴۰ الی ۸۴ رجوع کن سپس به سوالات زیر پاسخ بده.

دماهای مربوط به مراحل انجامPCR را با ذکر دلیل بیان کنید؟

جهت جلوگیری از خطای carry over چه راکاری پیشنهاد می کنید؟

برای آزمودن خودت در این درس از کتاب تست بانک سوالات ایران (IQB) خون شناسی گروه تألیفی دکتر خلیلی کمک بگیر.

_ تعداد کپی نامبر در هر سیکل چگونه محاسبه می گردد؟

_ نحوه محاسبه دمای anneling چگونه است؟

به خاطر داشته باشید:

DNA پلیمراز به دلیل دماهای بالا که در PCR استفاده می‌شود، باید نسبت به حرارت پایدار باشد.

اندازه DNA هدف برای PCR حداکثر ۳-۴ Kb می باشد.

غلظت های اولیه مناسب جهت انواع الگو در PCR

DNA الگو (۰.۵ - ۵۰ ng)

< ۰.۱ نانوگرم DNA پلاسمید

۵۰ نانوگرم تا ۱ میکروگرم gDNA (برای ژن های تک نسخه)

یادداشت های دانشجو:

.....

جلسه پنجم : اصول و مبانی PCR و انواع PCR

تغییر در روش پایه ای PCR منجر به پیشرفت و ایجاد انواع PCR شد که در زیر نام برده شده است

- پی سی آر ویژه آلل (Allele specific PCR (Tetra-primer ARMS PCR)

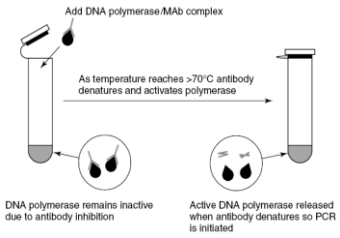
PCR ویژه آلل روشی است که به کمک آن می توان جهش نقطه ای در DNA را به صورت مستقیم شناسایی نمود. در این روش داشتن شناخت نسبت به توالی DNA هدف مانند تفاوت میان آلل ها ضروری بوده و نوعی پرایمر دارای انتهای ۳' ناجور که حاوی تغییرات تک نوکلئوتیدی است نیاز دارد. برای هر آلل SNP یک پرایمر ویژه طراحی شده که مکمل چندشکلی تک نوکلئوتیدی انتهای ۳' توالی مورد نظر می باشد. در هر صورت جهت شناسایی دو آلل از یک SNP دو واکنش پی سی آر مورد نیاز است.

- پی سی آر کلونی (Colony PCR)

از این روش به صورت معمول جهت مطالعه ژنوم باکتری ها استفاده می گردد. توسط این تکنیک کلونی های باکتریایی حاصل از القا پلاسمید با تکثیر بالا به آن ها غربالگری می گردند. این روش علاوه بر فراهم کردن میزان کافی از محصول PCR جهت توالی یابی به عنوان جایگزین روش غربالگری سنتی کلونی آبی و سفید استفاده می شود.

- پی سی آر هات استارت (Hotstart PCR)

تنها تفاوتی که این روش با PCR معمولی دارد اضافه شدن پلیمراز Taq به مخلوط واکنش در زمانی است که بقیه اجزای واکنش فوق تا دمای ذوب DNA گرما داده شده اند بدین ترتیب از تولید محصولات غیراختصاصی ممانعت می کند. در بعضی مواقع هم می توان از پلیمراز Taq متصل به مهارکننده هایی استفاده نمود که پس از رسیدن مخلوط واکنش به دمای ذوب Tm مهارکننده ها از آن جدا شده و آنزیم فعال می گردد.

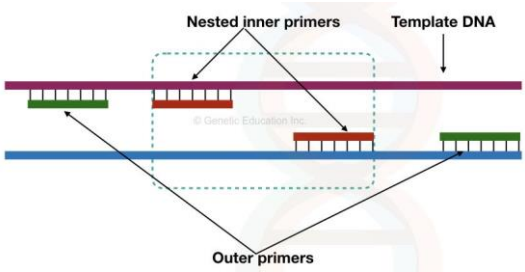


- پی سی آر چندگانه (Multiplex PCR)

از این روش در موارد مختلفی نظیر شناسایی و بررسی سریع حذف های ژنی، مضاعف شدگی ها، جهش ها و چندشکلی ها، ریز ماهواره ها و چندشکلی های تک نوکلئوتیدی (SNP) در ژن های بزرگ استفاده می گردد. در این روش در یک واکنش PCR از پرایمرهای مختلف برای تکثیر آمپلیکون در اندازه های مختلف و اختصاصی استفاده می شود؛ به گونه ای که چندین ژن مورد بررسی قرار می گیرد. همچنین آمپلیکون ها باید به اندازه کافی تفاوت اندازه داشته تا در ژل به راحتی قابل تفکیک و تشخیص باشد.

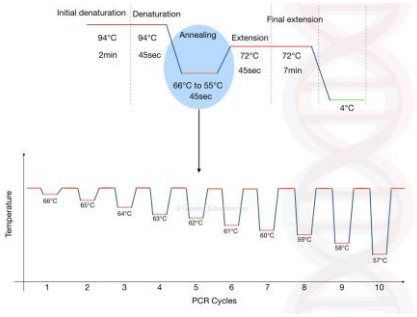
- پی سی آر آشیانه (Nested)

در این روش PCR از دو مرتبه PCR کاملاً مجزا جهت تکثیر توالی DNA استفاده می شود. به گونه ای که در یک مرحله از یک مجموعه پرایمر و در مرحله دوم از یک مجموعه پرایمر دیگر استفاده می گردد. در واقع هدف از این روش به حداقل رساندن تکثیر محصولات غیراختصاصی بوده و توالی مورد نظر دارای دو جایگاه هدف می باشد؛ به طوری که امکان وجود دو جایگاه اختصاصی در توالی ناخواسته نزدیک به صفر بوده و نتیجه نهایی یک محصول PCR بسیار خالص خواهد بود.



- پی سی آر تاچ داون (Touchdown)

از این تکنیک نیز در جهت کاهش حداکثری توالی های غیراختصاصی استفاده می گردد. در این روش پرایمرها در مراحل ابتدایی در حداکثر دمای ممکن به توالی هدف شان متصل می شوند. سپس دمای اتصال در مراحل بعدی به صورت تدریجی کاهش یافته که این روند امکان تکثیر انحصاری توالی اختصاصی مورد نظر را به ما می دهد. دمایی که حداقل مجاز جهت اتصال غیراختصاصی پرایمر به توالی هدف می باشد.



واژگان نا آشنا :

sensitivity ،non-specific ،hairpin" structure

فعالیتهای دانشجو در ارتباط با یادگیری:

برای مطالعه بیشتر به کتاب Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology A Practical Lab صفحات ۹۶ الی ۱۱۵ و کتاب تکنیک های پیشرفته مولکولی صفحات ۸۵ الی ۹۹ رجوع کن سپس به سوالات زیر پاسخ بده.

جهت بررسی جهش از کدام نوع از انواع PCR می توان استفاده نمود؟

در کدام یک از انواع PCR لزوما ۴ عدد پرانر نیاز است؟

برای آزمودن خودت در این درس از کتاب تست بانک سوالات ایران (IQB) خون شناسی گروه تألیفی دکتر خلیلی کمک بگیر.

_ تغییر دمای Tm به صورت مرحله ای دارد چگونه سبب اختصاصیت می شود؟

_جهت حذف باندهای غیر اختصاصی درمحصول PCR افزایش کدام مورد کارامد است؟

به خاطر داشته باشید:

plateau Effect در PCR معمولا از سیکل ۴۰ دیده می شود.

هر ناحیه از مولکول DNA را می توان تکثیر کرد مشروط به آنکه ردیف های بازی دو سوی آن معلوم باشد.

یادداشت های دانشجو:

.....

جلسه ششم : طراحی پرایمر و بررسی انواع پرایمرها

پرایمرها قطعات الیگو نوکلئوتیدی هستند که معمولا اندازه آنها بین ۱۸ تا ۲۴ نوکلئوتید است و یکی از مهم ترین اجزای واکنش PCR برای تکثیر قطعه مورد نظر می باشند. این توالی های آغازگر باید قبل از سنتز توسط نرم افزارهای بیوانفورماتیکی طراحی شوند که اصطلاحا طراحی پرایمر نام دارد.

جهت طراحی پرایمر توجه به نکات زیر اساسی و الزامی است.

طول پرایمر: به طور معمول، طول ۲۲-۱۸ نوکلئوتید برای یک پرایمر بهینه است. ...

دمای ذوب پرایمرها: ..

دمای اتصال(Anealing) پرایمرها: ...

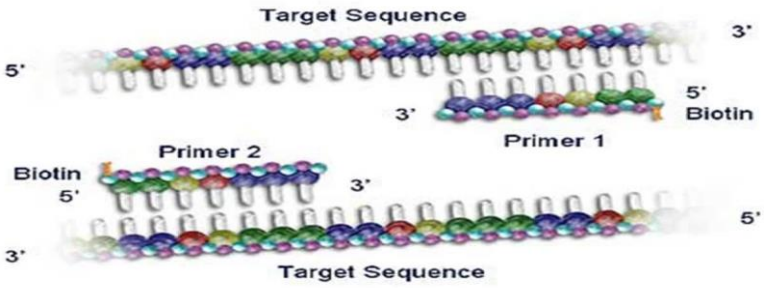
محتوای GC: ...

گیره GC یا... :(GC clamp)

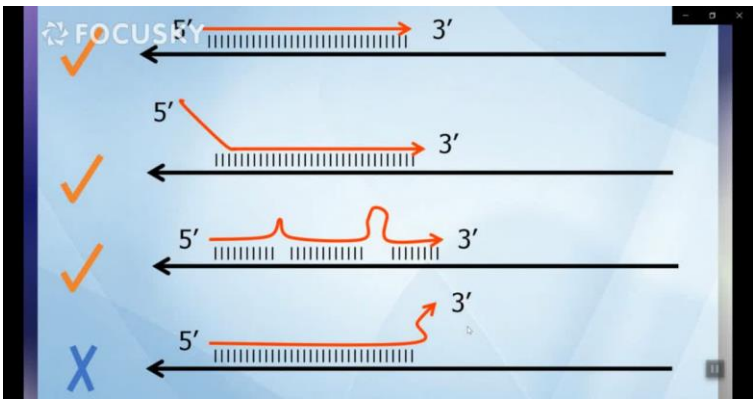
ساختار ثانویه پرایمر: ...

ساختارهای سنجاق سری(hairpins) : ...

از همولوژی متقابل دوری کنید



.



واژگان نا آشنا :

«اختصاصیت» (Specificity) ، «کارایی» (Efficiency)

فعالیتهای دانشجو در ارتباط با یادگیری:

برای مطالعه بیشتر به کتاب Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology A Practical Lab صفحات ۱۲۰ الی ۱۲۹ و کتاب تکنیک های پیشرفته مولکولی صفحات ۹۹ الی ۱۱۴ رجوع کن سپس به سوالات زیر پاسخ بده.

چند نرم افزار آنلاین جهت طراحی پرایمر نام ببرید؟

چرا میزان GC در طراحی پرایمر اهمیت دارد؟

برای آزمودن خودت در این درس از کتاب تست بانک سوالات ایران (IQB) خون شناسی گروه تألیفی دکتر خلیلی کمک بگیر.

_ چرا انتهای ۵ ´ در پرایمر از انتهای ۳ ´ مهم تر است؟

_اضافه کردن نوکئوتید جهت آنزیم محدود کننده از کدام سمت قابل قلول است؟

به خاطر داشته باشید:

در طراحی پرایمر مناسب تفاوت دمای tm پرایمر رفت و برگشت تا ۳ درجه سانتی گراد باشد.

در محاسبه Tm پرایمر تعدادنوکلئوتیدها ونوع نوکلئوتیدها تاثیر گذار است.

یادداشت های دانشجو:

.....

جلسه هفتم : الکتروفورز ژل

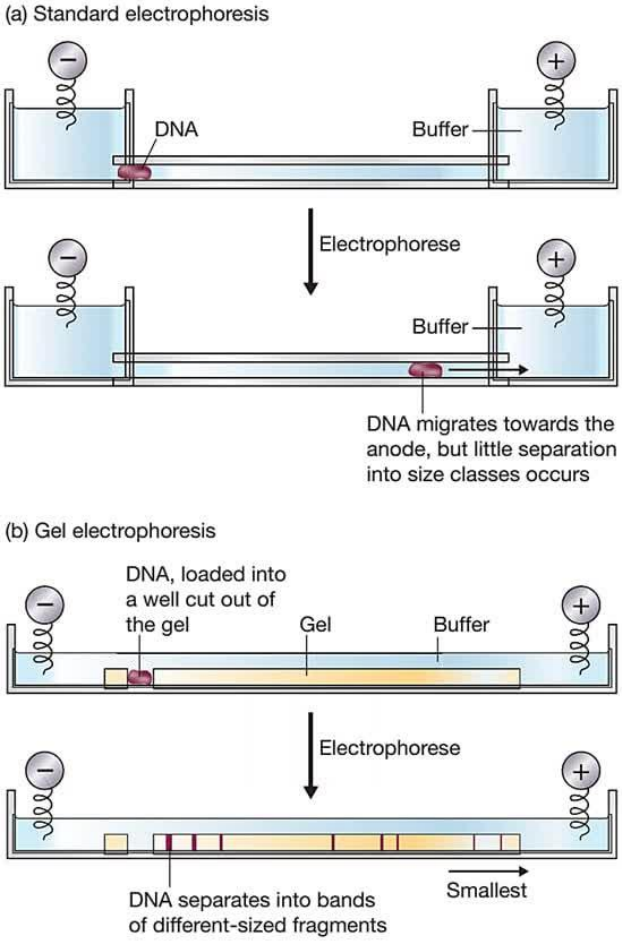
از روش های آزمایشگاهی مرسوم جهت جداکردن مولکولهای باردار تکنیک ژل الکتروفورز (Gel Electrophoresis) میباشد .این جداسازی با توجه به اندازه، بار و جرم مولکولی آنها انجام میگیرد. فرایند کلی این تکنیک به این صورت است که با برقراری جریان در ژل الکتروفورز ، دو سمت ژل دارای دو قطب مخالف مثبت و منفی میشود که باعث میشود مولکول های باردار به سمت قطب مخالف خود حرکت کنند.این عمل حرکت مولکول ها تحت اصطلاح " مهاجرت " شناخته شده است. دلیل این مهاجرت ساختار ماتریکس نفوذپذیر ژل است که مولکول‌ها را قادر میسازد از میان منافذ موجود در آن عبور و در طول ژل حرکت کنند.

اساس کار این تکنیک اعمال جریان الکتریکی است که منجر به جداسازی و شناسایی مولکول ها میشود . همان گونه که در بالا شرح دادیم کاربرد این روش در آزمایشگاه های مولکولی و بیوشیمی برای جداسازی مولکول‌های باردار مانند DNA،RNA و پروتئین است. ژلی که برای این تکنیک استفاده میشود از پودر آگاروز (آگارز) و یا پلی آکریلامید است . ساختار این ژل ها منفذ دار است و همین امر موجب میشود ، مولکول‌ها با اندازه‌های متفاوت به راحتی از آن عبور کند. برای کوچک یا بزرگ کردن این منافذ جهت حرکت مولکول های کوچکتر و یا بزرگتر ، میتوانیم غلظت ژل های مورد استفاده درالکتروفورز را کمتر و یا بیشتر کنیم.

کاربرد اصلی این متد در آزمایشگاه ها به دو بخش اصلی تقسیم میشود :

جداسازی مولکولهای DNA که یا بصورت استخراج شده هستند و یا محصول PCR ، ریل تایم و یا کلونیگ ژن

بررسی و مطالعه کیفیت محصول PCR



واژگان نا آشنا :

positive and negative electrode ،Safe DNA Gel stain ،loading dye

فعالیتهای دانشجو در ارتباط با یادگیری:

برای مطالعه بیشتر به کتاب Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology A Practical Lab صفحات ۱۲۹ الی ۱۳۴ و کتاب تکنیک های پیشرفته مولکولی صفحات ۱۱۴ الی ۱۱۶ رجوع کن سپس به سوالات زیر پاسخ بده.

-با توجه به سایز محصول PCR و اندازه ژل مورد نظر چگونه مقدار مناسب از آگار را محاسبه می شود؟

-اصول و مکانسیم حرکت و قرار گیری باند ها را شرح دهید؟

برای آزمودن خودت در این درس از کتاب تست بانک سوالات ایران (IQB) خون شناسی گروه تألیفی دکتر خلیلی کمک بگیر.

_ چگونه قطعات کوچکتر DNA می توانند در یک زمان معین بیشتر از قطعات بزرگتر حرکت کنند؟

_کابرد Ladder و محل مناسب آن بین نمونه ها در ژل الکتروفورز چگونه است؟

به خاطر داشته باشید:

سرعت مهاجرت یک مولکول در الکتروفورز استاندرد به دو عامل بستگی دارد ، یعنی شکل آن و نسبت بار به جرم آن .

در الکتروفورز استاندارد، قطعات با اندازه های یکسان را نمی توان جدا کرد.

DNA دارای یک اسید آلی است که دارای بار منفی است.

یادداشت های دانشجو:

.....

جلسه هشتم : استخراج RNA به روش دستی واستخراج DNA توسط کیت

Basic Steps in Isolating DNA from Clinical Specimens(whole blood)

Separate WBCs from RBCs

↓

Lyse WBCs or other nucleated cells

↓

Denature/digest proteins

↓

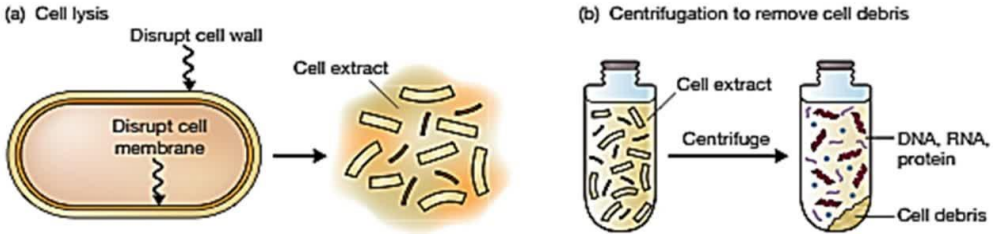
Separate contaminants (*e.g.*, proteins, heme) from DNA

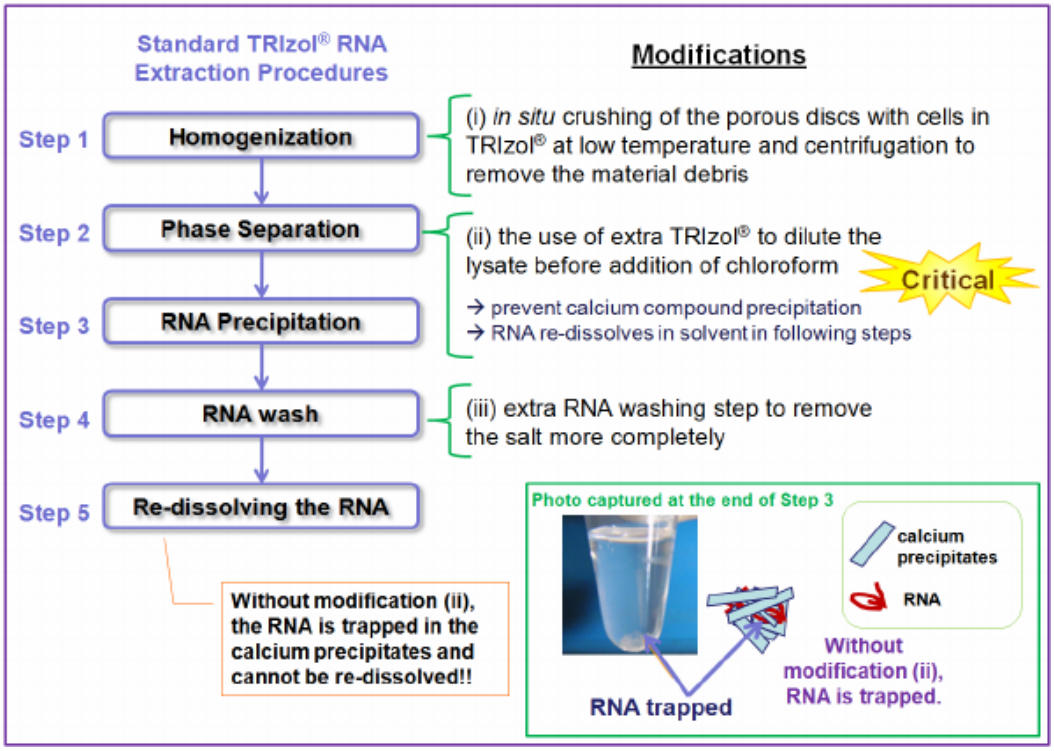
↓

Precipitate DNA if necessary

↓

Resuspend DNA in final buffer





واژگان نا آشنا :

RNAlater، پروتئین کینازA، UV Spectrophotometry

فعالیتهای دانشجو در ارتباط با یادگیری:

کاربرد ایزوپروپانول در مراحل استخراج RNA چیست؟
دور سانتریفیوژ و زمان آن را در پروسه استخراج RNA و DNA شرح دهید؟
استفاده از پروتئین کینازA در فرایند استخراج DNA به چه منظور انجام میگیرد؟

برای آزمودن خودت در این درس از کتاب تست بانک سوالات ایران (IQB) خون شناسی گروه تألیفی دکتر خلیلی کمک بگیر.

_ نگهداری سلولهای در نیتروژن مایع جهت جمع کردن نمونه ها قبل از استخراج کابردی است؟
_ در مرحله separation توسط کلروفرم در فرایند استخراج RAN چه تغییری می تواند سبب ایجاد دو لایه(RNA&DNA/ Protein)به جای سه لایه (RNA/DNA/ Protein) گردد؟
_حضور چه ماکری احتمال بدخیم بودن پلاسما سل را بالا می برد؟
- جهت بررسی غلظت DNA استخراج شده توسط اسپکتوفتومتر، خوانش کدام طول موج کاربرد خواهد داشت؟

به خاطر داشته باشید:

استخراج بلافاصله بعد از نمونه گیری سبب حفظ و بهبود کیفیت RNA در طی پروسه استخراج RNA می گردد.
نگهداری سلولهای بافت در نیتروژن مایع جهت جمع کردن نمونه ها قبل از استخراج کابردی است.
DNA را در بافر TE در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای هفته ها یا در دمای ۲۰- تا ۸۰- درجه سانتیگراد برای طولانی مدت نگهداری کنید

یادداشت های دانشجو:

.....