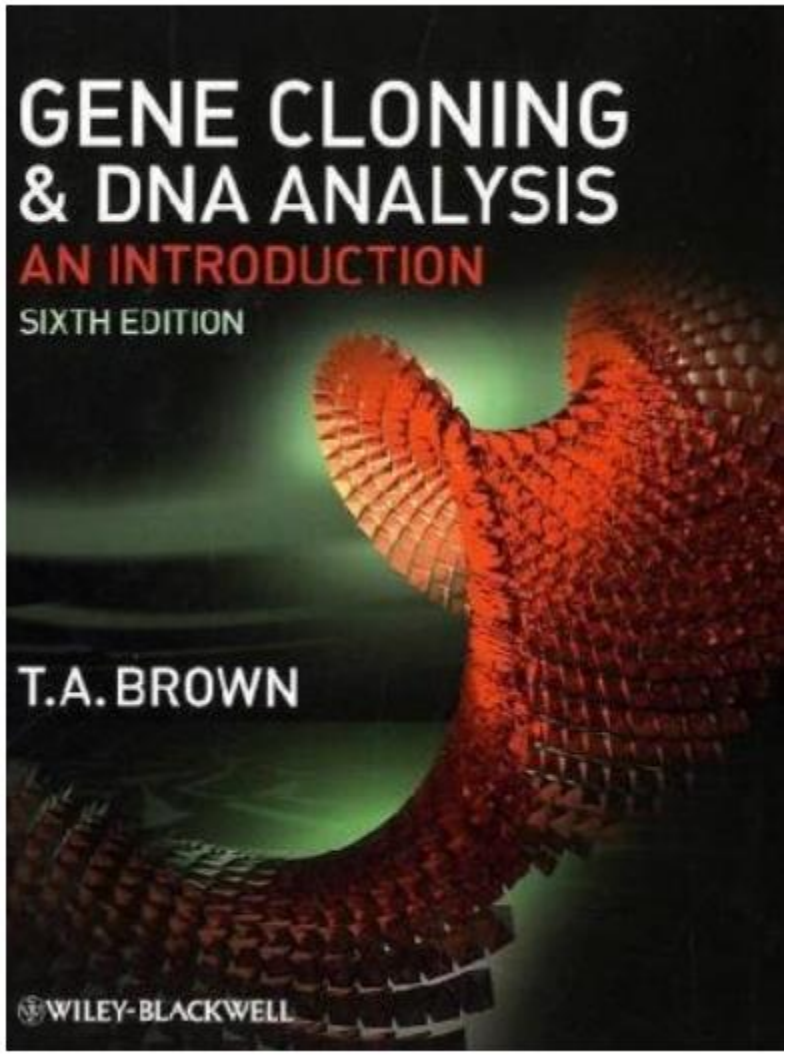


سرفصل های درس مهندسی ژنتیک

◄تاریخچه و کلیاتی از مهندسی ژنتیک

◄PCRو کاربردهای آن

◄کلونینگ و استراتژی های بکار گرفته شده برای کلون کردن انواع ژن های پروکاریوتی و یوکاریوتی

◄الکتروفورز و تنکنیک های بلاتینگ

◄خالص سازی پروتئین های نوترکیب

◄اساس ملکولی جهش های Invivo و invitro

◄متابولومیکس: واکاوی انواع متابولیت ها

موضوعات پیشنهادی سمینارهای کلاسی

◄پروتئومیکس و کاربردهای بالینی آن

◄ژنومیکس و کاربردهای بالینی آن

◄ متابولومیکس و کاربرد آن

◄کاربرد PCR در پزشکی قانونی

◄کاربرد PCR در علوم جنایی

◄کاربرد PCR در زیست ملکولی

◄کاربرد PCR در بیوتکنولوژی

◄کاربرد PCR در تعیین جنسیت

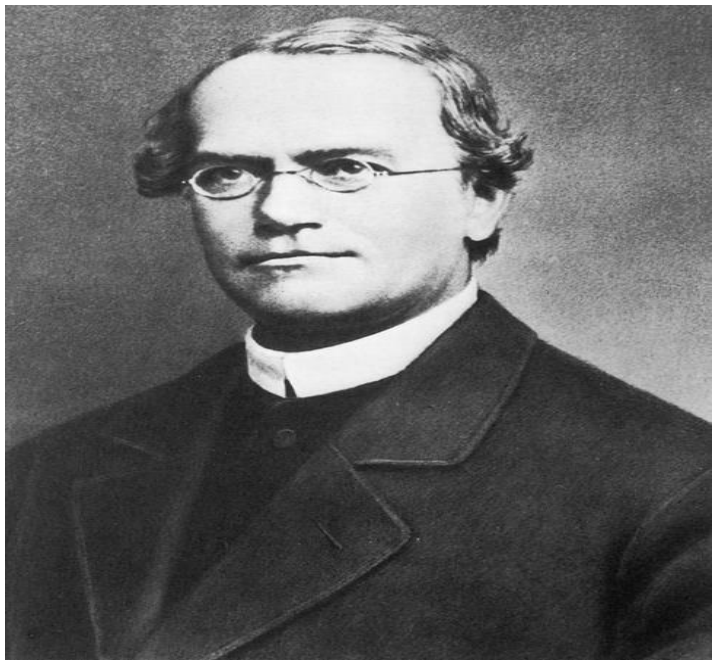
► CRISPR (سیستم ویرایش ژنی)

►Mega-Primer PCR Mutagenesis

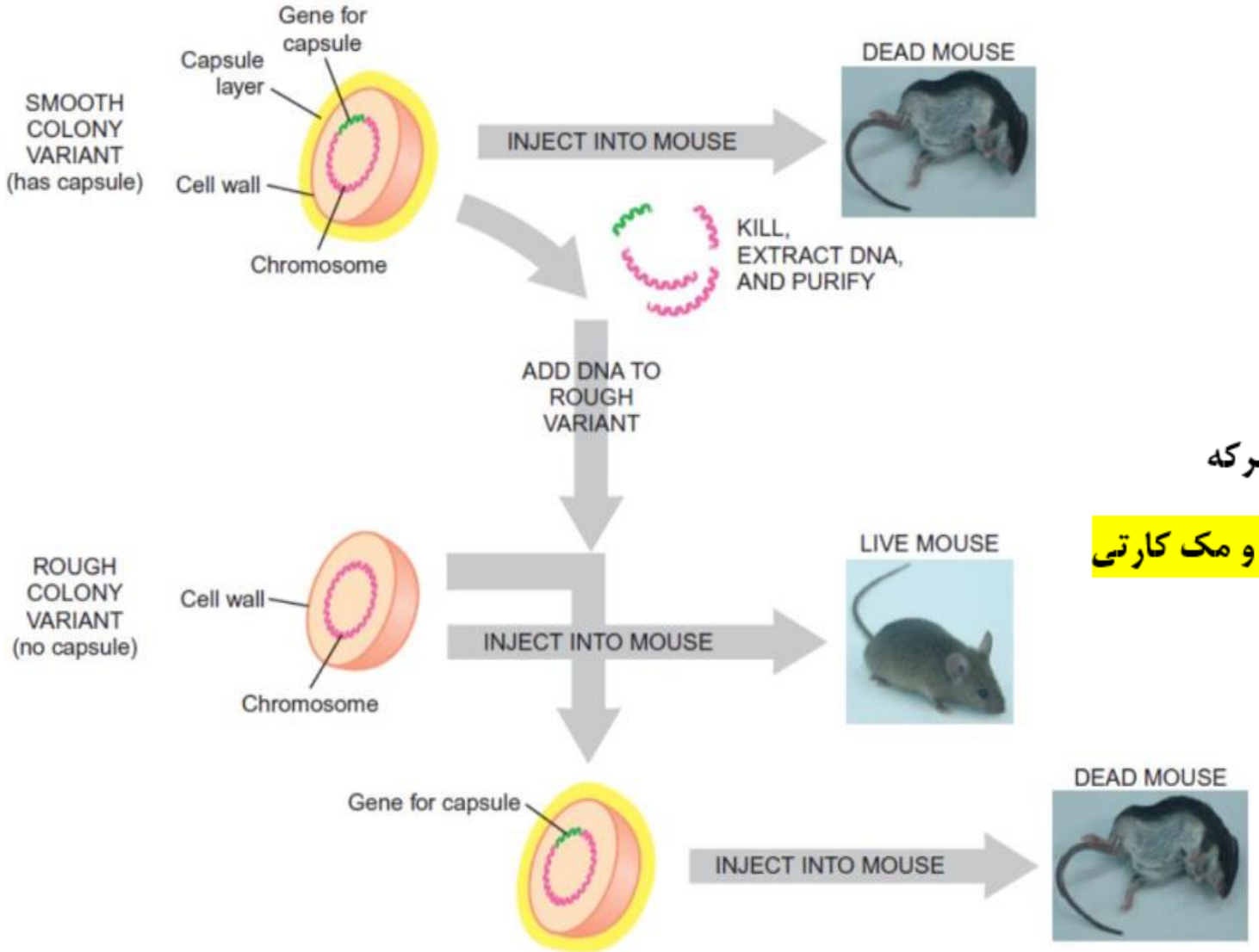
ژنتیک: علم انتقال اطلاعات ژنتیکی از یک سلول به سلول دیگر، از والد به نوزاد و بنابراین از یک نسل به نسل دیگر است.

مهندسی ژنتیک: مجوعه روش هایی که به منظور جداسازی، خالص سازی، وارد کردن و بیان یک ژن خاص در یک میزبان خاص بکار می رود و در نهایت منجر به بروز یک صفت خاص و یا تولید محصول مورد نظر در میزبان می شود.

کلونینگ: فرآیند تولید جمعیت های یکسان به لحاظ ژنتیکی



مندل (۱۸۶۶) : بنیانگذار و پدر علم ژنتیک: هر صفت قابل توارث جاندار توسط یک عامل فیزیکی کنترل می شود که در جایی از سلول یافت می شود.



Avery's Experiment

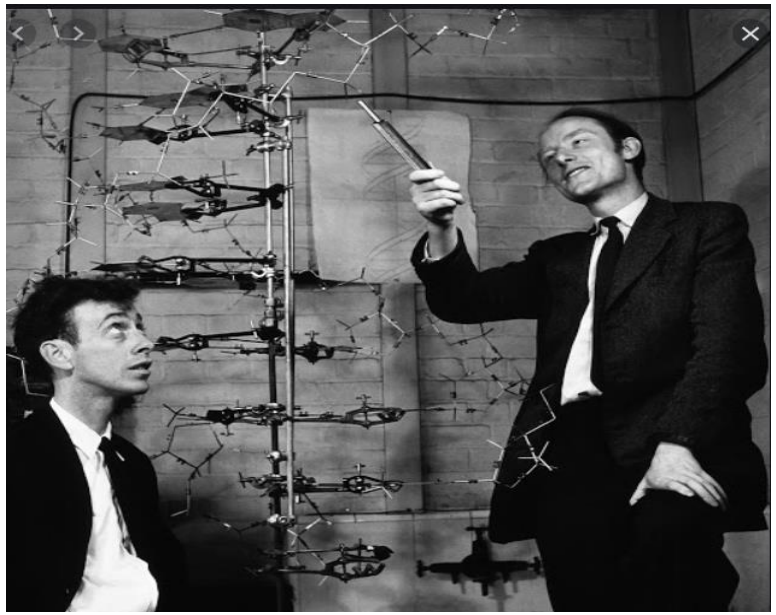
Avery isolated DNA from the virulent variant and added it to the rough variant of *S. pneumonia*. He noticed that the virulent DNA "transformed" or changed the rough variant into a smooth variant. To confirm that the bacteria were truly transformed, he exposed mice to the newly created smooth variants, and the mice died. Thus, the transformed bacteria had gained both the smooth appearance and virulence by taking up DNA from the original virulent strains.

ساتن (۱۹۰۳): ژن ها روی کروموزوم قرار دارند.

مورگان و همکارانش (۱۹۲۲): ابداع Genemapping و

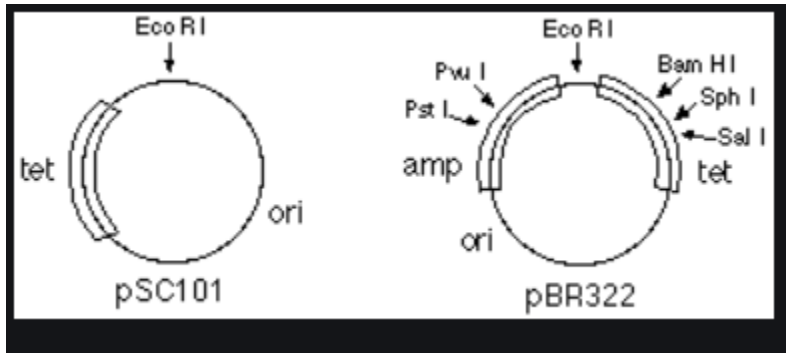
تعیین موقعیت بیش از ۲۰۰۰ ژن روی چهار کروموزوم مگس سرکه

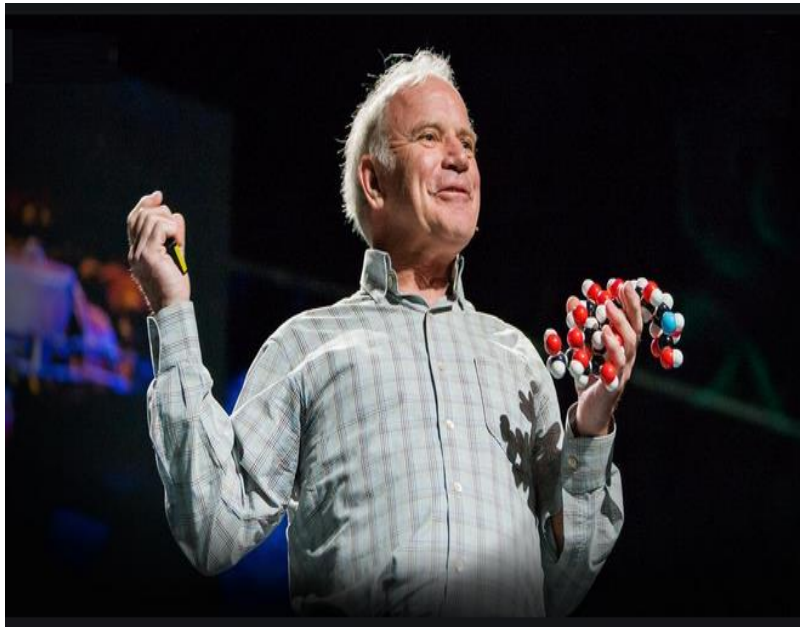
1944: اهمیت DNA به عنوان ماده ژنتیکی توسط آوری، مک لود و مک کارتی



۱۹۵۴: ارائه مدل ملکولی DNA بوسیله واتسون و کریک

۱۹۷۳-۱۹۷۱: پیدایش فناوری DNA نوترکیب توسط استنلی نورمن کوهن دانشمند آمریکایی با ساخت نخستین کلونینگ وکتور تحت نام pSC101





۱۹۸۳: ابداع تکنیک PCR توسط کری مولیس شیمیست آمریکایی و برنده نوبل شیمی ۱۹۹۰ برای اولین بار از این تکنیک در تشخیص بیماری کم خونی داسی شکل استفاده شد.

کاربردهای PCR:

تشخیص بیماری های عفونی باکتریایی و ویروسی

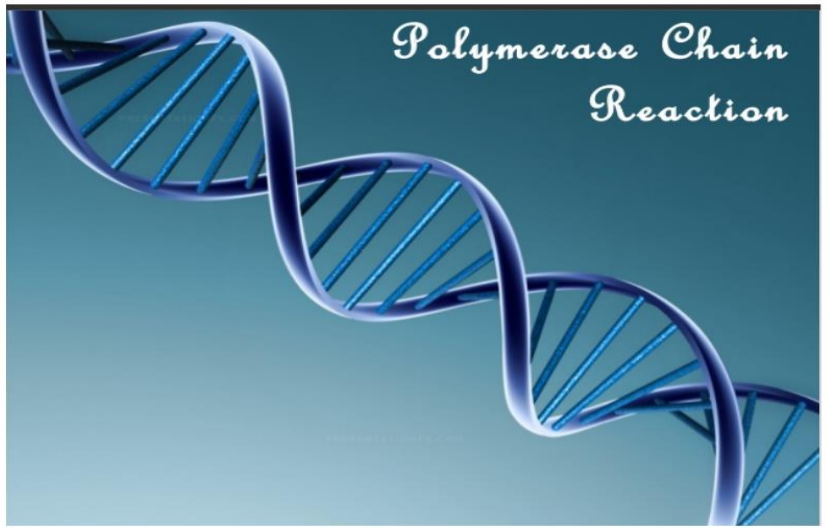
تشخیص بیماری های ژنتیکی

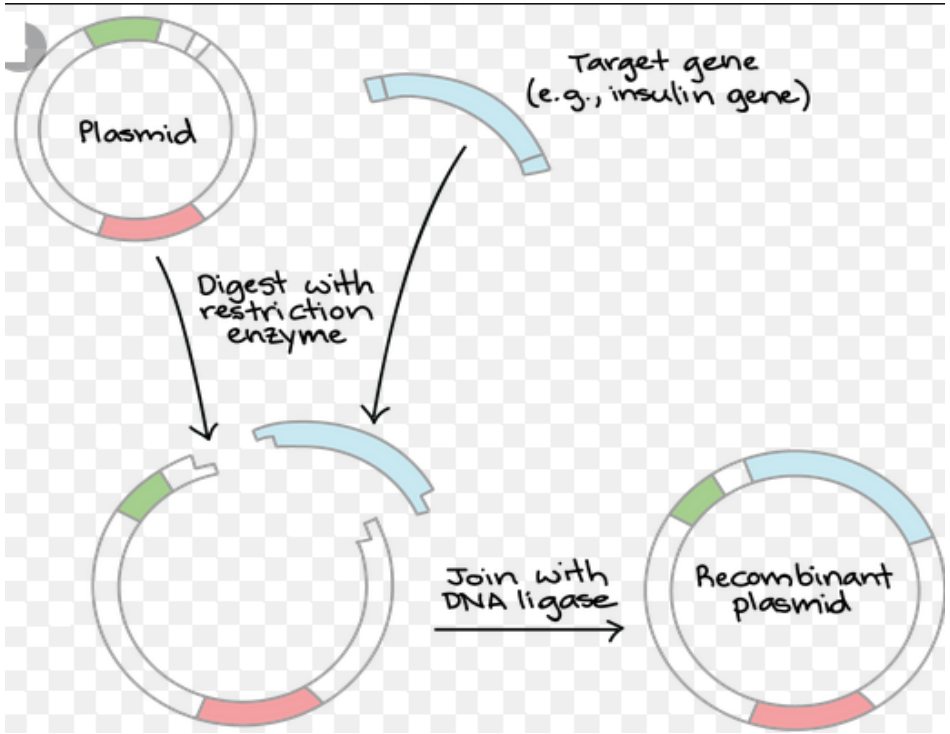
تحقیقات جنایی

بررسی Ancient DNA

جداسازی DNA ژنومی با اهداف کلونینگ

تعیین توالی





مزایا و معایب PCR و مقایسه آن با کلونینگ

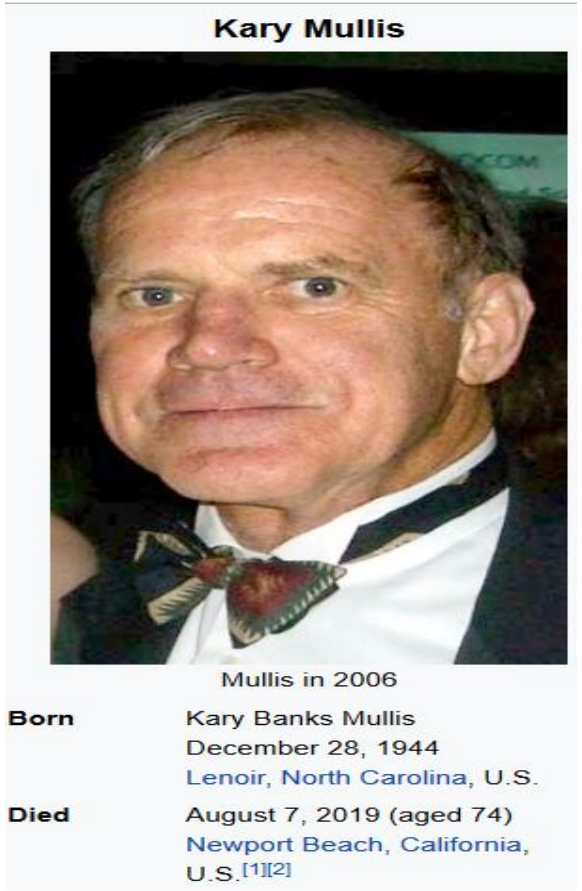
- تکثیر DNA در محیط عاری از سلول (invitro) ولی کلونینگ (invivo)
- در PCR مقادیر کم کفایت می کند اما در کلونینگ میلیون ها کپی لازم است
- کلونینگ هفته ها وقت لازم است ولی PCR ظرف چند ساعت
- در کلونینگ DNA باید کامل خالص ولی در PCR ضرورت ندارد
- در PCR نیازی به جدا کردن قطعه از محل استقرارش نیست ولی این محدودیت در کلونینگ وجود دارد.

محدودیت های PCR:

- محدودیت طول قطعه تکثیر شونده
- توالی دو طرف ژن باید مشخص گردد

PCR

American biochemist



PCR: 1985

Nobel Prize in Chemistry (1993)

اهداف کلی PCR

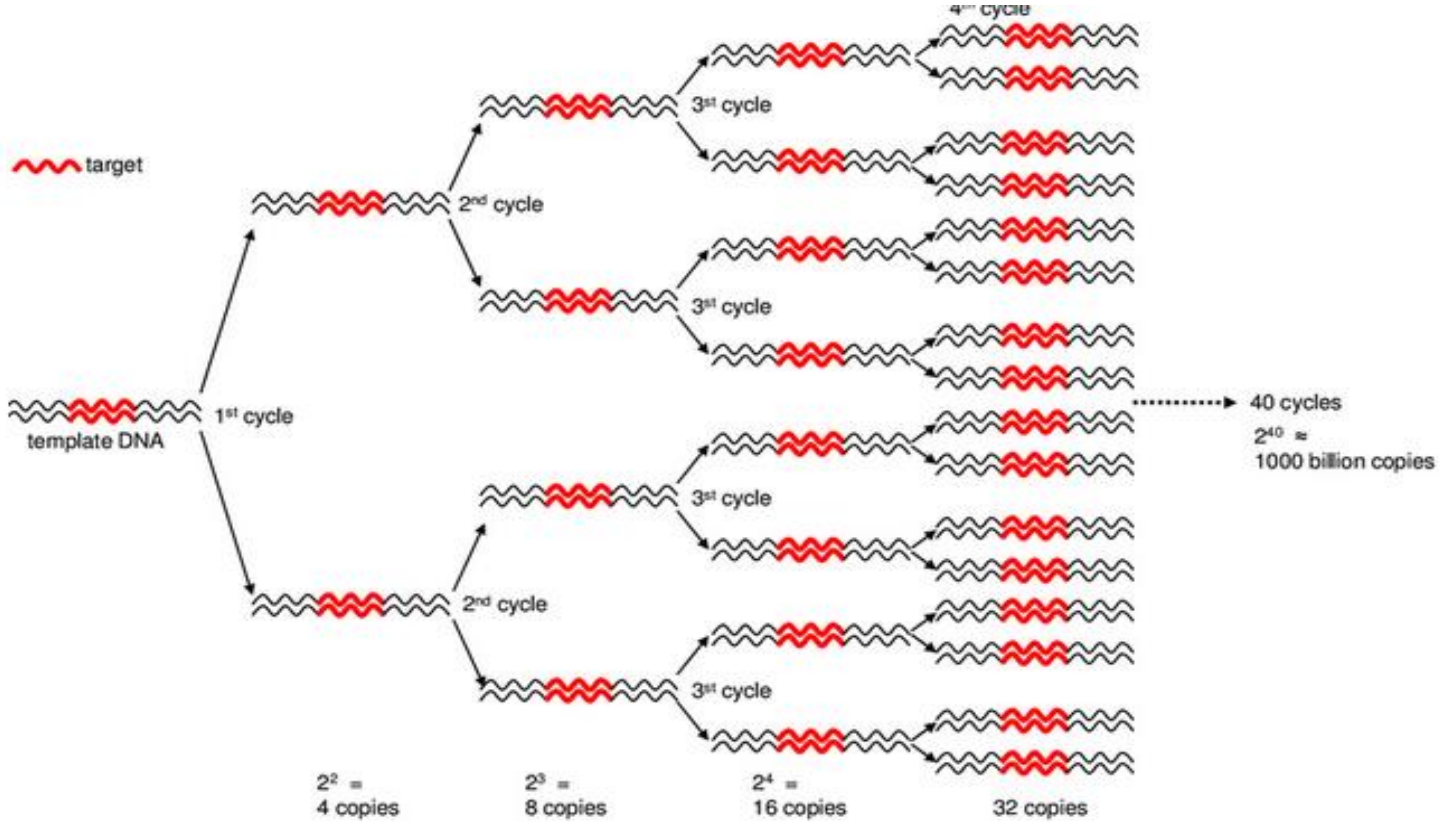
1. تهیه نسخه های متعدد از یک ژن (Amplicon): اهمیت در کلونینگ و جهش زایی
2. بررسی حضور یا عدم حضور یک ژن خاص: اهمیت تشخیص بیماری های عفونی و ژنتیکی

اصول تکنیک PCR:

1. Sensitivity
2. Specificity

میزان DNA ایجاد شده در PCR بستگی به عوامل زیر دارد:

1. تعداد سیکل های استفاده شده (۲۵ تا ۴۰ سیکل)
2. وجود مهار کننده های پلیمرازی
3. غلظت کاتیون مورد نیاز (Mg^{+2}) برای فعالیت آنزیم


target
template DNA
1st cycle
2nd cycle
2nd cycle
3st cycle
3st cycle
3st cycle
3st cycle
40 cycles
2^10 ≈
1000 billion copies
2^2 =
4 copies
2^3 =
8 copies
2^4 =
16 copies
32 copies

نیازمندی های واکنش PCR

1. PCR master mix (Taq DNA pol، dNTPs، Buffer solution، Mg^{+2})
2. DNA template
3. F/R primers
4. Water (nuclease free)

DNA polymerase

1. Taq DNA polymerase: *Thermus aquaticus* (g-, چشمه های آب گرم)

   مقاومت حرارتی: ۹۵ درجه به مدت ۴۰ دقیقه

   قابلیت پلیمریزاسیون ۱۰۰۰ جفت باز را در مدت ۳۰ ثانیه در دمای اپتیمم ۷۲ درجه دارد

   خاصیت Proof-reading در جهت ۵'–۳' را ندرد. محصول نهایی PCR (3'-overhange)

2. PFu: *Pyrococcus furiosus* (آرشی باکتر)

   مقاومت حرارتی: ۱۰۰ درجه به مدت ۴۰ دقیقه

   قابلیت پلیمریزاسیون ۱۰۰۰ جفت باز را در مدت ۳۰ ثانیه در دمای اپتیمم ۷۲ درجه دارد

   خاصیت Proof-reading در جهت ۳'–۵' را درد. محصول نهایی PCR (blunt end)

3.Dream Taq DNA polymerase

1.longer PCR products (20 kbp)

2.higher sensitivity

3.higher yields

4.Tth DNA polymerase

Thermus thermophiles strain HB-8

74°C: replication

95°C for 20 min

Polymerization duplex DNA 5-3 in the presence of Mg

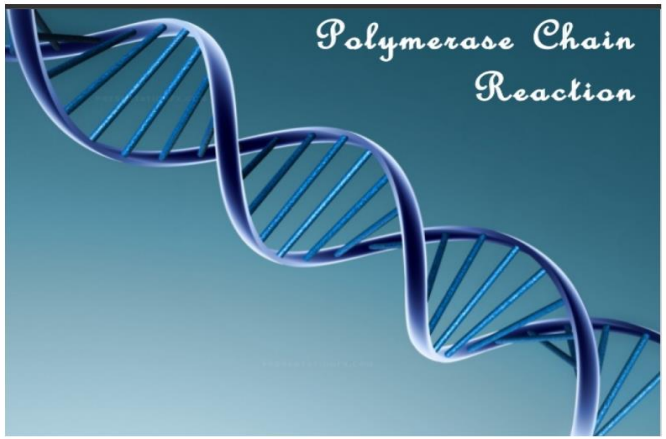
Polymerization RNA templete 5-3 in the presence of Mn

5.Hot start Taq polymerase

Minimize non-specific amplification products (primer dimers, background)

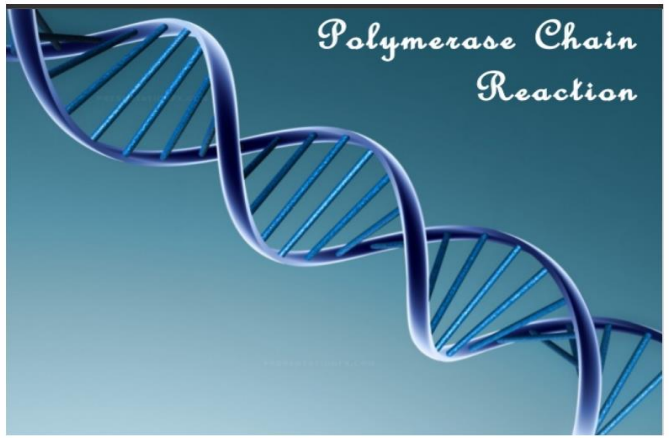
High-sensitivity

Suitable for GC-rich templates

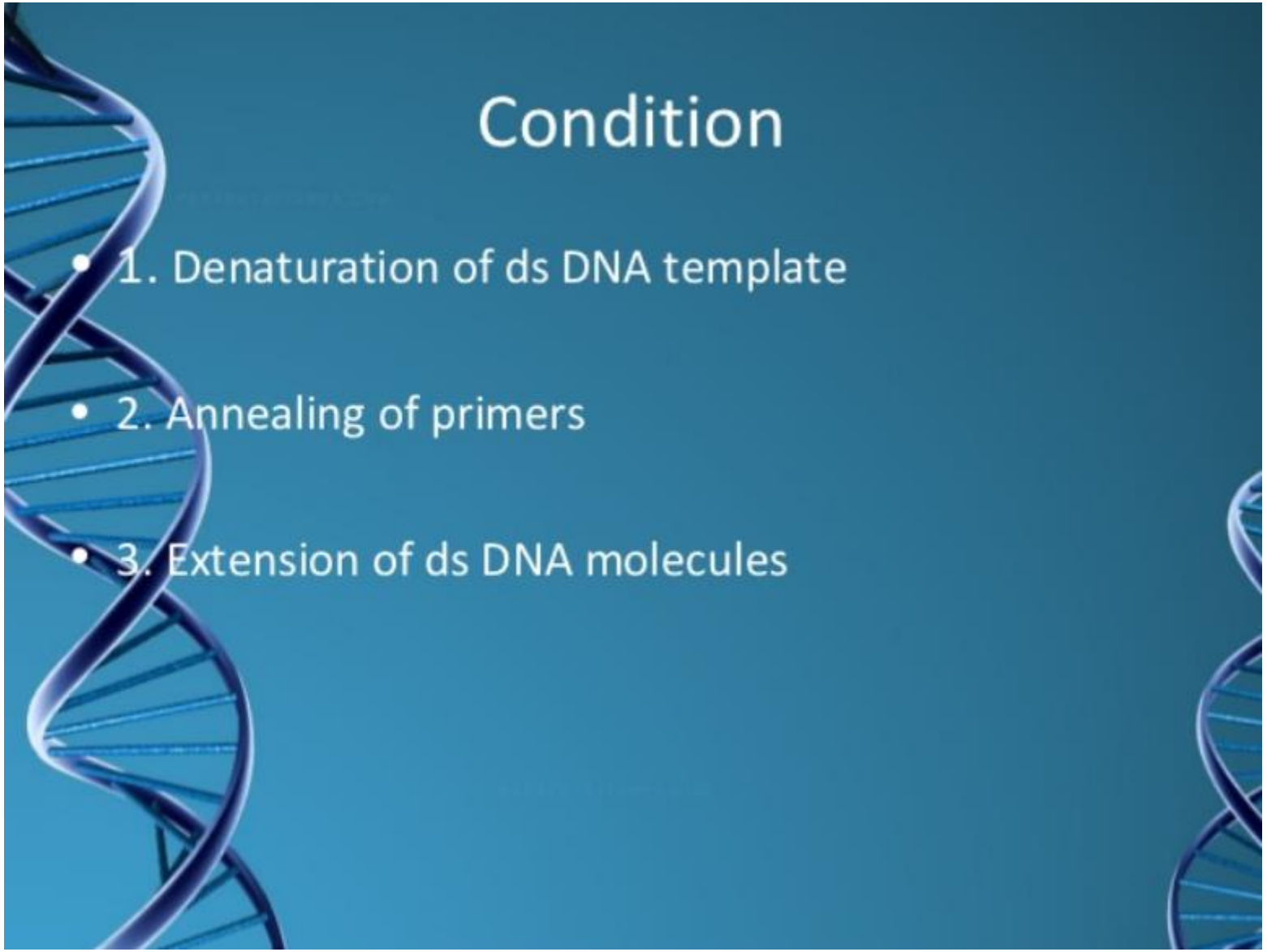


Mixture of Taq DNA pol + aptamer-based inhibitor

آپاتامر: اولیگونوکلئوتید سنتزی از DNA یا RNA که بصورت اختصاصی و با میل ترکیبی بالا به ملکول هدف متصل می شود. کار این بازدارنده این است که در دماهای زیر ۴۵ درجه به آنزیم متصل (برگشت پذیر) و مانع از فعالیت پلیمرازی می شود. این امر امکان انجام واکنش PCR را دمای اتاق محقق می سازد. مزیت دیگر این آنزیم این است که احتیاجی به مرحله فعال سازی آنزیم در دماهای بالا را ندارد.

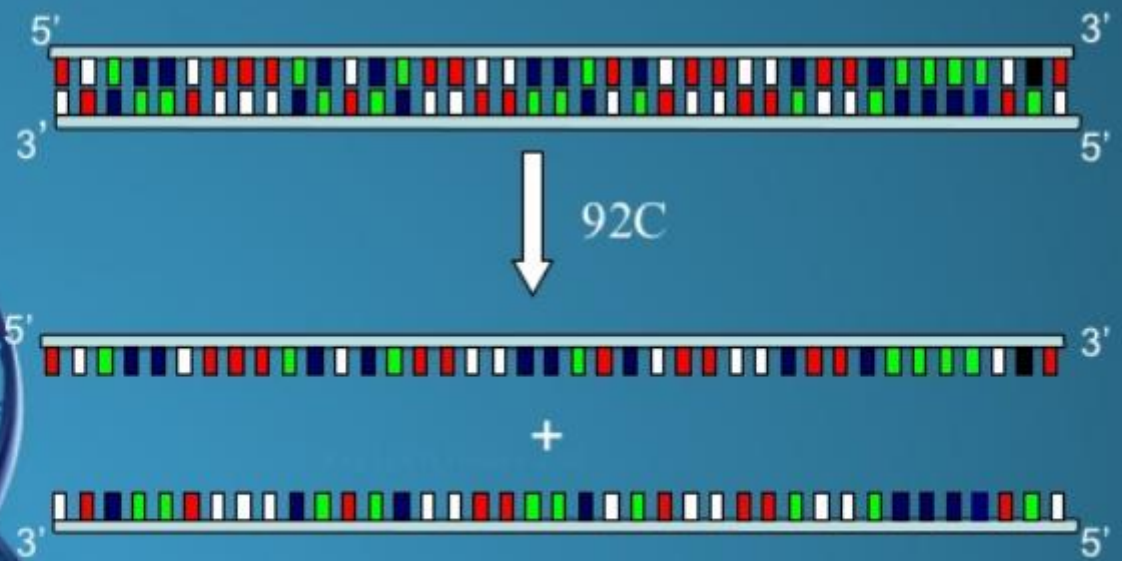


Cycling parameters



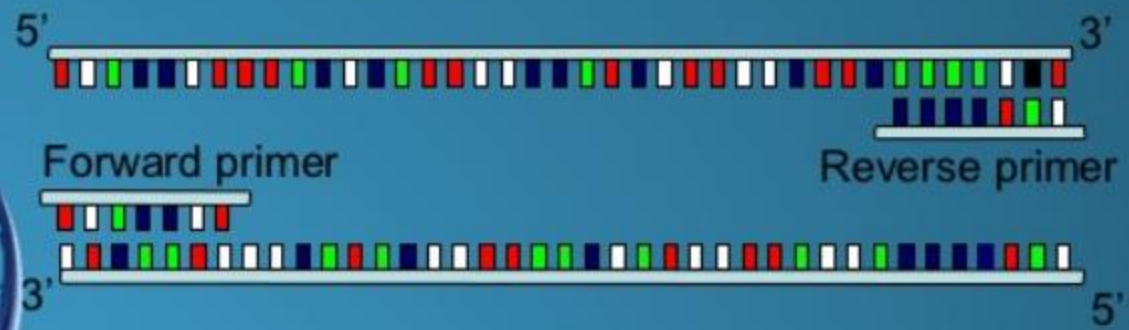
Denaturation

- Temperature: 92-94C
- Double stranded DNA melts ⟶ single stranded DNA



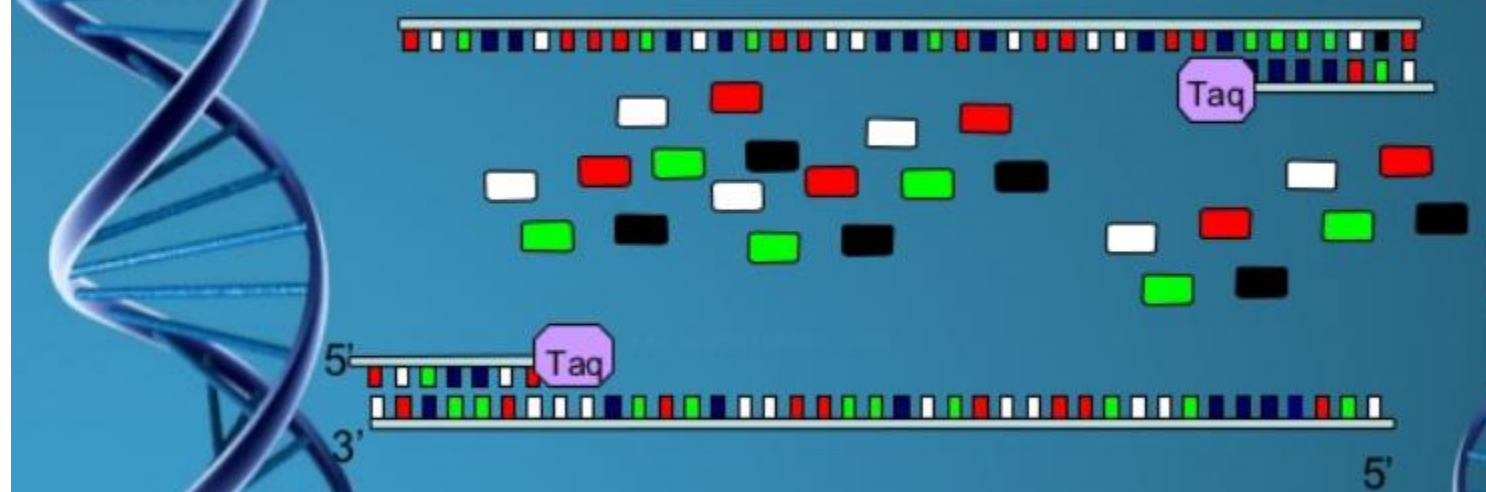
Annealing

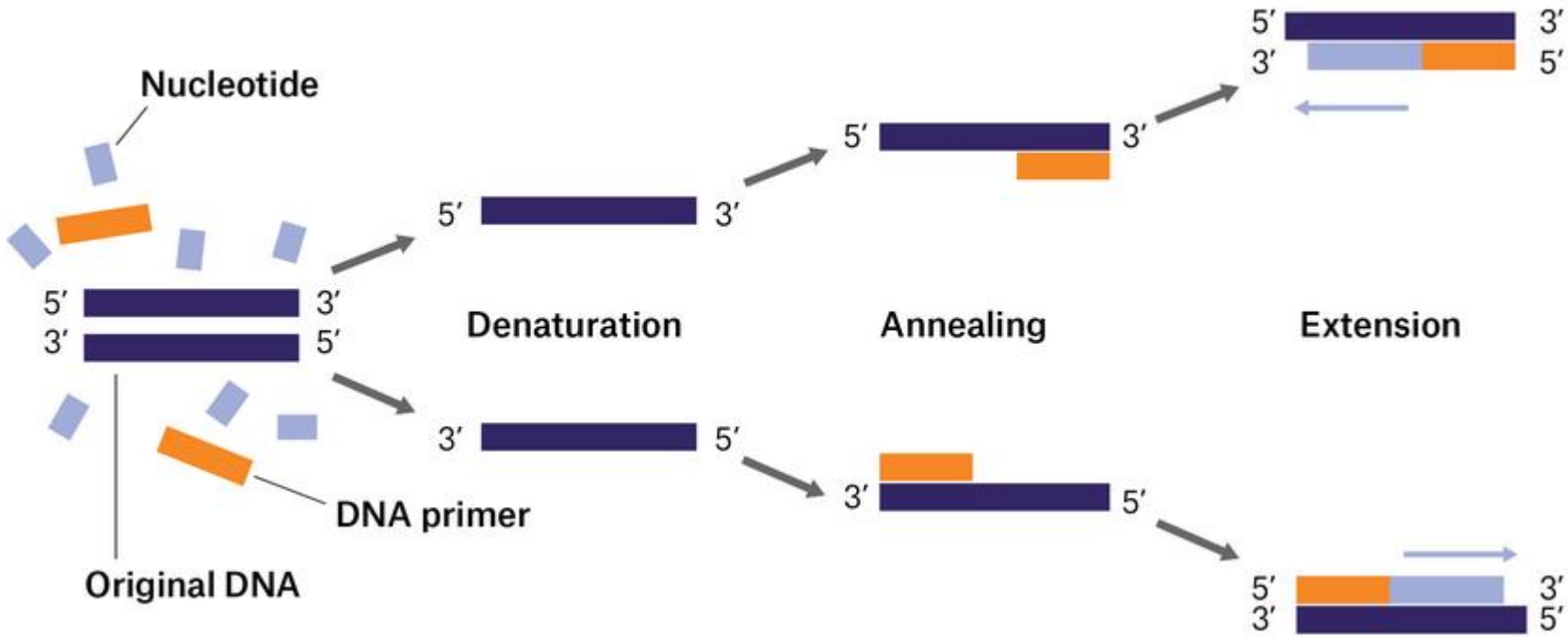
- Temperature: ~50-70C (dependant on the melting temperature of the expected duplex)
- Primers bind to their complementary sequences



Extension

- Temperature: ~72C
- Time: 0.5-3min
- DNA polymerase binds to the annealed primers and extends DNA at the 3’ end of the chain




Nucleotide
5′
3′
3′
5′
DNA primer
Original DNA
Denaturation
5′
3′
3′
5′
Annealing
5′
3′
3′
5′
Extension
5′
3′
3′
5′
5′
3′
3′
5′

تقسیم بندی مراحل واقعی از مراحل PCR در عمل:

1. Exponential: میزان محصول در هر سیکل دو برابر می شود.
2. Levelling off: واکنش کند می شود بواسطه ی از دست رفتن فعالیت آنزیم، مصرف معرف ها و dNTPs
3. Plateau: محصول بیشتری تشکیل نمی شود به دلیل مصرف کامل نوکلئوتیدها و از دست رفتن فعالیت کامل آنزیم

طراحی و آنالیز پرایمر (Primer design and analysis)

نرم افزارهای موجود:

Gene runner

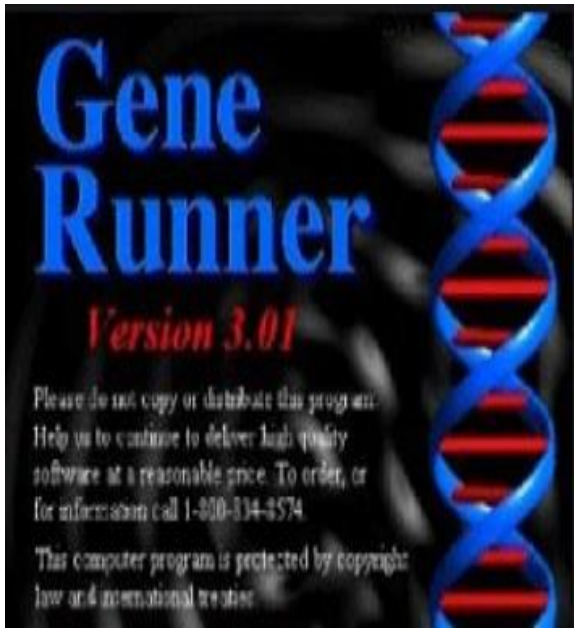
Primer 3

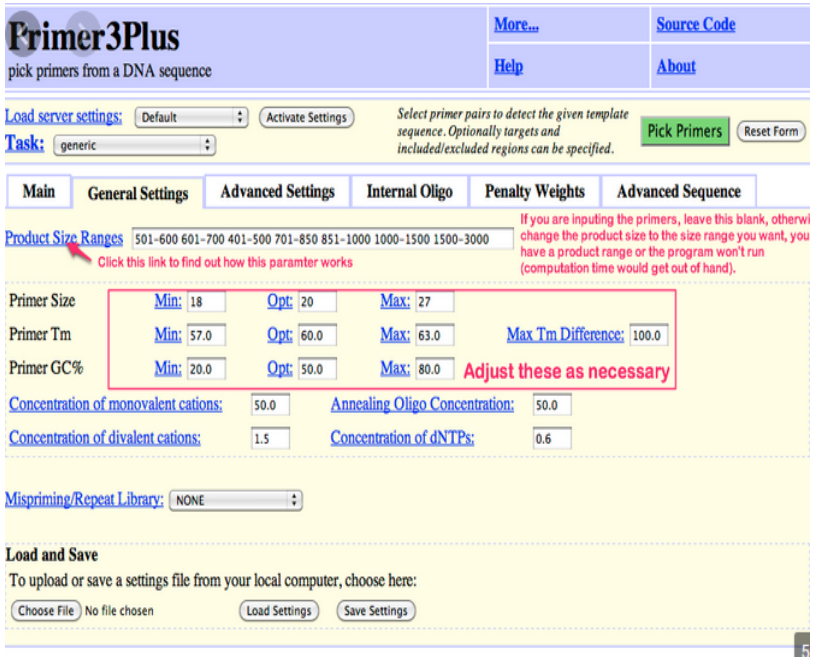
Oligo primer analysis

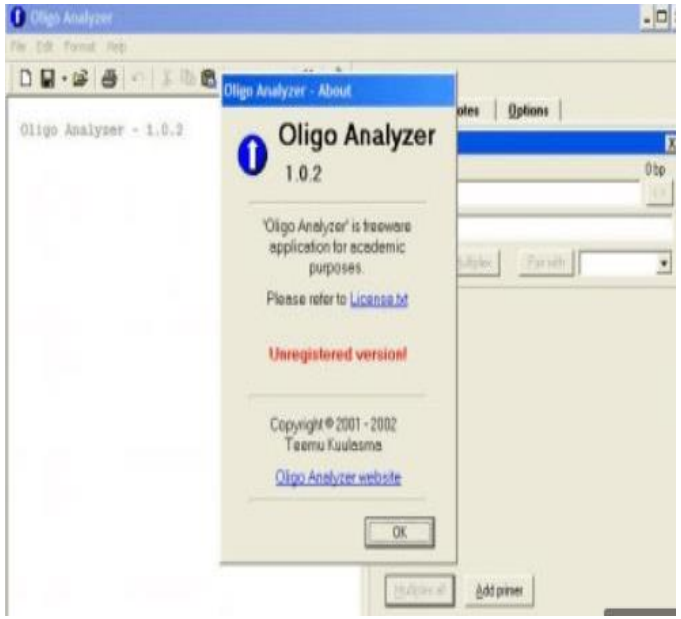
Primer blast

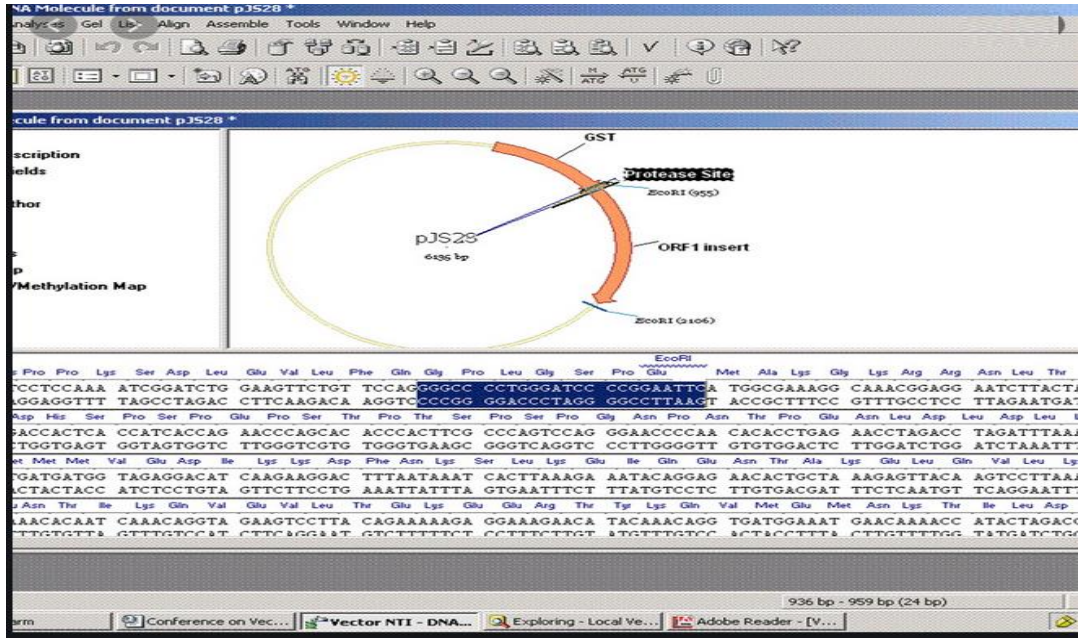
Vector NTI

GeneScript primer design





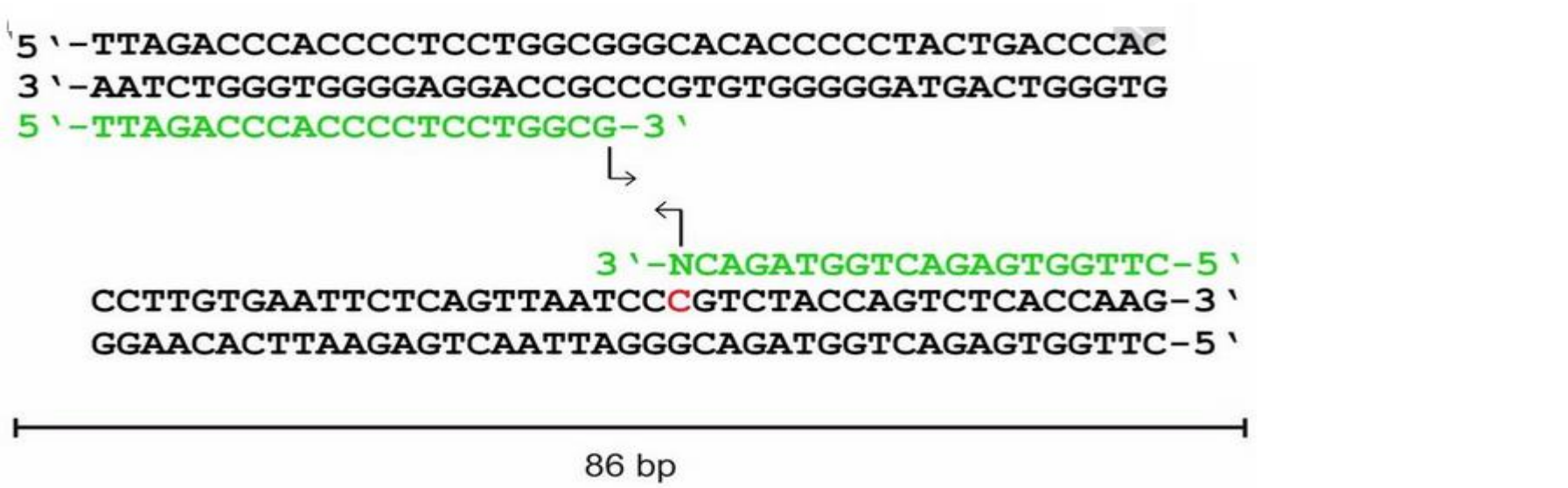




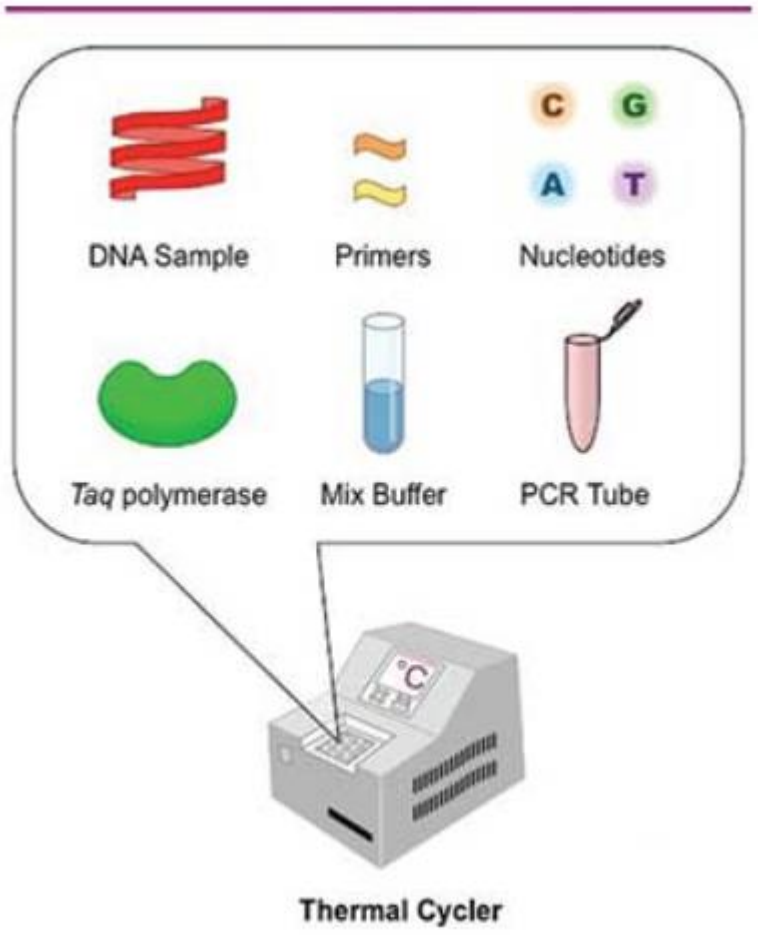
1. طول پرایمر (Primer length)
2. دو پرایمر مکمل هم نباشند (انتهای ۳ مکمل هم نباشند)
3. دمای آنیلینگ آنها مشابه باشد
4. در ساختار آنها نباید تعداد نوکلئوتیدهای مکمل زیاد باشد زیرا منجر به تشکیل لوپ می شود
5. سعی شود در انتهای ۳ پرایمر نوکلئوتید C یا G یا GC (GC clamp) انتخاب شود.
6. درصد بازهای GC بین ۴۵ تا ۵۵ درصد باشد
7. دمای ذوب پرایمرها تا حد امکان مشابه هم باشد

$$Tm=4\ (C+G) + 2\ (A+ T)$$

این فرمول برای پرایمرهای کمتر از ۲۵ نوکلئوتید مناسب است و در صورتی که بالاتر از ۲۵ نوکلئوتید باشد از نرم افزار Reviewer TM (www.thermoscientific.com/reviewer) استفاده شود.



انواع PCR



Gradient PCR

Long PCR

Nested PCR

Colony PCR

RFLP PCR

Rapid PCR

RT-PCR

Quantitative PCR=Real time PCR

Hot start PCR

Touch down PCR

مراحل استخراج DNA ژنومی

1. آماده سازی نمونه ها
2. از بین بردن دیواره و غشای سلول=لیز سلول
3. جدا کردن مواد (پروتئین، چربی، نمک و غیره) غیر از DNA
4. خالص سازی DNA از ناخالصی ها
5. تغلیظ DNA

Boiling

Phenol-chloroform

Salting out

Glass bead

Enzymatic kit

Freeze-thawing

آماده سای نمونه (سلول/بافت/اشک/بزاق/خون/دندان/استخوان/تار مو و غیره)

در اینجا با توجه به نوع سلول یا بافت مورد نظر، اقدام به تهیه مقادیر مناسب از آنها می شود. به عنوان مثال، جهت استخراج DNA از باکتری لازم است ابتدا کشت داده شوند و سپس با سانتریفیوژ جدا شوند. جهت تهیه نمونه بافت گیاهی یا حیوانی مقادیر مشخصی از آنها برای استخراج ژنومی آماده می شوند.

لیز سلول

بسته به دیواره گرم مثبت و گرم منفی، داشتن یا نداشتن هسته سلول، روش های مختلقف زیر وجود دارد:

1. **لیز فیزیکی** (glass bead، سونیکاتور، فشار مکانیکی، French press (عبور عصاره سلولی از یک مجرای بسیار باریک تحت فشار) که اغلب موارد اخیر در ابعاد صنعتی جهت شکستن سلول باکتری، مخمر و قارچ استفاده می شود.

2. **لیز شیمیایی:** استفاده از آنزیم هایی مثل لیزوزیم، EDTA (کلیت کننده یون منیزیم و کلسیم که عامل اساسی در استحکام پوشش سلولی است) و دترجنت های یونی (SDS: چربی و پروتئین) ، غیر یونی (Triton X100)، بنابراین پس از لیز شدن پوشش های سلولی تمام محتویات سلول شامل Protein، lipid، اندامک های داخل سلولی، ذرات دیواره سلولی و سیتوپلاسمی و همچنین DNA و RNA آزاد می شود.

مراحل تخلیص و تغلیظ DNA

1. سانتریفیوژ کردن: در این حالت ذرات درشت، قطعات دیواره سلول و مواد دیگر ذره ای رسوب پیدا کرده و DNA/RNA/Protein در مایع رویی قرار می گیرند.
2. استفاده از مخلوط فنل/کلروفرم: مخلوط مساوی از فنل/کلروفرم سبب رسوب پروتئین ها می شوند ولی DNA و RNA در محلول رویی باقی می مانند که با سانتریفیوژ دو لایه تشکیل می شود که پروتئین ها در بین دو لایه به شکل یک لایه سفید رنگ تجمع می یابد. مایع شفاف رویی حاوی DNA و RNA است که با جدا نمودن آن در یک لوله دیگر می توان اقدام به تخلیص نمود. البته در زمانی که مقدار پروتئین عصاره سلول بسیار بالا باشد ضرورت تکرار مرحله فنل/کلروفرم جهت جداسازی تمام پروتئین ها وجود دارد که با توجه به حذف و شکسته شدن مقداری DNA در هر مرحله بهتر است از آنزیم های تجزیه کننده پروتئین (پروتئیناز K) قبل از مرحله فنل/کلروفرم استفاده نمود که با شکستن پلی پپتیدهای بزرگ به قطعات کوچکتر، راحتتر توسط فنل رسوب داده می شوند. برخی RNA ها بویژه mRNA با فنل حذف می شوند، ولی اغلب آنها با DNA در مایع رویی می مانند که جهت حذف آنها می توان به محلول DNA نهایی، RNAase اضافه نمود.
3. استفاده از نمک های رسوب دهنده پروتئین: استات سدیم و استات پتاسیم سبب رسوب پروتئین در مخلوط لیز سلولی می شوند. در واقع با اضافه نمودن این نمک ها به مخلوط لیز سلول، پروتئین ها و ذرات دیگر رسوب پیدا می کنند که پس از سانتریفیوژ کردن به شکل توده ی سفید رنگ در ته لوله مشاهده شده و مایع شفاف رویی حاوی DNA، RNA و مقداری پروتئین باقیمانده است که با فنل–کلروفرم اقدام به رسوب آنها می کنیم.
4. تغلیظ DNA: جهت رسوب DNA در محلول شفاف باقی مانده که حاوی DNA و RNA می باشد از اتانول خالص و سرد استفاده می شود. اضافه نمودن هم حجم اتانول و نگهداری آن روی یخ سبب رسوب DNA می گردد که جهت تکمیل از سانتریفیوژ با دور بالا (۱۵۰۰۰ به مدت ۱۰ تا ۲۵ دقیقه) استفاده می شود.

استخراج DNA به روش جوشاندن

در این روش سوسپانسیونی از کلنی خالص باکتری در یک میلی لیتر آب دوبار تقطیر استریل تهیه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری در حال جوش قرار داده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه برروی یخ قرار داده می شود و پس از آن در دور 3000×g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بدنبال سانتریفیوژ کردن، ۲ میکرولیتر از مایع رویی حاوی DNA به عنوان DNAی الگو برای واکنشPCR استفاده شد.

استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم

در این روش یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری تهیه شده در محیط مایع LB به میکروتیوپ استریل منتقل و به مدت ۴ دقیقه با دور 3000×g سانتریفیوژ شد. مایع رویی تخلیه و به رسوب سلولی حاصل ۴۷۴ میکرولیتر از بافر تهیه شده TE (10mM Tris-HCl, 1 mM Na_2EDTA و pH 8)، ۲۵ میکرولیتر از SDS ۱۰ درصد و ۱.۲۵ میکرولیتر پروتئیناز K (20 mg/ml) اضافه و به طور کامل مخلوط گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۵۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از آن ۵۰۰ میکرولیتر از محلول فنل-کلروفرم (به نسبت ۱ به ۱ با pHبرابر با ۸) به سوسپانسیون فوق اضافه شد. سپس با سروته نمودن میکروتیوپ فوق محتویات کاملا مخلوط گردیده و به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ (10000×g ، دمای ۴ درجه سانتی گراد) شد. مایع رویی (فازآبی) را به میکروتیوپ استریل دیگری منتقل نموده و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سدیم استات ۳ مولار(با pHبرابر ۵.۲) و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس نمونه را از فریزر خارج نموده و ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده و در دور 13000×g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی را دور ریخته و به رسوب حاصله با هدف حذف نمک های اضافی، SDS، فنل، کلروفرم و EDTA، اتانول ۸۰ درصد اضافه شد و پس از ۵ دقیقه قرار گرفتن در دمای آزمایشگاه به مدت ۱۰ دقیقه در دور 13000×g در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. مایع رویی را تخلیه و پس از تبخیر کامل اتانول، ۵۰ میکرولیتر بافر TEیا آب مقطر تزریقي به رسوب اضافه شد و کاملا مخلوط گردیده و تا زمان انجام فرآیند PCR در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت متابیون (Mi-bacterial Genomic DNA Isolation Kit mi-BD 100) انجام شد. ترکیبات موجود در کیت شامل:

Cell lysis buffer, PPT buffer, Column binding buffer, Column wash buffer, RNAase, Spin column, Collection tube

مراحل استخراج DNA ژنومي توسط كيت مذكور به شرح زير مي باشد:

۱) محیط LB براث حاوی باکتری با دور 12000×g و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد.

۲) مایع رویی تخلیه و ۳۰۰ میکرولیتر از بافر لیز سلولی به سوسپانسیون سلولی موجود در میکروتیوپ اضافه نموده و به مدت ۵ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی گراد انکوبه می شود.

۳) پس از سرد شدن در دمای اتاق ۳ میکرولیتر از محلول RNAase (10 mg/ml) به محتویات میکروتیوپ اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه می شود.

۴) ۱۰۰ میکرولیتر از بافر PPT اضافه نموده و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس می شود. سپس نمونه برروی یخ به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد.

۵) نمونه در دور 12000×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد.

۶) مایع رویی حاصل به یک میکروتیوپ جدید انتقال داده شد و سپس ۶۰۰ میکرولیتر از بافر متصل شونده به ستون اضافه و ورتکس شد.

۷) ۶۵۰ میکرولیتر از مخلوط نمونه تهیه شده به یک اسپین ستون تعبیه شده در تیوپ های ۱.۵ میلی لیتری مخصوص انتقال و سپس به مدت ۵ دقیقه در 12000×gسانتریفیوژ شد.

۸) مایع فیلتر شده را دور ریخته و ستون ها به یک تیوپ جدید انتقال داده شده و سپس ۷۵۰ میکرولیتر از بافر شستشوی ستون اضافه شده و برای مدت زمان ۲ دقیقه در 12000×g سانتریفیوژ شد.

۹) مایع رویی را تخلیه و سپس ستون به یک تیوپ جدید ۱.۵ میلی لیتری انتقال داده شده و با ۲۵۰ میکرولیتر بافر شستشوی ستون، شستشو داده شد.

۱۰) ستون به مدت ۲ دقیقه در دور 12000×g سانتریفیوژ شده و پس از تخلیه مایع رویی، ستون به یک میکروتیوپ استریل ۱.۵ میلی لیتری منتقل شده و سپس ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE اضافه شد. پس از آن به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بدنبال سانتریفیوژ کردن (12000×g برای مدت زمان ۱ دقیقه)، مایع فیلتر شده هم اکنون حاوی DNA می باشد که این مایع در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

روش های تعیین غلظت DNA استخراج شده

1. متد کالریمتریک
2. متد اسپکتروفتومتری
3. روش Gel doc
4. Densitometer

تعیین غلظت DNA ژنومی هم برای Cloning و هم Sequencing حائز اهمیت است.

متد کالریمتریک " بدنبال هیدرولیز DNA (حرارت ۹۵ درجه) قند دی اکسی ریبوز تبدیل به هیدروکسی لیونیلیل آلدئید که واکنش می دهد با معرف دی فنیل آمین (λmax: 600 nm).

متد Gel doc: DNA cutting با RE: running on Gel: staining with ethidium bromide: مقایسه شدت باند با شدت باند DNA marker

متد densitometer" آنالیز غلظت DNA بوسیله کیت های تجاری nex Tecc ™ و تحلیل نتایج براساس غلظت های مشخص DNA مارکر بوسیله نرم افزار موجود در دستگاه

UV Spectrophotometric متد

Purity: 260 nm/280nm=1.8-2.0

Concentration: dsDNA (concentration=OD260nm × dilution × 50= µg/ml=ng/µl

ssDNA/RNA (concentration=OD260nm × dilution × 40= µg/ml=ng/µl

oligonucleotides (concentration=OD260nm × dilution × 33= µg/ml=ng/µl