مهارت زیست فناوری۲

تکنیک‌های مولکولی کار با DNA

(استخراج DNA، PCR و الکتروفور)

از مجموعه کتاب‌های زیست فناوری در مدرسه

نرگس ابدالی

کتایون صداقتی زاده

دکتر محسن آسوری

مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی

دانشگاه علوم پزشکی لرستان

سرشناسه	:	صداقتی‌زاده، کتایون، ۱۳۵۷ -
عنوان و نام پدیدآور	:	مهارت‌های زیست‌فناوری 2 : کشت بافت گیاهی/مولفان کتایون صداقتی‌زاده،نرگس ابدالی،محسن آسوری.
مشخصات نشر	:	تهران : راشدین ، ۱۳۹۸.
مشخصات ظاهری	:	۶۱ص.: مصور(رنگی)،جدول(رنگی).
فروست	:	... مجموعه کتاب‌های زیست‌فناوری در مدرسه (ویژه مدرسان و کارگاه‌های تخصصی).
شابک	:	۹۷۸-۶۰۰-۳۶۱-۶۶۳-۹
وضعیت فهرست نویسی	:	فیپا
موضوع	:	تکنولوژی زیستی -- دستنامه‌های آزمایشگاهی
موضوع	:	Biotechnology -- Laboratory manuals
موضوع	:	گیاهان -- کشت بافت‌ها -- دستنامه‌های آزمایشگاهی
موضوع	:	Plant tissue culture -- Laboratory manuals
شناسه افزوده	:	ابدالی، نرگس، ۱۳۶۰-
شناسه افزوده	:	آسوری، محسن، ۱۳۵۱ -
رده بندی کنگره	:	TP۲۴۸/۲/ص۴م۹ ۱۳۹۸
رده بندی دیویی	:	۶/۶۶۰
شماره کتابشناسی ملی	:	۵۶۱۹۲۱۸

انتشارات راشدین

عنوان کتاب:	مهارت‌های زیست فناوری۲
مؤلف:	کتایون صداقتی زاده، نرگس ابدالی، دکتر محسن آسوری
تصویرگر:	محسن یزدان زاد
نوبت چاپ:	اول– ۱۳۹۸
شمارگان:	۱۰۰۰
شابک:	978-600-361-663-9
قیمت:	۲۰۰۰۰۰ ریال
نشانی:	میدان انقلاب – کارگر جنوبی– بن‌بست گشتاسب – پلاک ۴ واحد ۶
تلفن/ نمابر:	۶۶۱۲۳۴۴۹ – ۶۶۴۰۸۲۲۴
پایگاه اینترنتی:	www. siteketab. com
پست الکترونیک:	rashed1829@yahoo. Com

فهرست

مبحث اول

معرفی زیست فناوری ۹

مبحث دوم

نشانگر های مولکولی ۱۶

مبحث سوم

استخراج DNA ۲۵

مبحث چهارم

همانند سازی مصنوعی ۳۶

(معرفی فرآیند PCR) ۳۶

مبحث پنجم

آشکارسازی محصول PCR ۵۳

(معرفی فرآیند الکتروفورز) ۵۳

مبحث ششم

آشنایی با نشانگرهای مبتنی بر DNA ۶۳

پیوست ها ۷۸

منابع ۱۰۲

پیشگفتار

قبل از شروع لازم است چند نکته را با شما در میان بگذاریم، همانطور که می دانید زیست فناوری دامنه وسیعی دارد و لزوما نیازی نیست هر فرد تمام مهارت‌های آنرا بداند بلکه بر اساس علاقه و نیاز خود مهارت یا مهارت‌هایی را فرا گرفته و مورد استفاده قرار می دهد. بعنوان مثال کسی که نشانگر مولکولی کار می کند ممکن است هرگز نیاز به یادگیری کشت بافت یا سلول نداشته باشد. به همین علت ما کتاب‌های مهارت را بر اساس موضوع از هم تفکیک نموده ایم. اما برخی مباحث مانند معرفی زیست فناوری، اخلاق و ایمنی در پژوهش بطور مشترک در تمام کتاب‌های مهارت وجود دارد. در پایان این کتاب‌ها بخشی بنام پیوست وجود دارد که در این بخش به معرفی ابزارها و موادی که در طی کتاب به آنها اشاره شده است می پردازد.

مهارت آموز عزیز بخاطر داشته باشید، انجام آزمایشات کتاب‌های مهارت نیاز به آزمایشگاه‌های تخصصی زیست فناوری دارد و آزمایش‌ها حتما باید با نظارت کارشناس متخصص هر موضوع انجام شود. در اینجا لازم از از زحمات خانم مارال مرعشی اجرا و تهیه تصاویر آزمایشات تشکر نمائیم.

موفق باشید

راه‌های ارتباط با مؤلفین:

آدرس ایمیل: nargessabdali6090@gmail.com

وب سایت: http://stbiotech.ir

جدول سطح بندی کتاب‌های زیست فناوری بر اساس مقطع تحصیلی / سنی

سطح	عنوان کتاب	گروه هدف	محل برگزاری	مهارت‌های کسب شده	معرفی کتاب	اهداف
سطح اول **"توجه به طبیعت"**	کتاب شعر و موسیقی	دانش آموزان پیش دبستانی و کلاس اول	مدارس و پژوهشسراها	آشنایی با طبیعت و نقش موجودات زنده در حفظ طبیعت	نگاه هدفدار به بعضی موجودات زنده از طریق شعر و موسیقی	شناخت طبیعت و کشف جایگاه موجودات زنده
سطح دوم **"توجه به طبیعت"**	کودک، طبیعت، زیست فناوری	دانش آموزان کلاس پایه دوم و سوم دبستان	مدارس و پژوهشسراها	آشنایی با موجودات زنده و نقش آنها در زندگی انسانها	ایجاد علاقمندی در دانش آموزان از طریق بازی و نقاشی	افزایش خلاقیت و ابتکار
سطح اول "زیست فناوری"	کتاب آشنایی با زیست فناوری	دانش آموزان پایه چهارم و پنجم	مدارس و پژوهشسراها	آشنایی با کاربردهای زیست فناوری از طریق فعالیت‌های عملی	آشنایی با بیوتکنولوژی سنتی و نقش زیست فناوری در عصر حاضر	افزایش دقت در مشکلات و معضلات پیرامون
سطح دوم "زیست فناوری"	کتاب مبانی زیست فناوری	دانش آموزان پایه ششم و هفتم	مدارس و پژوهشسراها	انجام آزمایش‌های علمی و فعالیت‌های زیست فناوری	کسب مهارت در ارائه ایده‌های خلاقانه و علمی	افزایش روحیه پرسشگری و کنجکاوی توانمندی در ارائه فرضیه‌های کاربردی

سطح سوم "زیست فناوری"	کتاب زیست فناوری میکروبی	دانش آموزان پایه هفتم و هشتم و نهم	مدارس و پژوهشسراها	آشنایی با آزمایش ها، ابزارهای مطالعه میکروبی و اهمیت میکروب‌ها در زندگی انسانها	کسب توانایی در ارائه پروژه‌های علمی و انجام آن	توانمندی در آزمایش فرضیه‌ها و نتیجه گیری
سطح سوم "زیست فناوری"	زیست فناوری غذایی	دانش آموزان پایه هفتم و هشتم و نهم	مدارس و پژوهشسراها	آشنایی با محصولات غذایی پروبیوتیک و پری بیوتیک	کسب توانایی در ارائه پروژه‌های علمی و انجام آن	توانمندی در آزمایش فرضیه‌ها و نتیجه گیری
سطح چهارم "زیست فناوری"	مهارت ۱ کشت بافت گیاهی الکتروفورز	مدرسان و دانش آموزان پایه نهم، دهم و یازدهم	آزمایشگاه تخصصی با حضور کارشناس	آشنایی با تکنیک‌های آزمایشگاهی	کسب توانایی در ارائه پروژه‌های تخصصی و انجام آن	توانمندی در آزمایش فرضیه‌ها و نتیجه گیری
	مهارت ۲ استخراج DNA، PCR و الکتروفورز	مدرسان و دانش آموزان پایه نهم، دهم و یازدهم	آزمایشگاه تخصصی با حضور کارشناس	آشنایی با تکنیک‌های آزمایشگاهی (در آزمایشگاه‌های تخصصی)	کسب توانایی در ارائه پروژه‌های تخصصی و انجام آن	
-------	زیست فناوری به زبان ساده (ویژه والدین)	والدین و مدرسان	---------	آشنایی والدین، معلمان، مدیران و عموم علاقمندان		

مهارت زیست فناوری۲	
تکنیک‌های مولکولی کار با DNA (استخراج DNA، PCR و الکتروفور)	
سطح کتاب	عالی (از مجموعه کتاب‌های مهارت)
هدف	آشنایی با تکنیک‌های استخراج DNA، PCR، الکتروفورز
گروه مخاطب	مدرسان و کارگاه‌های تخصصی دانش‌آموزان
محل مجاز برگزاری	آزمایشگاه‌های تخصصی
مدت دوره	مقدماتی: ۸ ساعت (پیوسته) انتظارات: مشاهده مسیر ستخراج DNA، PCR، الکتروفورز و آشنایی با مفاهیم و تجهیزات پیشرفته: ۲۴ ساعت (ناپیوسته) انتظارات: اجرای عملی تمام مراحل توسط مهارت آموز و تسلط به تکنیک‌های ارائه شده در کتاب حاضر

مبحث اول
معرفی زیست فناوری

واژه بیوتکنولوژی که معادل فارسی آن زیست فناوری است، اولین بار در سال ۱۹۱۹ توسط آقای کارل ارکی[1] به کار گرفته شد و از آن پس، ایشان به عنوان پدر زیست فناوری شناخته می شوند. آقای ارکی یک مهندس کشاورزی مجارستانی بود که برای اولین بار بر روی مجموعه‌ای از فرآیندها که در این کتاب با آنها بیشتر آشنا می شوید یک نام پر محتوا گذاشت؛ اما سابقه استفاده از زیست فناوری چند هزار سال قبل بر می گردد، زمانیکه بشر از فرآیند تخمیر در تهیه سرکه، الکل، نان و ... استفاده می کرد.

در دنیای امروز زیست فناوری به ابزاری پرقدرت برای حل مشکلات در تمام شاخه های علوم زیستی و پزشکی تبدیل شده است. به جرأت می توان ادعا کرد که در حال حاضر هیچ شاخه ای از علوم زیستی بی نیاز از زیست شناسی مولکولی نیست و اگر قرار باشد، علمی پاسخگوی نیازهای زیستی بشر باشد بدون شک آن علم زیست شناسی مولکولی و بعبارتی زیست فناوری است .

---

[1] Karl Ereky

واژه بیوتکنولوژی ترکیبی از دو کلمه **بیو** به معنای "زیست" و **تکنولوژی** بـه معنـای "فـن آوری" اسـت. معـادل فارسـی **بیوتکنولـوژی** واژهٔ "**زیست‌فناوری**" است. "زیست" بـه کلیـه فرآینـدهای حیـاتی دلالـت دارد و "تکنولوژی یا فناوری" به طیف وسیعی از ابزار، فنون، اصول و فرآیندها اشاره دارد.

تقسـیم‌بنـدی زیسـت فنـاوری بـه شـاخه‌هـای مختلـف، برحسـب دیـدگاه متخصصین و دانشمندان مختلف فرق می‌کند. در رایج ترین تقسیم‌بندی، از نـام علوم مختلف با پیشوند زیست فناوری استفاده می‌کنند و نام شاخه‌ای از زیست فناوری را بدین ترتیب وضع می‌کنند. مانند زیست فناوری پزشکی که از تلاقـی بیوتکنولوژی با علم پزشکی بوجود آمده است، یا زیست فناوری کشـاورزی کـه کاربرد زیست فناوری در کشاورزی را نشان می‌دهد. بـدین ترتیـب مـی‌تـوان از زیست فناوری داروئی، زیست فناوری میکروبی، زیست فناوری دریـا، زیسـت فناوری قضائی یا پزشکی قانونی، زیست فناوری غذائی، زیست فناوری صنعتی، زیست فناوری نفت، زیست فناوری تشخیصی و ... نام برد.

گستردگی کاربرد زیست فناوری در قرن بیست و یکم بـه حـدی اسـت کـه اقتصاد، بهداشت، درمان، محیط زیست، آمـوزش، کشـاورزی، صـنعت، تغذیـه و سایر جنبه‌های زندگی بشر را تحت تأثیر شگرف خود قرار خواهد داد. به همـین

دلیل اندیشمندان جهان قـرن بیسـت و یکـم را قـرن بیوتکنولـوژی نامگـذاری کرده‌اند.

شکل۱- ارتباط زیست فناوری با علوم مختلف

تاکنون دقت کرده اید چرا نمی‌گوئیم علم زیست فناوری؟

آیا بین دو واژه **علم** با **تکنولوژی** تفاوت وجود دارد؟

اکثر مردم این دو واژه را معادل هم می دانند. حتـی برخـی بـه اشـتباه مـی گویند علم زیست فناوری و یا علم نانوتکنولوژی!! اما در واقع واژه‌های **"علم"** و **"تکنولوژی"** متفاوت هستند.

حرکت علم از مسائل خاص به طرف مسائل عام است و طی آن سعی دارد با کشف ارتباطات گسترده تر به توضیح هر پدیده بپردازد.

در صورتی که تکنولوژی (فناوری) در جهت عکس حرکت می کند، یعنی با استفاده از قوانین و اصول عمومی (که در مرحله شکل گیری و توسعه علم بدان‌ها دست یافته است) سعی می کند مسائل خاص را حل کند.

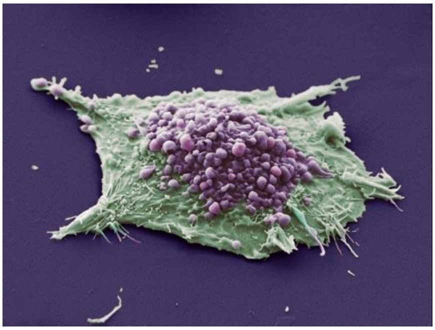
به عنوان مثال وقتی اولین بار دانشمند انگلیسی «رابرت هوک» در قرن هفدهم موفق به دیدن سلول بافت چوب پنبه در زیر اولین میکروسکوپ شد، واقعا نمی‌دانست چه می بیند و این سئوال مطرح شد که **این چیست؟**

شکل ۲- مشاهده اولین سلول

هوک سپس به بررسی سایر چیزهای زنده و غیر زنده برای توجیه مشاهده خود پرداخت. به عبارتی از **جزء** (یک ۶ ضلعی مشاهده شده در چوب پنبه) به سمت **کل** (وجود سلول در سایر بافت‌ها وموجودات) حرکت کرد.

نتیجه این حرکت شکل گیری علم زیست شناسی سلولی بود.

اما با گذشت زمان محققین متوجه شدند یک بی نظمی در تکثیر برخی سلول‌ها بوجود می آید. این بی نظمی باعث می شود که این سلول‌ها بیش از حد تکثیر شوند، این تکثیر بی رویه را سرطان می نامند. بعد از این مشاهده، این سئوال مطرح شد که برای جلوگیری از این تکثیر بی رویه **چه باید کرد؟**

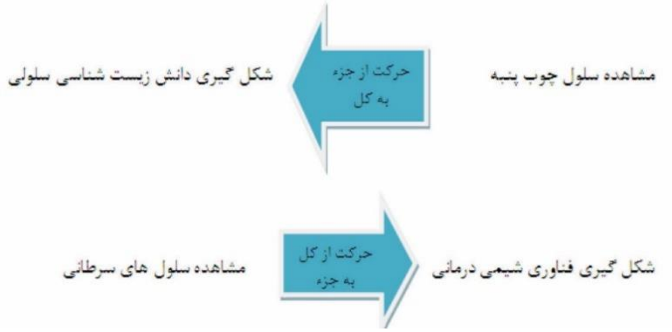


شکل ۳- سلول سرطانی

این سئوال زمینه را برای ابداع یک تکنولوژی مثل شیمی درمانی فراهم کرد. در اینجا ما از یک کل (علم زیست شناسی سلولی) بطرف یک جزء (درمان یک گروه خاص از سلول ها) حرکت کرده ایم. به عبارت دیگر، شناخت ما از ماهیت سلولی موجودات زنده، علم زیست شناسی سلولی را بوجود آورد و وقتی

یک گروه از این سلول‌ها در رشد و تکثیر خود از قـوانین کلـی تبعیـت نکردنـد، شیمی درمانی شکل گرفت.

نتیجه این حرکت چیزی جز شکل گیری یک تکنولوژی نیست.



شکل۴- تفاوت علم و تکنولوژی

با این توضیح حتما متوجه شده اید که زیسـت فنـاوری، علـم نیسـت بلکـه تکنولوژی است که با استفاده از قوانین علمی موجود سعی دارد مشکلات بشر را رفع نماید. تعاریف گسترده‌ای برای زیست فناوری ارائه شده است. یکی از کامل ترین این تعاریف می گوید: " هر گونه استفاده از موجودات زنده (یا بخش‌هایی از موجودات زنده مانند بافت و سلول) برای ایجاد یک فرآورده و یـا تغییـر یـک محصول، بهبود حیوان و گیاه و یا ایجاد ریز سازواره ها[1] برای اسـتفاده بشـر و تأمین رفاه وی زیست فناوری نام دارد."

[1] Microorganisms

به زبان ساده تر:

" استفاده از موجودات زنده برای ساخت فرآورده‌هایی که نیازهای انسـانی را رفع کنند یا انسان را به اهداف خود برساند"

حال که با مفهوم زیست فناوری بیشتر آشنا شدید، آیا می توانید مثال‌هایی از "علم" و تکنولوژی" در محیط اطراف خود بیابید؟

مبحث دوم

نشانگر های مولکولی

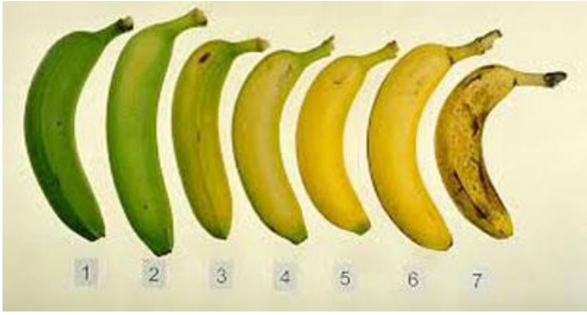
یکی از بحث های بسیار جالب زیست فناوری، نشانگرها هستند که هر روزه انواع جدیدتری از آنها ابداع شده و مورد استفاده قرار می گیرند. کشف آنها گـام بلندی در راستای حل مشکلات در زمینه های مختلف علوم زیستی بوده است.

نشانگر چیست؟

استفاده از نشانگرها قدمتی برابر با تاریخ بشـر دارد. انسـان‌هـای نخسـتین، بدون اینکه خود بدانند از نشانگرهای مورفولوژیک برای شناخت و تمـایز انـواع بذر و میوه استفاده می کردند و برخی را به برخی دیگر ترجیح می دادند.

ما معمولا با ظاهر اشخاص (مورفولوژی)، نژاد آنها را حدس می زنیم. مـثلا فردی با پوست سیاه و موی مجعد را از نژاد سیاه پوست و آفریقایی می دانـیم، فردی با پوست زرد و چشمان بادامی را از آسیا شرقی(چین ژاپن و..) می پنداریم افراد بلوند (پوست و موی روشن) را اروپایی و..... در واقع ما درحـال اسـتفاده از نشانگر مورفولوژیک بعنوان ساده ترین نوع نشانگر هستیم و این کار حتی قبـل از شکل گیری علم زیست شناسی و زیست فناوری وجود داشته است.

به عنوان مثال هیچگاه دقت کرده اید که موزهای دارای نقاط سیاه رنگ بر روی پوست خود، چقدر خوشمزه هستند؟ در واقع نقاط سیاه نشانگر رسیدن و شیرین بودن موز است. این نشانگر مورفولوژیک به شما کمک می کند بدون شکافتن پوست موز و چشیدن آن مطمئن باشید موزی که شما انتخاب کرده اید شیرین است.



شکل ۱- در شکل فوق موز ۱ نارس ترین و موز ۷ رسیده ترین است.

هر صفتی که با استفاده از آن بتوان صفات مشکل تر دیگر را بررسی کرد، **نشانگر**[1] نام دارد. یک نشانگر باید به سهولت قابل بررسی باشد.

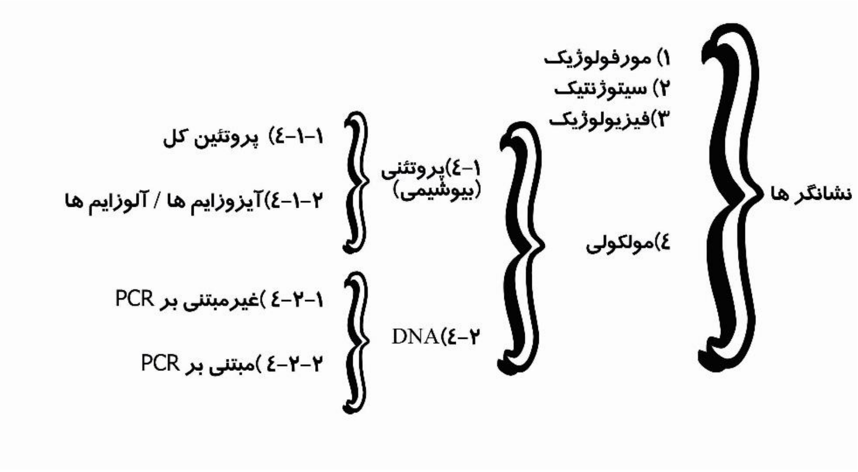
اما همانطور که می دانید نشانگرهای موفولوژیک تنها تا حدودی درست هستند، مثلا ما در کشور خودمان افراد با مشخصات نژاد سیاه پوست یا اروپایی را داریم در حالی که افرادی از نژاد آسیایی هستند!!!! پس نشانگر مورفولوژیک

[1]markers

هر چند بسیار مفید است و قرن هاست به انسان در انتخاب بهترین‌هـا (بهتـرین گندم جهت کشت، بهترین دام و...) کمک کرده است اما صددرصد قابل اطمینان نیست. زیست فناوری در اینجا به کمک آمده است.

شاید بپرسید چگونه؟ با کمک نشانگرهای مولکولی.

همانطور که در شکل ۲ می بینیـد انـواع مختلفـی از نشـانگرها و خصوصـا نشانگرهای مولکولی وجود دارد مانند نشانگرهای پروتئینی، DNA و ...



شکل ۲- طبقه بندی نشانگرها

کمی موضوع را باز می کنیم، به عنوان مثال؛ برای اینکـه بتـوان نـژاد یـک سیاه پوست با موی مجعد را شناسایی کرد، پـس از بررسـی مورفولـوژی نوبـت بررسی مولکولی است و باید به دنبال نشانگرهای مولکولی مثل DNA رفت. در

هر نژادی ژن‌های خاصی (توالی‌های نوکلئوتیدی خاصی) وجود دارد که خـاص آن نژاد است و در نژادهای دیگر یافت نمی‌شود. با بررسی و مطالعه این توالی‌ها می توان با اطمینان بالایی نژاد را تشـخیص داد. در واقـع ایـن تـوالی‌هـا یـک نشانگر مولکولی مبتنی بر DNA محسوب می شوند.

برای آنکه صفتی بتواند بعنوان نشانگر مورد استفاده قرار گیرد. بایـد حـداقل واجد دو ویژگی زیر باشد:

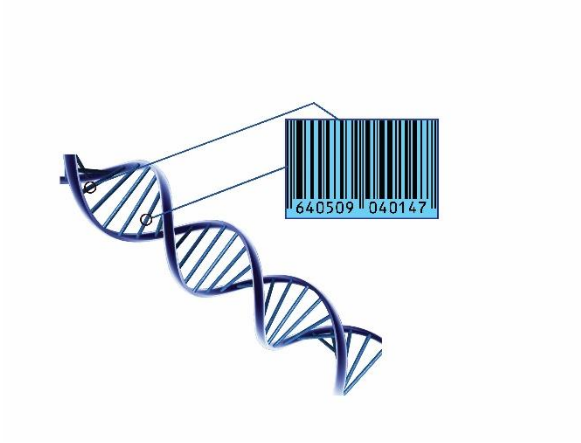
۱. در بین دو فرد متفاوت باشد:

یک نشانگر بایستی چند شکل باشد یعنی به فرم های مختلفی وجود داشـته باشد بعبارتی دارای پلی مورفیسم یا چند شکلی باشد تا بتوان آنرا نشانگر نامید.

۲. به توارث برسد.

تفاوت موجود بین توالی نوکلئوتیدهای هر موجود که از نسلی به نسل بعد به ارث می رسد، می تواند بعنوان نشانه یا «نشانگر ژنتیکی» بکار گرفته شود. ایـن تفاوت می تواند به شکل‌های مختلفی تظاهر یابد.

مطمئنا تاکنون بارکد موجود بر روی محصولات را دیده اید.



شکل ۳- شباهت بارکد روی محصولات و توالی های DNA

نشانگرها مولکولی مانند بارکدها هستند. فروشنده‌ها با استفاده از دستگاه بارکد خوان حتی بدون نیاز به دیدن چیزی که شما خریده اید آنرا شناسایی و در فاکتور خرید شما ثبت می کنند. نشانگرها هم کاربرد مشابه‌ای دارند. بهتر است بگوییم کل توالی موجود در DNA ما مانند یک بارکد است، که قسمت‌هایی از آن بعنوان نشانگرهای مختلف استفاده می شوند. (مراجعه به شکل ۳ و ۱۰)

برخی از تفاوت های موجود در ردیف DNA بین دو موجود ممکن است بصورت پروتئین هایی با اندازه های مختلف بروز کند که از طرق مختلف بیوشیمیایی قابل رویت و مطالعه می گردند. این قبیل نشانگرها را نشانگرهای مولکولی در سطح پروتئین می نامند.

اما دسته ای دیگر از تفاوتهای موجود در سطح DNA هیچ گونـه تظـاهری ندارند، نه صفت خاصی را کنترل می کنند و نه ردیف اسیدهای آمینه خاصـی را بیان می کنند در نتیجه اثر پروتئینی بر جای نمی گذارند. ایـن گونـه تفـاوت‌هـا فقط از طریق تجزیه و تحلیل مستقیم DNA قابل رویت هستند و بنـابراین بـه آنها نشانگرهای مولکولی در سطح DNA اطلاق می گردد.

امروزه از نشانگرها برای مطالعه ساختار جمعیت موجودات زنـده[1]، مطالعـات شجره نامه ای گیاهان و جانوران[2]، شناسایی ژنهای مناسب، تعیـین زود هنگـام جنسیت، فسیل شناسی[3]، اصلاح [4] گیاهان و جانوران، پزشکی، پزشکی قانونی و ... استفاده می شود.

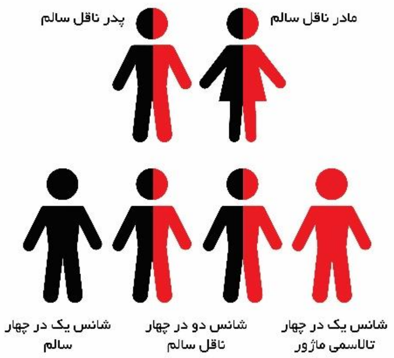
مثالی از کاربرد نشانگر مولکولی در شناسایی زود هنگام بیمـاران مبـتلا بـه تالاسمی:

تالاسمی یک نوع بیماری خونی است که به صورت ارثی منتقل می شود. در گلبولهای قرمز پروتئینی به نام هموگلوبین وجود دارد. وظیفه هموگلوبین، انتقال اکسیژن به سلولهای بدن است. در ساختمان هموگلوبین دو زنجیـره وجـود دارد که به اسامی آلفا و بتا نامگذاری شده‌اند. اختلال در هر یک از این زنجیـره‌هـا

---

[1] population studies
[2] pedigree analysis
[3] Archaeology
[4] Breeding

باعث اختلال در مولکول هموگلوبین و انجام وظیفه آن که اکسیژن رسانی به اعضاء مختلف بدن است، می شود. در این بیماری پروتئینی که اکسیژن را به قسمت‌های مختلف بدن حمل می کند، دچار نقص می باشد.



شکل ۴- نحوه توارث بیماری تالاسمی

امروزه قبل از ازدواج یکی از تست‌های اجباری تست تالاسمی است. اگر هر دو والد حامل یک آلل بیماری (تالاسمی مینور) باشند، ۲۵٪ احتمال تولد فرزند بیمار وجود (تالاسمی ماژور) دارد.

حال اگر بعلت حامل بودن آلل بیماری توسط هر دو نفر، به رغم اخطار در خصوص احتمال تولد کودک بیمار، بخواهند ازدواج کنند، چه باید کرد؟ در

گذشته به این افراد یا اجازه ازداواج داده نمی‌شد یا در صورت ازدواج اجازه بچـه دار شدن نداشتند!

اما امروزه به لطف زیست فناوری این مشکل رفع گردیده است. با استفاده از نشانگرهای مولکولی در مراحل ابتدایی شکل گیری جنین می توان با استفاده از تست ژنتیکی وجود بیماری را تشخیص داد.

در مباحث بعدی این کتـاب شـما بـا آزمـایش‌هـای لازم جهـت اسـتفاده از نشانگرها لازم است آشنا خواهید شد.

تمرین:

امروزه یکـی از کاربردهـای متـداول نشـانگرها اسـتفاده در تشخیص بیماریهـا از طریـق شناسـایی ترکیبـات شـیمیایی یـا بیوشیمیایی است. به عبارتی نشانگر بیوشیمیایی یا شیمیایی.

۱. لیستی از نشانگرهایی که در اطراف خود می بینیـد، مـی شناسید و یا روزانه استفاده می کنید در جدول وارد کنید.

نوع نشانگر	کاربرد	توضیحات

مبحث سوم

استخراج DNA

اگر شما کتاب‌های قبلی از سری کتاب‌های زیست فناوری در مدرسه را مطالعه کرده باشید، شما بعنوان یک زیست فناور مبتدی با استخراج DNA آشنا شدید. اما اگر به عنوان یک محقق حرفه‌ای بخواهید DNA را استخراج کنید تا بتوانید بر روی آن مطالعه کنید، حتما باید از روش‌های تخصصی استفاده کنید. قبل از اینکه به روش استخراج DNA اشاره کنیم بهتر است با هم به این سوال پاسخ دهیم: اصلا هدف ما از استخراج DNA چیست؟

ما به دلایل مختلف مجبوریم DNA را از سلول‌های موجودات زنده استخراج کنیم:

- **شناسایی بیماریهای نهفته ژنتیکی:** مثلا یک بیماری در یک خانواده شیوع دارد پزشکان می توانند قبل از بروز علایم در بقیه افراد آن خانواده، با بررسی DNA آنها از ظهور بیماری آگاه شوند و برای مداوای زود هنگام اقدام نمایند.

- **شناسایی نسبت‌های خانوادگی:** بعنوان مثال یافتن خـانواده واقعـی کودکان گمشده، هویت اجساد کشف شده متعلق به شهدای گمنام جنگ و ...

- **شناسایی مجرمین:** مثلا مقداری از ترشحات بدن مجرم مانند خـون، بزاق و.. در محل یک جرم باقیمانده است و چند مظنون هـم وجـود دارد بـرای یافتن مجرم واقعی ابتدا باید استخراج DNA انجام داد.

- **مطالعات باستان شناسی:** بعنوان مثال مطالعات انسان شناسـی بـر روی استخوان‌ها و مومیایی‌ها برای بررسی نژادها و...

و در موارد بسیار زیاد دیگری نیاز به ا سـتخراج DNA، RNA و پـروتئین برای مطالعات و کاربردهای مختلف پیش می آید. به عبارتی اولـین قـدم بـرای مطالعه بر روی DNA، استخراج آن است.

فعالیت

استخراج DNA

امروزه کیت‌های آماده برای استخراج DNA وجـود دارد امـا بـرای آشـنایی بیشتر شما، در زیر آزمایش استخراج DNA از ۳ نوع سلول گیـاهی، جـانوری و میکروارگانیسم ارائه می‌گردد.

آزمایش۱

استخراج DNA از سیانوباکتر یا باکتری[1]

- با توجه به لزوم رعایت نکات ایمنـی در کـار بـا بـاکتری، قبـل از شروع این آزمایش به پیوست ۱ مراجعه نمائید. البته همانطور کـه در مقدمه کتاب اشاره گردید این آزمایشات تخصصی بود و باید در آزمایشگاه‌های اختصاصی و در حضـور کارشـناس مربوطـه انجـام

[1] Boiling method

گردد. از کارشناس آزمایشگاه بخواهید نمونه بـاکتری کشـت داده شده و آماده استخراج را برای شما آماده کند. می توان بجای کار با باکتری با همین روش DNA را از سـیانوباکتر اسـپیرولینا (نـوعی جلبک سبز آبی) خالص نمود.

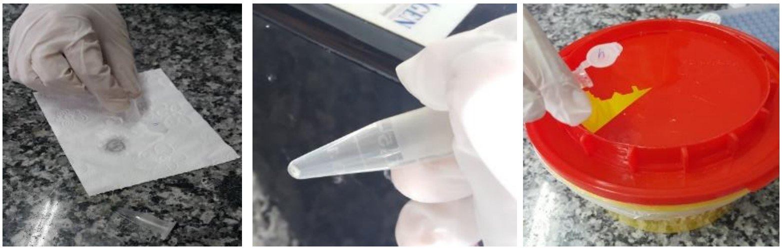
۱- ۱/۵ میلی لیتر ازکشت حاوی باکتری را درون میکروتیوپ ۱/۵ بریزد.
۲- به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۷۰۰۰ دور[1] سانتریفیوژ نمائید. (شکل ۱)

شکل ۱- سانتریفیوژ کردن محیط حاوی باکتری

۳- باکتری در تـه میکروتیـوپ رسـوب مـی کنـد، محلـول رویـی را دور بریزید.(شکل۲)

[1] 7000 RPM

۴- ۱۰۰ میکرو لیتر آب مقطر به رسوب اضافه کرده به مدت ۴ الی ۵ ثانیه ورتکس کنید.(شکل۳)



رسوب باکتری ها   دور ریختن مایع رویی   اطمینان از حذف مایع رویی

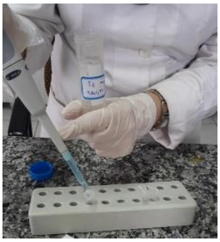
شکل۲- حذف محلول رویی پس از سانتریفیوژ

شکل ۳- ورتکسر کردن

۵- نمونه‌را درون بن ماری با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار دهید. (شکل ۴)

شکل ۴- قرار دادن نمونه در بن ماری

۶- ۲۰ میکرولیتر Tris-Hcl (۱ مولار با pH=7/5) اضافه کنید.(شکل۵)



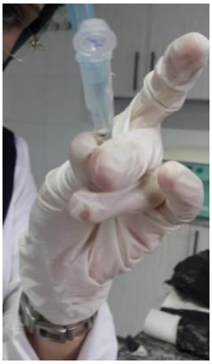
شکل ۵- افزودن Tris-Hcl

۷- ۴ الی ۵ ثانیه ورتکس نمائید. (شکل۶)

شکل۶- ورتکسر نمونه

۸- به مدت ۱ دقیقه سرعت ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ کنید.

۹- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی که حاوی DNA می باشد را به یک میکروتیوپ جدید منتقل کنید.



شکل۷- DNA استخراج شده

۱۰- DNA استخراج شده را تا زمان استفاده، باید در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد، نگهداری کنید.)

استخراج DNA از خون[1]

با توجه به لزوم رعایت نکات ایمنی در کار با خون و فرآورده‌های خونی، قبل از شروع این آزمایش به پیوست ۲ مراجعه نمائید. البته همانطور که در مقدمه کتاب اشاره گردید این آزمایشات تخصصی بود و باید در آزمایشگاه‌های اختصاصی و در حضور کارشناس مربوطه انجام گردد.

---

[1] Boiling method

۱- ۰/۵ میلی لیتر از خون را داخل یک میکروتیوپ بریزید.

۲- یک میلی لیتر بافر استخراج به آن اضافه کنید. (رجوع به پیوست۳)

۳- به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار دهید.

۴- به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ کنید.

۵- محلول رویی را دور ریخته، به رسوب ۳۰۰ میکرو لیتر بافر استخراج اضافه کنید.

۶- سپس میکروتیوپ را ورتکس کرده تا رسوب بطور کامل در بافر حل شود.

۷- ۷۰۰ میکرولیتر بافر استخراج به میکروتیوپ اضافه کنید. (رجوع به پیوست۳)

۸- به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ کنید.

۹- مراحل ۵ تا ۸ را مجدد تکرار کنید.

۱۰- محلول رویی را با سمپلر بردارید و دور بریزید(برای اطمینان از حذف کامل محلول روئی میکروتیوپ را بطور کامل سر و ته کنید.

۱۱- به رسوب باقیمانده ۱۰۰ میکرو لیتر NaOH (۵۰ میلی مولار) اضافه کنید.

۱۲- با ضربه زدن به میکروتیوپ گلبول‌های سفید لیز شده و محلول حالت ژله‌ای به خود می گیرد.

۱۳- به مدت ۲۰ دقیقه درون آب جوش قرار دهید.

۱۴- به مدت ۳-۴ ثانیه اسپین[1] کنید.

۱۵- ۲۰ میکرو لیتر Tris-Hcl (۱ مولار با pH=7/5)اضافه کنید.

۱۶- به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ کنید.

۱۷- ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول رویی که حاوی DNA می باشد را به میکروتیوپ جدید منتقل کنید.

۱۸- DNA استخراج شده را تا زمان استفاده، باید در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد، نگهداری کنید.

[1] Spin

آزمایش ۳

استخراج DNA از گیاه[1]

۱- یک سانتیمتر از برگ (شسته شده) را درون هاون چینی قرار دهید.

۲- ۱۰۰میکرولیتر از بافر استخراج[۲] را بر روی برگ‌ها ریخته و به مـدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه به سرعت بسابید. (رجوع به پیوست۴)

۳- مجددا ۳۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج را بدان افزوده و ۱۵ تا ۲۰ ثانیه دیگر هم بسابید، مواد را به میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری منتقل کنید.

۴- ۲۰ میکرولیتر از SDS ٪۲۰ به میکروتیوپ اضافه کنید و بـه مـدت ۳۰ ثانیه با دست تکان دهید. (رجوع به پیوست ۵)

۵- میکروتیوپ را به مدت ۱۰ دقیقـه در بـن مـاری در دمـای ۶۵ درجـه سانتیگراد قرار دهید.

۶- هم حجم مواد داخل میکرو تیوپ از بـافر **"الف"** اضـافه کنیـد[۱] و بـه مدت ۳۰ ثانیه با دست تکان دهید. (رجوع بـه پیوسـت ۵). سـپس بـه

---

[1] Kang &Yang method

[۲] Extraction buffer

مدت ۳ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ کنید. نهایتا محلول روئی را که حاوی DNA است، به میکروتیوپ جدید منتقل کنید.

۷- DNA استخراج شده را تا زمان استفاده، در یخچال (دمای ۴ درجه سانتیگراد)، نگهداری کنید.

---

[1] یعنی یه ازای هر ۱ میکرو لیتر ایزوآمیل الکل، ۲۴ میکرو لیتر کلروفرم اضافه کرد. اگر تیوپ نمونه ۵۰۰ میکرو لیتر است باید ۴۸۰میکرو لیتر کلروفرم و ۲۰ میکرولیتر ایزو آمیل الکل استفاده کرد.

مبحث چهارم
همانند سازی مصنوعی
(معرفی فرآیند PCR)

همانند سازی مصنوعی (در خارج از سلول)

در درس زیست شناسـی بـا نحـوه هماننـد سـازی طبیعـی DNA در درون سلول‌ها آشنا شدید. حال اگر بنا به هر دلیلی نیاز به تکثیر یک قطعـه از DNA داشته باشیم مثلا با هدف شناسایی وجود ژن یک بیماری قبـل از تولـد و.... بـه نظر شما چه باید کرد؟

مطمئنا تاکنون بارها نحوه کار یـک دسـتگاه فتـوکپی معمـولی را مشـاهده کرده‌اید. برای تکثیر توسط این دستگاه نیاز به مواد اولیه‌ای مانند کاغـذ، جـوهر مناسب در رنگ‌های مختلف و عواملی مانند طول موج خاصی از نـور و حـرارت است. البته مهمترین عامل را نباید فراموش کـرد **الگو**، یعنـی صـفحه مـتن یـا تصویری که قرار است تکثیر گردد!!

در سال ۱۹۸۳ گری مولیس که یـک بیوشیمیسـت عصـب شـناس بـود در حالیکه در یک نیمه شب تابستانی در حال رانندگی بود فکری به ذهنش خطـور کرد که انقلابی عظیم در زیست شناسی مولکولی و زیست فناوری پدید آورد. او روشی بنام **پی سی آر (PCR)** ابداع نمود. روشی که مولیس ابداع نمود مانند

فرآیندی است که در یک دستگاه فتوکپی معمولی رخ می دهد. در این روش با فراهم آوردن مواد اولیه ضروری، می توان در عرض چند ساعت میلیون‌ها نسخه DNA تکثیر نمود. واژه PCR مخفف **واکنش زنجیره‌ای پلیمراز**[1] است. در واقع PCR به مجموعه واکنش‌هایی گفته می شود که در درون دستگاه **ترموسایکلر**[2] رخ می دهد. دستگاه ترموسایکلر مانند دستگاه فتوکپی معمولی شرایط دمایی لازم را برای تکثیر DNAی الگو فراهم می کند.

تصویر واقعیِ یک دستگاه فتوکپی معمولی

تصویر واقعیِ یک دستگاه ترموسایکلر

شکل ۱ مقایسه دستگاه ترموسایکلر و دستگاه فتوکپی

1 Polymerase Chain Reaction
2 Thermal cycler

جدول۱- مقایسه اجزای مورد نیاز در دستگاه فتوکپی معمولی و ترموسایکلر

اجزا	در دستگاه فتوکپی معمولی	در ترموسایکلر
الگوی که باید تکثیر شود	متنی که می خواهیم تکثیر کنیم	قطعه DNAای که می خواهیم تکثیر کنیم
مواد جهت تکثیر	جوهر در رنگ‌های مختلف	انواع نوکلئوتید ها(A,T,C,G)
	کاغذ	سایر فاکتورها (آنزیم، پرایمرها، محیط آبی، یون ها)
	شرایط نوری و دمای مناسب	شرایط دمایی مناسب

مثلا در صحنه یک جنایت چند قطره خون از مجرم باقیمانده است و چند نفر مظنون وجود دارد، به منظور مطالعه بر روی این نمونه کوچک برای یافتن مجرم اصلی با کمک نشانگرهای ژنتیکی ، اول باید DNA موجود در این خون را تکثیر نمود.

قبلاً برای بدست آوردن نسخه های متعدد از یک ژن خاص، این ژن را به داخل حامل مناسب مانند پلاسمید[1] وارد کـرده و در یـک بـاکتری تکثیـر مـی کردند. ولی امروزه تکثیر نسخه های متعدد را به سـادگی و بـا اسـتفاده از روش PCR انجام می دهند.

حداقل عوامل مورد نیاز جهت یک واکنش PCR به قرار زیر است:

۱- DNA الگو استخراج شده از سلول

۲- پرایمرها[2] یا قطعات کوچک DNA جهت شروع تکثیر

۳- چهار بازسازنده DNA یا dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

۱) آنـزیم DNA پلیمـراز مقـاوم بـه حـرارت مثـل Taq-DNA Polymerase

۴- وجود شرایط بافری (محیط مایع) مناسب و یون Mg^{2+}

---

[1] یک قطعه‌ی حلقوی کوچک از DNA است که حاوی اطلاعات ژنتیکی مهمی برای رشد باکتری‌ها است.

[2] پرایمر یا آغازگر، قطعه کوچکی از DNA (معمولا ۱۰ تا۵۰نوکلئوتیدی) است که با نشستن بر روی توالی مکمل خودش در DNA امکان تکثیر قطعه هدف را توسط آنزیم پلیمراز فراهم می‌کند. اگر پرایمر نباشد آنزیم نمی‌تواند تکثیری انجام دهد.

مراحل کار یک واکنش PCR

پس از ترکیب نمودن مواد فوق تحت شرایط مناسب نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شده تا شرایط دمایی ویژه برای تکثیر فراهم گردد. بطور کلی هر چرخه حرارتی PCR شامل ۳ مرحله می باشد[۱]:

۱) مرحله باز شدن یا واسرشت شدن دو رشته [۲]

۲) مرحله چسبیدن پرایمر به DNAی الگو [۳]

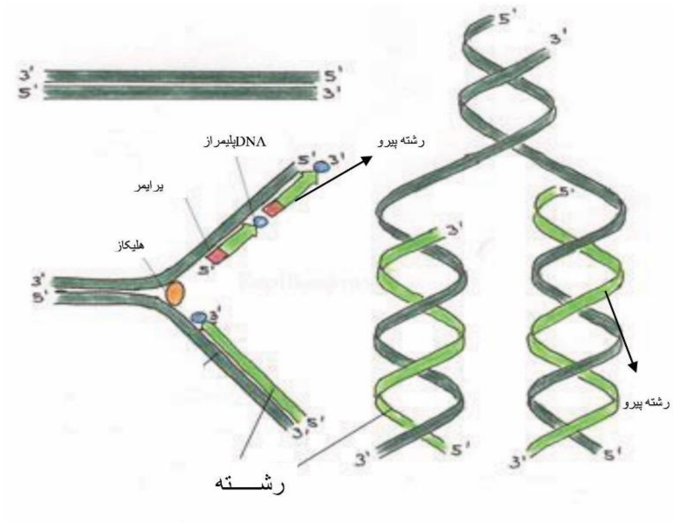
۳) مرحله ساخت رشته مکمل با DNAی الگو [۴]

مرحله اول : باز شدن یا واسرشت شدن دو رشته مکمل

در درون سلول برای تکثیر DNA در نقاط خاصی دو رشته DNA از هم باز شده و تکثیر شروع شده و کم کم در حالیکه تکثیر ادامه دارد باز شدن دو رشته DNA بطرف جلو پیش می رود.

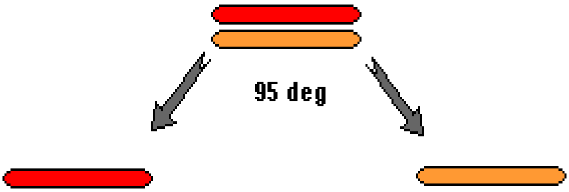
---

[2] Denatuing step
[3] Annealing step
[4] Extention step



شکل۲- همانندسازی طبیعی

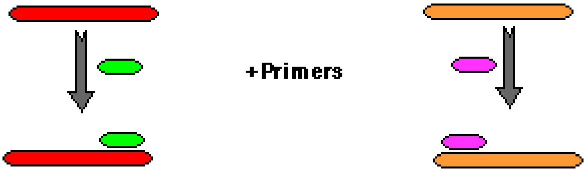
اما در شرایط خارج از سلول بجای بـاز کـردن گـام بـه گـام (ماننـد زیـپ) DNAی الگو، دو رشته DNA با قرار گرفتن در حـرارت بـالا بطـور کامـل از همدیگر جدا می شوند. با قرار گـرفتن DNA در دمـای $100^{\circ}C$-۹۳ نـه تنهـا انرژی لازم برای شکستن پیوندهای موجود در DNA فراهم می شود، بلکه دو رشته DNA بطور کامل از یکدیگر جدا می شوند(شکل ۳).



شکل۳- مرحله اول : باز شدن یا واسرشت شدن دو رشته مکمل

مرحله دوم : چسبیدن پرایمر به DNAی الگوی

در مرحله دوم با کاهش دما به C ° ۶۵- ۳۷ (بسته به نـوع پرایمـر مـورد استفاده) امکان اتصال پرایمر را به DNAی الگو فراهم نموده تا DNA پلیمراز بتواند با اتصال به آن تکثیر را آغاز نماید(شکل۴).



شکل۴- مرحله دوم : چسبیدن پرایمر به DNAی الگوی

مرحله سوم : ساخت رشته مکملِ DNAی الگوی

در این مرحله مجددا دما افزایش یافته و به C °۷۲ رسیده تـا آنـزیم DNA پلیمـراز بتوانـد بـا افـزودن نوکلئوتیـد بـه سـر ´۳ پرایمـر رشـته الگـو را تکثیـر کند(شکل۵).

شکل 5- مرحله سوم : ساخت رشته مکملِ DNAی الگوی

نکته: سه مرحله فوق یک چرخه یا سیکل PCR نامیده مـی شـود و چنـد دقیقه بیشتر طول نمی‌کشد، اما باید به خاطر داشـت کـه در طـی یـک چرخـه، DNA فقط دو برابر می شود پس لازم است که این چرخه چنـدین بـار تکـرار گردد (۳۰ تا ۳۵ بار) تا تکثیر، فرم تصاعدی یافته و میلیون‌ها نسخه از DNAی مد نظر بدست آید.

در ابتدای ابداع PCR یک مشکل وجود داشت، چون در واکنش PCR دمـا تا حدود ۱۰۰ درجه سانتیگراد بالا می رود، نمـی‌تـوان از آنـزیم DNA پلیمـراز معمولی استفاده کرد زیرا آنزیم‌های معمولی به حرارت حساس بوده و از بین می روند. در ابتدا، آنزیم DNA پلیمراز معمولی بصورت دستی هر بار در مرحله سوم به واکنش اضافه می شد. ورود DNA پلیمرازهای مقاوم به حرارت در تکنیـک PCR یکی از پیشرفت های مهم در ایـن زمینـه بـود. پرمصـرف تـرین آنـزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت که در PCR استفاده می شود Taq می باشد که

منبع آن باکتری ترموس اکواتیکوس[1] است این باکتری حرارت دوست است و اولین بار از چشمه‌های آب گرم جدا شد.

شکل ۶- کشف باکتری مقاوم به حرارت در چشمه‌های آب گرم

[1] *Thermus aquaticus*

آزمایش۱

اجرای آزمایش PCR برای نمونه گیاه و خون (پرایمر تصادفی)

در این آزمایش نمونه DNA استخراج شده از خون یا گیاه (فعالیت عملی مبحث قبل) جهت تکثیر مورد استفاده قرار می گیرد.

۱- ترکیبات واکنش PCR زیر را تهیه کنید. بهتر است ترکیب نمودن مواد در زیر هود لامینار صورت گیرد. (برای اطلاعات بیشتر رجوع به پیوست۶)

جدول۲ - ترکیبات شیمیایی بکار رفته در هر مخلوط واکـنش PCR بـرای پرایمر RAPD[1]

حجم مد نظر (میکرولیتر)	نام ماده
۲/۵	PCR buffer
۰/۷۵	Mgcl 2
۰/۵	dNTPs
۱	پرایمر
۰/۲۵	Taq DNA Polymerase
۱	DNA
۱۹	ddH2O
۲۵	حجم کل

[1] برای اطلاعات بیشتر در خصوص پرایمرها به مبحث ۶ مراجعه کنید.

۲- برنامه دمایی مناسب (مانند برنامه زیر) را به دستگاه داده تا DNA شما را تکثیر نماید.

جدول ۳- برنامه دمایی PCR: برای پرایمر RAPD، نمونه خون و گیاه

۱) برنامه واسرشت اولیه	۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد
۲) برنامه ۳۵- ۳۰ چرخه ای	۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد
	۱ دقیقه در دمای ۳۶ درجه سانتیگراد
	۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد
۳) برنامه نهایی تکمیل توسعه DNA	۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد

شکل ۷- قرار دادن ویال‌ها حاوی مخلوط واکنش در دستگاه ترموسایکلر

نکته۱: همانطور که قبلا خواندید، معمولا ۳مرحله (واسرشت- اتصال- تکثیر) فوق بارها و بارها تکرار می گردند اما بجز این برنامه ۳ مرحله ای، قبل از شروع باید برای چند دقیقه، یکبار دما به ۹۳-۱۰۰ درجه رسانده شود، سپس مراحل ۳ تایی شروع و تکرار گردند. به این عمل واسرشت اولیه گفته می شود. همچنین پس از پایان برنامه ۳۰ تا ۳۵ چرخه ای، باید یک مرحله چند دقیقه‌ای بعنوان تکثیر نهایی در نظر گرفته شود.

نکته۲: دماهای ارائه شده در جدول ۳ برای پرایمر RAPD بهینه شده است اما معمولا در هر آزمایشگاهی بسته به محیطی بهینه سازی مجدد باید صورت گیرد که گاه موجب تغییراتی در اعداد جدول فوق می گردد.

۱- ترکیب تهیه شده فوق که اصطلاحا ری اکشن[1] یا مخلوط می نامند را در دستگاه ترموسایکلر قرار دهید و دستگاه را روشن کنید.

۲- پس از اتمام کار دستگاه ترموسایکلر، محصولات PCR را تا زمان استفاده در یخچال (در دمای ۴ درجه سانتیگراد) نگهداری کنید.

[1] reaction

آزمایش ۲

اجرای آزمایش PCR برای نمونه باکتریایی(پرایمر 16srRNA)

در این آزمایش نمونه DNA استخراج شده از باکتری(فعالیت عملی مبحث قبل) جهت تکثیر مورد استفاده قرار می گیرد

۱- با کمک کارشناس آزمایشگاه ترکیبات واکنش PCR را به صورت زیر آماده کنید. بهتر است این مرحله از آزمایش را در زیر هود لامینار انجام دهید.

(برای اطلاعات بیشتر رجوع به پیوست۷)

جدول ۴- اجزای مخلوط (PCR) جهت نمونه باکتریایی

حجم مد نظر(میکرولیتر) باکتری	نام ماده
۲/۵	PCR buffer
۰/۷۵	Mgcl2
۰/۵	dNTPs
۱ ۱	پرایمر جلویی پرایمر عقبی
۰/۲۵	Taq DNA Polymerase
۵	DNA
۱۴	ddH2O
۲۵	حجم کل

۲- برنامه دمایی مناسب (مانند جدول ۵) را به دستگاه داده تا DNA شما را تکثیر نماید.

جدول ۵- برنامه دمایی PCR برای پرایمر **16srRNA**

۱) برنامه واسرشت اولیه	۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد
۲) برنامه ۳۵ چرخه ای	۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد
	۱ دقیقه در دمای ۵۷ درجه سانتیگراد
	۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد
۳) برنامه نهایی تکمیل توسعه DNA	۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد

نکته: پرایمر 16srRNA در تشخیص باکتریها کاربرد دارد. (جهت کسب اطلاعات بیشتر به مبحث ۶ مراجعه کنید.)

۳- ترکیب تهیه شده فوق که اصطلاحا ری اکشن می نامند را در دستگاه ترموسایکلر قرار دهید و دستگاه را روشن کنید.

۴- پس از اتمام کار دستگاه ترموسایکلر، محصولات PCR را تا زمان استفاده در یخچال (در دمای ۴ درجه سانتیگراد) نگهداری کنید.

مبحث پنجم

آشکارسازی محصول PCR

(معرفی فرآیند الکتروفورز)

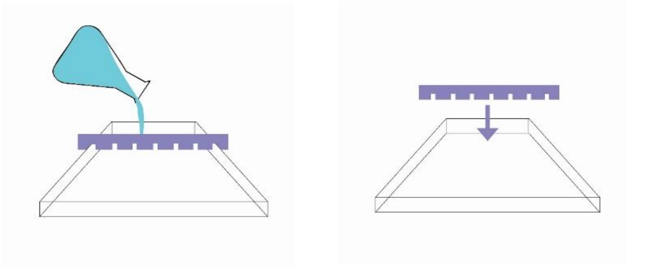
پس از اتمام واکنش PCR ژن یا قطعه DNA مورد نظر تکثیر شده است، اما هنوز قابل مشاهده نیست. برای دیدن قطعه یا قطعات حاصل از PCR که دارای طول متفاوتی هستند باید آنها را از یکدیگر جدا کرد. بدین منظور محصولPCR را بر روی یک محیط ژله‌ای قرار می دهند چون محیط‌های ژله‌ای دارای منافذ ریزی هستند، امکان حرکت DNA را فراهم می کنند تا قطعات DNA بسته به طول خود در منافذ مختلف گیر کنند و از یکدیگر تفکیک شوند. این محیط ژله‌ای تقریبا مانند همان ژله خوراکی خودمان تهیه می شود. فقط به یاد داشته باشید این نوع از ژله‌ها خوردنی نیستند! یک نوع ژل متداول برای این کار «آگارز» است که از جلبک دریایی استخراج و تهیه می گردد. عامل محرک حرکت قطعات بر روی ژل بار الکتریکی آنهاست.

همانطور که در شکل ۱ می بینید، برای تهیه ژل آگارز، ابتدا پودر ژل را با محلول مورد نظر ترکیب کرده، حرارت می دهند و قبل از سرد شدن درون یک ظرف تخت که اصطلاحا سینی نامیده می شود می ریزند.

شکل۱- تهیه ژل

برای اینکه بتوان محصولات PCR خود را وارد ژل کرد، باید بر روی آن چاهک‌هایی ایجاد کرد. پس باید قبل از اینکه ژل سفت شود با قرار دادن یک شی که مانند شانه دندانه دارد چندین چاهک ایجاد کرد(شکل۲). حال برای سرد و سفت شدن به ژل فرصت داده می شود. پس از سفت شدن ژل، شانه خارج می شود.

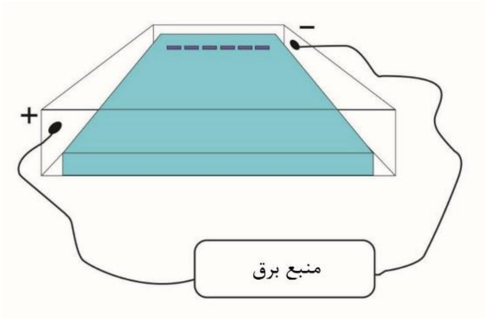
نکته: دقت شود شانه باید طوری روی ژل قرار داده شود که فقط روی ژل چاهک ایجاد کند و به سمت دیگر ژل نرسد.



شکل۲- ریختن ژل در سینی و ایجاد چاهک با قرار دادن شانه

مرحله بعدی حرکت دادن DNA بر روی این ژل هاست اما چگونه؟!

از آنجایی که DNA دارای بار منفی است با قرار گرفتن در معـرض جریـان الکتریکـی مناسـب، بطـرف قطـب مثبـت کشـیده مـی شـود. ایـن فرآینـد را **الکتروفورز** می گویند. به منظور اجرای فرآیند الکتروفورز باید ابتدا ژل را درون یک محفظه که تانک الکتروفورز نامیده می شود و حاوی یـک محلـول (بـافر) مناسب است، قرار داد(شکل۳).

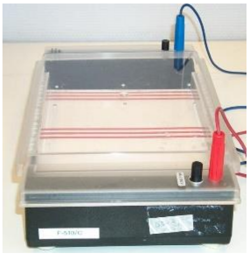


شکل۳- ژل درون تانک الکتروفورز

قبل از برقراری جریان برق، محصول PCR درون چاهک‌ها ریخته می شود. سپس دو سر تانک را به یک منبع برق وصـل مـی کننـد. بـا برقـراری جریـان الکتریکی قطعات بر اساس سایزشان با سرعت‌های متفاوت شروع به حرکت می کنند.

شکل۴ - منبع برق الکتروفورز

این منبع جریان الکتریکی لازم را برای حرکت قطعاتDNA فراهم می کند.

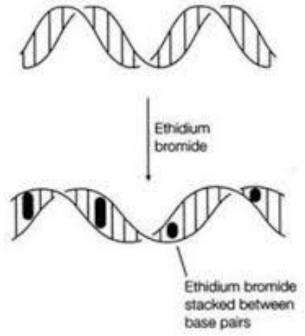


شکل۵- تانک الکتروفورز

این تانک محل قرار دادن ژل که دارای محیط آبی (بافری) مناسب می باشد.)

پس از این مرحله هرچند تفکیک صورت گرفته است، اما قطعات هنوز قابـل مشاهده نیستند. برای مشاهده باید تفاوت رنگ لازم بین رنگ محیط زمینـه‌ای ژل و قطعات DNA ایجاد شود تا قطعات قابل رویت شوند. بدین منظور ژل‌هـا باید رنگ آمیزی شوند.

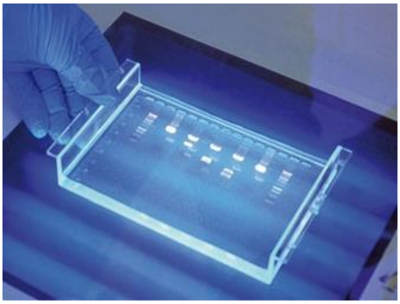
ژل آگارز با رنگ اتیدیوم بروماید یا ژل رد رنگ آمیـزی مـی شـود. اتیـدیوم برومايد يک رنگ فلوئورسنس است و توانایی وارد شدن در DNA دو رشـته‌ای را دارد(شکل۶) .



شکل ۶- قرار گرفتن اتیدیوم برومايد درون دو رشته DNA

بعد از رنگ آمیزی ، ژل بر روی دستگاه ترانس ایلومینیتور (شـکل۷) قـرار داده شده و باندهای DNA با نور UV (فرا بنفش) قابل مشـاهده مـی شـوند (شکل ۸). البته امروزه بعلت خطرات رنگ اتیدیوم برومايد بر سلامت محققين از رنگ‌های جدید کم خطر مانند **"ژل رد"** استفاده می شود.

شکل ۷- یک مدل دستگاه ترانس ایلومینیتور



شکل ۸ – رویت باند

آزمایش۱

تهیه ژل آگارز:

مراحل تهیه ژل آگارز ۲٪ :

۱- ۲ گرم از پودر آگارز را وزن کرده، داخل ارلن بریزید.

۲- سپس به پودر آگارز، بافر TBE (1X) اضافه نموده و به حجم ۱۰۰ برسانید. (رجوع به پیوست ۸)

۳- ارلن حاوی این مخلوط حدود یک دقیقه درمایکروویوو قرار دهید تا بجوشد و محلول شفاف و یکدستی حاصل گردد.

۴- زمانی که دمای محلول به حدود ۶۰-۵۰ درجه رسـید، ۲/۵ میکرولیتـر رنگ ژل رد به آن اضافه کنید[1].

۵- سپس محلول را در سینی ژل که قبلا شانه در آن قرار داده شده بود، بریزید تا ژل بسته شود.

فرآیند الکتروفورز

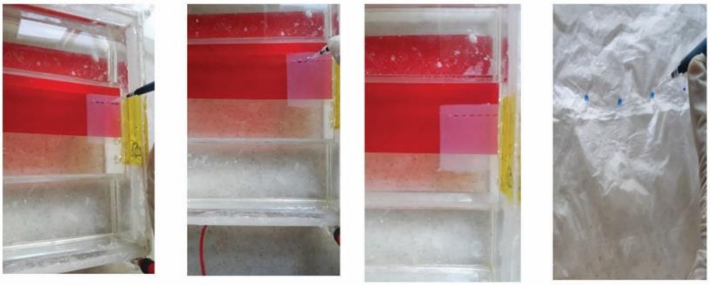
۱- پس از بستن ژل، آنرا در تانک حاوی بافر TBE (۱X) قرار دهید.

۲- هر۴ تا ۵ میکرولیتر ازمحصول PCR را با ۱ میکرولیتر لودینگ بـافر[2] مخلوط نموده و در چاهک‌ها بریزید. (پیوست۱۰)

---

[1] برای رنگ آمیزی می‌تـوان یـا رنـگ را در هنگـام تهیـه ژل در آن ریخـت یـا بعـد از اتمـام فرآینـد الکتروفورز، ژل را در رنگ قرار داد.

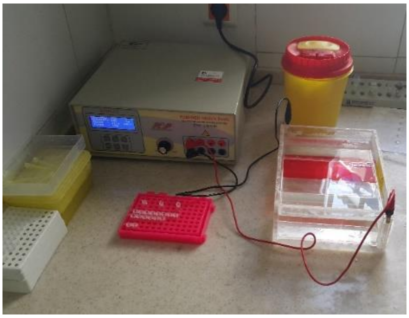
[2] لودینگ بافر یک ترکیب رنگی است برای مشاهده حرکت DNA بر روی ژل(قبل از رنگ آمیزی اصلی) استفاده می‌شود و فقط جایگاه DNA را بر روی ژل در مرحله الکتروفورز نشان می‌دهد. (مراجعه به پیوست۱۰)



ترکیب محصول PCR با لودینگ بافر — قرار دادن ژل در تانک — ریختن نمونه در چاهک

شکل ۹- مراحل فرایند الکتروفوز

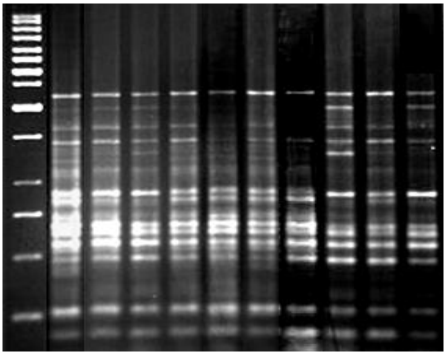
۳- سپس با ولتاژ ثابت ۱۰۰-۹۰ ولت، جریان لازم جهت حرکت مولکولهای DNA را فراهم کنید.



شکل ۱۰ – برقرار کردن جریان برق

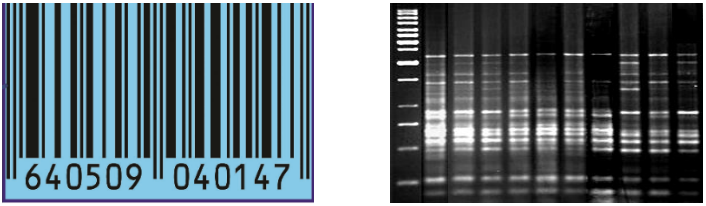
۴- پس از نزدیک شدن نمونه به نزدیک انتهایی ژل، جریان برق را قطع کنید.

۵- ژل را در دستگاه ترانس ایلومینیتور یا ژل داک قرار داده و عکس گرفته و سپس تفسیر نمائید.



شکل ۱۱- نمونه یک ژل آگارز بعد از آشکار سازی

آیا شکل ۳ در مبحث۲ را بیاد دارید. در واقع باندهای DNA بر روی ژل الکتروفوورز سریعا باندهای موجود بارکد محصولات را بیاد ما می آورد.



شکل ۱۲- شباهت بارکد و قطعات DNA روی ژل

مبحث ششم
آشنایی با نشانگرهای مبتنی بر DNA

نشانگرهای مولکولی DNA بر حسب استفاده از PCR به دودسته تقسیم می شوند:

- مبتنی بر PCR
- غیر مبتنی بر PCR

در نشانگرهای غیر مبتنی بر PCR بجای استفاده از PCR معمولا از آنزیم‌های برشی برای شناسایی تفاوت‌های موجود در توالی DNA استفاده می شود.

از آنجا که در کتاب حاضر تمرکز بر نشانگرهای مبتنی بر PCR است که در زیر مثال‌های از آن ارائه می گردد.

بطور کلی نشانگرهای مبتنی بر PCR دو دسته اند تصادفی و اختصاصی.

نکته: گاهاً واژه نشانگر مترادف با پرایمر بکار می‌رود. به زبان ساده در واقع پرایمرها توالی‌هایی هستند که به ما در شناسایی و تکثیر نشانگرها کمک می‌کنند. بعبارت دیگر پرایمترها کمک می‌کنند نشانگر مد نظر تکثیر و روئیت شود. اما متداول شده است که این دو واژه بجای هم بکار برده می شوند.

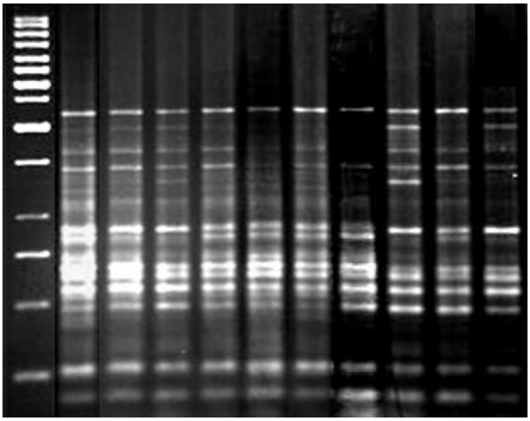
نشانگرها (پرایمرهای) تصادفی

از آنجایی که همیشه توالی لازم برای طراحی پرایمر برای نشانگرهای مولکولی DNA در دسترس نیست، محققین پرایمرهایی را طراحی کردند که توالیشان بطور اختیاری انتخاب شده و بطور تصادفی هر جایی از ژنوم که توالی مکملش را داشته باشد می نشینند و تکثیر از آنجا آغاز می شود و باعث می گردد ما اطلاعاتی (نشانگرهایی) در مورد کل ژنوم بدست آوردیم و افراد مختلف را بطور کلی نه از نظر یک ژن خاص با هم مقایسه نمائیم. مثلا برای بررسی تنوع ژنتیکی موجود در یک جمعیت از گوزن‌ها می توان از این پرایمر استفاده نمود. هرچه افراد قطعات متفاوت تری روی ژل تولید نمایند نشان دهنده تفاوت بیشتر درون افراد این جمعیت است. معروفترین این پرایمرها، پرایمر (یا نشانگر) **RAPD**[1] است. این پرایمر دارای توالی از ۱۰ نوکلئوتید است که بطور تصادفی انتخاب شده اند.

معمولا در پرایمرهای تصادفی باندهای بسیار زیادی تولید می شود بطوریکه مطالعه آنها بسیار سخت بوده و تنها با نرم افزارهای خاص امکان پذیر است.

---

[1] RAPD = Random Amplified Polymorphic DNA



شکل ۱- باندهای حاصل از پرایمرهای تصادفی

انواع دیگری از نشانگرهای تصادفی وجود دارد که عبارتند از:

- **نشانگر دف** (**DAF**[1]) : دف پرایمر اختیاری با **۵** تا **۸** نوکلئوتید است.
- **نشانگر ا پی- پی سی آر** (**AP-PCR**[2]): پرایمری بـا تـوالی اختیاری**۱۰** تا **۵۰** نوکلئوتید (اکثرا ۲۰ نوکلئوتیدی) می باشد.

---

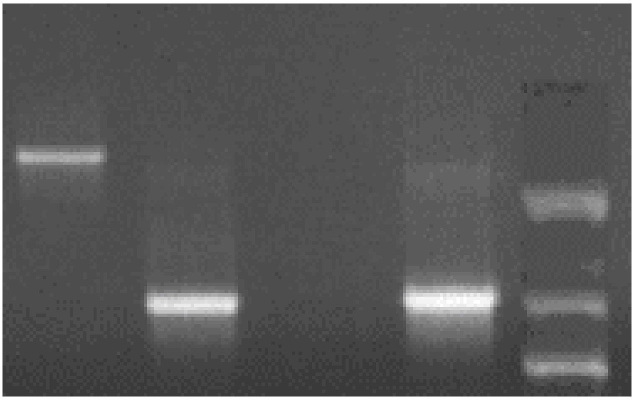
1 DAF=DNA Amplification finger printing

2 AP-PCR=Arbitrarily Primed PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغارگر اختیاری)

نشانگرها (پرایمرهای) اختصاصی:

نشانگرهای اختصاصی برای تفکیک دقیق در مواردی مانند شناسایی گونه ها، بیماریها، تعیین هویت اشخاص، پزشکی قانونی و... بکار می روند. از جمله این نشانگرها می توان به 16srRNA و... اشاره کرد.

بعنوان مثال پرایمر 16S rRNA ، پرایمری است که بر اساس توالی ژن RNA ریبوزومی 16s که در تمام باکتری‌ها وجود دارد طراحی شده است و دارای یک منطقه مشترک ثابت در بین تمام گونه های باکتریایی است. این پرایمر ناحیه ثابت موجود در توالی ژن RNA ریبوزومی 16s (16S rRNA) که در تمام باکتری‌ها ثابت است را تکثیر می نمایند. یکی از کاربردهای این پرایمر در تشخیص منشاء بیماریهای میکروبی استفاده می شود



شکل ۲- باندهای حاصل از پرایمرهای اختصاصی

مبحث هفتم
اخلاق و ایمنی در پژوهش

در هر علم و فناوری خصوصا فناوری‌های جدید و نو ظهور رعایت اصول ایمنی و اخلاق الزامی است، وگرنه آن فناوری نه تنها موجب پیشرفت و ارتقاء ما نخواهد شد بلکه ممکن است منجر به نابودی نسل بشر گردد. در مبحث حاضر بطور مختصر در خصوص اخلاق در پژوهش مطالبی خواهید خواند.

اخلاق در پژوهش

نقطه عطف تاریخ اخلاق در پژوهش، به مطالعات غیر اخلاقی تعدادی از پزشکان نازی طی جنگ جهانی دوم بر می گردد که منجر به آسیب جدی به سلامت اسرای اردوگاه‌ها شد. در این اردوگاه‌ها زندانیان را مجبور به قرار گرفتن در معرض سرمای شدی مانند قرار گرفتن در آب یخ برای ساعات طولانی به منظور بررسی اثر سرمازدگی، ریختن سم در غذای اسرا و کالبدشکافی آنها بعد از مرگ، عقیم کردن و.. کرده بودند. پس از جنگ در سال‌های ۱۹۴۷-۱۹۴۶، در دادگاهی در شهر نورنبرگ در کشور آلمان به این پرونده رسیدگی شد.

آن محاکمه منجر به وضع قوانینی برای پژوهش (خصوصا مطالعه بر روی انسان) گردید که به نام کدهای نورنبرگ معروفند. بطور کلی مفهوم کدهای نورنبرگ عبارت است از:

۱. شرکت افراد در پژوهش باید داوطلبانه باشد.

۲. شرکت کنندگان باید با رضایت کامل در پژوهش شرکت کنند.

۳. سود و منفعت حاصل از پژوهش باید بیشتر از مضرات آن باشد.

بعدها بیانه‌ای توسط انجمن جهانی پزشکی در شهر هلسینکی در کشور فنلاند برای مطالعه بر روی انسان تصویب شد که بنام بیانیه هلسینکی معروف است در آن بر ضرورت داوری طرح‌های پژوهشی و بررسی رعایت اصول اخلاق قبل از اجرای پژوهش تاکید شده است. در ایران کمیته‌ای بنام " کمیته اخلاق در پژوهش" این داوری را بر عهده دارد.

کسب رضایت از افراد یکی از مهمترین نکات پژوهش در انسان هاست. به عنوان مثال اگر محققی بخواهد چربی خون را بررسی کند باید از افراد اجازه بگیرد و نمی‌تواند با مراجعه به یک مرکز خون گیری چند نمونه خون تهیه کند. اما اگر محققی بخواهد با استفاده از نشانگرهای مولکولی احتمال ابتلا به یک بیماری ژنتیکی را در آینده در تعدادی از افراد بررسی کند نه تنها باید از خود فرد مورد مطالعه اجازه بگیرد بلکه چون اگر در فرد مورد مطالعه وجود ژن این بیماری مشخص گردد احتمال وجود آن در بستگان او نیز مشخص می گردد، برای چنین آزمایشی باید از تمام خانواده او اجازه و رضایت آگاهانه کسب گردد.

احترام به حقوق حیوانات آزمایشگاهی:

شکل ۱- استفاده از موش در پژوهش ها

ما بسیاری از پیشرفت‌های علمی خود را مدیون مطالعات بـر روی حیوانـات آزمایشگاهی هستیم مانند آزمایش داروها قبل از ورود به بازار بر روی حیوانـات و... اما لازم است در حین کار با حیوانات به حقوق آنها احترام گذاشـت. بعنـوان مثال :

- در کار با حیوانات آزمایشگاهی ما تا حد ممکن بایـد کمتـرین تعـداد حیـوان استفاده شود. البته تاحدی که به تحقیق آسیب نزد.
- حیوانات در شرایط مناسب نگهداری و حمل و نقل گردند.
- پس از هر نوع عمل جراحی از داروهـای لازم جهـت ممانعـت از عفونـت و کاهش درد استفاده شود.

- پس از مرگ حیوانات باید آنها را در محل مناسب دفن نمود.

شکل ۲- نماد تشکر از حیوانات آزمایشگاهی بخاطر خدماتشان در جهت پیشرفت علم که در نزدیکی موسسه سیتولوژی و ژنتیک نووسیبریسک در روسیه[1] نصب شده است.

ایمنی زیستی:

با توجه به اینکه شما در مسیر آموختن زیست فناوری فعالیت‌های عملی دارید و ممکن است برحسب نیاز وارد برخی آزمایشگاه‌های تخصصی در دانشگاه

---

[1] Institute of Cytology and Genetics in Novosibirsk, Russia

ها، مراکز تحقیقاتی و پژوهشگاه‌ها شوید، در این مبحث ابتدا شما را با انواع مختلف درجات ایمنی آشنا می کنیم.

شکل۳- نماد ایمنی زیستی

علامت فوق به معنای رعایت اصول ایمنی زیستی است. این علامت در آزمایشگاه‌هایی که با موجودات زنده و یا اجزائی از موجودات سر وکار دارند بکار می رود.

همانطور که بیاد دارید در کتاب زیست شناسی دبیرستان خوانده اید، زمانی محققین قصد داشتند از تلاقی دو گیاه کلم و هویج با کمک زیست فناوری گیاهی تولید کنند که ریشه آن هویج و ساقه آن کلم باشد تا بتوان از زمین‌های کشاورزی بهره برداری بیشتری کرد. اما نتایج تحقیق آنها برعکس شد و گیاهی که تولید شد ساقه‌ای مانند هویج و ریشه‌ای مانند کلم داشت!!! و یا اتفاق دیگری که از تلاقی زنبور عسل با یک زنبور درشت هیکل تر زنبور عسل

درشتی تولید کنند که بتواند عسل بیشتری تولید کند اما باز هم برعکس شد زنبور بزرگی تولید شد اما قابلیت تولید عسل را نداشت و برعکس قدرت تولید سم بسیار زیادی داشت!!!

از این اتفاقات در دنیای زیست فناوری بسیار رخ می دهد، بعبارتی در هر آزمایشی امکان پاسخ نگرفتن و به هدف نرسیدن هست اما محقق نباید دلسرد شود. همیشه با پشتکار هدف دست یافتنی است. اما در حوزه زیست فناوری چون احتمال چنین خطاهایی بالاست باید مواظب بود دستاوردهای این تحقیقات در شرایط ایمن نگهداری شوند تا قبل از تائید بی خطر بودن به محیط طبیعی وارد نگردند.

در مورد زنبور خطرناکی که در مثال بالا بدان اشاره شد متاسفانه عدم رعایت اصول ایمنی باعث فرار تنها چند عدد از آن زنبورهای بسیار خطرناک و ورودشان به طبیعت گردید. این زنبور در طبیعت تکثیر شد و سالانه جان صدها انسان را به خطر می اندازد.

حتی اگر این دستاوردها بی خطر باشند ورود آنها به طبیعت می تواند اکوسیستم را بهم بزند پس قبل از رها کردن هر موجودی در طبیعت باید به دقت به جنبه هابی مختلف آن توجه کرد. یک مثال ساده و حتی غیر زیست فناوری همین لاک پشت‌های زیبا و کوچکی است که طی چند سال اخیر در عید نوروز فروخته می شوند. چون این لاک پشت گوشت خوار است و متعلق

به این محیط نیست، با رها شدنش در طبیعت باعث گردیده نسل برخی موجودات زنده به خطر بیفتد.

هرچند این لاک پشت‌ها محصول زیست فناوری نیستند اما به اکوسیستم آسیب زده اند. پس برای حفظ محیط زیست باید دقت کرد به ویژه در خصوص دستاوردهای زیست فناوری.

هرچند تاکنون اثرات زیان آوری از محصولات مهندسی ژنتیک و زیست فناوری از نقطه نظر علمی به اثبات نرسیده است، اما آثار احتمالی آن نیاز به بررسی مداوم دارند. از آنجا که در طول تاریخ اهداف سودجویانه و برتری طلبانه برخی انسان‌ها که به منظور نیل به اهداف تجاری و مقاصد اقتصادی خود، ابعاد ایمنی، معیارهای انسانی و منافع عمومی را نادیده می گیرند. احتمال سوء استفاده از زیست فناوری وجود دارد.

لذا لازم است قوانین و مقرراتی برای کار با این موجودات تراریخت که اصطلاحا GMO[1] نامیده می شوند وضع گردد. هر موجود تراریختی باید به درستی بررسی و از نظر ریسک خطر ارزیابی گردند تا پس از تائید ایمنی و سلامت وارد محیط زیست و سبد دارویی یا غذایی ما گردد.

---

[1] Genetically Modified Organism

به منظور اطمینان از محصولات تولید شده و جلوگیری از سوء استفاده‌های احتمالی، پروتکلی برای رعایت اخلاق در پژوهش‌های زیست فناوری نیز تدوین گردیده که تحت نام "پروتکل کارتاهنا" معروف است. در ایـران کمیتـه ملـی ایمنی زیستی از سال ۱۳۷۹ شکل گرفته است.

اصول ایمنی در آزمایشگاه

به علت اهمیت اخلاق و ایمنی پژوهش‌های زیست فناوری، در این مبحـث به معرفی قوانین و مقرارت کار در آزمایشگاه‌های زیست فناوری می پردازیم.

آزمایشات زیست فناوری باید در شرایط ایمنی خاصـی در آزمایشـگاه انجـام گردد. در تقسیم بندی آزمایشگاه‌ها آنها را برحسـب شـدت و سـختی قـوانین و مقررارت ایمنی کار بعبارتی خطرات موجود در آنها به ۴ دسته تقسیم مـی کننـد که اصطلاحا ۴ سطح ایمنی زیستی است. کم خطرترین و سـاده تـرین قـوانین متعلق به آزمایشگاه‌های سطح ۱ است و خطرناکترین و سختگیرانه ترین قوانین متعلق به آزمایشگاه‌های سطح ۴ است. در زیر بطور مختصـر شـما بـا ۴ سـطح ایمنی مذکور آشنا می شوید:

مقرارت ایمنی زیستی کار در آزمایشگاه‌های سطح۱:

- این مقرارت ایمنی زیستی برای کار با عواملی است که حداقل میـزان خطـر برای افراد و محیط را دارند، می باشد. از جمله این آزمایشگاه می تـوان بـه آزمایشگاه‌های مدارس اشاره کرد .
- عبور و مرور در این آزمایشگاه‌ها محدود نیست.
- آزمایشات بر روی میزهای معمولی آزمایشگاه انجام می شود.
- معمولا نیازی به استفاده از دستگاه‌های خاص مانند هود بیولوژیک نیست.

مقرارت ایمنی زیستی کار در آزمایشگاه‌های سطح ۲:

- مقرارت ایـن آزمایشـگاه مانـند سـطح۱ اسـت امـا آزمایشـاتی کـه در ایـن آزمایشگاه‌ها کار می شود کمی خطرناکتر از سطح ۱ هسـتند. از جملـه ایـن آزمایشگاه می توان به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی معمولی اشاره کرد .
- حضور در این آزمایشگاه فقط در زمان انجام کار مجاز است و تردد بی مورد ممنوع است.
- بعلت ایجاد آئروسل‌های آلوده در محیط، آزمایشات حتما بایـد در زیـر هـود بیولوژیک انجام شود.

تعریف آئروسل: به ذرات جامد یا مایع پراکنده شده در هـوا آئروسـل گوینـد. این ذرات ممکن است حاوی آلودگی‌های شیمیایی یا میکروب باشند.

مقرارت ایمنی زیستی کار در آزمایشگاه‌های سطح ۳:

- مقرارت این آزمایشگاه‌ها سختگیرانه تر از دو سطح قبلی است زیـرا عوامـل بیماریزای خطرناکی که ممکن است مرگبار باشند در این آزمایشگاه‌ها وجود دارند.
- علاوه بر مقرارت آزمایشگاه‌های سطح ۱ و۲، مقرارت زیـر نیـز رعایـت مـی گردد.
- کارکنان جهت کار با عوامل بیماریزا و خطرناک آموزش می بینند.
- علاوه بر اینکه تمام آزمایشات زیر هود بیولوژیک انجام می شود، افراد بایـد پوشش حفاظتی خاص داشته باشند.
- آزمایشگاه دارای فضای با طراحی خاص است.

مقرارت ایمنی زیستی کار در آزمایشگاه‌های سطح ۴:

- این نوع مقررات سختگیرانه ترین مقررات است زیرا در آزمایشگاه‌های سطح ۴ با عوامل مرگباری مانند تب کنگو، آنفلونزا A و .. کار می شود.
- در این آزمایشگاه‌ها علاوه بر رعایت مقرارت ۳ سطح قبلـی مـوارد زیـر نیـز رعایت می گردد.
- افراد با لباس‌های مخصوص حق ورود دارند.
- فضای کل آزمایشگاه مانند یک هود بیولوژیک تهویه می شود.

- افراد قبل از خروج از آزمایشگاه باید با مواد شیمیایی خاصی دوش بگیرند تا آلودگی را از آزمایشگاه خارج نکنند.

شکل۴- عکس واقعی از یک آزمایشگاه سطح ۴

دفع پسماند

در تمام آزمایشگاه‌ها چه زیست فناوری و چه غیر زیست فناوری نمی‌توان به راحتی زباله‌های خانگی پسماندها را دور ریخت مثلا ریختن یک محیط کشت درون سینک کار بسیار خطرناکی است. باید تمام پسماندها قبل از دور ریخته شدن، غیرفعال شوند و سپس به بسته به نوع پسماند بطور مناسب دفع گردند. بعنوان مثال یک محیط کشت حاوی باکتری باید قبل از دور ریخته شدن اتوکلاو گردد تا باکتری‌های کشته شوند. این روش در مورد پسماندهای زیستی و خصوصا دستاوردهای زیست فناوری (ارگانیسم‌های حاوی DNA نوترکیب) بسیار باید به شدت رعایت شود.

پیوست ها

پیوست ۱

مقررات ایمنی کار با باکتری *E. coli*

باکتری *E. coli* یا اشرشیاکلی از مرسومترین باکتری‌های مورد استفاده در آزمایشگاه‌ها می باشد. در صورتی که از این باکتری برای تحقیقات غیر از مهندسی ژنتیک استفاده گردد، ایمنی سطح ۱ برای کار با باکتری فوق در آزمایشگاه کافی است که نکات کلیدی آن به صورت زیر است:

۱- کار با باکتری فوق روی میزهای معمولی آزمایشگاه و کنار شعله امکانپذیر است.

۲ سطوح کاری روزی یکبار و بعد از هر بار کار با این میزبان باید ضد عفونی گردد. عمل ضد عفونی کردن توسط ساولن ۱۰٪ یا وایتکس ۱۰٪ صورت می گیرد.

۳- در هنگام کار با باکتری فوق، تیوپ‌ها و سر سمپلرها آلوده را پس از مصرف به ظرف حاوی ساولن ۱۰٪ انتقال دهید

۴- بعد از ضد عفونی کردن مواد آلوده و حذف ساولن ۱۰٪ وسایل آلوده اتوکلاو شوند.

۵- پی پت کردن محلول باکتری توسط سمپلرهای خودکار صورت گیرد.

۶- بعد از کار با ارگانیسم‌های فوق شستشوی دستها حتما انجام شود. برای این کار صابون مایع وشستشو ۲۰ ثانیه کافی به نظر می رسد.

- در صورتی که از این میزبان برای تولید مواد توکسیک مضر برای انسان و یا کلون سازی ژنومهای ویروسی استفاده گردد، در این صورت ایمنی زیستی سطح ۲ بایستی رعایت گردد.

پیوست۲

مقررات ایمنی کار با خون و فرآوردهای آن

کار با نمونه‌های خونی مورد آزمایش بعلت امکان آلوده بودن به انواع ویروس‌های بیماریزای انسانی (مانند ایدز، هپاتیت بی و..) بسیار خطرناک است. این ذرات ویروسی هپاتیت بی برخلاف ذرات ویروسی ایدز قادرند در خارج از بدن موجود زنده به مدت چندین روز زنده باشند. مسلما رعایت نکات ایمنی در آزمایشگاههای فوق ضروری بوده و هر گونه بی احتیاطی می تواند خطرات بالقوه جبران ناپذیری را در برداشته باشد.

۱- آزمایشگاه تحقیقاتی مربوط به نمونه‌های خونی باید در مکان مشخص و جدا از سایر بخشهای آزمایشگاهی ساخته شود.

۲- افراد در ارتباط با این نمونه‌ها بایستی واکسینه شده و در مواقع بروز حادثه فرمهای مخصوصی را پر کنندو در فرمهای مذکور علل حادثه ذکر گردد.

۳- پوشیدن دستکش، لباسهای مناسب آزمایشگاهی، شستشوی مداوم دستها، عدم استفاده از کفشهای روباز و عدم استفاده از لنز و لوازم آرایشی به شدت توصیه می گردد.

۴- استفاده از هودهای بیولوژیک در حین کار توصیه می گردد. سطح کاری توسط bench-cover (که متشکل از یک لایه پلاستیک و بخش جاذب رویی) پوشیده شود تا بعد از اتمام کار پوشش فوق جمع آوری شده و اتوکلاو گردد.

۵- در صورت آلوده شدن میزهای آزمایشگاه توسط خون ، میز و یا جایگاه آلوده توسط یکی از مواد ضد عفونی کننده آب ژاول (وایتکس) ٪۱۰یا سود ۰/۵ مولار، و یا SDS ۰/۵٪ ضد عفونی شده و سپس با آب آبکشی گردد.

۶- نمونه‌های آلوده پس از علامت گذاری اتوکلاو گردند.

۷- پاکسازی منظم و دوره‌ای در محوطه‌های فوق بایستی انجام گیرد.

پیوست۳

بافر استخراج DNA از خون

- قبل از شروع این آزمایش لازم است بافر استخراج را که اجزای آن در جدول زیر ارائه شده، آماده کنید.

طرز تهیه بافر استخراج

اجزا	مقادیر
Sucrose	۵۴/۷۶گرم
Tris-HCl	۰/۷۸۷ گرم
Mgcl2	۰/۵۰۷ گرم
Triton 100x	۵ میلی لیتر
ddH_2O[۱]	حدودا ۴۹۵ میلی لیتر
حجم نهایی	۵۰۰ میلی لیتر

بعابرتی باید با آب مقطر استریل محلول را به حجم ۵۰۰ میلی لیتر برسانید

[۱] آب مقطر دو بار تقطیر استریل

پیوست ۴

بافر استخراج DNA از گیاه

- قبل از شروع این آزمایش لازم است بافر استخراج را که اجزای آن در جدول زیر ارائه شده، آماده کنید.

طرز تهیه بافر استخراج

اجزا	مقادیر
Nacl (۱مولار)	۲/۵ml
Triss Hcl (۰/۵ مولار با pH= ۷/۵)	۱ml
EDTA (۰/۵ مولار با pH= ۷/۵)	۰/۵ml
ddH_2O[۱]	۱ml
حجم نهایی	۵ ml

[۱] آب مقطر دو بار تقطیر استریل

پیوست ۵

روش تهیه SDS با غلظت ۲۰٪ :

۲۰ گرم از پودر SDS در ml ۱۰۰ آب مقطر حل شود.

روش تهیه بافرالف:

بافر الف شامل ترکیبی ازکلروفرم:ایزو آمیل الکل به نسبت ۱:۲۴ می باشد.

پیوست ۶

غلظت ترکیبات لازم جهت واکنش PCR برای نمونه‌های گیاه و خون:

نام ماده	غلظت ماده	حجم مد نظر (میکرولیتر) گیاه	حجم مد نظر(میکرولیتر) خون	غلظت نهایی در واکنش
PCR buffer	۱۰X	۲/۵	۲/۵	۱X
Mgcl 2	۵۰ میلی مولار	۰/۷۵	۰/۷۵	۱/۵ میلی مولار
dNTPs	۱۰ میلی مولار	۰/۵		۰/۲ میلی مولار
پرایمر	۱۰ پیکو مول	۱	۱	۰/۴ پیکو مول
Taq DNA Polymerase	۵ واحد	۰/۲۵	۰/۲۵	۱/۲۵ واحد
DNA	۱۰نانو گرم درمیکرولیتر	۱	۱	۰/۴ نانوگرم
ddH2O	-------	۱۹	۱۹	-----
حجم کل	-------	۲۵	۲۵	-----

پیوست ۷

غلظت ترکیبات لازم جهت واکنش PCR برای نمونه باکتری:

غلظت نهایی در واکنش	حجم مد نظر(میکرولیتر) باکتری	غلظت ماده	نام ماده
۱X	۲/۵	۱۰X	PCR buffer
۱/۵ میلی مولار	۰/۷۵	۵۰ میلی مولار	Mgcl 2
۰/۲ میلی مولار	۰/۵	۱۰ میلی مولار	dNTPs
۰/۴ پیکو مول ۰/۴ پیکو مول	۱ ۱	۱۰ پیکو مول ۱۰ پیکو مول	پرایمر جلویی پرایمر عقبی
۱/۲۵ واحد	۰/۲۵	۵ واحد	Taq DNA Polymerase
۰/۴ نانوگرم	۵	۱۰نانو گرم درمیکرولیتر	DNA
-----	۱۴	-------	ddH2O
-----	۲۵	-------	حجم کل

پیوست ۸

TBE مخفف ترکیبات بکار رفته در آن یعنی Tris/Borate/EDTA است

تهیه بافر TBE (استوک 10X)

اجزا	مقادیر
Triss- base	۱۰/۸گرم
Boric acid	۵/۵ گرم
EDTA	۰/۹۲۸
dH_2O	با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر برسانید

نکته۱: این بافر استوک است یعنی غلظت بالایی دارد و برای استفاده باید بر حسب نیاز با استفاده از فرمول N1V1=N2V2 رقیق شود. استوک سازی در مواردی که یک محلول کاربرد زیادی دارد انجام می شود.

مثلا در اینجا با ۱۰ برابر رقیق کردن از آن بافر TBE با غلظت ۱X به حجم مورد نیاز خود تهیه کنید.

تحرک الکتروفورزی تحت تاثیر ترکیب و قدرت یونی بافر است. اگر بجای بافر از آب استفاده شود DNA به کندی حرکت می کند و برعکس اگر

بجای بافر X ۱ از بافر X ۱۰ استفاده شود سرعت حرکت بالا می رود. اما در غلظت بالای بافر و سرعت بالا ،گرمای زیادی تولید می شود که حتی می تواند ژل را ذوب کند.

نکته ۲: نوع و غلظت محلول بکار رفته جهت تهیه ژل آگارز باید با نوع و غلظت محلول موجود در تانک همخوانی داشته باشد.

تحرک الکتروفورزی تحت تاثیر ترکیب و قدرت یونی بافر است. اگر بجای بافر از آب استفاده شود DNA به کندی حرکت می کند و برعکس اگر بجای بافر X ۱ از بافر X ۱۰ استفاده شود سرعت حرکت بالا می رود. اما در غلظت بالای بافر و سرعت بالا ،گرمای زیادی تولید می شود که حتی می تواند ژل را ذوب کند.

نکته ۲: نوع و غلظت محلول بکار رفته جهت تهیه ژل آگارز باید با نوع و غلظت محلول موجود در تانک همخوانی داشته باشد.

پیوست ۹
معرفی ابزارها و دستگا هها

اسکالپل

اسکالپل یا پیستوری نوعی تیغ جراحی است. اسکالپل‌ها ممکن است یک بار مصرف یا با کاربرد همیشگی باشند. تیغه برخی از آن‌ها را می‌توان تعویض کرد ولی برخی دیگر قابلیت تعویض ندارند ولی می‌توان آنها را تیز کرد.

شکل ۱ - اسکالپل

پنس

پنس وسیله‌ی است که به محقق اجازه می دهد وسایل و ذرات کوچک را محکم نگهدارد یا جابجا کند.

شکل۲- پنس

سمپلر

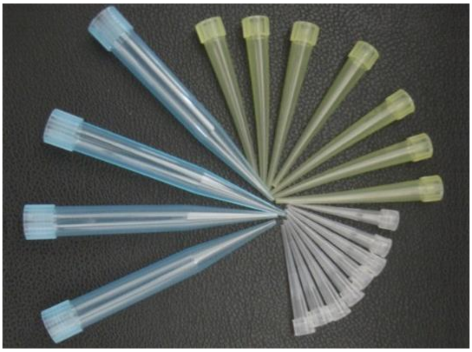
برای برداشتن مایعات از پیپت استفاده می شود اما برای مایعات کم حجم از میکروپیپت استفاده می گردد. سمپلر یک نوع میکروپیپت است.

شکل۳- سمپلر

- بر روی بدنه هر سمپلر محدوده مجاز (حداقل و حداکثر حجم مجاز قابل برداشت) نوشته شده است. دقت کنید از هر نوع سمپلر خارج از محدوده مجاز آن استفاده نکنید.

قبل از معرفی انواع سمپلر بر اساس محدوده مجاز استفاده، بهتر است بدانید یک میکرولیتر یک میلیونم (۰/۰۰۰۰۰۱) لیتر است بعبارتی یک هزارم میلی لیتر. سمپلرها معمولا شامل انواع زیر هستند:

- کمتر از ۱۰ میکرولیتر
- بین ۱۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر
- بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرو لیتر
- انواع مختلفی از سرسمپلر(تیپ) وجود دارد. برای هر سمپلر از سر سمپلر مناسب استفاده کنید.



شکل۴- سرسمپلر

هر یک از این سر سمپلرها برای یک نوع سمپلر بکار می رود، مثلا

- معمولا سر سمپلر آبی رنگ برای سمپلر ۱۰۰ تا۱۰۰۰ میکرولیتری
- معمولا سر سمپلر زرد رنگ برای سمپلر ۱۰ تا ۱۰۰ میکرولیتری

- معمولا سر سمپلر کریستالی رنگ برای سمپلر کمتر از ۱۰ میکرولیتری

میکرو تیوپ یا ویال

میکرو تیوپ‌ها لوله‌های آزمایش درب دار کوچکی برای نگهداری و آزمایشات بر روی حجم کم محلول استفاده می شود.

شکل۵- میکرو تیوپ

ورتکس و اسپین

ورتکس دستگاه کوچکی است که گاه بصورت مجزا (شکل۶) و گاه با دستگاه اسپین بصورت یک دستگاه مرکب (شکل۷) است.

شکل۶- ورتکس

شکل۷- ورتکس- اسپین

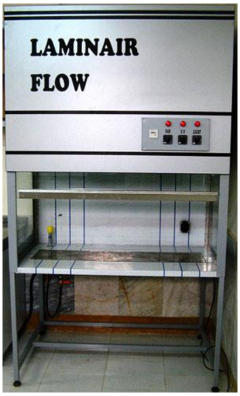
کاربرد ورتکس مخلوط کردن بافرهاست. اما برای محلول‌های حاوی قطعات DNAی بزرگ مناسب نیست چون ممکن است DNA شکسته شود.

اسپین باعث می گردد قطرات پراکنده شده بر روی بدنه میکروتیوپ یکجا در کف میکروتیوپ جمع گردد. معمولا پس از اتمام تهیه محلول و یا بعد از ورتکس حتما باید اسپین کرد.

هود

دو نوع اصلی عبارتند از

۱. هود شیمیایی: برای کار کردن با مواد شیمیایی بکار می روند. هدف اصلی استفاده از این هودهای حفاظت کاربر (محقق) از استنشاق مواد شیمیایی است.
۲. هودهای زیستی : این نوع هود که با نام هود لامینار معروفند برای کار با موجودات زنده (کشت سلول، بافت گیاهی و میکروب) بکار می روند در این نوع هود هدف اصلی از استفاده، برعکس هود شیمیایی حفاظت از نمونه مورد آزمایش است. بعبارتی جلوگیری از ورود آلودگی به محیط کشت است. البته گاه هدف هود لامینار دوجانبه است یعنی حفاظت از کاربر و نمونه بطور همزمان. هودهای لامینار براساس سطح ایمنی مد نظر خود انواع مختلفی دارند.



هود لامینار　　　　هود شیمیایی

شکل۸- هود

انکوباتور

انکباتورها دستگاه‌هایی با شرایط دمایی و رطوبتی مناسب هستند که براساس امکانات آنها برای کشت میکروب یا سلول استفاده می شوند. برای کشت سلول حتما باید دستگاه مجهز به تنظیم کننده CO_2 باشد.

انکباتور کشت سلول　　　　انکباتور کشت میکروب

شکل۹- انکباتور

اتوکلاو

اتوکلاو دستگاهی است که با استفاده از بخار آب تحت فشار، عمل استریلیزسیون را انجام می دهد.

اتوکلاو رو میزی اتوکلاو ایستاده

شکل ۱۰

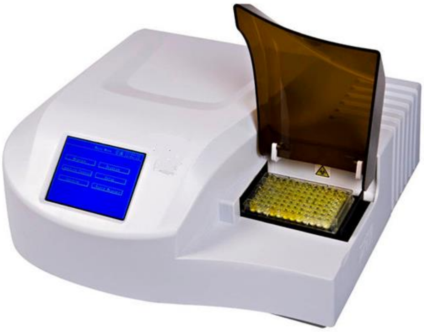
بن ماری

بن ماری یا حمام آب گرم یک دستگاه با محفظه آب است که قابلیت گرم کردن آب در آن وجود دارد و زمانی که نیاز به حرارت دادن مواد بصورت غیرمستقیم داریم از آن استفاده می شود.

شکل ۱۱- بن ماری

الایزا ریدر

یک نوع اسپکتروفتومتر تخصصی است که به منظور قرائت نتایج تست الیزا طراحی شده است.در واقع اسپکتروفتومترها و بخصوص الایزاریدر دستگاه‌هایی هستند که با استفاده از میزان اندازه جذب نور توسط نمونه مورد مطالعه، غلظت آن را تعیین می‌کنند.



شکل ۱۲- الایزا ریدر

پیوست ۱۰

معرفی برخی مواد شیمیایی

EDTA

EDTA در واقع مخفف Ethylenedinitrilo Tetraacetic Acid Disodiumsalt dihyrate است و فرمول شیمیایی آن $C_{10}H_{14}N_2NaO_8.2H_2O$ می باشد.

اولین مرحله استخراج DNA سلول لیز می گردد (تجزیه می شود)، در این زمان غشاء حذف می شود و به همین دلیل ممکن است DNA آسیب ببیند. علت معمول آسیب به DNA وجود آنزیم‌های تجزیه کننده DNA بنام نوکلئاز (DNAse) درون سلوال است که با تجزیه سلول فرصت نزدیک شدن به DNA را پیدا کرده اند. نوکلئازها برای فعالیت خود به یون‌های منیزیم (Mg^{2+}) بعنوان یک کوفاکتور نیاز دارند. اما افزودن EDTA در بافر استخراج موجب شلاته شدن یون منیزیم شده و ماده مورد نیاز برای فعالیت نوکلئازها زا از محیط حذف می کند. شلاته شدن به معنی ترکیب شدن و رسوب دادن است.

از سویی دیگر چون EDTA می تواند با یونهای فلزی دو ظرفیتی ترکیب شود این در حالی است که برخی از این یون‌ها در دیواره سلول وجود دارند و دیواره را مستحکم می کنند. پس نقش دیگر EDTA در استخراج DNA از سلول هی دارای دیواره خارج کردن این یون‌ها و کمک به شکستن دیواره سلولی است.

SDS

SDS در واقع مخففSodium dodecyl sulfate است و فرمول شیمیایی آن$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$ می باشد.

در مرحله لیز کردن سلول بایستی DNA را از غشاء سلول یا اندامک‌ها آزاد نمود. این عمل به کمک شوینده‌ها (دترجنت ها) صورت می گیرد. از عمومی ترین شوینده‌هایی که برای استخراج DNA مورد استفاده قرار می گیرد می توان به SDS، تریتون X-100 و CTAB اشاره نمود.

Triton x 100

Triton x100 در واقع یک نام تجاری برای ترکیبی بنام Polyethylene glycol tert-octylphenyl etherاست و فرمول شیمیایی آن t-Oct-$C_6H_4-(OCH_2CH_2)_xOH$می باشد.

همانطور که در خصوص SDS توضیح داده شد، تریتونx100 هم یک شوینده است باعث حذف غشاء در مرحله استخراج DNA می گردد.

ایزوآمیل الکل

ایزو آمیل الکل یا Isoamyl alcohol با فرمول شیمیایی آن$C_5H_{12}O$ می باشد.

در استخراج DNA برای تغلیظ DNA و تشکیل کلاف از الکل‌هایی مثل ایزوپروپانول و ایزو آمیل الکل استفاد می شود. ایزوپروپانل سرد اغلب برای ایجاد رسوب اولیه استفاده می شود . ایزو آمیل الکل به عمل

جداسازی کمک می کند. ایزو آمیل الکل مقدار موادی که در فاز آلی و مایی (آبی) یافت می شوند را کاهش داده و مانع کف کردن شدید حلال‌های بکار رفته می شود.

کلروفرم

کلروفرم دارای فرمول شیمیایی آن$CHCl_3$ می باشد.

معمولا برای جداسازی DNA از مواد زائد یا سایر ماکرومولکول‌ها از کلروفرم استفاده می کنند. موادی مانند شوینده‌ها (دترجنت ها) و پروتئازها که از بین برنده پروتئین‌ها هستند، توسط کلروفرم (به تنهایی یا همراه با سایر ترکیبات) جدا می شوند. پس از افزودن کلروفرم و انجام سانتریفیوژ، دو فاز جدا از هم پدیدار می شود که کلروفرم به همراه پروتئین در پائین قرارگرفته و DNA در فاز بالایی قرار دارد. کلرفروم در از بین بردن لیپیدها نیز موثر است.

بقایای کلرفرم نیز می تواند در تخلیص DNA مشکل ایجاد کند. به منظور اطمینان از حذف بقایای کلرفرم می توان یک مرحله DNA را خشک نمود و مجدد در حلال مد نظر (مثلا آب مقطر استریل) حل نمود.

پرایمر 16srRNA

این پرایمر ناحیه ثابت موجود در توالی ژن RNA ریبوزومی ۱۶s (16S rDNA) که در تمام باکتری‌ها ثابت است را تکثیر می نمایند. از این پرایمر در تشخیص منشاء بیماریهای میکروبی استفاده می شود بعیارتی تائید باکتریایی بودن یک بیماری.

TBE 1x

جهت توضیحات کامل به پیوست ۸ مراجعه گردد.

لودینگ بافر

برای انجام الکتروفورز بیومولکول‌هایی مانند DNA معمولا آنها ر با لودینگ بافر مخلوط می کنند. افزودن لودینگ بافر با ۳ هدف انجام می شود:

۱. افزودن دانسیته نمونه بری اطمینان از سنگین شدن و قرارگرفتن در چاهک و پخش نشدن در محیط.
۲. لودینگ بافر ب رنگی کردن نمونه مشاهده آن را در زمان ریختن در چاهک راحت تر می کند.
۳. رنگ‌های استفاده شذه در لودینگ بافر در یک میدان الکتریکی به سمت آند (قطب مثبت) حرکت می کنند و در نتیجه به حرکت نمونه کمک می کنند.

انواع مختلفی از لودینگ بافرها وجود دارد که در زیر به روش تهبه یک نمونه از آنها اشاره می شود. البته لودینگ بافر بصورت آماده شذه نیز قابل تهیه است

روش تهیه لودینگ بافر:

+ ۰٪/۲۵ xylene cyanol FF + ۰٪/۲۵ Bromophenol blue

(w/v)۴۰٪sucrose in H2O

منابع

- حسینی پژوه خسرو. شبیه سازی و فناوری سلول‌های بنیادی. انتشارات سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران. ۱۳۸۴.
- صنعتی محمد حسین و گروهی از مترجمین. پروتکل ایمنی زیستی کارتاهنا. انتشارات مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی. ۱۳۸۰
- طباطبایی یزدی مجتبی، زرینی غلامرضا، سپهری زاده ضرغام و قاسمیان عبدا... مقدمه‌ای بر کلون سازی ژن‌ها و آنالیز DNA. انتشارات خانه زیست شناسی پائیز ۱۳۸۶ (براون تی ای. ۲۰۰۶).
- عبدالکریم زاده محمدرضا. آموزش کشت بافت گیاهی در منزل. انتشارات مرسل. ۱۳۸۴.
- فرامرزی محمدعلی، نفیسی ورچه نسترن، مرادپور زهرا و شریف راده محمد. ایمنی زیستی در آزمایشگاه. انتشارات نویسه. ۱۳۸۶.
- کمال الدینی حسین، سلوکی محمود، ریگی نژاد نفیسه و حدادی فاطمه. بیوتکنولوژی گیاهی- مبانی روش‌های آزمایشگاهی. انتشارات گلبن. ۱۳۸۵.
- گروه نویسندگان، جزوه ایمنی (GLP) پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ایران.
- نقوی محمد رضا، قره یاضی بهزاد و حسینی سالکده قاسم. نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران. ۱۳۸۴.

- نوری دلویی محمدرضا، خسروی نیا سامیه، سامانی امیرعباس و مجیدفر فرزان. آموزش بیوتکنولوژی در مدارس- سند ۳۹ یونیسکو. انتشارات مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی. پائیز ۱۳۷۳.

- Nargess Abdali, Saeedeh Ataei, Arezoo Keihan, Leila Motaghi, Mohamadreza Naghavi, Seyed Kamal Kazemitabar, Amir Rezazade and Mehdi Hosseini-Mazinani. Comparative study of the morphological and molecular characteristics of 10 Iranian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. Annals of Biological Research vol 5 Issue 4, April *2014*.