بسم الله الرّحمن الرّحيم

سرشناسه : غدیر خمی، ۱۳۶۵-
عنوان و نام پدیدآور: راهنمای عملی در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی/ مولف: الهام غدیرخمی؛ تهیه کننده
سازمان جهاد دانشگاهی آذربایجان شرقی.
مشخصات نشر : تهران : جهاد دانشگاهی، سازمان انتشارات، ۱۴۰۳.
مشخصات ظاهری : ۱۶۹ ص.؛ ۲۱/۵×۱۴/۵ سم.
شابک : ۵-۸۷۲-۴۶۰-۶۰۰-۹۷۸ : ۱۲۵۰۰۰۰ ریال
وضعیت فهرست نویسی : فیپا
یادداشت : کتابنامه: ص. ۱۶۵ - ۱۶۹.
موضوع : ژنتیک مولکولی -- دستنامه‌های آزمایشگاهی
Molecular genetics -- Laboratory manuals
شناسه افزوده : جهاد دانشگاهی. سازمان آذربایجان شرقی
شناسه افزوده : جهاد دانشگاهی. سازمان انتشارات
شناسه افزوده : Press Organization Jahade Daneshgahi
رده بندی کنگره : QH۴۴۲
رده بندی دیویی : ۵۷۲/۸۰۷۸
شماره کتابشناسی ملی : ۹۸۵۸۸۶۰
اطلاعات رکورد کتابشناسی: فیپا

راهنمای عملی در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی

مولف
الهام غدیرخمی
پژوهشگر سازمان جهاددانشگاهی آذربایجان شرقی

سازمان انتشارات جهاد دانشگاهی
۱۴۰۳

راهنمای عملی در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی

مولف
الهام غدیرخمی
تهیه کننده: جهاد دانشگاهی واحد آذربایجان شرقی
ناشر: سازمان انتشارات جهاددانشگاهی
چاپ: جلد اول - ۱۴۰۳
شمارگان: ۱۰۰۰ نسخه
شابک: ۵-۸۷۲-۴۶۰-۶۰۰-۹۷۸

قیمت: ۱۲۵۰۰۰ تومان

نشانی سازمان انتشارات جهاد دانشگاهی: تهران، خیابان انقلاب اسلامی، خیابان فخر رازی، خیابان شهدای ژاندارمری، پلاک ۷۲ - تلفن: ۶۶۹۵۲۹۴۸
نشانی فروشگاه مرکزی: تهران، خیابان انقلاب اسلامی، بین خیابان فلسطین و چهارراه ولیعصر (عج)، پلاک ۱۰۷۸، فروشگاه کتاب شانزده - تلفن: ۶۶۹۶۵۰۱۷
نشانی مرکز پخش و توزیع: تهران، خیابان انقلاب اسلامی، روبروی درب اصلی دانشگاه تهران، خیابان فخر رازی، پلاک ۵۰، مجتمع تجاری منشور دانش، طبقه همکف، واحد ۶ - تلفن: ۶-۶۶۴۸۷۶۲۵

فهرست مطالب

پیش‌گفتار..... ۹

فصل اول: مقدمه ای بر ژنتیک مولکولی..... ۱۱
معرفی و تاریخچه ژنتیک مولکولی..... ۱۳
ساختار و سازماندهی یک آزمایشگاه ژنتیک مولکولی..... ۲۱
اصول ایمنی و مدیریت مواد زیستی در آزمایشگاه..... ۲۴

فصل دوم: تجهیزات و ابزارهای پایه در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی..... ۲۹
معرفی تجهیزات اصلی آزمایشگاه ژنتیک مولکولی..... ۳۱
روش‌های کالیبراسیون و نگهداری ابزارها..... ۴۱
راهنمای انتخاب و استفاده از تجهیزات آزمایشگاهی..... ۴۵

فصل سوم: تکنیک‌های استخراج و خالص‌سازی اسیدهای نوکلئیک..... ۵۱
روش‌های استخراج DNA از سلول‌های باکتریایی، گیاهی و جانوری..... ۵۳
تکنیک‌های خالص‌سازی RNA و جلوگیری از تجزیه آن..... ۵۹
روش‌های سنجش غلظت و خلوص DNA/RNA..... ۶۳

فصل چهارم: تکنیک‌های توالی یابی DNA..... ۶۹
آشنایی با توالی‌یابی سنتی Sanger..... ۷۱
آشنایی با توالی‌یابی نسل جدید (NGS)..... ۷۶

فصل پنجم: الکتروفورز و آنالیز باندهای DNA..... ۸۱
اصول الکتروفورز ژل آگاروز و پلی‌اکریل‌آمید..... ۸۳
رنگ‌آمیزی، تصویربرداری و تحلیل باندهای ژلی..... ۸۹

فصل ششم: هیبریداسیون نوکلئیک اسید..... ۹۵
اصول و روش‌های عملی هیبریداسیون ۹۷
کاربردهای هیبریداسیون در تشخیص مولکولی..... ۱۰۲

فصل هفتم: بررسی و تحلیل جهش‌ها..... ۱۰۵
انواع جهش‌ها و روش‌های شناسایی و تحلیل آنها..... ۱۰۷
PCR و روش‌های RFLP..... ۱۱۳
PCR در زمان واقعی یا Real Time PCR..... ۱۱۷

فصل هشتم: تحلیل بیوانفورماتیکی مقدماتی..... ۱۲۳
معرفی نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی رایج در ژنتیک مولکولی..... ۱۲۵
معرفی پایگاه‌های داده ژنتیکی برای مقایسه و تفسیر نتایج..... ۱۳۰

فصل نهم: کاربردهای عملی ژنتیک مولکولی در پزشکی..... ۱۳۷
راهنمای عملی انجام تست‌های ژنتیکی بالینی..... ۱۳۹
روش‌های تشخیص پیش از تولد و تست‌های مرتبط..... ۱۴۲
کاربرد ژنتیک مولکولی در تشخیص، پیشگیری و درمان سرطان..... ۱۴۵

فصل دهم: پروتکل‌های عملی ویژه..... ۱۵۱
مجموعه‌ای از پروتکل‌های تفصیلی برای روش‌های اصلی..... ۱۵۳

مراجع..... ۱۶۵

پیش‌گفتار

ژنتیک مولکولی، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین شـــاخه‌های علم زیست‌شناسی، نقشی بی‌بدیل در درک ما از عملکرد ســـلول‌ها، مکانیسم‌های بیماری‌ها، و توسعه روش‌های درمانی جدید ایفا می‌کند. آزمایشگاه‌های ژنتیک مولکولی، بستر اصلی پژوهش‌های پیشـــرفته در این زمینه هســـتند و تکنیک‌های مدرن مورد استفاده در این آزمایشگاه‌ها، امکان تحلیل دقیق و عمیق ژن‌ها و عملکردهای مولکولی را فراهم می‌سازند.

کتاب "راهنمای عملی در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی" با هدف ارائه یک منبع جامع و کاربردی برای دانشجویان، پژوهشـــگران، و تکنسین‌های فعال در این حوزه نگاشته شده است. این کتاب تلاش می‌کند تا علاوه بر توضیح مبانی تئوریک، شما را به دنیای عملیاتی ژنتیک مولکولی وارد کند، جایی که مفاهیم به واقعیت تبدیل می‌شوند و نتایج علمی ارزشمندی حاصل می‌گردد.

در طـــول ایـــن کتاب، تـــلاش کرده‌ایم که مجموعـــه‌ای از مهم‌تریـــن تکنیک‌ها و پروتکل‌هـــای مورد اســـتفاده در آزمایشـــگاه‌های ژنتیک مولکولی را به زبان ســـاده و به‌صورت گام‌به‌گام معرفی کنیم. همچنین، با اشاره به مشکلات رایج و ارائه راهکارهای عملی، سعی شده است تا شما را در مواجهه با چالش‌های عملیاتی در آزمایشگاه یاری کنیـــم. در کنار هر تکنیـــک، مثال‌های عملی و تجربی ارائه شـــده‌اند تا روند یادگیری تسهیل و تسریع شود.

این کتاب به گونه‌ای تدوین شـــده است که هم برای افراد مبتدی که تازه وارد دنیای ژنتیک مولکولی شـــده‌اند مفید باشـــد و هم بـــرای متخصصانی که بـــه دنبال ارتقای مهارت‌های عملی خود هستند. امیدواریم که این کتاب بتواند به‌عنوان یک منبع معتبر و کاربردی، شما را در مســـیر یادگیری و اجرای تکنیک‌های ژنتیک مولکولی همراهی کند و در نهایت به ارتقای سطح علمی و عملی جامعه پژوهشی کمک نماید.

از تمامی اساتید، همکاران و دانشجویانی که در فرآیند تألیف و گردآوری این کتاب ما را یاری کرده‌اند، سپاســـگزاریم. نظرات و پیشنهادات ارزشـــمند شما، بی‌تردید در بهبود و تکمیل این اثر مؤثر خواهد بود.

با آرزوی موفقیت،
دکتر الهام غدیرخمی

فصل اول

مقدمه ای بر ژنتیک مولکولی

معرفی و تاریخچه ژنتیک مولکولی

ژنتیک مولکولی شاخه‌ای از علم ژنتیک است که به بررسی ساختار و عملکرد ژن‌ها در سطح مولکولی می‌پردازد. این حوزه علمی با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و زیست‌شناسی مولکولی، به درک دقیق‌تری از چگونگی انتقال اطلاعات ژنتیکی و نحوه عملکرد ژن‌ها در سلول‌ها و ارگانیسم‌ها کمک می‌کند. ژنتیک مولکولی در قلب بسیاری از پیشرفت‌های علمی و پزشکی قرار دارد و به‌عنوان ابزاری کلیدی برای تشخیص، درمان و پیشگیری از بیماری‌های مختلف استفاده می‌شود.

تاریخچه ژنتیک مولکولی

تاریخچه ژنتیک مولکولی به ابتدای قرن بیستم بازمی‌گردد، زمانی که دانشمندان تلاش کردند تا مفهوم ژن‌ها و نحوه انتقال صفات را در سطح مولکولی درک کنند. بسیاری از اکتشافات اولیه به عنوان نقاط عطف مهم برای مطالعه ژنوم آنطوری که امروزه هست محسوب می‌شوند. یکی از مهم‌ترین نقاط عطف در تاریخ این علم که امکان تجسم ساختارهای درون سلولی را فراهم کرد،

اختراع میکروسکوپ نوری تک لنز توسط جانسن[1] در سال ۱۵۹۵ می‌باشد. پس از اینکه بسیاری از محققان شروع به انجام مشاهدات با میکروسکوپ تازه اختراع شده کردند، هوک[2] توصیف «سلول» را در سال ۱٦٦۵ ارائه کرد. یک گیاه‌شناس سوئیسی به نام ناگلی[3] برای اولین بار ساختارهای نخ مانندی را در هسته سلول‌های گیاهی در سال ۱۸٤۰ توصیف کرد، و آن را «سیتوبلاست‌های گذرا» نامید که بعدها در سال ۱۸۸۸ این ساختار توسط دانشمندی به نام والدیر[4] کروموزوم نامیده شدند. چارلز داروین در سال ۱۸۵۹ منشأ گونه‌ها با استفاده از انتخاب طبیعی را مطرح کرد و پس ازآن با کارهای پیشگامانه یک راهب اتریشی به نام گریگور مندل در اواسط قرن نوزدهم ژنتیک کلاسیک، به‌عنوان یکی از پایه‌های اساسی علم ژنتیک، شکل گرفت.

مندل به‌عنوان پدرعلم ژنتیک شناخته می‌شود و کارهای او مبنای درک ما از وراثت و انتقال صفات در ارگانیسم‌ها است. پژوهش‌های مندل در باغ صومعه، اصولی را بنیان گذاشت که به‌عنوان قوانین وراثت مندلین شناخته می‌شوند و پایه‌گذار علم ژنتیک مدرن هستند.

تا قبل از کارهای مندل، نظریات مختلفی درباره وراثت وجود داشتند که بیشتر بر پایه مشاهده و فرضیات غیردقیق بودند. در آن زمان، نظریه آمیزش صفات[5] رایج بود که بر اساس آن تصور می‌شد که صفات فرزندان، حاصل آمیزش و ترکیب صفات والدین است. این نظریه اما نمی‌توانست تنوع و جداسازی صفات در نسل‌های بعدی را به‌درستی توضیح دهد. مندل که به علم و ریاضیات علاقه‌مند بود، تصمیم گرفت آزمایش‌هایی دقیق و سیستماتیک بر

1. Janssen
2. Hooke
3. Nageli
4. Waldeyer
5. Blending Inheritance

روی گیاهان نخود انجام دهد تا به فهم بهتری از نحوه انتقال صفات از والدین به فرزندان دست یابد.

مندل در آزمایش‌های خود از گیاه نخود[1] استفاده کرد که ویژگی‌های مختلفی مانند رنگ گل، شکل بذر، و طول ساقه داشتند. او گیاهان نخود را با توجه به صفات مشخصی مانند رنگ گل (سفید یا بنفش)، شکل بذر (صاف یا چین‌خورده)، و طول ساقه (بلند یا کوتاه) مورد بررسی قرار داد. مندل با استفاده از روش‌های ریاضی و آماری که در آن زمان غیرمعمول بود، به بررسی نحوه انتقال این صفات در نسل‌های بعدی پرداخت. یکی از کلیدهای موفقیت مندل، انتخاب دقیق صفات بود. او صفاتی را انتخاب کرد که در دو شکل متضاد و جداگانه بروز می‌کردند (مثلاً رنگ گل بنفش یا سفید). مندل ابتدا گیاهانی را که در این صفات یکسان بودند با هم تلاقی داد (تلقیح متقابل). سپس نسل بعدی (F1) را مورد بررسی قرار داد و مشاهده کرد که تنها یکی از صفات در نسل اول ظاهر می‌شود (مثلاً همه گل‌ها بنفش بودند). سپس مندل نسل F1 را با هم تلقیح داد و نتایج را در نسل بعدی (F2) مشاهده کرد. او متوجه شد که صفت مغلوبی که در نسل F1 ناپدید شده بود، در نسل F2 با نسبت ۳:۱ بازمی‌گردد. بر اساس نتایج این آزمایش‌ها، مندل دو قانون اساسی را مطرح کرد که به‌عنوان قوانین وراثت مندلی شناخته می‌شوند:

* قانون اول (قانون جدایی یا قانون تفکیک): این قانون بیان می‌کند که هر صفت در یک ارگانیسم توسط دو عامل (که امروزه به آنها ژن می‌گوییم) کنترل می‌شود و این عوامل در تولیدمثل از هم جدا می‌شوند، به‌گونه‌ای که هر گامت (سلول جنسی) یکی از این دو عامل را دریافت می‌کند.

* قانون دوم (قانون دسته‌بندی مستقل): این قانون می‌گوید که ژن‌ها برای

1. Pisum sativum

صفات مختلف به‌طور مستقل از یکدیگر به نسل‌های بعد منتقل می‌شوند. به‌عبارت دیگر، نحوه جدایی ژن‌ها برای یک صفت، تأثیری بر نحوه جدایی ژن‌های دیگر ندارد.

این قوانین، پایه‌گذار مفاهیم اساسی ژنتیک شدند و هنوز هم در درک ما از نحوه انتقال صفات به نسل‌های بعدی کاربرد دارند. مندل نتایج خود را در سال ۱۸۶۵ در قالب مقاله‌ای با عنوان "آزمایش‌هایی بر روی گیاهان هیبرید[1]" منتشر کرد. اما این کار در زمان خودش چندان مورد توجه قرار نگرفت. یکی از دلایل این عدم توجه، پیچیدگی کار مندل و همچنین ناشناخته بودن او در جامعه علمی بود. با این حال، در اوایل قرن بیستم، کارهای مندل توسط دانشمندان دیگری مانند هوگو دو وریس[2]، کارل کورنز[3] و اریش فن تسیرماک[4] دوباره کشف و تأیید شد. این دانشمندان به‌طور مستقل به نتایج مشابهی با مندل دست یافتند و کارهای او را به عنوان مبنای ژنتیک مدرن تأیید کردند. کارهای مندل به سرعت به یکی از مهم‌ترین پایه‌های علم زیست‌شناسی تبدیل شد و منجر به توسعه ژنتیک مدرن گردید. این قوانین به دانشمندان کمک کرد تا مکانیسم‌های پیچیده‌تری مانند وراثت ژن‌های مرتبط با بیماری‌ها و تعاملات ژنتیکی بین ژن‌های مختلف را درک کنند. همچنین، این کشفیات تأثیر عمیقی بر زمینه‌های دیگری مانند اصلاح نباتات، زیست‌شناسی تکاملی و حتی ژنتیک پزشکی داشتند.

1. Experiments on Plant Hybridization
2. Hugo de Vries
3. Carl Correns
4. Erich von Tschermak

کشف DNA به‌عنوان ماده ژنتیکی

تاریخ ژنتیک مولکولی عملاً با کشف DNA به‌عنوان ماده ژنتیکی آغاز می‌شود. در اوایل قرن بیستم، هرچند که مفهوم ژن به عنوان واحد وراثت در ژنتیک کلاسیک پذیرفته شده بود، اما ماهیت فیزیکی ژن‌ها ناشناخته باقی مانده بود. در سال ۱۹۲۸، فردریک گریفیث با آزمایش‌های خود بر روی باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه[1]، پدیده‌ای را که به «ترنسفورماسیون» مشهور شد، کشف کرد؛ او نشان داد که ماده‌ای از باکتری‌های کشته‌شده می‌تواند اطلاعات ژنتیکی را به باکتری‌های زنده منتقل کند، اما ماهیت این ماده مشخص نبود.

این موضوع تا سال ۱۹٤٤ ادامه یافت که اوسوالد آوری[2]، کالین مک‌لئود[3] و مک‌لین مک‌کارتی[4] نشان دادند که DNA مسئول این انتقال ژنتیکی است. این کشف به‌طور جدی DNA را به‌عنوان ماده ژنتیکی معرفی کرد، اما بسیاری از دانشمندان در ابتدا با شک و تردید به این نتیجه‌گیری نگاه کردند. یکی از بزرگترین پیشرفت‌ها در ژنتیک مولکولی در سال ۱۹۵۳ با کشف ساختار دو رشته‌ایDNA توسط جیمز واتسون[5] و فرانسیس کریک[6] رخ داد. این دو دانشمند با استفاده از داده‌های پراش اشعه ایکس که توسط روزالیند فرانکلین[7] و موریس ویلکینز[8] به دست آمده بود، موفق به ارائه مدل مارپیچ دوگانه DNA شدند. این مدل نشان داد که DNA از دو رشته مکمل تشکیل شده است که با جفت شدن بازهای نیتروژنی (آدنین با تیمین و گوانین با سیتوزین) به هم متصل می‌شوند.

---

1. Streptococcus pneumoniae
2. Oswald Avery
3. Colin MacLeod
4. Maclyn McCarty
5. James Watson
6. Francis Crick
7. Rosalind Franklin
8. Maurice Wilkins

کشف این ساختار، نه‌تنها نحوه ذخیره اطلاعات ژنتیکی را توضیح داد، بلکه مکانیزم‌های تکثیر DNA و انتقال اطلاعات به RNA و پروتئین‌ها را نیز روشن کرد. پس از کشف ساختارDNA، یکی از پرسش‌های بزرگ در زیست‌شناسی مولکولی این بود که چگونه اطلاعات ذخیره‌شده در DNA به پروتئین‌ها که عملکردهای بیولوژیکی را انجام می‌دهند، منتقل می‌شود. در دهه ۱۹۶۰، مارشال نیرنبرگ[1] و هار گوبیند خورانا[2] به همراه گروه‌های پژوهشی خود، رمز ژنتیکی را کشف کردند. آنها نشان دادند که توالی‌های سه‌تایی از نوکلئوتیدها (کدون‌ها) بر روی RNA پیام‌رسان (mRNA) هر کدام یک اسید آمینه خاص را رمزگذاری می‌کنند. این کشف نشان داد که توالی DNA به‌وسیله فرآیندی به نام رونویسی به mRNA منتقل می‌شود و سپس در فرآیندی به نام ترجمه، توالی mRNA به یک زنجیره پلی‌پپتیدی (پروتئین) تبدیل می‌شود. این فرآیندها به‌عنوان بخش‌های کلیدی مرکزی‌ترین آموزه زیست‌شناسی مولکولی تعریف شدند.

توسعه تکنیک‌های مهندسی ژنتیک

دهه ۱۹۷۰ به‌عنوان یکی از دوران‌های طلایی ژنتیک مولکولی شناخته می‌شود که طی آن تکنیک‌های کلیدی مهندسی ژنتیک توسعه یافتند. پائول برگ[3] و همکارانش در سال ۱۹۷۲ اولین مولکول DNA نوترکیب را تولید کردند که راه را برای مهندسی ژنتیک هموار کرد. این تکنیک شامل ترکیب DNA از منابع مختلف در یک مولکول واحد بود که امکان تغییر ژن‌ها و ایجاد

1. Marshall Nirenberg
2. Har Gobind Khorana
3. Paul Berg

ارگانیسم‌های تراریخته را فراهم کرد. در همین دوران، هربرت بویِر [1] و استنلی کوهن [2] نیز تکنیک کلونینگ مولکولی را توسعه دادند که به دانشمندان امکان داد تا ژن‌های خاصی را درون باکتری‌ها و سایر ارگانیسم‌ها وارد کرده و تکثیر کنند. این دستاوردها، ابزارهای اولیه لازم برای بررسی عملکرد ژن‌ها و توسعه فناوری‌های جدید در حوزه زیست‌فناوری را فراهم کردند.

پروژه ژنوم انسان و توالی‌یابی ژنوم

یکی از بزرگ‌ترین دستاوردهای علمی در تاریخ ژنتیک مولکولی، پروژه ژنوم انسان [3] بود که در سال ۱۹۹۰ آغاز شد و در سال ۲۰۰۳ به پایان رسید. این پروژه بین‌المللی با هدف تعیین توالی کامل DNA انسان و شناسایی تمامی ژن‌های آن انجام شد. پروژه ژنوم انسان، انقلابی در درک ما از زیست‌شناسی انسان به وجود آورد و به پایه‌ای برای بسیاری از پژوهش‌های پزشکی و ژنتیکی تبدیل شد. در کنار این پروژه، توسعه تکنیک‌های توالی‌یابی نسل جدید [4] (NGS)، امکان توالی‌یابی سریع و مقرون‌به‌صرفه ژنوم‌های کامل را فراهم کرد. این تکنیک‌ها به‌طور گسترده‌ای در پژوهش‌های ژنتیکی، تشخیص‌های پزشکی و حتی درک تکامل و تنوع زیستی به کار گرفته می‌شوند.

1. Herbert Boyer
2. Stanley Cohen
3. Human genome project
4. Next-Generation Sequencing

ویرایش ژنوم و تکنولوژی CRISPR-Cas9

در دهه ۲۰۱۰، یکی از مهم‌ترین پیشرفت‌های ژنتیک مولکولی با معرفی تکنولوژی CRISPR-CAS9 به وقوع پیوست. این سیستم، که از یک مکانیسم دفاعی طبیعی در باکتری‌ها الهام گرفته شده است، امکان ویرایش دقیق ژنوم را فراهم می‌کند. با استفاده از CRISPR-Cas9، دانشمندان می‌توانند به‌صورت هدفمند توالی‌های خاصی از DNA را برش داده، تغییر داده یا حذف کنند.

تکنولوژی کریسپر به سرعت به یکی از ابزارهای اساسی در پژوهش‌های ژنتیکی تبدیل شد و امیدهای بزرگی برای درمان‌های ژنتیکی، کشاورزی و حتی مهندسی زیستی ایجاد کرده است. با این حال، این تکنولوژی چالش‌های اخلاقی و اجتماعی نیز به همراه داشته است که نیاز به بررسی‌های عمیق‌تر دارند. به طور کلی ژنتیک مولکولی، طی کمتر از یک قرن، از کشفیات ابتدایی در مورد DNA به یکی از پیچیده‌ترین و پیشرفته‌ترین حوزه‌های علمی تبدیل شده است. این رشته به ما امکان درک عمیق‌تر و کاربردهای گسترده‌تری از زیست‌شناسی، پزشکی و بیوتکنولوژی داده است. با پیشرفت‌های مداوم در این زمینه، آینده ژنتیک مولکولی به‌طور قطع با کشفیات و تکنولوژی‌های جدیدی همراه خواهد بود که زندگی ما را به شکل‌های مختلف تحت تأثیر قرار خواهند داد.

ساختار و سازماندهی یک آزمایشگاه ژنتیک مولکولی

طراحی فیزیکی و تقسیم‌بندی فضاها

آزمایشگاه‌های ژنتیک مولکولی به فضاهای مختلفی تقسیم می‌شوند که هرکدام برای انجام وظایف خاصی طراحی شده‌اند. تقسیم‌بندی مناسب فضاها به منظور کاهش خطر آلودگی متقاطع و افزایش کارایی بسیار مهم است. معمولاً یک آزمایشگاه ژنتیک مولکولی به بخش‌های زیر تقسیم می‌شود:

* اتاق PCR: اتاق یا فضایی اختصاصی برای انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) که باید از سایر بخش‌های آزمایشگاه جدا باشد تا خطر آلودگی کاهش یابد.

* فضای پیش‌آماده‌سازی نمونه‌ها: این بخش برای آماده‌سازی اولیه نمونه‌ها (مانند استخراج DNA یا RNA) طراحی شده است. استفاده از تجهیزات حفاظتی شخصی (PPE)[1] و کابینت‌های ایمنی زیستی در این بخش ضروری است. این فضا معمولاً شامل هودهای مخصوص و سانتریفیوژهای مناسب برای جداسازی و خالص‌سازی DNA یا RNA از نمونه‌ها است.

* فضای تجزیه و تحلیل: این بخش شامل ابزارهایی مانند ژل الکتروفورز، سیستم‌های تصویربرداری، و دستگاه‌های توالی‌یابی DNA است که برای تجزیه و تحلیل نهایی نمونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند.

* اتاق نگهداری نمونه‌ها و مواد شیمیایی: یخچال‌ها، فریزرها و مخازن نیتروژن مایع در این بخش قرار دارند تا نمونه‌ها و مواد شیمیایی حساس در دماهای پایین نگهداری شوند.

---

1. Personal Protective Equipment

تجهیزات کلیدی آزمایشگاه ژنتیک مولکولی

تجهیزات آزمایشگاه‌های ژنتیک مولکولی نقش مهمی در اجرای دقیق و صحیح آزمایش‌ها دارند. برخی از تجهیزات کلیدی عبارتند از:

* ترموسایکلر[1]: دستگاهی برای انجام PCR که به‌صورت اتوماتیک چرخه‌های حرارتی مختلف را طی می‌کند.

* اسپکتروفوتومتر یا نانودراپ: برای اندازه‌گیری غلظت و خلوص نمونه‌های DNA و RNA.

* هودهای ایمنی زیستی: برای کار با مواد زیستی خطرناک که از کاربر و محیط محافظت می‌کند.

* سانتریفیوژ: برای جداسازی اجزای سلولی و مولکول‌های زیستی بر اساس چگالی.

* ژل الکتروفورز: برای جداسازی قطعات DNA، RNA و پروتئین‌ها بر اساس اندازه.

* تجهیزات توالی‌یابی DNA: از جمله دستگاه‌های نسل جدید توالی‌یابی (NGS) که امکان تجزیه و تحلیل دقیق توالی‌های ژنتیکی را فراهم می‌کنند.

پروتکل‌های ایمنی و مدیریت نمونه‌ها

رعایت پروتکل‌های ایمنی زیستی در آزمایشگاه‌های ژنتیک مولکولی حیاتی است. این پروتکل‌ها شامل استفاده از تجهیزات حفاظتی شخصی (PPE)، آموزش کارکنان در زمینه اصول ایمنی زیستی، و مدیریت صحیح مواد شیمیایی و نمونه‌ها می‌شود.

* استفاده از PPE: کارکنان آزمایشگاه باید از لباس‌های آزمایشگاهی،

---

1. Thermocycler

دستکش‌ها و عینک‌های محافظ استفاده کنند. در کار با مواد خطرناک یا نمونه‌های زیستی، استفاده از ماسک‌ها و محافظ‌های صورت نیز الزامی است.

* مدیریت پسماندها: پسماندهای زیستی و شیمیایی باید به‌طور مناسب دسته‌بندی و دفع شوند. این شامل جداسازی پسماندهای بیولوژیک از زباله‌های معمولی و استفاده از اتوکلاوها برای ضدعفونی کردن مواد است.

* آماده‌سازی نمونه‌ها: برای جلوگیری از آلودگی متقاطع، آماده‌سازی نمونه‌ها باید در مناطق تمیز و با استفاده از ابزارهای اختصاصی انجام شود. استفاده از نوک‌های پیپت استریل و تغییر منظم دستکش‌ها از جمله روش‌های کاهش خطر آلودگی هستند.

* مدیریت و ردیابی نمونه‌ها: ثبت دقیق اطلاعات نمونه‌ها، شامل منبع، تاریخ جمع‌آوری و روش‌های ذخیره‌سازی، برای جلوگیری از اشتباهات و تضمین کیفیت داده‌ها بسیار مهم است. سیستم‌های مدیریت اطلاعات آزمایشگاهی (LIMS) می‌توانند در این زمینه کمک کنند.

مدیریت داده‌ها و تجزیه و تحلیل

یکی از جنبه‌های مهم سازماندهی یک آزمایشگاه ژنتیک مولکولی، مدیریت داده‌های حاصل از آزمایش‌ها است. ابزارهای زیست‌محاسباتی[1] برای تجزیه و تحلیل داده‌های توالی‌یابی و سایر داده‌های ژنتیکی ضروری هستند.

* ذخیره‌سازی داده‌ها: با توجه به حجم بالای داده‌های تولید شده در آزمایش‌های ژنتیک مولکولی، استفاده از سرورها و پایگاه‌های داده مناسب ضروری است. همچنین، تهیه نسخه‌های پشتیبان منظم از داده‌ها برای جلوگیری از از دست رفتن اطلاعات ضروری است.

1. Bioinformatics

* تجزیه و تحلیل زیست‌محاسباتی: نرم‌افزارهای تخصصی برای تفسیر داده‌های توالی‌یابی، شناسایی ژن‌ها، و تجزیه‌وتحلیل جهش‌ها مورد نیاز هستند. این نرم‌افزارها باید با استانداردهای بین‌المللی سازگار باشند و کارکنان آزمایشگاه باید در استفاده از آنها آموزش دیده باشند.

* اشتراک‌گذاری داده‌ها: در بسیاری از پروژه‌های ژنتیک مولکولی، به‌ویژه آنهایی که در مقیاس بزرگ مانند پروژه‌های ژنوم انجام می‌شوند، اشتراک‌گذاری داده‌ها با دیگر محققان و سازمان‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. رعایت اصول اخلاقی و حریم خصوصی در این زمینه نیز ضروری است.

اصول ایمنی و مدیریت مواد زیستی در آزمایشگاه

آزمایشگاه‌های ژنتیک مولکولی با مواد زیستی کار می‌کنند که ممکن است شامل نمونه‌های انسانی، حیوانی، گیاهی و میکروارگانیسم‌ها باشد. به همین دلیل، رعایت اصول ایمنی زیستی و مدیریت صحیح این مواد از اهمیت بالایی برخوردار است. این اصول به جلوگیری از آلودگی، حفاظت از پرسنل آزمایشگاه و محیط، و حفظ یکپارچگی نتایج علمی کمک می‌کنند. در ادامه، اصول کلیدی ایمنی و مدیریت مواد زیستی در آزمایشگاه‌های ژنتیک مولکولی را بررسی می‌کنیم.

طبقه‌بندی و ارزیابی ریسک مواد زیستی

اولین گام در مدیریت ایمنی زیستی، شناسایی و ارزیابی ریسک‌های مرتبط با مواد زیستی است. مواد زیستی بر اساس میزان خطر آنها برای انسان‌ها و محیط‌زیست طبقه‌بندی می‌شوند. این طبقه‌بندی به‌طور کلی به چهار گروه تقسیم می‌شود:

* گروه ۱ (کم‌خطر): ارگانیسم‌ها و مواد زیستی که در شرایط عادی به‌ندرت بیماری‌زا هستند.

* گروه ۲ (متوسط‌خطر): ارگانیسم‌ها و مواد زیستی که ممکن است بیماری‌های خفیف ایجاد کنند اما در دسترس بودن درمان یا اقدامات پیشگیری‌کننده مناسب وجود دارد.

* گروه ۳ (بالاخطر): ارگانیسم‌ها و مواد زیستی که می‌توانند بیماری‌های جدی و بالقوه خطرناک ایجاد کنند، اما درمان‌های مؤثری در دسترس است.

* گروه ٤ (بسیار بالاخطر): ارگانیسم‌ها و مواد زیستی که می‌توانند بیماری‌های شدید و اغلب کشنده ایجاد کنند و درمان یا اقدامات پیشگیری‌کننده قابل‌اعتماد در دسترس نیست.

آزمایشگاه‌های ژنتیک مولکولی باید از این طبقه‌بندی‌ها برای تعیین سطح ایمنی زیستی و اقدامات حفاظتی مناسب استفاده کنند.

استفاده از تجهیزات حفاظتی شخصی (PPE)

استفاده از تجهیزات حفاظتی شخصی یکی از اصول اساسی در کار با مواد زیستی است. شامل موارد زیر است:

* دستکش: برای محافظت از دست‌ها در برابر تماس مستقیم با مواد زیستی.

* ماسک و محافظ صورت: برای جلوگیری از استنشاق آئروسل‌ها و محافظت از چشم‌ها.

* لباس آزمایشگاهی: برای جلوگیری از آلودگی لباس شخصی و پوست.

* کفش‌های محافظ: برای جلوگیری از تماس مواد زیستی با پاها.

کارکنان آزمایشگاه باید آموزش‌های لازم برای استفاده صحیح از PPE را دریافت کنند و مطمئن شوند که این تجهیزات همیشه در دسترس هستند.

هودهای ایمنی زیستی و محیط کار استریل

هودهای ایمنی زیستی[1] یکی از مهم‌ترین تجهیزات در آزمایشگاه‌های ژنتیک مولکولی هستند که برای کار با مواد زیستی استفاده می‌شوند. این هودها به سه دسته تقسیم می‌شوند:

کلاس I: حفاظت از کاربر و محیط در برابر آئروسل‌ها، اما از نمونه‌ها محافظت نمی‌کند.

کلاس II: حفاظت از کاربر، نمونه‌ها، و محیط را فراهم می‌کند. این کلاس معمولاً در آزمایشگاه‌های ژنتیک مولکولی استفاده می‌شود.

کلاس III: هودهایی با حفاظت بالا که در محیط‌های با ریسک بسیار بالا (گروه ٤) استفاده می‌شوند.

کارکنان آزمایشگاه باید با نحوه استفاده از هودها آشنا باشند و دستورالعمل‌های تمیزکاری و نگهداری آنها را رعایت کنند.

مدیریت پسماندهای زیستی

مدیریت صحیح پسماندهای زیستی از اهمیت زیادی برخوردار است. پسماندهای زیستی شامل موادی هستند که از ارگانیسم‌های زنده به‌دست می‌آیند و ممکن است شامل نمونه‌های بیولوژیک، نوک پیپت‌ها، لوله‌ها، و دستکش‌های استفاده‌شده باشند. این پسماندها باید به‌طور صحیح دسته‌بندی و دفع شوند:

* دسته‌بندی و ذخیره‌سازی: پسماندهای زیستی باید به‌طور مجزا از پسماندهای معمولی ذخیره‌سازی شوند. ظروف مخصوص برای جمع‌آوری و ذخیره‌سازی پسماندهای تیز (سرنگ‌ها و نوک پیپت‌ها) باید در دسترس باشند.

---

1. Biosafety Cabinets

* ضدعفونی و دفع: پسماندهای زیستی باید قبل از دفع به‌طور مناسب ضدعفونی شوند. استفاده از اتوکلاو برای استریل کردن پسماندها یکی از روش‌های رایج است. پسماندهای ضدعفونی‌شده سپس می‌توانند به‌عنوان پسماندهای عادی دفع شوند.

مدیریت نمونه‌ها و ثبت اطلاعات

مدیریت دقیق نمونه‌ها در آزمایشگاه‌های ژنتیک مولکولی به‌ویژه برای جلوگیری از اشتباهات و حفظ یکپارچگی داده‌ها اهمیت دارد. این مدیریت شامل موارد زیر است:

* برچسب‌گذاری نمونه‌ها: هر نمونه باید به‌درستی برچسب‌گذاری شود و اطلاعات ضروری مانند کد نمونه، تاریخ جمع‌آوری، و نوع نمونه روی آن درج شود.

* ثبت دقیق اطلاعات: تمامی اطلاعات مرتبط با نمونه‌ها باید به‌طور دقیق ثبت و نگهداری شود. این شامل روش جمع‌آوری، شرایط ذخیره‌سازی، و نتایج آزمایش‌های انجام‌شده است.

* ردیابی و پیگیری: استفاده از سیستم‌های مدیریت اطلاعات آزمایشگاهی (LIMS) برای ردیابی و پیگیری نمونه‌ها می‌تواند از اشتباهات جلوگیری کند و دسترسی سریع به اطلاعات را فراهم سازد.

آموزش و تمرین‌های ایمنی

آموزش مداوم کارکنان آزمایشگاه در زمینه اصول ایمنی زیستی و مدیریت مواد زیستی از اهمیت بسیاری برخوردار است. برنامه‌های آموزشی باید شامل موارد زیر باشد:

* آشنایی با پروتکل‌های ایمنی: کارکنان باید با تمامی پروتکل‌ها و دستورالعمل‌های ایمنی آشنا باشند.

* شبیه‌سازی و تمرین‌های عملی: انجام تمرین‌های شبیه‌سازی برای مواجهه با موقعیت‌های اضطراری و نحوه برخورد با حوادث احتمالی (مانند ریختن مواد زیستی یا شکستن ظروف) ضروری است.

فصل دوم

تجهیزات و ابزارهای پایه در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی

معرفی تجهیزات اصلی آزمایشگاه ژنتیک مولکولی

در یک آزمایشگاه ژنتیک مولکولی، تجهیزات مختلفی برای انجام آزمایش‌ها و تجزیه و تحلیل‌های مختلف ضروری هستند. این تجهیزات به دسته‌های مختلفی تقسیم می‌شوند که هر کدام وظایف خاصی را بر عهده دارند. در زیر، تجهیزات اصلی یک آزمایشگاه ژنتیک مولکولی معرفی و توضیح داده می‌شوند:

۱. ترموسایکلر[1]: ترموسایکلر یا دستگاه PCR[2] یکی از مهم‌ترین و رایج‌ترین تجهیزات در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی است. این دستگاه برای تکثیر توالی‌های خاصی از DNA استفاده می‌شود.

عملکرد: دستگاه PCR شامل یک بلاک گرمایی است که می‌تواند به سرعت بین دماهای مختلف تغییر کند. این تغییرات دمایی برای دناتوراسیون DNA (جدا شدن دو رشته DNA از هم)، اتصال پرایمرها به توالی هدف و افزایش زنجیره‌های DNA با استفاده از آنزیم DNA پلیمراز مورد استفاده قرار می‌گیرد. این چرخه‌های دمایی به صورت تکراری انجام می‌شوند تا تعداد

1. Thermocycler
2. Polymerase Chain Reaction

نسخه‌های DNA مورد نظر به طور نمایی افزایش یابد.

کاربرد PCR: برای تشخیص جهش‌ها، بررسی تنوع ژنتیکی، کلونینگ ژن‌ها و شناسایی میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود.

۲. اسپکتروفوتومتر یا نانودراپ[1]: اسپکتروفوتومتر یکی از تجهیزات ضروری برای اندازه‌گیری غلظت و خلوص نمونه‌های DNA، RNA و پروتئین‌ها است.

عملکرد: اسپکتروفوتومتر نور را از یک طول موج خاص به نمونه می‌تاباند و جذب نور توسط نمونه را اندازه‌گیری می‌کند. این اندازه‌گیری به محققان امکان می‌دهد تا غلظت و خلوص مولکول‌های زیستی موجود در نمونه را محاسبه کنند. نانودراپ یک نوع اسپکتروفوتومتر است که به دلیل نیاز به حجم‌های بسیار کم از نمونه‌ها، در آزمایشگاه‌های مولکولی محبوب است.

کاربرد: این دستگاه در مراحل مختلفی از جمله بعد از استخراج DNA یا RNA و قبل از انجام PCR یا توالی‌یابی برای ارزیابی کیفیت و کمیت نمونه‌ها استفاده می‌شود.

۳. هود ایمنی زیستی[2]: هودهای ایمنی زیستی برای حفاظت از کاربر، محیط و نمونه‌ها در برابر آئروسل‌های خطرناک و آلودگی‌ها استفاده می‌شوند.

عملکرد: هودهای ایمنی زیستی از طریق جریان‌های هوای کنترل شده، که به صورت عمودی یا افقی فیلتر می‌شوند، کار می‌کنند. این هودها معمولاً شامل فیلترهای HEPA هستند که می‌توانند ذرات بسیار ریز، از جمله باکتری‌ها و ویروس‌ها، را به دام بیندازند. برخی هودها همچنین هوای خروجی را قبل از تخلیه به محیط، فیلتر می‌کنند.

1. Spectrophotometer/NanoDrop
2. Biosafety Cabinet

کاربرد: هودهای ایمنی زیستی در آزمایش‌هایی که شامل کار با عوامل بیماری‌زا، سلول‌های انسانی، یا حیوانی است، ضروری هستند. این هودها برای جلوگیری از آلودگی متقابل و محافظت از کاربر در برابر عوامل خطرناک به کار می‌روند.

۴. سانتریفیوژ[1]: سانتریفیوژ برای جداسازی اجزای مختلف نمونه‌ها بر اساس چگالی آنها استفاده می‌شود.

عملکرد: سانتریفیوژ با چرخاندن نمونه‌ها با سرعت بالا، نیروی گریز از مرکز را ایجاد می‌کند که باعث جدا شدن اجزای مختلف نمونه بر اساس وزن مولکولی و چگالی می‌شود. به عنوان مثال، در فرآیند جداسازی DNA، سلول‌ها در ابتدا لیز می‌شوند و سپس از سانتریفیوژ برای جداسازی DNA از سایر اجزای سلولی استفاده می‌شود.

کاربرد: سانتریفیوژ برای کاربردهای مختلفی از جمله استخراج و خالص‌سازی DNA/RNA، جداسازی پروتئین‌ها و فرآوری نمونه‌های خون به منظور جدا کردن پلاسما یا سرم استفاده می‌شود.

۵. ژل الکتروفورز[2]: ژل الکتروفورز یک تکنیک کلیدی برای جداسازی قطعات DNA، RNA و پروتئین‌ها بر اساس اندازه و بار الکتریکی است.

عملکرد: در این تکنیک، نمونه‌های DNA، RNA یا پروتئین به درون یک ژل آگارز یا پلی‌آکریل‌آمید تزریق می‌شوند. سپس یک میدان الکتریکی به ژل اعمال می‌شود که باعث حرکت قطعات مولکولی در طول ژل می‌شود. قطعات کوچکتر سریعتر حرکت می‌کنند و قطعات بزرگتر کندتر. این فرآیند امکان

1. Centrifuge
2. Gel Electrophoresis

جداسازی و تجزیه و تحلیل قطعات مختلف مولکولی را فراهم می‌کند.

کاربرد: ژل الکتروفورز در بررسی کیفیت و اندازه قطعات DNA (مثلا پس از PCR) تأیید نتایج کلونینگ و تجزیه و تحلیل بیان ژن‌ها استفاده می‌شود.

۶. دستگاه توالی‌یابی DNA[1]: دستگاه توالی‌یابی DNA یکی از پیشرفته‌ترین تجهیزات در آزمایشگاه‌های ژنتیک مولکولی است که برای تعیین توالی دقیق بازهای DNA استفاده می‌شود.

عملکرد: دستگاه توالی‌یابی با استفاده از روش‌های مختلف، از جمله توالی‌یابی سنتز[2]، روش‌های مبتنی بر ترمیناتورهای فلورسنت، یا روش‌های نانوتکنولوژی، توالی بازهای DNA را شناسایی می‌کند. دستگاه‌های مدرن مانند توالی‌یاب‌های نسل جدید[3] می‌توانند میلیون‌ها قطعه DNA را به‌طور همزمان و با سرعت بالا توالی‌یابی کنند.

کاربرد: توالی‌یابی DNA برای پروژه‌های ژنومیک، مطالعه تغییرات ژنتیکی، شناسایی جهش‌ها و بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها به کار می‌رود.

۷. اتوکلاو[4]: اتوکلاو یک دستگاه ضروری برای استریل کردن تجهیزات، محیط‌های کشت و پسماندهای زیستی است.

عملکرد: اتوکلاو با استفاده از بخار آب تحت فشار، اجسام را استریل می‌کند. دما و فشار بالا باعث از بین رفتن باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و سایر عوامل عفونی می‌شود. این فرآیند معمولاً در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار

1. DNA Sequencer
2. sequencing by synthesis
3. Next-Generation Sequencers
4. Autoclave

۱۵ پوند بر اینچ مربع (psi) انجام می‌شود.

کاربرد: اتوکلاو برای استریل کردن وسایل آزمایشگاهی، ظروف شیشه‌ای، محیط‌های کشت و دفع ایمن پسماندهای زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۸. میکروسکوپ فلورسانس[1]: میکروسکوپ فلورسانس یکی از ابزارهای کلیدی برای مشاهده و تجزیه و تحلیل نمونه‌های زیستی با استفاده از نشانگرهای فلورسنت است.

عملکرد: این میکروسکوپ با استفاده از منابع نوری خاص، مانند لیزر یا لامپ‌های فلورسنت، برانگیخته شدن رنگ‌های فلورسنت متصل به مولکول‌های زیستی را امکان‌پذیر می‌کند. این رنگ‌ها با انتشار نور در طول موج‌های مختلف به کاربر اجازه می‌دهند تا ساختارهای زیستی مانند پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و اندامک‌های سلولی را مشاهده کند.

کاربرد: میکروسکوپ فلورسانس در تکنیک‌های ایمونوفلورسانس برای شناسایی پروتئین‌های خاص، مطالعه دینامیک سلولی و ردیابی مولکول‌های زیستی در سلول‌ها و بافت‌ها استفاده می‌شود.

۹. کابینت‌های نگهداری مواد شیمیایی و بیولوژیکی: کابینت‌های نگهداری مواد شیمیایی و بیولوژیکی برای ذخیره‌سازی ایمن مواد خطرناک و حساس ضروری هستند.

عملکرد: این کابینت‌ها معمولاً از مواد مقاوم در برابر آتش و مواد شیمیایی ساخته شده‌اند و با تهویه مناسب تجهیز شده‌اند. برخی از آنها شامل سیستم‌های قفل‌دار برای کنترل دسترسی به مواد خطرناک هستند.

---

1. Fluorescence Microscope

کاربرد: این کابینت‌ها برای نگهداری مواد شیمیایی قابل اشتعال، سمی، خورنده و همچنین مواد بیولوژیکی حساس (مانند نمونه‌های DNA یا RNA) در دماهای مناسب و ایمن استفاده می‌شوند.

۱۰. فریزر و یخچال‌های آزمایشگاهی: فریزرها و یخچال‌های آزمایشگاهی برای ذخیره‌سازی طولانی‌مدت نمونه‌ها و مواد زیستی حساس به دما استفاده می‌شوند.

عملکرد: فریزرهای آزمایشگاهی معمولاً در دماهای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا ۸۰- درجه سانتی‌گراد کار می‌کنند، که برای نگهداری طولانی‌مدت نمونه‌های زیستی مانند DNA، RNA، پروتئین‌ها، سلول‌ها و میکروارگانیسم‌ها مناسب است. یخچال‌های آزمایشگاهی نیز برای نگهداری مواد حساس به دمای پایین مانند معرف‌های شیمیایی، آنزیم‌ها و محیط‌های کشت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد استفاده می‌شوند.

کاربرد: این دستگاه‌ها برای حفظ کیفیت و پایداری نمونه‌ها و مواد زیستی بسیار حیاتی هستند. نگهداری مناسب این مواد از تخریب آن‌ها در اثر نوسانات دما جلوگیری می‌کند و امکان استفاده طولانی‌مدت از آن‌ها را فراهم می‌سازد.

۱۱. پیپت‌ها و پیپتورهای اتوماتیک[1]: پیپت‌ها و پیپتورهای اتوماتیک ابزارهای اساسی برای جابجایی دقیق و کنترل‌شده مایعات در آزمایشگاه‌های ژنتیک مولکولی هستند.

عملکرد: پیپت‌ها امکان جابجایی حجم‌های بسیار کم مایعات، از چند میکرولیتر تا چند میلی‌لیتر را فراهم می‌کنند. پیپتورهای اتوماتیک نیز دستگاه‌های

1. Pipettes and Pipette Controllers

پیشرفته‌ای هستند که به کاربر اجازه می‌دهند تا حجم مایعات را به صورت دقیق و با تکرارپذیری بالا جابجا کند. این دستگاه‌ها به تنظیم دقیق حجم، کاهش خطای انسانی و افزایش سرعت در انجام آزمایش‌ها کمک می‌کنند.

کاربرد: پیپت‌ها و پیپتورهای اتوماتیک برای انجام واکنش‌های PCR، آماده‌سازی محلول‌ها، رقیق‌سازی نمونه‌ها و انجام مراحل مختلف آزمایش‌ها در ژنتیک مولکولی به کار می‌روند.

۱۲. اسپکتروفوتومتر فلورسانس[1]: این دستگاه پیشرفته برای اندازه‌گیری دقیق غلظت و ویژگی‌های فلورسانس مولکول‌های زیستی مانند DNA، RNA و پروتئین‌ها استفاده می‌شود.

عملکرد: اسپکتروفوتومتر فلورسانس از نور فلورسانس تولید شده توسط مولکول‌ها پس از تحریک با نور خاص استفاده می‌کند. این نور می‌تواند برای تعیین غلظت، بررسی برهم‌کنش‌های مولکولی و شناسایی تغییرات ساختاری در مولکول‌های زیستی مورد استفاده قرار گیرد.

کاربرد: این دستگاه به‌ویژه در مطالعات مربوط به ژن بیان، برهم‌کنش‌های پروتئین–پروتئین و تحقیقات بیومولکولی کاربرد دارد.

۱۳. سیستم‌های استخراج DNA/RNA اتوماتیک: سیستم‌های اتوماتیک استخراج DNA و RNA برای انجام سریع و مؤثر مراحل استخراج و خالص‌سازی مواد ژنتیکی طراحی شده‌اند.

عملکرد: این دستگاه‌ها با استفاده از فناوری‌های مختلف، از جمله ستون‌های سیلیکای متصل به مغناطیس، غشاها و روش‌های مبتنی بر محلول،

1. Fluorescence Spectrophotometer

DNA و RNA را از نمونه‌های مختلف (مانند خون، بافت و سلول‌ها) استخراج و خالص می‌کنند. سیستم‌های اتوماتیک این فرآیندها را به صورت دقیق و بدون نیاز به دخالت دستی انجام می‌دهند.

کاربرد: این سیستم‌ها برای کاربردهایی که به حجم بالای نمونه نیاز دارند، مانند پروژه‌های بزرگ ژنومیک، تحقیقات در زمینه سرطان و مطالعات اپیدمیولوژیک استفاده می‌شوند.

۱۴. دستگاه‌های ایمیجینگ[1]: دستگاه‌های ایمیجینگ برای تجسم و ثبت تصاویر از ژل‌های الکتروفورز، میکروسکوپ‌های فلورسانس و دیگر نمونه‌های زیستی استفاده می‌شوند.

عملکرد: این دستگاه‌ها شامل سیستم‌های کامپیوتری با دوربین‌های حساس به نور و نرم‌افزارهای تجزیه و تحلیل تصویر هستند که می‌توانند تصاویر باکیفیت از نمونه‌های زیستی را ثبت و آنالیز کنند. برای مثال، دستگاه‌های تصویربرداری ژل برای ثبت و آنالیز باندهای DNA یا پروتئین پس از انجام الکتروفورز مورد استفاده قرار می‌گیرند.

کاربرد: دستگاه‌های ایمیجینگ در تجزیه و تحلیل ژن‌ها، پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های زیستی و در تحقیقات پایه و بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

۱۵. کوره خشک کن[2]: کوره‌های خشک کن برای استریل کردن تجهیزات شیشه‌ای و فلزی در آزمایشگاه به کار می‌روند.

عملکرد: این دستگاه‌ها از هوای گرم و خشک برای از بین بردن میکروارگانیسم‌ها و استریل کردن وسایل استفاده می‌کنند. برخلاف اتوکلاو، این

1. Imaging Systems
2. Dry Heat Sterilizer

روش برای موادی که نمی‌توانند در تماس با رطوبت قرار گیرند، مناسب است.

کاربرد: کوره‌های خشک کن برای استریل کردن ابزارهایی مانند پنس، قیچی، لوله‌های شیشه‌ای و پیپت‌ها که در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند، استفاده می‌شوند.

۱۶. ترازوی دقیق[1]: ترازوی دقیق یک ابزار اساسی برای اندازه‌گیری دقیق وزن مواد شیمیایی و نمونه‌ها است.

عملکرد: این ترازوها قادر به اندازه‌گیری وزن‌ها در مقیاس میلی‌گرم و حتی نانومتر هستند. دقت بالا در این دستگاه‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است، به ویژه زمانی که حجم‌های بسیار کمی از مواد شیمیایی یا بیولوژیک برای آزمایش‌ها مورد نیاز است.

کاربرد: ترازوهای دقیق در تهیه محلول‌های شیمیایی، تنظیم غلظت‌های دقیق و آماده‌سازی نمونه‌ها برای واکنش‌های حساس مانند PCR یا واکنش‌های آنزیمی استفاده می‌شوند.

۱۷. کولینگ سنتر[2]: کولینگ سنترها برای انکوباسیون نمونه‌ها در دماهای پایین‌تر از دمای اتاق به کار می‌روند.

عملکرد: این دستگاه‌ها به محققان امکان می‌دهند تا دمای دقیق را برای نگهداری و رشد نمونه‌های حساس مانند باکتری‌ها، سلول‌ها، یا پروتئین‌ها در دماهای خاص تنظیم کنند. برخی کولینگ سنترها نیز دارای قابلیت برنامه‌ریزی چرخه‌های دمایی هستند.

کاربرد: کولینگ سنترها برای رشد میکروارگانیسم‌ها در دماهای پایین، حفظ

1. Analytical Balance
2. Cooling Incubator

آنزیم‌ها و ذخیره موقت نمونه‌های زیستی حساس استفاده می‌شوند.

۱۸. دستگاه سانتریفیوژ اولترا[1]: سانتریفیوژهای اولترا برای جداسازی اجزای مولکولی بسیار ریز مانند ویروس‌ها، پروتئین‌ها و قطعات DNA فوق‌العاده کوچک استفاده می‌شوند.

عملکرد: این دستگاه‌ها می‌توانند نمونه‌ها را با سرعت‌های بسیار بالا (تا صدها هزار دور در دقیقه) بچرخانند و نیروی گریز از مرکزی ایجاد کنند که باعث جداسازی اجزای بسیار ریز بر اساس وزن مولکولی می‌شود.

کاربرد: سانتریفیوژ اولترا برای کاربردهای پیشرفته‌ای مانند جداسازی و خالص‌سازی ویروس‌ها، تهیه لیپوزوم‌ها و انجام تحقیقات نانوبیوتکنولوژی به کار می‌رود.

روش‌های کالیبراسیون و نگهداری ابزارها

نگهداری و کالیبراسیون ابزارهای آزمایشگاهی در یک آزمایشگاه ژنتیک مولکولی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. این فرآیندها نه‌تنها به حفظ کارایی و دقت تجهیزات کمک می‌کنند، بلکه باعث افزایش طول عمر ابزارها و کاهش خطرات احتمالی ناشی از خرابی‌های غیرمنتظره می‌شوند. در زیر، روش‌های نگهداری و کالیبراسیون ابزارهای مختلف آزمایشگاهی به تفصیل توضیح داده شده است:

۱. نگهداری تجهیزات آزمایشگاهی

نگهداری تجهیزات شامل مجموعه‌ای از فرآیندها و اقدامات است که برای حفظ شرایط بهینه کارکرد تجهیزات و جلوگیری از خرابی‌های احتمالی انجام می‌شود. این

1. Ultracentrifuge

روش‌ها به دو دسته کلی تقسیم می‌شوند: نگهداری پیشگیرانه و نگهداری واکنشی.

الف) نگهداری پیشگیرانه[1]: نگهداری پیشگیرانه به مجموعه اقداماتی اطلاق می‌شود که به‌صورت منظم و برنامه‌ریزی‌شده انجام می‌شوند تا از وقوع مشکلات و خرابی‌های احتمالی در تجهیزات جلوگیری شود.

روش‌های نگهداری پیشگیرانه به شرح زیر است:

بازرسی‌های دوره‌ای: شامل بررسی منظم وضعیت فیزیکی تجهیزات، بررسی کابل‌ها و اتصالات، تمیز کردن قطعات خارجی و داخلی و اطمینان از عملکرد صحیح قطعات متحرک.

تعویض قطعات مستهلک: برخی قطعات مانند فیلترها، لامپ‌ها و نازل‌ها پس از مدتی استفاده باید تعویض شوند تا از عملکرد بهینه دستگاه اطمینان حاصل شود.

تمیزکاری: تمیز کردن تجهیزات پس از هر بار استفاده، خصوصاً قطعاتی که با نمونه‌های بیولوژیکی یا مواد شیمیایی در تماس هستند، برای جلوگیری از آلودگی و حفظ عملکرد دستگاه ضروری است.

روانکاری: برخی تجهیزات مانند سانتریفیوژها و پیپت‌ها نیاز به روانکاری قطعات متحرک دارند تا از سایش و آسیب جلوگیری شود.

ب) نگهداری واکنشی[2]: نگهداری واکنشی به اقداماتی اطلاق می‌شود که پس از بروز مشکل یا خرابی در تجهیزات انجام می‌شوند. این نوع نگهداری معمولاً به دلیل مشکلات فنی یا خرابی‌های غیرمنتظره مورد نیاز است.

روش‌های نگهداری واکنشی به شرح زیر است:

1. Preventive Maintenance
2. Reactive Maintenance

تشخیص عیب: شامل بررسی دقیق دستگاه برای شناسایی علت خرابی و تعیین قسمت‌های آسیب‌دیده.

تعمیر یا تعویض: پس از تشخیص عیب، قطعات معیوب تعمیر یا تعویض می‌شوند. این فرآیند ممکن است توسط تکنسین‌های مجاز یا نمایندگی‌های رسمی انجام شود.

آزمایش پس از تعمیر: پس از تعمیر، دستگاه باید تحت آزمایش قرار گیرد تا از عملکرد صحیح و دقت آن اطمینان حاصل شود.

۲. کالیبراسیون تجهیزات آزمایشگاهی

کالیبراسیون فرآیندی است که طی آن دقت و صحت اندازه‌گیری‌های انجام شده توسط یک دستگاه آزمایشگاهی ارزیابی و تنظیم می‌شود. این فرآیند به اطمینان از صحت نتایج آزمایش‌ها کمک می‌کند و معمولاً به‌صورت دوره‌ای انجام می‌شود.

الف) ضرورت کالیبراسیون

دقت نتایج: کالیبراسیون منظم تضمین می‌کند که دستگاه‌ها نتایج دقیقی ارائه می‌دهند. این امر به‌ویژه در آزمایشگاه‌های ژنتیک مولکولی که نتایج اشتباه می‌تواند پیامدهای بالینی جدی داشته باشد، اهمیت دارد.

رعایت استانداردها: بسیاری از آزمایشگاه‌ها ملزم به رعایت استانداردهای بین‌المللی مانند ISO هستند. کالیبراسیون منظم یکی از الزامات اصلی این استانداردها است.

ب) روش‌های کالیبراسیون: کالیبراسیون می‌تواند به‌صورت داخلی[1] یا توسط مراکز خارجی[2] انجام شود.

کالیبراسیون داخلی: در کالیبراسیون داخلی، از استانداردهای مرجع مانند محلول‌ها یا تجهیزات کالیبره شده برای بررسی و تنظیم دستگاه‌ها استفاده می‌شود.

مراحل کالیبراسیون به شرح زیر است:

آماده‌سازی: دستگاه باید قبل از کالیبراسیون تمیز و آماده به کار باشد. تمامی اتصالات، تنظیمات و شرایط محیطی باید مطابق با دستورالعمل‌های سازنده بررسی شوند.

اندازه‌گیری: دستگاه را با استفاده از استانداردهای مرجع مورد آزمایش قرار داده و نتایج به‌دست آمده را با مقادیر مرجع مقایسه کنید.

تنظیم: در صورت وجود انحراف در نتایج، تنظیمات لازم برای همگام‌سازی نتایج با مقادیر مرجع انجام می‌شود.

مستندسازی: تمامی مراحل کالیبراسیون و نتایج به‌دست آمده باید مستندسازی شوند تا در آینده به آن‌ها ارجاع شود.

کالیبراسیون خارجی: در صورت نیاز به دقت بیشتر، تجهیزات به مراکز تخصصی کالیبراسیون ارسال می‌شوند. این مراکز دارای تجهیزات پیشرفته‌تر و استانداردهای دقیق‌تری هستند. پس از کالیبراسیون، مراکز تخصصی گواهینامه‌ای صادر می‌کنند که نشان‌دهنده دقت و صحت دستگاه است. این گواهینامه معمولاً شامل اطلاعاتی مانند تاریخ کالیبراسیون، نتایج اندازه‌گیری و اصلاحات انجام شده است.

1. In-House
2. External Calibration

ج) فواصل زمانی کالیبراسیون

دوره‌های زمانی منظم: کالیبراسیون باید بر اساس برنامه‌های منظم انجام شود. برای مثال، دستگاه‌هایی که به‌طور مکرر استفاده می‌شوند، نیاز به کالیبراسیون ماهانه یا فصلی دارند، در حالی که برای سایر دستگاه‌ها ممکن است کالیبراسیون سالانه کافی باشد.

کالیبراسیون پس از تعمیر: هرگاه دستگاهی تعمیر می‌شود، باید پس از تعمیر مجدداً کالیبره شود تا از صحت عملکرد آن اطمینان حاصل شود.

کالیبراسیون پس از جابجایی: اگر دستگاه به مکان دیگری منتقل شود، تغییرات محیطی می‌تواند بر عملکرد آن تأثیر بگذارد، بنابراین کالیبراسیون مجدد ضروری است.

۳. مستندسازی و مدیریت نگهداری و کالیبراسیون

مستندسازی دقیق فرآیندهای نگهداری و کالیبراسیون ابزارهای آزمایشگاهی برای پیگیری وضعیت دستگاه‌ها و ارائه مدارک به مراجع بازرسی الزامی است.

ثبت سوابق: تمامی اقدامات نگهداری و کالیبراسیون باید ثبت و به‌روزرسانی شوند. این سوابق باید شامل تاریخ انجام، نام شخص مسئول، جزئیات اقدامات انجام شده و نتایج کالیبراسیون باشد.

برنامه‌ریزی: برای هر دستگاه باید یک برنامه نگهداری و کالیبراسیون منظم تعیین شود. این برنامه باید شامل زمان‌بندی دوره‌ای، اقدامات پیشگیرانه و کالیبراسیون‌های مورد نیاز باشد.

راهنمای انتخاب و استفاده از تجهیزات آزمایشگاهی

انتخاب و استفاده از تجهیزات آزمایشگاهی یک فرآیند پیچیده و

چندمرحله‌ای است که به دقت و برنامه‌ریزی نیاز دارد. در ادامه، هر یک از مراحل اصلی انتخاب و استفاده از تجهیزات آزمایشگاهی با جزئیات بیشتری توضیح داده شده‌اند.

۱. مراحل انتخاب تجهیزات آزمایشگاهی

الف) شناسایی نیازها و کاربردها

تجزیه و تحلیل الزامات: ابتدا باید انواع آزمایش‌هایی که قرار است در آزمایشگاه انجام شود، به‌دقت شناسایی و تحلیل شوند. این شامل شناسایی روش‌های آزمایشی مورد استفاده، نوع نمونه‌ها، حجم نمونه‌ها و پارامترهای مورد بررسی است.

طبقه‌بندی تجهیزات: برخی از تجهیزات به‌طور خاص برای یک نوع آزمایش یا یک مجموعه خاص از آزمایش‌ها طراحی شده‌اند. به‌عنوان مثال، دستگاه‌های PCR برای تقویت DNA و RNA طراحی شده‌اند و اگر آزمایشگاه شما به چنین تحلیل‌هایی نیاز دارد، این تجهیزات ضروری خواهند بود.

تخمین تعداد نمونه‌ها: برآورد تعداد نمونه‌هایی که در یک بازه زمانی مشخص (مثلاً روزانه یا هفتگی) پردازش می‌شوند، می‌تواند به انتخاب دستگاه‌هایی که توانایی پردازش این حجم را دارند کمک کند. به‌عنوان مثال، یک سانتریفیوژ با ظرفیت بالا برای آزمایشگاهی که تعداد زیادی نمونه خونی را پردازش می‌کند ضروری است.

برنامه‌ریزی برای رشد آینده: در نظر گرفتن برنامه توسعه‌ی آینده آزمایشگاه و افزایش احتمالی حجم کار نیز مهم است. اگر احتمال می‌دهید که حجم کاری در آینده افزایش یابد، انتخاب تجهیزاتی با ظرفیت بیشتر منطقی است.

نیازهای دقت و حساسیت: برخی آزمایش‌ها به دقت بسیار بالایی نیاز

دارند. مثلاً، در تشخیص‌های ژنتیکی، کوچک‌ترین نوسانات در نتایج می‌تواند منجر به تفسیر نادرست شود. بنابراین، دستگاه‌های دقیق‌تر برای این‌گونه کاربردها لازم هستند.

مقایسه مشخصات فنی: مشخصات فنی دستگاه‌ها باید با نیازهای آزمایشگاه تطبیق داده شوند. به‌عنوان مثال، در یک اسپکتروفوتومتر، محدوده دقت و حساسیت نوری بررسی شود تا مطمئن شوید که دستگاه قادر به تشخیص تغییرات کوچک در جذب نور است.

ب) بررسی مشخصات فنی

بررسی مستندات فنی: پیش از خرید، مطالعه دقیق دفترچه‌های فنی و بروشورهای تجهیزات مختلف ضروری است. این مستندات شامل اطلاعاتی درباره نحوه عملکرد، قابلیت‌ها، نیازهای نگهداری و ویژگی‌های ایمنی تجهیزات است.

مقایسه برندها و مدل‌ها: انتخاب برند و مدل مناسب نیازمند مقایسه ویژگی‌های مختلف برندهای موجود در بازار است. ممکن است برخی برندها امکانات بیشتری ارائه دهند یا از پشتیبانی فنی بهتری برخوردار باشند.

رعایت استانداردهای بین‌المللی: برخی تجهیزات باید با استانداردهای خاصی مانند ISO، CE، یا FDA سازگار باشند، به‌ویژه در آزمایشگاه‌های تشخیصی یا تحقیقاتی که نیاز به رعایت مقررات دقیق دارند.

سازگاری با الزامات داخلی آزمایشگاه: ممکن است آزمایشگاه شما نیاز به رعایت استانداردهای داخلی داشته باشد که باید مطمئن شوید دستگاه‌ها با آن‌ها مطابقت دارند.

پشتیبانی از ارتقاء نرم‌افزاری و سخت‌افزاری: برخی تجهیزات قابلیت

ارتقاء و به‌روزرسانی دارند که به افزایش طول عمر و بهره‌وری آن‌ها کمک می‌کند. بررسی کنید که آیا دستگاه‌های مورد نظر قابلیت ارتقاء دارند یا خیر.

دسترسی به پشتیبانی فنی: اطمینان حاصل کنید که پشتیبانی فنی توسط تولیدکننده یا تأمین‌کننده به‌صورت مداوم ارائه می‌شود، به‌ویژه برای تعمیرات و نگهداری دوره‌ای.

ج) ارزیابی هزینه‌ها

مقایسه قیمت‌ها: مقایسه قیمت‌های دستگاه‌های مختلف در بازار از جنبه‌های مختلفی مانند قیمت اولیه، امکانات اضافی و شرایط پرداخت انجام شود.

بررسی تخفیف‌ها و پیشنهادهای ویژه: ممکن است برخی تأمین‌کنندگان برای خریدهای عمده یا قراردادهای طولانی‌مدت تخفیف‌هایی ارائه دهند که می‌تواند به کاهش هزینه‌ها کمک کند.

برآورد هزینه‌های عملیاتی: باید هزینه‌های مربوط به نگهداری و کالیبراسیون دوره‌ای دستگاه‌ها در برنامه بودجه‌بندی آزمایشگاه در نظر گرفته شود. این شامل هزینه قطعات یدکی، مواد مصرفی و خدمات کالیبراسیون می‌شود.

قراردادهای خدمات: برخی تولیدکنندگان قراردادهای خدماتی را ارائه می‌دهند که شامل تعمیر و نگهداری دوره‌ای است. این قراردادها می‌توانند هزینه‌های غیرمنتظره را کاهش دهند.

هزینه‌های مرتبط با مواد مصرفی: برخی تجهیزات به مواد مصرفی خاصی نیاز دارند که باید هزینه‌های آن‌ها نیز در نظر گرفته شود. به‌عنوان مثال، دستگاه‌های اتوآنالایزر به مواد شیمیایی و کیت‌های خاصی نیاز دارند.

آموزش پرسنل: هزینه آموزش پرسنل برای استفاده صحیح از تجهیزات نیز

باید در بودجه‌بندی لحاظ شود، به‌ویژه اگر دستگاه‌های جدیدی که پیچیدگی بالایی دارند، خریداری شوند.

د) بررسی قابلیت‌های ایمنی و سازگاری با محیط

ویژگی‌های ایمنی داخلی: دستگاه‌های آزمایشگاهی باید دارای ویژگی‌های ایمنی مانند قطع‌کننده‌های خودکار در صورت بروز خطا، حفاظ‌های ایمنی و سیستم‌های هشداردهنده باشند.

مدیریت خطرات: در آزمایشگاه‌هایی که با مواد خطرناک کار می‌کنند، تجهیزات باید به‌گونه‌ای طراحی شده باشند که ریسک‌های مرتبط با این مواد را کاهش دهند. مثلاً، هودهای ایمنی برای کار با مواد شیمیایی خطرناک ضروری هستند.

شرایط محیطی: تجهیزات باید با شرایط محیطی آزمایشگاه سازگار باشند. به‌عنوان مثال، برخی دستگاه‌ها ممکن است در محیط‌هایی با دمای بالا یا رطوبت زیاد به‌خوبی عمل نکنند.

مدیریت فضا: همچنین باید بررسی شود که آیا فضای کافی برای نصب و عملکرد صحیح دستگاه در آزمایشگاه وجود دارد یا خیر.

۲. استفاده صحیح از تجهیزات آزمایشگاهی

الف) نصب و راه‌اندازی

مطالعه دستورالعمل‌های نصب: نصب تجهیزات باید دقیقاً طبق دستورالعمل‌های سازنده انجام شود. این دستورالعمل‌ها شامل جزئیات مربوط به اتصال‌ها، تنظیمات اولیه و شرایط محیطی مناسب هستند.

انجام تنظیمات لازم: برخی تجهیزات نیاز به تنظیمات اولیه قبل از استفاده

دارند. این تنظیمات ممکن است شامل کالیبراسیون اولیه، تنظیمات نرم‌افزاری، یا تنظیمات مکانیکی باشد.

آموزش پرسنل: تمامی کاربران باید دوره‌های آموزشی لازم را برای استفاده صحیح از تجهیزات طی کنند. این دوره‌ها می‌تواند توسط سازنده یا نماینده آن برگزار شود.

مستندسازی آموزش‌ها: ثبت اطلاعات آموزش‌های ارائه‌شده و ارزیابی توانایی پرسنل پس از آموزش مهم است. این مستندسازی می‌تواند به‌عنوان مرجع برای آموزش‌های آینده و همچنین ارزیابی عملکرد پرسنل مورد استفاده قرار گیرد.

تست عملکرد: پس از نصب، آزمایش اولیه برای اطمینان از عملکرد صحیح دستگاه انجام می‌شود. این آزمایش‌ها باید شامل تست تمامی قابلیت‌ها و عملکردهای کلیدی دستگاه باشد.

تنظیم نهایی: در صورت لزوم، پس از آزمایش اولیه، تنظیمات نهایی انجام می‌شود تا دستگاه به‌طور کامل آماده بهره‌برداری شود.

ب) نگهداری روزمره و دوره‌ای

تمیزکاری پس از هر استفاده: تجهیزات باید پس از هر بار استفاده تمیز شوند تا از آلودگی‌ها و رسوبات جلوگیری شود. به‌ویژه در مورد دستگاه‌هایی که با مواد شیمیایی یا زیستی حساس کار می‌کنند.

استفاده از مواد تمیزکننده مناسب: استفاده از مواد تمیزکننده‌ای که توسط سازنده توصیه شده‌اند، ضروری است تا از آسیب به دستگاه جلوگیری شود.

بازدیدهای دوره‌ای: بازدیدهای دوره‌ای برای بررسی عملکرد دستگاه، شناسایی خرابی‌های احتمالی و انجام تعمیرات پیشگیرانه لازم است.

فصل سوم

تکنیک‌های استخراج و خالص‌سازی اسیدهای نوکلئیک

روش‌های استخراج DNA از سلول‌های باکتریایی، گیاهی و جانوری

جداسازی DNA یکی از مراحل اساسی در تحقیقات ژنتیک مولکولی است. این فرآیند شامل جداسازی DNA از سایر اجزای سلولی مانند پروتئین‌ها، چربی‌ها و RNA است. روش‌های مختلفی برای استخراج DNA وجود دارد که به نوع نمونه (مانند خون، بافت، سلول‌های کشت‌شده) و کاربردهای مورد نظر بستگی دارد. در ادامه، چند روش اصلی استخراج DNA به همراه توضیحات آنها آورده شده است:

۱. روش فنل-کلروفرم

مراحل روش فنل-کلروفرم به شرح زیر است:

لیز سلولی: سلول‌ها در یک محلول بافر حاوی پروتئیناز K و SDS لیز می‌شوند تا غشاهای سلولی شکسته شده و محتویات سلولی آزاد شوند.

جداسازی پروتئین‌ها: فنل و کلروفرم به نمونه اضافه می‌شوند و نمونه مخلوط می‌شود. در این مرحله، پروتئین‌ها دناتوره شده و در فاز آلی (فنل-کلروفرم) جدا می‌شوند، در حالی که DNA در فاز آبی باقی می‌ماند.

ته نشینی DNA: فاز آبی حاوی DNA جدا شده و به آن الکل سرد (اتانول یا ایزوپروپانول) اضافه می‌شود تا DNA ته‌نشین گردد.

شستشو و احیای DNA: DNA ته‌نشین‌شده با الکل ۷۰ درصد شسته می‌شود تا ناخالصی‌ها از بین برود، سپس DNA خشک و در بافر TE یا آب مقطر حل می‌شود.

* مزایا: این روش می‌تواند DNA باکیفیت بالا و بدون آلودگی را تولید کند.

* معایب: استفاده از حلال‌های سمی مانند فنل و کلروفرم. زمان‌بر بودن و نیاز به تجربه در انجام مراحل.

۲. روش نمکی[1]

مراحل روش نمکی به شرح زیر است:

لیز سلولی: سلول‌ها با استفاده از بافر حاوی SDS و پروتئیناز K لیز می‌شوند.

رسوب پروتئین‌ها:با اضافه کردن نمک اشباع (مانند استات آمونیوم)، پروتئین‌ها رسوب می‌کنند و DNA در محلول باقی می‌ماند.

جداسازی DNA: DNA در محلول باقی‌مانده با استفاده از اتانول ته‌نشین شده و سپس شسته و در نهایت حل می‌شود.

* مزایا: این روش نسبت به روش فنل-کلروفرم ایمن‌تر است زیرا از حلال‌های سمی استفاده نمی‌کند. سادگی و امکان انجام سریع‌تر آن.

* معایب: ممکن است DNA به اندازه روش فنل-کلروفرم خالص نباشد.

1. Salting-Out

۳. روش استفاده از کیت‌های استخراج تجاری

مراحل روش استفاده از کیت‌های استخراج تجاری به شرح زیر است:

لیز سلولی: نمونه با استفاده از بافرهای اختصاصی کیت تجاری لیز می‌شود.

اتصال DNA به ستون: نمونه لیز شده از یک ستون حاوی یک غشاء سیلیکایی عبور داده می‌شود که DNA به آن متصل می‌شود.

شستشو: با استفاده از بافرهای شستشو، ناخالصی‌ها از ستون خارج می‌شوند.

جداسازی DNA: DNA با استفاده از یک بافر الوت[1] از ستون جدا می‌شود.

* مزایا: سادگی، سرعت بالا و قابلیت تکرار بالا. امکان استفاده از این روش برای تعداد زیادی نمونه به‌طور همزمان.

* معایب: هزینه بالای کیت‌های تجاری. گاهی کاهش در خلوص یا بازدهی در مقایسه با روش‌های سنتی.

٤. روش کلرید سزیم[2]

مراحل روش کلرید سزیم به شرح زیر است:

لیز سلولی و جداسازی اولیه DNA: پس از لیز سلول‌ها، DNA در محلول CsCl قرار می‌گیرد.

سانتریفیوژ: محلول حاوی DNA و CsCl تحت سانتریفیوژ با سرعت بالا قرار می‌گیرد تا یک گرادیان تشکیل شود و DNA به صورت یک باند در نقطه چگالی خود متمرکز شود.

بازیابی DNA: باند DNA استخراج شده و DNA با استفاده از اتانول

1. Elution Buffer
2. CsCl Gradient

ته‌نشین می‌شود.

* مزایا: امکان به دست آوردن DNA با خلوص بسیار بالا.
* معایب: تجهیزات گران قیمت و نیاز به زمان، تجربه و مهارت بالا.

۵. روش مغناطیسی[1]

مراحل روش مغناطیسی به شرح زیر است:

لیز سلولی: سلول‌ها با استفاده از بافرهای لیز مخصوص شکسته می‌شوند.

اتصال DNA به ذرات مغناطیسی: DNA به دانه‌های مغناطیسی متصل می‌شود که با پوششی از مواد خاصی پوشیده شده‌اند.

شستشو: دانه‌ها با استفاده از یک میدان مغناطیسی جدا می‌شوند و ناخالصی‌ها شسته می‌شوند.

جداسازی DNA: DNA از دانه‌های مغناطیسی آزاد شده و جمع‌آوری می‌شود.

* مزایا: روش سریع و بدون نیاز به سانتریفیوژ. قابلیت اتوماسیون بالا.
* معایب: هزینه بالا به دلیل استفاده از مواد مغناطیسی. ممکن است نیاز به بهینه‌سازی داشته باشد.

استخراج DNA از سایر منابع مختلف زیستی (باکتریایی، گیاهی) شامل تکنیک‌های مشابهی است، اما به دلیل تفاوت‌های ساختاری و ترکیبی بین این موجودات، نیاز به تنظیمات و روش‌های خاصی دارد. در ادامه، برخی از این تفاوت‌ها مقایسه شده است:

۱. استخراج DNA از باکتری‌ها

1. Magnetic Bead-Based Extraction

لیز قلیایی: باکتری‌ها به راحتی با استفاده از بافر قلیایی حاوی SDS و NaOH لیز می‌شوند. این روش برای استخراج DNA پلاسمیدی مناسب است.

روش فنل-کلروفرم: لیز سلولی با استفاده از پروتئیناز K و SDS انجام می‌شود و سپس فنل-کلروفرم برای جداسازی DNA از پروتئین‌ها به کار می‌رود.

استفاده از لیزوزیم: لیزوزیم دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت را تخریب می‌کند و پس از آن لیز با SDS و پروتئیناز K کامل می‌شود.

* چالش‌ها:

دیواره سلولی ضخیم: باکتری‌های گرم مثبت دیواره سلولی ضخیمی دارند که نیاز به لیزوزیم یا آنزیم‌های مشابه برای تخریب دارد.

وجود DNA پلاسمیدی: در برخی باکتری‌ها، نیاز به جدا کردن DNAپلاسمیدی از DNA ژنومی وجود دارد.

۲. استخراج DNA از گیاهان

روش CTAB[1]: این روش شامل استفاده از CTAB برای لیز سلولی و حذف پلی‌ساکاریدها و ترکیبات فنلی است که به طور معمول در سلول‌های گیاهی وجود دارند.

روش فنل-کلروفرم: مشابه با روش‌های دیگر، اما معمولاً برای گیاهان نیاز به افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها برای جلوگیری از اکسیداسیون DNA وجود دارد.

استفاده از آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی: استفاده از آنزیم‌هایی مانند سلولاز برای تجزیه دیواره سلولی و لیزوزوم‌ها برای تخریب غشاهای داخلی.

---

1. Cetyltrimethylammonium Bromide

*** چالش‌ها:**

وجود دیواره سلولی: دیواره سلولی گیاهان از سلولز تشکیل شده و نیاز به روش‌های مکانیکی یا شیمیایی برای تخریب دارد.

پلی‌ساکاریدها و ترکیبات فنلی: این مواد می‌توانند به DNA چسبیده و خلوص DNA را کاهش دهند.

۳. تجزیه DNA: در نمونه‌های حیوانی ممکن است DNA به دلیل فعالیت نوکلئازها تخریب شود، بنابراین افزودن مهارکننده‌های نوکلئاز مهم است.

در ادامه به مقایسه تفاوت‌ها بین روش های مختلف پرداخته شده است:

۱. ساختار سلولی:

باکتری‌ها: دیواره سلولی باکتری‌ها بسته به نوع باکتری (گرم مثبت یا منفی) ممکن است نیاز به روش‌های خاصی برای لیز داشته باشد.

گیاهان: دیواره سلولی گیاهان ضخیم و غنی از سلولز است که نیاز به استفاده از آنزیم‌های خاص یا مواد شیمیایی مانند CTAB دارد.

حیوانات: سلول‌های جانوری فاقد دیواره سلولی هستند و لیز آن‌ها نسبتاً ساده است، اما حذف پروتئین‌ها و محافظت از DNA در برابر تخریب مهم است.

۲. ناخالصی‌های ویژه:

باکتری‌ها: اغلب نیاز به جدا کردن DNA پلاسمیدی از DNA ژنومی وجود دارد.

گیاهان: حضور پلی‌ساکاریدها و ترکیبات فنلی که می‌توانند باDNA تداخل داشته باشند.

حیوانات: احتمال حضور پروتئین‌های غشایی و هسته‌ای که باید به‌طور

کامل حذف شوند.

۳. استفاده از آنزیم‌ها:

باکتری‌ها: لیزوزیم برای تخریب دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت.

گیاهان: سلولاز و پکتیناز برای تجزیه دیواره سلولی گیاهان.

حیوانات: پروتئیناز K برای تجزیه پروتئین‌ها و لیز سلولی.

استخراج DNA از منابع زیستی مختلف، اگرچه از اصول مشابهی پیروی می‌کند، اما نیاز به تنظیمات خاص و روش‌های مختلف دارد تا بتوان DNA با کیفیت و خلوص بالا را به دست آورد. انتخاب روش مناسب بسته به نوع سلول و اهداف آزمایشگاهی تعیین می‌شود. مهم‌ترین نکته در هر روش، بهینه‌سازی مراحل برای کاهش میزان آلودگی‌ها و افزایش بازده استخراج DNA است.

تکنیک‌های خالص‌سازی RNA و جلوگیری از تجزیه آن

خالص‌سازی RNA یکی از مراحل مهم و حساس در تحقیقات زیستی است که نیاز به دقت بالا دارد. RNA به دلیل ساختار تک‌رشته‌ای و ناپایدار بودن آن، به‌ویژه در برابرRNase ها که به طور طبیعی در محیط وجود دارند، بسیار آسیب‌پذیر است. بنابراین، تکنیک‌های خالص‌سازی RNA نه تنها باید کارآمد باشند، بلکه باید شامل مراحل دقیقی برای جلوگیری از تجزیه RNA نیز باشند. در ادامه، به معرفی تکنیک‌های متداول خالص‌سازی RNA و روش‌های جلوگیری از تجزیه آن پرداخته می‌شود.

۱. روش TRIzol یا روش Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction

مراحل روش TRIzol به شرح زیر است:

لیز سلولی: سلول‌ها یا بافت‌ها در حضور گوانیدینیوم تیوسیانات (یک ماده دناتوره‌کننده قوی کهRNase ها را غیرفعال می‌کند) و فنل قرار می‌گیرند. این ترکیب، پروتئین‌ها و چربی‌ها را دناتوره کرده و RNA را در فاز آبی محلول نگه می‌دارد.

استخراج با کلروفرم: کلروفرم به مخلوط اضافه شده و سانتریفیوژ انجام می‌شود. پس از سانتریفیوژ، محلول به دو فاز تقسیم می‌شود: فاز آبی بالایی که RNAرا در خود دارد و فاز آلی پایینی که حاوی پروتئین‌ها و چربی‌ها است.

رسوب RNA: RNA از فاز آبی با استفاده از ایزوپروپانول یا اتانول رسوب داده می‌شود.

شستشو و حل کردن RNA:RNA رسوب داده شده با اتانول ۷۰٪ شسته و در نهایت در آب دیونیزه یا بافر خاص RNA مانند (DEPC-treated water) حل می‌شود.

* مزایا: این روش به طور گسترده استفاده می‌شود و RNA باکیفیت و خلوص بالا را تولید می‌کند.

* معایب: استفاده از حلال‌های سمی مانند فنل و کلروفرم. همچنین نیاز به تجربه در انجام مراحل دقیق است.

۲. روش ستون‌های سیلیکایی[1]

مراحل روش ستون‌های سیلیکایی به شرح زیر است:

لیز سلولی: سلول‌ها یا بافت‌ها با بافر لیز خاص (حاوی گوانیدینیوم تیوسیانات یا مشابه آن) لیز می‌شوند.

اتصال RNA به ستون: لیزات به ستون سیلیکایی منتقل شده و RNA به

1. Silica Column-Based Kits

غشاء سیلیکایی ستون متصل می‌شود.

شستشو: ناخالصی‌ها با استفاده از بافرهای شستشو حذف می‌شوند.

الوت RNA:RNA با استفاده از یک بافر الوت یا آب RNase-free از ستون جدا می‌شود.

* مزایا: این روش سریع، ساده و تکرارپذیر است و نیازی به استفاده از حلال‌های آلی ندارد.

* معایب: ممکن است برخی از انواع RNA های کوچک یا تخریب‌شده به طور کامل بازیابی نشوند.

۳. روش مگنتیک بیدز[1]

مراحل روش مگنتیک بیدز به شرح زیر است:

لیز سلولی: سلول‌ها یا بافت‌ها در حضور بافر لیز حاوی مواد دناتوره‌کننده لیز می‌شوند.

اتصال RNA به بیدها: RNA به بیدهای مغناطیسی پوشیده شده با مواد شیمیایی خاصی که RNA را متصل می‌کنند، متصل می‌شود.

شستشو: بیدهای مغناطیسی شسته می‌شوند تا ناخالصی‌ها از آن‌ها جدا شود.

لوت RNA :RNA از بیدها جدا و در محلول خاصی الوت می‌شود.

* مزایا: روش بسیار کارآمد و مناسب برای اتوماسیون و کار با نمونه‌های بزرگ.

* معایب: نیاز به تجهیزات خاص برای جداسازی بیدهای مغناطیسی.

٤. روش رسوب اسید[2]: این روش مشابه روش TRIzol است، با این تفاوت

1. Magnetic Bead-Based Kits
2. Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction

که RNA در شرایط اسیدی استخراج می‌شود، که به حفظ RNA و جداسازی آن از DNA کمک می‌کند. برای جلوگیری از تجزیه RNA میتوان به موارد زیر اشاره کرد:

۱. پیشگیری از تجزیه توسط RNaseها:

استفاده از مواد شیمیایی بازدارنده RNase: اضافه کردن RNase Inhibitors به نمونه‌ها یا بافرهای کاری برای غیرفعال کردن RNase ها.

کار با مواد ضد RNase: استفاده از آب و محلول‌های DEPC-treated (آب دیونیزه شده و سپس با DEPC درمان شده برای غیرفعال کردنRnase ها) برای آماده‌سازی بافرها و محلول‌ها.

تمیز نگه داشتن محیط کار: استفاده از دستکش تمیز، اجتناب از تماس مستقیم با نمونه‌ها و تجهیزات و استفاده از تجهیزات و ظروف یکبار مصرف.

کار در شرایط سرد: انجام مراحل استخراج و خالص‌سازی RNA در دمای پایین (روی یخ یا در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد) برای کاهش فعالیتRNase ها.

۲. ثبات RNA در طول خالص‌سازی:

استفاده از عوامل دناتوره‌کننده قوی: مانند گوانیدینیوم تیوسیانات برای غیرفعال کردنRNase ها در طول لیز سلولی.

خنک‌سازی سریع نمونه‌ها: استفاده از نیتروژن مایع یا فریز کردن سریع نمونه‌ها برای جلوگیری از تجزیه RNA قبل از لیز سلولی.

نگهداری RNA در شرایط مناسب: RNA خالص‌سازی شده باید در آب RNase-free یا بافر TE در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شود تا از تجزیه جلوگیری شود.

۳ . اقدامات پیشگیرانه اضافی:

اجتناب از استفاده از آنزیم‌های قدیمی: مطمئن شوید که آنزیم‌ها (مانند پروتئیناز K یا سایر آنزیم‌های استفاده‌شده در فرآیند استخراج) تازه هستند و در شرایط مناسب نگهداری شده‌اند.

پاک‌سازی محیط کار: استفاده از محلول‌های پاک‌کننده خاص که RNase ها را غیرفعال می‌کنند، برای تمیز کردن سطوح کاری و ابزارها.

روش‌های سنجش غلظت و خلوص DNA/RNA

اندازه‌گیری خلوص و غلظت DNA از مراحل حیاتی در مطالعات ژنتیکی و زیست‌شناسی مولکولی است. انتخاب روش مناسب برای اندازه‌گیری غلظت و خلوص DNA به نیازهای خاص آزمایشگاهی و نوع نمونه‌ها بستگی دارد. ترکیب چندین روش نیز می‌تواند به دست آوردن نتایج دقیق‌تر کمک کند.

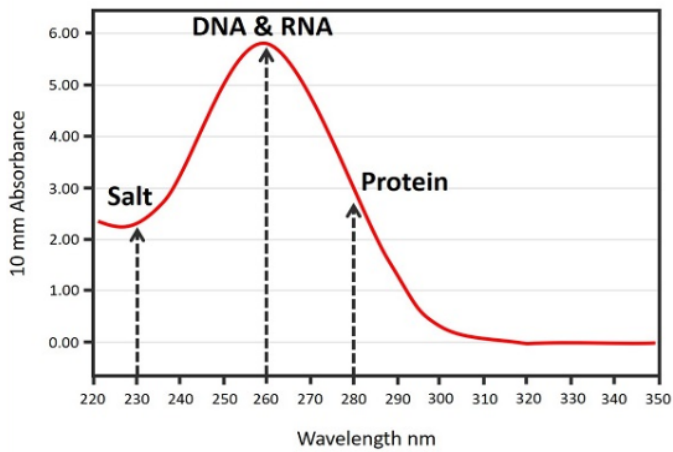
اسپکتروفتومتری و فلورومتری از روش‌های سریع و رایج برای تعیین غلظت DNAهستند، در حالی که نسبت‌های جذب نوری و الکتروفورز ژل آگارز برای ارزیابی خلوص و کیفیت DNA کاربرد دارند. برای بررسی‌های دقیق‌تر و در شرایط خاص، از روش‌های کروماتوگرافی نیز می‌توان استفاده کرد.

۱. اسپکتروفتومتری

اسپکتروفتومتری یکی از روش‌های رایج و سریع برای اندازه‌گیری غلظت و خلوص DNA است. این روش بر اساس جذب نور توسط DNA در طول موج‌های مشخص انجام می‌شود.

اصول کار: DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر نور را جذب می‌کند.

اسپکتروفتومتر، میزان جذب نور در این طول موج را اندازه‌گیری کرده و بر اساس قانون بیر-لامبرت (Beer-Lambert Law)، غلظت DNA را محاسبه می‌کند. در این روش نمونه DNA باید رقیق شود تا در محدوده خطی حد تشخیص اسپکتروفوتومتر قرار گیرد. در حالت ایده آل، قرائت چگالی نوری آن (OD) باید بین ۰/۱ و ۱/۰ باشد، که مقدار ۱/۰ مربوط به غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر است. جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر برای ارزیابی میزان آلودگی نمونه با پروتئین‌ها (به‌ویژه تریپتوفان و تیروزین) استفاده می‌شود.



محاسبه غلظت DNA دوتایی: ۱ واحد جذب (OD) در ۲۶۰ نانومتر برابر با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر DNA دوتایی (dsDNA) است.

محاسبه غلظت DNA تک رشته‌ای: ۱ واحد جذب (OD) در ۲۶۰ نانومتر برابر با غلظت ۳۳ میکروگرم در میلی‌لیتر DNA تک‌رشته‌ای (ssDNA) است.

محاسبه نسبت A260/A280: نسبت A260/A280 حدود ۱٫۸ تا ۲٫۰ نشان‌دهنده خلوص مناسب DNA است. نسبت‌های پایین‌تر نشان‌دهنده آلودگی با پروتئین‌ها است.

محاسبه نسبت A260/A230: این نسبت نیز برای ارزیابی خلوص DNAاستفاده می‌شود. مقادیر پایین‌تر از ۲٫۰ ممکن است نشان‌دهنده آلودگی با نمک‌ها، پلی‌ساکاریدها یا سایر آلاینده‌ها باشد.

* مزایا: سریع، ساده و نیاز به تجهیزات کم. اطلاعات همزمان از غلظت و خلوص DNA

* معایب: نمی‌تواند آلودگی‌های RNA یا سایر اسیدهای نوکلئیک را به‌طور خاص تشخیص دهد. دقت آن در غلظت‌های پایین DNA محدود است.

۲. نانو دراپ[1]

همان روش اسپکتروفتومتری است که نیاز به حجم بسیار کمی از نمونه (معمولاً ۱-۲ میکرولیتر) دارد. دستگاه نانو دراپ غلظت و خلوص DNA و RNAرا بر اساس جذب نوری در طول‌موج‌های مختلف اندازه‌گیری می‌کند. نانو دراپ برای اندازه‌گیری سریع و بدون نیاز به آماده‌سازی نمونه استفاده می‌شود.

۳. فلورومتری[2]

فلورومتری یکی از روش‌های حساس برای اندازه‌گیری غلظت DNA است که از رنگ‌های فلورسنتی استفاده می‌کند که به‌طور انتخابی به DNA متصل شده و نور فلورسنت ساطع می‌کنند.

اصول کار: از رنگ‌هایی مانند PicoGreen یا Hoechst استفاده می‌شود

1. NanoDrop
2. Fluorometry

که به DNA متصل می‌شوند و وقتی با نور UV تحریک می‌شوند، فلورسانس می‌دهند. میزان فلورسانس ساطع شده متناسب با غلظت DNA است و با استفاده از یک دستگاه فلورومتر اندازه‌گیری می‌شود.

محاسبه غلظت: یک منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های شناخته‌شده DNA تهیه می‌شود و غلظت نمونه‌های ناشناخته با مقایسه میزان فلورسانس با این منحنی استاندارد تعیین می‌شود.

* مزایا: حساسیت بالا و قابلیت تشخیص DNA در غلظت‌های بسیار پایین. توانایی تفکیک بین DNA دو رشته‌ای و سایر انواع اسید نوکلئیک.

* معایب: نیاز به مواد شیمیایی خاص و تجهیزات پیشرفته‌تر نسبت به اسپکتروفتومتری. مراحل بیشتر و احتمال خطا در صورت استفاده نادرست از رنگ‌ها.

٤. الکتروفورز ژل آگارز[1]

این روش نه تنها به تعیین خلوص DNA کمک می‌کند بلکه می‌تواند اندازه و یکپارچگی DNA را نیز نشان دهد.

اصول کار: نمونه‌های DNA در ژل آگارز بارگذاری شده و تحت میدان الکتریکی قرار می‌گیرند DNA .با توجه به اندازه خود در ژل حرکت می‌کند. با استفاده از رنگ‌آمیزی DNA مانند اتیدیوم بروماید (EtBr) یا SYBR Green، باندهای DNA قابل مشاهده می‌شوند.

تشخیص خلوص: حضور باندهای اضافی یا دنباله‌دار شدن باندهای DNAنشان‌دهنده آلودگی یا تخریب DNA است. باندهای واضح و تیز نشان‌دهنده DNA خالص و با کیفیت است.

---

1. Agarose Gel Electrophoresis

* مزایا: ارزیابی تصویری از کیفیت و یکپارچگی DNA. شناسایی آلودگی‌های احتمالی.
* معایب: نسبت به روش‌های نوری زمان‌برتر و نیازمند تجهیزات بیشتری است. مقدار نمونه مورد نیاز بیشتر است.

۵. روش‌های کروماتوگرافی

کروماتوگرافی یکی دیگر از روش‌های پیشرفته برای تعیین خلوص DNA است. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) می‌تواند برای جداسازی و اندازه‌گیری DNA و همچنین شناسایی ناخالصی‌ها مورد استفاده قرار گیرد.
* مزایا: دقت بالا و توانایی جداسازی و شناسایی ناخالصی‌های مختلف. قابل استفاده برای تحلیل دقیق‌تر در شرایط تحقیقاتی خاص.
* معایب: نیازمند تجهیزات پیچیده و گران‌قیمت. نیاز به تخصص و تجربه بالا برای انجام و تحلیل نتایج.

۶. تعیین غلظت به روشQubit

این روش بر اساس فلورومتری است، اما از دستگاه خاصی به نام Qubit استفاده می‌کند که به طور خاص برای اندازه‌گیری دقیق غلظت DNA، RNA و پروتئین طراحی شده است. رنگ‌های فلورسانس مورد استفاده در این روش به طور انتخابی به DNA یا RNA متصل می‌شوند. دستگاه Qubit شدت فلورسانس را اندازه‌گیری کرده و غلظت نمونه را با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه می‌کند. روش Qubit برای اندازه‌گیری دقیق‌تر و حساس‌تر DNA و RNA نسبت به اسپکتروفتومتری مناسب است.
* مزایا: دقت بسیار بالا و حساسیت بیشتر نسبت به سایر روش‌ها. مناسب

برای نمونه‌های با غلظت بسیار کم.

* معایب: هزینه‌بر و نیاز به دستگاه خاص Qubit. نیاز به مواد شیمیایی خاص و منحنی‌های استاندارد.

۷. پراکندگی دینامیک نور[1]

این روش بیشتر برای ارزیابی اندازه ذرات در یک نمونه استفاده می‌شود و می‌تواند اطلاعاتی درباره یکپارچگی و خلوص نمونه DNA یا RNA ارائه دهد. در این روش، نمونه DNA یا RNA در یک محلول قرار می‌گیرد و یک پرتوی لیزر به آن تابیده می‌شود. نور تابیده شده توسط ذرات DNA یا RNA پراکنده می‌شود و پراکندگی نور بر اساس اندازه ذرات تحلیل می‌شود. تغییرات در الگوهای پراکندگی نور می‌تواند نشان‌دهنده آلودگی‌ها یا وجود قطعات دگرگون‌شده در نمونه باشد.

* مزایا: می‌تواند اطلاعات دقیق درباره اندازه و پراکندگی ذرات ارائه دهد. مناسب برای بررسی یکپارچگی نمونه.

* معایب: نیاز به تجهیزات خاص و پیچیده. بیشتر برای تحلیل‌های خاص و دقیق استفاده می‌شود و برای سنجش معمول DNA یا RNA کاربرد ندارد.

1. Dynamic Light Scattering - DLS

فصل چهارم

تکنیک‌های توالی یابی DNA

آشنایی با توالی‌یابی سنتی Sanger

توالی‌یابی سنگر[1] یکی از قدیمی‌ترین و پرکاربردترین روش‌های تعیین توالی DNA است که برای چندین دهه به عنوان استاندارد طلایی در تحقیقات ژنتیکی و زیست‌شناسی مولکولی شناخته شده است. این روش توسط فردریک سنگر و همکارانش در سال ۱۹۷۷ توسعه یافت و به دلیل دقت بالا و کاربرد گسترده، به سرعت جایگاه خود را در بسیاری از آزمایشگاه‌ها به دست آورد.

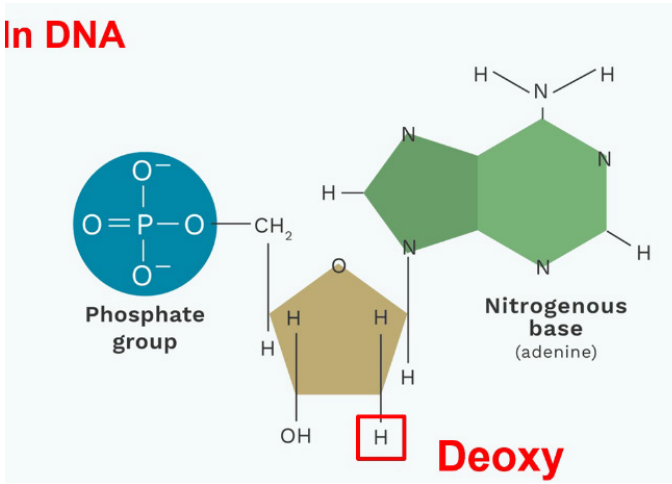
روش سنگر بر اساس سنتز DNA جدید است که در آن از دئوکسی‌نوکلئوتیدهای تغییر یافته به نام دی‌دئوکسی‌نوکلئوتیدها[2] استفاده می‌شود. این نوکلئوتیدها فاقد گروه هیدروکسیل در موقعیت ۳' هستند که مانع از ادامه رشد زنجیره DNA پس از اضافه شدن به رشته در حال سنتز می‌شود. بنابراین، با استفاده از این نوکلئوتیدها، رشته‌های DNA با طول‌های متفاوت که هر کدام به یک نوکلئوتید خاص ختم می‌شوند، تولید می‌گردند. این رشته‌ها سپس بر اساس طولشان جداسازی و توالی DNA تعیین می‌شود.

---

1. Sanger sequencing
2. ddNTPs

مراحل توالی‌یابی سنگر به شرح زیر است:

۱. آماده‌سازی DNA: ابتدا باید نمونه DNA هدف آماده شود. این مرحله شامل استخراج DNA از سلول‌ها، خالص‌سازی و در صورت نیاز تکثیر ناحیه خاصی از DNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) است. DNA هدف باید با کیفیت بالا و به مقدار کافی استخراج و خالص‌سازی شود تا در واکنش توالی‌یابی استفاده گردد. در بسیاری از موارد، ناحیه خاصی از DNA با استفاده از PCR تکثیر می‌شود تا به مقدار کافی DNA برای توالی‌یابی موجود باشد.



۲. آماده‌سازی واکنش توالی‌یابی: واکنش توالی‌یابی شامل مخلوطی از موارد زیر است:

DNA هدف[1]: این همان قطعه DNA است که قصد توالی‌یابی آن را دارید.

پرایمر[2]: یک قطعه کوتاه از DNA تک‌رشته‌ای که به ناحیه‌ای از DNA

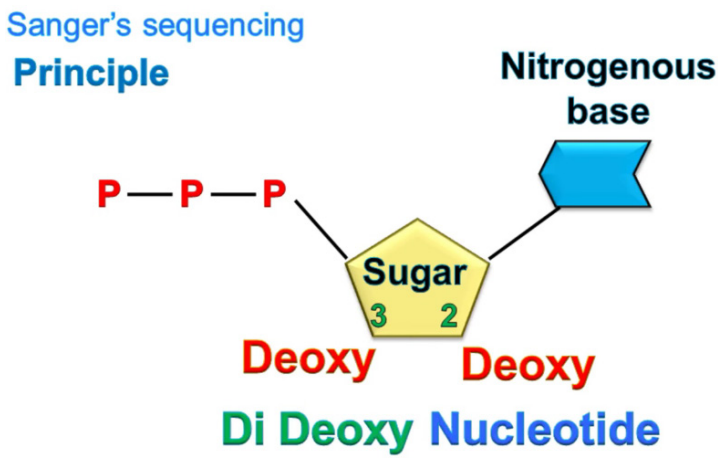
1. Template DNA
2. Primer

هدف متصل شده و شروع‌کننده سنتز DNA جدید است.

نوکلئوتیدهای دئوکسی: این‌ها نوکلئوتیدهای معمولی A، T، G، C هستند که به سنتز DNA جدید کمک می‌کنند.

نوکلئوتیدهای دی‌دئوکسی[1]: این نوکلئوتیدهای تغییر یافته در هر یک از چهار نوع ddATP، ddTTP، ddCTP،ddGTP وجود دارند. این‌ها باعث خاتمه سنتز DNA در مکان‌های خاصی می‌شوند.

DNA پلیمراز: آنزیمی که مسئول سنتز DNA جدید با افزودن نوکلئوتیدها به زنجیره در حال رشد است.

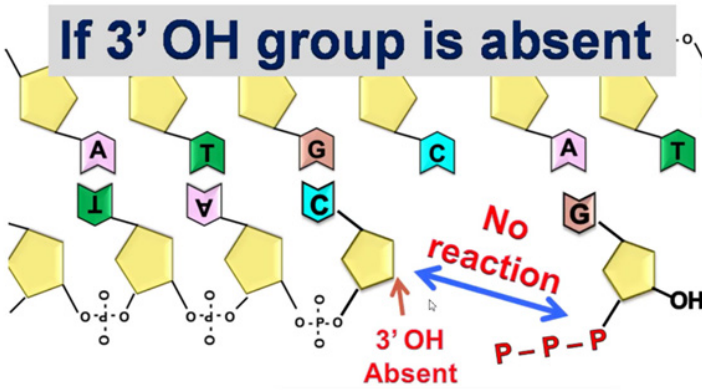


۳. واکنش سنتز و خاتمه زنجیره: این واکنش شامل مراحل زیر است:

شروع سنتز: پرایمر به DNA هدف متصل شده و سنتز DNA توسط DNA پلیمر از آغاز می‌شود. این فرایند با استفاده از نوکلئوتیدهای dNTP ادامه می‌یابد.

1. ddNTPs

خاتمه زنجیره: در هر زمان که یک ddNTP وارد رشته در حال سنتز شود، سنتز متوقف می‌شود زیرا ddNTP فاقد گروه هیدروکسیل ۳` است که برای افزودن نوکلئوتید بعدی لازم است. بنابراین، رشته‌های DNA با طول‌های مختلف که به یکی از چهار نوکلئوتید ختم می‌شوند، تشکیل می‌گردد.



٤. جداسازی و شناسایی محصولات: پس از واکنش، محصولات با استفاده از الکتروفورز جداسازی می‌شوند:

الکتروفورز کاپیلاری[1]: این روش در حال حاضر رایج‌ترین روش برای جداسازی محصولات توالی‌یابی است. در این روش، DNA با توجه به اندازه خود در یک لوله بسیار نازک (کاپیلار) حرکت می‌کند. نوکلئوتیدهای کوچکتر سریع‌تر از نوکلئوتیدهای بزرگتر حرکت می‌کنند، بنابراین محصولات مختلف بر اساس اندازه‌شان جداسازی می‌شوند.

شناسایی فلورسانس: در نسخه‌های مدرن‌تر از توالی‌یابی سنگر، ddNTP ها با رنگ‌های فلورسنت خاصی برچسب‌گذاری می‌شوند که هر رنگ نمایانگر

1. Capillary Electrophoresis

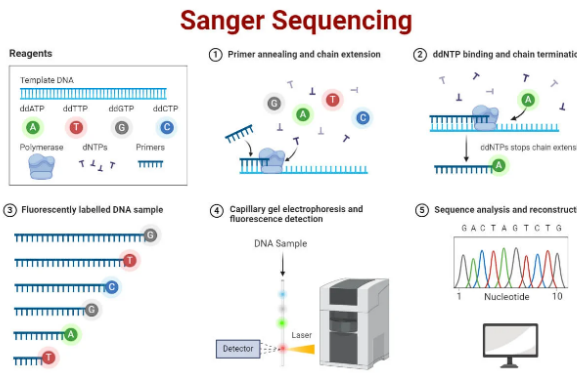
یکی از چهار نوکلئوتید است. هنگام عبور هر محصول از کاپیلار، دستگاه فلورسانس آن را شناسایی کرده و نوع نوکلئوتید انتهایی را تشخیص می‌دهد.

۵. تحلیل داده‌ها: داده‌های به‌دست‌آمده از الکتروفورز کاپیلاری به صورت یک کروماتوگرام نمایش داده می‌شوند که در آن هر پیک (قله) نمایانگر یک نوکلئوتید است. ترتیب پیک‌ها در کروماتوگرام نشان‌دهنده توالی DNA است.

۶. بررسی و تفسیر نتایج: پس از اتمام تحلیل، نتایج به دست آمده باید بررسی و تفسیر شوند:

بررسی کیفیت: برخی از نرم‌افزارهای تحلیل، کیفیت هر نوکلئوتید را بر اساس وضوح پیک‌ها در کروماتوگرام ارزیابی می‌کنند. اگر پیک‌ها به‌خوبی از هم جدا نشده باشند یا همپوشانی داشته باشند، ممکن است نتایج نامطمئن باشند.

تصحیح خطاها: در صورت مشاهده هرگونه خطا یا تناقض، داده‌ها می‌توانند دوباره بررسی شوند و در صورت لزوم، واکنش توالی‌یابی تکرار شود.



کاربردها و محدودیت‌های این روش به شرح زیر می باشد:

توالی‌یابی ژن‌ها و پلاسمیدها: سنگر برای تعیین توالی ژن‌ها، پلاسمیدها و سایر قطعات کوچک DNA به‌کار می‌رود.

تشخیص جهش‌ها: این روش به‌طور گسترده‌ای برای شناسایی جهش‌های نقطه‌ای و دیگر تغییرات ژنتیکی استفاده می‌شود.

تایید کلون‌ها: پس از کلونینگ ژن‌ها، از این روش برای تایید توالی صحیح استفاده می‌شود.

ظرفیت محدود: توالی‌یابی سنگر به‌طور معمول برای قطعات DNA با طول کمتر از ۱۰۰۰ جفت باز مناسب است. برای قطعات بلندتر نیاز به تقسیم قطعه به قطعات کوچکتر و سپس توالی‌یابی هر بخش است.

هزینه: هزینه توالی‌یابی سنگر نسبت به روش‌های نسل جدید توالی‌یابی بالاتر است، به‌ویژه زمانی که نیاز به توالی‌یابی کل ژنوم باشد.

زمان‌بر: توالی‌یابی قطعات بزرگ یا تعداد زیادی از نمونه‌ها با این روش زمان زیادی می‌برد.

آشنایی با توالی‌یابی نسل جدید (NGS)

توالی‌یابی نسل جدید[1] تحولی بزرگ در زمینه ژنتیک و زیست‌شناسی مولکولی ایجاد کرده است. این فناوری به دانشمندان این امکان را می‌دهد که به‌سرعت و با هزینه کمتر، مقادیر عظیمی از داده‌های توالی DNA را تولید کنند. توالی‌یابی نسل جدید مجموعه‌ای از فناوری‌ها است که امکان توالی‌یابی سریع و موازی تعداد زیادی از مولکول‌های DNA را فراهم می‌کند. این فناوری‌ها از دهه ۲۰۰۰ به بعد توسعه یافته‌اند و شامل روش‌های مختلفی مانند Illumina

1. Next-Generation Sequencing, NGS

sequencing، 454 Pyrosequencing، Ion Torrent sequencing، SOLiD sequencing. هر کدام از این فناوری‌ها دارای مزایا و معایب خاص خود هستند، اما اصول کلی و مراحل راه‌اندازی آن‌ها تا حد زیادی مشابه است.

مراحل عملی توالی‌یابی نسل جدید

۱. آماده‌سازی نمونه[1]: آماده‌سازی نمونه شامل جمع‌آوری، استخراج و خالص‌سازی (DNA یا RNA) از نمونه‌های زیستی است. این مرحله برای هر نوع نمونه زیستی مانند باکتری‌ها، گیاهان، حیوانات و انسان می‌تواند متفاوت باشد. ابتدا باید DNA یا RNA از نمونه زیستی مورد نظر استخراج و خالص‌سازی شود. روش‌های مختلفی برای این کار وجود دارد، از جمله استفاده از کیت‌های آماده تجاری یا روش‌های دستی مانند استفاده از فنل-کلروفرم. بعد از استخراج، کیفیت و کمیت DNA یا RNA باید با استفاده از روش‌هایی مانند اسپکتروفتومتری (نسبت A260/A280) و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شود.

۲. ساخت کتابخانه[2]: ساخت کتابخانه یکی از مهم‌ترین مراحل در توالی‌یابی نسل جدید است. کتابخانه توالی‌یابی مجموعه‌ای از قطعات DNA است که برای خوانش در دستگاه NGS آماده شده‌اند.

شکستن DNA[3]: ابتدا DNA باید به قطعات کوچک‌تر (معمولاً در محدوده ۱۵۰-۸۰۰ جفت باز) شکسته شود. این کار می‌تواند با روش‌های مختلفی مانند سونیکاسیون یا استفاده از آنزیم‌های محدودکننده انجام شود.

1. Sample Preparation
2. Library Preparation
3. Fragmentation

پایان‌دهی[1]: پس از شکستن، انتهای قطعات DNA باید اصلاح شوند تا بتوانند با آداپتورها پیوند بخورند. این شامل اضافه کردن یک باز "A" به انتهای ۳' است.

اتصال آداپتور[2]: در این مرحله، آداپتورهای مخصوص به انتهای قطعات DNA پیوند می‌خورند. این آداپتورها شامل توالی‌هایی هستند که برای شناسایی و اتصال DNA به پلتفرم توالی‌یابی استفاده می‌شوند.

تقویت[3]: در برخی موارد، کتابخانه با استفاده از PCR تقویت می‌شود تا مقادیر کافی برای توالی‌یابی حاصل شود.

۳. توالی‌یابی[4]: در این مرحله، کتابخانه آماده‌شده وارد دستگاه توالی‌یابی می‌شود و فرآیند تعیین توالی DNA آغاز می‌شود.

بارگذاری در دستگاه[5]: کتابخانه به دستگاه توالی‌یابی بارگذاری می‌شود. در پلتفرم Illumina، این کار شامل اتصال قطعات DNA به سطحی از فاز جامد (مانند یک اسلاید شیشه‌ای) است که امکان تکثیر و توالی‌یابی موازی را فراهم می‌کند.

توالی‌یابی تک‌قاعده‌ای[6]: در اکثر پلتفرم‌های NGS، توالی‌یابی به‌صورت تک‌قاعده‌ای انجام می‌شود. یعنی هر بار یک باز (A, T, G, C) در طی واکنش اضافه می‌شود و سیگنال تولید شده نور یا تغییر (pH) ثبت می‌گردد.

قرائت همزمان[7]: یکی از ویژگی‌های مهم NGS، توانایی خواندن همزمان

1. End Repair
2. Adapter Ligation
3. Amplification
4. Sequencing
5. Loading onto the Sequencer
6. Single-Base Sequencing
7. Parallel Reading

هزاران یا میلیون‌ها قطعه DNA است که باعث می‌شود سرعت و توان عملیاتی به‌شدت افزایش یابد.

٤. تحلیل داده‌ها[1]: داده‌های خام به‌دست‌آمده از دستگاه توالی‌یابی باید تحلیل شوند تا توالی نهایی DNA مشخص شود.

کیفیت‌سنجی داده‌ها[2]: ابتدا باید کیفیت داده‌ها ارزیابی شود. نرم‌افزارهایی مانند FastQC به‌طور معمول برای بررسی کیفیت داده‌ها استفاده می‌شوند.

هم‌ترازی توالی‌ها[3]: توالی‌های به‌دست‌آمده با یک ژنوم مرجع یا دیگر توالی‌های شناخته‌شده هم‌تراز می‌شوند. ابزارهایی مانند Bowtie یا BWA برای این منظور به‌کار می‌روند.

تعیین توالی و مونتاژ[4]: در صورت نبود ژنوم مرجع، توالی‌ها باید به‌طور مستقل مونتاژ شوند. ابزارهایی مانند SPAdes یا Velvet برای مونتاژ استفاده می‌شوند.

تحلیل بیوانفورماتیک: نتایج نهایی سپس با استفاده از روش‌های مختلف بیوانفورماتیکی تحلیل می‌شوند تا جهش‌ها، پلی‌مورفیسم‌ها، تغییرات ساختاری یا سایر ویژگی‌های ژنتیکی شناسایی شوند.

1. Data Analysis
2. Quality Control
3. Sequence Alignment
4. Assembly

فصل پنجم

الکتروفورز و آنالیز باندهای DNA

اصول الکتروفورز ژل آگاروز و پلی‌اکریل‌آمید

الکتروفورز ژل آگارز

الکتروفورز ژل آگارز معمولاً برای جداسازی مولکول‌های DNA وRNA با وزن مولکولی بالا استفاده می‌شود. ژل آگارز از پلیمر آگارز تشکیل شده که در آب یا بافر حل می‌شود و پس از سرد شدن، به صورت یک ماتریکس متخلخل در می‌آید.

۱. تشکیل ژل: آگارز، یک پلیمر طبیعی استخراج شده از جلبک‌های قرمز است که وقتی با محلول بافر گرم می‌شود، حل می‌شود و پس از سرد شدن به شکل یک ژل جامد درمی‌آید. غلظت آگارز تعیین‌کننده اندازه منافذ ژل است؛ ژل‌های غلیظ‌تر منافذ کوچک‌تری دارند و برای مولکول‌های کوچک‌تر مناسب هستند، در حالی که ژل‌های با غلظت کمتر منافذ بزرگ‌تری دارند و برای جداسازی مولکول‌های بزرگ‌تر مناسب‌تر هستند.

۲. مکانیزم جداسازی: نمونه‌های DNA یا RNA که با رنگ (مثل اتیدیوم بروماید یا سیف استین[1]) نشان‌دار شده‌اند، در چاهک‌های ژل آگارز بارگذاری

1. Safe stain

می‌شوند. با اعمال جریان الکتریکی، مولکول‌های باردار (به‌ویژه DNA که دارای بار منفی است) به سمت قطب مثبت حرکت می‌کنند. سرعت حرکت مولکول‌ها در ژل به اندازه و شکل آن‌ها بستگی دارد؛ مولکول‌های کوچک‌تر سریع‌تر از منافذ ژل عبور می‌کنند.

۳. مزایا: ساخت و استفاده از ژل آگارز آسان است. برای جداسازی مولکول‌های DNA تا چندین هزار جفت باز مؤثر است.

٤. محدودیت‌ها: برای جداسازی مولکول‌های کوچک‌تر، آگارز نمی‌تواند به خوبی عمل کند.

۵. کاربردها: جداسازی قطعات DNA. بررسی کیفیت RNA. تعیین اندازه قطعات DNA و RNA

الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید[1]

الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید عمدتاً برای جداسازی پروتئین‌ها و مولکول‌های کوچکتر DNA یا RNA استفاده می‌شود. این تکنیک از ماتریکس پلی‌آکریل‌آمید برای جداسازی مولکول‌ها بر اساس اندازه آن‌ها استفاده می‌کند. SDS (سدیم دودسیل سولفات) یک دترجنت است که به پروتئین‌ها متصل شده و باعث دناتوراسیون آنها و ایجاد بار منفی یکنواخت روی پروتئین‌ها می‌شود.

۱. تشکیل ژل: پلی‌آکریل‌آمید از پلیمر شدن اکریل‌آمید و بیس‌اکریل‌آمید در حضور یک کاتالیزور مانند APS و TEMED تشکیل می‌شود. غلظت پلی‌آکریل‌آمید، اندازه منافذ ژل را تعیین می‌کند؛ ژل‌های با غلظت بالاتر برای مولکول‌های کوچکتر و ژل‌های با غلظت کمتر برای مولکول‌های بزرگ‌تر مناسب هستند.

---

1. SDS-PAGE

۲. مکانیزم جداسازی: با استفاده از SDS، پروتئین‌ها دناتوره شده و ساختار سه‌بعدی آنها از بین می‌رود. در نتیجه، پروتئین‌ها تنها بر اساس اندازه‌شان جدا می‌شوند. پروتئین‌های کوچکتر سریع‌تر از منافذ ژل عبور می‌کنند، در حالی که پروتئین‌های بزرگ‌تر آهسته‌تر حرکت می‌کنند.

۳. مزایا: ژل پلی‌آکریل‌آمید دقت بسیار بالایی در جداسازی پروتئین‌ها و مولکول‌های کوچک DNA دارد. بسته به نیاز، ژل‌ها با غلظت‌های مختلف می‌توانند برای جداسازی مولکول‌های مختلف به کار روند.

٤. محدودیت‌ها: ساخت و آماده‌سازی سخت‌تر نسبت به آگارز. این تکنیک برای جداسازی مولکول‌های DNA یا RNA بزرگ مناسب نیست.

۵. کاربردها: جداسازی پروتئین‌ها. تجزیه و تحلیل ترکیب پروتئین‌های سلولی. اندازه‌گیری وزن مولکولی پروتئین‌ها با استفاده از استانداردهای وزنی.

جدول ۱. تفاوت‌های کلیدی بین الکتروفورز ژل آگارز و پلی‌آکریل‌آمید

ردیف	ویژگی	ژل آگارز	ژل پلی آکریل آمید
1	ماده ژل	پلیمر طبیعی	پلیمر مصنوعی
2	اندازه منافذ	بزرگ‌تر (DNA)	کوچک‌تر (برای پروتئین‌ها)
3	کاربرد اصلی	DNAوRNA	پروتئین‌ها و مولکول‌های کوچکDNA
4	دقت جداسازی	کمتر	بیشتر
5	سادگی استفاده	ساده‌تر	پیچیده‌تر (سمی)
6	اساس جداسازی	اندازه و شکل	اندازه

تهیه و اجرای ژل‌های الکتروفورز برای DNA و RNA

تهیه و اجرای ژل الکتروفورز شامل چندین مرحله است که به طور کلی به آماده‌سازی ژل، بارگذاری نمونه‌ها و اعمال جریان الکتریکی تقسیم می‌شود. بسته به نوع ژل (آگارز یا پلی‌آکریل‌آمید)، مراحل ممکن است کمی متفاوت باشد. در اینجا، نحوه تهیه و اجرای ژل الکتروفورز برای هر دو نوع ژل توضیح داده می‌شود.

الف) الکتروفورز ژل آگارز (برای DNA و RNA)

مواد و تجهیزات مورد نیاز برای الکتروفورز ژل آگارز به ترتیب شامل: پودر آگارز، بافر (TAE یا TBE) برای DNA یا بافر مناسب برای RNA، رنگ‌های نشانگر (مانند اتیدیوم بروماید یا SYBR Safe)، نمونه‌های DNA یا RNA، چاهک‌ساز (کمب[1])، دستگاه الکتروفورز (تانک و منبع تغذیه)، محلول بارگذاری[2]، نردبان اندازه[3] است.

مراحل تهیه و اجرای ژل آگارز نیز به ترتیب موارد زیر را شامل می شود:

۱. آماده‌سازی ژل:

وزن کردن آگارز: برای تهیه ژل آگارز، غلظت‌های مختلفی (معمولاً ۰/۷٪ تا ۲٪) استفاده می‌شود. برای تهیه یک ژل ۱٪، ۱ گرم آگارز را در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر TAE یا TBE بریزید.

ذوب کردن آگارز: مخلوط آگارز و بافر را درون یک مایکروویو یا حمام آب گرم حرارت دهید تا آگارز کاملاً حل شود و محلول شفاف شود. دقت کنید که محلول به جوش نیاید.

خنک کردن: محلول داغ را تا دمای حدود ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد خنک

1. Comb
2. Loading dye
3. DNA ladder

کنید (گرم اما نه خیلی داغ).

اضافه کردن رنگ (اختیاری): برای مشاهده DNA بعد از الکتروفورز، اتیدیوم بروماید یا SYBR Safe را به محلول اضافه کنید. توجه کنید که اتیدیوم بروماید سمی است و باید با دقت استفاده شود.

ریختن ژل: محلول آگارز را به قالب ژل ریخته و چاهک‌ساز (کمب) را در آن قرار دهید. سپس اجازه دهید ژل در دمای اتاق جامد شود (حدود ۴۰-۳۰ دقیقه).

۲. آماده‌سازی نمونه‌ها: به نمونه‌های DNA یا RNA مقدار مناسبی از محلول بارگذاری[1] اضافه کنید تا سنگین شده و بتواند به چاهک‌ها نفوذ کند. محلول بارگذاری همچنین به نمایش حرکت نمونه‌ها در طول ژل کمک می‌کند.

۳. بارگذاری نمونه ها: پس از سخت شدن ژل، کمب را به آرامی بردارید تا چاهک‌ها مشخص شوند. ژل را درون تانک الکتروفورز قرار دهید و بافر TAE یا TBE را تا جایی که ژل را بپوشاند، به تانک اضافه کنید. نمونه‌ها و نردبان اندازه[2] را به دقت به چاهک‌ها منتقل کنید. Ladder معمولا در چاهک اول یا آخر بارگذاری می‌شود.

٤. اجرای الکتروفورز: تانک را به منبع تغذیه متصل کرده و ولتاژ مناسب (معمولاً بین ۸۰ تا ۱۲۰ ولت) را اعمال کنید. DNA که دارای بار منفی است به سمت قطب مثبت حرکت می‌کند. اجازه دهید الکتروفورز تا زمانی که رنگ به سمت پایین ژل حرکت کند، ادامه یابد (معمولاً ٤٥ دقیقه تا ۱ ساعت).

۵. مشاهده نتایج: پس از پایان الکتروفورز، ژل را از تانک خارج کرده و با دستگاه UV ترانس‌ایلومیناتور یا سایر دستگاه‌های تصویربرداری فلورسانس بررسی کنید. DNA در حضور اتیدیوم بروماید یا رنگ‌های مشابه به صورت

1. Loading dye
2. DNA ladder

باندهای فلورسانس دیده می‌شود.

ب) الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید (SDS-PAGE) برای پروتئین‌ها

مواد و تجهیزات مورد نیاز برای الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید به ترتیب شامل: اکریل‌آمید و بیس‌اکریل‌آمید، محلول‌های بافر (Tris-HCl)، سدیم دودسیل سولفات SDS، آمونیوم پرسولفات (APS) و کاتالیزور TEMED، نمونه‌های پروتئینی، محلول بارگذاری برای SDS-PAGE، دستگاه الکتروفورز (تانک و منبع تغذیه)، نردبان اندازه پروتئین[1]، رنگ‌آمیزی ژل (مانند کوماسی بریلیانت بلو) است.

مراحل تهیه و اجرای ژل پلی‌آکریل‌آمید نیز به ترتیب موارد زیر را شامل می‌شود:

۱. آماده‌سازی ژل:

تهیه محلول ژل جداسازی: ابتدا ژل جداسازی[2] را با استفاده از اکریل‌آمید، بیس‌اکریل‌آمید، بافر Tris-HCl، SDS و آب دیونیزه آماده کنید. سپس APS و TEMED را اضافه کرده و محلول را سریعاً به قالب ژل منتقل کنید و تا قبل از پلیمره شدن بریزید.

اضافه کردن لایه ایزوبوتانول: به آرامی ایزوبوتانول یا آب به سطح ژل اضافه کنید تا از تشکیل حباب جلوگیری شود. این لایه پس از پلیمره شدن ژل حذف خواهد شد.

آماده‌سازی ژل جمع‌کننده[3]: پس از پلیمره شدن ژل جداسازی، لایه ایزوبوتانول را بردارید و ژل جمع‌کننده (با درصد کمتر اکریل‌آمید) را بریزید.

1. Protein ladder
2. Resolving gel
3. Stacking gel

چاهک‌ساز را وارد کنید و اجازه دهید ژل جمع‌کننده نیز پلیمره شود.

۲. آماده‌سازی نمونه‌ها: نمونه‌های پروتئینی را با محلول بارگذاری SDS مخلوط کرده و سپس حرارت دهید (معمولاً ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه) تا پروتئین‌ها دناتوره شوند.

۳. بارگذاری نمونه‌ها: پس از پلیمره شدن ژل جمع‌کننده، کمب را بردارید و ژل را در تانک الکتروفورز قرار دهید. بافر مناسب (Tris-Glycine-SDS) را اضافه کنید. نمونه‌ها و نردبان پروتئین را داخل چاهک‌ها بارگذاری کنید.

٤. اجرای الکتروفورز: دستگاه را به منبع تغذیه متصل کرده و جریان الکتریکی (معمولاً ۱۰۰ تا ۲۰۰ ولت) اعمال کنید. SDS بار منفی یکنواختی به پروتئین‌ها می‌دهد و پروتئین‌ها بر اساس اندازه‌شان از ژل عبور می‌کنند. پروتئین‌های کوچکتر سریع‌تر از منافذ ژل عبور می‌کنند و پروتئین‌های بزرگ‌تر آهسته‌تر حرکت می‌کنند.

۵. رنگ‌آمیزی ژل: پس از پایان الکتروفورز، ژل را خارج کرده و با محلول کوماسی بریلیانت بلو رنگ‌آمیزی کنید. سپس ژل را شسته تا پروتئین‌ها به صورت باندهای رنگی مشخص شوند.

رنگ‌آمیزی، تصویربرداری و تحلیل باندهای ژلی

رنگ‌آمیزی ژل‌ها، تصویربرداری و تحلیل باندهای ژلی مراحل اساسی در بسیاری از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی است. انتخاب رنگ مناسب، دقت در تصویربرداری و استفاده از نرم‌افزارهای تحلیل تصویر می‌تواند به دقت نتایج و تفسیر درست داده‌ها کمک شایانی کند.

رنگ‌آمیزی ژل برای ژل آگارز DNA و RNA: برای رنگ‌آمیزی DNA و RNA در ژل آگارز، از رنگ‌های فلورسانس استفاده می‌شود که به اسید

نوکلئیک متصل شده و در حضور نور فرابنفش یا نور آبی قابل مشاهده هستند.

الف. اتیدیوم بروماید[1]: اتیدیوم بروماید یکی از رایج‌ترین رنگ‌های فلورسانس است که به DNA متصل می‌شود و در معرض نور UV به رنگ نارنجی-قرمز درمی‌آید. روش رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید به شرح زیر است:

۱. افزودن به ژل: می‌توان اتیدیوم بروماید را به محلول ژل آگارز قبل از پلیمریزه شدن اضافه کرد (حدود ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر). این روش ساده است و بلافاصله پس از الکتروفورز می‌توان ژل را مشاهده کرد.

۲. غوطه‌وری پس از الکتروفورز: ژل پس از الکتروفورز را در محلول اتیدیوم بروماید (غلظت حدود ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه غوطه‌ور کنید. سپس ژل را با آب یا بافر TAE/TBE شستشو دهید تا رنگ اضافی حذف شود.

۳. نکات ایمنی: اتیدیوم بروماید یک ماده جهش‌زا است، بنابراین هنگام کار با آن باید از دستکش و عینک محافظ استفاده کنید.

ب. SYBR Safe: SYBR Safe یک رنگ جایگزین کم‌خطرتر نسبت به اتیدیوم بروماید است که در حضور نور آبی قابل مشاهده است و ایمنی بیشتری دارد. مشابه اتیدیوم بروماید، می‌توان SYBR Safe را به محلول ژل اضافه کرد یا ژل را پس از الکتروفورز در محلول SYBR Safe غوطه‌ور نمود (غلظت‌های معمول 1:10000است).

رنگ‌آمیزی ژل برای ژل پلی‌آکریل‌آمید (پروتئین‌ها): در SDS-PAGE، رنگ‌های متداولی برای رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها استفاده می‌شود.

1. Ethidium Bromide

رایج‌ترین آن‌ها کوماسی بریلیانت بلو و سیلور استینینگ (نقره‌ای) است.

الف. رنگ‌آمیزی با کوماسی بریلیانت بلو[1]: این روش رایج‌ترین تکنیک برای رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها در ژل پلی‌آکریل‌آمید است که پروتئین‌ها را به رنگ آبی نشان می‌دهد. روش رنگ‌آمیزی با کوماسی به شرح زیر است:

۱. تهیه محلول رنگ‌آمیزی: محلول کوماسی شامل کوماسی بریلیانت بلو R-250، متانول، اسید استیک و آب است.

۲. غوطه‌وری ژل: ژل پس از الکتروفورز را در محلول رنگ‌آمیزی غوطه‌ور کنید و به مدت 1 ساعت تا یک شب در دمای اتاق تکان دهید تا پروتئین‌ها رنگ بگیرند.

۳. شستشو: ژل را با محلول‌های شفاف‌کننده (متانول و اسید استیک) بشویید تا رنگ اضافی حذف شده و فقط باندهای پروتئین رنگی باقی بمانند.

ب. رنگ‌آمیزی نقره‌ای[2]: رنگ‌آمیزی نقره‌ای یکی از حساس‌ترین روش‌ها برای تشخیص پروتئین‌ها در ژل است و پروتئین‌ها را به رنگ قهوه‌ای یا مشکی نشان می‌دهد. روش رنگ‌آمیزی نقره‌ای به شرح زیر است:

۱. ژل را در محلول‌های ثبوت[3] (معمولاً اتانول و اسید استیک) به مدت 20 تا 30 دقیقه غوطه‌ور کنید.

۲. ژل را در محلول حاوی یون‌های نقره (معمولاً نقره نیترات) غوطه‌ور کرده و به آرامی تکان دهید.

---

1. Coomassie Brilliant Blue
2. Silver Staining
3. Fixing solution

۳. ژل را در محلول‌های ظهور[1] که شامل فرمالدهید است، قرار دهید تا باندهای پروتئین به صورت واضح نمایان شوند.

تصویربرداری از ژل‌های آگارز: پس از رنگ‌آمیزی، ژل‌های حاوی DNA یا RNA معمولاً با دستگاه UV ترانس‌ایلومیناتور یا نور آبی تصویربرداری می‌شوند. مراحل تصویربرداری از این ژل به ترتیب شامل موارد زیر است:

۱. استفاده از UV ترانس‌ایلومیناتور: ژل حاوی اتیدیوم بروماید یا SYBR Safe را درون دستگاه قرار دهید.

۲. گرفتن تصویر: از طریق دوربین دیجیتال مخصوص، تصویری از باندهای DNA یا RNA ثبت کنید. معمولاً دستگاه‌ها دارای نرم‌افزارهایی هستند که می‌توانند تصویر را در فرمت‌های مختلف ذخیره کنند (مانند TIFF یا JPGE)

تصویربرداری از ژل‌های پروتئینی (پلی‌آکریل‌آمید): پروتئین‌های رنگ‌شده با کوماسی بریلیانت بلو یا نقره‌ای را می‌توان با اسکنرهای ژلی یا دوربین دیجیتال ثبت کرد. مراحل تصویربرداری از این گونه ژل ها شامل موارد زیر است:

۱. ژل رنگ‌شده را روی اسکنر قرار دهید.

۲. تنظیمات نور و کنتراست را تنظیم کنید تا باندها به وضوح قابل مشاهده شوند.

۳. تصویر را با وضوح بالا ذخیره کنید.

1. Developing solution

تحلیل باندهای ژلی شامل تفسیر الگوی باندها برای شناسایی اندازه مولکول‌ها و یا غلظت آنها است.

تحلیل باندهای DNA و RNA: برای تعیین اندازه قطعات DNA یا RNA، از یک نردبان اندازه استفاده می‌شود که شامل باندهایی با اندازه‌های مشخص است. باندهای نمونه را با باندهای نردبان مقایسه کرده و اندازه قطعات را تخمین بزنید. برای دقت بیشتر، می‌توان از نرم‌افزارهای تحلیل تصویر مانند ImageJ یا GelAnalyzer استفاده کرد .این نرم‌افزارها می‌توانند شدت باندها و اندازه آن‌ها را با مقایسه با نردبان‌های مرجع تعیین کنند.

تحلیل باندهای پروتئینی: مشابه با DNA، برای تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها از یک نردبان پروتئینی استفاده می‌شود. باندهای پروتئینی را با باندهای نردبان مقایسه کرده و وزن مولکولی آن‌ها را تخمین بزنید. در روش‌هایی مانند Western Blot، می‌توان از نرم‌افزارهای تحلیل تصویر برای سنجش غلظت پروتئین‌ها بر اساس شدت باندها استفاده کرد.

نکات مهم در تحلیل:

تفسیر باندها: باندهای نزدیک به هم نشان‌دهنده مولکول‌هایی با اندازه‌های مشابه هستند. هر چه باندها واضح‌تر و تیزتر باشند، جداسازی بهتر بوده است.

شدت باند: شدت باندها می‌تواند نشان‌دهنده مقدار DNA، RNA یا پروتئین در هر نمونه باشد. باندهای تیره‌تر به معنای غلظت بیشتر هستند.

فصل ششم

هیبریداسیون نوکلئیک اسید

اصول و روش‌های عملی هیبریداسیون

هیبریداسیون[1] به فرآیندی گفته می‌شود که طی آن دو رشته مکمل از اسید نوکلئیک (DNA یا RNA) به یکدیگر متصل می‌شوند تا یک مولکول دو رشته‌ای تشکیل دهند. این روش برای شناسایی توالی‌های خاص اسید نوکلئیک در نمونه‌های پیچیده، استفاده می‌شود. هیبریداسیون می‌تواند در شرایط in vitro (مانند بلات‌های نیتروسلولزی) یا in situ (مانند هیبریداسیون درون سلول‌ها) انجام شود. در اینجا به اصول علمی و روش‌های مختلف هیبریداسیون می‌پردازیم.

الف. اصول هیبریداسیون اسید نوکلئیک: اسیدهای نوکلئیک (DNA و RNA) از رشته‌هایی از نوکلئوتیدها تشکیل شده‌اند که به وسیله پیوندهای هیدروژنی به هم متصل می‌شوند. در فرآیند هیبریداسیون، دو رشته مکمل اسید نوکلئیک (که توالی بازهای آن‌ها مکمل هم هستند) به هم متصل می‌شوند. برای اتصال این دو رشته به هم، شرایط محیطی مانند دما و غلظت نمک باید کنترل شوند.

---

1. Hybridization

در حضور دما و غلظت نمک مناسب، رشته‌های مکمل نوکلئیک اسید به طور انتخابی به یکدیگر متصل می‌شوند و یک مولکول دو رشته‌ای تشکیل می‌دهند.

ب. ویژگی‌های مهم هیبریداسیون

اختصاصیت توالی: هیبریداسیون بستگی به این دارد که دو رشته مکمل به طور کامل یا تقریباً کامل باشند. توالی‌های ناقص ممکن است نتوانند به درستی هیبرید شوند.

دمای هیبریداسیون (Tm): دمای ذوب یا هیبریداسیون، دمایی است که در آن نیمی از رشته‌های نوکلئیک اسید دو رشته‌ای به حالت تک‌رشته‌ای تبدیل می‌شوند. این دما به طول توالی، نسبت GC و شرایط محیطی وابسته است.

توالی پروب و تارگت: برای هیبریداسیون موفق، یک پروب (توالی نوکلئوتیدی کوتاه و مشخص) برای شناسایی توالی مورد نظر (تارگت یا توالی هدف) استفاده می‌شود.

ج. کاربردهای اصلی هیبریداسیون

تشخیص و شناسایی توالی‌های DNA و RNA: از هیبریداسیون برای شناسایی توالی‌های خاص در نمونه‌های ژنتیکی استفاده می‌شود.

نشان‌گذاری ژن‌ها و توالی‌ها: در بررسی‌های ژنتیکی برای شناسایی ژن‌های خاص از پروب‌های اختصاصی استفاده می‌شود.

هیبریداسیون درون سلولی (in situ) این تکنیک برای شناسایی موقعیت ژن‌ها یا RNA های خاص در سلول‌ها یا بافت‌ها استفاده می‌شود.

در زیر روش‌های هیبریداسیون ارائه شده است:

الف. روش هیبریداسیون در بلات‌های نیتروسلولزی (Blotting): این

روش‌ها برای تشخیص توالی‌های نوکلئوتیدی خاص در نمونه‌های DNA یا RNA استفاده می‌شوند. پروب‌های نشان‌دار با توالی‌های مکمل در نمونه هیبرید می‌شوند.

۱. ساترن بلات[1]: این روش برای تشخیص توالی‌های خاص DNA استفاده می‌شود. مراحل اصلی آن به شرح زیر است:

هضم DNA با آنزیم‌های محدودکننده: DNA ژنومی با استفاده از آنزیم‌های برش‌دهنده (ریسترکشن اندونوکلئازها) به قطعات کوچکتر تقسیم می‌شود.

الکتروفورز: قطعات DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز جدا می‌شوند.

منتقل کردن به غشاء: DNA جداشده به یک غشاء نیتروسلولزی یا PVDFمنتقل می‌شود.

هیبریداسیون با پروب: یک پروب DNA یا RNA (که نشان‌دار شده است) با توالی هدف در غشاء هیبرید می‌شود.

شناسایی باندها: باندهای هیبرید شده با استفاده از روش‌های رادیواکتیو یا فلورسانس قابل مشاهده می‌شوند.

۲. نوترون بلات[2]: این روش برای شناسایی RNA به کار می‌رود. تفاوت اصلی آن با Southern Blot در این است که به جای DNA، RNA استخراج شده از نمونه‌ها جدا و مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۳. وسترن بلات[3]: این روش برای شناسایی پروتئین‌ها استفاده می‌شود و از آنتی‌بادی‌ها به عنوان پروب استفاده می‌کند.

---

1. Southern Blot
2. Northern Blot
3. Western Blot

ب. روش هیبریداسیون in situ: در این روش، پروب‌های نوکلئوتیدی برای شناسایی توالی‌های DNA یا RNA درون سلول‌ها یا بافت‌های ثابت استفاده می‌شود. این روش برای بررسی بیان ژن‌ها در محل و موقعیت مکانی آن‌ها در سلول‌ها کاربرد دارد.

۱. هیبریداسیون فلورسنت درجا[1] (FISH): اساس این تکنیک، هیبریداسیون درون سلولی با استفاده از پروب‌های فلورسانس است. کاربردهای FISH عبارتند از:

شناسایی کروموزوم‌ها: برای شناسایی جایگاه ژن‌ها در کروموزوم‌ها، از پروب‌های فلورسانس استفاده می‌شود که به مناطق خاصی از کروموزوم هیبرید می‌شوند.

تشخیص اختلالات ژنتیکی FISH: می‌تواند برای تشخیص تغییرات ساختاری در کروموزوم‌ها مانند حذف یا جابه‌جایی‌ها استفاده شود.

۲. هیبریداسیون درجا کروموژنیک (CISH)[2]: در این روش به جای پروب‌های فلورسانس از پروب‌هایی استفاده می‌شود که با آنزیم‌های کروموژنیک نشان‌دار شده‌اند و رنگ قابل مشاهده تولید می‌کنند. این روش در تشخیص‌های بالینی برای بررسی بیان ژن‌ها در نمونه‌های بافتی (نظیر تشخیص تکثیر ژن HER2 در سلول‌های سرطان سینه) به کار می‌رود.

ج. روش هیبریداسیون ریزآرایه‌ای[3]: ریزآرایه‌ها شامل تعداد زیادی پروب DNAیا RNA است که به ترتیب‌های خاصی روی یک سطح کوچک قرار گرفته‌اند. این پروب‌ها برای شناسایی هزاران توالی ژنی در یک نمونه استفاده

1. Fluorescence In Situ Hybridization
2. Chromogenic In Situ Hybridization
3. Microarray Hybridization

می‌شوند. مراحل هیبریداسیون ریزآرایه‌ای به شرح زیر است:

آماده‌سازی نمونه: DNA یا RNA از نمونه استخراج می‌شود و سپس با استفاده از رنگ‌های فلورسانس نشان‌دار می‌شود.

هیبریداسیون: نمونه نشان‌دار شده به ریزآرایه متصل می‌شود و به پروب‌های مکمل خود هیبرید می‌شود.

اسکن و تحلیل: سطح ریزآرایه با استفاده از دستگاه‌های اسکنر مخصوص اسکن می‌شود تا سیگنال‌های فلورسانس شناسایی و داده‌ها تحلیل شوند. از این داده‌ها برای شناسایی ژن‌های بیان‌شده یا جهش‌یافته استفاده می‌شود.

برای هیبریداسیون موفق، پروب‌ها باید به گونه‌ای نشان‌دار شوند که بتوان آن‌ها را پس از هیبریداسیون تشخیص داد. در ادامه به بررسی برخی از این روش‌های پرداخته شده است:

الف. نشان‌دار کردن رادیواکتیو: در این روش، پروب‌ها با استفاده از ایزوتوپ‌های رادیواکتیو (مانند فسفر-۳۲) نشان‌دار می‌شوند. این روش بسیار حساس است اما به دلیل خطرات سلامتی و مسائل ایمنی، امروزه کمتر استفاده می‌شود.

ب. نشان‌دار کردن فلورسانس: پروب‌های نوکلئوتیدی با رنگ‌های فلورسانس نشان‌دار می‌شوند که در حضور نور UV یا نور آبی تابش می‌کنند. این روش نسبت به روش رادیواکتیو ایمن‌تر است و معمولاً از این روش در FISH و ریزآرایه‌ها استفاده می‌شود.

ج. نشان‌دار کردن با آنزیم‌ها: در برخی موارد، پروب‌ها با آنزیم‌هایی مانند آلکالین فسفاتاز یا پراکسیداز نشان‌دار می‌شوند. پس از هیبریداسیون، این آنزیم‌ها در حضور سوبسترا، یک واکنش رنگی ایجاد می‌کنند که قابل مشاهده است.

کاربردهای هیبریداسیون در تشخیص مولکولی

هیبریداسیون اسیدهای نوکلئیک یکی از تکنیک‌های پایه‌ای در زیست‌شناسی مولکولی است که به طور گسترده‌ای در تشخیص بیماری‌ها و مطالعات ژنتیکی به کار گرفته می‌شود. این روش، به دلیل دقت و اختصاصیت بالا، در شناسایی توالی‌های خاص DNA یا RNA و تحلیل بیان ژن‌ها نقش حیاتی دارد. در ادامه، به کاربردهای این روش در تشخیص‌های مولکولی پرداخته می‌شود:

۱. تشخیص عفونت‌های ویروسی: یکی از کاربردهای مهم هیبریداسیون در تشخیص بیماری‌های ویروسی است. در این روش، از پروب‌های نوکلئیک اسیدی برای شناسایی توالی‌های اختصاصی RNA یا DNA ویروسی در نمونه‌های بیمار استفاده می‌شود. به عنوان مثال، از هیبریداسیون برای تشخیص ویروس‌های زیر استفاده می‌شود:

ویروس HIV: شناسایی ژنوم ویروس HIV در نمونه‌های خونی به منظور تشخیص و پایش بار ویروسی.

ویروس هپاتیت B و C: از روش‌های هیبریداسیون برای تشخیص DNA یا RNA این ویروس‌ها در خون بیماران استفاده می‌شود.

در این روش، پس از استخراج RNA یا DNA ویروس از نمونه‌های بالینی، پروب‌های نشاندار شده به توالی ویروسی مکمل خود متصل می‌شوند و از طریق سیگنال‌های فلورسانت یا رادیواکتیو قابل شناسایی هستند.

۲. تشخیص سرطان‌ها: تکنیک‌های هیبریداسیون به ویژه هیبریداسیون درجا[1] یا (ISH) برای شناسایی و تحلیل بیان ژن‌های مرتبط با سرطان کاربرد دارد. به عنوان مثال:

1. in situ hybridization

تشخیص سرطان پستان: در مواردی که سرطان پستان مشکوک به افزایش بیان ژن HER2 است، از روش هیبریداسیون فلورسانس (FISH) استفاده می‌شود. این تکنیک به شناسایی تعداد کپی ژن HER2 در سلول‌های توموری کمک می‌کند و می‌تواند به درمان‌های هدفمند هدایت کند.

سرطان خون (لوسمی): تغییرات کروموزومی خاص در بیماران مبتلا به لوسمی می‌تواند با استفاده از روش FISH شناسایی شود.

این تکنیک‌ها بر اساس تغییرات ژنتیکی یا کروموزومی که معمولاً در سلول‌های سرطانی رخ می‌دهد، عمل می‌کنند.

۳. تشخیص بیماری‌های ژنتیکی: بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی ناشی از جهش‌ها یا تغییرات کروموزومی هستند که می‌توان با استفاده از تکنیک‌های هیبریداسیون شناسایی کرد. به عنوان مثال:

بیماری فیبروز سیستیک[1]: هیبریداسیون برای شناسایی جهش‌های ژنتیکی در ژن CFTR به کار می‌رود.

سندرم داون[2]: با استفاده از تکنیک FISH، می‌توان سه‌تایی شدن کروموزوم ۲۱ را در جنین تشخیص داد.

این تکنیک به‌ویژه در غربالگری‌های قبل از تولد استفاده می‌شود. این روش‌ها به دلیل دقت بالا و امکان تشخیص جهش‌های کوچک یا تغییرات ساختاری کروموزومی، اهمیت زیادی در تشخیص بیماری‌های ژنتیکی دارند.

1. Cystic Fibrosis
2. Down Syndrome

٤. تحلیل بیان ژن‌ها: هیبریداسیون نورترن بلات[1] به طور گسترده‌ای برای تحلیل بیان ژن‌ها در نمونه‌های RNA استفاده می‌شود. این روش به بررسی سطح بیان ژن‌های خاص در شرایط مختلف کمک می‌کند. به عنوان مثال:

تحلیل بیان ژن‌ها در بیماری‌های قلبی: با استفاده از هیبریداسیون نورترن، می‌توان الگوی بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌های قلبی را در بافت‌های مختلف تحلیل کرد.

بررسی تغییرات بیان ژن در تومورها: این روش به شناسایی ژن‌های با بیان افزایش‌یافته یا کاهش‌یافته در سلول‌های توموری کمک می‌کند و می‌تواند به تعیین نوع درمان کمک کند.

٥. تشخیص اختلالات کروموزومی: روش FISH همچنین برای شناسایی تغییرات ساختاری کروموزوم‌ها، مانند جابه‌جایی‌ها، حذف‌ها و افزوده‌ها، استفاده می‌شود. این تکنیک به‌ویژه در تشخیص اختلالات کروموزومی زیر مؤثر است:

سندرم‌های اختلالات کروموزومی: مانند سندرم کلاین‌فلتر، سندرم ترنر و تریزومی‌های مختلف.

تشخیص نقص‌های کروموزومی: در افراد مبتلا به ناباروری، مشکلات کروموزومی ممکن است با استفاده از FISH شناسایی شود.

---

1. Northern Blot

فصل هفتم

بررسی و تحلیل جهش‌ها

انواع جهش‌ها و روش‌های شناسایی و تحلیل آنها

جهش‌های ژنتیکی تغییرات دائمی در توالی DNA یک موجود زنده هستند که می‌توانند بر یک یا چند ژن یا بخش‌های بزرگ‌تری از ژنوم تأثیر بگذارند. این تغییرات ممکن است به دلایل مختلفی از جمله اشتباهات در فرآیند تکثیر DNA، عوامل محیطی (مانند تابش اشعه UV یا مواد شیمیایی) یا عوامل داخلی رخ دهند. جهش‌ها به دو دسته کلی تقسیم می‌شوند: جهش‌های نقطه‌ای و جهش‌های ساختاری.

۱. جهش‌های نقطه‌ای[1]: جهش‌های نقطه‌ای تغییرات کوچکی در یک یا چند نوکلئوتید از DNA هستند که معمولاً فقط یک باز (نوکلئوتید) را تحت تأثیر قرار می‌دهند. انواع اصلی جهش‌های نقطه‌ای شامل موارد زیر هستند:

جهش خاموش[2]: در این جهش، تغییر در یک نوکلئوتید باعث تغییر کدون در RNA پیام‌رسان (mRNA) می‌شود، اما آمینواسید ترجمه شده تغییری نمی‌کند. این به دلیل پدیده تنوع کدهای ژنتیکی است که ممکن است چندین کدون یک آمینواسید مشابه را کد کنند. معمولاً بدون اثر قابل مشاهده است.

1. Point Mutations
2. Silent Mutation

جهش جابجایی معنادار[1]: در این جهش، تغییر نوکلئوتید منجر به تغییر آمینواسید در پروتئین می‌شود. این نوع جهش ممکن است عملکرد پروتئین را تغییر دهد و به ایجاد بیماری‌ها منجر شود.

جهش بی‌معنی[2]: در این نوع جهش، یک کدون معمولی به کدون پایان (Stop Codon) تبدیل می‌شود. در نتیجه، زنجیره ترجمه پروتئین زودتر از موعد پایان می‌یابد. معمولاً باعث ناتمام ماندن یا غیرفعال شدن پروتئین می‌شود.

جهش تغییر قاب[3]: در این نوع جهش، یک یا چند باز از DNA اضافه یا حذف می‌شوند و به این ترتیب "قاب" ترجمه ژنتیکی جابجا می‌شود. به دلیل تغییر در کدون‌ها، توالی آمینواسیدی پروتئین کاملاً تغییر می‌کند. معمولاً منجر به تولید یک پروتئین غیرعملکردی می‌شود.

۲. جهش‌های ساختاری[4]: این جهش‌ها بخش‌های بزرگتری از ژنوم را تحت تأثیر قرار می‌دهند و ممکن است شامل تغییر در ساختار کروموزوم یا تعداد آن‌ها باشد. انواع مختلفی از جهش‌های ساختاری وجود دارد:

حذف[5]: در این نوع جهش، یک بخش از DNA یا یک کروموزوم حذف می‌شود. این حذف می‌تواند یک یا چندین نوکلئوتید، یک ژن یا حتی بخشی بزرگ‌تر از یک کروموزوم را شامل شود. حذف ژنتیکی ممکن است باعث از دست رفتن یک یا چند پروتئین حیاتی شود.

---

1. Missense Mutation
2. Nonsense Mutation
3. Frameshift Mutation
4. Structural Mutations
5. Deletion

تکرار[1]: در این نوع جهش، یک بخش از DNA یا کروموزوم تکثیر می‌شود و نسخه اضافه‌ای از آن در ژنوم قرار می‌گیرد. تکرار ممکن است منجر به تولید پروتئین‌های اضافه و ناهماهنگی‌های سلولی شود.

وارونگی[2]: در این نوع جهش، یک بخش از DNA معکوس شده و در جهت مخالف در ژنوم قرار می‌گیرد. به عبارت دیگر، توالی نوکلئوتیدی آن بخش برعکس می‌شود. معمولاً باعث اختلال در عملکرد ژن‌هایی می‌شود که در نزدیکی نقطه وارونگی قرار دارند.

جابجایی[3]: در این نوع جهش، بخشی از یک کروموزوم به یک کروموزوم دیگر منتقل می‌شود. این جابجایی می‌تواند بین کروموزوم‌های غیرهمولوگ اتفاق بیفتد. جابجایی ممکن است منجر به تغییرات در تنظیم ژن‌ها یا از دست رفتن عملکرد ژنی شود.

تغییر تعداد نسخه[4]: در این نوع جهش، تعداد کپی‌های یک بخش از DNA بین افراد یا در سلول‌های یک فرد تغییر می‌کند. این تغییر می‌تواند شامل حذف یا تکرار بخش‌های بزرگ DNA باشد. ممکن است بر روی میزان بیان ژن‌ها تأثیر بگذارند و با بیماری‌هایی مانند سرطان در ارتباط باشند.

جهش‌های اینتراکروموزومال: جهش‌های ساختاری که درون یک کروموزوم اتفاق می‌افتند، مانند حذف‌های بزرگ یا وارونگی‌ها.

جهش‌های بین‌کروموزومی: جهش‌هایی که بین کروموزوم‌های مختلف رخ می‌دهند، مانند جابجایی‌ها یا ترکیب کروموزوم‌ها.

۳. جهش‌های کروموزومی[5]: این جهش‌ها مربوط به تغییرات در تعداد یا

---

1. Duplication
2. Inversion
3. Translocation
4. Copy Number Variation - CNV
5. Chromosomal Mutations

ساختار کروموزوم‌ها هستند و می‌توانند منجر به بیماری ژنتیکی جدی شوند:

آنئوپلوئیدی[1]: تغییر در تعداد کروموزوم‌ها که معمولاً شامل اضافه یا حذف کروموزوم است. به عنوان مثال، در سندروم داون، یک نسخه اضافی از کروموزوم ۲۱وجود دارد. اغلب با مشکلات رشدی و بیماری‌های جدی همراه است.

پلی‌پلوئیدی[2]: این حالت شامل داشتن بیش از دو مجموعه کروموزوم کامل است. معمولاً در جانوران کشنده است، اما در گیاهان گاهی مفید است.

روش‌های شناسایی جهش‌ها: روش‌های مختلف شناسایی جهش‌های نقطه‌ای و ساختاری به دو دسته اصلی تجربی و بیوانفورماتیکی تقسیم می‌شوند که در ادامه معرفی می‌شوند:

۱. روش‌های شناسایی جهش‌های نقطه‌ای (SNPs):

توالی‌یابی نسل جدید[3]: این تکنیک توالی ژنوم یا بخش‌های خاص آن را با دقت بالا می‌خواند. پس از توالی‌یابی، داده‌ها با ژنوم مرجع مقایسه می‌شوند تا تغییرات در سطح نوکلئوتیدی مشخص شوند.

کاربرد: برای شناسایی تغییرات تک‌نوکلئوتیدی در سطح ژنوم استفاده می‌شود.

ابزارها: نرم‌افزارهای GATK و SAMtools برای تحلیل داده‌های NGS و شناسایی SNPها استفاده می‌شوند.

Sanger Sequencing: یک تکنیک کلاسیک برای توالی‌یابی DNA که در آن DNA تکثیر شده و با استفاده از آنزیم‌ها و رنگ‌های فلورسانت توالی‌یابی

1. Aneuploidy
2. Polyploidy
3. Next-Generation Sequencing - NGS

می‌شود.

کاربرد: بیشتر برای تایید جهش‌های شناسایی شده از روش‌های دیگر استفاده می‌شود.

SNP Microarray: چیپ‌های DNA حاوی پروب‌های خاص برای شناسایی SNP های شناخته‌شده هستند. DNA نمونه به پروب‌ها متصل شده و تغییرات SNP مشخص می‌شود.

کاربرد: برای تحلیل تعداد زیادی SNP در سطح ژنوم و مطالعات ارتباطی ژنومی (GWAS) کاربرد دارد.

Allele-Specific PCR: طراحی پرایمرهای اختصاصی برای جهش‌های خاص. اگر پرایمر با جهش مطابقت داشته باشد، PCR محصول تولید می‌کند.

کاربرد: برای شناسایی SNP های خاص در ژن‌های مرتبط با بیماری‌ها استفاده می‌شود.

۲. روش‌های شناسایی جهش‌های ساختاری SVs :

Array Comparative Genomic Hybridization (Array CGH):

در این روش، DNA نمونه و DNA مرجع به یک چیپ هیبرید می‌شوند تا تغییرات تعداد نسخه ژنی شناسایی شود.

کاربرد: برای تشخیص تغییرات بزرگ‌تر در ژنوم مانند حذف‌ها و تکرارها (CNVs).

Paired-End Mapping (PEM): در این روش، انتهای قطعات DNA توالی‌یابی می‌شود و با ژنوم مرجع مقایسه می‌شود. فاصله بین انتهاها می‌تواند نشان‌دهنده وجود جهش ساختاری باشد.

کاربرد: شناسایی جابجایی‌ها و وارونگی‌های کروموزومی.

توالی‌یابی ژنوم کامل[1]: این روش توالی‌یابی کل ژنوم را پوشش می‌دهد و از این طریق تمام انواع تغییرات ژنتیکی از جمله جهش‌های ساختاری و نقطه‌ای قابل شناسایی است.

ابزارها: نرم‌افزارهایی مانند Manta، DELLY و LUMPY برای شناسایی جهش‌های ساختاری از داده‌های WGS استفاده می‌شوند.

Long-Read Sequencing (PacBio, Oxford Nanopore): این روش توالی‌های بلندتری از DNA را خوانش می‌کند که می‌تواند برای شناسایی جهش‌های ساختاری بزرگ و پیچیده مفید باشد.

کاربرد: مناسب برای تشخیص وارونگی‌ها، تکرارها و جابجایی‌ها.

Fluorescence In Situ Hybridization (FISH): استفاده از پروب‌های فلورسانس برای شناسایی جابجایی‌های کروموزومی و تغییرات ساختاری بزرگ.

کاربرد: برای تشخیص جابجایی‌های کروموزومی در بیماری‌هایی مانند سرطان استفاده می‌شود.

۳. سایر ابزارها و روش‌های بیوانفورماتیک:

CNVnator: ابزاری برای شناسایی تغییرات تعداد نسخه (CNV) از داده‌های NGS.

BreakDancer: برای شناسایی جابجایی‌ها و جهش‌های ساختاری از داده‌های paired-end sequencing.

SVDetect: یک ابزار برای شناسایی جهش‌های ساختاری با استفاده از داده‌های NGS .

1. Whole Genome Sequencing - WGS

PCR و روش‌های RFLP

1. PCR[1]: PCR یا واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یک روش بیوشیمیایی است که برای تکثیر مقادیر کمی از DNA مورد استفاده قرار می‌گیرد. در PCR با حساسیت بالا، تغییراتی در فرآیند استاندارد PCR ایجاد می‌شود که امکان تکثیر و شناسایی مقادیر بسیار کم DNA را فراهم می‌آورد. این تکنیک به‌طور گسترده در مطالعات تشخیصی، تحقیقاتی و ژنتیکی به کار می‌رود.

ویژگی‌ها و کاربردها PCR به شرح زیر است:

حساسیت بالا: این روش قادر است مقادیر بسیار کم DNA، حتی در حد چند نسخه از یک ژن یا قطعه DNA را تکثیر کند.

دقت بالا: تغییرات دقیق ژنتیکی مانند جهش‌های نقطه‌ای یا تغییرات اندک در توالی‌های DNA قابل شناسایی هستند.

کاربردهای پزشکی و تحقیقاتی: در تشخیص بیماری‌های ژنتیکی، انواع خاصی از سرطان‌ها، و حتی شناسایی عوامل عفونی با تعداد بسیار کم (مانند HIV و هپاتیت) استفاده می‌شود.

در ادامه مراحل اجرای PCR شرح داده شده است:

جداسازی DNA: ابتدا DNA از نمونه (مانند خون، بافت، بزاق یا نمونه دیگر) استخراج می‌شود.

آماده‌سازی مخلوط PCR: مخلوط شامل پرایمرهای اختصاصی، DNA پلیمراز مقاوم به دما و بافرهای مناسب است.

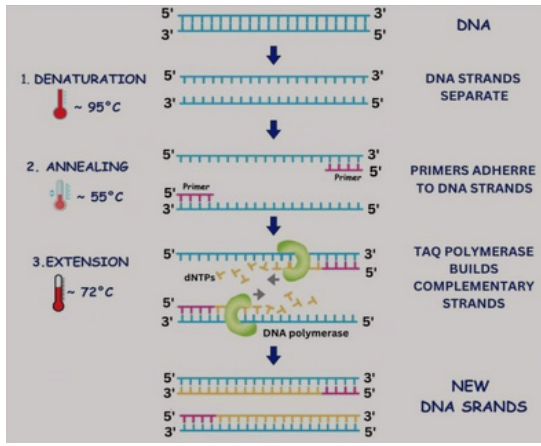
تکثیر DNA: واکنش PCR شامل سه مرحله اساسی است:

دناتوراسیون[2]: DNA دو رشته‌ای به تک رشته‌ای تجزیه می‌شود (حدود ۹۵ درجه سانتی‌گراد).

1. Polymerase Chain Reaction
2. Denaturation

اتصال پرایمر[1]: پرایمرهای اختصاصی به نواحی هدف در DNA متصل می‌شوند (در دمایی حدود ۵۰-۶۵ درجه سانتی‌گراد).
گسترش DNA[2]: پلیمراز از پرایمر شروع به سنتز رشته جدید DNA می‌کند (حدود ۷۲ درجه سانتی‌گراد).

تکرار مراحل بر اساس تعداد چرخه‌ها: در PCR با حساسیت بالا، ممکن است چرخه‌های PCR افزایش یابند (تا حدود ۴۰ تا ۵۰ چرخه) تا اطمینان حاصل شود که حتی مقادیر بسیار کمی از DNA تکثیر می‌شود.



گسترش نهایی[3]: تنها در اخرین چرخه مدت زمان بیشتری برای گسترش DNA (۱۰-۵ دقیقه) در نظر گرفته می‌شود تا تمام قطعات ناقص سنتز شوند.

آنالیز محصول PCR: با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز، محصولات تکثیر شده بررسی و اندازه‌گیری می‌شوند. در برخی موارد، از تکنیک‌های پیشرفته‌تر مانند Real-Time PCR یا qPCR برای اندازه‌گیری دقیق‌تر مقدار

1. Annealing
2. Extension
3. Final Extension

DNAاستفاده می‌شود.

برای افزایش حساسیت، معمولاً از بهینه‌سازی شرایط PCR (مانند دمای مناسب برای آنیلینگ پرایمر و کیفیت DNA) استفاده می‌شود. در PCR با حساسیت بالا، احتمال آلودگی باDNA های دیگر زیاد است، به همین دلیل رعایت دقیق شرایط ضدعفونی و پیشگیری از آلودگی ضروری است.

۲. روش RFLP[1]: RFLP (چندشکلی طول قطعات حاصل از برش آنزیمی) یکی از روش‌های قدیمی و بسیار کاربردی در تجزیه و تحلیلDNA است. این روش به‌طور گسترده در ژنتیک، تحقیقات بیماری‌های ژنتیکی، و تشخیص بیماری‌ها به کار می‌رود. در این روش، از آنزیم‌های برشی[2] برای تجزیه DNA در نواحی خاصی استفاده می‌شود. RFLP براساس وجود یا عدم وجود مکان‌های برش اختصاصی برای آنزیم‌های محدود کننده (آنزیم‌های برشی) در توالی‌های DNA عمل می‌کند. جهش‌های ژنتیکی یا تغییرات در DNA ممکن است باعث حذف یا ایجاد یک مکان برش جدید شود که باعث تولید قطعات DNA با طول متفاوت می‌شود. مراحل اجرای RFLR به شرح زیر است:

استخراج DNA: ابتدا DNA از نمونه‌ای مانند خون یا بزاق استخراج می‌شود.

برش DNA با آنزیم‌های محدودکننده: آنزیم‌های محدودکننده، DNA را در نقاط خاصی که توالی‌های معین دارند (مانند GAATTC) برش می‌دهند. اگر در DNA جهش یا تفاوتی وجود داشته باشد، ممکن است این نقاط برش تغییر کند یا حذف شود.

الکتروفورز ژل: قطعات DNA حاصل از برش توسط الکتروفورز روی

1. Restriction Fragment Length Polymorphism
2. Restriction Enzymes

ژل آگارز جدا می‌شوند. قطعات کوچک‌تر سریع‌تر حرکت می‌کنند و قطعات بزرگ‌تر آهسته‌تر.

انتقال به غشا[1]: پس از جداسازی قطعات DNA، آن‌ها به یک غشای نیتروسلولز یا نایلون منتقل می‌شوند این فرآیند به نام Southern Blot شناخته می‌شود.

هیبریداسیون با پروب: یک پروب DNA تک‌رشته‌ای که به ناحیه خاصی از DNA متصل می‌شود، به قطعات DNA روی غشا متصل می‌شود.

آشکارسازی: با استفاده از روش‌های فلورسانس یا پرتوزا، قطعاتDNA مشخص می‌شوند. تفاوت در طول قطعات DNA که به پروب متصل شده‌اند، تفاوت‌های ژنتیکی را نشان می‌دهد.

در ادامه ویژگی‌ها و کاربردها این روش بیان شده است:

تشخیص چندشکلی‌ها: (Polymorphisms) این روش برای شناسایی تغییرات ژنتیکی بین افراد مختلف بر اساس وجود یا عدم وجود مکان‌های برش آنزیمی استفاده می‌شود.

تشخیص بیماری‌های ژنتیکی: بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی (مانند آنمی داسی شکل) از طریق RFLP شناسایی می‌شوند، زیرا جهش‌های ایجاد شده ممکن است مکان‌های برش آنزیمی را تغییر دهند.

نقشه‌برداری ژنتیکی و مطالعات خانوادگی: در شناسایی ژن‌های مرتبط با بیماری و بررسی تفاوت‌های ژنتیکی بین اعضای خانواده‌ها کاربرد دارد.

دقت و وضوح بالا RFLP: قادر است تفاوت‌های کوچک در توالی DNA را شناسایی کند.

پایداری نتایج: قطعات DNA در این روش بسیار پایدار هستند و به راحتی

---

1. Blotting

قابل ذخیره و بررسی هستند.

زمان‌بر بودن RFLP: نسبت به روش‌های مدرن مانند توالی‌یابی نسل جدید (NGS) زمان بیشتری برای اجرا نیاز دارد.

نیاز به مقدار زیاد DNA: این روش به مقدار قابل توجهی DNA نیاز دارد، که ممکن است در برخی موارد به‌خصوص در نمونه‌های انسانی دشوار باشد.

مقایسه PCR با حساسیت بالا و RFLP:

حساسیت: PCR با حساسیت بالا می‌تواند مقادیر بسیار کمی از DNA را تکثیر و شناسایی کند، در حالی که RFLP به مقدار بیشتری DNA نیاز دارد.

دقت: RFLP توانایی شناسایی چندشکلی‌ها را در توالی DNA دارد، اما PCRبرای تکثیر نواحی خاص و شناسایی جهش‌های نقطه‌ای دقیق‌تر است.

زمان اجرا: PCR به مراتب سریع‌تر از RFLP است، زیرا RFLP به چند مرحله پیچیده‌تر مانند الکتروفورز و هیبریداسیون نیاز دارد.

کاربردها: PCR بیشتر برای شناسایی و تکثیر جهش‌های خاص در ژنوم مورد استفاده قرار می‌گیرد، در حالی که RFLP بیشتر برای شناسایی چندشکلی‌ها و تغییرات ساختاری بزرگ‌تر DNA کاربرد دارد.

PCR در زمان واقعی یا Real Time PCR

Real-Time PCR که به آن qPCR (Quantitative PCR) نیز گفته می‌شود، یکی از تکنیک‌های پیشرفته و پرکاربرد در زیست‌شناسی مولکولی است که برای تکثیر و در عین حال شناسایی کمی DNA یا RNA هدف در زمان واقعی استفاده می‌شود. این روش نه تنها به تکثیر DNA یا RNA می‌پردازد، بلکه به صورت همزمان امکان سنجش دقیق مقدار محصول تکثیر شده را در هر چرخه PCR فراهم می‌کند. در PCR معمولی، محصول نهایی PCR پس از

پایان واکنش در یک ژل آگارز توسط الکتروفورز و رنگ‌آمیزی بررسی می‌شود. اما در Real-Time PCR، از رنگ‌های فلورسانس یا پروب‌های فلورسانس استفاده می‌شود تا محصول PCR در طول فرآیند واکنش در هر چرخه بررسی شود. به این صورت، تکثیر DNA به‌صورت لحظه‌ای رصد می‌شود و نیازی به تجزیه و تحلیل نهایی محصول بر روی ژل نیست.

در qPCR، دو بخش مهم وجود دارد:

۱. بخش تکثیر DNA: مشابه PCR معمولی، DNA دو رشته‌ای به دو رشته تک رشته‌ای تبدیل شده و پرایمرها به نواحی هدف متصل می‌شوند و سپس DNA پلیمراز، رشته‌های جدید DNA را سنتز می‌کند.

۲. بخش شناسایی فلورسانس: در هر چرخه PCR، محصول تکثیر شده با کمک پروب‌ها یا رنگ‌های فلورسانس شناسایی می‌شود. هرچه تعداد چرخه‌ها بیشتر می‌شود، مقدار محصول نیز بیشتر می‌شود و شدت سیگنال فلورسانس افزایش می‌یابد.

انواع پروب‌ها و رنگ‌های فلورسانس در qPCR:

SYBR Green: یک رنگ فلورسانس است که به DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود و سیگنال فلورسانس تولید می‌کند. وقتی DNA تکثیر می‌شود و مقدار DNA دو رشته‌ای بیشتر می‌شود، سیگنال فلورسانس نیز افزایش می‌یابد.

مزایا: قیمت ارزان و عمومی بودن برای انواع توالی‌های DNA.

معایب: این رنگ به هر DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود، بنابراین ممکن است سیگنال‌های نادرستی از محصول جانبی PCR (مانند دایمر پرایمر) تولید کند.

پروب‌های TaqMan: پروب‌های TaqMan، قطعات کوتاه DNA

تک‌رشته‌ای هستند که به طور اختصاصی به توالی هدف متصل می‌شوند. این پروب‌ها دارای دو رنگ فلورسانس هستند: یک رنگ گزارشگر[1] و یک رنگ خاموش‌کننده[2]. زمانی که پروب توسط آنزیم Taq DNA polymerase تجزیه می‌شود، رنگ فلورسانس گزارشگر آزاد شده و سیگنال فلورسانس تولید می‌شود.

مزایا: بسیار اختصاصی، دقت بالا و عدم تولید سیگنال‌های اشتباه.

معایب: قیمت بالاتر نسبت بهSYBR Green

Molecular Beacons: پروب‌های حلقه‌ای که فقط زمانی که بهDNA هدف متصل می‌شوند، سیگنال فلورسانس تولید می‌کنند.

Scorpion Probes: این پروب‌ها به صورت دائمی به پرایمر متصل هستند و پس از تکثیر DNA سیگنال فلورسانس تولید می‌کنند.

در ادامه مراحل اجرای Real-Time PCR بیان شده است:

استخراج DNA یا RNA: ابتدا DNA از نمونه استخراج می‌شود. اگر هدف RNA باشد، ابتدا باید از Retro transcription استفاده شود تاRNA به cDNA تبدیل شود.

آماده‌سازی مخلوط PCR: مخلوط شامل پرایمرهای اختصاصی، آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به دما (Taq polymerase)، رنگ فلورسانس یا پروب‌های اختصاصی، dNTPs و بافر PCR است.

چرخه‌های PCR: واکنش شامل مراحل زیر است:

دناتوراسیون[3]: در حدود ۹۵ درجه سانتی‌گراد، DNA دو رشته‌ای

1. Reporter
2. Quencher
3. Denaturation

به دو رشته تک رشته‌ای تبدیل می‌شود.

اتصال پرایمر[1]: در دمایی بین ۵۰-۶۵ درجه سانتی‌گراد، پرایمرها به توالی هدف در DNA متصل می‌شوند.

گسترش[2]: در حدود ۷۲ درجه سانتی‌گراد، DNA پلیمراز، رشته جدید DNA را سنتز می‌کند.

شناسایی و آنالیز داده‌ها: در هر چرخه، میزان محصول تکثیر شده با استفاده از سیگنال‌های فلورسانس اندازه‌گیری می‌شود. یک منحنی تکثیر تولید می‌شود که نشان‌دهنده افزایش سیگنال فلورسانس به ازای هر چرخه است.

محاسبه Ct (Cycle Threshold): Ct عدد چرخه‌ای است که در آن سیگنال فلورسانس از آستانه مشخص عبور می‌کند. مقدار Ct متناسب با مقدار اولیه DNA یا RNA هدف در نمونه است. هرچه مقدار DNA یا RNA در نمونه اولیه بیشتر باشد، Ct کوچکتر خواهد بود.

کاربردهای Real-Time PCR به شرح زیر است:

شناسایی و اندازه‌گیری ویروس‌ها: برای تشخیص ویروس‌هایی مانند HIV، هپاتیت و SARS-CoV-19 از qPCR استفاده می‌شود. این روش می‌تواند مقدار ویروس را به صورت کمی اندازه‌گیری کند.

تحقیقات ژنتیکی: شناسایی جهش‌های ژنتیکی، تکثیر ژن‌های هدف، و بررسی سطح بیان ژن‌ها در مطالعات مختلف.

تشخیص سرطان: بررسی تغییرات در بیان ژن‌های مرتبط با سرطان و جهش‌های ژنتیکی.

---

1. Annealing
2. Extension

مطالعات بیوتکنولوژی: تعیین کیفیت و مقدار DNA یا RNA در مراحل مختلف تولید محصولات بیوتکنولوژی.

میتوان مزایا و معایب Real-Time PCR را به شرح زیر بیان کرد:

حساسیت بالا: قادر به شناسایی مقادیر بسیار کم DNA یا RNA است.

سرعت بالا: نیازی به مراحل پس از PCR (مانند الکتروفورز ژل) نیست.

کمی بودن نتایج: امکان تعیین دقیق مقدار DNA یا RNA هدف.

اختصاصیت بالا: با استفاده از پروب‌های اختصاصی مانند TaqMan می‌توان تکثیر بسیار اختصاصی DNA را انجام داد.

هزینه بالا: نسبت به PCR معمولی هزینه بیشتری دارد، به‌خصوص اگر از پروب‌های اختصاصی استفاده شود.

نیاز به تجهیزات پیشرفته: دستگاه‌های Real-Time PCR برای ثبت سیگنال‌های فلورسانس نیازمند تجهیزات گران‌قیمت هستند.

نیاز به کنترل‌های دقیق: به‌منظور جلوگیری از آلودگی و تداخل‌های احتمالی، نیاز به کنترل‌های دقیق آزمایشگاهی دارد.

فصل هشتم

تحلیل بیوانفورماتیکی مقدماتی

معرفی نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی رایج در ژنتیک مولکولی

نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی ابزارهای کلیدی برای انجام مطالعات پیچیده ژنتیکی هستند و به دانشمندان در تفسیر داده‌های بزرگ و پیچیده ژنتیکی کمک می‌کنند.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): ابزاری است که برای مقایسه یک توالی ژنتیکی (نوکلئوتیدی یا پروتئینی) با پایگاه داده‌های بزرگ توالی‌های زیستی استفاده می‌شود. این نرم‌افزار به‌طور خاص برای یافتن شباهت‌های محلی بین توالی‌ها طراحی شده است. ویژگی های این نرم افزار به شرح زیر است:

به محققان کمک می‌کند توالی‌های ژنتیکی ناشناخته را با توالی‌های شناخته‌شده مقایسه کنند.

می‌تواند توالی‌های مشابه در گونه‌های مختلف را شناسایی کرده و روابط تکاملی بین آنها را تعیین کند.

انواع مختلفی از BLAST وجود دارد: BLASTn برای توالی‌های DNA، BLASTp برای توالی‌های پروتئینی، و غیره.

از الگوریتم‌های سریع استفاده می‌کند تا به‌سرعت شباهت‌های میان توالی‌ها را شناسایی کند.

Clustal Omega: ابزاری برای هم‌ترازی چندگانه توالی‌های نوکلئوتیدی یا پروتئینی است. این ابزار به‌ویژه برای تجزیه و تحلیل تکاملی و مطالعه همسانی و تفاوت توالی‌ها در چندین گونه یا نمونه کاربرد دارد. ویژگی های این نرم افزار به شرح زیر است:

از الگوریتم‌های پیشرفته برای هم‌ترازی دقیق و سریع توالی‌ها استفاده می‌کند.

می‌تواند توالی‌های مشابه را به‌طور خودکار شناسایی و آن‌ها را هم‌تراز کند.

به طور گسترده در ساخت درخت‌های فیلوژنتیک و بررسی شباهت‌های ساختاری بین توالی‌ها استفاده می‌شود.

MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis):
یک نرم‌افزار جامع برای تحلیل تکامل مولکولی و فیلوژنتیکی است. این نرم‌افزار به محققان کمک می‌کند که درخت‌های فیلوژنتیک بسازند و روندهای تکاملی ژن‌ها را بررسی کنند. ویژگی های این نرم افزار به شرح زیر است:

این نرم‌افزار امکان مقایسه توالی‌های ژنتیکی از گونه‌های مختلف را فراهم می‌کند.

محققان می‌توانند از آن برای تخمین زمان جدایی تکاملی بین گونه‌ها استفاده کنند.

از ابزارهای آماری پیچیده برای تحلیل تغییرات ژنتیکی و تنوع ژنتیکی

استفاده می‌کند.

رابط کاربری ساده و مناسبی دارد و به‌طور گسترده توسط زیست‌شناسان تکاملی استفاده می‌شود.

Bioconductor: یک پلتفرم جامع برای تجزیه و تحلیل داده‌های ژنومی و بیوانفورماتیک است که به‌ویژه با زبان R استفاده می‌شود. این نرم‌افزار مجموعه‌ای از ابزارها را برای تحلیل داده‌های ژنومیکس، مانند داده‌های RNA-Seq و میکروآرایه، ارائه می‌دهد. ویژگی های این نرم افزار به شرح زیر است:

شامل بیش از هزار پکیج مختلف برای تحلیل داده‌های بیوانفورماتیکی است.

به‌طور گسترده برای تحلیل داده‌های بزرگ زیستی مانند NGS (توالی‌یابی نسل جدید) استفاده می‌شود.

امکان تجزیه و تحلیل‌های پیچیده بیوانفورماتیکی را با روش‌های آماری پیشرفته فراهم می‌کند.

ابزارهایی برای تحلیل بیان ژن، شناسایی جهش‌ها و تحلیل داده‌های ترنسکریپتومی ارائه می‌دهد.

Geneious: یک نرم‌افزار چندکاره برای مدیریت و تحلیل داده‌های ژنومی است که شامل توالی‌یابی، هم‌ترازی توالی‌ها، ویرایش ژنوم و بسیاری از قابلیت‌های دیگر است. ویژگی های این نرم افزار به شرح زیر است:

محیط کاربرپسند و ساده‌ای دارد که باعث می‌شود کاربران با دانش کم‌تر از برنامه‌نویسی نیز بتوانند از آن استفاده کنند.

ابزارهای پیشرفته برای آنالیز داده‌های NGS و مقایسه توالی‌های ژنومی دارد.
امکان جستجوی توالی‌های ژنتیکی، ایجاد درخت‌های فیلوژنتیک و بررسی ساختار پروتئینی را دارد.
این نرم‌افزار همچنین قابلیت‌هایی برای طراحی پرایمر، شبیه‌سازی کلونینگ و آنالیز جهش‌ها فراهم می‌کند.

Bowtie: ابزاری بسیار سریع برای هم‌ترازی توالی‌های کوتاه DNA است که معمولاً در توالی‌یابی نسل جدید (NGS) استفاده می‌شود. این نرم‌افزار به‌ویژه برای داده‌های RNA-Seq مفید است. ویژگی های این نرم افزار به شرح زیر است:
سرعت بسیار بالا در هم‌ترازی توالی‌ها، به‌خصوص برای داده‌های بزرگ NGS
مصرف پایین حافظه که آن را برای تحلیل داده‌های بزرگ بهینه می‌کند.
توانایی هم‌ترازی دقیق و سریع توالی‌های کوتاه DNA
به‌طور گسترده در توالی‌یابی ژنوم، RNA-Seq و مطالعات اپی‌ژنتیک استفاده می‌شود.

Galaxy: یک پلتفرم وب‌بنیاد است که برای تحلیل داده‌های ژنومیک به کار می‌رود و به کاربران اجازه می‌دهد بدون نیاز به دانش برنامه‌نویسی، تحلیل‌های پیچیده‌ای را روی داده‌های بیوانفورماتیکی انجام دهند. ویژگی های این نرم افزار به شرح زیر است:
رابط کاربری گرافیکی که به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود و نیاز به دانش فنی کم‌تری دارد.

امکان دسترسی به تعداد زیادی از ابزارهای تحلیل داده‌های ژنتیکی و ژنومی.
قابلیت پردازش داده‌های بزرگ مانند NGS و تحلیل‌های پیچیده مانند آنالیز SNP، RNA-Seq و غیره.
کاربران می‌توانند نتایج تحلیل‌ها را ذخیره کرده و مجدداً استفاده کنند.

PLINK: یک نرم‌افزار قدرتمند برای تجزیه و تحلیل داده‌های ژنوتیپی است و به‌طور خاص برای مطالعات ارتباطات ژنتیکی و وابستگی ژنتیکی به صفات پیچیده استفاده می‌شود. ویژگی های این نرم افزار به شرح زیر است:
مناسب برای تحلیل داده‌های ژنوتیپی در مطالعات GWAS (Genome-Wide Association Studies).
ابزارهایی برای تجزیه و تحلیل همبستگی ژن‌ها با بیماری‌ها و صفات پیچیده دارد.
امکان پردازش داده‌های چندین هزار نمونه ژنتیکی با سرعت بالا.
دارای قابلیت‌هایی برای کنترل کیفیت داده‌ها، شناسایی خطاهای ژنتیکی و بررسی همخونی.

PyMOL: یک نرم‌افزار مدل‌سازی و نمایش ساختارهای سه‌بعدی مولکولی است که به‌طور خاص برای نمایش و تحلیل ساختار پروتئین‌ها و مولکول‌های زیستی استفاده می‌شود. ویژگی های این نرم افزار به شرح زیر است:
ابزاری قوی برای تجسم ساختارهای پروتئینی، اسیدهای نوکلئیک و سایر مولکول‌ها.
امکان نمایش داده‌های کریستالوگرافی اشعه ایکس و مدل‌های پروتئینی سه‌بعدی.

به‌طور گسترده در تحقیقاتی که نیاز به تحلیل ساختار پروتئین‌ها و مکانیسم‌های تعامل مولکولی دارند، استفاده می‌شود.

قابلیت‌های گرافیکی پیشرفته و امکان ساخت انیمیشن‌های مولکولی.

GATK (Genome Analysis Toolkit): یک مجموعه ابزار قوی برای تحلیل داده‌های توالی‌یابی ژنوم است که به‌ویژه در کشف واریانت‌های ژنتیکی (مانند SNPs و InDels) مورد استفاده قرار می‌گیرد. ویژگی های این نرم افزار به شرح زیر است:

ابزاری استاندارد برای تحلیل داده‌هایNGS

قابلیت کشف تغییرات ژنتیکی در سطح ژنوم، شناسایی SNPs و جهش‌های کوچک.

به‌طور گسترده در پروژه‌های ژنوم انسان و سایر موجودات استفاده می‌شود.

ابزارهای متنوعی برای تصحیح داده‌های خام توالی‌یابی و افزایش دقت تحلیل داده‌ها دارد.

معرفی پایگاه‌های داده ژنتیکی برای مقایسه و تفسیر نتایج

استفاده از پایگاه‌های داده ژنتیکی برای مقایسه و تفسیر نتایج یکی از مراحل کلیدی در تحلیل داده‌های ژنتیکی و مولکولی است. این پایگاه‌های داده حاوی اطلاعات زیادی در مورد توالی‌های DNA، RNA، پروتئین‌ها و واریانت‌های ژنتیکی هستند و به محققان امکان می‌دهند نتایج تحقیقات خود را در چارچوب داده‌های موجود قرار دهند. پایگاه‌های داده ژنتیکی زیادی وجود دارند که هر یک شامل اطلاعات مختلفی در زمینه ژنوم، پروتئوم، و واریانت‌های ژنتیکی هستند. برخی از پایگاه‌های مهم شامل:

1. NCBI (National Center for Biotechnology Information):
یکی از مهم‌ترین پایگاه‌های داده در زیست‌شناسی و بیوتکنولوژی است که توسط دولت ایالات متحده و تحت نظر موسسه ملی سلامت (NIH) مدیریت می‌شود. این پایگاه داده در سال ۱۹۸۸ تاسیس شد و نقش مهمی در نگهداری و ارائه اطلاعات ژنتیکی، بیولوژیکی و پزشکی دارد. NCBI ابزارها و پایگاه‌های داده‌ای را فراهم می‌کند که به محققان در تحلیل و تفسیر داده‌های ژنتیکی و مولکولی کمک می‌کند. مهم‌ترین پایگاه‌های داده و ابزارهای NCBI در ادامه بیان شده است:

GenBank: GenBank یکی از بزرگترین پایگاه‌های داده توالی‌های DNAو RNA در جهان است. این پایگاه داده حاوی توالی‌های ژنتیکی از هزاران گونه مختلف است و به‌صورت مداوم با داده‌های جدید از پروژه‌های توالی‌یابی به‌روزرسانی می‌شود. محققان می‌توانند از GenBank برای جستجو و بازیابی توالی‌های ژنومیک مختلف، هم‌ترازی توالی‌ها، و مقایسه آن‌ها با توالی‌های جدید استفاده کنند.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): BLAST
یکی از پرکاربردترین ابزارهای موجود در NCBI است که به محققان امکان می‌دهد تا توالی‌های DNA، RNA یا پروتئین را با پایگاه داده‌های موجود مقایسه کنند. این ابزار توالی‌های مشابه یا همولوگ را پیدا می‌کند و اطلاعاتی در مورد شباهت‌های بین آن‌ها ارائه می‌دهد. این ابزار برای شناسایی ژن‌های همولوگ، بررسی شباهت توالی‌های ژنتیکی و شناسایی نواحی ژنومی مشابه کاربرد دارد.

PubMed: PubMed یک پایگاه داده برای مقالات علمی و پژوهش‌های زیست‌پزشکی است که شامل میلیون‌ها مقاله از مجلات علمی معتبر است

و به محققان امکان جستجو و دسترسی به مقالات علمی در زمینه‌های زیست‌شناسی، ژنتیک، بیوتکنولوژی و پزشکی را فراهم می‌آورد.

RefSeq (Reference Sequence): RefSeq مجموعه‌ای استاندارد از توالی‌های ژنومی، RNA و پروتئینی است که توسط NCBI نگهداری می‌شود. این توالی‌ها برای گونه‌های مختلف ارائه شده و به عنوان یک مرجع دقیق و قابل اعتماد در مطالعات ژنومی استفاده می‌شود. محققان از RefSeq برای شناسایی و مقایسه توالی‌های مرجع استاندارد استفاده می‌کنند و داده‌های خود را بر اساس این توالی‌ها آنالیز می‌کنند.

dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism Database): dbSNP یک پایگاه داده شامل اطلاعات مربوط به SNPها (پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی) و واریانت‌های ژنتیکی دیگر است. با استفاده از این پایگاه داده می‌توان به شناسایی واریانت‌های ژنتیکی و مقایسه آن‌ها با داده‌های موجود برای تعیین ارتباط با بیماری‌ها یا صفات خاص پرداخت.

GEO (Gene Expression Omnibus): GEO یک پایگاه داده عمومی برای داده‌های میکروآرایه‌ای و RNA-Seq است که اطلاعات مربوط به بیان ژن‌ها در شرایط مختلف بیولوژیکی و پزشکی را در خود جای داده است. این پایگاه داده برای تحلیل داده‌های بیان ژن در شرایط مختلف و مقایسه الگوهای بیان ژن در بافت‌ها و گونه‌های مختلف بسیار کارآمد است.

ClinVar: ClinVar یک پایگاه داده حاوی اطلاعات مربوط به واریانت‌های ژنتیکی و ارتباط آن‌ها با بیماری‌ها است. این پایگاه داده اطلاعاتی درباره اهمیت بالینی واریانت‌ها ارائه می‌دهد و برای تفسیر واریانت‌های ژنتیکی و بررسی تأثیر آن‌ها بر بیماری‌های ژنتیکی به کار می‌رود.

OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man): OMIM

یک پایگاه داده جامع است که شامل اطلاعاتی درباره ژن‌ها و بیماری‌های ارثی می‌باشد و بیشتر برای مطالعه بیماری‌های ژنتیکی و شناسایی ژن‌های مرتبط با این بیماری‌ها کاربرد دارد.

2. Ensembl: Ensembl یکی دیگر از مهم‌ترین پایگاه‌های داده ژنومیک است که برای ارائه اطلاعات جامع درباره توالی‌های ژنومی از گونه‌های مختلف ایجاد شده است. این پایگاه داده توسط مؤسسه بیوانفورماتیک اروپایی (EMBL-EBI) و موسسه ولکام تراست سانگر (Wellcome Trust Sanger Institute) توسعه یافته است و به محقق امکان می‌دهد تا به داده‌های ژنومیک از گونه‌های متنوعی مانند انسان، حیوانات، گیاهان، و سایر موجودات دسترسی داشته باشند. ویژگی‌های اصلی Ensembl به شرح زیر است:

اطلاعات ژنومی از گونه‌های مختلف: Ensembl داده‌های ژنومی کاملی از بیش از ۱۰۰ گونه مختلف، از جمله انسان، موش، زبرا فیش و حتی گونه‌های گیاهی و میکروبی فراهم می‌کند و امکان مقایسه ژنوم‌های گونه‌های مختلف، مطالعه تکامل ژنتیکی و شناسایی ژن‌های همولوگ (مشابه) میان گونه‌ها را ممکن می‌سازد.

حاشیه‌نویسی ژنومی: Ensembl ژن‌ها، RNAهای غیرکدکننده و واریانت‌های ژنتیکی را بر روی توالی‌های ژنومی حاشیه‌نویسی می‌کند. این اطلاعات شامل موقعیت دقیق ژن‌ها، اینترون‌ها، اگزون‌ها و توالی‌های تنظیمی است. به این ترتیب محققان می‌توانند ساختار ژن‌ها را شناسایی کنند، توالی‌های ژنومی خاص را استخراج کنند و عملکرد بخش‌های مختلف ژنوم را مطالعه کنند.

واریانت‌های ژنتیکی و SNPها: Ensembl اطلاعات جامعی از

واریانت‌های ژنتیکی از جملهSNP ها (پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی) و سایر تغییرات ژنومی مانند حذف و اضافه‌ها ارائه می‌دهد که به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی در میان جمعیت‌ها و شناسایی واریانت‌های ژنتیکی مرتبط با بیماری‌ها یا صفات خاص کاربرد دارد.

مقایسه ژنوم‌ها[1]: یکی از قابلیت‌های مهم Ensembl، مقایسه ژنوم‌های گونه‌های مختلف است. این پایگاه داده امکان شناسایی ژن‌های همولوگ (ارتولوگ و پارالوگ) و نواحی ژنومی حفظ‌شده بین گونه‌ها را فراهم می‌کند و برای مطالعات تکاملی و بررسی شباهت‌های ژنتیکی بین گونه‌های مختلف کاربرد دارد.

بیان ژن[2]: داده‌های مربوط به بیان ژن در بافت‌ها و شرایط مختلف بیولوژیکی در Ensembl ارائه می‌شود. این داده‌ها از پروژه‌های RNA-Seq و سایر تکنیک‌های بیان ژن به دست آمده‌اند و امکان بررسی تفاوت‌های بیان ژن بین بافت‌ها و در شرایط مختلف (مانند بیماری‌ها) را فراهم می‌آورند.

پیش‌بینی اثر واریانت‌ها (Variant Effect Predictor یا VEP): Ensembl ابزاری به نام VEP دارد که به کاربران کمک می‌کند تا اثرات واریانت‌های ژنتیکی را بر روی ژن‌ها و پروتئین‌ها پیش‌بینی کنند. محققان از این ابزار برای بررسی تاثیر احتمالی واریانت‌های ژنتیکی بر عملکرد ژن‌ها و پروتئین‌ها استفاده می‌کنند، که به‌ویژه در مطالعات مرتبط با بیماری‌ها بسیار مفید است.

ابزارها و قابلیت‌های Ensembl در ادامه بیان شده است:

Ensembl Genome Browser: Ensembl دارای یک مرورگر ژنومی

1. Comparative Genomics
2. Gene Expression

تعاملی است که به محققان امکان می‌دهد تا به‌راحتی توالی‌های ژنومی را مشاهده کنند و ژن‌ها، واریانت‌ها، و سایر اطلاعات مربوط به توالی‌های ژنتیکی را در آن بررسی کنند. مرورگر Ensembl به کاربران این امکان را می‌دهد تا موقعیت ژن‌ها را در ژنوم مشاهده کرده و نواحی ژنومی مرتبط با ژن‌ها و واریانت‌ها را بررسی کنند.

Ensembl BioMart: BioMart یک ابزار قدرتمند برای استخراج داده‌های سفارشی از Ensembl است. با استفاده از این ابزار، محققان می‌توانند داده‌های ژنومی، واریانت‌ها، و سایر اطلاعات موردنظر خود را جستجو و دانلود کنند. برای استخراج داده‌های گسترده و سفارشی مانند تمام ژن‌های یک موجود خاص یا تمام واریانت‌های موجود در یک ناحیه ژنومی مشخص به کار می‌رود.

Compara (Comparative Genomics): Compara ابزار مقایسه ژنوم‌ها در Ensembl است که به محققان اجازه می‌دهد شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنتیکی میان گونه‌ها را بررسی کنند. این ابزار می‌تواند ژن‌های همولوگ و نواحی ژنومی حفظ‌شده را شناسایی کند و به محققان برای مطالعات تکاملی، شناسایی ژن‌های همولوگ و بررسی مسیرهای بیولوژیکی مشترک بین گونه‌ها کمک می‌کند.

Ensembl REST API: Ensembl از طریق یک API (رابط برنامه‌نویسی کاربردی) دسترسی به داده‌ها و ابزارهای خود را برای برنامه‌نویسان و محققانی که به تحلیل‌های خودکار نیاز دارند، فراهم می‌کند. محققان می‌توانند با استفاده از API داده‌های ژنومی را به صورت خودکار بازیابی کنند و برای تحلیل‌های پیشرفته بیوانفورماتیکی از آن استفاده کنند.

فصل نهم

کاربردهای عملی ژنتیک مولکولی در پزشکی

راهنمای عملی انجام تست‌های ژنتیکی بالینی

راهنمای عملی انجام تست‌های ژنتیک بالینی شامل مراحلی است که به صورت دقیق برای آزمایش و شناسایی بیماری‌های ژنتیکی و مشاوره ژنتیکی استفاده می‌شود. این راهنما شامل مراحل اصلی، از جمع‌آوری نمونه‌ها تا تجزیه‌وتحلیل نتایج، و همچنین رعایت استانداردها و اصول اخلاقی است.

۱. انتخاب بیمار برای تست ژنتیک: قبل از هر آزمایش ژنتیکی، باید مشخص شود که آیا بیمار نیاز به تست ژنتیکی دارد یا خیر. تست‌های ژنتیک معمولاً برای موارد زیر توصیه می‌شود:

سابقه خانوادگی از بیماری‌های ژنتیکی.

نتایج غیرطبیعی آزمایش‌های بالینی، مانند آزمایش‌های تصویربرداری یا بیوشیمیایی.

تشخیص پیش از تولد برای شناسایی بیماری‌های ژنتیکی در جنین.

مشاوره پیش از بارداری برای والدینی که ممکن است حامل بیماری‌های ژنتیکی باشند.

۲. جمع‌آوری نمونه: نوع نمونه‌ها:

خون: رایج‌ترین نمونه برای انجام تست‌های ژنتیک است. DNA معمولا از گلبول‌های سفید خون استخراج می‌شود.

بزاق: نمونه بزاق یکی دیگر از راه‌های ساده برای جمع‌آوری DNA است.

بافت‌های بیوپسی: برای موارد خاص مانند بررسی جهش‌های بافتی یا توموری، بیوپسی بافت استفاده می‌شود.

مایع آمنیوتیک یا پرزهای کوریونی: برای تست‌های پیش از تولد استفاده می‌شوند.

شرایط ضدعفونی باید رعایت شود تا از آلودگی جلوگیری شود.

حجم مناسب: معمولاً ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر خون کامل برای آزمایش ژنتیکی کافی است.

ذخیره‌سازی: نمونه‌های خون باید در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در اسرع وقت به آزمایشگاه منتقل شوند.

۳. استخراج DNA یا RNA: بعد از جمع‌آوری نمونه، اولین قدم استخراج DNAیا RNA از سلول‌ها است که به تفصیل در فصل ۳ بحث شد.

۴. انتخاب نوع تست ژنتیکی: تست‌های ژنتیکی متفاوتی وجود دارند که بر اساس نوع بیماری و هدف از تشخیص، یکی از آنها انتخاب می‌شود:

الف) تست‌های مولکولی نظیر NGS، RFLP، Real time PCR، PCR

ب) تست‌های سیتوژنتیکی نظیر کاریوتایپینگ و FISH و...

ج) تست‌های بیوشیمیایی برای بررسی فعالیت آنزیم‌ها یا متابولیت‌ها در تشخیص بیماری‌های ژنتیکی متابولیک.

۵. اجرای آزمایش و تحلیل نتایج:

الف) اجرای آزمایش: بر اساس نوع تست انتخاب شده، پروتکل‌های

مشخص برای اجرای هر آزمایش وجود دارد. مثلاً در PCR، پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های موردنظر طراحی شده و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز اجرا می‌شود.

ب) کنترل‌های مثبت و منفی: در هر آزمایش ژنتیکی باید از کنترل مثبت (نمونه حاوی جهش یا تغییر ژنتیکی شناخته شده) و کنترل منفی (نمونه بدون جهش) استفاده شود تا از صحت نتایج اطمینان حاصل شود.

ج) تفسیر نتایج: در صورتی که جهش شناسایی شد، باید نوع و اهمیت آن از نظر بالینی تفسیر شود. برخی جهش‌ها بی‌ضرر هستند (پلی‌مورفیسم‌های طبیعی)، در حالی که برخی دیگر می‌توانند بیماری‌زا باشند. برای تفسیر دقیق‌تر ممکن است از بانک‌های اطلاعاتی جهش‌ها مانند ClinVar یا OMIM استفاده شود.

۶. مشاوره ژنتیک: پس از دریافت نتایج آزمایش، بیماران نیاز به مشاوره ژنتیک دارند تا اطلاعات دقیقی درباره نتایج، اهمیت آنها و گزینه‌های درمانی یا پیشگیرانه دریافت کنند. مشاور ژنتیک به بیمار کمک می‌کند تا درک درستی از:

احتمال بروز بیماری،

تأثیرات ژنتیکی بر اعضای خانواده،

گزینه‌های درمانی یا مدیریت بیماری داشته باشد.

۷. رعایت اصول اخلاقی: در انجام تست‌های ژنتیک بالینی، رعایت اصول اخلاقی بسیار مهم است:

رضایت آگاهانه: بیمار باید از هدف، فرآیند و نتایج ممکن آزمایش ژنتیکی آگاه باشد و رضایت خود را به صورت کتبی اعلام کند.

حفظ حریم خصوصی: نتایج آزمایش ژنتیکی باید به صورت محرمانه نگهداری شود.

استفاده از نتایج آزمایش: نتایج نباید بدون رضایت بیمار به شخص ثالث (مانند شرکت‌های بیمه یا کارفرما) ارائه شود.

۸. چالش‌های تست‌های ژنتیکی

تنوع ژنتیکی: برخی از نتایج ممکن است به دلیل تنوع ژنتیکی بین افراد طبیعی باشند، بنابراین نیاز به تفسیر دقیق دارند.

هزینه و دسترسی: تست‌های ژنتیک معمولاً هزینه بالایی دارند و در برخی مناطق دسترسی به آنها محدود است.

نتایج نامشخص: برخی جهش‌ها ممکن است هنوز به‌طور کامل از نظر بیماری‌زایی شناخته نشده باشند و تفسیر نتایج ممکن است چالش‌برانگیز باشد.

روش‌های تشخیص پیش از تولد و تست‌های مرتبط

روش‌های تشخیص پیش از تولد[1] یکی از مهم‌ترین ابزارها در تشخیص بیماری‌های ژنتیکی و نقص‌های ساختاری جنین است. این روش‌ها برای شناسایی ناهنجاری‌های ژنتیکی و کروموزومی در جنین قبل از تولد استفاده می‌شوند. هدف از این روش‌ها، تشخیص زودهنگام ناهنجاری‌ها به منظور برنامه‌ریزی بهتر برای مراقبت‌های بارداری، درمان‌های پیش از تولد، یا در مواردی مشاوره برای تصمیم‌گیری‌های بالینی است. در ادامه، روش‌های مختلف تشخیص پیش از تولد و تست‌های مرتبط به طور مفصل توضیح داده می‌شوند.

۱. روش‌های غیرتهاجمی تشخیص پیش از تولد[2]

NIPT با استفاده از DNA آزاد جنینی (cfDNA): در این روش، DNA آزاد جنینی که در خون مادر وجود دارد، تجزیه‌وتحلیل می‌شود. DNA آزاد

1. Prenatal Diagnosis
2. Non-invasive Prenatal Testing - NIPT

جنینی (cell-free fetal DNA) در اثر مرگ سلول‌های جنینی به خون مادر وارد می‌شود. این DNA از حدود هفته هفتم تا دهم بارداری به بعد در خون مادر قابل شناسایی است.

کاربرد: شناسایی ناهنجاری‌های کروموزومی مانند تریزومی ۲۱ (سندروم داون)، تریزومی ۱۸، تریزومی ۱۳ و ناهنجاری‌های کروموزوم‌های جنسی.

مزایا: کاملاً غیرتهاجمی است و نیازی به نمونه‌برداری مستقیم از جنین ندارد. دقت بالایی دارد و خطر سقط جنین یا آسیب به جنین را به همراه ندارد.

معایب: این تست نمی‌تواند تمام ناهنجاری‌های ژنتیکی را تشخیص دهد و بیشتر برای ناهنجاری‌های کروموزومی استفاده می‌شود. به علاوه، نتایج ممکن است به صورت احتمالی باشند و برای تأیید ممکن است نیاز به تست‌های تهاجمی باشد.

۲. روش‌های تهاجمی تشخیص پیش از تولد

این روش‌ها شامل نمونه‌برداری مستقیم از بافت‌های جنین یا مایع اطراف جنین هستند و معمولاً برای تشخیص دقیق‌تر ناهنجاری‌های ژنتیکی یا کروموزومی استفاده می‌شوند.

آمنیوسنتز[1]: این روش شامل گرفتن نمونه از مایع آمنیوتیک (مایع اطراف جنین) از طریق وارد کردن سوزن به رحم از طریق شکم مادر است. این نمونه‌برداری معمولاً در هفته‌های ۱۵ تا ۲۰ بارداری انجام می‌شود.

کاربرد: این روش به منظور تجزیه‌وتحلیل کروموزوم‌های جنین برای شناسایی ناهنجاری‌های کروموزومی مانند تریزومی ۲۱، تریزومی ۱۸، تریزومی ۱۳ و همچنین شناسایی برخی بیماری‌های ژنتیکی تک‌ژنی مانند

1. Amniocentesis

سیستیک فیبروزیس، تالاسمی و آنمی داسی شکل استفاده می‌شود.

مزایا: دقت بسیار بالا و توانایی شناسایی طیف گسترده‌ای از بیماری‌های ژنتیکی.

معایب: خطر کمی از سقط جنین (حدود ۰/۱ تا ۰/۳ درصد) به دلیل ورود سوزن به داخل رحم وجود دارد.

نمونه‌برداری از پرزهای کوریونی[1]: این روش شامل گرفتن نمونه از پرزهای کوریونی (بافت جفت) است که حاوی DNA جنینی می‌باشد. این روش معمولاً در هفته‌های ۱۰ تا ۱۳ بارداری انجام می‌شود و نمونه از طریق وارد کردن یک سوزن به داخل رحم از طریق شکم یا واژن مادر گرفته می‌شود.

کاربرد: برای تشخیص ناهنجاری‌های کروموزومی مانند سندروم داون و سایر تریزومی‌ها و همچنین برای تشخیص بیماری‌های ژنتیکی تک‌ژنی مانند دیستروفی عضلانی دوشن و سیستیک فیبروزیس.

مزایا: امکان تشخیص زودهنگام بیماری‌های ژنتیکی و کروموزومی از هفته دهم بارداری.

معایب: خطر سقط جنین حدود ۰/۵ تا ۱ درصد است و ممکن است برخی مشکلات مادرزادی در اعضای جنین گزارش شوند.

کوردوسنتز[2] یا نمونه‌برداری از خون جنین: این روش شامل گرفتن نمونه خون از بند ناف جنین (ورید بند ناف) است و معمولاً در هفته‌های ۱۸ تا ۲۳ بارداری انجام می‌شود.

کاربرد: این روش بیشتر برای تشخیص ناهنجاری‌های خونی یا عفونت‌های

1. Chorionic Villus Sampling - CVS
2. Cordocentesis

جنین استفاده می‌شود. همچنین ممکن است برای بررسی شرایط ژنتیکی نادر استفاده شود.

مزایا: امکان دسترسی به خون جنین برای بررسی‌های دقیق‌تر و تشخیص عفونت‌ها و ناهنجاری‌های خونی.

معایب: خطر بالاتری از سقط جنین (۱ تا ۲ درصد) و به همین دلیل به عنوان گزینه آخر در تشخیص‌ها استفاده می‌شود.

کاربرد ژنتیک مولکولی در تشخیص، پیشگیری و درمان سرطان

ژنتیک مولکولی در تشخیص و درمان سرطان نقش بسیار مهمی دارد، زیرا سرطان یک بیماری پیچیده ژنتیکی است که به علت تغییرات در DNA سلول‌ها ایجاد می‌شود. این تغییرات (جهش‌ها) ممکن است در ژن‌های مرتبط با رشد سلولی، تنظیم چرخه سلولی، و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول (آپاپتوزیس) رخ دهد و باعث رشد کنترل‌نشده سلول‌های سرطانی شود. با استفاده از روش‌های ژنتیک مولکولی، می‌توان این جهش‌ها را شناسایی کرد و در نتیجه، تشخیص دقیق‌تر و درمان هدفمندتری ارائه داد.

۱. کاربرد ژنتیک مولکولی در تشخیص سرطان

الف) تشخیص زودهنگام و غربالگری: با استفاده از تکنیک‌های ژنتیک مولکولی می‌توان جهش‌های ژنتیکی را که با ریسک بالاتر ابتلا به سرطان مرتبط هستند، شناسایی کرد. برخی از این ژن‌های مرتبط که کاربرد و اهمیت بالایی در تشخیص انواع سرطان‌ها دارند شامل BRCA1 و BRCA2 و TP53. جهش در BRCA1 و BRCA2 خطر ابتلا به سرطان پستان و تخمدان را افزایش می‌دهد. همچنین جهش در TP53 (که یک ژن سرکوبگر تومور است) می‌تواند به سرطان‌های متعددی منجر شود. با استفاده از تست‌های ژنتیکی،

افراد دارای این جهش‌ها شناسایی شده و می‌توانند تحت غربالگری‌های بیشتر و مشاوره قرار گیرند تا ریسک ابتلا به سرطان کاهش یابد.

ب) تعیین نوع سرطان و پیش‌آگهی: بررسی پروفایل ژنتیکی سلول‌های سرطانی به پزشکان کمک می‌کند تا نوع سرطان را با دقت بیشتری تشخیص دهند. برای مثال: در سرطان خون (لوسمی)، برخی تغییرات کروموزومی مانند جابجایی کروموزومی بین کروموزوم‌های ۹ و ۲۲ (که به عنوان کروموزوم فیلادلفیا شناخته می‌شود) می‌تواند لوسمی میلوئید مزمن (CML) را مشخص کند و یا در سرطان کولون، بررسی جهش‌های ژنتیکی خاص مانند جهش در ژن‌های KRAS و NRAS می‌تواند به تعیین نوع دقیق سرطان و درمان مؤثر کمک کند.

ج) پیش‌بینی حساسیت به درمان: با استفاده از تست‌های ژنتیکی مولکولی، می‌توان تعیین کرد که آیا یک بیمار به درمان خاصی پاسخ می‌دهد یا خیر. برای مثال، جهش در ژن EGFR در برخی سرطان‌های ریه یافت می‌شود و می‌تواند حساسیت به داروهای مهارکننده EGFR مانند ارلوتینیب را پیش‌بینی کند و یا در برخی بیماران مبتلا به سرطان ریه، تغییرات در ژن ALK می‌تواند نشان‌دهنده پاسخ خوب به داروهای مهارکننده ALK مانند کریزوتینیب باشد.

۲. کاربرد ژنتیک مولکولی در درمان سرطان

الف) درمان هدفمند[1]: درمان‌های هدفمند با هدف قرار دادن جهش‌های خاص ژنتیکی یا مسیرهای مولکولی غیرطبیعی در سلول‌های سرطانی عمل می‌کنند. این درمان‌ها نسبت به روش‌های سنتی مانند شیمی‌درمانی عوارض جانبی کمتری دارند، زیرا به طور خاص سلول‌های سرطانی را مورد هدف قرار

1. Targeted Therapy

می‌دهند. نمونه‌هایی از درمان‌های هدفمند عبارت‌اند از:

مهارکننده‌های تیروزین کیناز: مانند داروی ایماتینیب که برای بیماران مبتلا به لوسمی میلوئید مزمن (CML) با کروموزوم فیلادلفیا مؤثر است.

مهارکننده‌های EGFR: مانند ارلوتینیب و گفیتینیب، که برای بیماران مبتلا به سرطان ریه با جهش در ژن EGFR استفاده می‌شوند.

مهارکننده‌های HER2: مانند تراستوزومب، که در بیماران مبتلا به سرطان پستان با اضافه‌تعداد ژن HER2 استفاده می‌شود.

ب) ایمونوتراپی: ایمونوتراپی یک روش درمانی است که از سیستم ایمنی بدن برای مبارزه با سرطان استفاده می‌کند. برخی از درمان‌های ایمونوتراپی براساس ژنتیک مولکولی طراحی شده‌اند تا سیستم ایمنی را برای شناسایی و تخریب سلول‌های سرطانی فعال کنند. برای مثال مهارکننده‌های نقاط بازرسی ایمنی[1]. این داروها، مانند پمبرولیزومب و نیولوماب، با مهار پروتئین‌هایی مانند PD-1 و CTLA-4، سیستم ایمنی را فعال می‌کنند تا سلول‌های سرطانی را از بین ببرد.

ج) ژن‌درمانی[2]: ژن‌درمانی در حال توسعه است تا ژن‌های معیوب را اصلاح کرده یا ژن‌های جدیدی را وارد سلول‌های سرطانی کند که بتواند رشد آنها را متوقف کرده یا سیستم ایمنی بدن را تقویت کند. به عنوان مثال وکتورهای ویروسی برای انتقال ژن‌های سالم به سلول‌های سرطانی استفاده می‌شود. در روش CAR-T Therapy، سلول‌های ایمنی بیمار (سلول‌های T) با استفاده از ژنتیک مولکولی اصلاح می‌شوند تا بتوانند به طور خاص سلول‌های سرطانی را شناسایی و نابود کنند. این روش برای درمان برخی از انواع لوسمی و لنفوم موفقیت‌آمیز بوده است.

1. Checkpoint inhibitors
2. Gene Therapy

۳. کاربرد ژنتیک مولکولی در پیشگیری از سرطان

الف) شناسایی افراد با ریسک بالا: تست‌های ژنتیکی می‌توانند افراد با ریسک بالای ابتلا به سرطان را شناسایی کنند. برای مثال، زنانی که دارای جهش در ژن‌های BRCA1 یا BRCA2 هستند، ممکن است تصمیم به انجام ماستکتومی پیشگیرانه (حذف بافت پستان) برای کاهش خطر ابتلا به سرطان پستان بگیرند.

ب) مشاوره ژنتیکی: افرادی که در خانواده خود سابقه سرطان دارند، می‌توانند با انجام تست‌های ژنتیکی و دریافت مشاوره ژنتیکی، ریسک ابتلا به سرطان را ارزیابی کرده و اقدامات پیشگیرانه مانند غربالگری‌های زودهنگام یا تغییر در سبک زندگی را انجام دهند.

۴. روش‌های مولکولی مورد استفاده در تشخیص سرطان

الف) توالی‌یابی نسل جدید[1]: این روش امکان بررسی هم‌زمان چندین ژن در یک نمونه را فراهم می‌کند. برای مثال، تست‌های پانل سرطان با استفاده از NGS برای شناسایی جهش‌های مرتبط با سرطان در چندین ژن به‌طور هم‌زمان استفاده می‌شوند. این روش به ویژه در سرطان‌هایی که جهش‌های متعددی دارند، مانند سرطان ریه یا سرطان کولون، مفید است.

ب) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): این روش در تشخیص جهش‌های خاص ژنتیکی در سرطان‌ها کاربرد دارد. برای مثال، شناسایی جهش‌های KRAS در سرطان کولون و یا بررسی جهش‌های BRAF در ملانوما.

ج) FISH: این روش برای بررسی تغییرات کروموزومی خاص، مانند تعداد نسخه‌های ژن HER2 در سرطان پستان، استفاده می‌شود. نتایج FISH

1. Next-Generation Sequencing - NGS

می‌تواند به تعیین درمان مناسب کمک کند.

د) مایع‌زیستی[1]: مایع‌زیستی یک روش غیرتهاجمی است که با استفاده از DNAآزاد توموری (ctDNA) در خون، امکان شناسایی جهش‌های ژنتیکی تومورها را فراهم می‌کند. این روش به ویژه برای مانیتورینگ پاسخ به درمان و شناسایی جهش‌های مقاوم به درمان استفاده می‌شود.

1. Liquid Biopsy

فصل دهم

پروتکل‌های عملی ویژه

مجموعه‌ای از پروتکل‌های تفصیلی برای روش‌های اصلی

الف) پروتکل استخراج DNA ژنومی از خون به روش فنول کلروفرم:

۲ میلی‌لیتر از نمونه خون را داخل یک فالکون ۱۵ میلی‌لیتر بریزید.

توجه داشته باشید نمونه خون حتما باید در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA و فاقد لخته باشد.

دو الی سه برابر حجم خون اولیه (حدود ۶ cc) آب مقطر به فالکون اضافه کنید.

از آنجاییکه گلبول‌های قرمز فاقد هسته هستند و برای استخراج DNA تنها نیاز به گلبول‌های سفید حاوی هسته هست افزودن آب مقطر منجر به تورژسانس سلولی و در نهایت لیز گلبول‌های قرمز می‌شود.

فالکون را به مدت ۵ دقیقه محکم تکان دهید.

نمونه ها را به صورت بالانس داخل سانتریفوژ قرار دهید.

با دور ۵۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ کنید.

مایع رویی را به ارامی و با سر و ته کردن فالکون دور بریزید.

پس از سانتریفوژ گلبول‌های سفید در ته فالکون رسوب کرده و گلبول‌های

قرمز لیز شده در قسمت رویی فالکون قرار می‌گیرند.

به منظور اطمینان از ازبین رفتن کامل گلبول‌های قرمز همان مراحل را تکرار می‌کنیم.

مراحل ۲- ۶ را آنقدر تکرار می‌کنیم تا محلول رویی سفید رنگ شود.

250 میکرولیتر لیز بافر گلبول‌های سفید (SDS10%, Tris EDTA) و ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز k به فالکون اضافه کنید.

فالکون را به مدت ۱۲-۱۶ ساعت (over night) در دمای 37 ℃ و یا یک ساعت در دمای 60 ℃ قرار دهید.

نمونه را به یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتر منتقل کرده ۲۵۰ میکرولیتر فنول به آن بیفزایید.

نمونه را به مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید.

۱۲ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰rpm سانتریفوژ کنید.

فاز رویی را به آرامی جدا کرده داخل یک میکروتیوپ دیگر بریزید.

پس از سانتریفوژ دو فاز کاملا مجزا تشکیل می‌شود که فاز زیرین فاز آلی نامیده می‌شود که حاوی فنول و سایر بقایای سلولی است و فاز رویی فاز آبی نامیده می‌شود که شفاف است و حاوی DNA می‌باشد. بین این دو فاز یک لایه سفید رنگ حاوی پروتئین‌های تجزیه شده قرار می‌گیرد. هنگام کشیدن محلول رویی مواظب باشید از این لایه چیزی وارد فاز آبی نشود.

هم حجم مایع برداشته شده کلروفرم اضافه کنید.

میکروتیوپ را به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوز کنید.

مجددا مایع رویی را برداشته به فالکون جدید منتقل کنید.

۰/۸ برابر حجم مایع رویی برداشته شده پروپانل الکل و ۰/۱ برابر آن

سدیم استات اضافه کنید.

میکروتیوپ را به آرامی چند بار سر و ته کنید. کلاف DNA قابل مشاهده خواهد شد.

به منظور رسوب و جداسازی DNA میکروتیوپ را به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ کنید.

مایع رویی را خالی کرده و DNA را با اتانل ۷۰٪ شستشو می‌دهیم. به این منظور حدود ۲۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۰ درصد به میکروتیوپ اضافه کنید.

میکروتیوپ را با دور ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوز کنید.

مایع رویی را خالی کرده و مجددا شستشو دهید. مراحل ۲۰-۲۱ را تکرار کنید.

پس از خالی کردن الکل، میکروتیوپ را بر روی یه دستمال کاغذی به صورت وارونه قرار دهید تا الکل اضافه گرفته شود سپس به یک هات بلاک منتقل کنید تا الکل به طور کامل تبخیر شود.(می‌توانید میکروتیوپ را در دمای محیط نیز قرار دهید تا کاملا خشک شود.)

توجه داشته باشید که الکل یکی از ممانعت کننده‌های اصلی PCR است.

DNA را داخل ۵۰-۳۰ میکرولیتر TE بافر یا آب مقطر حل کنید.

پس از اندازه گیری خلوص و مقدار DNA جدا شده با استفاده از نانو دراپ به منظور نگهداری DNA جداسازی شده آنرا به فریزر ۲۰- منتقل کنید. به منظور نگهداری طولانی مدت DNA می‌توانید آنرا به فریزر ۸۰- منتقل کنید.

ب) پروتکل استخراج DNA باکتریایی به روش جوشاندن

۳۰۰ میکرولیتر بافر PBS را داخل یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر بریزید.

با استفاده از یک لوپ، یک لوپ پر از باکتری را از محیط کشت برداشته در

بافر PBS درون میکروتیوپ حل کنید.

هنگام کار با باکتری حتما کنار شعله کار کنید. به منظور برداشتن باکتری از محیط کشت ابتدا لوپ را روی شعله استریل نمایید سپس چند دقیقه صبر کنید تا خنک شود می‌توانید با استفاده از لبه محیط کشت لوپ را خنک نمایید.

میکروتیوپ را به مدت ۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰ rpm سانتریفوژ کنید.

با استفاده از میکروپیپت محلول رویی را دور بریزید.

به آرامی اینکار را انجام دهید تا رسوب وارد مایع رویی نشود.

۳۰۰ میکرولیتر بافر TE به هر نمونه اضافه کنید.

بافر TE از آسیب به ساختار DNA باکتری در طی مراحل جداسازی جلوگیری می‌کند.

میکروتیوپ را ورتکس کنید تا باکتری ها داخل بافر حل شوند.

میکروتیوپ را به مدت ۱۰ دقیقه داخل بن ماری آب جوش قرار دهید.

میکروتیوپ را به مدت ۵ دقیقه در فریزر ۲۰- قرار دهید.

به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ کنید.

مایع رویی را که حاوی DNA باکتریایی است به یک ویال جدید منتقل کنید.

DNA جداسازی شده را پس از ارزیابی می‌توانید برای PCR یا انجام مراحل بعدی استفاده کنید و یا در دمای ۲۰- نگهداری نمایید.

ج) پروتکل استخراج RNA از خون به روش ترایزول

۲۵۰ میکرولیتر از خون تازه تهیه شده را داخل یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر بریزید.

۵۰۰ میکرولیتر محلول ترایزول به آن اضافه می‌کنیم.

تیوپ ها را چند ثانیه ورتکس کنید تا ترایزول به طور کامل با نمونه خون هموژن گردد.

به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط قرار دهید.

۱۵۰ میکرولیتر کلروفرم به هر نمونه اضافه کنید.

نمونه هرا را محکم تکان دهید تا کاملا همگن شود.

نمونه ها را به مدت ده دقیقه در دمای محیط قرار دهید.

نمونه ها را در سانتریفوژ یخچال دار با دمای 4 ̊c به مدت ۱۵ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ کنید.

۳۰۰ میکرولیتر از محلول رویی را با میکروپیپت برداشته به یک میکروتیوپ جدید منتقل کنید.

پس از سانتریفوژ سه فاز تشکیل می‌شود. فاز رویی که بیرنگ و حاوی RNA هست. فاز میانی که سفید رنگ و حاوی DNA هست و فاز آلی پایین که تیره رنگ است و حاوی مواد آلی و پروتئین ها می‌باشد.

هم حجم محلول برداشته شده الکل ایزوپروپانل اضافه کنید.

نمونه ها را چند بار به آرامی سر و ته کنید. مایع کدر رنگ می‌شود.

میکروتیوپ ها را به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ کنید.

محلول رویی را با سر و ته کردن دور بریزید.رسوب تشکیل شده حاوی RNA می‌باشد.

رسوب را با اتانل شستشو دهید. به این منظور ۵۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۰٪ به هر نمونه اضافه کنید.

میکروتیوپ ها را چند بار سر و ته کنید تا رسوب کنده شود.

۵ دقیقه با ۱۴۰۰۰RPMسانتریفوژ کنید.

الکل رویی را خالی کرده مجددا شستشو دهید.

پس از خالی کردن الکل میکروتیوپ را بر روی یه دستمال کاغذی به صورت وارونه قرار دهید تا الکل اضافه گرفته شود سپس به داخل هات بلاک منتقل کنید تا الکل کاملا تبخیر شود.

۲۰ میکرولیتر اب دپس (DEPC Water) به آن اضافه کرده ۴-۵ دقیقه در دمای محیط قرار دهید تا RNA کاملا در اب حل شود.

خلوص و مقدار RNA را با استفاده از نانو دراپ اندازه گیری کنید.

RNA استخراج شده را به فریزر ۲۰- منتقل کنید.

چ) پروتکل استخراج RNAاز سلول کشت داده شده:

زمانی که کف فلاسک از سلول پر شد (حداقل 10^6 سلول)، محیط کشت را خارج کرده و یک بار با PBS سرد (۱-۲ میلی لیتر) بشویید.

PBS را خارج کرده (تا حد ممکن حذف کنید) و 1میلی لیتر محلول ترایزول اضافه کنید.

کف فلاسک را به طور کامل خراش دهید.

محتوای فلاسک را درون یک لوله ۱/۵ میلی لیتری انتقال دهید.

به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق بگذارید.

۲۵۰ میکرولیتر کلروفرم را اضافه کرده و لوله را به مدت ۱۵ ثانیه با شدت تکان دهید.

به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق بگذارید.

به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpm سانتریفوز کنید.

با دقت فاز آبی را با استفاده از پیپت جدا کرده و در یک لوله ۱/۵ میلی لیتری دیگر بریزید.

سعی کنید این کار را با میکروپیپت‌های کوچکتر انجام دهید. با داشتن پیپت

بزرگتر، کنترل میزان و نیرو ترشح مایعات سخت تر است و احتمال مخلوط شدن بعضی از فازهای آلی یا DNA را افزایش می‌دهد.

۵۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول را به فاز آبی اضافه کرده و به آرامی مخلوط کنید.

به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق بگذارید.

به مدت ۲۵ دقیقه با دور ۱٤۰۰۰rpm سانتریفیوژ کنید.

نمونه ها را روی یخ قرار دهید. ایزوپروپانول را دور ریخته و با اتانل ۷۰٪ شستشو دهید.

به منظور شستشو ۵۰۰ میکرولیتر اتان ۷۰٪ به هر نمونه اضافه کنید.

میکروتیوپ ها را چند بار سر و ته کنید تا رسوب کنده شود.

به مدت ۵ دقیقه در ۱٤۰۰۰rpm سانتریفوز کنید.

الکل رویی را خالی کرده مجددا شستشو دهید.

پس از خالی کردن الکل میکروتیوپ را بر روی یه دستمال کاغذی به صورت وارونه قرار دهید تا الکل اضافه گرفته شود سپس به داخل هات بلاک منتقل کنید تا الکل کاملا تبخیر شود.

۲۰ میکرولیتر اب دپس (DEPC Water) به آن اضافه کرده ۵-۴ دقیقه در دمای محیط قرار دهید تا RNA کاملا در اب حل شود.

خلوص و مقدار RNA را با استفاده از نانو دراپ اندازه گیری کنید.

نسبت ۲٦۰/۲۸۰ OD باید بیشتر از ۱/۸ باشد. اگر کمتر از ۱/۵ یا ۱/٦ باشد،RNA احتمالاً تا حدی تخریب شده است. نسبتهای پایین تر همچنین آلودگی به DNA یا تیوسیانات را نشان می‌دهند.

RNA استخراج شده را به فریزر ۲۰- منتقل کنید.

ح) پروتکل پایه PCR

1) مواد واکنش PCR را داخل یک میکروتیوپ‌های PCR بریزید. برای یک واکنش با حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر مواد واکنش حاوی موارد زیر خواهد بود:

نام ماده	مقدار(میکرو لیتر)
بافر pcr	۲/۵
Dntp	۰/۵
MgCl2	۰/۷۵
پرایمر فوروارد	۱
پرایمر ریورس	۱
آنزیم Taq Dna polymerase	۰/۲
DNA	۱
اب مقطر	۱۸/۰۵
حجم نهایی واکنش	۲۵

بهتر است ابتدا به تعداد نمونه‌های موجود مستر میکس را داخل یک میکروتیوپ بزرگتر آماده کنید (مستر میکس شامل تمام مواد واکنش منهای نمونه DNA می‌باشد) و پس از مخلوط و اسپین کردن داخل میکروتیوپ‌های pcr تقسیم کرده و DNA نمونه مورد نظر را اضافه نمایید. همیشه یک واکنش برای نمونه کنترل مثبت و یک واکنش برای نمونه کنترل منفی در نظر بگیرید.

2) میکروتیوب ها را اسپین کنید.

3) میکروتیوب ها را داخل دستگاه ترموسایکلر قرار دهید.

4) برنامه مربوط به ران واکنش مورد نظر را وارد کنید.

برنامه پایه پیشنهادی برای PCR به شرح ذیل است:

دناتوراسیون اولیه، 95 درجه سلسیوس، ۵ دقیقه، فقط سیکل اول

دناتوراسیون، 95 درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه

دمای اتصال پرایمر (انلینگ)، ۶۰-۵۰ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه

دمای طویل سازی (اکستنشن)، ۷۲ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه

تکرار چرخه از مرحله ۲ تا ۴ به تعداد ۲۹ سیکل (۲۹×)
طویل سازی نهایی، ۷۲ درجه سلسیوس، ۵ دقیقه، فقط سیکل آخر
نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس

خ) نحوه الکتروفورز DNA
تهیه ژل آگارز
قالب ژل را آماده کنید.
شانه اي با دنده هاي مناسب روي قالب قراردهید.
حجم ژل مورد نظر را تعیین کنید. (اندازه گیري طول وعرض قالب و قطر ژل مورد نظر)
پودر آگارز را وزن کنید. (مثلا برای تهیه ۵۰ سی‌سی ژل آگارز ۲٪، یک گرم پودر آگارز را وزن کرده در ۵۰ سی‌سی بافر حل کنید)
آگارز را در بافر TAE یا x1 TBEحل کنید و آن را حرارت دهید تا پودر آگارز کاملا در آن حل شود.
اجازه دهید اندکی در دمای محیط خنک شود نباید ژل شروع به سفت شدن نماید.
به ازاي هر ۱۰ میلی لیتر ژل یک میکرولیتر از محلول ۱۰ml/mgاتیدیوم بروماید یا سیف استین اضافه کنید.
سپس آن را خوب مخلوط کرده و داخل قالب بریزید.
بعد از بسته شدن ژل شانه را به آرامی خارج کنید تا آسیبی به چاهک ها وارد نشود.
ژل را داخل تانک الکتروفورز قرار دهید.
تانک الکتروفورز باید از همان بافری که برای ساخت ژل استفاده شده پر

شده باشد.

هر ۵ میکرولیتر نمونه را با یک میکرولیتر لود بافر مخلوط کرده و داخل چاهک‌های ژل بریزید. یک چاهک را نیز به نردبان DNA (لدر) اختصاص دهید.

سیمهاي تانک الکتروفورز به پاورساپلاي (منبع تغذیه) متصل و دستگاه روي ۸۰ ولت تنظیم و به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز کنید.

پس از اتمام الکتروفورز دستگاه را خاموش نموده، ژل را روي دستگاه ترانس ایلومیناتور قرار داده و با بستن درب محافظ دستگاه و استفاده از عینک مخصوص باندها را مورد بررسی قرار دهید.

قدرت جداسازي مولکولهاي DNA توسط غلظتهاي مختلف آگارز

در صد آگارز	قدرت جداسازی DNA (bp)
3	100-1000
2	200-1500
1.5	300-3000
1	500-5000
0.8	1000-7000
0.6	kbp 30-10
0.4	kbp 30-50

د) طرز تهیه بافر TAE (50×)

1) در یک ظرف یک لیتری مواد زیر را با هم مخلوط کنید:

تریس بیس (Tris- base) ۲۴۲ گرم

اسید استیک گلایسیال ۵۷/۱ میلی‌لیتر

EDTA ۰/۵ مولار ۱۰۰ میلی لیتر

2) حجم محلول را با استفاده از آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی لیتر (یک لیتر)

برسانید.

3) این بافر در دمای اناق قابل نگهداری است.

4) هنگام استفاده با آب مقطر دوبار تقطیر رقیق کرده (1× شود) و استفاده نمایید.

EDTA PH مورد استفاده برای ساخت بافر باید ۸ باشد. PH این بافر تغییر نمی کند و نیازی به تنظیم ندارد و باید حدود ۸/۵ باشد.

ذ) طرز تهیه بافر TBE (50×)

1)در یک ظرف یک لیتری مواد زیر را مخلوط نمایید:

تریس ۵۴ گرم

بوریک اسید ۲۷/۵ گرم

0.5 EDTA مولار ۲۰۰ میلی لیتر

2) حجم محلول را با استفاده از آب مقطر به یک لیتر برسانید.

3) PH محلول را بر روی ۸/۳ تنظیم نمایید.

ر) طرز تهیه EDTA ۰/۵ مولار

مقدار ۱۸۶/۱۲ گرم EDTA را وزن کرده و در یک لیتر آب مقطر حل کنید. سپس PH محلول را روی ۸ تنظیم نمایید.

ژ) طرز تهیه بافر ۱X از بافر ۵۰X

به این منظور از فرمول $C1 \times V1 = C2 \times V2$ استفاده می‌شود. به عموان مثال برای تهیه ۳۰۰ میلی لیتر بافر 1x TAE، ۶ میلی لیتر از بافر استوک ۵۰x

برداشته و با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر به حجم ۳۰۰ میلی لیتر می‌رسانیم.

$$50 \times V1 = 300 \times 1$$

$$V1 = 300/50$$

$$V1 = 6$$

مراجع

Alberts, B., et al. Molecular Biology of the Cell. Garland Science.

Asude Alpman Durmaz, 2015, Evolution of Genetic Techniques: Past, Present, and Beyond, BioMed Research International

Ausubel, F. M. et al. (1995). Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (2002). Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons.

Ausubel, F. M., et al. (2003). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Son.

Avery, O. T., MacLeod, C. M., & McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Journal of Experimental Medicine, 79(2), 137–158.

Berg, P., & Singer, M. F. (1995). The recombinant DNA controversy: Twenty years later. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92(20), 9011–9013.

Bianchi, D. W., et al. (2014). Noninvasive prenatal testing and fetal aneuploidy. New England Journal of Medicine, 370(9), 799–808.

Carroll, S. G., et al. (2003). Fetal blood sampling. Prenatal Diagnosis, 23(2), 107–112.

Collins, F. S., & McKusick, V. A. (2001). Implications of the human genome project for medical science. Journal of the American Medical Association, 285(5), 540–544.

Dorak MT. Real-Time PCR. Garland Science.

Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineer-

ing with CRISPR-Cas9. Science, 346(6213), 1258096.

G. B. Stewart, 2003, The Kid Haven Science Library: "Microscopes",Kid Heaven Press, Farmington Hills, Mich, USA..

Garraway, L. A., & Lander, E. S. (2013). Lessons from the cancer genome. Cell, 153(1), 17-37.

Gelehrter, T.D., Collins, F.S., Ginsburg, D. (2010). Principles of Medical Genetics. Lippincott Williams & Wilkins

Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nature reviews genetics, 17(6), 333-351.

Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 144(5), 646-674.

Hartl, D. L., & Ruvolo, M. (2011). Genetics: Analysis of Genes and Genomes. Jones & Bartlett Learning.

Henig, R. M. (2000). The Monk in the Garden: The Lost and Found Genius of Gregor Mendel, the Father of Genetics. Houghton Mifflin Harcourt.

Hunkapiller, T., Kaiser, R. J., Koop, B. F., & Hood, L. (1991). Large-scale and automated DNA sequence determination. Science, 254(5028), 59-67.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science, 337(6096), 816-821.

Jones, G., Gilligan, J. P., & Dawkins, P. (2012). Laboratory Instrumentation: Basic Concepts and Applications. Wiley-Blackwell.

Korf, B.R., Irons, M.B. (2013). Human Genetics and Genomics, Includes Wiley E-Text. Wiley-Blackwell.

Kubista M, et al. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 2006

Lehmann, S., Delaby, C., Vialaret, J., Ducos, J., & Hirtz, C. (2014), Current and future use of biomarkers for risk stratification in acute coronary syndromes. Annals of Clinical Biochemistry, 51(5), 499-511.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Res. 2002

Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 9, 387-402.

Mendel, G. (1865). Experiments in plant hybridization. In Proceedings of the Natural History Society of Brü nn. (Vol. 4, pp. 3-47).

Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. Nature reviews genetics, 11(1), 31-46.

Nirenberg, M. W., & Matthaei, J. H. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in E. coli upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. Proceedings of the National Academy of Sciences, 47(10), 1588-1602.

Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F. (2007). Thompson & Thompson Genetics in Medicine. Elsevier.

Olby, R. (2009). Francis Crick: Hunter of Life's Secrets. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Olby, R. C. (1985). Origins of Mendelism. University of Chicago Press.

Oxford Academic: Nucleic Acid Isolation and Hybridization Techniques.

Rio, D. C., et al. (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). Cold Spring Harbor Protocols, 2010(6), pdb-prot5439.

Rosenfeld, L. (2012). Discovery and early uses of DNA. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 72(sup244), 5-9.

Rupani, P. F., & Nawaz, M. (2020). Design and setup of molecular biology lab-

oratories: Concepts, challenges, and future directions. Journal of Biomedical Science and Engineering, 13(5), 105-115.

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Springer: Nucleic Acid Hybridization Techniques for Viral Disease Diagnosis, 2023.

Strachan, T., & Read, A. Human Molecular Genetics. Garland Science.

Tabor, A., & Alfirevic, Z. (2010). Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. Fetal Diagnosis and Therapy, 27(1), 1-7.

U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), National Institutes of Health (NIH). (2020). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL), 6th Edition.

U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2021). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) (6th Edition).

Vogelstein, B., & Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. Nature Medicine, 10(8), 789-799.

Wapner, R. J., et al. (2000). Chorionic villus sampling versus amniocentesis for prenatal diagnosis. New England Journal of Medicine, 340(9), 595-603.

Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1953). Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature, 171(4356), 737-738.

Willems, L., & Lefever, S. (2019). Guidelines for organizing a molecular biology laboratory. Journal of Molecular Diagnostics, 21(5), 778-787.

Wilson, K. (2001). Preparation of genomic DNA from bacteria. In Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons.

World Health Organization (WHO). (2004). Laboratory Biosafety Manual, 3rd Edition.

World Health Organization (WHO). (2011). Laboratory Quality Management System: Handbook.

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., & Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. Nucleic Acids Research, 32(12), e103.