University of Isfahan

Faculty of Biological Science and Technology

Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology

Farzaneh Forouharfar

عنوان:

آنالیز محصولات PCR

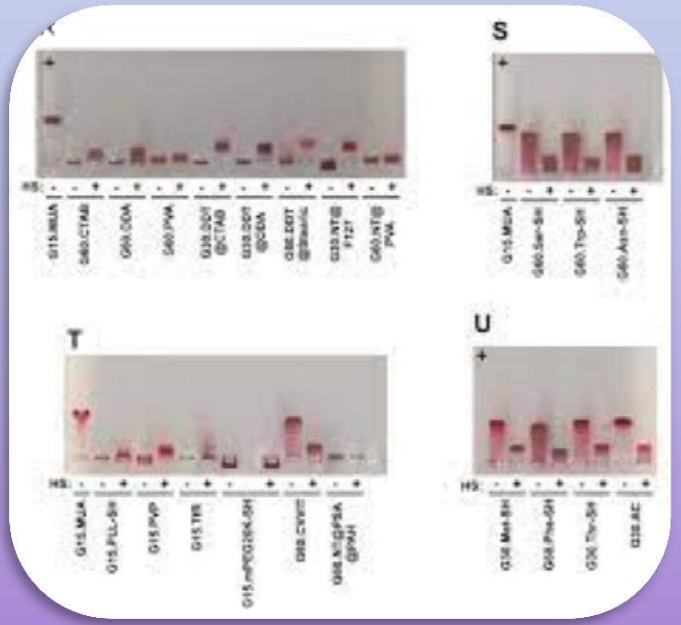
Analysis of PCR products

Farzaneh Forouharfar

اهداف آزمایش

- ✓ آنالیز محصولات PCR بر روی ژل آگارز
- ✓ تعیین غلظت و خلوص محصول PCR با اسپکتروفوتومتر

مقدمه



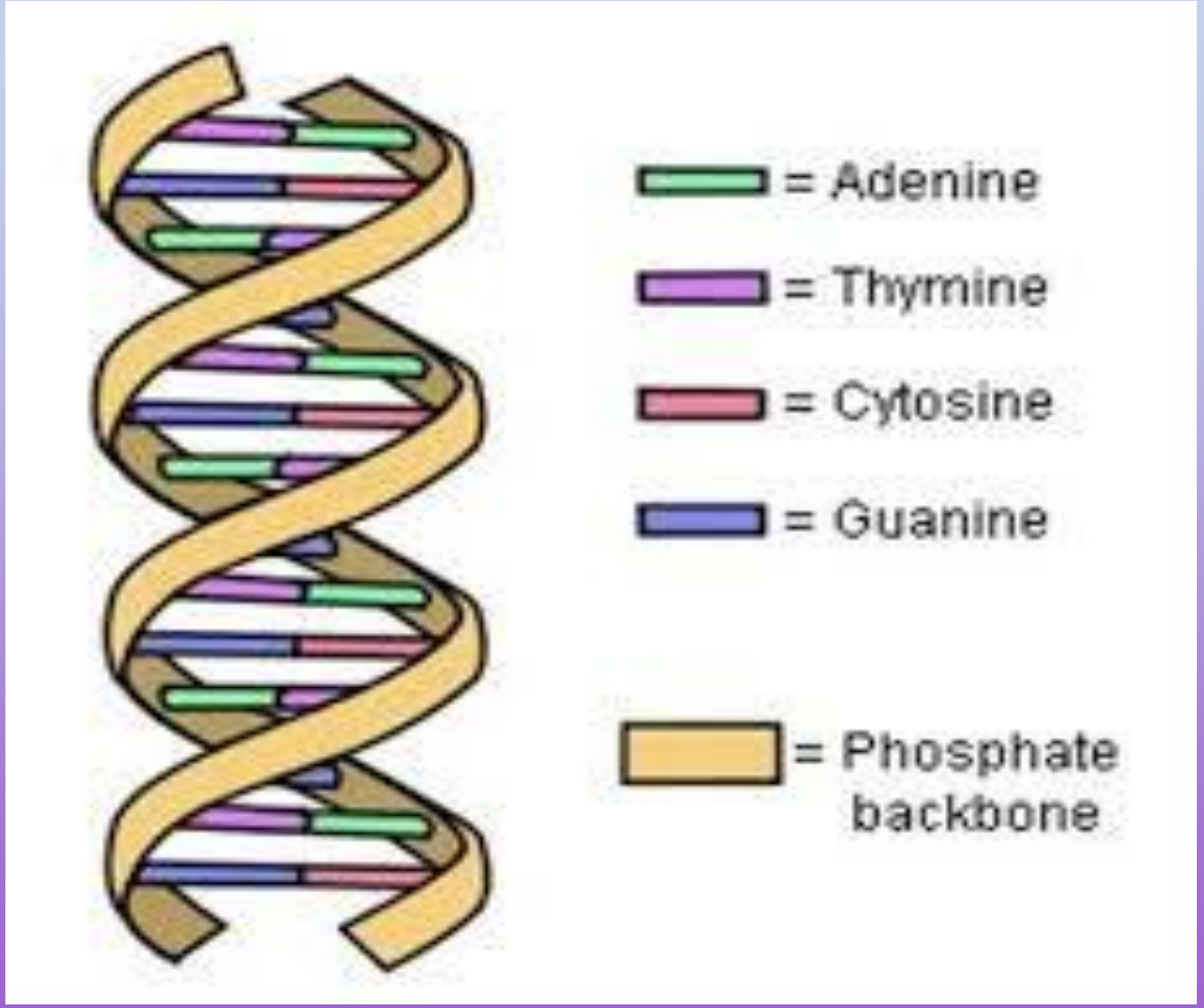
روش‌های مختلف الکتروفورزی برای تفکیک و مطالعه بیومولکول‌ها اعم از اسیدهای نوکلئیک یا پروتئین‌ها ابداع شده است. انواع متداول آن‌ها عبارتند از:

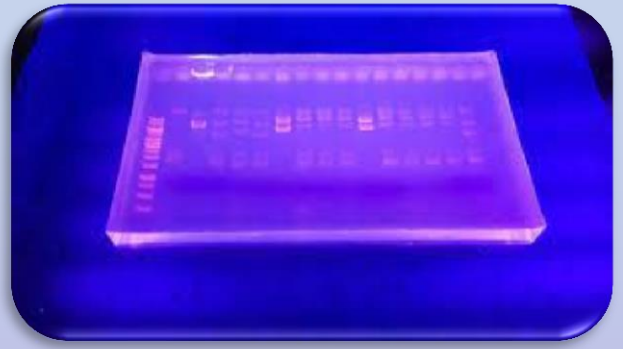
الکتروفورز سطحی (surface electrophoresis) که از یک نوار کاغذی یا استات سلولزی به‌عنوان فاز ثابت استفاده می‌شود؛ و الکتروفورز (gel electrophoresis) که از یک محیط نیمه جامد (ژل)، به‌عنوان فاز ثابت استفاده می‌شود که برحسب نوع ژل به کار گرفته شده متفاوت است. برای تفکیک اسیدهای نوکلئیک از ژل آگارز استفاده می‌شودکه تهیه‌ی آن سریع و راحت بوده و نسبت به ژل‌های دیگر هزینه‌ی کمتری را در بر می‌گیرد. معمولا برای تفکیک قطعات بزرگ دنا (بزرگ‌تر از 500 جفت باز) در صورتی که هدف صرفا بررسی کیفی و تفکیک باشد؛ استفاده از آگارز، ارجح است. معمولا برای تفکیک قطعات کوچک‌تر از 100 جفت باز از آگارز 3 درصد و برای قطعات بزرگ‌تر از 500 جفت باز از آگارز 0.8 درصد استفاده می‌شود.

اگر نیاز به تفکیک دنا به صورت تک‌رشته‌ای باشد؛ مواد denature کننده مثل اوره یا فرمالدهیددر ژل همزمان با الکتروفورز استفاده می‌شود. این ژل‌ها پیچ و تاب‌های اسیدهای نوکلئیک را از هم باز کرده و تفکیک مولکول‌ها براساس طول آن‌ها انجام می‌شود. مولکول‌های کوچک‌تر در مقایسه با مولکول‌های بزرگ‌تر، سریع‌تر حرکت کرده و مسافت بیشتری را طی می‌کنند.

برای مشخص کردن مولکول‌های تفکیک شده در الکتروفورز از روش‌های رنگ‌آمیزی استفاده می‌شود. برای دنا از اتیدیوم برماید (EtBr) و آکریدین نارنجی، متیلن بلو، ریبوفلاوین و یا پروبیدیوم یداید (PI) استفاده می‌شود. مواد رنگ‌کننده‌ی دنا بین دو رشته‌ی آن قرار گرفته و از این رو فقط می‌توان مولکول‌های دورشته‌ای را مشاهده کرد.

برای رنگ‌آمیزی دنای تفکیک شده بر روی ژل آکریل‌آمید نیز از رنگ‌آمیزی نقره (silver staining) استفاده می‌شود که هم دنای دورشته‌ای و هم تک‌رشته‌ای را به رنگ قهوه‌ای پررنگ، رنگ می‌کند.


= Adenine
= Thymine
= Cytosine
= Guanine
= Phosphate backbone



مواد و محلول‌های لازم:

1- یک لیتر بافر 10xTBE شامل:

تریس 108 گرم، اسید بوریک 55 گرم، محلول 0.5 مولار EDTA با pH=8

40 میلی‌لیتر مواد فوق با آب مقطر به حجم 1 لیتر رسانیده می‌شود؛ و هنگام مصرف 10 برابر رقیق می‌گردد (این محلول قابل اتوکلاو می‌باشد).

2- محلول اتیدیوم برماید (10 میلی‌گرم در میلی‌لیتر)

(هنگام استفاده 10 میکرولیتر از این محلول به 100 میلی‌لیتر از 1xTBE اضافه می‌گردد).

توجه: محلول فوق به شدت سمی و سرطان‌زا است و هنگام کار با آن بایستی حتما از دستکش استفاده کرد.

3- ژل آگارز

به مقدار موردنیاز بسته به درصد ژل پودر آگارز در 100 میلی‌لیتر بافر 1xTBE تهیه می‌گردد. برای تهیه‌ی ژل 0.8 درصد مقدار 0.8 گرم پودر آگارز در 100 میلی‌لیتر بافر 1xTBE حل می‌شود.

4- لودینگ بافر شامل:

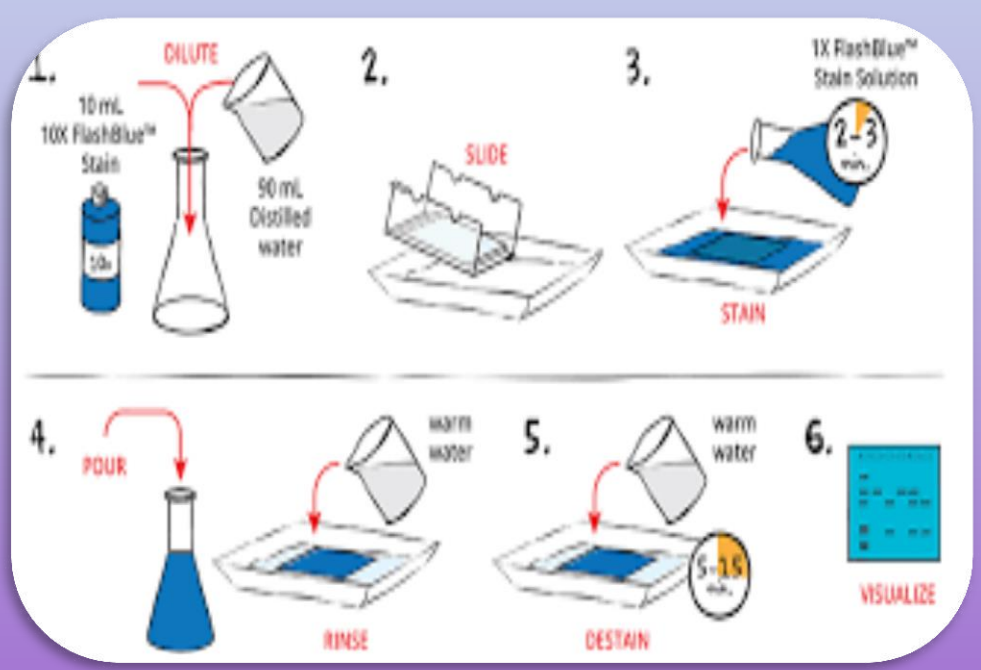
0.09 درصد برومونفل بلو، 0.09 درصد گزیلن سیانول

و 10 درصد گلیسیرین.

5-دنای حاصل از PCR

وسایل لازم:

دستگاه کامل الکتروفورز، منبع تغذیه، سپلر و سرسمپلر، شعله، همزن، لوله‌های اپندرف استریل


1.
DILUTE
10 mL
10X FlashBlue™
Stain
90 mL
Distilled
water
2.
SLIDE
3.
1X FlashBlue™
Stain Solution
2-3
min.
STAIN
4.
POUR
warm
water
RINSE
5.
warm
water
5-10
min.
DESTAIN
6.
VISUALIZE

روش کار:

1- ژل را با غلظت 0.8 درصد تهیه کنید.

2- دستگاه الکتروفورز را تنظیم و شانه را در فاصله 1 میلی‌متری از کف و نیم تا 1 سانتی‌متری از سر قالب قرار دهید.

3- ژل را در سینی ژل بریزید و تا منقعدشدن آن صبر کنید.

4- پس از آماده شدن ژل آن را در تانک الکتروفورز حاوی بافر 1xTBE قرار دهید به طوری که بافر روی ژل را بپوشاند.

5- در یک لوله‌ی اپندرف تمیز و استریل، 5 میکرولیتر محصول PCR را با 1 میکرولیتر لودینگ بافر مخلوط کرده و در چاهک‌ها منتقل کنید.

6-الکتروفورز محصول PCR را در اختلاف پتانسیل ثابت 100-90 ولت انجام دهید.

توجه: جهت تعیین غلظت و خلوص محصول PCR مطابق با روش توضیح داده شده در جلسه‌ی چهارم عمل کنید.

سوالات:

1- در صورت اضافه نکردن اتیدیوم برماید به ژل قبل از انجام الکتروفورز، چه راهی برای رنگ‌آمیزی دنا بعد از الکتروفورز پیشنهاد می‌کنید؟

2- در روش PCR مراحل مختلف را توضیح داده و بیان نمایید چرا با بالا رفتن دما از annealing به extension پرایمرها از محل خود جدا نمی‌شوند؟