University of Isfahan

Faculty of Biological Science and Technology

Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology

Farzaneh Forouharfar

تعیین نقشه ی ژنی با هضم آنزیمی

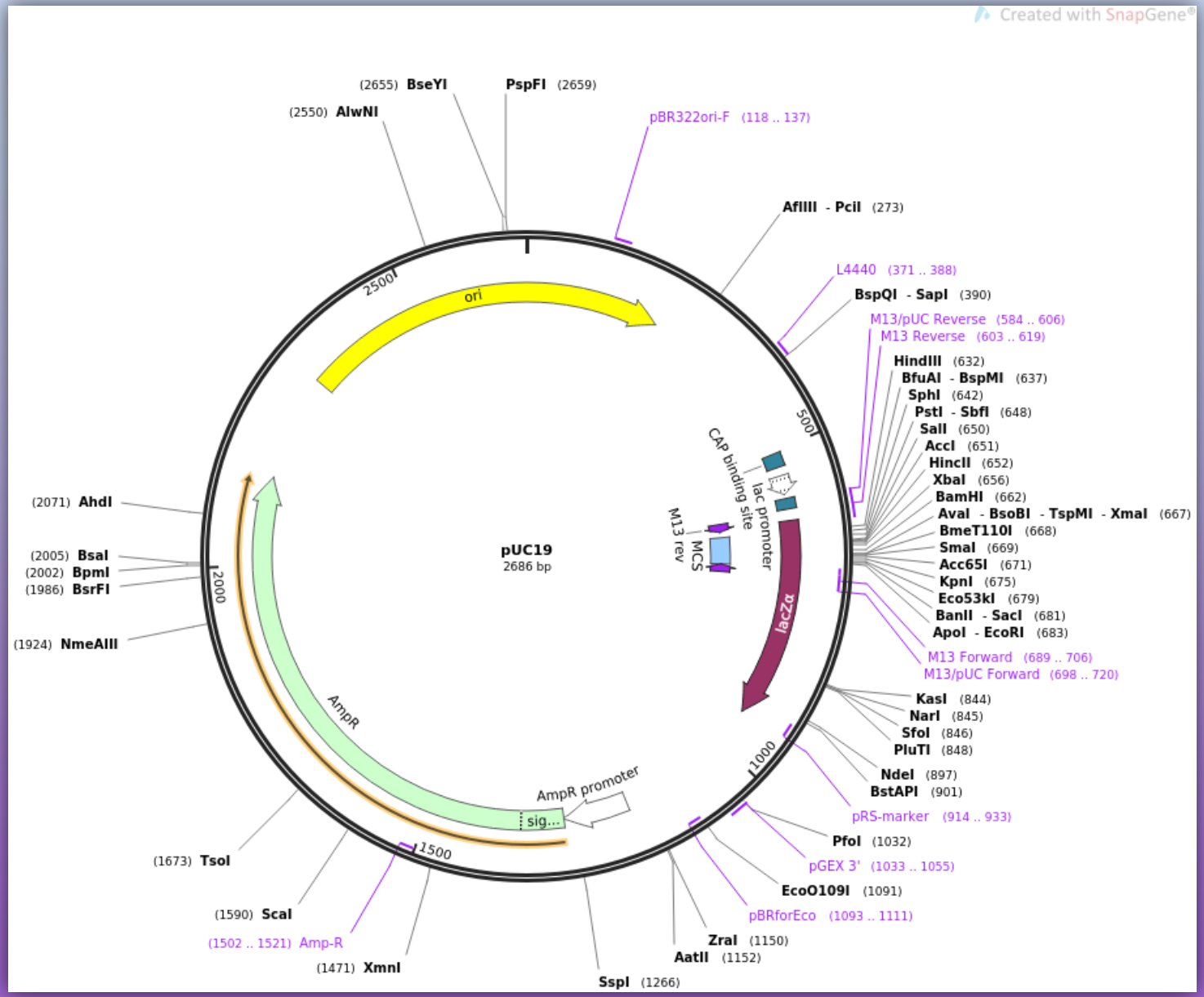
Restriction Mapping

Farzaneh Forouharfar

✓ اهداف آزمایش

- تهیه ی ژل آگارز
- آنالیز دنای پلاسمیدی
- تعیین وزن مولکولی قطعات DNA
- تعیین نقشه ی ژنتیکی تقریبی برای پلاسمید PUC19و لاندا DNA

- ساختمان پلاسمید PUC19.



Farzaneh Forouharfar

مقدمه

همانطور که می‌دانید ساختمان اصلی کلیه ی رشته‌های دنا مشابه است یعنی بصورت نردبان‌هایی هستند که ستون‌های آن‌ها را قندها و فسفات‌ها و پله‌های آن را بازهای آلی A, T, C و Gتشکیل می‌دهند. تفاوت اصلی رشته‌های دنا درواقع، در توالی بازهای آلی است. از راه‌های بررسی تفاوت مولکول‌های دنا تعیین توالی بازهای دنا است. همینطور با استفاده از آنزیم‌های اندونوکلئاز محدودالاثر (Restriction Endonuclease) می‌توان به بررسی ماهیت قطعات دنا و پلاسمیدها پرداخت. بنابراین پس از استخراج دنای پلاسمیدی (که در جلسه ی قبل انجام شد) به پنظور بررسی ماهیت آن می‌توان از آنزیم‌های محدودکننده استفاده نمود. سپس دنای هضم شده را بر روی ژل آگارز تکفیک و بررسی نمود. در زیر به طور مشروح راجع به آنزیم‌های محدودکننده و انواع برش‌های ایجاد شده توسط آن‌ها توضیح داده شده است.

- **آنزیم‌های محدودکننده (Restriction Enzymes)**

- این آنزیم‌ها قادر هستند دنا را در نقاط بخصوصی برش دهند. این نقاط معمولا دارای توالی ۴_۶ جفت باز هستند. بدیهی است برحسب اینکه توالی مورد شناسایی آنزیم چند بار در طول رشته ی دنا تکرار شده باشد، رشته ی دنا به قطعات مختلفی شکسته می‌شود. یکی از مهم‌ترین خصوصیات این توالی‌های ۴_۶ جفت بازی این است که به صورت قرینه می‌باشند. این قرینه‌ها اصطلاحا پالیندروم (palindrom) نامیده می‌شوند و به زبان یونانی به معنی کلمه یا عبارتی است که اگر از چپ به راست یا از راست به چپ خوانده شود، معنی آن یکسان باشد. به این توالی‌های نوکلئوتیدی خاص که توسط اندونوکلئنازها شناسایی می‌شوند توالی شناسایی (Recognition Sequence) گفته می‌شود.

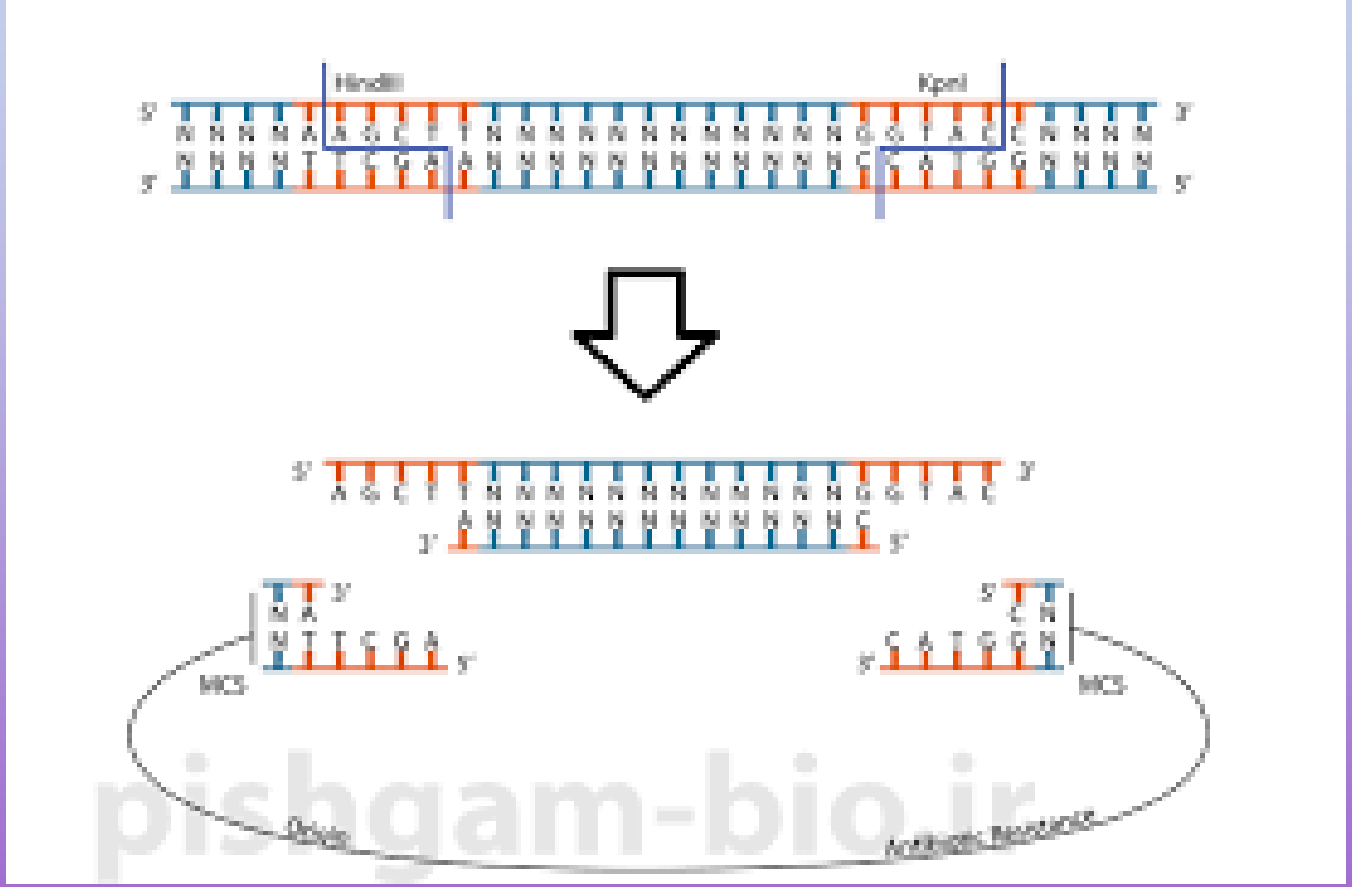
- منشاء اکثر آنزیم‌های محدودکننده باکتری‌ها می‌باشند و تا بحال بیش از ۲۰۰ نوع آنزیم محدودکننده شناسایی و جداسازی شده است و توالی مورد شناسایی آن‌ها نیز تعیین گردیده است. این آنزیم‌ها بر اساس نام سویه ی باکتریایی که از آن استخراج شده اند نامگذاری می‌شوند، مثلا آنزیم EcoRIاز باکتری اشرشیاکلای سویه ی Rاستخراج شده و پسوند عددی آن به این مفهوم است که این آنزیم، اولین آنزیم اندونوکلئازی اسن که از باکتری اشرشیاکلای جداسازی شده است، اسن آنزیم توالی زیر را شناسایی می‌کند:

- ___CAATTG___
- ___GTTAAC___

- یا آنزیم Hind IIIکه از باکتری *Haemophilus influenzae* سویه ی Dجدا شده و سومسن اندونوکلئاز از این باکتری است و توالی زیر را شناسایی می کند:

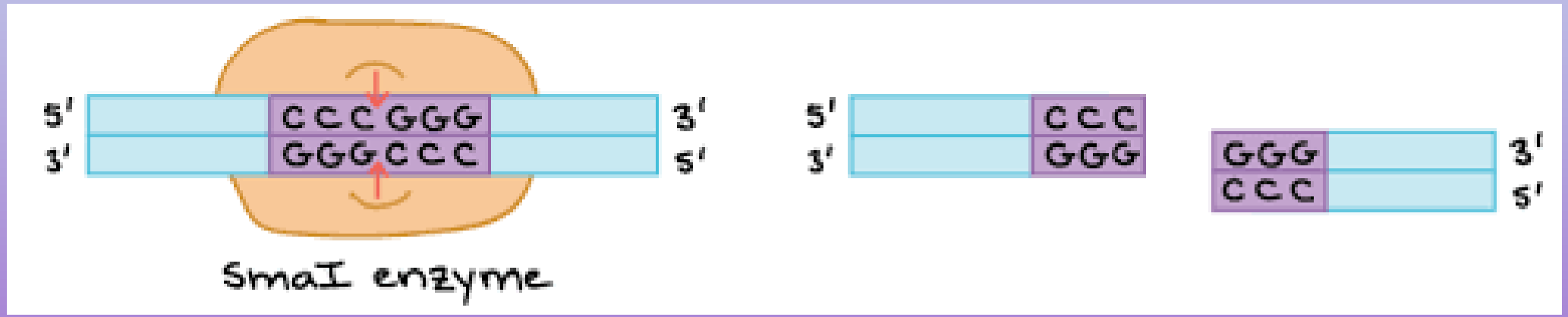
- ___TTGGAA___
- ___AACCTT___

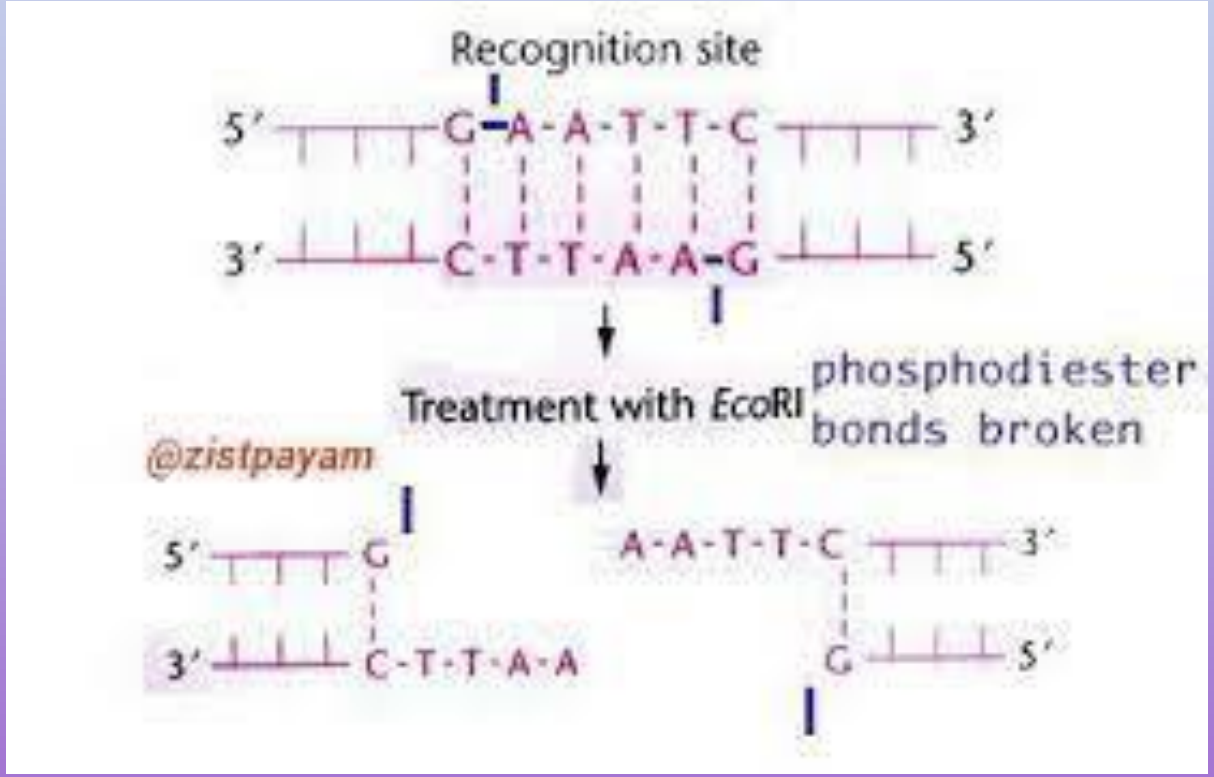
- **انواع برش‌های ایجاد شده بوسیله ی آنزیم های محدودکننده**



Farzaneh Forouharfar

- عموما دو نوع برشتوسط این آنزیم‌ها ایجاد و منجر به تولید دو سری مختلف از قطعات دنا می گردد.
- ۱_ انتهای چسبناک: این برش‌ها توسط آنزیم‌هایی شده EcoRIو HindIIIایجاد می‌شود. این آنزیم‌ها به وفور در مهندسی ژنتیک کاربرد دارند، چرا که توسط این آنزیم‌ها قطعاتی حاصل می‌شود که پس از برش در انتها تک رشته ای هستند و قادر هستند توسط پیوندهای هیدروژنی مجددا اتصال برقرار کنند. (شکل ۱_۴)
- ۲_ انتهای صاف (Blunt end): این برش‌ها توسط آنزیم‌هایی مثل HapIو SmaIایجاد و برعکس آنزیم‌های قبلی رشته ی دنا را بطور عمودی برش می‌دهند و قطعاتی با انتهای صاف بوجود می‌آورند که قادر به اتصال مجدد به هم نمی‌باشند.


5′
3′
C C C G G G
G G G C C C
3′
5′
SmaI enzyme
5′
3′
C C C
G G G
G G G
C C C
3′
5′



Farzaneh Forouharfar

- **بررسی محصولات هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز**

- رسته‌های دنای حاصل از عملکرد آنزمی‌های اندونوکلئاز توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز قابل بررسی می‌باشد. الکتروفورز بر روی ژل آگارز اولین بار توسط Daniel Nathansدر سال ۱۹۷۰ معرفی شد. در این روش مولکل‌های دنا بر اساس بارالکتریکی و وزن مولکولی در یک محیط مناسب تحت تأثیر میدان الکتریکی حرکت کرده و تفکیک می‌شوند. اسیدهای نوکلئیک به دلیل دارا بودن گروه‌های فسفات دا ای بار الکتریکی منفی هستند و در ژل آگارز در بافر مناسب در یک میدان الکتریکی به سمت قطب مثبت حرکت می‌کنند. ژل مانند یک غربال مولکولی عمل کرده و قطعات دنا ضمن حرکت بر روی ژل، ب اساس شکل و اندازه از یکدیگر جدا می‌شوند. قابلیت تفکیک ژل آگارز با غلظت آن رابطه ی مستقیم و با طول قطعه ی جداشده نسبت معکوس دارد. به طوریکه هزچه غلظت ژل بیش‌تر باشد، قطعات کوچک‌تر بهتر تفکیک می‌شوند.

- برای مثال غلظت ژل موردنیاز برای جداسازی مولکول دنا به طول 2kbpبه مراتب کمتر از غلظت ژل بکار گرفته شده برای دنا به طول 200bpاست. سرعت حرکت قطعات سبک‌تر از قطعات سنگین‌تر بیش‌تر است و به همین دلیل قطعات مختلف دنا از هم جدا می‌شوند و نوارهای مختلفی را تشکیل می‌دهند. با استفاده از قطعات شاهد با وزن مولکولی مشخص می‌توان قطعات مجهول را پیدا کرد.

- لازم به ذکر است که برای مشاهده ی دنا روش‌های مختلفی وجود دارد. متداول‌ترین روش رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید و مشاهده توسط دستگاه اولتراوایوله (UV) می‌باشد. اتیدیوم بروماید یک ماده چند حلقه‌ای است و قادر است به بازهای آلی متصل شود. ماده ی مزبور به تنهایی فاقد خاصیت فلورسانس است اما پس از اتصال به باز آلی دارای این خاصیت شده و در مقابل نور UVبه رنگ نارنجی دیده می‌شود. (توجه کنید که این ماده به شدت سمی و سرطان‌زا می‌باشد، هنگام استفاده از آن حتما از دستکش استفاده کنید)

- را هدیگر مشاهده ی دنا استفاده از خاصیت رادیواکتیو است مثل اضافه کردن فسفر و یا کربن رادیواکتیو به مولکول دنا در شکل ۲_۴ نمایش شماتیک الکتروفورز بر روس ژل آگارز را نشان می‌دهد. نمایش گرافیکی محل‌های شناسایی (Restriction sites) دنا توسط آتزیم‌های اندونوکلئاز را Restriction mapمی‌نامند (شکل ۳_۴).

مواد و محلول‌های مورد نیاز:

- بافرTBE (تریس_هیدروکلراید، اسیدبوریک، EDTA) بافر لودینگ، اتیدیوم بروماید (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، آگارز، آب مقطر استریل، آتزیم محدودکننده (برحسب نوع پلاسمید مورد آزمایش متفادت می‌باشد)، بافر مخصوص آنزیم (×۱۰) و دنای پلاسمیدی.
- **طرز تهیه ی محلول‌ها**
- بافرTBE (×۲۰): ۱۲.۱ گرم تریس را در ۷۵ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و ۶.۲ گرم اسید بوریک به آن اضافه می‌کنیم، سپس phنهایی را به کمک اسید کلریدریک بر روی ۸ تنظیم می‌کنیم و حجم را به ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم. این بافر هنگام مصرف ۱ به ۲۰ رقیق گردد.
- **ژل آگارز:** این ژل را با غلظت ۰.۸ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر بافرTBE (×۱) تهیه کنید.

- **وسایل مورد نیاز:**
- دستگاه الکتروفورز شامل تانک الکتروفورز، سینی تهیه ی ژل، شانه، گیره، منبع تغذیه
- ترانس لومیناتور
- سمپلر ۱۰، ۳۰، ۵۰ و سرسمپلر استریل
- پیپت ۱ میلی لیتری استریل
- اپندرف استریل (تعدادی)
- شیکر (Shaker)
- بن ماری یا انکوباتور ۳۷ درجه ی سانتی‌گراد

- **روش کار:**
- **الف) هضم آنزیمی (Restriction Digestion) دنای فاژ لامبدا**
- ۱_ در ابتدا برای ایجاد شرایط هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم HindIIIیا EcoRIمقدار ۱ میکرولیتر آنزمی را با ۱ میکرولیتر محلول دنا (حدود یک میکروگرم)، ۲ میکرولیتر بافر آنزیم و ۱۶ میکرولیتر آب مقطر استریل، در یک لوله اپندرف مخلوط کنید (حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر).
- ۲_ لوله ی اپندرف را در میکروسانتریفیوژ قرار داده و ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ نموده تا مواد با یکدیگر مخلوط شده و به ته لوله منتقل شوند.
- ۳_ لوله ی اپندرف را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه کنید. پس از این مدت نمونه آماده ی تفکیک شده بر روی ژل آگارز می‌باشد.

- **ب) تهیه ی ژل آگارز (Gel casting):**
- ۱_ سینی تهیه ی ژل را با مسدود نمودن دو طرف سینس با چسب نواری آماده نمایید.
- ۲_ ژل آگارز را با غلظت ۰.۸ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر بافر TBEحل نموده و روی شعله به طور کامل ذوب نمایید تا محلول کاملا شفاف به دست آید.
- ۳_ مخلول ژل را در محیط آزمایشگاه سرد نموده و در حالیکه ولرم است ۱۰ میکرولیتر اتیدیوم بروماید به هر ۱۰۰ میلی لیتر محلول ژل اضافه نمایید
- ۴_ ژل را به داخل سینی ژل ریخته و بلافاصله شانه ی مناسب (با تعداد دندانه‌های مورد نیاز و حجم مناسب) داخل سینی قرار دهید.
- ۵_ سینی را در محیط آزمایشگاه بر روی یک سطح طراز تا منعقد شدن ژل انکوبه نمایید.

Farzaneh Forouharfar

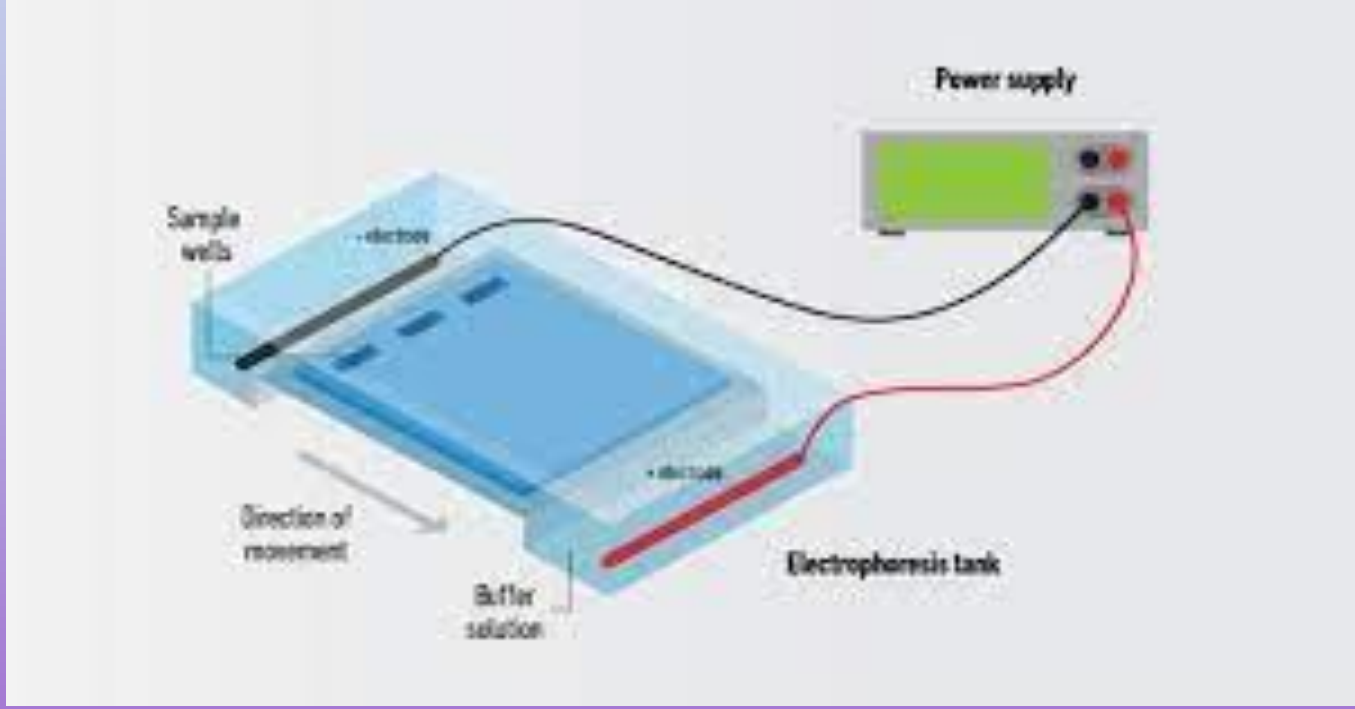
- ۶_ نوارهای چسب را از دو طرف سینی جدا نموده و سینس را به داخل تانک الکتروفورز حاوی بافرTBE (۱×) منتقل نمایید و به آرامی شانه را خارج کنید.

- ۷_ ۱۰ میکرولیتر از محلول واکنش هضم آنزیمی را بداخل یک لدله اپندرف منتقل نموده و به آن ۱ میکرولیتر از بافر لودینگ اضافه نمایید. محتوای لوله را مخلوط نموده و با استفاده از میکروپیپت یا قطره چکان به داخل چاهک‌های ژل لودینگ، لود کنید.

- ۸_ در چاهک دیگر نیز ۱۰ میکرولیتر دنای پلاسمیدی استخراج شده در هفته ی قبل را بدون هضم آنزیمی با اضافه ۱ میکرولیتر بافر لودینگ، لود کنید.

- ۹_ الکتروفورز را به منبع تغذیه وصل نموده روی ولتاژ ۱۰۰ تنظیم کنید.

- ۱۰_ پس از رسیدن رنگ آبی بروموفنل بلو موجود در بافر لودینگ به ۳/۲ طول ژل جریان الکتریکی را قطع نموده، ژل را بر روی جعبه ی UVمورد مطالعه قرار دهید و نتایج را بررسی نمایید.



Farzaneh Forouharfar