



University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان DNA CLONING



اهداف

آموزش مراحل پایه‌ای کلونینگ DNA شامل:

1. آماده‌سازی قطعه ژنی هدف Insert

2. آماده‌سازی میزبان یا سلول باکتریایی مستعد Preparation of Competent cell

3. اتصال قطعه ژنی هدف به ناقل یا وکتور Ligation

4. انتقال ناقل نوترکیب به سلول میزبان Transformation

5. غربال‌گری کلون‌های انتخاب‌شده نوترکیب Screening of selected clones

هدف از آموزش کامل این تکنیک به دانشجویان این است که برای انجام تحقیقات مولکولی و پروژه‌های مهندسی ژنتیک آماده شوند.

• فرایند کلونینگ مولکولی یکی از روش‌های پایه در زیست‌فناوری و مهندسی ژنتیک است که با هدف تولید مولکول‌های نو ترکیب در موجودات میزبان مانند باکتری‌ها انجام می‌شود.

طی این فرایند ژن و یا تکه ای از ژنوم یک موجود جداسازی شده و با کمک یک وکتور یا ناقل وارد یک سلول زنده دیگر می‌شود تا به میزان فراوان از آن تکثیر شود. به بیان ساده با فرایند کلونینگ می‌توان از یک مولکول DNA خاص میلیون‌ها نسخه مشابه تکثیر کرد که معمولاً در باکتری *E. coli* انجام می‌شود. فرایند کلونینگ چه اهدافی را برآورده می‌کند و هدف از ساخت نسخه‌های متعدد از یک توالی DNA چیست؟

• 1 اولین دلیل آن است که از یک ژن یک محصول به میزان فراوان تولید شود. در این حالت سلول به یک کارخانه تولید کننده پروتئین مورد نظر ما تبدیل می‌شود.

• 2 دلیل دوم آن است که می‌خواهیم یک ژن خاص را شناسایی کنیم و اطلاعاتی درباره توالی نوکلئوتیدی آن به دست بیاوریم.

• 3 دلیل سوم دست ورزی یک ژن می‌باشد. به این معنا که توالی DNA یک ژن را تغییر دهیم یا دوتوالی DNA متفاوت را با یکدیگر ترکیب کنیم.

• چرا باید این تغییر و دست ورزی ژنی هدفی برای محققان باشد؟ برای اینکه ممکن است بخواهند ژن تغییر یافته را در سلول‌های یک ارگانیسم دیگر جایگزین کنند (ترانسفورماسیون ژنی) و در سلول زنده تغییر ژنتیکی بوجود آورند. تنها یک کپی از مولکول DNA برای تغییر دائمی آرایش ژنتیکی یک سلول کافی است. اگر این کپی از ژن مورد نظر در ژنوم جاندار تک سلولی مثل باکتری وارد شود شانس بیشتری برای تغییر دادن میزبان خود دارد.

کلون‌ها را میتوان یا به‌صورت سنتزی در آزمایشگاه با کمک آنزیم‌های محدودکننده از منبع مورد نظر تهیه کرد و یا از شرکت‌های تأمین‌کننده سفارش داد.

این تکنیک کاربردهای مستقیمی در تحقیقات ژنتیکی دارد و به دانشمندان این امکان را می‌دهد که عملکرد ژن‌ها و تعاملات پروتئینی را با جزئیات دقیق بررسی کنند. فناوری Recombinant DNA همچنین نقش حیاتی در پزشکی دارد.

در یک دید کلی در فرایند کلونینگ، ژن هدف در مرحله لیگیشن وارد DNA حلقوی به نام پلاسمید شده و از طریق مرحله ای به نام ترانسفورماسیون به درون باکتری مستعد رفته و باکتری‌های حامل پلاسمید انتخاب شده و وادار می‌گردند تا ژن را بیان کرده و پروتئین بخصوصی را تولید کنند.

• کاربردهای کلون‌سازی ژن :

-تولید دارو و پروتئین های درمانی .مانند تولید انسولین نوترکیب انسانی
ژن انسولین انسانی به داخل پلاسمید وارد و به باکتری E. coli منتقل می گردد.
تولید انبوه انسولین انسانی بدون نیاز به استخراج از پانکراس .

درمان میلیون ها بیمار دیابتی در سراسر جهان.
-تولید هورمون های رشد

تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب بصورت ایمن. درمان کوتاهی قد ناشی از کمبود هورمون در کودکان.
-کلون کردن ژن گزارشگر GFP(Green Fluorescent Protein) پروتئینی که درباکتری نوترکیب باعث تولید رنگ
فلورسنت سبز می شود و بعنوان ژن گزارشگر در تحقیقات مولکولی کاربرد دارد.

-تشخیص بیماری ها،آنالیز موتاسیون ها ، شناسایی بیماری های ژنتیکی و ایجاد درمان های هدفمندتر.
-تحلیل عملکرد ژنها و ویرایش ژنی با ابزارهایی مانند کریسپر. اجزای کریسپر مثل Cas9 و gRNA باید در این تکنیک
در ناقل کلون شوند.

-توسعه تولید وساخت واکسن ها با انتی ژن نوترکیب .واکسن هپاتیت B ،واکسن HPV برای پیشگیری از سرطان دهانه
رحم و زگیل تناسلی واکسن های بیماری زونا آنفولانزا.
-تولید آنتی بادی نوترکیب. کلون سازی زنجیره های تولید آنتی بادی در سلول.

- تولید آنزیم‌ها. ژن آنزیم‌هایی مثل آمیلاز، پروتئاز، لیپاز در باکتری‌ها یا قارچ‌ها کلون شده‌اند.
- بیومدیسین و ژن‌درمانی و اصلاح ژنتیکی بیماری‌ها به‌صورت پایه‌ای. استفاده از ناقل‌های ویروسی کلون‌شده برای رساندن ژن سالم به سلول‌های بیمار در بیماری‌هایی چون هموفیلی، نقص ایمنی و آتروفی عضلانی.
- مهندسی ژنتیک و اصلاح نژادی با تولید حیوانات و محصولات کشاورزی تراریخته. مانند تولید موش‌های تراریخته برای مدل‌سازی بیماری‌های انسانی مثل دیابت، سرطان، آلزایمر. تولید ذرت مقاوم به آفات، سویا و پنبه مقاوم به علف‌کش‌ها در جهت کاهش آسیب زیستی و تولید غذای ارزان‌تر و مقاوم‌تر در برابر تنش‌های محیطی.
- کلون‌سازی ژن ویروسی و بیان آنها در سلول‌های HEK293 یا CHO که از رایج‌ترین سلول‌های میزبان در زیست فناوری نوین هستند.
- سلول‌های HEK و CHO، دو نوع از پرکاربردترین سلول‌های پستانداران هستند که در زیست‌فناوری، کلونینگ مولکولی، برای تولید پروتئین نو ترکیب و آنتی‌بادی‌ها به کار می‌روند و توانایی بیان بلند مدت پروتئین‌ها را دارند و در تولید داروهای زیستی کاربرد دارند.

• **سلول (HEK (Human Embryonic Kidney cells** سلول‌های کلیه جنین انسان

پرکاربردترین خط سلولی: HEK293

• ویژگی‌ها:

- منشاء انسانی دارد رشد آسان در محیط کشت، مناسب برای ترنسفکشن یا وارد کردن DNA با بازده بالا می باشد.
- برای تولید پروتئین‌های انسانی، گیرنده‌ها، آنزیم‌ها و آنتی‌بادی‌ها استفاده می‌شود.
- کاربرد زیاد در تحقیقات پایه، ژن‌درمانی، تست دارویی و بیولوژی مولکولی دارد.

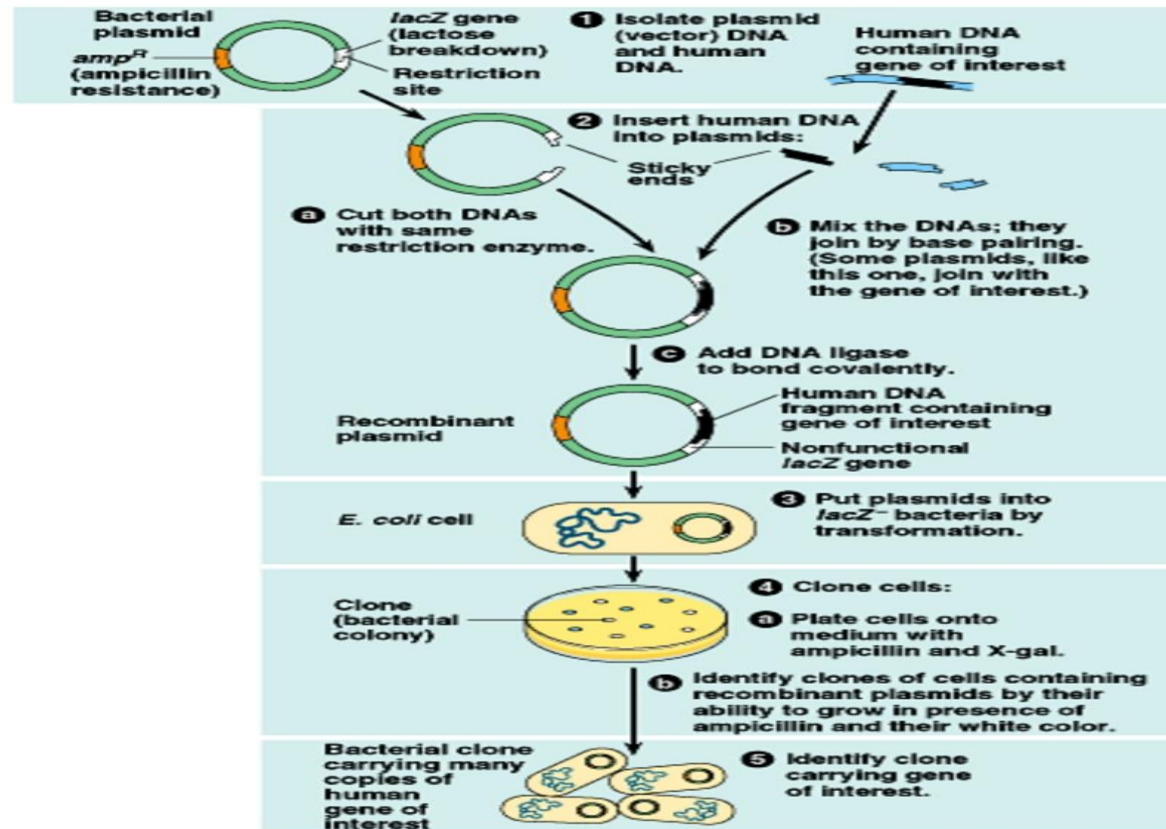
• **سلول (CHO (Chinese Hamster Ovary cells** سلول تخمدان همستر چینی

• ویژگی‌ها:

- منشاء حیوانی دارد مقاوم، رشد سریع، توانایی رشد در محیط فاقد سرم قدرت بالای بیان و ترشح پروتئین دارد.
- مناسب برای تولید آنتی‌بادی‌ها، واکسن‌ها، هورمون‌ها (مثل انسولین، اریتروپویتین).
- مناسب برای داروهای تزریقی.

هر دو نوع سلول مورد تأیید FDA سازمان غذا دارو ایالات متحده آمریکا برای تولید داروها و مطالعات زیستی می باشند.

روند انجام کلونینگ به صورت گام به گام



خلاصه شده کلیه مراحل کلونینگ

1 انتخاب ژن یا قطعه DNA هدف (Selection of Target Gene or DNA Fragment)

ابتدا ژن یا قطعه خاصی از DNA که قرار است کلون شود، انتخاب می‌شود.

2 انتخاب ناقل یا وکتور کلونینگ (Selection of Cloning Vector)

یک پلاسمید مناسب به عنوان ناقل یا وکتور انتخاب می‌شود که دارای ویژگی‌هایی مانند مبدأ همانندسازی، ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک، و ناحیه متناسب با جایگاه‌های آنزیم برشگر خاص باشد.

3 برش DNA هدف و وکتور با آنزیم‌برشگر محدودکننده (Digestion with Restriction Enzymes)

هم قطعه DNA هدف و هم وکتور، با آنزیم‌های محدودکننده مناسب با سایت‌های مکمل در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

4 تخلیص قطعات برش‌خورده (Purification of DNA Fragments)

پس از برش، قطعات DNA روی ژل آگارز، الکتروفورز شده و قطعه موردنظر بریده می‌شود.

سپس با استفاده از کیت تخلیص ژل، قطعه DNA خالص‌سازی می‌شود.

5 اتصال ژن هدف به ناقل (Ligation of Insert into Vector)

قطعات برش‌خورده Insert و Vector در حضور آنزیم DNA Ligase و بافر مخصوص، با نسبت مناسب مخلوط می‌شوند.

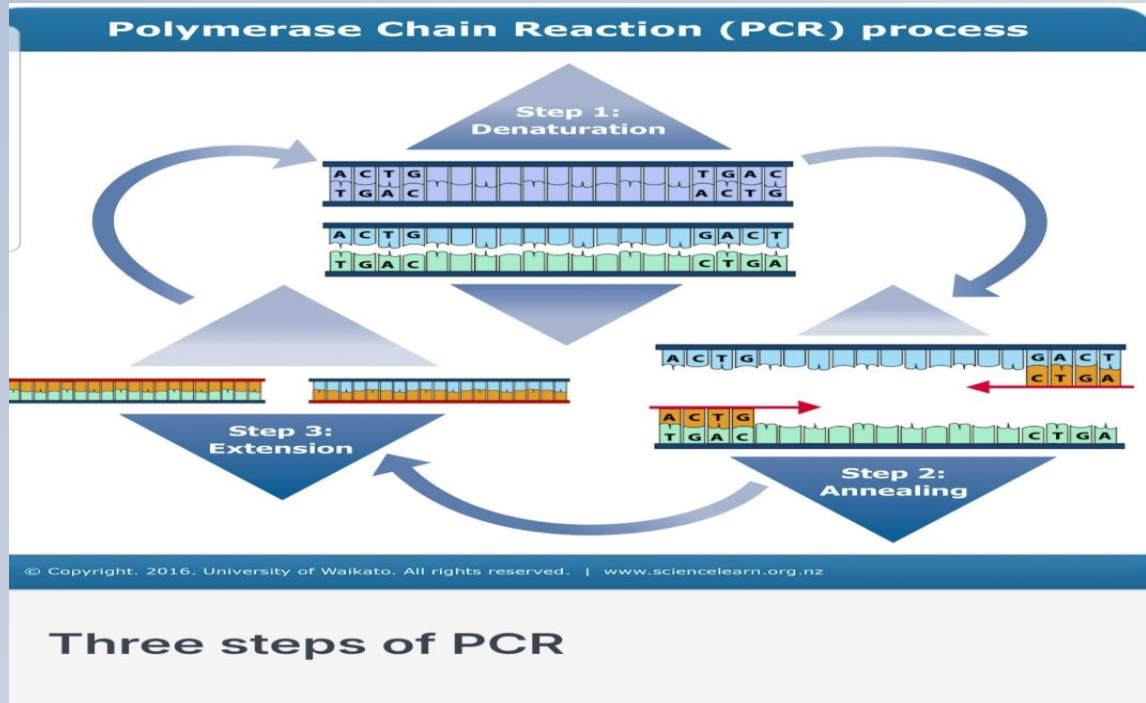
- 6 آماده‌سازی سلول‌های باکتریایی مستعد (Competent cells)
- 7 ترانسفورمیشن به داخل سلول میزبان (Transformation into Host Cells)
DNA نو ترکیب به سلول‌های مستعد اضافه می‌شود.
- 8 کشت سلول‌ها روی محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک (Plating on Selective Medium)
سلول‌ها روی پلیت آگار LB حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده می‌شوند.
- 9 انتخاب کلونی‌های مثبت (Selection of Positive Colonies)
کلونی‌هایی که رشد کرده‌اند دارای پلاسمید نو ترکیب هستند.
- 10 تأیید صحت انجام کلونینگ با روشهای مختلف (Confirmation of Cloning Accuracy)
- 11 بیان ژن و استخراج محصول (Gene Expression and Product Purification)
ژن القا شده بیان و پروتئین حاصل تخلیص می‌گردد.
- 12 نگهداری کلون‌های مثبت برای استفاده‌های آینده (Storage of Positive Clones)
کلونی‌های تأیید شده در محیط مناسب نگهداری می‌شوند.



- مراحل انجام فرایند کلونینگ بصورت گام به گام :
- **1 استخراج DNA ژنومی یا پلاسمیدی حاوی ژن هدف: DNA Extraction**
- مواد و وسایل لازم
- نمونه مناسب جهت استخراج DNA
- کیت مناسب استخراج DNA
- روش کار
- نمونه سلولی را لیز کرده و با انجام مراحل استخراج بر اساس پروتوکل که در جلسات گذشته اموختید، DNA هدف استخراج و در بافر حل می‌شود.
- DNA باید بدون آلودگی و با غلظت مناسب جهت تکثیر برای PCR آماده شود.

• 2 تکثیر ژن هدف: PCR

- مواد و وسایل لازم
- DNA الگوی هدف
- پرایمر اختصاصی
- dNTP
- بافر PCR
- آنزیم Taq پلیمراز
- ترموسایکلر
- روش کار



با استفاده از پرایمرهایی که جایگاه آنزیم‌های برشی در دو انتهای آن‌ها قرار داده شده، ژن مورد نظر را طبق دستورالعمل جلسه آموزشی PCR تکثیر می‌کنیم.

در صورت لزوم وجود باند مشخص در ژل آگارز تأیید می‌کند که انجام PCR موفق بوده است.

• 3 هضم آنزیمی: Digestion Enzymatic

• مواد و وسایل لازم

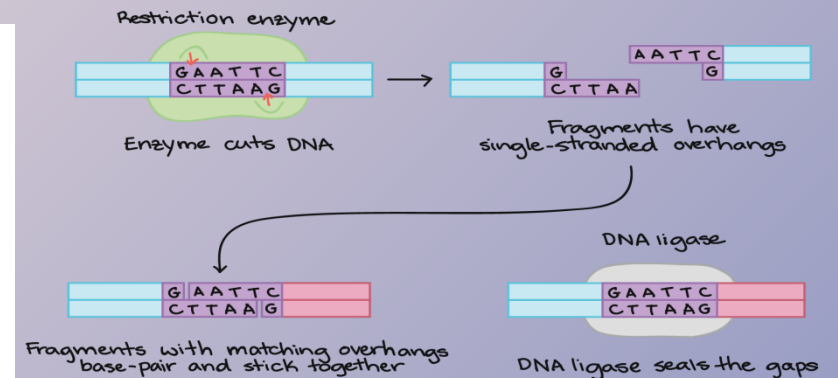
• آنزیم‌های محدودکننده مثلاً EcoRI و HindIII

• بافر هضم

• DNA هدف و وکتور پلاسمیدی مثلاً pUC19. پلاسمید pUC19 یک وکتور کلونینگ رایج در باکتری E. coli است که به‌طور گسترده‌ای در آزمایش‌های ترانسفورماسیون به‌عنوان کنترل مثبت برای ارزیابی کارایی سلول‌های مستعد استفاده می‌شود.

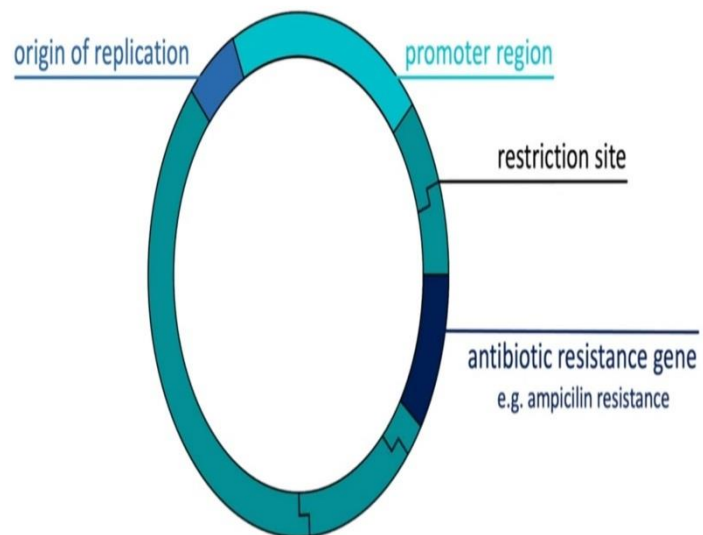
• روش کار

هر دو DNA هدف و وکتور با آنزیم‌ها طبق دستورالعمل جلسه آموزشی هضم آنزیمی هضم می‌شوند تا انتهای چسبنده ایجاد گردد. و سپس محصول هضم آنزیمی طبق جلسه آموزشی الکتروپورز، آنالیز می‌گردد. ایجاد برش موفق با مشاهده اندازه‌های مورد انتظار در فرایند الکتروپورز تأیید می‌شود.



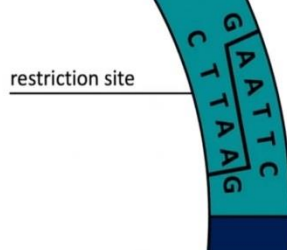
Cloning: Step 1

Backbone generation



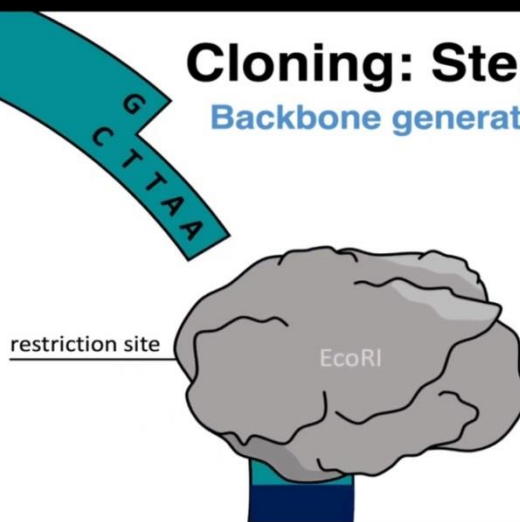
Cloning: Step 1

Backbone generation



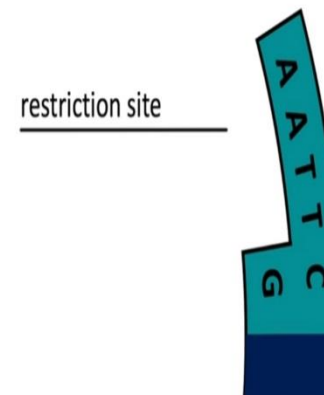
Cloning: Step 1

Backbone generation



Cloning: Step 1

Backbone generation





Joachim Messing

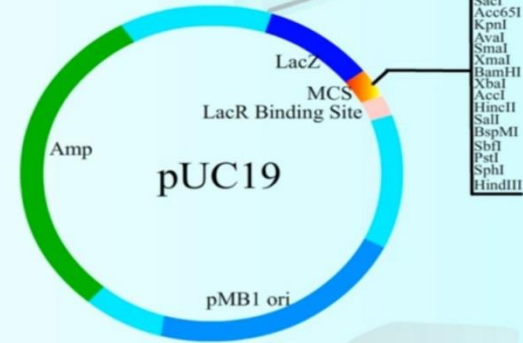
pUC19 Vector

p - plasmid

UC -



19 - Numerical Designation



Application of pUC19 Vector

1. Easy to do cloning and subcloning. Since, pUC19 plasmid is compatible with a wide range of bacterial strains.
2. Have a **high copy number**. About **500 to 700 copies per cell**. While for pBR322 it is only 20 copies of plasmid per cell.
3. The **compact size** of pUC19 makes it suitable for sequencing cloned inserts.
4. pUC19 can be used for preliminary studies involving **gene expression or promoter analysis**.
5. The **screening** can be **done in a single step**.

• 4 اتصال به پلاسمید: Ligation into Plasmid Vector

اتصال قطعه ژنی هدف به پلاسمید با کمک آنزیم لیگاز.

• مواد و وسایل مورد نیاز

• قطعه DNA هضم شده

• وکتور هضم شده

• آنزیم DNA Ligase

• بافر لیگیشن

• آب دی یونیزه

• یخ و انکوباتور ۱۶-۲۵ درجه

Cloning: Step 4

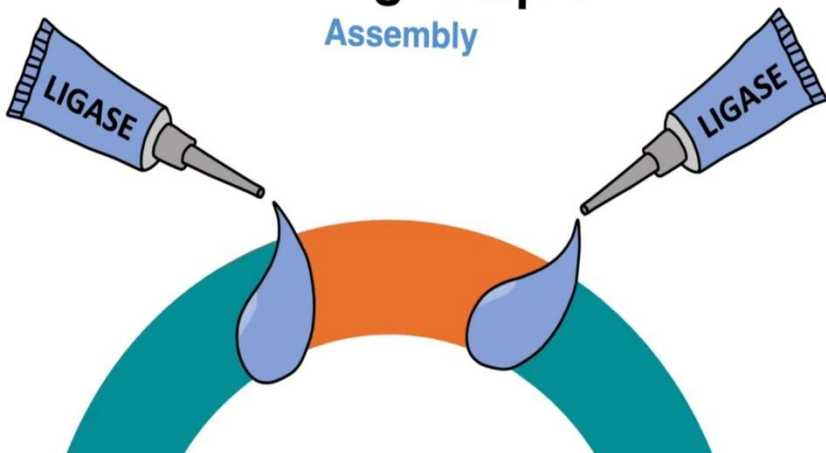
Assembly



36%

Cloning: Step 4

Assembly



• روش کار

DNA هدف و وکتور را با آنزیم لیگاز و بافر مخلوط کنید.

نسبت مولی مناسب بین پلاسمید و قطعه DNA هدف را ۱ به ۳ انتخاب کنید. یعنی قطعه DNA هدف سه برابر باشد.

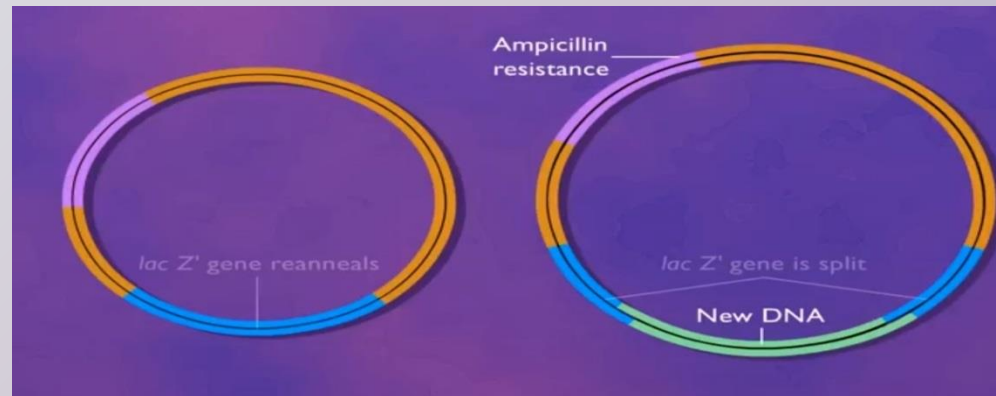
مواد را به ترتیب زیر بر اساس دستورالعمل در میکروتیوب بریزید:

دی‌ان‌ای هدف، پلاسمید، بافر و آنزیم دی‌ان‌ای لیگاز.

حجم نهایی را به ۱۰ میکرولیتر با آب دی‌یونیزه برسانید.

مخلوط را در دمای اتاق برای ۴ ساعت انکوبه کنید. در این مرحله واکنش موفق منجر به تشکیل پلاسمید نو ترکیب

خواهد شد.



- 5آماده سازی سلول های باکتریایی مستعد Competent cells:

- روش الکتروپوریشن Electroporation انتقال DNA به کمک جریان الکتریکی

این روش به ویژه در باکتری ها و مخمرها کاربرد دارد و با استفاده از یک پالس الکتریکی بسیار کوتاه (در حد میلی ثانیه) باعث ایجاد منافذ موقتی در غشای سلول می شود که DNA می تواند از طریق آن وارد سلول شود.

- روش شیمیایی با کلرید کلسیم CaCl_2

یون های کلسیم باعث خنثی سازی بار منفی غشای سلولی و DNA می شوند تا DNA بتواند به غشا نزدیک شود. سپس با شوک حرارتی، نفوذ DNA به داخل سلول تسهیل می شود.

در این آزمایش از روش شیمیایی استفاده می شود.

- مواد و وسایل مورد نیاز

- سلول های E. Coli در مرحله رشد

- CaCl_2 100 mM

- گلیسرول 15% برای انجماد

روش کار

سلول‌ها در فاز رشد برداشت و با CaCl_2 شست‌وشو داده می‌شوند.

۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت باکتری در ال‌بی را به محیط تازه منتقل کرده و در دمای ۳۷ درجه انکوبه کنید تا

غلظت نوری محیط در طول موج ۶۰۰ به حدود ۰/۵ برسد.

سلول‌ها را در ۴۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیفریوژ کنید.

رسوب را با ۲۰ میلی‌لیتر کلرید کلسیم سرد بشویید.

دوباره سانتیفریوژ و شست‌شو را تکرار کرده، سپس رسوب را در ۱ میلی‌لیتر کلرید کلسیم معلق کنید.

سلول‌ها را در لوله‌های کوچک تقسیم کرده و در فریزر منفی ۸۰ درجه تا زمان استفاده نگهداری نمایید.

• 6 ترانسفورماسیون به باکتری: Transformation into Competent E. coli

وارد کردن پلاسمید نو ترکیب به داخل سلول های باکتریایی مستعد شده تا درون آن تکثیر و بیان گردد.

• مواد و وسایل مورد نیاز

• محیط SOC: محیط کشت مغذی جهت ریکاوری باکتری است که به بهبود رشد سلول ها پس از ترانسفورماسیون کمک می کند.

• پلیت آگار حاوی آنتی بیوتیک (مانند آمپی سیلین)

• سلول های E. coli مستعد و آماده شده (Competent cells)

• محصول لیگیشن

• یخ، آب گرم ۴۲°C،

• روش کار

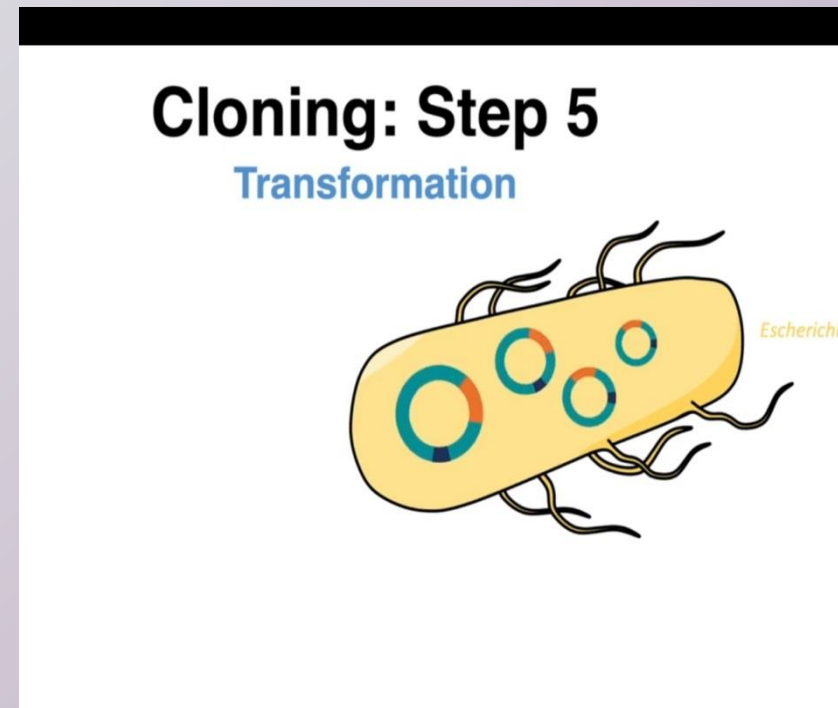
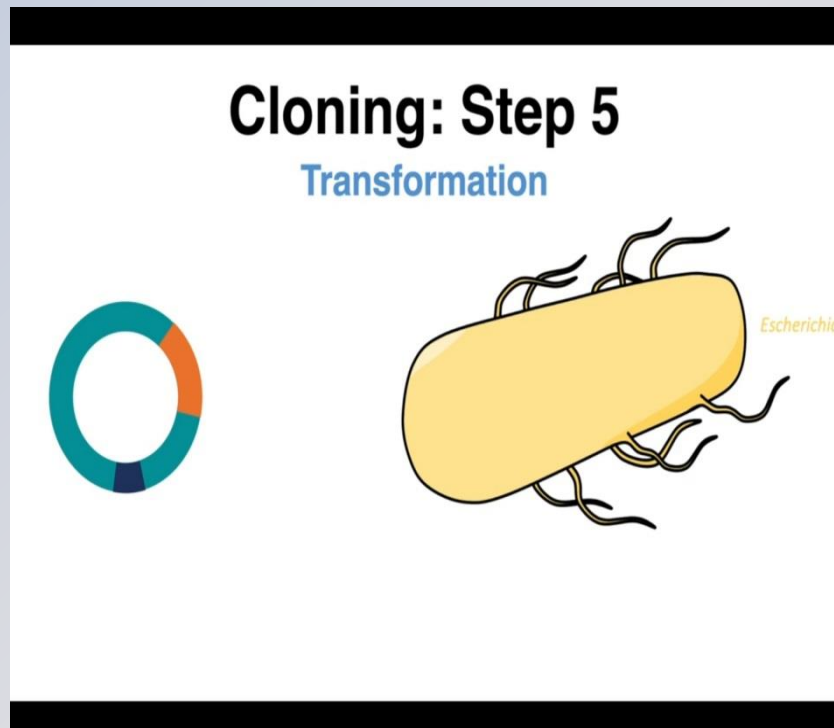
• ۵۰ میکرولیتر از سلول مستعد را با ۵ میکرولیتر محصول لیگیشن روی یخ مخلوط کنید.

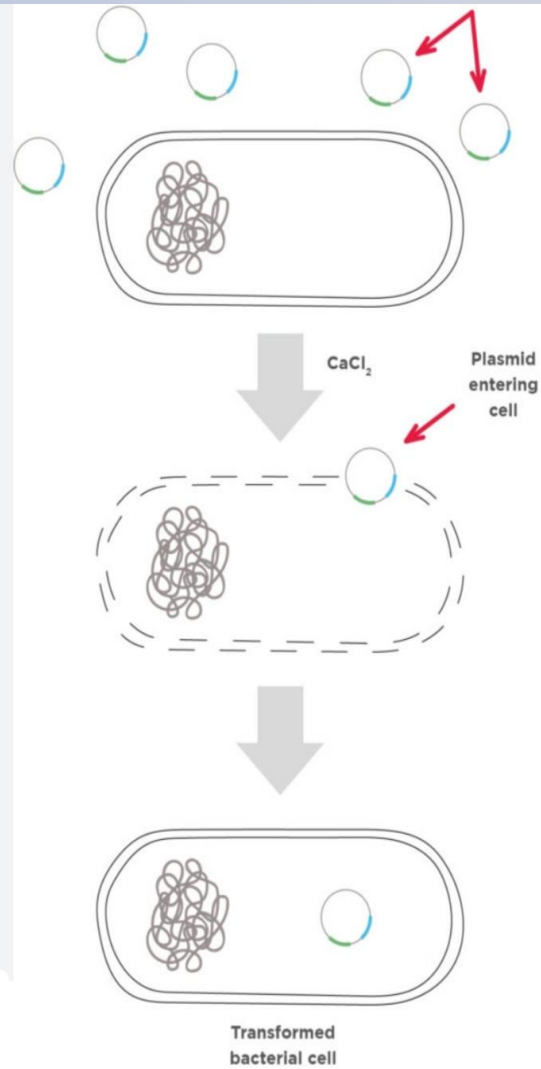
مخلوط را ۳۰ دقیقه روی یخ و سپس ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه قرار دهید.

شوک حرارتی باعث ورود پلاسمید به داخل سلول می شود.

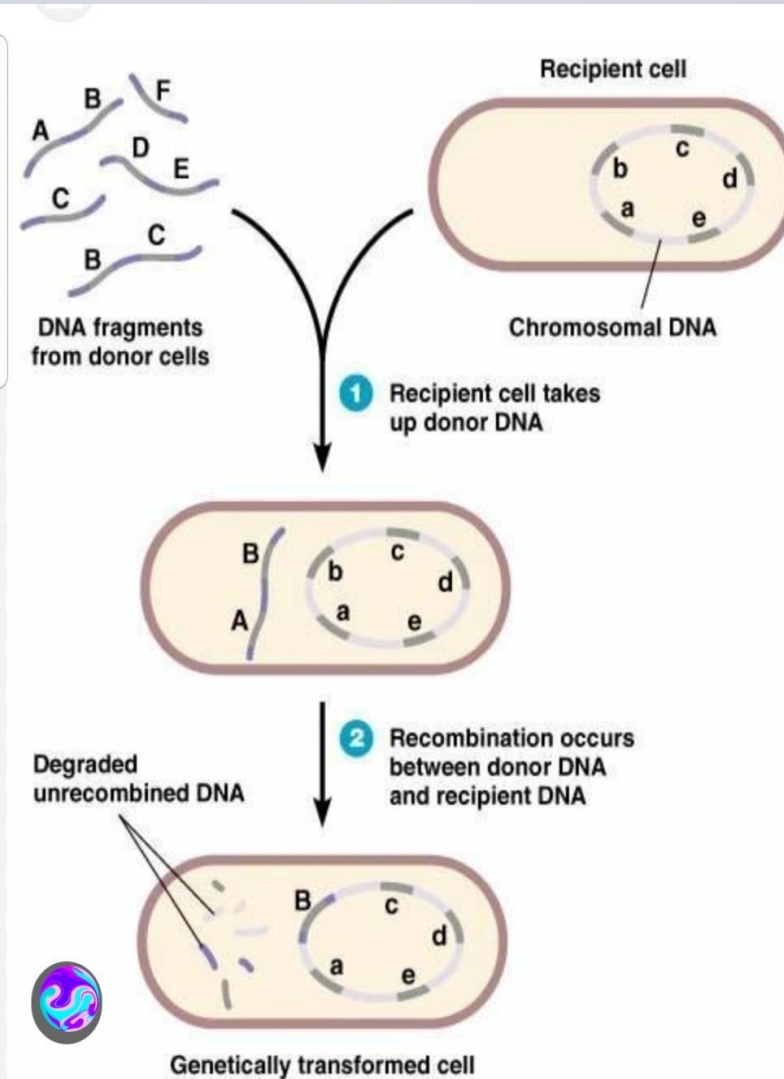
بلافاصله مخلوط را روی یخ بگذارید و ۹۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه کنید.

به مدت ۴۵ دقیقه تا یک ساعت در دمای ۳۷ درجه با لرزش ملایم انکوبه نمایید.





Three key steps to transforming bacteria –...



The mechanism of transformation (*) |...

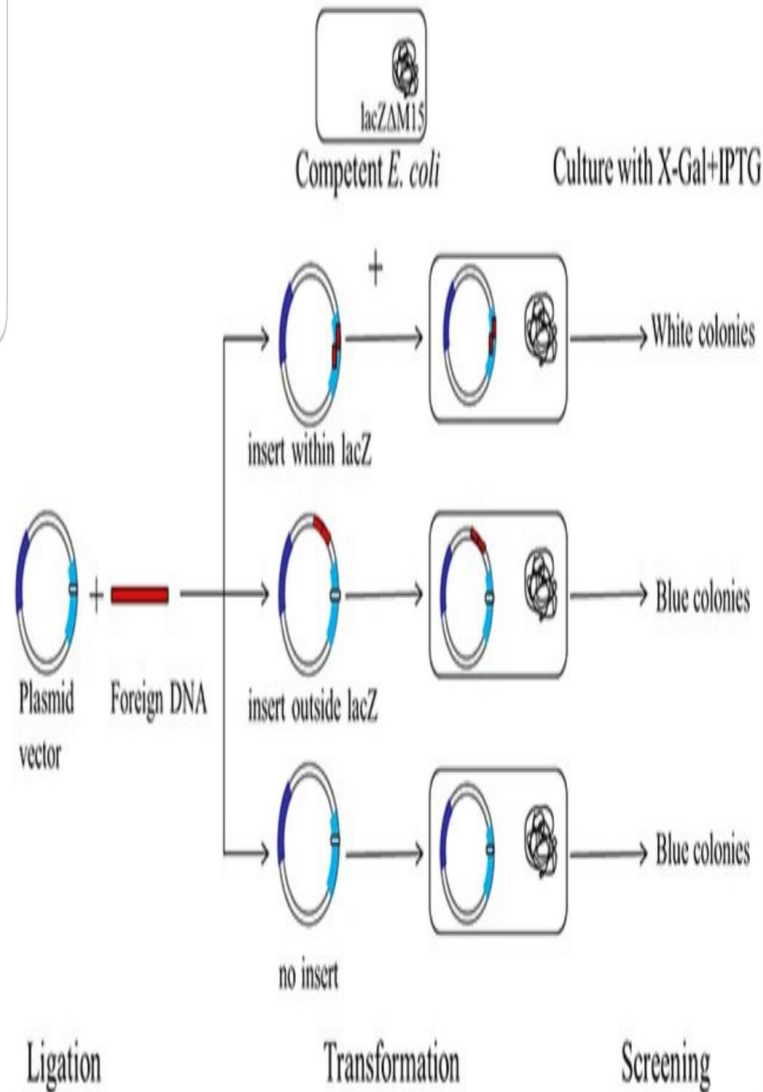
7 • انتخاب و غربالگری کلونی‌ها / Selection and Screening of Colonies/ Blue-White Screening:

شناسایی کلونی‌هایی که پلاسمید نو ترکیب را دریافت کرده‌اند با استفاده از تجزیه X-gal توسط ژن *lacZ*

توضیح: در برخی وکتورها مانند pUC19، ناحیه‌ای به نام Multiple Cloning Site (MCS) درون ژن *lacZα* قرار دارد. این ژن، بخشی از آنزیم β -galactosidase را کد می‌کند که می‌تواند ماده رنگی مصنوعی به نام X-gal که شبیه لاکتوز است را تجزیه و به محصول آبی رنگی تبدیل می‌کند. اگر قطعه DNA هدف درست در محل MCS وارد شده باشد، ژن *lacZ* غیرفعال شده و دیگر آنزیم فوق تولید نمی‌شود؛ بنابراین نمی‌تواند رنگ آبی تولید کند و، کلونی سفید باقی می‌ماند. ولی اگر پلاسمید بدون قطعه هدف وارد باکتری شود، *lacZ* فعال مانده و کلونی آبی خواهد بود.

بتاگالاکتوسیداز آنزیمی است که توسط ژن *lacZ* در باکتری *E. coli* کد می‌شود. این آنزیم یکی از اجزای کلیدی سیستم اپرون لاکتوز *lac operon* است و نقش آن تجزیه قند لاکتوز به قندهای ساده‌تر یعنی گلوکز و گالاکتوز است.

- عملکرد: X-gal به‌طور ویژه در تست‌های غربالگری ژن *lacZ* استفاده می‌شود.
- زمانی که آنزیم بتاگالاکتوزیداز که محصول ژن *lacZ* است وجود داشته باشد، X-gal تجزیه و رنگ آبی تولید می‌کند.



تصویری شماتیک از پروسه انتخاب کلونی

• مواد و وسایل مورد نیاز

• پلیت LB-agar حاوی آنتی‌بیوتیک و X-gal

• لوپ استریل جهت کشت باکتری

• روش کار

کشت سلول‌های ترنسفورم شده روی پلیت حاوی آنتی‌بیوتیک وانکوباسیون در ۳۷ درجه به مدت یک شب. تنها باکتری‌هایی که پلاسمید نو ترکیب را دریافت کرده‌اند، رشد می‌کنند. چون ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک را دریافت کرده‌اند.

• رشد کلونی آبی: پلاسمید بدون درج ژن هدف (lacZ فعال) می‌باشند.

• رشد کلونی سفید: درج موفق ژن هدف (lacZ غیرفعال) می‌باشند.

فقط کلونی‌های سفید باید برای استخراج DNA پلاسمیدی جهت بررسی‌های بیشتر بعدی انتخاب شوند.

همانطور که گفته شد کلونی‌های آبی نشان‌دهنده عدم ورود قطعه هدف به وکتور هستند و نباید انتخاب شوند.

و تاکید می‌شود هنگامی که ژن lacZ در پلاسمید دست‌نخورده باشد، آنزیم بتاگالاکتوسیداز فعال است و X-gal را تجزیه می‌کند و رنگ آبی ایجاد می‌شود. اگر ژن هدف وارد ناحیه lacZ شود، عملکرد آنزیم مختل شده و کلونی سفید می‌شود. مشاهده کلونی‌های سفید، نشانه ورود موفق قطعه به وکتور و اختلال در عملکرد ژن lacZ است.

روش blue-white screening یک روش سریع و دقیق برای شناسایی موفقیت کلونینگ است

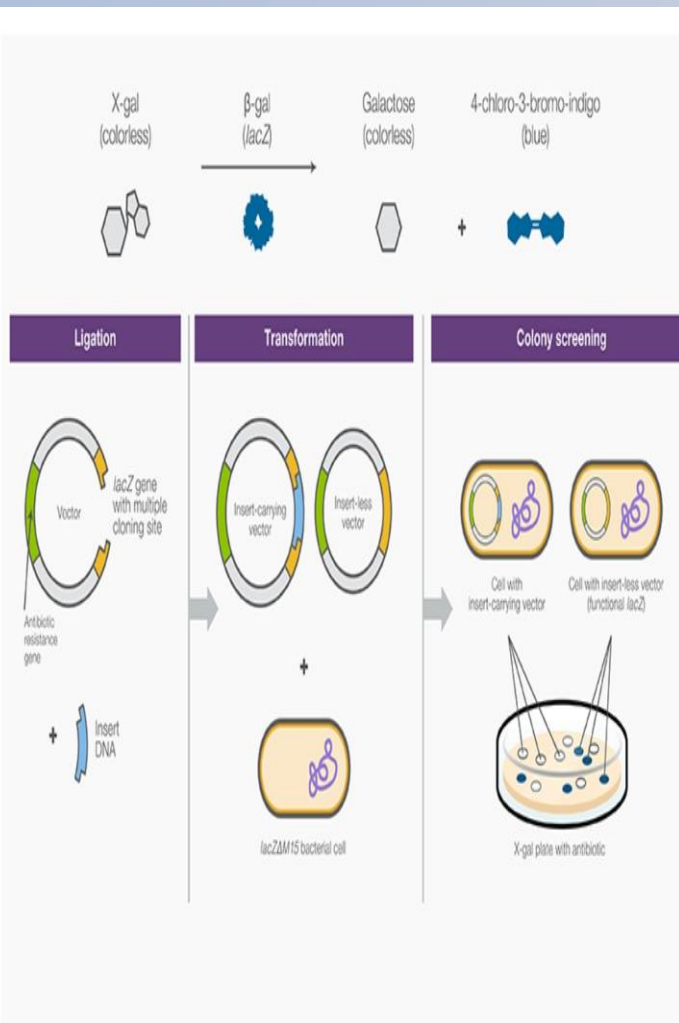


Figure 7. Color formation by beta-galactosidase (β -gal) activity on X-gal, and its application in blue/white screening.



Blue white screening of DNA clones



An LB agar plate showing the result of a blue–white screen.

• 8 استخراج پلاسمید از کلونی‌های سفید به روش مینی پرپ: Plasmid Extraction

مینی پرپ Miniprep به معنای Mini Plasmid Preparation است، و به روش استخراج سریع و کوچک مقیاس پلاسمید از کلونی‌های مثبت باکتریایی گفته می‌شود. این مرحله جهت بررسی های نهایی و به دست آوردن DNA پلاسمیدی خالص از باکتری‌های ترانسفورم شده یا کلونی‌های سفید است .

- مواد و وسایل لازم

- کیت استخراج پلاسمید

- ایزوپروپانول

- سانتریفیوژ

- روش کار

طبق دستورالعمل کیت، پلاسمید استخراج میشود وبا الکل رسوب داده می‌شوند.

• 9 تأیید موفقیت کلونینگ: Confirmation of Cloning Accuracy

• روش کار

با یکی از 3 روش زیر میتوان صحت انجام کلونینگ را تأیید کرد. گاهی بدلیل حساسیت و اهمیت کار لازم است هر 3 روش انجام شود.

• PCR و بدنبال آن الکتروفورز جهت تأیید وجود باند صحیح.

• هضم آنزیمی مجدد: بررسی وجود یا عدم وجود قطعه درج شده با آنزیمهای محدودکننده.

• توالی یابی DNA.

• تفسیر: وجود باند صحیح در PCR، یا قطعه مورد انتظار در هضم، یا تطابق توالی نشان دهنده موفقیت کلونینگ است.

• اگر فقط بخواهید بررسی کنید ژن وارد شده یا نه؟ → PCR کافی است.

• اگر بخواهید بررسی کنید ژن کجا و چگونه وارد شده؟ → هضم آنزیمی لازم است.

• اگر بخواهید مطمئن شوید هیچ اشتباهی در کلونینگ و توالی ژن نیست؟ → توالی یابی بایستی انجام شود.

- **10 بیان ژن و استخراج محصول: Gene Expression and Product Purification**

- ژن القا شده بیان و پروتئین حاصل طی مراحل استخراج پروتئین استخراج و تخلیص می‌گردد.

- **11 نگهداری کلون‌های مثبت برای استفاده‌های آینده: Storage of Positive Clones**

- کلونی‌های تأیید شده در محیط LB حاوی گلیسرول ۲۰٪ در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد جهت استفاده های بعدی
- نگهداری می‌شوند.

Cloning: Step 7

Verification



PCR

Cloning: Step 7

Verification



DNA sequencing

مقایسه دو فرایند ترنسفورمیشن و ترنسفکشن

Transformation vs. Transfection

ترنسفورمیشن فرایندی است که طی آن DNA خارجی (معمولاً پلاسمید) به درون سلول‌های پروکاریوتی مانند *E. coli* وارد می‌شود.

Transformation is the process of introducing foreign DNA (usually plasmids) into prokaryotic cells, especially *Escherichia coli* (*E. coli*).

Introducing a plasmid carrying an antibiotic resistance gene into *E. coli* cells.

Common Methods:

Heat shock (CaCl_2 method)

Electroporation

Applications:

Gene cloning

Protein expression

Plasmid amplification

ترنسفکشن به وارد کردن اسید نوکلئیک خارجی DNA یا RNA به درون سلول‌های یوکاریوتی مانند سلول‌های انسانی، حیوانی یا گیاهی گفته می‌شود.

Transfection refers to the introduction of foreign nucleic acids (DNA or RNA) into eukaryotic cells, such as human, animal, or plant cells.

Transfecting HEK293 cells with a plasmid encoding GFP to study protein expression.

Common Methods:

Chemical methods (e.g., calcium phosphate, lipofection)

Electroporation

Viral vectors

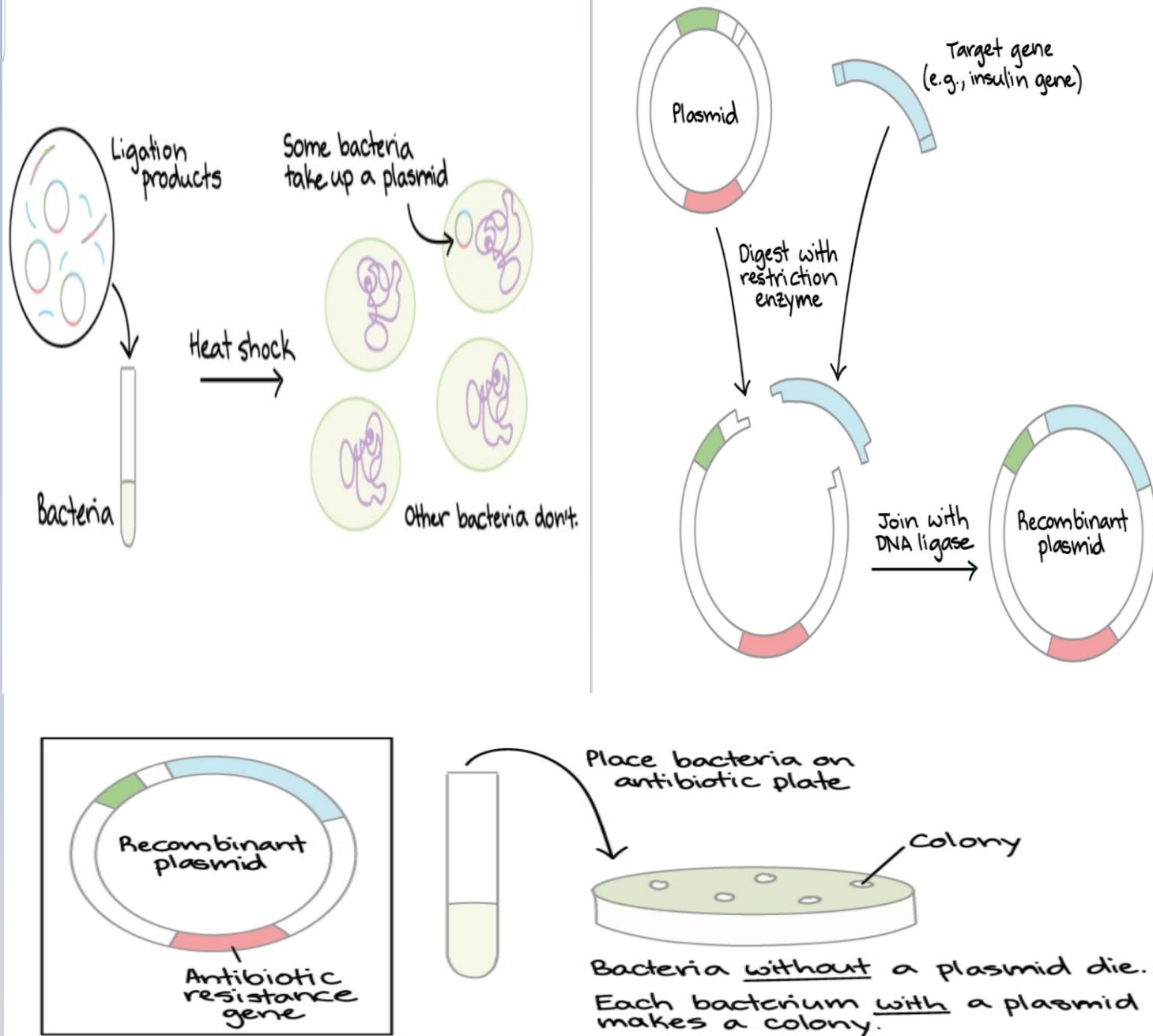
Applications:

Gene expression studies

siRNA or miRNA delivery

CRISPR gene editing

Recombinant protein production in mammalian cells



A general workflow for traditional cloning includes the following steps (Figure 1):

1. Vector preparation 2. Insert preparation 3. Ligation 4. Transformation 5. Colony screening

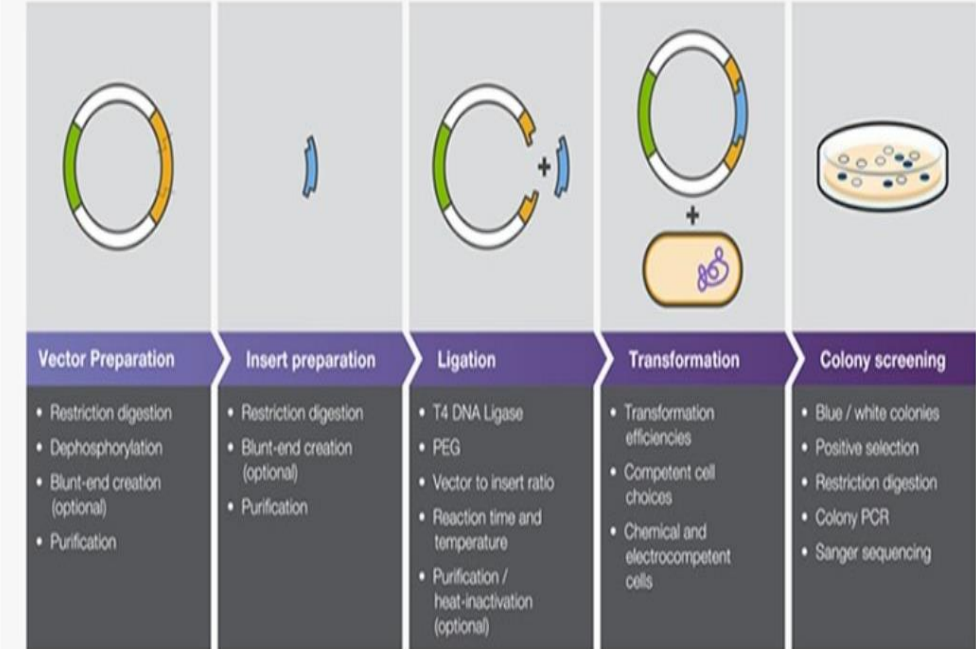
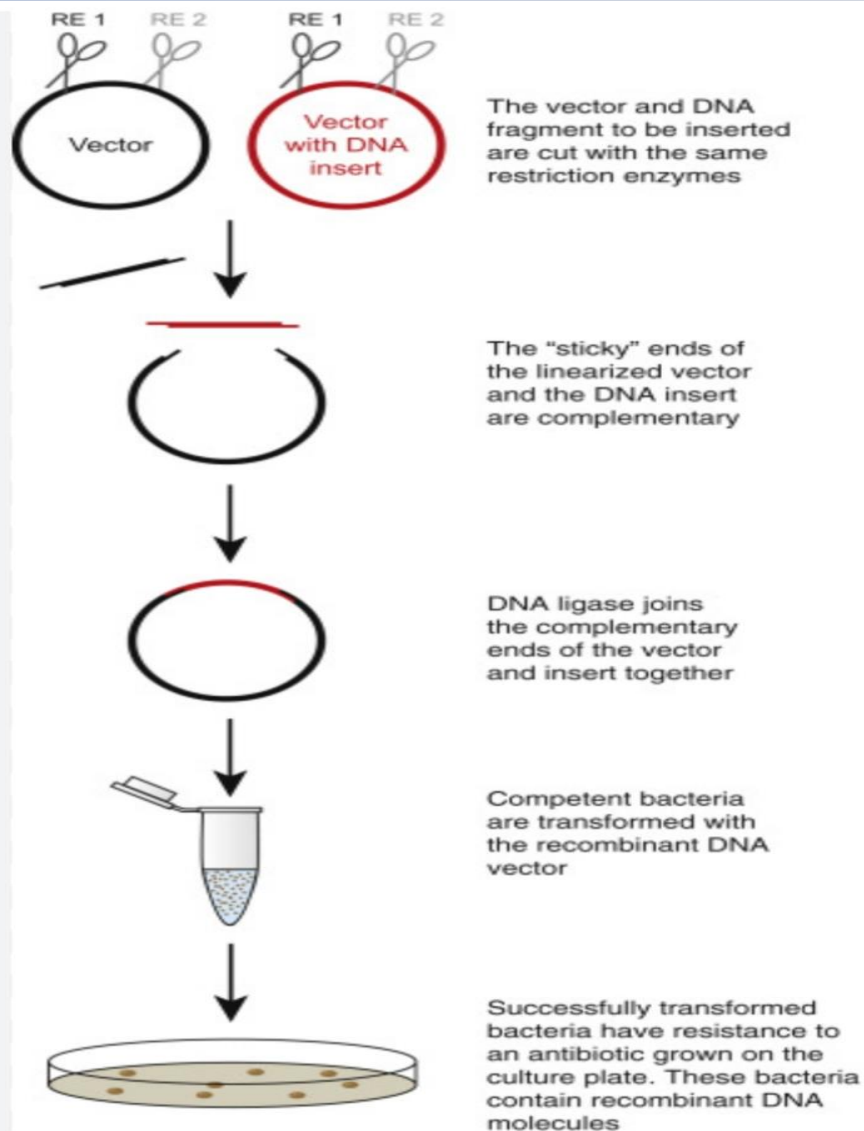
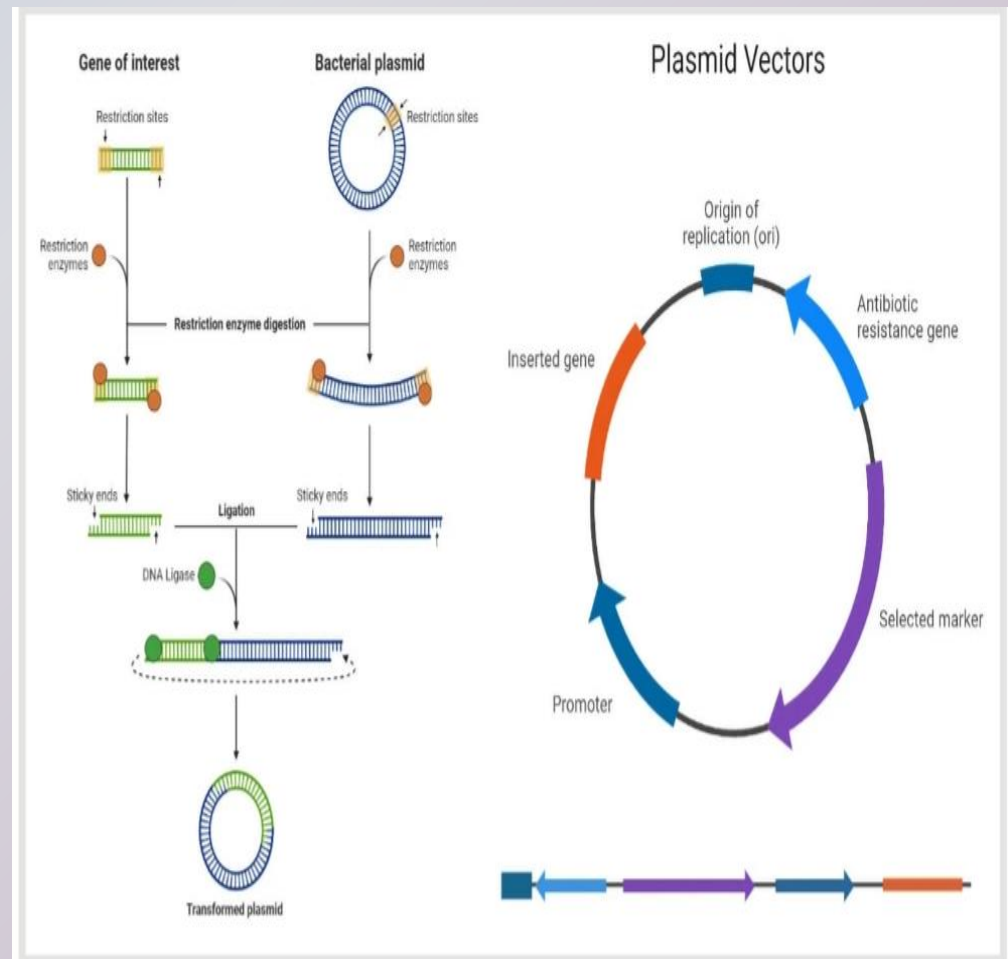


Figure 1. Traditional cloning workflow.

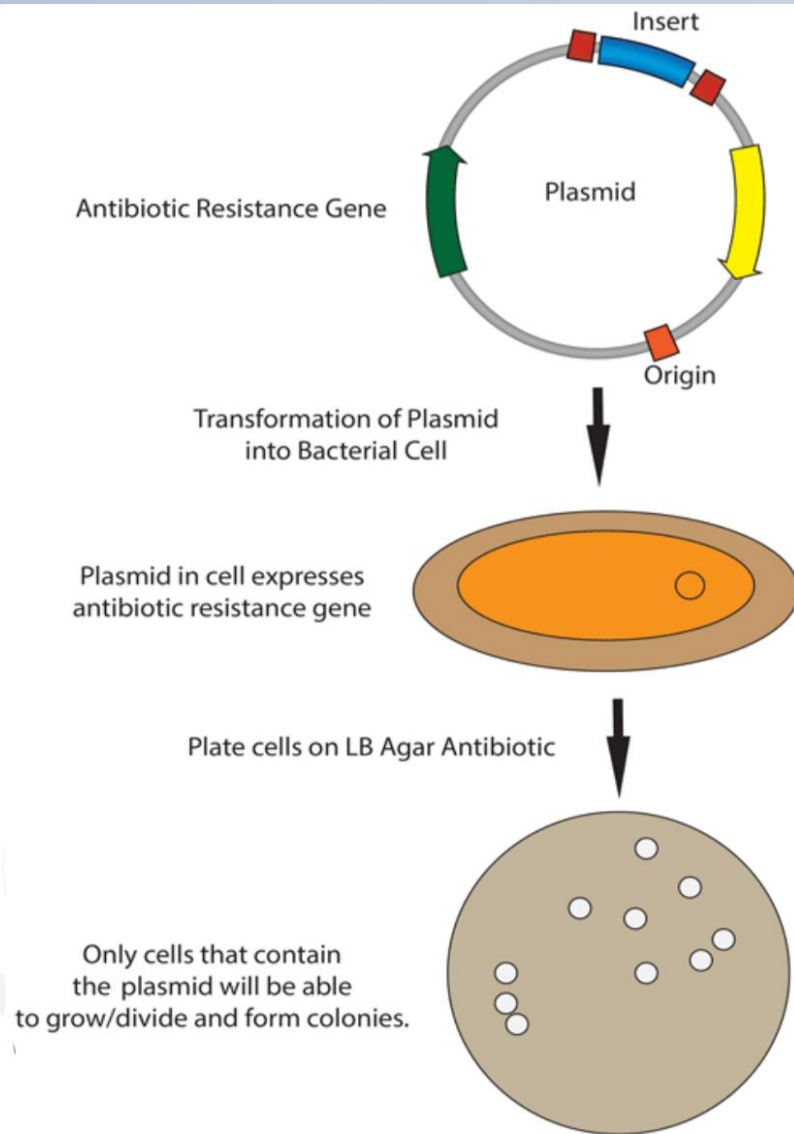


Cloning Vector - an overview | ScienceDirect...

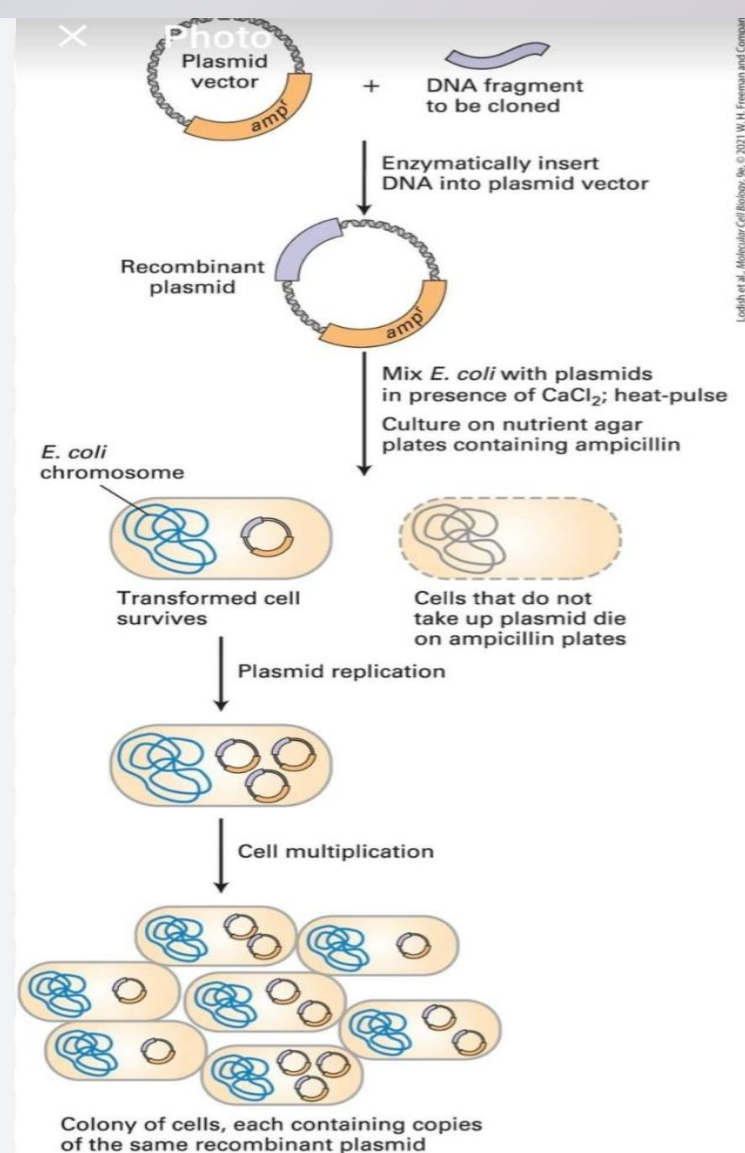


Restriction Enzymes Cloning Steps

Steps in DNA Cloning



Addgene: Protocol - Bacterial Transformation



DNA cloning in a plasmid vector permits amplificati...