



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

عنوان

معرفی انواع مارکریا لدر و
کاربرد آنها

Ladder

اهداف

بررسی انواع مارکر

طرز تهیه مارکر

آشنایی با روش اندازه‌گیری طول قطعات با استفاده

DNA از مارکر

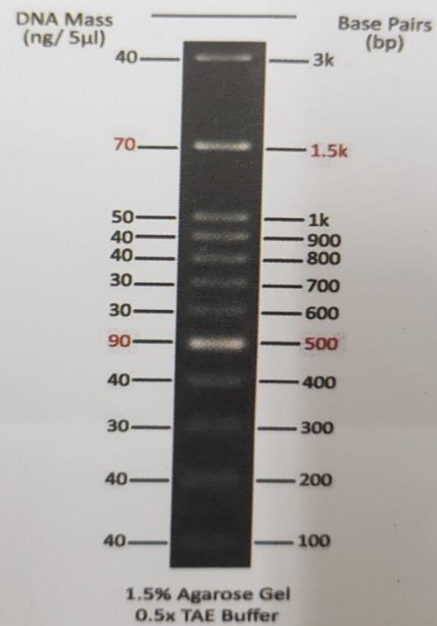
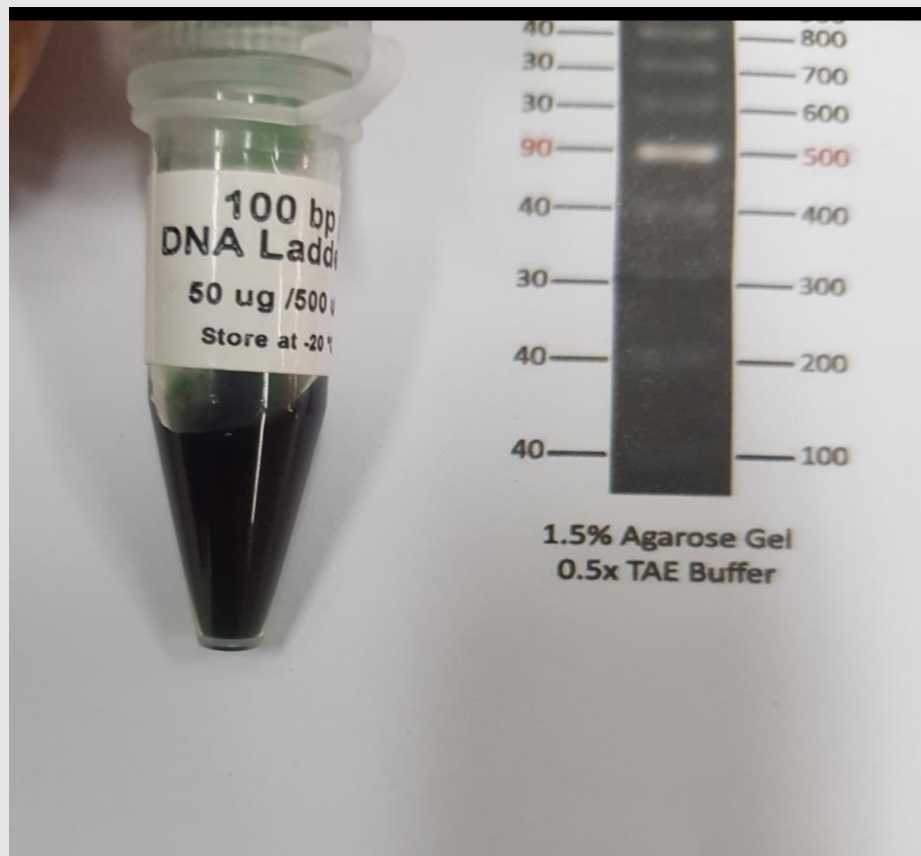
مقایسه قطعات DNA با مارکر استاندارد

مقدمه

مارکر Marker یا لدر Ladder چیست؟

مارکر یا لدر مولکولی، ترکیبی از قطعات DNA، RNA یا پروتئین با اندازه‌های مشخص است که در الکتروفورز ژل استفاده می‌شود. این ابزار برای تعیین اندازه قطعات نمونه‌های فوق در آزمایشگاه کاربرد دارند و ابزاری مهم برای تخمین اندازه قطعات DNA، RNA و پروتئین می‌باشند. انواع آن شامل لدر DNA، RNA و پروتئین می‌شود که هر کدام برای اهداف خاصی در آزمایشگاه‌های بیولوژی مولکولی استفاده می‌شوند.

مارکر DNA در کنار نمونه‌های ناشناخته در ژل بارگذاری می‌شود و پس از الکتروفورز، اندازه قطعات DNA نمونه با مقایسه آن‌ها با مارکر تعیین می‌شود.



انواع مارکرها و کاربردهای آنها

۱. مارکر یا لدر DNA

کاربرد:

تخمین اندازه قطعات DNA در الکتروفورز ژل آگارز یا پلی اکریل آمید
بررسی موفقیت فعالیت آنزیم‌های برشی محدود کننده و هضم کننده دی ان ای
تأیید وجود یا عدم وجود محصول PCR
انواع:

مارکر DNA خطی: شامل قطعات DNA خطی شده با اندازه‌های مشخص
مارکر DNA فوق پیچیده: Supercoiled شامل پلاسمیدهای برش نخورده با ساختارهای
مختلف
نمونه:

100 bp DNA Ladder: شامل قطعاتی با فواصل 100 جفت‌بازی

1 kb DNA Ladder: شامل قطعاتی با فواصل 1,000 جفت‌بازی

۲. مارکر یا لدر RNA

کاربرد:

در الکتروفورز RNA تخمین اندازه مولکول‌های

استخراج شده RNA بررسی کیفیت

نمونه:

با اندازه‌های بین 200 تا 6,000 nt RNA شامل قطعات
نوکلئوتید

۳. مارکر یا لدر پروتئین

کاربرد:

SDS-PAGE اندازه‌گیری وزن مولکولی پروتئین‌ها در

بررسی تخلیص پروتئین‌ها

انواع:

قطعات پروتئینی رنگ‌آمیزی شده برای مشاهده مستقیم: Prestained لدر رنگی

قطعات پروتئینی بدون رنگ برای رنگ‌آمیزی پس از Unstained لدر غیررنگی

الکتروفورز



• DNA پلاسمیدی یا ژنومی

• آنزیم‌های برشی (مانند EcoRI، HindIII)

• بافر مخصوص آنزیم

• آب دیونیزه یا RNase-Free

• دمای انکوباسیون: 37 درجه سانتی‌گراد

• دستگاه الکتروفورز افقی

• منبع تغذیه الکتروفورز

• ژل کست و شانه‌های مخصوص چاهک‌گذاری

• ترانس‌ایلو میناتور UV یا سیستم مستندسازی

ژل

• آگارز (برای تهیه ژل)

• بافر TAE یا TBE برای
الکتروفورز

• اتیدیوم بروماید EtBr یا
رنگ‌های جایگزین مانند SYBR
Safe برای رنگ‌آمیزی DNA
مارکر DNA مناسب 100 bp یا
1 kb

• نمونه‌های DNA استخراج‌شده یا
حاصل از PCR

• بافر بارگذاری Loading Dye

L

روش کار



روش کار

۱. برش DNA

DNA را با آنزیم‌های برشی مناسب در بافر آنزیمی مخلوط کنید.
نمونه را به مدت 1 تا 2 ساعت در 37 درجه انکوبه کنید.

۲. بررسی روی ژل:

DNA برش‌خورده را در ژل آگارز 1% الکتروفورز کنید.
بررسی کنید که باندها مطابق انتظار باشند.

۳. خالص‌سازی:

را استخراج کرده و خالص‌سازی کنید. DNA باندهای

۴. آماده‌سازی محلول نهایی:

DNA خالص‌شده را در بافر TE حل کنید.

به آن رنگ مخصوص لدر (مانند گلیسرول + رنگ آبی) اضافه کنید.

در دمای -20 درجه نگهداری کنید.

تهیه ژل آگارز:

مقدار مشخصی از آگارز (مثلاً 1 گرم برای ژل 1%) را در بافر TAE یا TBE حل کنید. محلول را گرم کنید تا آگارز کاملاً حل شود.

پس از خنک شدن تا حدود 50°C ، رنگ اتیدیوم بروماید یا سایبرسیف را به آن اضافه کنید.

ژل را در قالب ریخته و شانه را قرار دهید.

پس از 30-40 دقیقه ژل را در تانک الکتروفورز قرار دهید.

بارگذاری نمونه‌ها و مارکر:

5-10 میکرولیتر از مارکر DNA را در یک چاهک بارگذاری کنید.

5-10 میکرولیتر از نمونه DNA (مخلوط‌شده با بافر بارگذاری) را در چاهک‌های دیگر اضافه کنید.

انجام الکتروفورز:

تانک را با بافر الکتروفورز پر کنید.

دستگاه را روی ولتاژ مناسب (معمولاً 80-120 ولت) تنظیم کرده و به مدت 45-60 دقیقه

الکتروفورز کنید.

مشاهده و تحلیل نتایج

ژل را در ترانس ایلومیناتور UV قرار دهید.

با استفاده از مارکر، اندازه قطعات DNA نمونه را تخمین بزنید.

تفسیر تحلیل نتایج

باندهای مشاهده شده در ژل، نشان دهنده قطعات DNA هستند.

مقایسه موقعیت باندهای نمونه با مارکر DNA به ما کمک می کند تا طول قطعات DNA ناشناخته را تعیین کنیم.

اگر باندها نامشخص یا کم رنگ باشند، مشکلاتی مانند غلظت پایین DNA، نقص در بارگذاری، یا خطای رنگ آمیزی می تواند علت باشد.

در صورت مشاهده اسمیر شدن باندها، احتمالاً DNA تجزیه شده یا غلظت آگارز نامناسب بوده است.

توجه

در DNA و RNA، هر نوکلئوتید شامل یک باز آلی (آدنین، گوانین، سیتوزین، اوراسیل/تیمین)، یک قند پنج‌کربنی و یک گروه فسفات است.

در لدر DNA، اندازه قطعات معمولاً بر حسب جفت‌باز bp, base pairs بیان می‌شود.

اما در لدر RNA، چون RNA تک‌رشته‌ای است، طول آن را بر اساس تعداد نوکلئوتیدها nt, nucleotides گزارش می‌کنند.

مثال:

RNA Ladder 200 – 6,000 nt یعنی این لدر شامل قطعاتی با طول 200 تا 6,000 نوکلئوتید است.

RNA 500 nt یعنی این رشته RNA دارای 500 نوکلئوتید است.

در مارکر پروتئین، واحد اندازه‌گیری وزن مولکولی پروتئین‌ها کیلودالتون kDa, kilodalton است.

توضیح بیشتر:

دالتون Da واحد جرم اتمی است و تقریباً برابر با جرم یک اتم هیدروژن است.
کیلودالتون kDa برابر با 1,000 دالتون Da است.

وزن مولکولی پروتئین‌ها بر اساس جمع وزن اسیدهای آمینه تشکیل‌دهنده آن‌ها تعیین می‌شود.

چرا وزن مولکولی مهم است؟

در SDS-PAGE (ژل پلی‌اکریل‌آمید دناتورده‌کننده)، پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی kDa از هم جدا می‌شوند. مارکر پروتئینی شامل پروتئین‌هایی با وزن‌های مشخص است و به تخمین وزن مولکولی پروتئین‌های نمونه کمک می‌کند.

مثال:

Protein Ladder 10-250 kDa یعنی این مارکر شامل پروتئین‌هایی با وزن 10 تا 250 کیلو دالتون است.

آلبومین سرم گاوی (BSA) = 66 kDa

آنزیم DNA پلیمراز Taq = 94 kDa

در نتیجه، واحد اندازه‌گیری مارکر پروتئین " " kDa است، که بیانگر وزن مولکولی پروتئین‌ها بر اساس جرم مولکولی آن‌ها می‌باشد.

جمع‌بندی کلی

این آزمایش روش استاندارد برای اندازه‌گیری طول قطعات DNA است که به کمک مارکر مولکولی و الکتروفورز ژل آگارز انجام می‌شود. این روش در تحقیقات بیولوژی مولکولی برای تعیین اندازه قطعات DNA پس از PCR، برش آنزیمی یا استخراج DNA بسیار کاربردی است.



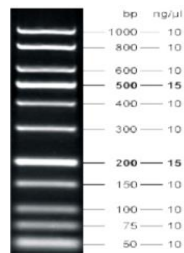
Protein Marker & DNA Ladder

**Prestained Protein Ladder10-
250,500µl-SL7001**

6,700,000 تومان

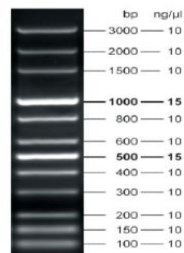
Mid Range DNA Ladder

Low Range DNA Ladder



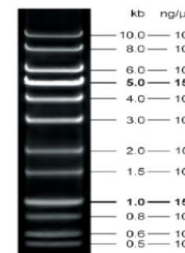
3.0 % Agarose

Mid Range DNA Ladder



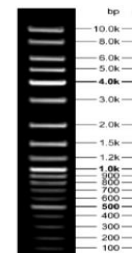
1.8 % Agarose

High Range DNA Ladder



0.6 % Agarose

Long Range DNA Ladder



1 % Agarose

مشخص عمومی



Jena Bioscience
Building Blocks of Life

محصول
شرکت ینا بیوساینس
آلمان

محصول برای مشخص کردن اندازه قطعات DNA بین ۱۰۰ تا ۳۰۰ جفت باز در ژل آگارز کاربرد دارد. همچنین می توان غلظت مورد نظر را بطور تقریبی با استفاده از غلظت باندهای موجود در محصول تخمین زد.

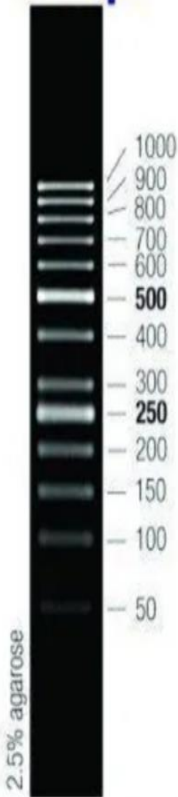
غلظت: ۱۳۰ ng/µl

اسب برای قطعات ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز

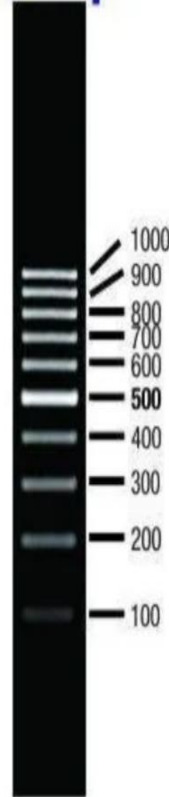
ده بارگذاری روی ژل

DNA ladder

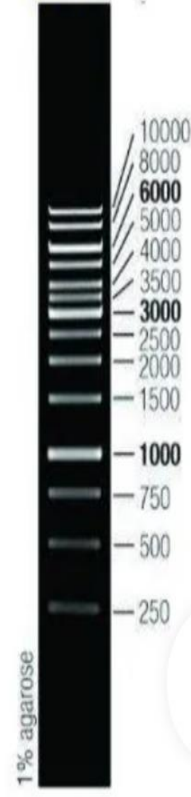
50bp



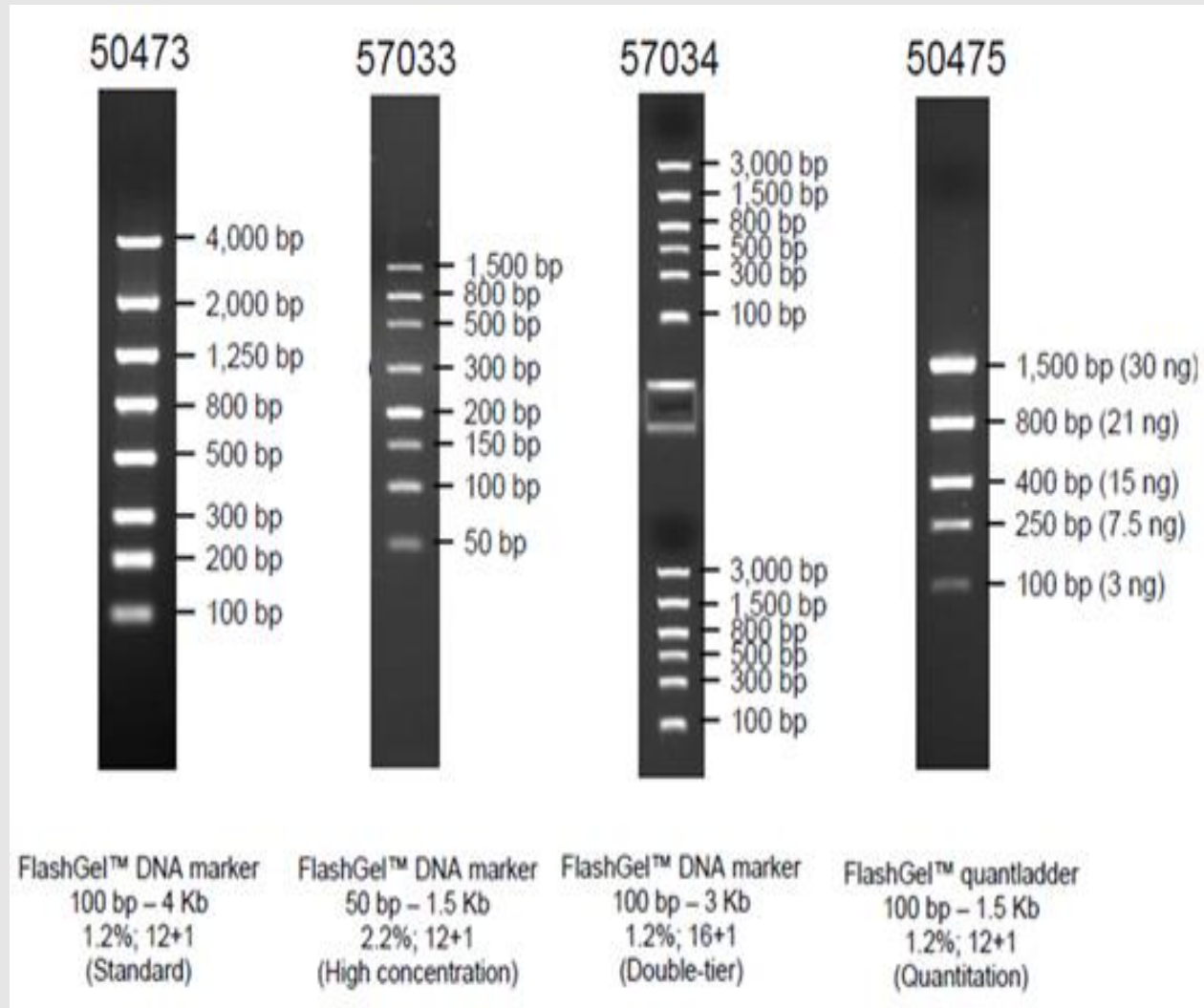
100bp



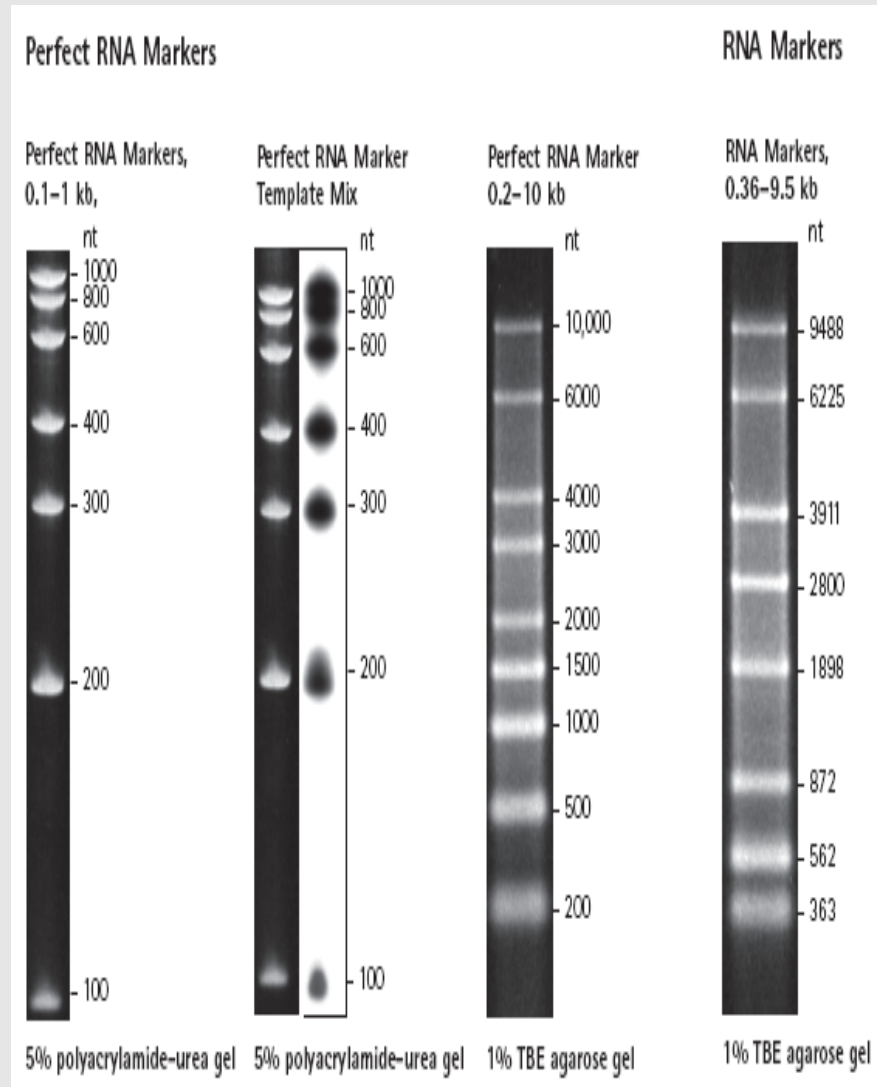
1kb



مارکرهای DNA



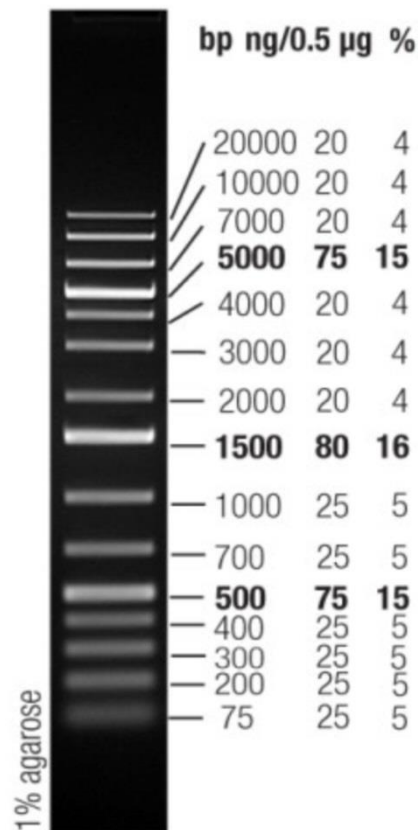
مارکرهای RNA



Farzaneh

آزمایشگاه زیست‌شناسی مولکولی، فخرانه فروهرفر

GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder

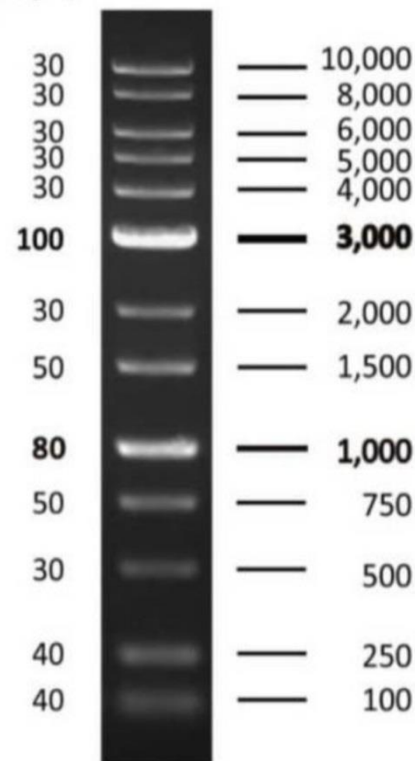


0.5 µg/lane, 8 cm length gel,
1X TAE, 7 V/cm, 45 min

Note. Formation of diffused bands of small DNA fragments is a feature of agarose gel electrophoresis.

DNA Mass
(ng/5µl)

Base Pairs



1 % TAE agarose gel

