



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

عنوان

تجزیه تحلیل پلی مرفیسم قطعات طولی محدود شونده
به روش الکتروفورز

RFLP

**Restriction Fregment Lenght
Polymorphism**

اهداف

بررسی مفهوم RFLP

(Restriction Fregment Lenght Polymorphism)

تجزیه و تحلیل قطعات به روش الکتروفورز

مقدمه

شناخت مفهوم RFLP

پلی مورفیسم به تفاوت در طول قطعات برش خورده DNA اشاره دارد که ناشی از تفاوت در جایگاه‌های محدودکننده در DNA است.

این تفاوت‌ها می‌توانند به شکل الگوهای متفاوت در زمان تجزیه و تحلیل ظاهر شوند.

تجزیه و تحلیل پلی مورفیسم قطعات طولی محدود شونده (Restriction Fragment Length Polymorphism) یا RFLP به کمک ژل آگارز یکی از روش‌های معمول در زیست‌شناسی مولکولی است که برای شناسایی تنوع‌های ژنتیکی استفاده می‌شود. در این روش DNA با آنزیم‌های محدودکننده برش خورده و سپس تجزیه و تحلیل قطعات برش خورده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز صورت می‌گیرد.

این تکنیک یک ابزار مهم در زیست‌شناسی مولکولی برای شناسایی تفاوت‌ها و مطالعه تنوعات ژنتیکی است. این روش بویژه در تحلیل DNA و شناسایی جهش‌ها، پلی مورفیسم‌ها، و نقشه‌برداری ژنوم‌ها کاربرد دارد.

مراحل تجزیه و تحلیل RFLP با ژل آگارز عبارت است از:

۱. استخراج DNA: در ابتدا باید DNA از نمونه‌های زیستی (مثلاً خون، بافت، یا سلول‌های گیاهی) استخراج شود.

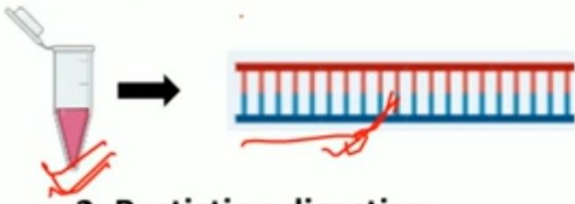
۲. هضم DNA با آنزیم‌های محدودکننده: آنزیم‌های محدودکننده برای برش DNA در توالی‌های خاص شناسایی شده استفاده می‌شوند. این آنزیم‌ها، بسته به جایگاه‌های موجود در DNA، قطعاتی با طول‌های مختلف ایجاد می‌کنند.

۳. جداسازی قطعات DNA با الکتروفورز ژل آگارز: قطعات تولیدشده از هضم DNA به وسیله الکتروفورز ژل آگارز جداسازی می‌شوند. در این مرحله DNA با استفاده از بار منفی خود به سمت قطب مثبت حرکت می‌کند.

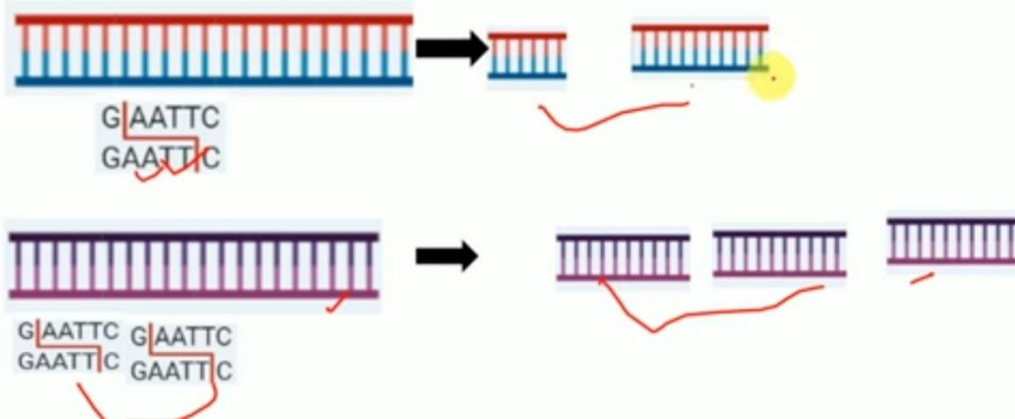
قطعات DNA بر اساس اندازه خود حرکت کرده و در نتیجه قطعات کوچکتر سریع‌تر از قطعات بزرگتر حرکت می‌کنند.

RFLP Steps

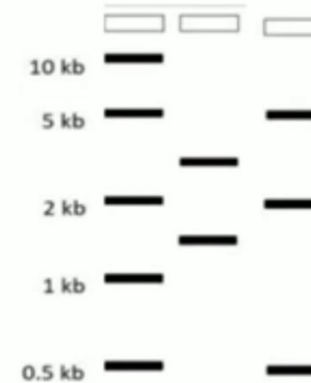
1. DNA Extraction



2. Restriction digestion



3. Agarose gel electrophoresis



۴. انتقال قطعات DNA به غشا (اگر نیاز باشد)

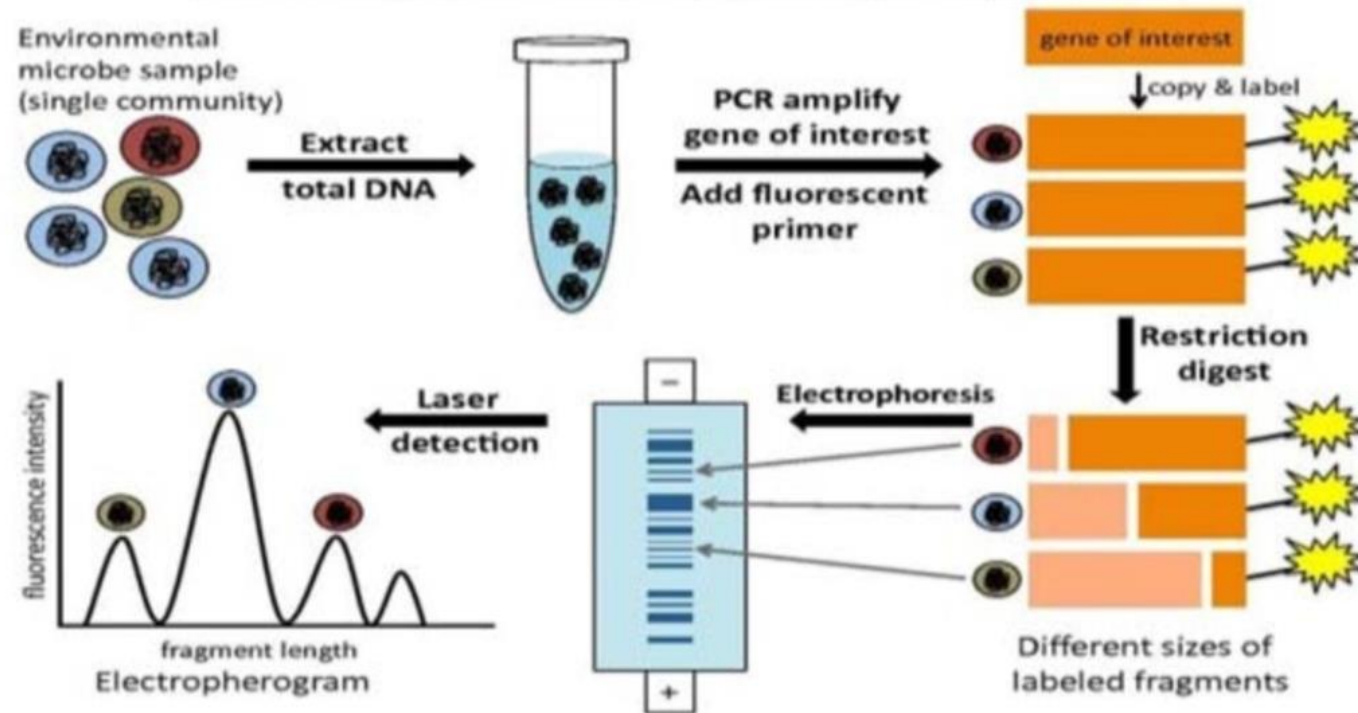
۵. استفاده از پروب‌ها برای شناسایی قطعات خاص:

در این مرحله از روش Southern Blot یا Northern Blot استفاده می‌شود

پروب‌ها به قطعات DNA خاص متصل می‌شوند که این قطعات را شناسایی می‌کنند.

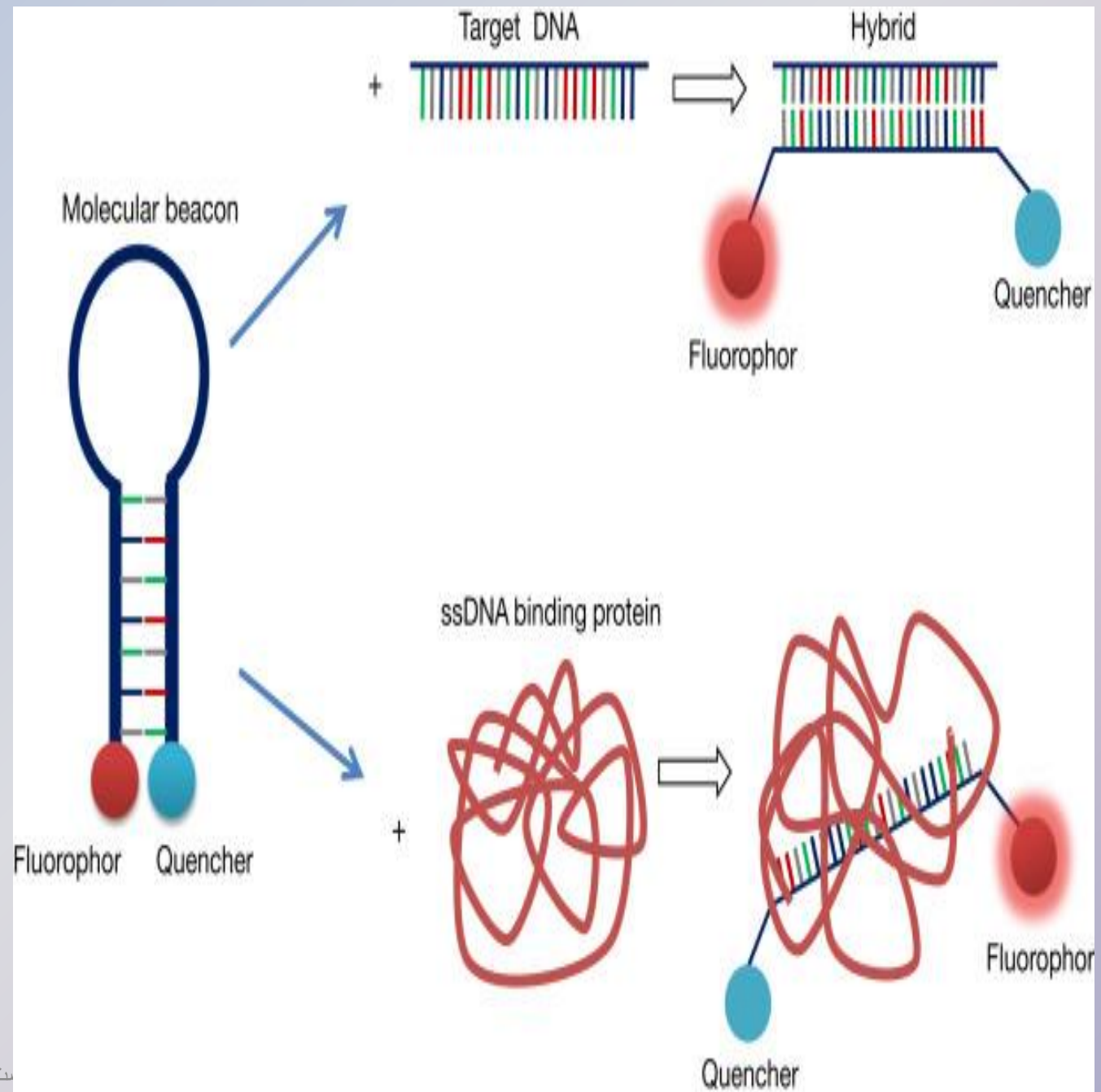
پس از انجام الکتروفورز و انتقال قطعات DNA به غشا (اگر لازم باشد)، نوارهایی که نشان‌دهنده قطعات DNA هستند توسط فلوئورسانس یا رنگ‌آمیزی با برومید اتیدیوم مشاهده می‌شوند.

T-RFLP: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism



پروب نوکلئوتیدی چیست؟

پروب نوکلئوتیدی یک توالی کوتاه و تکرار شونده از DNA یا RNA است که به طور اختصاصی به توالی مکمل خود در نمونه DNA یا RNA هدف متصل می شود. این مولکول دارای برچسب فلورسنت، رادیواکتیو یا آنزیمی است تا پس از اتصال، امکان شناسایی و ردیابی توالی مورد نظر را فراهم کند. پروب ها در روش های مختلف زیست شناسی مولکولی مانند هیبریداسیون در سادرن بلات، نورترن بلات، تشخیص جهش های ژنی، شناسایی میکروارگانیسم ها و بررسی بیان ژن استفاده می شوند.



کاربردهای تجزیه و تحلیل RFLP با ژل آگارز

1. شناسایی جهش‌ها و پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی: تفاوت‌ها در طول قطعات برش‌خورده می‌توانند به دلیل جهش‌ها یا تغییرات در توالی DNA ایجاد شوند که منجر به تولید قطعات طولی متفاوت می‌شود.

2. نقشه‌برداری ژنوم: از RFLP برای نقشه‌برداری جایگاه‌های ژنی و بررسی ساختار ژنتیکی استفاده می‌شود.

3. تشخیص بیماری‌های ژنتیکی: در تشخیص و شناسایی جهش‌های خاص که موجب بیماری‌های ژنتیکی می‌شوند، از این روش بهره‌برداری می‌شود.

4. تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها: برای شناسایی تنوع‌های ژنتیکی و مطالعه روابط تکاملی بین گونه‌ها.

5. تعیین الگوهای ارثی: در آزمایش‌های وراثت‌شناسی و در مطالعات پیوستگی ژنتیکی برای شناسایی روابط خانوادگی و ژن‌های مربوط به ویژگی‌های خاص.

وسائل مواد و تجهیزات مورد نیاز



مواد، وسایل و تجهیزات مورد نیاز برای انجام و تجزیه و تحلیل RFLP

1. DNA هضم شده: قطعات DNA حاصل از هضم آنزیمی که باید روی ژل آگارز جداسازی شوند.
2. لودینگ بافر
3. اتیدیوم بروماید (برای رنگ آمیزی DNA یا SYBR SAFE برای مشاهده قطعات).
4. پروب های خاص (در صورت نیاز به Southern Blot برای شناسایی قطعات DNA خاص از طریق هیبریداسیون).
5. ژل آگارز
6. محلول بافر الکتروفورز: TAE یا TBE برای انجام الکتروفورز استفاده می شود.
7. دستگاه الکتروفورز: برای حرکت DNA از طریق ژل به وسیله میدان الکتریکی
8. UV Transilluminator: برای مشاهده قطعات DNA پس از رنگ آمیزی با برومید اتیدیوم.
9. غشا نیتروسلولزی در صورت استفاده از Southern Blot برای انتقال قطعات DNA از ژل به غشا برای هیبریداسیون.

10. محلول هیبریداسیون (در صورت استفاده از پروب‌ها) برای شناسایی قطعات خاص از DNA

11. آب دیونیزه: برای رقیق کردن و شست‌وشو

12. میکروتیوب: برای انتقال و نگهداری نمونه‌ها

13. میکروپیپت‌ها و سرسمپلرها با حجمهای مختلف برای اندازه‌گیری دقیق حجم‌ها.

14. سانتریفیوژ

15. حمام آب: برای حفظ دمای واکنش‌های آنزیمی در طی انکوباسیون.

روش کار



روش کار

مرحله اول: استخراج DNA

DNA از نمونه‌های زیستی (مثلاً خون، بافت گیاهی یا حیوانی) استخراج کنید.

مرحله دوم: هضم آنزیمی DNA

۱. انتخاب آنزیم محدودکننده: آنزیم‌های محدودکننده‌ای را انتخاب کنید که توالی‌های خاص را شناسایی کنند.

۲. آماده‌سازی واکنش هضم: در یک میکروتیوب به حجم 50 میکرولیتر مخلوطی از مواد زیر آماده کنید:

DNA (معمولاً 1 میکروگرم)

بافر آنزیم (بسته به آنزیم انتخابی، معمولاً 5 میکرولیتر از بافر تجاری).

آنزیم محدودکننده (مقدار پیشنهادی از سازنده، معمولاً 1 واحد آنزیم).

آب دیونیزه برای رساندن حجم نهایی به 50 میکرولیتر.

۳. انکوباسیون واکنش هضم: واکنش را در دستگاه انکوباتور یا حمام آب در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 تا 2 ساعت (بسته به آنزیم) انکوبه کنید.

۴. غیرفعال‌سازی آنزیم‌ها: پس از اتمام زمان هضم، آنزیم‌ها را با قرار دادن میکروتیوب‌ها در دمای 65 درجه سانتی‌گراد برای 20 دقیقه غیرفعال کنید.

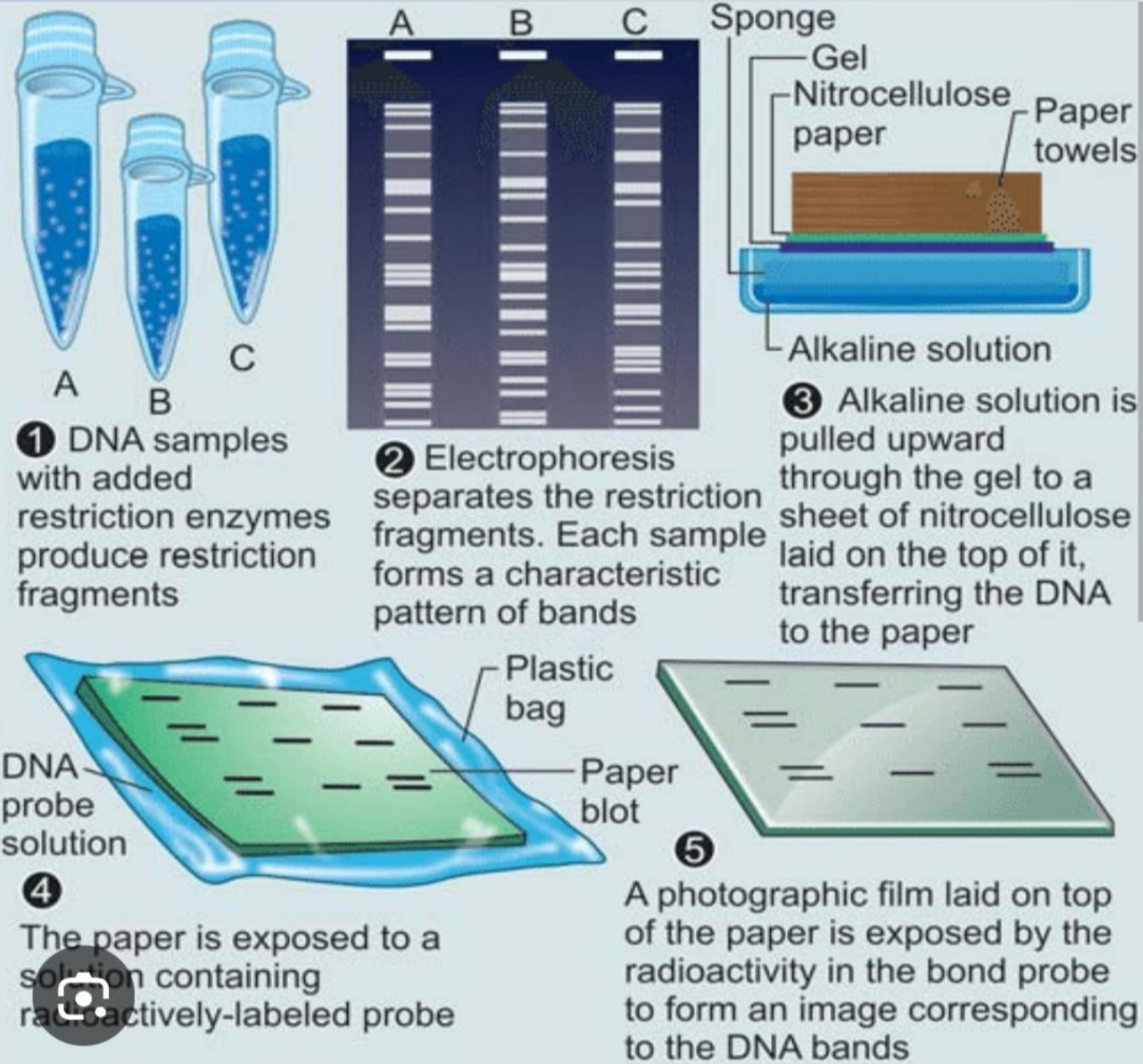
مرحله سوم: آماده‌سازی ژل آگارز برای الکتروفورز
آماده‌سازی ژل آگارز: برای آماده‌سازی ژل، مقدار مناسب آگارز (معمولاً 0.8 تا 2 درصد) را
در محلول بافر TBE حل کنید.

پس از حل شدن آگارز در بافر، محلول را در مایکروویو یا حمام آب تا زمانی که کاملاً ذوب
شود، حرارت دهید.

ژل را در قالب ژل الکتروفورز بریزید و در وسط قالب چاه‌های بارگذاری ایجاد کنید.
ژل را به مدت 20 تا 30 دقیقه در دمای اتاق بگذارید تا سفت شود.

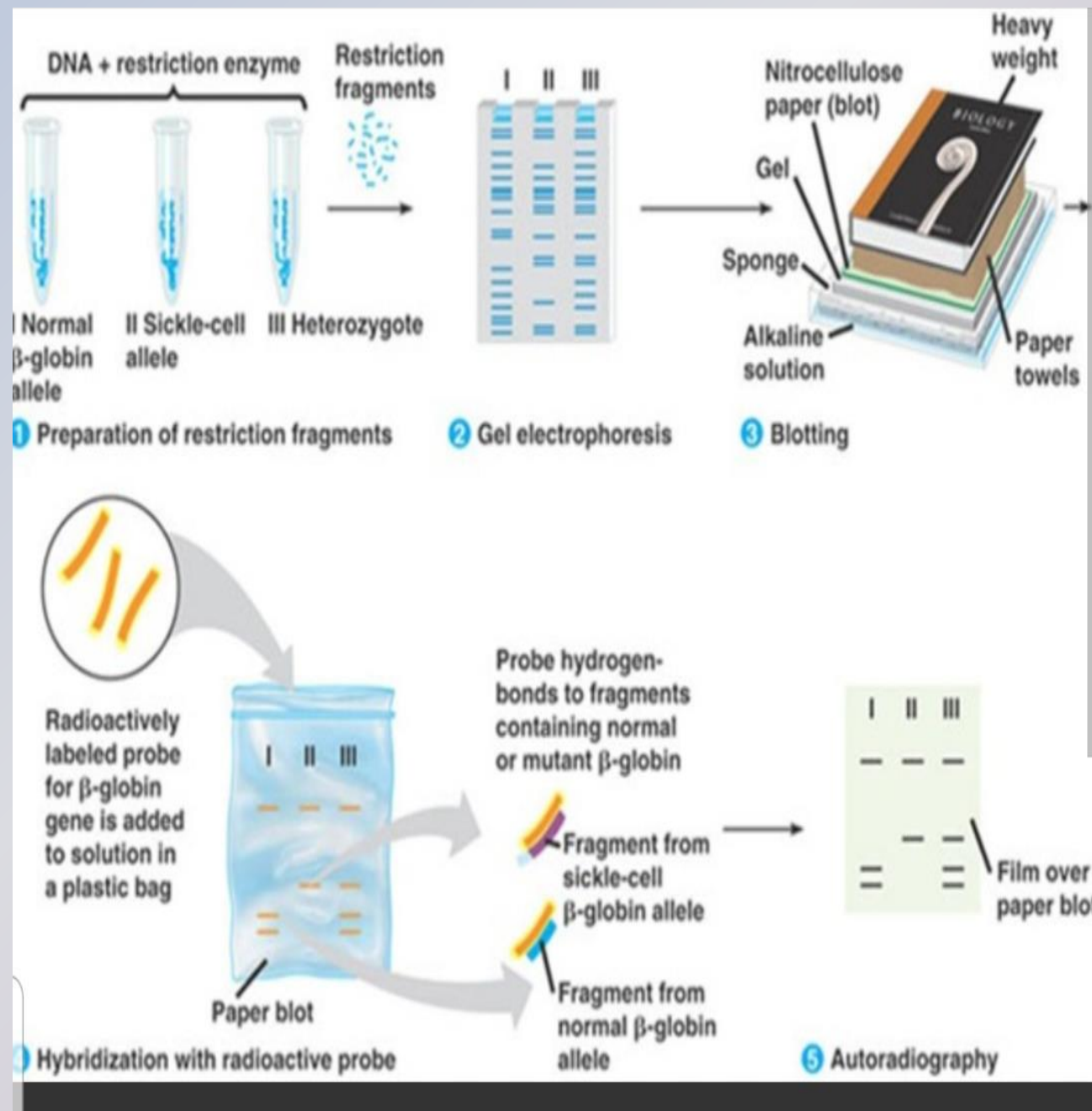
مرحله چهارم: بارگذاری و انجام الکتروفورز

- بارگذاری نمونه‌ها در ژل: به مقدار معین از قطعات DNA هضم‌شده (10-20 میکرولیتر) و محلول بارگذاری ژل (که معمولاً حاوی برومید اتیدیوم یا رنگ دیگر برای مشاهده DNA است) را به چاهک های ژل اضافه کنید.
- انجام الکتروفورز: ژل را در دستگاه الکتروفورز قرار دهید. با استفاده از بافر TAE یا TBE، جریان الکتریکی را اعمال کنید. معمولاً 100 ولت برای 45-60 دقیقه یا تا زمانی که رنگ بارگذاری به انتهای ژل برسد، جریان را برقرار می‌کنید. قطعات DNA بر اساس اندازه خود در ژل حرکت می‌کنند.
- مشاهده DNA در ژل: پس از اتمام الکتروفورز، ژل را در UV transilluminator قرار دهید تا قطعات DNA مشاهده شوند. برومید اتیدیوم در زیر نور UV می‌درخشد و قطعات DNA را به صورت نوارهایی نشان می‌دهد.
- عکسبرداری از ژل: از ژل عکس بگیرید یا نوارها را با استفاده از دوربین UV ثبت کنید.



Process of RFLP analysis Fig.





تحلیل و تفسیر نتایج

اندازه قطعات برش خورده را با استفاده از مقیاس استاندارد (Marker DNA) که در کنار نمونه‌ها بارگذاری شده است، مقایسه کنید.

تفاوت‌های طول قطعات به دلیل پلی‌مورفیسم (تغییرات در سایت‌های محدودکننده) نشان‌دهنده وجود تنوع‌های ژنتیکی در نمونه‌ها است.

این نتایج می‌توانند در تحلیل‌های بیشتری مانند کلونینگ ژنی، مطالعه جهش‌ها، و بررسی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند.

انجام مراحل فوق شامل استخراج DNA، هضم آنزیمی، الکتروفورز ژل آگارز، و تحلیل نتایج به ما این امکان را می‌دهد تا پلی‌مورفیسم‌های مختلف ژنتیکی را شناسایی کنیم. برای هر مرحله، مواد و وسایل خاصی نیاز است که باید به دقت انتخاب و استفاده شوند تا نتایج دقیقی بدست آید.

مثال از آنزیم MstII در ژن بتاگلوبین و نقش آن در تشخیص کم‌خونی داسی‌شکل (Sickle Cell Anemia)

Sickle-cell anemia	
Caused by single bp substitution in β -globin gene	
Type of Hb	Amino acid sequence Nucleotide sequence
A	—Pro—Glu—Glu— —CCT—GAG—GAG— ⏟ MstII
S	—Pro—Val—Glu— —CCT—GTG—GAG

در آل نرمال (βA) این توالی وجود دارد، پس برش انجام می‌شود.
در آل داسی شکل (βS) به دلیل جهش نقطه‌ای ($A \rightarrow T$) این جایگاه از بین رفته و برش صورت نمی‌گیرد.

معرفی آنزیم MstII:

MstII یک آنزیم محدودکننده است که توالی CCTNAGG (N می‌تواند هر نوکلئوتیدی باشد) را در DNA شناسایی و برش می‌دهد.
این آنزیم در مطالعه ژن بتاگلوبین (HBB) برای تشخیص کم‌خونی داسی‌شکل (Sickle Cell Anemia) کاربرد دارد.

تأثیر MstII بر ژن بتاگلوبین:

- فرد سالم ($\beta A/\beta A$): در آلل نرمال (βA)، آنزیم MstII یک جایگاه خاص در اگزون 1 ژن بتاگلوبین دارد. وقتی DNA با MstII هضم شود، ۲ قطعه کوچکتر ایجاد می‌شود.

در ژل الکتروفورز: ۲ باند دیده می‌شود.

- فرد مبتلا به داسی‌شکل ($\beta S/\beta S$): در آلل جهش‌یافته (βS)، یک جهش نقطه‌ای در کدون 6 (تغییر $GAG \rightarrow GTG$) رخ داده است. این جهش جایگاه برش MstII را از بین می‌برد، بنابراین برشی اتفاق نمی‌افتد.

در ژل الکتروفورز: یک باند بزرگتر (DNA برش‌نخورده) دیده می‌شود.

تأثیر MstII بر ژن بتاگلوبین:

- فرد هتروزیگوت ($\beta A/\beta S$):

یک آل (βA) دارای جایگاه برش است → برش خورده و ۲ قطعه کوچکتر ایجاد می‌کند.

آل دیگر (βS) جایگاه برش ندارد → یک قطعه بزرگتر باقی می‌ماند.

در ژل الکتروفورز: ۳ باند (یک باند بزرگ و دو باند کوچکتر) دیده می‌شود.

آنزیم MstII بنابراین برای تشخیص جهش داسی‌شکل در ژن بتاگلوبین بسیار مؤثر است.

تفاوت در الگوی باندها در آزمایش RFLP می‌تواند برای غربالگری ژنتیکی و تشخیص بیماری‌های وراثتی به کار رود.

الگوی باندها در ژل RFLP برای آنزیم MstII

الگوی باندها در ژل RFLP برای آنزیم MstII

ژنوتیپ	وضعیت فرد	تعداد باندها	الگوی باندها
$\beta A/\beta A$	سالم	۲ باند	۲ قطعه کوچکتر
$\beta A/\beta S$	ناقل (هتروزیگوت)	۳ باند	۲ قطعه کوچک + ۱ قطعه بزرگتر
$\beta S/\beta S$	مبتلا	۱ باند	۱ قطعه بزرگتر

Determine β -globin genotype by RFLP analysis

