University of Isfahan

Faculty of Biological Science and Technology

Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology

Farzaneh Forouharfar

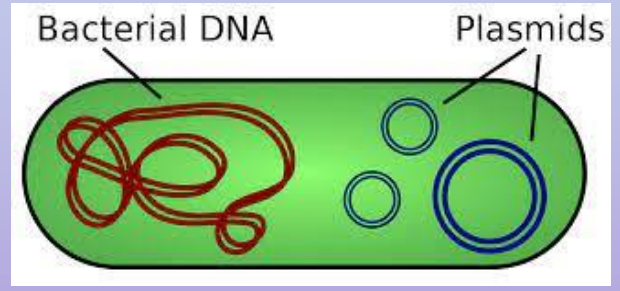
# آشنایی با روش‌های عملی بیولوژی مولکولی

# Familiarity with practical method of molecular Biology

Farzaneh Forouharfar

# اهداف آزمایش

- ✓ آشنایی با انواع پلاسمیدها، ساختمان و کاربرد آن‌ها
- ✓ تهیه‌ی محلول LB و پلیت‌های LB آگار و LB آگار با آمپی‌سیلین
- ✓ تلقیح کلونی باکتریایی در محیط LB و کشت باکتری‌ها
- ✓ تهیه‌ی استوک باکتریایی جهت نگهداری طولانی‌مدت



Farzaneh Forouharfar

# مقدمه

پلاسمیدها مولکول‌های دنای حلقوی می‌باشند که به صورت خارج کروموزومی در اغلب باکتری‌ها یافت می‌شوند. همه‌ی پلاسمیدها دارای منشا همانندسازی مستقل بوده و مستقل از دنای کروموزومی (ژنوم) باکتری قادر به تکثیر می‌باشد. بسته به نوع پلاسمید و میزبان از 2 تا 200 کپی از یک پلاسمید در یک باکتری ممکن است یافت شود. پلاسمیدها اغلب دارای ژن‌های مختلفی از جمله ژن مقاومت به یک یا چند آنتی‌بیوتیک می‌باشند. انتقال پلاسمیدها از یک باکتری به باکتری دیگر سبب انتقال خصوصیات پلاسمیدی از حمله مقاومت به آنتی‌بیوتیک می‌شود. در شرایط عادی ممکن است حضور پلاسمید برای بقای باکتری ضروری نباشد. پلاسمیدها در بیولوژی مولکولی به عنوان وکتور جهت تکثیر و انتقال قطعات دنا از یک سلول به سلول دیگر مورد استفاده می‌باشد.

از این‌رو پلاسمیدهایی با اندازه‌های مختلف طراحی و ساخته شده است. چنین پلاسمیدهایی علاوه بر نقطه‌ی شروع همانندسازی و ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارای ناحیه‌ای برای کلونینگ قطعه‌ی دنای موردنظر (غریبه) می‌باشند. ناحیه‌ی مزبور متشکل از چند جایگاه برای آنزیم‌های محدودکننده (Restriction Enzymes) بوده که جایگاه کلونینگ چندگانه MSC ( Multiple Cloning Site) نامیده می‌شوند.

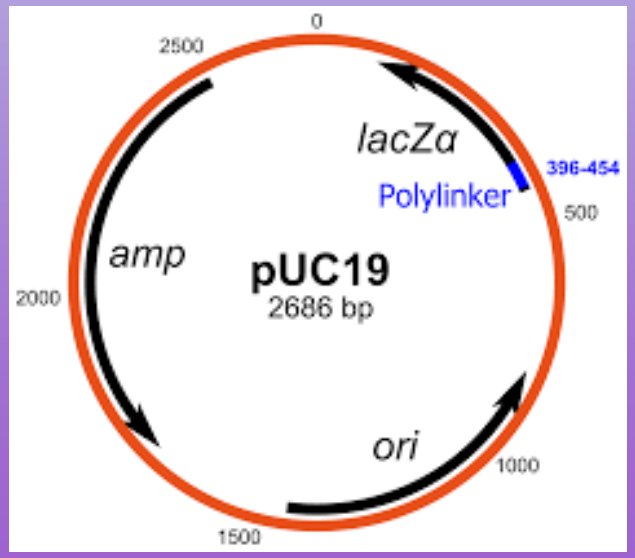
وجود جایگاه‌های متعدد برای آنزیم‌های محدودکننده، انتخاب نوع آنزیم محدودکننده را بیشتر نموده و فرایند کلونینگ را تسهیل می‌نماید.

شکل1-1 ساختمان شماتیک پلاسمید PBR322 را نشان می‌دهد. پلاسمید مزبور از قدیمی‌ترین پلاسمیدهایی است که در بیولوژی مولکولی جهت تکثیر قطعات دنای مختلف به کار گزفته شده است و در رابطه با دنا در باکتری *E.coli* بسیار کاربرد دارد. طول این پلاسمید حدود 4361bp است. علاوه بر نقطه‌ی شروع همانندسازی (ORI) دارای ژن‌های مقاومت به آمپی‌سیلین (Amp) و تتراسایکلین (Tc) می‌باشد.

در نقشه‌ی ژنتیکی این پلاسمید علاوه بر مشخص شدن قطعات فوق محل اثر آنزیم‌های متعددی هم مشخص شده. شکل 2-1 جایگاه‌های آنزیم‌های محدودکننده را بر روی پلاسمید PBR322 نشان می‌دهد.

از انواع دیگر پلاسمیدها می‌توانPUC18 ، PUC19 ، PTZ 19R ، PTZ 19U ، PACYC 177 ، را نام برد. پلاسمیدهای با پایه‌ی PUC دارای عدد کپی بیشتری از PBR322 در باکتری اشرشیا کلی می‌باشد. حضور پلاسمید در باکتری اغلب با بررسی ژن‌های حمل‌شده توسط پلاسمید نشان داده میشود. برای مثال باکتری اشرشیاکلی در حالت طبیعی نسبت به اثرات ممانعتی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و تتراسایکلین حساس است. اما باکتری‌های حاوی پلاسمید PBR322 به این آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم اند. این پلاسمید دو سری ژن را حمل می‌کند: یک سری مسئول تولید آنزیم بتالاکتاماز که آمپی‌سیلین را به فرم غیرسنی در می‌آورد و سری دوم ژن‌ها مسئول تولید آنزیم‌هایی هستند که در غیرسمی کردن تتراسایکلین نقش دارند.

پلاسمیدهای با پایه‌ی PUC از جمله PUC19 نیز دارای کاربرد متعددی می‌باشد. این پلاسمیدها علاوه بر ژن مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین دارای ژن آنزیم بتاگالاکتوسیداز نیز می‌باشد. به همین دلیل پس از انتقال این پلاسمیدها به داخل باکتری2های لاکتوز منفی، لاکتوز مثبت می‌گردد( البته این پلاسمیدها عموما تنها ژن مربوط به یک زیرواحد آنزیم بتاگالاکتوسیداز را دارند و ژن زیرواحد دیگر در ژنوم باکتری میزبان باید وجود داشته باشد). از این خاصیت جهت بررسی صحت کلونینگ نیز استفاده می‌شود( چگونه؟) شکل‌های 3-1 و 4-1 ساختمان پلاسمید PUC19 و جایگاه آنزیم‌های محدودکننده را بر روی آن نشان می‌دهد.




Farzaneh Forouharfar

# مواد موردنیاز

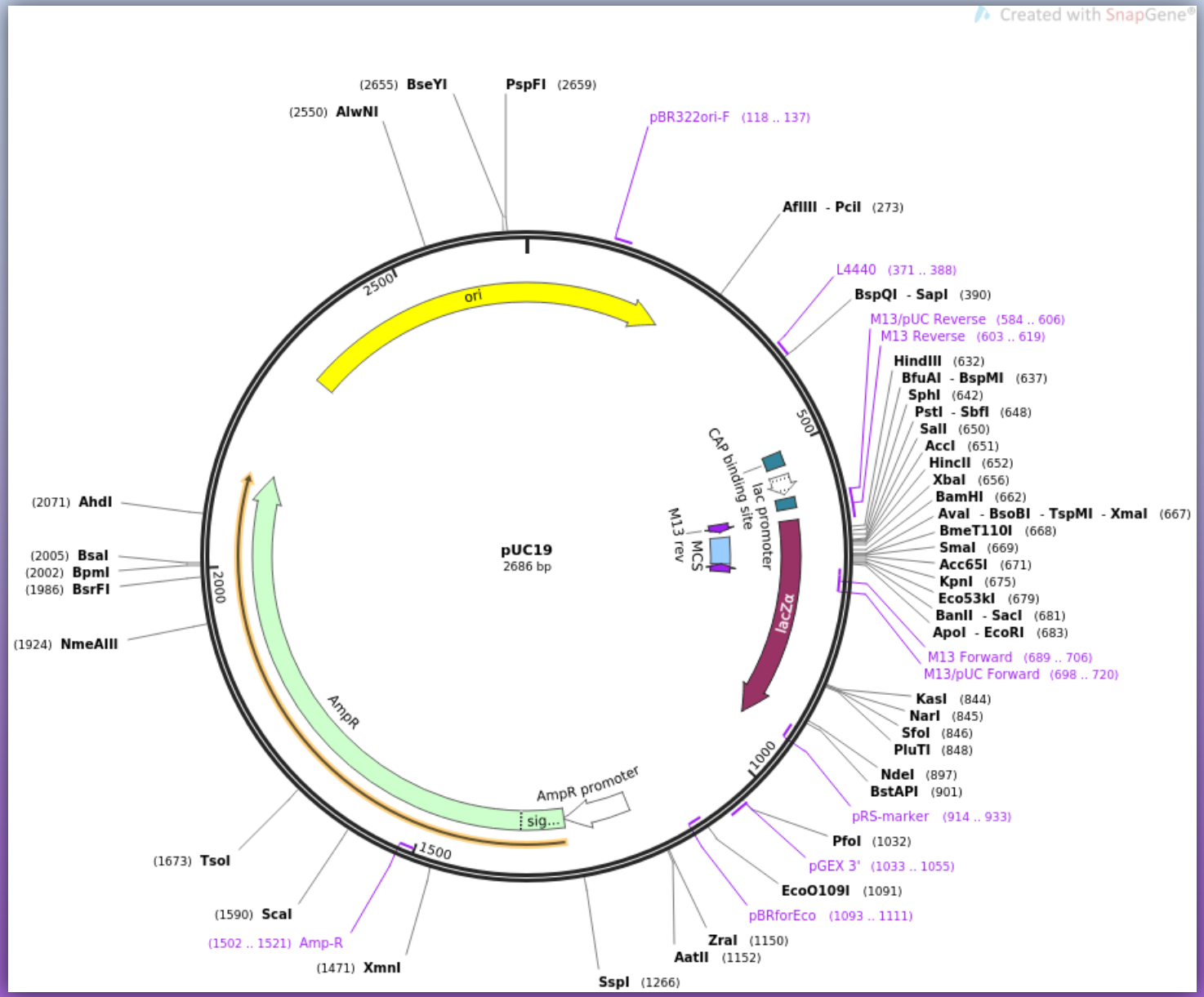
- تریپتون – 10 گرم
- نمک طعام – 10 گرم
- عصاره مخمر – 5 گرم
- هیدروکسید سدیم – 1 میلی‌لیتر (1مولار)
- آب مقطر- 1 لیتر
- آگار- 3.75 گرم
- آمپی‌سیلین – 75 میلی‌گرم
- گلیسیرین – به تعداد استوک‌های باکتریایی

Farzaneh Forouharfar

# وسایل موردنیاز

- ترازوی حساس
- لوله شیشه‌ای 15 میلی‌لیتر (تعدادی)
- پی‌پت‌های استریل نیم و یک میلی‌لیتری
- پلیت استریل (تعدادی)
- لوله اپندرف استریل (تعدادی)
- نوار پارافیلم
- لوپ مخصوص کشت باکتری
- ارلن 1 لیتری 2 عدد
- ارلن 250 میلی‌لیتری (تعدادی)
- شعله آتش
- فریزر 20-
- انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد
- انکوباتور شیکردار

Farzaneh Forouharfar




- ساختمان پلاسمید PUC19. پلاسمید مزبور علاوه بر نقطه شروع همانندسازی (ORI)، دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین(Amp)، ژل بتاگالاکتوسیداز، جایگاه چندگانه کلونینگ و ژن رپرسور(LacI)می‌باشد.

Farzaneh Forouharfar

# طرز ساخت محلول‌ها و محیط کشت

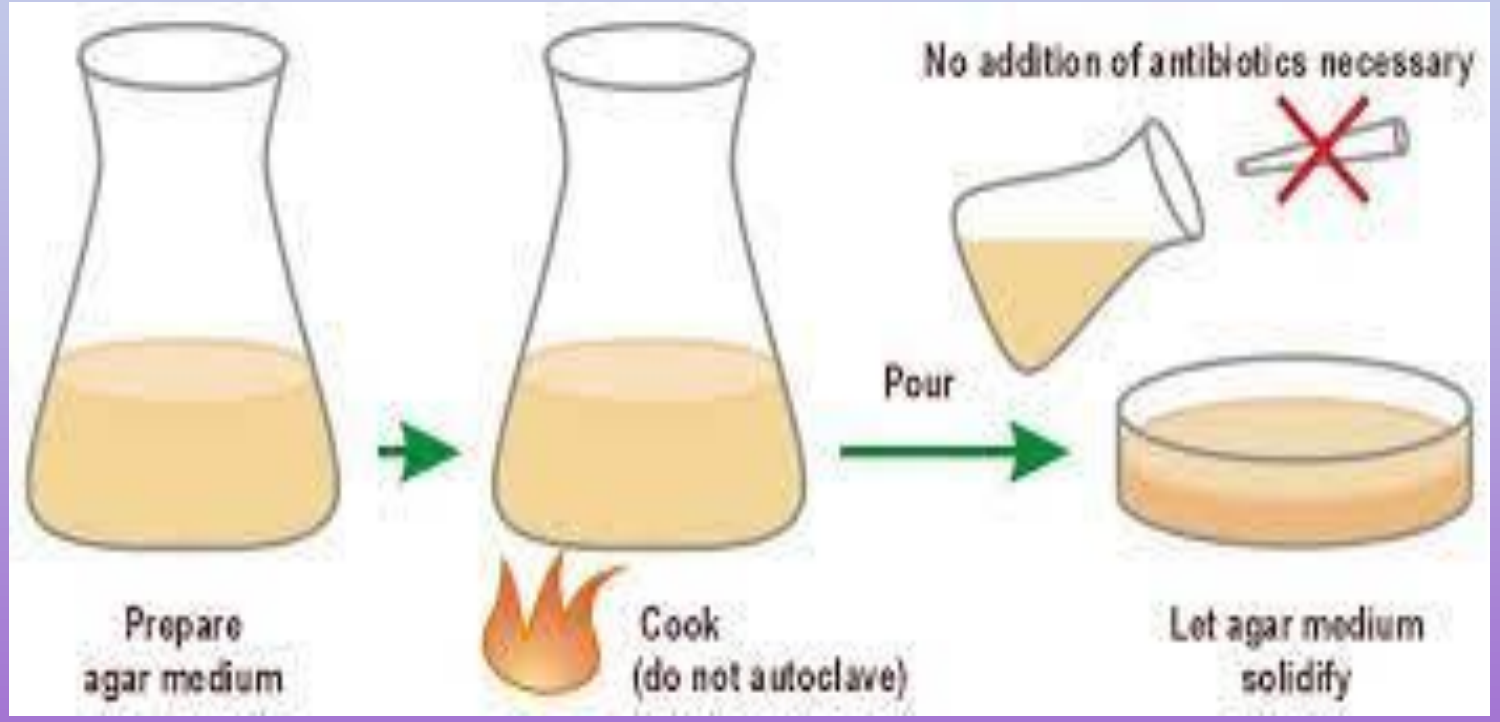
1. **محیط کشت مایع LB :**

برای تهیه یک لیتر محیط کشت، 10 گرم تریپتون، 10 گرم نمک‌طعام و 5 گرم عصاره مخمر را وزن کرده و با 1 میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم یک مولار(جهت تنظیم pH) با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده و خوب مخلوط نمایید تا محلول شفافی به‌دست آید. بلافاصله محلول را در ارلن‌های کوچکتر حدود 250 میلی‌لیتری تقسیم کرده، با آلومینیوم درپوش گذاری نموده و اتوکلاو نمائید. پس ازخنک شدن در دمای محیط یا یخچال نگهداری می‌کنیم. به منظور تهیه محیط کشت LB-آگار، قبل از اتوکلاو مقدار 3.75 گرم آگار به 250 سی‌سی محیط LB اضافه نموده و اتوکلاو کنید.

2. **تهیه پلیت‌های LB آگار:**

پس ار اتوکلاو نمودن LB آگار، قبل از اینکه منعقد شود(دمای 45 درجه سانتی‌گراد) در کنار شعله آن را در 10 پلیت توزیع کنید. به این ترتیب برای هر پلیت 25 سی‌سی از LB-آگار مصرف خواهد شد. پس از منعقد شدن، اطراف پلیت را با پارافیلم به دقت بپوشانید و به‌طور وارونه برای استفاده بعدی در یخچال نگهداری کنید. این پلیت برای مدت یک ماه قابل نگهداری می‌باشند.

Farzaneh Forouharfar


No addition of antibiotics necessary
Pour
Prepare
agar medium
Cook
(do not autoclave)
Let agar medium
solidify

**3.تهیه محیط LB حاوی آمپی‌سیلین و LB-آگار حاوی آمپی‌سیلین:**

جهت تهیه استوک آمپی‌سیلین (*1000) حدود 75 گرم آمپی‌سیلین را در 1میلی‌لیتر آب مقطر استریل در یک اپندرف استریل حل کنید. سپس به 250 میلی‌لیتر از محیط LB استریل، 250 میکرولیتر آمپی‌سیلین اضافه کنید. جهت تهیه پلیت‌های LB-آگار حاوی آمپی‌سیلین، قبل از ریختن LB-آگار به داخل پلیت‌ها (دما حدود 40 درجه)، آمپی‌سیلین به میزان یک میکرولیتر در میلی‌لیتر از استوک آمپی‌سیلین اضافه گردد.

**4. کشت و تکثیر باکتری‌ها**

جهت انجام آزمایشات مربوط به تکثیر، استخراج و آنالیز دنا پلاسمیدی نیاز به باکتری‌های مناسب و فعالی داریم که دنا پلاسمیدی را به آن‌ها وارد کنیم.بنابراین لازم است که از استوک اولیخ باکتری تعدادی از آن‌ها را در پلیت حاوی محیط LB-آگار که قبلا تهیه نموده‌اید به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد کشت دهید. پس از این زمان یک کلنی از باکتری‌ها را در 5 میلی‌لیتر محیط LB-آگار تلقیح کنید و در انکوباتور شیکردار در دمای 37 درجه سانتی‌گراد حدود 16-17 ساعت رشد دهید تا $OD_{600}$ = 0.6 حاصل شود. این باکتری‌ها برای انجام مراحل بعدی آزمایش‌ها آماده‌اند.

CULTURED

MOLTOX
21-40S122
LB Agar (Lennox L) w/
12.5µg/mL Zeocin &
25ug/mL Kanamycin
10 plates/slv
Lot No:

**5.تهیه استوک باکتریایی:**

به منظور تهیه استوک باکتریایی از سوش‌های مناسب که قبلا در آزمایش‌های مولکولی نتایج خوبی داده‌اند استفاده می‌شود. به این ترتیب که در یک اپندرف استریل، نیم میلی‌لیتر گلیسیرین استریل و 300-400 میکرولیتر محیط کشت حاوی باکتری که در مرحله قبل کشت داده شد، اضافه نمایید.درب لوله‌ها را محکم بسته و با پارافیلم به دقت مسدود نمائید. سپس برچسب نام و تاریخ روی آن زده، خوب ورتکس نمائید و دردمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. این استوک تا مدت‌ها قابل استفاده می‌باشد(حدود 6 ماه). لازم است هر 3-6 ماه یکبار استوک‌ها تجدید شوند.

PURE
GLYCEROL
DISTILLED
WATER
50%
SOLUTION
10 mL
10 mL
wikiHow

# سوالات

لطفا به سوالات زیر در گزارش‌کار خود پاسخ دهید.

1. خصوصیات محیط LB چیست؟

2. اهمیت پلاسمیدهای PBR322 و PUC19 را به عنوان حامل مناسب جهت کلونینگ ذکر کنید.