BP DNA Ladder Low Range

مواد و روش ها:

۱- پلاسمید

۲- باکتری اکولای سویه DH5a

۳- آنزیم های Restriction Site

۴- طراحی مجموعه ای 12 **جفتی از پرایمر ها با جایگاه های برش آنزیمی**

۵- نانودراپ

۶- باکس حاوي يخ

۷- میکروسانتریفیوژ یخچال دار با حداکثر دور 14000 RPM **از شرکت سیگما**

۸- سمپلر هاي اپندروف 10 **و** 100

۹- سر سمپلر هاي فیلتر دار مخصوص سمپلر 100 **و** 10 **با مارك** Biohit

۱۰- کیت TA – cloning Vector **از شرکت فرمنتاز با کت نامبر**

۱۱- لوله هاي فالکون 15 mL **استریل**

۱۲- آنتي بیوتیك آمپي سیلین با غلظت استوك 100 µg/mL

۱۳- پلیت هاي استریل کشت

۱۴- تریپتون و Nacl **از شرکت مرك**

۱۵- Yeast extract **از شرکت فولکا**

۱۶- لوله هاي شیشه اي

۱۷- سوش هاي باکتري DH5α

۱۸- سوش باکتري XL1Blue

۱۹- IPTG **و** X-Gal **خریداري شده از شرکت سیناکلون**

۲۰- ماده DMSO **از شرکت مرك**

۲۱- اتوکلاو مدل تامي ژاپن

۲۲- پیپت پاستور

۲۳- فیلتر 0.2 **میلي پور**

۲۴- سواپ هاي استریل

۲۵- Orange G

۲۶- Cyanol FF

پروسه:

ابتدا مجموعه ای از پرایمر با تعداد اندازه های مورد نظر از 50bb تا 1000bb طوری طراحی می شوند تا در انتهای 5′ هر یک از پرایمر های رفتی و برگشتی(Forward& Reverse) جایگاه آنزیم های برش قرا گیرد. این پرایمرها می توانند توالی های مختلفی از یک میکروارگانیسم غیر بیماریزا برای انسان را تکثیر نمایند.

سپس از میکروارگانیسم مورد نظر با کمک کیت استخراج DNA ژنوم ویروس مورد نظر استخراج می گردد. واکنش PCR بر روی هر جفت از پرایمر ها انجام می شود. سپس محصول PCR و وکتور PTZ با کمک آنزیم برش دهنده همسان برش داده می شوند. آنگاه آنزیم برش داده شده و وکتور PTZ در مجاورت هم در حضور آنزیم لیگاز به هم الحاق می شوند و سپس پلاسمید نوترکیب PTZ به سلول های کامپتنت اکولای سویه DH5a ترانسفور شده و بروی محیط LB جامد حاوی ۵۰ میکروگرم آمپی سیلین، XGAL وIPTG کشت داده می شوند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار می گیرند.

آنگاه کلون های نوترکیب شفاف جدا سازی شده و این باردر محیط LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم آمپی سیلین کشت داده می شوند.

سپس استخراج پلاسمید با کمک کیت فرمنتاز انجام می شود. بروی پلاسمید استخراج واکنش هضم آنزمی بصورت Double Digestion انجام می شود. و محتوی واکنش بر روی ژل آگارز 1.2% الکتروفورز شده و باندهای مورد نظر با کمک یک اسکالپل تمیز در زیر نور UV برش داده می شود.

سپس با کمک کیت استخراج از ژل شرکت ترمو باند مورد نظر تخلیص می شود.

مقدار غلظت DNA با کمک دستگاه نانودراپ 2000C ترمو اندازه گیری می شود. و به میزان 80ng/µl در محلولی حاوی ترکیبات زیر حل می شود:

liquid, green, DNA fragment mix in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 10 % (w/v) Glycerol, Orange G and Xylene Cyanol FF

برای باند های شاخص در این لدر 200 bb 500 bb , 1000 bb, به میزان 120 ng/µl حل می شود.

توجه: برای هر یک از اندازه ها طبق دستورالعمل فوق اقدام می شود.

لدر Low Range از 11 قطعه DNA تشکیل شده است که محدوده ای تشخیصی از 50 کیلو باز تا 1000bb را شامل می شود. این کیت برای تشخیص انداز DNA بر روی ژل الکتروفورز طراحی شده است . در این سیستم ابتدا DNA مورد نظر شما در حضور این لدر به میزان ۵ میکرولیتر بر روی ژل آگاروز 3% لود می شود.

این کیت حاوی دو رنگ Orange G و Cyanol FF می باشد که میزان حرکت DNA Ladder را به خوبی نشان می دهد.

DNA Fragments:
50, 75, 100, 150, **200**, 300, 400, **500**, 600, 800, 1000 bp