

## BP DNA Ladder Mid Range

مواد و روش ها:

- ۱- پلاسمید
- ۲- باکتری اکولای سویه DH5a
- ۳- آنزیم های Restriction Site
- ۴- طراحی مجموعه ای 12 جفتی از پرایمرها با جایگاه های برش آنزیمی
- ۵- نانودراپ
- ۶- باکس حاوی یخ
- ۷- میکروسانتریفیوژ یخچال دار با حداکثر دور 14000 RPM از شرکت سیگما
- ۸- سمپلر های اپندروف 10 و 100
- ۹- سر سمپلر های فیلتر دار مخصوص سمپلر 100 و 10 با مارک Biohit
- ۱۰- کیت TA – cloning Vector از شرکت فرمنتاز با کت نامبر
- ۱۱- لوله های فالكون 15 mL استریل
- ۱۲- آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت استوک 100  $\mu\text{g/mL}$
- ۱۳- پلیت های استریل کشت
- ۱۴- تریپتون و NaCl از شرکت مرک
- ۱۵- Yeast extract از شرکت فولکا
- ۱۶- لوله های شیشه ای
- ۱۷- سوش های باکتری DH5 $\alpha$
- ۱۸- سوش باکتری XL1Blue
- ۱۹- IPTG و X-Gal خریداری شده از شرکت سیناکلون
- ۲۰- ماده DMSO از شرکت مرک
- ۲۱- اتوکلاو مدل تامی ژاپن
- ۲۲- Orange G
- ۲۳- Cyanol FF
- ۲۴- پیپت پاستور
- ۲۵- فیلتر 0.2 میلی پور
- ۲۶- سوآپ های استریل

پروسه:

ابتدا مجموعه ای از پرایمر با تعداد اندازه های مورد نظر از 100 bb تا 3000 bb 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 میکروارگانیزم غیر بیماریزا برای انسان را تکثیر نمایند.

سپس از میکروارگانیزم مورد نظر با کمک کیت استخراج DNA ژنوم ویروس مورد نظر استخراج می گردد. و اکنش 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 نو ترکیب PTZ به سلول های کامپنتت اکولای سویه DH5a ترانسفور شده و بروی محیط LB جامد حاوی ۵۰ میکروگرم آمپی سیلین، XGAL و IPTG کشت داده می شوند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار می گیرند.

آنگاه کلون های نو ترکیب شفاف جدا سازی شده و این بار در 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 آنزیمی بصورت Double Digestion انجام می شود. و محتوی واکنش بر روی ژل آگارز 1.2% الکتروفورز شده و باند 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 شرکت 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 باندهای شاخص در این لدر 2000, 1500, 1000, 500 bb به میزان 120 ng/μl حل می شود.

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

لدر Mid Range از ۱۲ قطعه DNA تشکیل شده است که محدوده ای تشخیصی از 100 bb تا 3000 bb 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 1.8% 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:

100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1500, 2000, 3000 bp

