

Colony PCR

دکتر محمد مهدی حیدری

عضو هیات علمی ژنتیک مولکولی

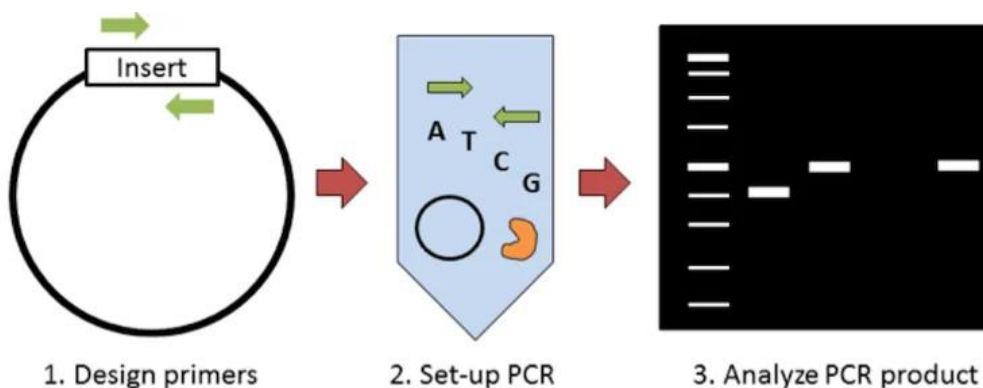
دانشگاه یزد

کلون سازی مولکولی نیاز به روشی برای غربالگری کلنی های رشد کرده در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک است تا کلنی های حاوی قطعه دلخواه (Inserted fragment) شناسایی شود. به طور سنتی این کار با هضم آنزیم محدودکننده انجام می شود. با این حال کلنی PCR می تواند همان کار را در زمان کمتر و هزینه کمتر انجام دهد. مراحل کلیدی برای کلونی PCR عبارتند از:

(۱) طراحی پرایمرهایی برای تشخیص وجود قطعه دلخواه شما.

(۲) یک واکنش استاندارد PCR (پرایمرها، dNTPs، پلیمرز) را با استفاده از مقدار کمی از کلنی باکتری به عنوان الگو.

(۳) محصول PCR خود را روی ژل ران کنید تا اندازه محصول را تجزیه و تحلیل کنید.



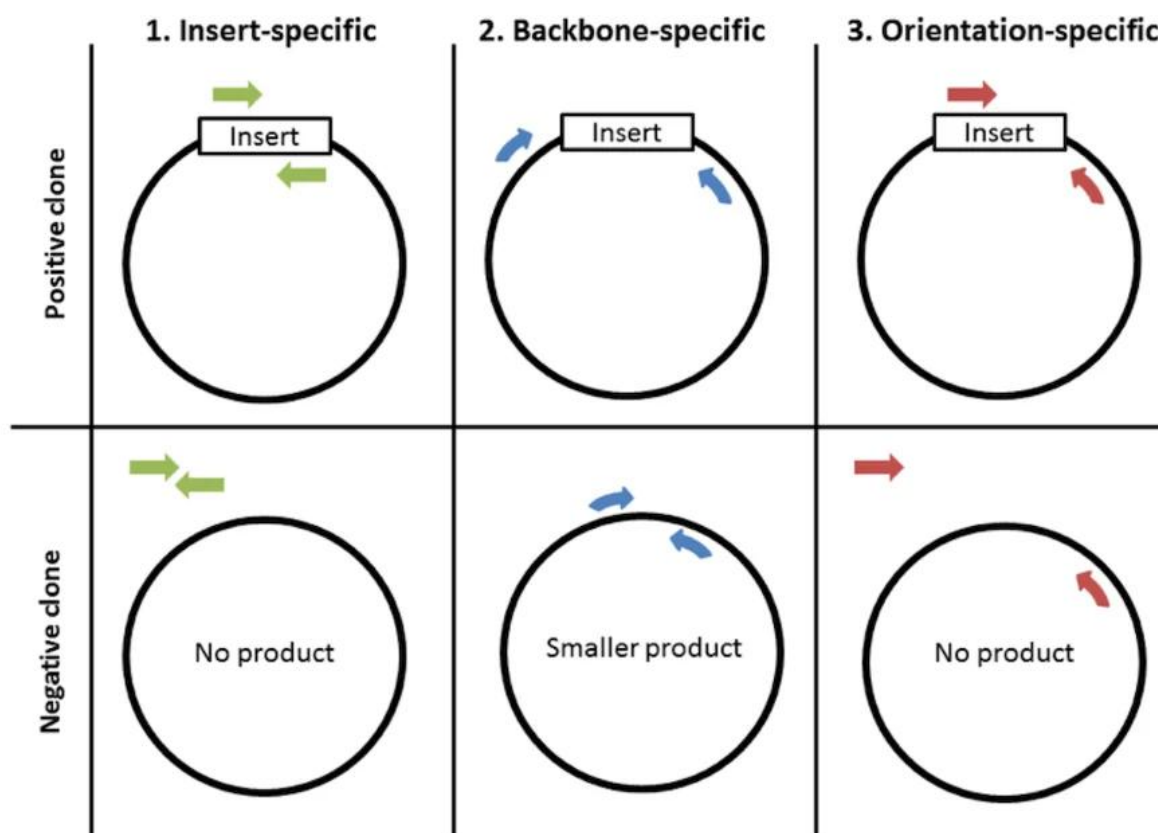
طراحی پرایمرهای کلنی PCR

اولین و شاید مهم ترین مرحله برای کلنی PCR طراحی پرایمرها است. ۳ استراتژی برای طراحی پرایمر وجود دارد:

(۱) پرایمرهای اختصاصی درون قطعه دلخواه

(۲) آغازگرهای اختصاصی توالی وکتور،

(۳) آغازگرهای مخصوص جهت دار.



۱) **پرایمرهای اختصاصی درون قطعه دلخواه:** آغازگرهای ویژه درون قطعه دلخواه برای اتصال به توالی قطعه دلخواه طراحی شده اند. این یک نوع تست "بله یا خیر" است، با یک کلون مثبت محصول تکثیر می شود و یک کلون منفی منجر به هیچ محصولی نمی شود. علاوه بر این، این نوع پرایمر فقط به شما می گوید که آیا قطعه دلخواه خاص شما وجود دارد یا خیر، اما صحت جهت درست را مشخص نمی کند همچنین صحت قرارگیری درست در پلاسمید شما را مشخص نمی کند.

۲. **پرایمرهای مخصوص توالی وکتور:** گزینه دوم طراحی پرایمرهای مخصوص توالی وکتور است. این پرایمرها به گونه ای طراحی شده اند که در محل هایی که در کنار محل قرارگیری هستند، متصل می شوند. یک کلون مثبت یک محصول با اندازه بزرگتر و یک کلون منفی بدون قطعه دلخواه محصول کوچکتر ایجاد می کند. این نوع جفت پرایمر می تواند به شما بگوید که آیا درج اندازه درستی دارد یا خیر. این نوع جفت پرایمر همچنین برای غربالگری کلون هایی که با همان پلاسمید ایجاد شده اند اما حاوی قطعات مختلف هستند، عالی است. هنگامی که پرایمرهایی را برای اتصال در خارج از محل کلون سازی طراحی می کنید، مهم نیست که توالی قطعه کلون شده چیست، به شما این امکان را می دهد که از همان جفت پرایمر برای غربالگری وجود قطعات مختلف استفاده کنید. نقطه ضعف: این نوع پرایمر اطلاعاتی در مورد جهت قرارگیری توالی دلخواه را ارائه نمی دهد.

۳. **آغازگرهای مخصوص جهت دار:** اگر به اطلاعاتی در مورد جهت قرارگیری قطعه دلخواه نیاز دارید، ممکن است طراحی پرایمرهای مخصوص جهت دار مناسب باشد. یکی از اعضای این نوع جفت پرایمر به دنباله ای در کنار قطعه دلخواه متصل می شود و یک پرایمر دیگر روی توالی دلخواه متصل می شود.

انجام PCR

راه اندازی واکنش کلنی - PCR تقریباً مشابه آماده سازی یک واکنش استاندارد PCR است: DNA الگو، پرایمرها، پلیمراز و dNTP ها را ترکیب کرده و سپس با یک برنامه استاندارد ترموسایکلر PCR انکوبه کنید. یک تفاوت کلیدی این است که DNA پلاسمید باید از باکتری آزاد شود تا به عنوان الگوی PCR عمل کند. مقابله با این و چند نکته دیگر برای کلنی PCR در زیر آورده شده است.

۱) **آماده سازی الگو:** یک کلنی را با یک خلال دندان استریل یا نوک پپیت انتخاب کنید و در مقدار کمی آب استریل بچرخانید. در مجموع ۳ تا ۱۰ کلنی را برای آزمایش انتخاب کنید.

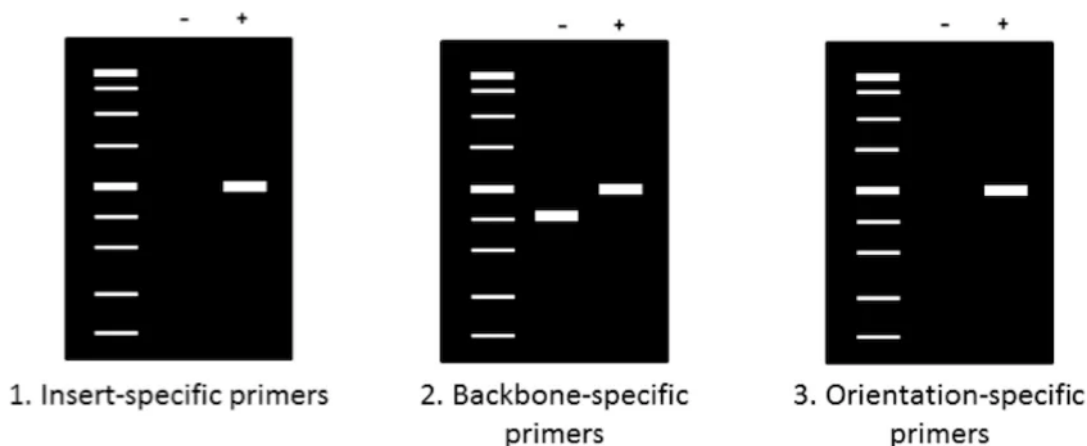
۲) **ذخیره سازی کلون ها برای کشت بعدی:** در این مرحله، می خواهید برای استفاده بعدی به کلون های خود آویزان کنید. چند راه وجود دارد که می توانید این کار را انجام دهید. اگر قرار است آنالیز PCR

کلنی خود را در همان روز کامل کنید، می توانید سوسپانسیون باکتری-آب باقیمانده را ذخیره کرده و از آنها برای شروع کشت کلون های مثبت خود استفاده کنید. اگر می خواهید کلون های خود را طولانی تر ذخیره کنید، فقط کلنی ها را روی یک پلیت LB قرار دهید. می توانید از این پلیت برای شروع کشت مایع استفاده کنید.

۳) **لیز کردن باکتری ها و تنظیم واکنش PCR:** سوسپانسیون باکتری-آب باقیمانده به عنوان الگوی واکنش PCR شما عمل می کند. شما باکتری ها را با جوشاندن مختصر نمونه قبل از استفاده در واکنش PCR لیز کنید تا DNA پلاسمید آزاد شود.

۴) **واکنش PCR کنترل ها:** بهترین کنترل ها برای کلنی PCR همان مواردی هستند که برای بررسی اینکه آیا پرایمرهای PCR کلنی در وهله اول کار می کنند یا خیر. اجرای یک واکنش PCR بدون الگو نیز برای تشخیص آلودگی ایده خوبی است.

تجزیه و تحلیل اندازه محصول PCR روی ژل



اکنون که PCR شما کامل شده است، زمان آن است که محصولات را روی ژل آگارز الکتروفورز کنید تا اندازه آنها مشخص شود. شکل بالا نتایج مورد انتظار تعمیم یافته را برای سه آغازگر که قبلاً توضیح داده شد خلاصه می کند. هنگام استفاده از پرایمرهای اختصاصی درون قطعه دلخواه (۱)، کلون های مثبت (+) یک نوار می دهند، در حالی که یک کلون منفی (-) نمی دهد. آغازگرهای اختصاصی توالی وکتور (۲) در مقایسه با کلون های منفی، محصولاتی با اندازه بزرگتر برای کلون های مثبت (+) ارائه می دهند. در نهایت، آغازگرهای مخصوص جهت دار

(۳) همان باند (+) یا بدون باند (-) را به عنوان پرایمرهای ویژه درج می دهند، اما همچنین به شما می گویند که آیا قطعه درخواه جهت گیری درستی دارد یا خیر.

بررسی توالی قطعه دلخواه با Sanger Sequencing

پس از شناسایی چند کلون مثبت، آخرین مرحله آماده سازی این کلون ها و ارسال پلاسمیدها برای توالی یابی سنگر است. توالی یابی به شما امکان می دهد توالی قطعه دلخواه، جهت قرارگیری و توالی اتصالات بین پلاسمید و DNA درج شده را تأیید کنید.

نکات و ترفندها

- (۱) مقدار زیادی از یک کلنی بردارید. باکتری های بسیار زیاد می توانند واکنش PCR شما را مهار کنند یا باعث شوند محصولات غیر اختصاصی روی ژل شما ظاهر شوند.
- (۲) مراقب نکات مثبت کاذب باشید. فقط به این دلیل که محصول PCR با اندازه مورد انتظار را دریافت می کنید به این معنی نیست که جهش در قطعه شما وجود ندارد. قبل از ادامه آزمایش، حتماً چندین کلون مثبت را برای توالی یابی ارسال کنید تا توالی قطعه شما را تأیید شود.
- (۳) آمپلیکون های (قطعات PCR) کوتاه تر بهتر هستند. آمپلیکون های کوتاه تر، برنامه های PCR کوتاه تری را را لازم دارد.
- (۴) از کنترل مثبت استفاده کنید. یک کنترل مثبت خوب باکتری است که با همان توالی پلاسمید ترانسفرم شده است. اگر این کنترل محصولی را تکثیر نمی کند، می دانید که ممکن است مشکلی در مواد PCR و/یا طراحی پرایمر وجود داشته باشد.
- (۵) از یک سویه کنترل منفی استفاده کنید. یک سویه کنترل منفی خوب، کشت ترانسفرم نشده از همان سویه باکتری است که برای کلون سازی استفاده کردید.