LaserSoft Imaging

I.G.S.
انجمن ژنتیک ایران
Iranian Genetics Society

یازدهمین کنگره ژنتیک ایران

۱ الی ۳ خرداد ماه ۸۹
سالن همایش های بین المللی دانشگاه شهید بهشتی

[پوستر-P4-007]

استفاده از SOE-PCR در طراحی و ساخت قطعه رقابتگر مورد استفاده در واکنش cPCR

مهندس امیر طاهری[۱]، دکتر مجتبی طهمورث پور[۲]، دکتر محمدرضا نصیری[۳]، مهندس محمدهادی سخاوتی[۴]، مهندس مهدی خیرآبادی[۵]

۱) دانشگاه فردوسی مشهد taheri1362@gmail.com
۲) دانشگاه فردوسی مشهد m_tahmoorespur@yahoo.com
۳) دانشگاه فردوسی مشهد nassiryr@gmail.com
۴) دانشگاه فردوسی مشهد hadisekhavati@gmail.com
۵) دانشگاه فردوسی مشهد kh.mahdi65@gmail.com

کمی سازی اسید های نوکلئیک در نمونه های زیستی از مهمترین نیاز های تحقیقاتی می باشد. بدین منظور PCR رقابتی (competitive-PCR) شامل تکثیر همزمان دو قطعه DNA هدف و DNA رقابتگر، که دارای بیشترین تشابه با توالی هدف و مقادیر آن شناخته شده است، می باشد. روش cPCR از این طریق قادر است تعداد دقیق مولکول های هدف را مشخص نماید. عمده ترین مسئله در انجام cPCR ساخت قطعه رقابتگر است. در این مطالعه، بر اساس منطقه S rDNA۱۶ باکتری بوتیریوبریو فیبری سالونس، عمده ترین تولید کننده بوتیرات در شکمبه، یک روش cPCR بهینه‌سازی شد. برای تولید قطعه رقابتگر همولوگ با قطعه هدف، دو آغازگر داخلی، که هر کدام حامل حدود ۳۰ نوکلئوتید در انتهای ′۵ خود بودند (به صورتی که بتوانند تکثیر شوند و مکمل یکدیگر باشند) طراحی شدند و یک واکنش SOE-PCR Splicing by Overlap Extension-PCR) شامل سه واکنش مجزای PCR با استفاده از جفت آغازگرهای متفاوت انجام شد. قطعه حاصل از این واکنش ها در نهایت علاوه بر توالی نوکلئوتیدی قطعه هدف دارای ۵۰ نوکلئوتید در وسط آن بود. جهت افزایش بیشتر صحت cPCR و همچنین استفاده های آتی از این قطعه و سهولت تعیین دقیق تعداد نسخه های آن این قطعه در داخل یک ناقل پلاسمیدی و در باکتری E.coli همسانه‌سازی شد و صحت توالی همسانه‌سازی شده بوسیله هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب مورد تأیید قرار گرفت. واکنش cPCR با استفاده از مقادیر مشخصی از DNA پلاسمیدی به عنوان رقابتگر بهینه سازی شد و نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار ImageJ تجزیه و تحلیل شدند. رابطه خطی بین log نسبت شدت باند هدف به رقابتگر (log C/T) به رقت های مورد استفاده از رقابتگر بوسیله نرم‌افزار Excel مورد بررسی قرار گرفت. در این رابطه میزان R2 به عنوان شاخصی از راندمان cPCR در نظر گرفته شد. نتایج به دست آمده نشان داد رابطه خطی بالایی بین Log(C/T) و رقت های ساخته شده از رقابتگر وجود دارد ($R2 = 0.98$).

واژه های کلیدی: PCR رقابتی، SOE-PCR، بوتیریوبریو فیبری سالونس