فایل راهنمای تعیین توالی به روش سنگر در شرکت زیست فن آوری پیشگام

فهرست

۱. خدمات شرکت زیست فن آوری پیشگام
۲. هزینه خدمات
۳. شرایط لازم برای نمونه‌ها و پرایمرهای ارسالی جهت درخواست تعیین توالی
۴. فهرست پرایمرهای universal موجود در آزمایشگاه
۵. مفهوم تعیین توالی
۶. معرفی روش توالی یابی به روش سنگر
۷. توالی یابی DNA به صورت اتوماتیک و با دستگاه توالی یاب Applied Biosystems (ABI)
۸. مشکلات توالی یابی DNA به صورت اتوماتیک

خدمات شرکت زیست فن آوری پیشگام

۱. توالی یابی DNA به روش سنگر
۲. توالی یابی DNA و RNA به روش NGS
۳. سنتز پرایمر و پروب (DNA/RNA)

در حال حاضر معتبرترین شرکت سازنده دستگاه‌های sequencer، Applied Biosystems (ABI) می‌باشد و گروه زیست فن آوری پیشگام خدمات تعیین توالی به روش سنگر را به وسیله دستگاه Applied Biosystems 3500 با بالاترین کیفیت همراه با مشاوره علمی به پژوهشگران ارائه می‌دهد.

آدرس : تهران ، خیابان کارگر شمالی ، پمپ بنزین امیرآباد ، نبش خیابان فکوری ، پلاک ۱۶۶۹
راه های ارتباطی با ما : ۰۲۱-۸۸۰۱۴۳۹۳ info@pishgambc.com , www.pishgambc.com

شکل ۱: دستگاه Applied Biosystems 3500

در این مرکز، امکان خوانش قطعات تا طول **۸۰۰ جفت باز** و خوانش دو طرفه Forward & Reverse برای قطعات طویل و استفاده رایگان از پرایمرهای Universal موجود در آزمایشگاه که در لیست زیر ارائه شده، فراهم می‌باشد. علاوه بر خدمات فوق، امکان خوانش توالی‌های غنی از GC به کمک پروتوکل‌های اختصاصی وجود دارد. در صورتی که نتیجه تعیین توالی در مرحله اول مناسب نباشد، پس از آنالیز جواب‌ها و بررسی کیفیت نمونه‌ها در صورت مناسب بودن یکبار به صورت رایگان خوانش قابل تکرار است. {شرکت زیست فن آوری پیشگام از پژوهشگران محترم خواهشمند است حتما در استاندارد بودن شرایط نمونه‌های ارسالی (که در ذیل توضیح داده شده) حداکثر دقت را بفرمایند، لازم به ذکر است **درصورت عدم رعایت نکات مذکور و به تبع** نامناسب بودن جواب‌ها پس از تکرار رایگان، شرکت مسئولیتی در قبال جواب‌های دریافتی نمی‌پذیرد). همچنین پرایمرها و نمونه‌های ارسالی توسط مشتریان پس از انجام توالی یابی به مدت یک ماه در بانک مربوط نگه داری می‌شوند.

هزینه خدمات

* برای اطلاع از هزینه خدمات با شرکت تماس حاصل فرمایید.

آدرس : تهران ، خیابان کارگر شمالی ، پمپ بنزین امیرآباد ، نبش خیابان فکوری ، پلاک ۱۶۶۹
راه های ارتباطی با ما : ۰۲۱-۸۸۰۱۴۳۹۳ info@pishgambc.com , www.pishgambc.com

شرایط لازم برای نمونه‌ها و پرایمرهای ارسالی جهت درخواست تعیین توالی

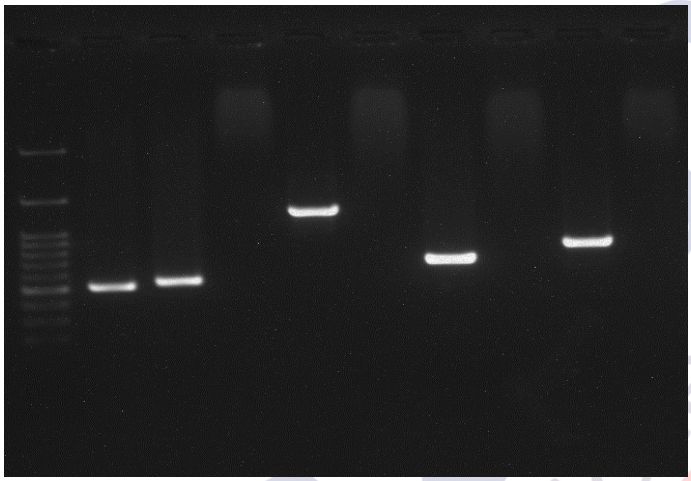
۱. جدول زیر حداقل مقدار لازم و غلظت مورد نیاز را نشان می‌دهد. در صورت امکان، ارسال مقدار بیشتری از نمونه توصیه می‌گردد تا در صورت نیاز به تکرار خوانش و یا خوانش با پرایمرهای متعدد نیاز به ارسال مجدد نباشد.

Template Type/Format	Sample Requirement	Remarks
Plasmid	* 100 ng/µl * Minimum volume: 20 µl	**For re-sequencing, at least 5 µl is required**
16S	* Agar plate/ Glycerol Stock * gDNA: 30-50 ng * Minimum volume: 20 µl	**N/A**
PCR Product (Purified)	* 50 ng/µl * Minimum volume: 20 µl	**For re-sequencing, at least 5 µl is required**
PCR Product (Unpurified)	*> 100 ng/µl * Minimum volume: 20 µl	**N/A**
Difficult Sequence	* 100 ng/µl * Minimum volume: 20 µl	**N/A**
Primer Walking	8 µg (for an insert size of up to 4kb)	**Single Strand Sequencing: 1µg/ 1kb insert. If insert size is longer than 4kb, clone is req**

۲. لطفا نمونه‌های DNA در آب دیونیزه حل شود نه در سایر بافرها.

۳. حتما قبل از ارسال نمونه، مقدار کمی از آن را روی ژل برده و با مقایسه با نشانگر (Ladder) از اختصاصیت محصول مورد نظر مطمئن شوید (شکل ۲). برای هر نمونه حداقل ۲۵-۲۰ میکرولیتر مورد نیاز می‌باشد.

آدرس : تهران ، خیابان کارگر شمالی ، پمپ بنزین امیرآباد ، نبش خیابان فکوری ، پلاک ۱۶۶۹
راه های ارتباطی با ما : ۰۲۱-۸۸۰۱۴۳۹۳ info@pishgambc.com , www.pishgambc.com



شکل ۲: تصویری از باندهای اختصاصی محصولات برای تعیین توالی

۴. توصیه می‌گردد همراه نمونه تصویر ژل نیز ارسال گردد (ارسال تصویر الکترونیک از طریق ایمیل شرکت نیز قابل قبول است). همکاران ما در شرکت تصاویر ژل‌ها را بررسی نموده و وجود هر گونه مشکل در ارتباط با کیفیت و اختصاصیت محصول تکثیر شده را به مشتریان محترم اعلام می‌کنند.

۵. به طور معمول در صورت عدم تخلیص نمونه‌ها، نتایج تعیین توالی مناسب نخواهد بود، از این رو تمامی نمونه‌های دریافتی توسط شرکت به روش ستونی یا با اضافه کردن آنزیم اگزو سپ تخلیص می‌گردند.

*** منظور از تخلیص محصول PCR، حذف پرایمرها و نوکلئوتیدهای اضافی و مصرف نشده باقیمانده در هر واکنش است که وجود آن‌ها می‌تواند باعث مشکلاتی در خوانش‌های حاصل از دستگاه گردد.**

۶. در مورد نمونه‌هایی که دارای قطعات اضافی هستند (باند اضافی روی ژل)، می‌بایستی باند اختصاصی از ژل استخراج شده و سپس تعیین توالی گردد.

***لازم به ذکر است که تخلیص، مشکل نمونه‌هایی که حاوی بیش از یک قطعه باشند (به عبارتی قطعات غیراختصاصی در طول تکثیر ایجاد کرده باشند) را برطرف نمی‌کند و در مورد این موارد می‌بایستی حتما ابتدا استخراج از ژل صورت گیرد.**

آدرس : تهران ، خیابان کارگر شمالی ، پمپ بنزین امیرآباد ، نبش خیابان فکوری ، پلاک ۱۶۶۹
راه های ارتباطی با ما : ۰۲۱-۸۸۰۱۴۳۹۳ info@pishgambc.com , www.pishgambc.com

۷. نیازی به ارسال پرایمرهای universal ذکر شده در جدول زیر نمی‌باشد. در صورت نیاز به خوانش با هر کدام از این پرایمرها نام کامل پرایمر را در ستون مربوطه ذکر نمایید. ضمنا برای جلوگیری از هر گونه اشتباه، لطفا توالی پرایمر مورد نظر را نیز ایمیل کنید.

۸. در مورد پرایمرهای ارسالی رعایت موارد ذیل در دستیابی به نتیجه مناسب دارای اهمیت است:

- ترجیحا پرایمرها در آب دیونیزه حل شوند.
- استوک پرایمرهای ارسالی جدید بوده و دارای خلوص بالایی باشد.
- در مورد طراحی پرایمرهای مورد استفاده برای توالی یابی، عدم اتصال غیراختصاصی و عدم وجود ساختارهای ثانویه از اهمیت بسزایی برخوردار است.
- بهتر است طول پرایمرها ۲۵-۱۸ نوکلئوتید، با میزان GC برابر ۶۰-۴۰ درصد و Tm برابر ۶۰-۵۵ درجه سانتی گراد باشد.

۹. توصیه می‌گردد غلظت پرایمرهای ارسالی **۱۰ پیکومول در میکرولیتر** باشد. حجم پرایمر مورد نیاز، **۱۵ میکرولیتر** برای نمونه اول و **۱۰ میکرولیتر** برای هر نمونه اضافی می‌باشد.

۱۰. لطفا نام نمونه‌ها و پرایمرها را به زبان انگلیسی و خوانا و به صورت مختصر بر روی ویال‌ها بنویسید و دقت فرمایید که **تفاوتی در نام روی ویال‌ها با اطلاعات ذکر شده در فرم ارسالی نباشد.**

۱۱. نمونه‌ها و پرایمرها را در **ویال‌های یک و نیم میلی لیتری** قرار داده و حتما در آن‌ها را با پارافیم ببندید.

۱۲. فرم درخواست با فرمت Excel تهیه شده و در وب سایت شرکت موجود می‌باشد. ضمنا در صورت درخواست، به ایمیل شما نیز ارسال خواهد شد. پس از پر کردن فرم مذکور، خواهشمند است ضمن ارسال فرم به ایمیل شرکت، فرم را پرینت نموده و همراه نمونه‌ها، پرایمرها و تصویر ژل به شرکت ارسال نمایید.

۱۳. تحویل نتایج به صورت ارسال به پست الکترونیک سفارش دهنده می‌باشد.

۱۴. در صورتی که نتیجه تعیین توالی در مرحله اول مناسب نباشد، پس از آنالیز جوابها وبررسی کیفیت نمونه ها در صورت مناسب بودن یکبار به صورت رایگان خوانش قابل تکرار است.

*** در صورت نیاز به اطلاعات بیشتر با شرکت تماس حاصل فرمایید.**

آدرس : تهران ، خیابان کارگر شمالی ، پمپ بنزین امیرآباد ، نبش خیابان فکوری ، پلاک ۱۶۶۹
راه های ارتباطی با ما : ۰۲۱-۸۸۰۱۴۳۹۳ info@pishgambc.com , www.pishgambc.com

فهرست پرایمرهای universal موجود در آزمایشگاه

Universal Primers

No	Primer Name	Sequence (5'→ 3')	Base
1	Bluescript SK	CGCTCTAGAACTAGTGGATC	20
2	EBV-RP	GTGGTTTGTCCAAACTCATC	20
3	KAN2-FP	ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC	25
4	KAN2-RP	GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG	25
5	M13-FP	TGTAAAACGACGGCCAGT	18
6	pBacPAC-RP	GTCTGTAAATCAACAACGC	19
7	pBAD-FP	ATGCCATAGCATTTTTATCC	20
8	pDONOR-FP	TAACGCTAGCATGGATCTC	19
9	pEGFP_N	CCGTCCAGCTCGACCAG	17
10	pEGFP-FP	TTTAGTGAACCGTCAGATC	19
11	pEGFP-RP	AACAGCTCCTCGCCCTTG	18
12	pESP-RP	TCCAAAAGAAGTCGAGTGG	19
13	pET-24a	GGGTTATGCTAGTTATTGCTCAG	23
14	pET-RP	CTAGTTATTGCTCAGCGG	18
15	pMalE	TCAGACTGTCGATGAAGC	18
16	pREP-fwd	GCTCGATACAATAAACGCC	19
17	35S-A	AAGGGTCTTGCGAAGGATAG	20
18	35S-B	AGTGGAAAAGGAAGGTGGCT	20
19	AD Reverse	AGATGGTGCACGATGCACAG	20
20	CYC1 Reverse	GCGTGAATGTAAGCGTGAC	19
21	DsRed1-C	AGCTGGACATCACCTCCCACAACG	24
22	DsRed1-N	GTACTGGAACTGGGGGGACAG	21
23	EGFP-C	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG	22
24	EGFP-N	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG	22
25	GAL1 Forward	AATATACCTCTATACTTTAACGTC	24
26	U-19mer Primer	GTTTTCCCAGTCACGACGT	19
27	T7 EEV	ATGTCGTAATAACCCCGCCCCG	22
28	Bluescript KS	TCGAGGTCGACGGTATC	17
29	pFastBac Forward	GGATTATTCATACCGTCCCA	20
30	pFastBac Reverse	CAAATGTGGTATGGCTGATT	20
31	AOX1 Forward	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	21
32	AOX1 Reverse	GCAAATGGCATTCTGACATCC	21
33	a-Factor	TACTATTGCCAGCATTGCTGC	21
34	STag 18mer Primer	GAACGCCAGCACATGGAC	18
35	MT Forward	CATCTCAGTGCAACTAAA	18
36	QE Promoter	CCGAAAAGTGCCACCTG	17
37	pRH Forward	CTGTCTCTATACTCCCCTATAG	22
38	pRH Reverse	CAAAATTCAATAGTTACTATCGC	23
39	SV40-pArev	CCTCTACAAATGTGGTATGG	20
40	SV40-Promoter	GCCCCTAACTCCGCCCATCC	20
41	pTrcHis Forward	GAGGTATATATTAATGTATCG	21
42	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19
43	ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	20
44	ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	20
45	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20
46	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	22

آدرس : تهران ، خیابان کارگر شمالی ، پمپ بنزین امیرآباد ، نبش خیابان فکوری ، پلاک ۱۶۶۹
راه های ارتباطی با ما : ۰۲۱-۸۸۰۱۴۳۹۳ info@pishgambc.com , www.pishgambc.com

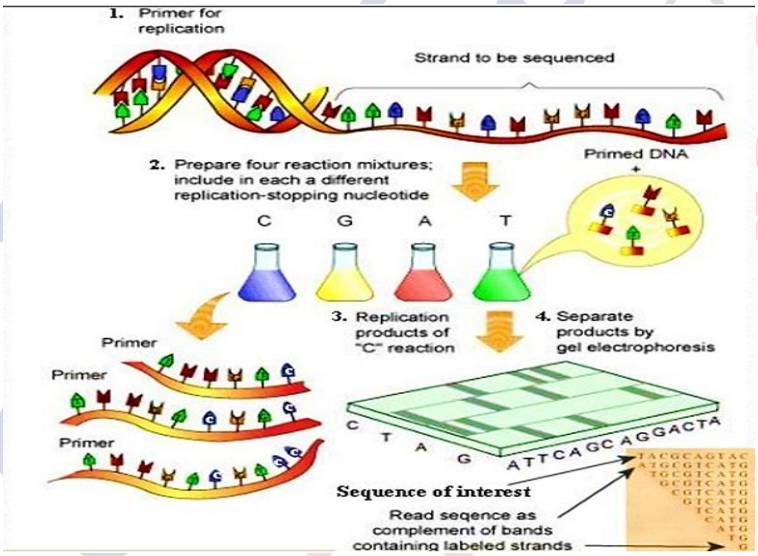
47	**pJET1.2F**	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	23
48	**pJET1.2R**	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	24
49	**T7**	AATACGACTCACTATAG	17
50	**T7terminator**	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	19
51	**T7promoter**	TAATACGACTCACTATAGGG	20
52	**T3**	ATTAACCCTCACTAAAG	17
53	**SP6**	ATTTAGGTGACACTATAG	18
54	**M13F-pUC(-40)**	GTTTTCCCAGTCACGAC	17
55	**M13R-pUC(-40)**	CAGGAAACAGCTATGAC	17
56	**M13F**	GTAAAACGACGGCCAGT	17
57	**M13R**	GCGGATAACAATTTCACACAGG	22
58	**pGEX5**	GGCAAGCCACGTTTGGTG	18
59	**pGEX3**	GGAGCTGCATGTGTCAGAGG	20
60	**27F**	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20
61	**1492R**	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	22
62	**518F**	CCAGCAGCCGCGGTAATACG	20
63	**800R**	TACCAGGGTATCTAATCC	18
64	**BGH-R**	TAGAAGGCACAGTCGAGG	18
65	**CMV-F**	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	21
66	**RVprimer3**	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC	20
67	**RVprimer4**	GACGATAGTCATGCCCCGCG	20
68	**GLprimer1**	TGTATCTTATGGTACTGTAACTG	23
69	**GLprimer2**	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA	23
70	**pQE-F**	CCCGAAAAGTGCCACCTG	18
71	**pQE-R**	GTTCTGAGGTCATTACTGG	19
72	**Gal4AD**	TACCACTACAATGGATG	17
73	**pBAD-F**	ATGCCATAGCATTTTTATCCA	21
74	**pBAD-R**	GATTTAATCTGTATCAGG	18
75	**EGFP-CF**	AGCACCCAGTCCGCCCTGAGC	21
76	**EGFP-CR**	CGTCCATGCCGAGAGTG	17
77	**EGFP-NR**	CGTCGCCGTCCAGCTC	16
78	**LCO1490**	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	25
79	**HCO2198**	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	26
80	**785F**	GGATTAGATACCCTGGTA	18
81	**907R**	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	20
82	**337F**	GACTCCTACGGGAGGCWGCAG	21
83	**1100R**	GGGTTGCGCTCGTTG	15
84	**NS1**	GTAGTCATATGCTTGTCTC	19
85	**NS8**	TCCGCAGGTTCACCTACGGA	20
86	**LR0R**	ACCCGCTGAACTTAAGC	17
87	**LR7**	TACTACCACCAAGATCT	17

راهنمای توالی یابی DNA به روش سنگر

مفهوم تعیین توالی

تعیین توالی DNA از مهم ترین تکنیک‌های موجود در زمینه زیست شناسی مولکولی بوده که به موجب آن می‌توان ترتیب قرار گرفتن نوکلئوتیدها را در یک قطعه از DNA مشخص نمود. چندین روش مختلف جهت تعیین توالی DNA وجود دارد که به موجب آن دانشمندان قادرند به مطالعه مستقیم ژنوم بپردازند. در حال حاضر تعیین توالی DNA در زمینه تشخیص طبی و دیگر زمینه‌های پزشکی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار می‌باشد.

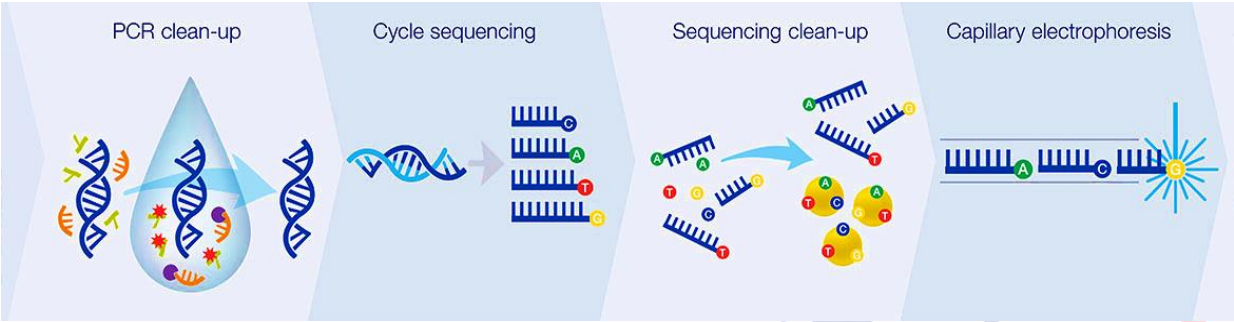
شکل زیر نمایی از جزئیات این روش را نشان می‌دهد:



شکل ۳: روش توالی یابی سنگر

توالی یابی DNA به صورت اتوماتیک و با دستگاه توالی یاب Applied Biosystems (ABI)

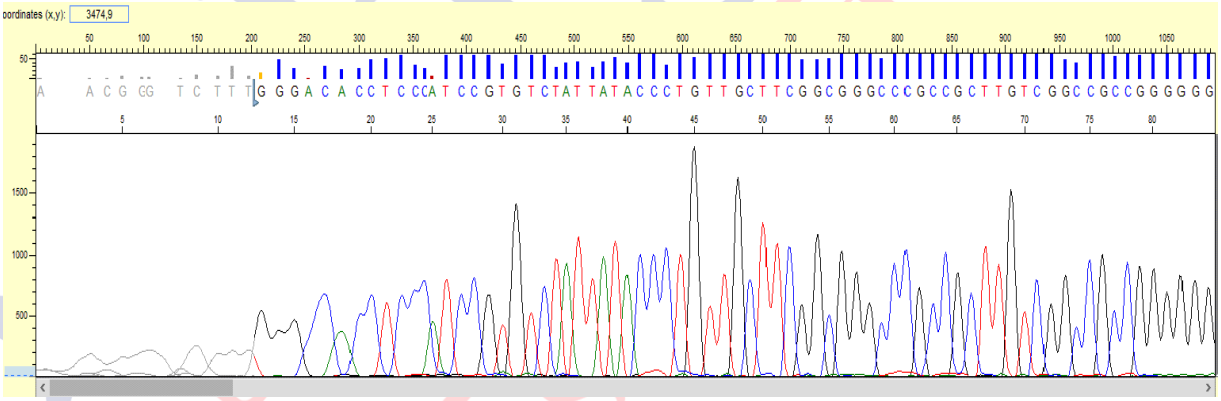
سیستم توالی یاب بر مبنای فلورسانس ABI، نوع پیشرفته و اصلاح شده‌ای از توالی یابی دی داکسی سنگر است. به طور کلی عملکرد این سیستم اتوماتیک از مراحل نشان داده شده در شکل زیر تشکیل شده است:



شکل ۴: شمایی از مراحل توالی یابی DNA به صورت اتوماتیک

در صورت رعایت موارد ذیل، امکان دستیابی به یک نتیجه توالی یابی موفق وجود دارد که نمونه‌ای از این نتایج در شکل ۵ به تصویر کشیده شده است.

- **غلظت مناسب پرایمر و DNA الگو**
- **تخلیص عالی DNA و الگو**
- **طراحی بهینه پرایمر**



شکل ۵: نمونه‌ای از خوانش صحیح توالی DNA

مشکلات توالی یابی DNA به صورت اتوماتیک

به منظور دستیابی به یک خوانش صحیح و موفق، می‌بایستی نکاتی در نظر گرفته شود که در بخش شرایط نمونه برای تعیین توالی به تعدادی از آن‌ها اشاره شد. در ادامه تعدادی از دلایل عدم دستیابی به یک نتیجه توالی یابی مطلوب ذکر شده است.

از دلایل عمده نتایج نامطلوب توالی یابی، کیفیت پایین نمونه ارسالی و طراحی نامناسب و کیفیت پایین پرایمر می‌باشد.

کیفیت پایین نمونه ناشی از:

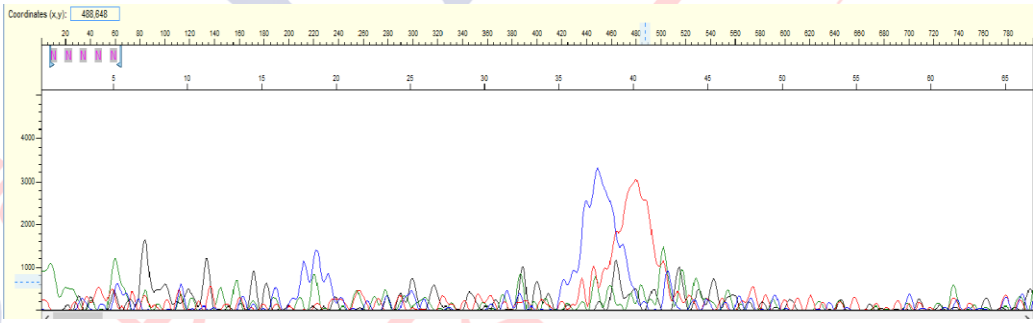
- حجم و غلظت نمونه کمتر از حد استاندارد ذکر شده (به دلیل نشتی و تبخیر)
- عدم تخلیص مناسب محصول و وجود مهار کننده‌های PCR
- وجود ساختارهای ثانویه و تکرارهای مونونوکلئوتیدی

کیفیت پایین پرایمر ناشی از:

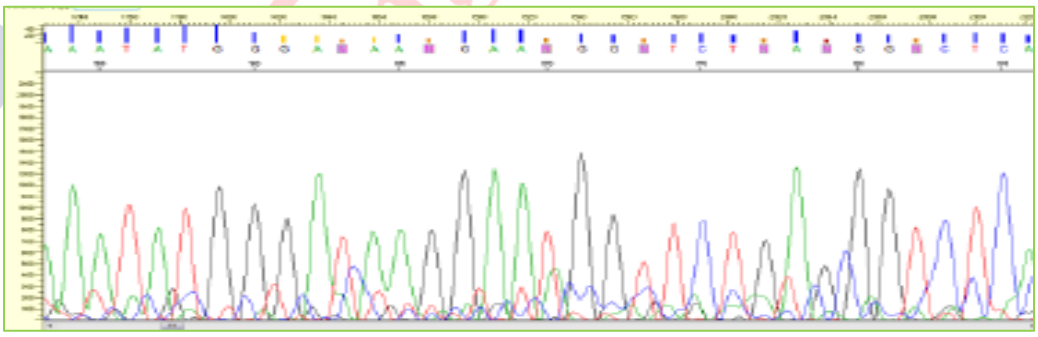
- حجم و غلظت پرایمر کمتر از حد استاندارد ذکر شده (به دلیل نشتی و تبخیر)
- طراحی و سنتز نامطلوب
- اتصال غیراختصاصی

نمونه‌هایی از نتایج توالی یابی ناموفق

۱. عدم انجام واکنش‌های توالی یابی DNA به دلیل کیفیت نامطلوب نمونه

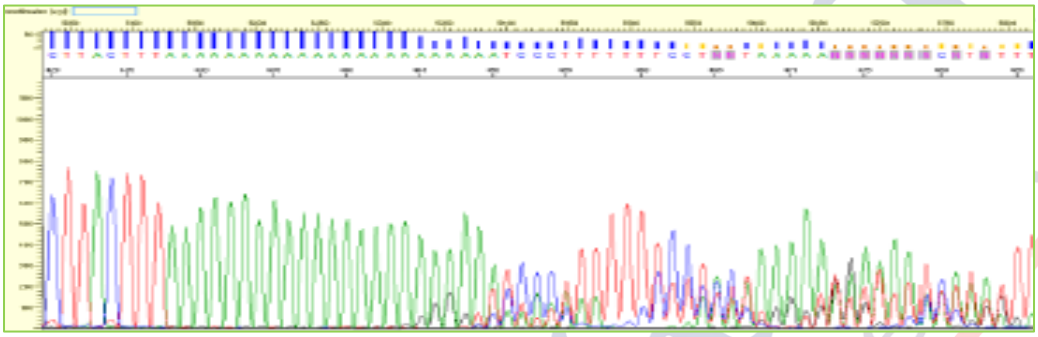


۲. وجود نویز در پس زمینه توالی‌ها به دلیل کیفیت نامناسب نمونه

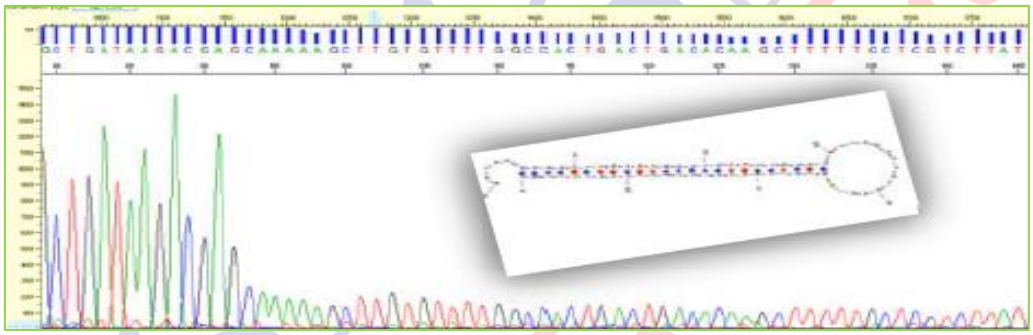


آدرس : تهران ، خیابان کارگر شمالی ، پمپ بنزین امیرآباد ، نبش خیابان فکوری ، پلاک ۱۶۶۹
راه های ارتباطی با ما : ۰۲۱-۸۸۰۱۴۳۹۳ info@pishgambc.com , www.pishgambc.com

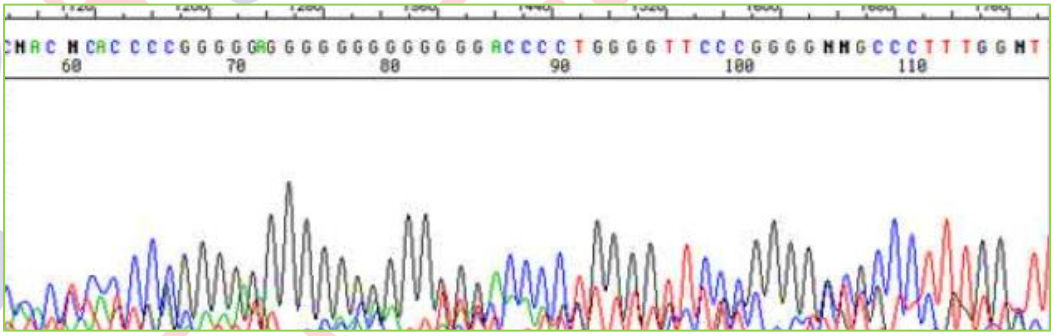
۳. کاهش شدت پیک‌ها پس از تکرارهای مونونوکلئوتیدی



۴. توقف توالی ناشی از تشکیل ساختارهای ثانویه

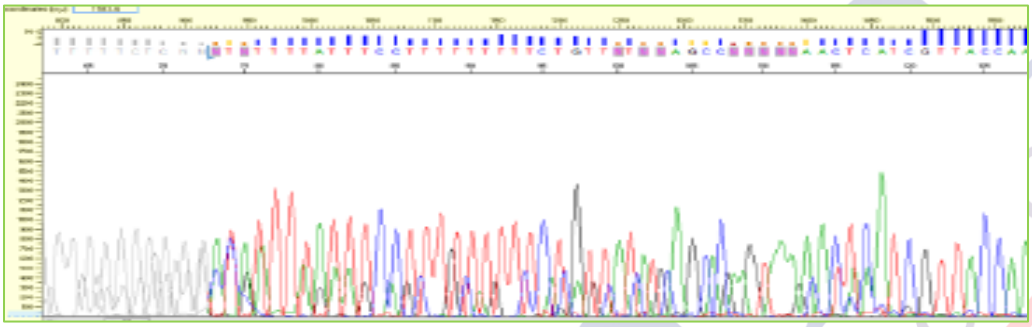


۵. نتیجه توالی یابی با وجود پرایمر تخریب شده

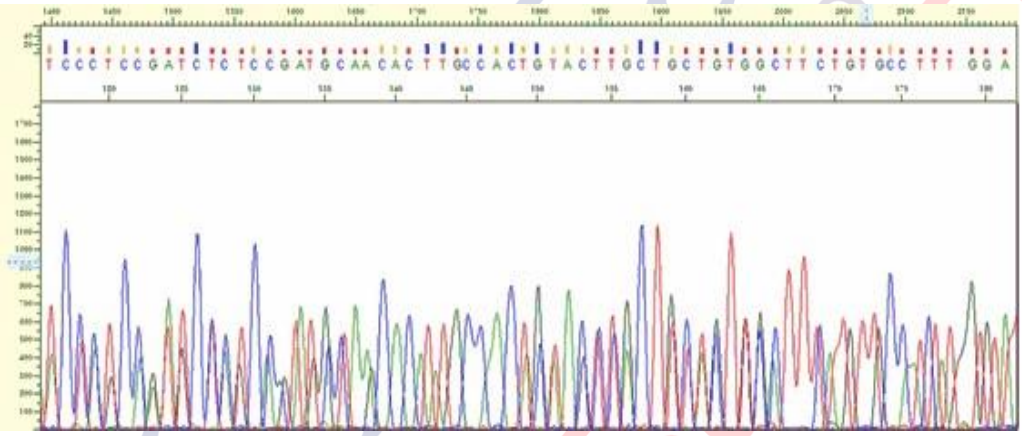


آدرس : تهران ، خیابان کارگر شمالی ، پمپ بنزین امیرآباد ، نبش خیابان فکوری ، پلاک ۱۶۶۹
راه های ارتباطی با ما : ۰۲۱-۸۸۰۱۴۳۹۳ info@pishgambc.com , www.pishgambc.com

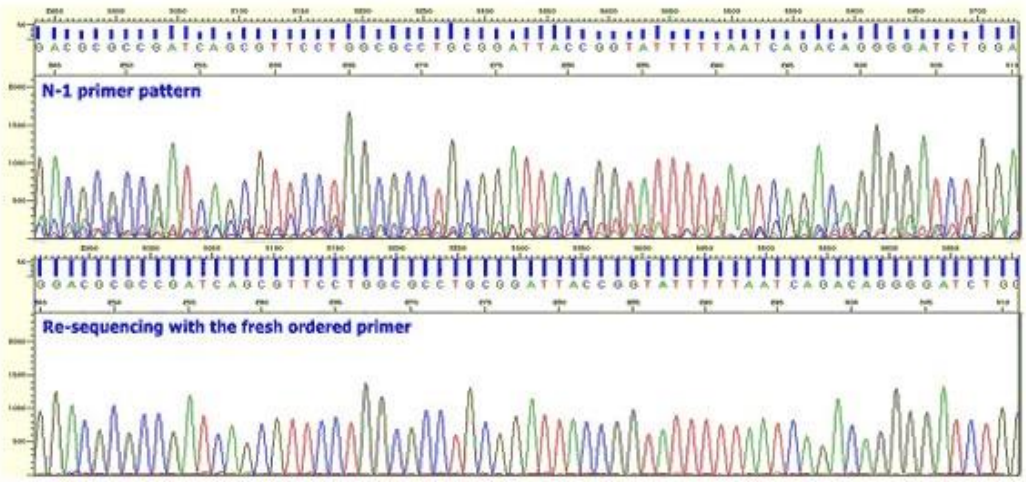
۶. پرایمر دایمر



۷. اتصال پرایمر به نواحی مختلف



۸. سنتز نامناسب پرایمر



آدرس : تهران ، خیابان کارگر شمالی ، پمپ بنزین امیرآباد ، نبش خیابان فکوری ، پلاک ۱۶۶۹
راه های ارتباطی با ما : ۰۲۱-۸۸۰۱۴۳۹۳ info@pishgambc.com , www.pishgambc.com