

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

فهرست

1. خدمات شرکت زیست فن آوری پیشگام
2. هزینه خدمات
3. شرایط لازم برای نمونه ها و پرایمرهای ارسالی جهت درخواست تعیین توالی
4. فهرست پرایمرهای universal موجود در آزمایشگاه
5. مفهوم تعیین توالی
6. معرفی روش توالی یابی به روش سنگر
7. توالی یابی DNA به صورت اتوماتیک و با دستگاه توالی یاب (ABI Biosystems Applied)
8. مشکلات توالی یابی DNA به صورت اتوماتیک خدمات شرکت زیست فن آوری پیشگام

در حال حاضر معتبرترین شرکت سازنده دستگاههای ABI ، sequencer می باشد و گروه زیست فن آوری پیشگام خدمات تعیین توالی به روش سنگر را به وسیله دستگاه Genetic analyzer 3500 با بالاترین کیفیت همراه با مشاوره علمی به پژوهشگران ارائه میدهد



شکل 1 : دستگاه Applied Biosystems 3500

در این مرکز، امکان خوانش قطعات تا طول 800 جفت باز و خوانش دو طرفه Reverse & Forward 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 توالی های غنی از GC به کمک پروتکل های اختصاصی وجود دارد. در صورتی که نتیجه تعیین توالی در مرحله اول مناسب نباشد، پس از آنالیز جوابها و بررسی کیفیت نمونه ها 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 نمونه های ارسالی که در ذیل توضیح داده شده حداکثر دقت را بفرمایند، لازم به ذکر است در صورت عدم رعایت نکات مذکور و به تبع نامناسب بودن جوابها پس از تکرار رایگان، شرکت مسئولیتی در قبال جوابهای دریافتی نمی پذیرد. همچنین پرایمرها و نمونه های 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.

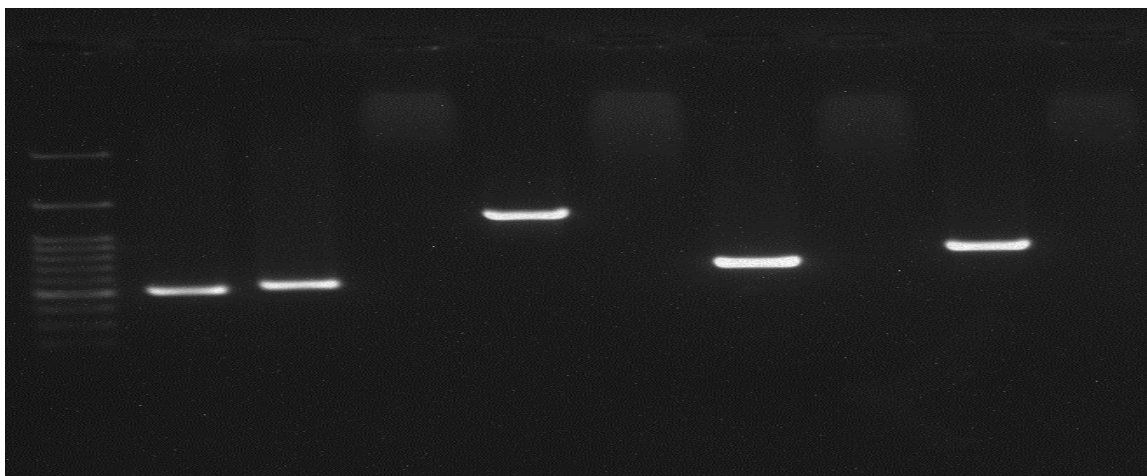
شرایط لازم برای نمونه ها و پرایمرهای ارسالی جهت درخواست تعیین توالی

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.

Sample Type	Concentration	Required volume
Plasmid	>100 ng/ul	20 ul per reaction
PCR Product (Purified)	>50 ng/ul	15 ul per reaction
PCR Product (Unpurified)	>100 ng/ul	15 ul per reaction
Gel extraction	—	(حداقل 40 میکرولیتر محصول PCR ران شود)
Primer	10 pmol/ul	>7 ul per reaction

2. لطفا نمونه های تخلیص شده در آب دیونیزه حل شود نه در سایر بافرها.

3. 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 2).



شکل 2: تصویری از باندهای اختصاصی محصولات برای تعیین توالی

۴. توصیه می‌گردد همراه نمونه تصویر ژل نیز ارسال گردد. همکاران ما در شرکت تصاویر ژل ها 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 نمونه ها، نتایج تعیین توالی مناسب نخواهد بود، از این رو تمامی نمونه های دریافتی توسط شرکت به روش ستونی یا با اضافه کردن آنزیم اگزو سب 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 خوانش های حاصل از دستگاه گردد. (

۶. در مورد نمونه هایی که دارای قطعات اضافی روی ژل (ساب باند) هستند برای انجام توالی یابی لازم هست برش از ژل انجام شود. چون تمامی قطعات تکثیر شده در محصول مجدد در روند توالی یابی تکثیر و خوانش میشوند و باعث روی هم افتادن پیک ها در نتایج توالی یابی میشوند.

۷. خواهشمند است توجه داشته باشید که سکانس «سنگر» تنها به صورت یک طرفه قابل انجام است؛ بدین معنا که هنگام ثبت سفارش، پرایمرها نباید با یکدیگر مخلوط شوند. لازم است نمونه ها **یا فقط**

به صورت فوروارد و یا فقط به صورت ریورس ارسال گردند و هر یک به طور جداگانه و در

میکروتیوب های مستقل قرار داده شوند. در صورت اختلاط پرایمرهای فوروارد و ریورس، خوانش پیک ها بر روی یکدیگر افتاده و نتیجه قابل تفسیر نخواهد بود.

۸. لطفاً نوع Purification مورد نظر رو طبق توضیحات زیر انتخاب کنید .

- **در صورتی که Sample Type شما PCR Product است:**
- **Without Purification:** اگر نمونه شما فاقد آلودگی است و روی ژل تنها یک باند شارپ مشاهده می‌کنید، لطفاً این گزینه را انتخاب کنید. شرکت پیشگام با استفاده از پروتکل‌های اختصاصی خود، کیفیت این نمونه‌ها را برای انجام توالی‌یابی افزایش می‌دهد. همچنین در صورتی که محصول PCR را خودتان قبلاً تخلیص کرده و برای ما ارسال می‌کنید، لطفاً این گزینه را انتخاب نمایید.
- **Enzyme Purification:** در صورتی که محصول PCR شما نیاز به خالص‌سازی دارد، اما روی ژل اسمیر یا آلودگی زیادی مشاهده نمی‌شود، لطفاً این گزینه را انتخاب کنید.
- **Column Purification:** در صورتی که نمونه شما روی ژل تک‌بند است، اما میزان اسمیر یا آلودگی روی ژل زیاد می‌باشد، لطفاً این گزینه را انتخاب نمایید. توجه داشته باشید تخلیص ستونی مشکل وجود باند اضافی را برطرف نخواهد کرد.
- **Run Electrophoresis and Gel Extraction:** در مورد نمونه‌هایی که باند اضافی روی ژل دارند، در صورتی که محصول PCR را برای انجام الکتروفورز و سپس برش باند مورد نظر برای ما ارسال می‌کنید تا در نهایت توالی‌یابی انجام شود، این گزینه را انتخاب نمایید. جهت انجام این روش، لطفاً حداقل ۴۰ میکرولیتر از محصول PCR را برای ما ارسال کنید.
- **در صورتی که Sample Type شما Plasmid است:**
- اگر پلاسمید را به صورت مستقیم جهت توالی‌یابی برای ما ارسال می‌کنید، لطفاً توجه داشته باشید که پلاسمید استخراج شده حتماً در آب دیونیزه (Deionized Water) برای مرحله Elution حل شده باشد و سپس ارسال گردد.
- **در صورتی که Sample Type شما Agarose Gel است:**
- در مورد نمونه‌هایی که دارای باند اضافی روی ژل هستند، اگر شما محصول PCR را شخصاً روی ژل ران کرده و باند مورد نظر را برش داده‌اید و قصد دارید شرکت پیشگام عملیات تخلیص ژل و سپس توالی‌یابی را انجام دهد، لطفاً این گزینه را انتخاب نمایید.

(توجه داشته باشید حداقل میزان محصول PCR برای ران کردن روی ژل ۴۰ میکرولیتر باشد و ژل برش خورده حتماً در میکروتیوب ۲ میلی لیتری برای ما ارسال شود.)

۹. نیازی به ارسال پرایمرهای **Universal** ذکر شده در جدول زیر نمی باشد. در صورت نیاز به خوانش با هر یک از این پرایمرها، لطفاً نام کامل پرایمر را در ستون مربوطه درج نمایید. همچنین به منظور جلوگیری از هرگونه اشتباه، خواهشمند است توالی پرایمر مورد نظر را نیز از طریق ایمیل ارسال فرمایید.

در خصوص پرایمرهای ارسالی، رعایت موارد زیر جهت دستیابی به نتیجه مناسب از اهمیت بالایی برخوردار است:

- ترجیحاً پرایمرها در آب دیونیزه حل شوند.
- استوک پرایمرهای ارسالی جدید بوده و دارای خلوص بالا باشند.
- در طراحی پرایمرهای مورد استفاده برای توالی یابی، عدم اتصال غیراختصاصی و عدم وجود ساختارهای ثانویه بسیار حائز اهمیت است.
- طول مناسب پرایمرها ۱۸-۲۵ نوکلئوتید، درصد GC برابر با ۴۰-۶۰٪ و Tm در محدوده ۵۵-۶۰ درجه سانتی گراد باشد.
- توصیه می گردد غلظت پرایمرهای ارسالی ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر باشد.

۱۰. لطفاً نام نمونه ها و پرایمرها را به زبان انگلیسی، خوانا و به صورت مختصر بر روی ویال ها درج نمایید و اطمینان حاصل فرمایید که نام درج شده روی ویال ها کاملاً مطابق با اطلاعات ثبت شده در فرم ارسالی باشد.

۱۱. نمونه ها و پرایمرها را در میکروتیوب قرار داده و حتماً درب آن ها را با پارافیلیم محکم ببندید.

۱۲. جهت ثبت درخواست توالی یابی، لطفاً از طریق وب سایت زیست فناوری پیشگام به آدرس www.pishgambc.com اقدام نموده و پس از ثبت نام، از طریق منوی «درخواست سکانس»، سفارش خود را ثبت نمایید.

۱۳. تحویل نتایج به صورت آنلاین انجام شده و در صفحه سفارش کاربر بارگذاری می گردد.

۱۴. در صورتی که نتیجه تعیین توالی در مرحله اول مناسب نباشد، پس از آنالیز نتایج و بررسی کیفیت نمونه‌ها، در صورت مناسب بودن، خوانش یک‌بار به‌صورت رایگان تکرار خواهد شد. در انجام ریسکانس نمونه و پرایمر قابل تعویض نیستند.

لیست پرایمر های Universal موجود در آزمایشگاه :

M13FP	TGTAAACGACGGCCAGT
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
T7	AATACGACTCACTATAG
T7terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
T7promoter	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
M13F-pUC(-40)	GTTTTCCTCAGTCACGAC
M13R-pUC(-40)	CAGGAAACAGCTATGAC
M13F	GTAAACGACGGCCAGT
M13R	GCGGATAACAATTTCACACAGG
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT
BGH-R	TAGAAGGCACAGTCGAGG
CMV-F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
SV40-Promoter	GCCCCTAACTCCGCCCATCC
SV40-pArev	CCTCTACAAATGTGGTATGG

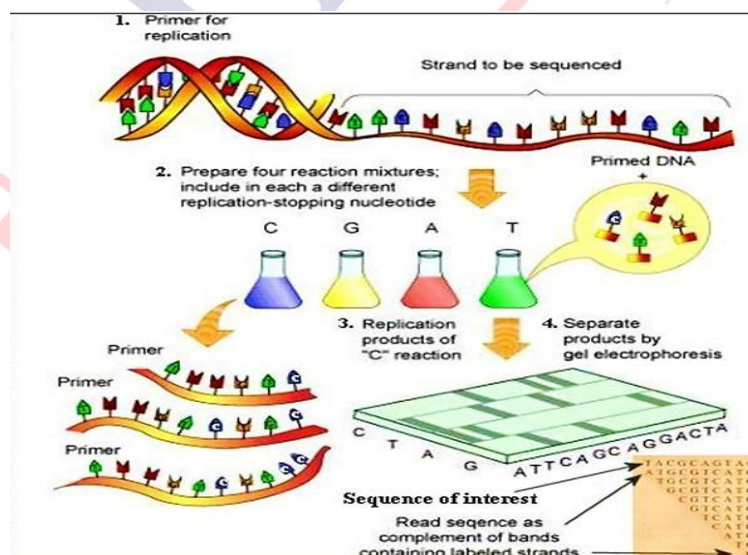
راهنمای توالی‌یابی DNA به روش سنگر

مفهوم تعیین توالی

تعیین توالی DNA یکی از مهم‌ترین تکنیک‌های زیست‌شناسی مولکولی است که به‌وسیله آن می‌توان ترتیب قرارگیری نوکلئوتیدها را در یک قطعه DNA مشخص نمود. روش‌های متعددی برای تعیین توالی DNA وجود دارد که امکان مطالعه مستقیم ژنوم را برای پژوهشگران فراهم می‌سازد.

در حال حاضر، تعیین توالی DNA در زمینه تشخیص‌های طبی و سایر حوزه‌های پزشکی از جایگاه ویژه و اهمیت بالایی برخوردار است.

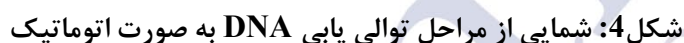
شکل زیر نمایی کلی از جزئیات این روش را نشان می‌دهد.



شکل ۳: روش توالی‌یابی سنگر

توالی‌یابی DNA به‌صورت اتوماتیک با دستگاه توالی‌یابی ABI (Applied Biosystems)

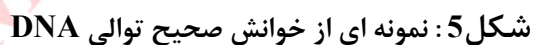
سیستم توالی‌یابی مبتنی بر فلورسانس ABI، نوعی پیشرفته و بهینه‌شده از روش توالی‌یابی دی‌دئوکسی سنگر می‌باشد. به‌طور کلی، عملکرد این سیستم اتوماتیک شامل مراحل است که در شکل زیر نمایش داده شده‌اند.



- غلظت مناسب پرایمر و DNA الگو

- تخلص با کیفیت و مطلوب DNA و الگو

• طراحی بهینه پرایمر



مشکلات توالی یابی DNA به صورت اتوماتیک

به‌منظور دستیابی به یک خوانش صحیح و موفق، لازم است نکات متعددی مورد توجه قرار گیرد که در بخش «شرایط نمونه برای تعیین توالی» به برخی از آن‌ها اشاره شده است. در ادامه، تعدادی از دلایل عدم دستیابی به نتایج مطلوب در توالی‌یابی DNA بیان می‌گردد.

از مهم‌ترین دلایل بروز نتایج نامطلوب در توالی‌یابی، کیفیت پایین نمونه ارسالی و طراحی نامناسب یا کیفیت پایین پرایمر می‌باشد.

کیفیت پایین نمونه می‌تواند ناشی از موارد زیر باشد:

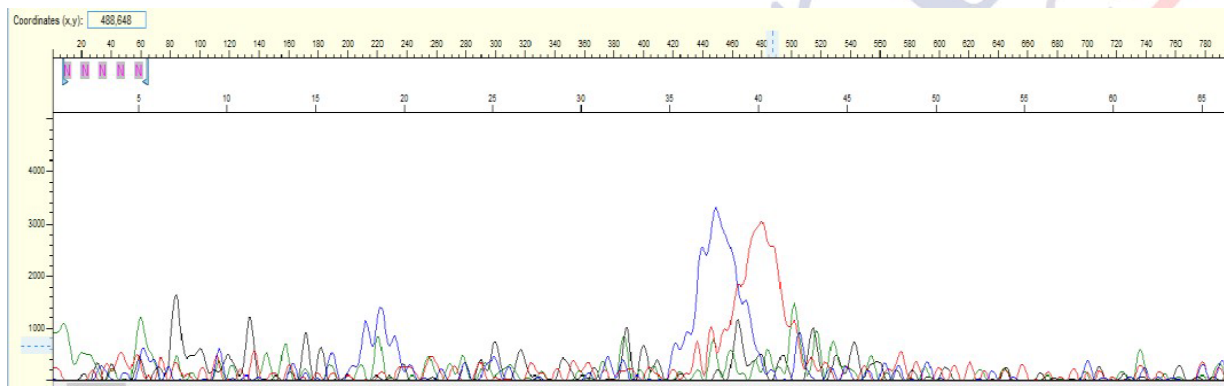
- حجم و غلظت نمونه کمتر از حد استاندارد ذکر شده (به دلیل نشتی یا تبخیر)
- عدم تخلیص مناسب محصول و وجود مهارکننده‌های PCR
- وجود ساختارهای ثانویه و تکرارهای مونونوکلئوتیدی

کیفیت پایین پرایمر می‌تواند ناشی از موارد زیر باشد:

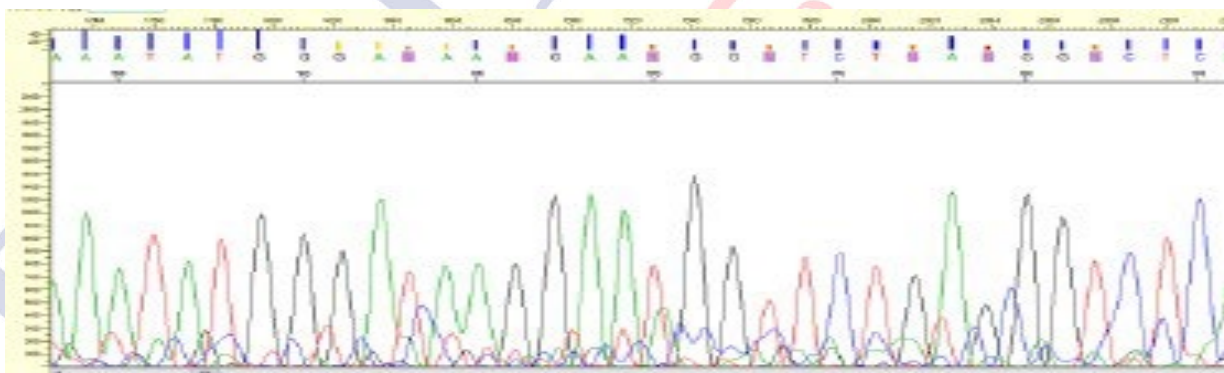
- حجم و غلظت پرایمر کمتر از حد استاندارد ذکر شده (به دلیل نشتی یا تبخیر)
- طراحی و سنتز نامناسب پرایمر
- اتصال غیراختصاصی پرایمر

نمونه‌هایی از نتایج ناموفق توالی‌یابی

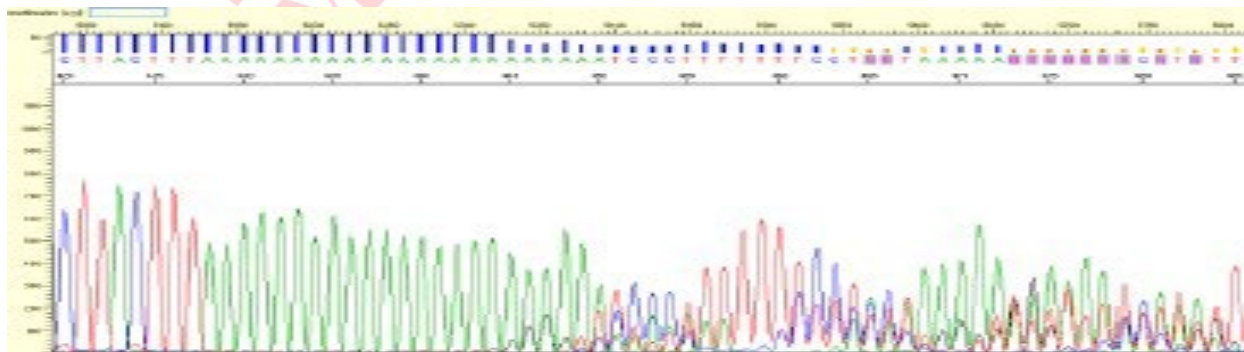
1. عدم انجام واکنش‌های توالی‌یابی DNA به دلیل کیفیت نامطلوب نمونه



2. وجود نویز در پس‌زمینه توالی‌ها به دلیل کیفیت نامناسب نمونه

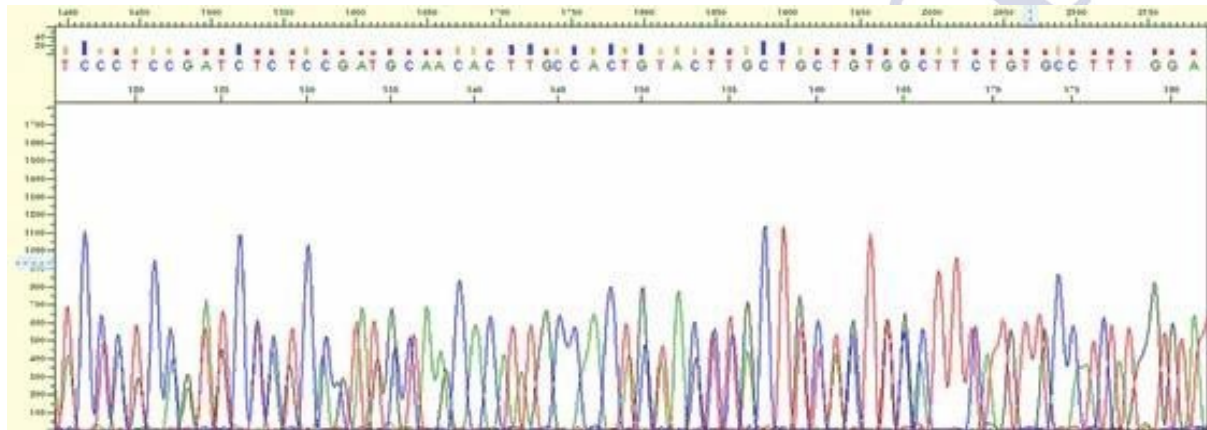


3. کاهش شدت پیک‌ها پس از تکرارهای مونونوکلوتهیدی



The figure displays the Sanger sequencing chromatogram and the predicted secondary structure of the 12S rRNA gene. The top panel shows the chromatogram with peaks for A (green), C (blue), G (black), and T (red) across 1000 nucleotide positions. The bottom panel shows the predicted secondary structure of the 12S rRNA gene, which is a small, single-stranded RNA molecule with a complex fold, including a large internal loop and several stem regions. The structure is color-coded to match the chromatogram: A (green), C (blue), G (black), and T (red).

7. اتصال پرایمر به نواحی مختلف



8. سنتز نامناسب پرایمر

