به نام خدا

# فن آوری زیستی تشخیص مولکولی
# در آبزی پروری

**مولف :**

**اس.  فلیکس**

**مترجم :**

**دکتر مسعود صیدگر**

**ویراستار علمی:**

**دکتر سهراب رضوانی**

**شناسه** : فلیکس، اس
S. Felix
**عنوان و نام پدیدآور** : فن آوری زیستی تشخیص مولکولی در آبزی پروری/ مولف اس. فلیکس؛ مترجم مسعود صیدگر؛ ویراستار علمی سهراب رضوانی.
**مشخصات نشر** : تهران : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور ، ۱۳۹۳.
**مشخصات ظاهری** : ۲۰۰ ص. : مصور، جدول.
**شابک** : ۹۷۸-۹٦٤-۵۸۵٦-۷۷-۷
**وضعیت فهرست نویسی** : فیپا
**یادداشت** : عنوان اصلی: Molecular diagnostic biotechnology in aquaculture, 2007
**یادداشت** : کتابنامه.
**موضوع** : واکنش زنجیره ای پلیمراز - کاربرد تشخیصی.
**موضوع** : تکنولوژی زیستی دریایی
**موضوع** : آبزی پروری
**شناسه افزوده** : صیدگر، مسعود، ۱۳۵۵-، مترجم
**شناسه افزوده** : رضوانی گیل کلائی، سهراب، ۱۳۳۷-، ویراستار
**شناسه افزوده** : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
**رده‌بندی کنگره** : ۱۳۹۳ ۸ ف ۲و/۸/٤٣ RB
**رده‌بندی دیویی** : ٦١٦/۰۷۵۸۲
**شماره کتابشناسی ملی** : ۳٦۱۷۹٦۹

نام کتاب : فن آوری زیستی تشخیص مولکولی در آبزی پروری
مؤلف: س. فیلیکس
مترجم : دکتر مسعود صیدگر
ویراستار علمی : دکتر سهراب رضوانی
ویراستار ادبی : گل‌اندام آل‌علی
شمارگان : ٦۰۰ نسخه
چاپ اول : سال ۱۳۹٤
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
ناظر چاپ : مدیریت اطلاعات و ارتباطات علمی
(نشانی : اتوبان تهران کرج- خروجی پیکان شهر -خیابان سرو آزاد- خیابان هشتم غربی -بلوار باغ گیاه شناسی ملی ایران - موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تلفن ٤٤٧٨۷۹۵٤ - Web Add: www ifroir)
شابک : ۹۷۸-۹٦٤-۵۸۵٦-۷۷-۷ (ISBN : 978- 964-5856-77-7)
قیمت : ۸۰۰۰۰ ریال

**حق چاپ و نشر برای موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور محفوظ است**

## مقدمه مترجم

اختراع واکنش زنجیره ای پلی مراز توسط کری ب. مولیس، تغییری اساسی در زیست فن آوری تشخیص مولکولی ایجاد کرده است. با استفاده از این روش می توان در مدت کوتاهی قطعه خاصی از مولکول DNA را در شرایط آزمایشگاهی میلیون ها بار تکثیر نمود. امروزه واکنش زنجیره ای پلی مراز در اکثر آزمایشگاه های تشخیصی و تحقیقاتی استفاده می شود و در بسیاری از موارد مانند شناسایی و جداسازی ژن ها، طبقه بندی و شناسایی موجودات زنده ، تعیین هویت، تشخیص بیماری های ژنتیکی و حتی پرونده های جنایی کاربرد دارد. توانایی آن در تشخیص عوامل بیماری زا در سطح مولکولی جایگاه ویژه ای یافته است هر چند این فن آوری در ابتدا محدود به آزمایشگاه های پیشرفته بود ، ولی امروزه کاربرد گسترده ای در سطح مزرعه یافته است. با توجه به فراوانی بیماری های ویروسی و باکتریایی که صنعت پرورش میگو را دچار گرفتاری کرده است، این صنعت نیاز به استفاده از ساز و کار نوین برای حفظ خود دارد. یکی از این راهکارها، غربالگری تخم میگو و مولدین است. با رواج فن آوری واکنش زنجیره ای پلی مراز، پرورش دهندگان می توانند تخم های آزمایش شده تهیه کنند و مراکز تکثیر، خطر استفاده از مولدین آزمایش نشده را نخواهند داشت.

طراحی واکنش زنجیره ای پلی مراز ساده بوده و کاربردهای متنوعی دارد. از آنجاییکه واکنش زنجیره ای پلی مراز فراتر از مخلوط کردن معرف ها در یک لوله و راه اندازی دستگاه است ، این کتاب نحوه کاربرد فن آوری واکنش زنجیره ای پلی مراز برای تشخیص بیماری میگو بویژه ویروس سندرم لکه سفید همراه با پروتکل های کامل برای راه اندازی واکنش زنجیره ای پلی مراز را توضیح داده و راهکارهایی برای جلوگیری از ایجاد آلودگی در مراحل مختلف واکنش

زنجیره ای پلی مراز ارائه می نماید. بعلاوه ، درمورد سایر فنون مولکولی و میکروسکوپ الکترونی و پروتکل های حفاظت انجمادی بحث می کند.

این کتاب مشتمل بر ۲۲ فصل بوده که در ترجمه آن کوشش شده است که تا حد امکان با رعایت امانت داری و ارائه واژه های علمی ، مطالب بصورت ساده و قابل فهم ارائه گردند. در خاتمه از همکاری مسئولین محترم موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور در چاپ این کتاب تشکر و قدردانی می نمایم.

**مسعود صیدگر**

تقدیم به پدر و مادر فداکار

خواهر مهربان و همسر عزیزم

# فهرست مندرجات

مقدمه مترجم

**پیشگفتار** ........ ۱

**مقدمه** ........ ۲

**فصل ۱ : ویروس سندرم لکه سفید – سناریوی موجود** ........ ٤

۱-۱- بیماریهای ویروسی میگو ........ ۵

۲-۱- دامنۀ میزبانی ........ ۷

۳-۱- نشانه‌های بالینی ........ ۸

۴-۱- گرایش بافتی ........ ۹

۵-۱- رویارویی با تهدید ویروس سندرم لکه سفید ........ ۹

۶-۱- فنون تشخیصی برای ویروس سندرم لکه سفید ........ ۱۰

**فصل ۲ : اصول واکنش زنجیره ای پلی مراز ( PCR )** ........ ۱۲

۱-۲- مولکول DNA ........ ۱۳

۲-۲- پرایمرها در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز ........ ۱۴

۳-۲- مراحل اصلی به کار رفته در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز ........ ۱۴

۴-۲- تولید نسخه های چندگانه از اجزاء DNA ........ ۱۵

۵-۲- مزایای واکنش زنجیره ای پلی مراز ........ ۱۷

۶-۲- منابع ........ ۱۸

**فصل ۳ : اجزای واکنش زنجیره ای پلی مراز** ........ ۲۰

۱-۳- پرایمرها ........ ۲۰

۲-۳- تامپون‌های واکنش زنجیره ای پلی مراز ........ ۲۱

۳-۳- DNA پلی مراز .................... ۲۳

۴-۳- تری فسفات های دی اکسی ریبو نوکلئوتید .................... ۲۵

۵-۳- DNA الگو .................... ۲۶

۶-۳- منابع .................... ۲۶

**فصل ٤ : تجهیزات مورد نیاز یک آزمایشگاه واکنش زنجیره ای پلی مراز .................... ۲۷**

۱-۴- چرخشگر حرارتی .................... ۲۸

۲-۴- میکروسانتریفیوژ .................... ۲۹

۳-۴- دستگاه الکتروفورز ژل آگاروز .................... ۳۱

۴-۴- ترانس لومینیتور اشعه فرا بنفش .................... ۳۱

۵-۴- دوربین عکاسی پولاروئید برای عکسبرداری از ژل .................... ۳۲

۶-۴- سیستم ارائه اسناد و مدارک ژل .................... ۳۳

۷-۴- سایر تجهیزات .................... ۳۳

۸-۴- منابع .................... ۳۴

**فصل ۵ : الکتروفورز ژل آگارز .................... ۳۵**

۱-۵- مواد و تجهیزات .................... ۳۶

۲-۵- ژل آگارز .................... ۳۶

۳-۵- تامپون ها .................... ۳۸

۴-۵- آماده سازی ژل .................... ۳۸

۵-۵- تامپون های بارگیری ژل .................... ۳۹

۶-۵- بار گیری نمونه‌ها .................... ۳۹

۷-۵- تجزیه وتحلیل ژل .................... ۴۰

۸-۵- قابل مشاهده کردن .................... ۴۱

**فصل ٦ : روش نمونه برداری برای پروتکل واکنش زنجیره ای پلی مراز ..................... ٤٢**
۱-۶- روشهای نگه داری ........................................................................................ ۴۳
۲-۶- منابع الگو برای تجزیه و تحلیل واکنش زنجیره ای پلی مراز ........................................ ۴۴
۳-۶- روش های نمونه برداری ........................................................................................ ۴۵
۴-۶- آماده سازی الگوی غیر کشنده ................................................................................ ۴۶
**فصل ۷ : آماده سازی DNA الگو برای واکنش زنجیره ای پلی مراز ..................... ٤٨**
۱-۷- منابع الگو ........................................................................................ ۴۹
۲-۷- مواد و تجهیزات ........................................................................................ ۴۹
۳-۷- معرف‌ها و موادشیمیایی ........................................................................................ ۵۰
۴-۷- پروتکل ۱ ........................................................................................ ۵۱
۵-۷- پروتکل۲ ........................................................................................ ۵۳
۶-۷- پروتکل ۳ ........................................................................................ ۵۵
۷-۷- منابع ........................................................................................ ۵۷
**فصل ۸ : پروتکل واکنش زنجیره ای پلی مراز تک مرحله ای برای WSSV ..................... ٥٨**
۱-۸- مواد ........................................................................................ ۵۸
۲-۸-توالی پرایمرها ........................................................................................ ۵۹
۳-۸- روش کار ........................................................................................ ۵۹
۴-۸- دستور تعداد چرخه‌ها ........................................................................................ ۶۰
۵-۸- منابع ........................................................................................ ۶۱
**فصل ۹ : واکنش زنجیره ای پلی مراز آشیانه ای در شناسایی WSSV ..................... ٦٢**
۱-۹- استخراج DNA ........................................................................................ ۶۳
۲-۹- توالی پرایمر آشیانه‌ای ........................................................................................ ۶۳

۳-۹- آماده‌سازی مخلوط مادر از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز آشیانه ای برای ویروس سندرم لکه سفید ........................................ ۶۳

۴-۹- برنامه چرخشی ـ حرارتی برای واکنش زنجیره ای پلی مراز آشیانه ای .......................... ۶۴

۵-۹- منابع ........................................ ۶۵

**فصل ۱۰ : پروتکل واکنش زنجیره ای پلی مراز برای ویروس نکروز دهندهٔ بافت خونساز و زیر جلدی عفونی ( IHHNV ) ........................................ ٦٦**

۱-۱۰- استخراج DNA الگو........................................ ۶۶

۲-۱۰- دستور چرخش ........................................ ۶۸

**فصل ۱۱ : پروتکل واکنش زنجیره ای پلی مراز برای ویروس سرزرد ( YHV ) .............. ٦٩**

۱-۱۱- استخراج RNA ........................................ ۶۹

۲-۱۱- روش کار ........................................ ۶۹

۳-۱۱- توالی پرایمر ........................................ ۷۰

۴-۱۱- مخلوط مادر واکنش زنجیره ای پلی مراز RT ( RT PCR Master Mix ) برای ویروس سر زرد ( YHV ) – برای هر واکنش ........................................ ۷۰

۵-۱۱- واکنش و چرخهٔ حرارتی ........................................ ۷۱

۶-۱۱- پروفیل واکنش زنجیره ای پلی مراز/ RT ........................................ ۷۲

۷-۱۱- منبع ........................................ ۷۲

**فصل ۱۲ : پروتکل واکنش زنجیره ای پلی مراز برای ویروس سندرم تورا ( TSV ) ........ ۷۳**

۱-۱۲- استخراج RNA ........................................ ۷۳

۲-۱۲- توالی پرایمر ویروس سندرم تورا ( TSV ) ........................................ ۷۶

۳-۱۲- مخلوط مادر واکنش زنجیره ای پلی مراز / RT برای هر واکنش ویروس سندرم تورا (TSV ) ........................................ ۷۶

۴-۱۲- چرخش حرارتی ........................................ ۷۷

**فصل ۱۳: پروتکل برای التهاب هپاتوپانکراس نکروز دهنده ( NHP ) ........................ ۷۸**
۱-۱۳- استخراج DNA ........................................................................................ ۷۸
۲-۱۳- اجزاء واکنش ........................................................................................ ۷۸
۳-۱۳- پرایمر اختصاصی NHP ........................................................................ ۷۸
۴-۱۳- پروفیل حرارتی واکنش زنجیره ای پلی مراز ............................................ ۷۹
۵-۱۳- دستور چرخه ........................................................................................ ۷۹
**فصل ١٤ : اصلاحات واکنش زنجیره ای پلی مراز ........................................ ۸۰**
۱-۱۴- واکنش زنجیره‌ای پلی مراز معکوس ( خزیدن کروموزمی) ............................ ۸۰
۲-۱۴- واکنش زنجیره‌ای پلی مراز لنگردار ........................................................ ۸۱
۳-۱۴- واکنش زنجیره‌ای پلی مراز چند تایی ...................................................... ۸۲
۴-۱۴- واکنش زنجیره‌ای پلی مراز نسخه بردار معکوس ....................................... ۸۳
۵-۱۴- واکنش زنجیره‌ای پلی مراز آشیانه ای ..................................................... ۸۳
۶-۱۴- واکنش زنجیره‌ای پلی مراز نا قرینه ........................................................ ۸۴
۷-۱۴- تعیین توالی و گسترش توام .................................................................. ۸۵
۸-۱۴- نسخه برداری توالی خود پایدار ............................................................. ۸۵
۹-۱۴- واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با شروع گرم ................................................. ۸۵
۱۰-۱۴- واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با الگوی طویل باز شده ................................. ۸۶
۱۱-۱۴- واکنش زنجیره‌ای پلی مراز روی بخشی از بافت ثابت شده روی لام ........... ۸۶
۱۲-۱۴- منابع .............................................................................................. ۸۶
**فصل ۱۵: پاسخ های مثبت کاذب و منفی کاذب در واکنش زنجیره ای پلی مراز ........... ۸۷**
۱-۱۵- احتیاطات عمومی ................................................................................ ۹۱
۲-۱۵- اقدامات ویژهٔ پیشگیرانه ....................................................................... ۹۳
۳-۱۵- استریل سازی پیش از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز ........................... ۹۴

۴-۱۵- تابش اشعۀ فرابنفش .................................................... ۹۴

۵-۱۵- استریلیزاسیون بعد از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز .................................... ۹۵

۶-۱۵- تعیین آلودگی و تأیید نتایج .................................................... ۹۵

۷-۱۵- کنترل های منفی .................................................... ۹۵

۸-۱۵- مدیریت آلودگی .................................................... ۹۶

۹-۱۵- منابع .................................................... ۹۷

**فصل ١٦ : علت و اصلاح مشکلات واکنش زنجیره ای پلی مراز ............... ۹۸**

۱-۱۶- راهنمای مواجهه با مشکلات حاصله از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز ........................ ۹۹

**فصل ۱۷ : واکنش زنجیره ای پلی مراز در فن آوری زیستی تشخیصی ............... ١٠٤**

**فصل ۱۸ : واکنش زنجیره ای پلی مراز در شناسایی باکتری های بیماری زا ............... ١١١**

۱-۱۸- نشانی های بالینی و چکیده ای از بیماریهای ایجاد شده توسط گونه های ویبریو ............۱۱۳

۲-۱۸- تشخیص .................................................... ۱۱۵

۳-۱۸- تشخیص مولکولی ویبریو .................................................... ۱۱۷

۴-۱۸- جمع آوری نمونه و ذخیره سازی .................................................... ۱۱۷

۵-۱۸- دستورالعمل برای ویبریو پاراهمولیتیکوس .................................................... ۱۱۸

۶-۱۸- منابع .................................................... ۱۱۹

**فصل ۱۹ : راه اندازی یک آزمایشگاه واکنش زنجیره ای پلی مراز ............... ۱۲۰**

۱-۱۹- تاسیس یک آزمایشگاه واکنش زنجیره‌ای پلی مراز .................................................... ۱۲۱

۲-۱۹- توصیف طرح .................................................... ۱۲۷

**فصل ۲۰ : سایر فنون تشخیص مولکولی ............... ۱۲۹**

۱-۲۰- فنون بر اساس اسید نوکلئیک.................................................... ۱۲۹

۲-۲۰- روشهای ایمونولوژیک .................................................... ۱۳۲

۳-۲۰- اساس روشهای ایمونولوژیک .................................................... ۱۳۳

۴-۲۰- ارزیابی الایزا .................................................... ۱۳۵

۵-۲۰- رادیوایمونوآسه ........................................................... ۱۳۵

۶-۲۰- روش آنتی بادی درخشان ........................................................... ۱۳۵

۷-۲۰- روشهای ایمونولوژیک در تشخیص بیماری میگو ........................................... ۱۳۶

۸-۲۰- تهیه پروب اسید نوکلئیک ........................................................... ۱۳۶

۹-۲۰- دورگه سازی مستقیم DNA نشان دار به DNA در ژل های آگارز ................................ ۱۳۸

۱۰-۲۰- دورگه سازی کلونی باکتریائی ........................................................... ۱۴۰

۱۱-۲۰- پهن کردن نقطه ای ........................................................... ۱۴۲

۱۲-۲۰- پهن کردن به صورت سوراخ کردن ........................................................... ۱۴۳

۱۳-۲۰- ساترن بلات ........................................................... ۱۴۵

۱۴-۲۰- دورگه سازی مولکولی روی بخشی از بافت ثابت شده روی لام ................................ ۱۴۹

**فصل ۲۱ : کاربرد میکروسکوپ الکترونی در پژوهش های پیشرفتهٔ شیلاتی ................ ۱۵۵**

۱-۲۱- آماده سازی بافت برای بررسی با میکروسکوپ نوری با استفاده از رزین های پلاستیکی (اکریلیک ) ........ ۱۶۲

۲-۲۱- آماده سازی بافت برای میکروسکوپ الکترونی ........................................... ۱۶۳

۳-۲۱- برای اسکن میکروسکوپ الکترونی ........................................................... ۱۶۷

**فصل ۲۲ : میکروسکوپ انجمادی در پژوهش آبزی پروری ........................................... ۱۶۸**

۱-۲۲- راه اندازی میکروسکوپ انجمادی برای میگوی پنائیده ........................................... ۱۷۰

۲-۲۲- اصول کار میکروسکوپ انجمادی ........................................................... ۱۷۱

۳-۲۲- میکروسکوپ انجمادی جنین و لاروی ........................................................... ۱۷۲

۴-۲۲- اساس کارکرد میکروسکوپ انجمادی ........................................................... ۱۷۳

۵-۲۲- انجماد ........................................................... ۱۷۵

۶-۲۲- اجزای میکروسکوپ انجمادی ........................................................... ۱۷۷

۷-۲۲- منابع ........................................................... ۱۸۰

**ضمیمه ........................................................... ۱۸۱**