دانشکده پزشکی

قالب نگارش طرح درس دوره ترمی

ترم مهر۱۴۰۴-۱۴۰۳

عنوان درس : مهندسی ژنتیک عملی	**مخاطبان: دانشجویان کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی**
تعدادواحد:(یا سهم استاد از واحد) ۲ واحد عملی: سهم دکتر یداله بهرامی ۰,۴۸ واحد و سهم دکتر سارا محمدزاده ۱,۵۲ واحد از ۲ واحد	
ساعت پاسخگویی به سوالات فراگیر: چهارشنبه ها ۱۵-۱۳	
زمان ارائه درس: سه شنبه ها ساعت ۱۲-۸ نیمسال اول ۱۴۰۴-۱۴۰۳	**مدرسین: دکتر یداله بهرامی، دکتر سارا محمدزاده**
درس و پیش نیاز: مهندسی ژنتیک نظری، اصول استانداردسازی و ایمنی فرآورده های بیولوژیک	

هدف کلی درس : این طرح درس بر تکنیک های مهندسی ژنتیک عملی و کاربرد آن در تحقیقات و بیوتکنولوژی تمرکز دارد. در این درس دانشجویان در هر مرحله از فرآیند دستکاری مواد ژنتیکی هم درک نظری و هم مهارت های عملی لازم را کسب می کنند و به آنها تجربه عملی کار با پروتکل های استاندارد کلون سازی مولکولی داده می شود.

اهداف کلی جلسات : (جهت هر جلسه یک هدف)

۱- مقدمه ای بر مهندسی ژنتیک و طرح ریزی کلون سازی مولکولی

۲- جداسازی و خالص سازی DNA

۳- تکثیر PCR

۴- جداسازی و خالص سازی DNA پلاسمیدی

۵- هضم با آنزیم های محدودالاثر

۶- الحاق (Ligation)

۷- ترانسفورماسیون سلولهای مستعد *E. coli*

۸- غربالگری و کلونی PCR

۹- تایید پلاسمید نوترکیب

۱۰- مقدمه ای بر بیان پروتئین در *E. coli*

۱۱- راه اندازی کشت بیانی در مقیاس کم

۱۲- القای بیان پروتئین

۱۳- برداشت و لیز سلول

۱۴- SDS-PAGE و وسترن بلات

۱۵- حلالیت و خالص سازی پروتئین

۱۶- بررسی داده ها و عیب یابی

۱۷- گزارش پروژه و نتیجه گیری

هدف کلی جلسه اول: مقدمه ای بر مهندسی ژنتیک و طرح ریزی کلون سازی مولکولی

اهداف ویژه جلسه اول: ارائه یک نمای کلی از اصول، تکنیک ها و کاربردهای مهندسی ژنتیک و طرح و برنامه ریزی یک تجربه عملی برای کلون سازی مولکولی

در پایان دانشجو قادر باشد

۱-۱- اصول کلون سازی مولکولی را بشناسد.

۱-۲- بر اساس قطعه مورد نظر و پلاسمیدهای موجود و ارگانیسم های میزبان قادر به طراحی مراحل کلون سازی باشد و جریان کار(workflow) شامل مراحل درج ژن، ترانسفورماسیون، غربالگری و بررسی را ارائه دهد.

۱-۳- از نرم افزارهایی مانند CLC، SnapGene، Vector NTI و ... جهت وارد کردن توالی، طرح ریزی و شبیه سازی مجازی مراحل کلون سازی استفاده کند.

هدف کلی جلسه دوم: جداسازی و خالص سازی DNA

اهداف ویژه جلسه دوم: انجام جداسازی DNA از سلول های باکتریایی یا یوکاریوتی با استفاده از روش های استخراج استاندارد.

در پایان دانشجو قادر باشد

۲-۱- جداسازی DNA را با استفاده از روش‌های استخراج DNA ژنومی از سلول های باکتریایی یا یوکاریوتی انجام دهد.

۲-۲- کیفیت و غلظت DNA جدا شده را با استفاده از اسپکتروفتومتری (نانودارب) ارزیابی کند.

۲-۳- اهمیت خلوص DNA در مراحل پایین دست شبیه سازی مولکولی را توضیح دهد.

هدف کلی جلسه سوم: تکثیر PCR

اهداف ویژه جلسه سوم: تکثیر ژن هدف با استفاده از PCR برای کلوسازی

در پایان دانشجو قادر باشد

۳-۱- طراحی پرایمر با هدف تکثیر یک قطعه خاص از الگوی DNA و اضافه کردن جایگاههای محدودالاثر را انجام دهد.

۳-۲- یک واکنش PCR را با درک نقش هر جزء (الگو، پرایمرها، نوکلئوتیدها، پلیمراز) تنظیم و اجرا کند.

۳-۳- برای تایید تکثیر، ژل الکتروفورز محصولات PCR را روی ژل آگارز انجام دهد.

۳-۴- محصولات PCR را روی یک ژل آگارز مشاهده کند و با استفاده از مارکر مولکولی اندازه باند صحیح را بررسی کند.

۳-۵- نتایج را برای تایید تکثیر موفقیت آمیز و کمیت و کیفیت DNA تکثیر شده تفسیر کند.

هدف کلی جلسه چهارم: جداسازی و خالص سازی DNA پلاسمیدی

اهداف ویژه جلسه چهارم: انجام جداسازی DNA پلاسمیدی از سلول های باکتریایی

در پایان دانشجو قادر باشد

۴-۱- جداسازی DNA با استفاده از روش‌های استخراج DNA پلاسمیدی را انجام دهد.

۴-۲- کیفیت و غلظت DNA جدا شده را با استفاده از اسپکتروفتومتری (نانودارب) ارزیابی کند.

۴-۳- اهمیت خلوص DNA در مراحل پایین دست شبیه سازی مولکولی را توضیح دهد.

هدف کلی جلسه پنجم: هضم با آنزیم های محدودالاثر

اهداف ویژه جلسه پنجم: نقش و استفاده از آنزیم های محدودالاثر در برش DNA در توالی های خاص و ایجاد انتهای سازگار برای الحاق

در پایان دانشجو قادر باشد

۵-۱- هضم محدودالاثر محصول PCR و ناقل پلاسمیدی را با آنزیم های محدودالاثر انجام دهد.

۵-۲- با استفاده از روش های استخراج از ژل، قطعات DNA را پس از هضم خالص کند.

۵-۳- دلیل استخراج از ژل یا خالص سازی ستون را توضیح دهد.

۵-۴- محصول واکنش هضم را روی ژل آگارز ارزیابی و تفسیر کند.

۵-۵- تعیین کند که آیا قطعات برای واکنش الحاق (Ligation) مناسب هستند یا خیر.

هدف کلی جلسه ششم: الحاق (Ligation)

اهداف ویژه جلسه ششم: درج محصول PCR هضم شده (insert) در ناقل پلاسمیدی

در پایان دانشجو قادر باشد

۶-۱- مکانیسم DNA لیگاز در اتصال قطعات DNA با انتهای سازگار را توضیح دهد.

۶-۲- واکنش ligation برای وارد کردن ژن مورد نظر در یک ناقل پلاسمیدی را انجام کند.

۶-۳- نسبت‌های مولی قطعه insert به ناقل را محاسبه کند و اهمیت آن در بهینه‌سازی راندمان الحاق را درک کند.

هدف کلی جلسه هفتم: ترانسفورماسیون سلولهای مستعد *E. coli*

اهداف ویژه جلسه هفتم: وارد کردن پلاسمید نوترکیب به سلول های *E. coli* مستعد.

در پایان دانشجو قادر باشد

۷-۱- فرآیند ترانسفورماسیون باکتری و چگونگی جذب DNA پلاسمید خارجی را توضیح دهد.

۷-۲- ترانسفورماسیون سلول های *E. coli* مستعد با محصول لیگیشن با استفاده از روش شوک حرارتی یا الکتروپوریشن را انجام دهد.

۷-۳- سلول های ترانسفورم شده را روی محیط های انتخابی (به عنوان مثال، پلیت LB-agar دارای آنتی بیوتیک) کشت دهد و یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کند.

۷-۴- توضیح دهد که چگونه از مقاومت آنتی بیوتیکی و محیط های انتخابی برای شناسایی ترانسفورم های موفق استفاده می شود.

هدف کلی جلسه هشتم: غربالگری و کلونی PCR

اهداف ویژه جلسه هشتم: شناسایی کلون های حاوی پلاسمید نوترکیب.

در پایان دانشجو قادر باشد

۸-۱- با استفاده از غربالگری آبی-سفید یا روش های دیگر، بین کلنی های نوترکیب و غیر نوترکیب تفاوت قائل شود.

۸-۲- برای تایید وجود قطعه وارد شده Colony PCR انجام دهد.

۸-۳- نتایج PCR را روی ژل آگارز مشاهده کند و کلون های مثبت را برای بررسی های بیشتر انتخاب کند.

هدف کلی جلسه نهم: تایید پلاسمید نوترکیب

اهداف ویژه جلسه نهم: جداسازی DNA پلاسمید نوترکیب از کلون های مثبت و تایید آن

در پایان دانشجو قادر باشد

۹-۱- استخراج DNA پلاسمید (Miniprep) از کشت های باکتریایی را انجام دهد..

۹-۲- وجود قطعه درج شده را از طریق هضم محدودالاثر و ژل الکتروفورز تایید کند.

۹-۳- در صورت امکان نمونه‌ها را برای توالی‌یابی ارسال کند تا ترتیب صحیح را تأیید کند.

۹-۴- در مورد نقش تعیین توالی در تأیید جهت گیری و توالی صحیح ژن کلون شده بحث کند.

هدف کلی جلسه دهم: مقدمه ای بر بیان پروتئین در *E. coli*

اهداف ویژه جلسه دهم: اصول اولیه بیان پروتئین در *E.coli* را بداند.

در پایان دانشجو قادر باشد

۱۰-۱- درباره ناقل های بیانی، پروموترها و سیستم های القایی بیاموزد.

۱۰-۲- اجزای یک وکتور بیانی، مانند پروموتر، محل اتصال ریبوزوم و تگ های خالص سازی را شناسایی کند.

۱۰-۳- توضیح دهد که چگونه پروموترهای القایی (به عنوان مثال T7 و اپرون lac) بیان پروتئین را در پاسخ به القاکننده هایی مانند IPTG تنظیم می کند.

۱۰-۴- در مورد عوامل مؤثر بر بیان پروتئین مانند انتخاب سویه های میزبان برای بیان (به عنوان مثال DE3،BL21) و اهمیت بهینه سازی شرایط القا (دما، زمان و غلظت القا کننده) بحث کند.

هدف کلی جلسه یازدهم: راه اندازی کشت بیانی در مقیاس کم

اهداف ویژه جلسه یازدهم: بیان پروتئین هدف در مقیاس کم

در پایان دانشجو قادر باشد

۱۱-۱- ترانسفورم سویه های بیانی *E. coli* با پلاسمید بیانی حاوی ژن را انجام دهد.

۱۱-۲- کشت های باکتریایی در مقیاس کم را برای بیان پروتئین تلقیح کند و از حفظ فشار انتخابی باکتری های نوترکیب با استفاده از آنتی بیوتیک مناسب در محیط کشت اطمینان حاصل کند.

۱۱-۳- درک کند که چگونه شرایط کشت مانند shaking و دما، بر رشد باکتری ها و پتانسیل بیان پروتئین تأثیر می گذارد.

۱۱-۴- از تکنیک های آسپتیک برای حفظ استریل بودن کشت در طول فرآیند استفاده کند.

هدف کلی جلسه دوازدهم: القای بیان پروتئین

اهداف ویژه جلسه دوازدهم:

در پایان دانشجو قادر باشد

۱۲-۱- تراکم کشت باکتری در OD600 را اندازه گیری و نقطه بهینه برای القای پروتئین (mid-log phase) را شناسایی کند.

۱۲-۲- بیان پروتئین با استفاده از IPTG را القا کند و اثر غلظت های مختلف IPTG بر سطوح بیان را اعمال کند.

۱۲-۳- شرایط القایی از جمله دما و مدت، برای متعادل کردن بیان پروتئین و حلالیت را بهینه کند.

۱۲-۴- در مورد اهمیت کنترل متغیرهای القایی برای افزایش بازده پروتئین و به حداقل رساندن تشکیل inclusion body بحث کند.

هدف کلی جلسه سیزدهم: برداشت و لیز سلول

اهداف ویژه جلسه سیزدهم:

در پایان دانشجو قادر باشد

۱۳-۱- سلول های باکتریایی را با استفاده از سانتریفیوژ جمع آوری کند و رسوب را برای لیز آماده کند.

۱۳-۲- روش های مختلف لیز باکتری از جمله روش های آنزیمی، شیمیایی و مکانیکی را بشناسد.

۱۳-۳- اهمیت استفاده از مهارکننده های پروتئاز را در طول لیز سلولی برای جلوگیری از تخریب پروتئین بیان شده توضیح دهد.

هدف کلی جلسه چهاردهم: SDS-PAGE و سترن بلات

اهداف ویژه جلسه چهاردهم:

در پایان دانشجو قادر باشد.

۱۴-۱- SDS-PAGE را برای جداسازی پروتئین ها بر اساس اندازه آنها آماده و اجرا کند.

۱۴-۲- ژل SDS-PAGE را برای مشاهده باندهای پروتئینی و تخمین اندازه پروتئین رنگ آمیزی کند.

۱۴-۳- اصول وسترن بلات برای شناسایی پروتئین ها با استفاده از آنتی بادی های اختصاصی را بداند.

۱۴-۴- نتایج SDS-PAGE و وسترن بلات برای تایید بیان پروتئین و ارزیابی خلوص و اندازه پروتئین را بررسی کند.

هدف کلی جلسه پانزدهم: حلالیت و خالص سازی پروتئین

اهداف ویژه جلسه پانزدهم:

در پایان دانشجو قادر باشد.

۱۵-۱- برای تعیین حلالیت نتایج SDS-PAGE را تفسیر کنید.

۱۵-۲- راهکارهایی برای بهبود حلالیت پروتئین مانند کاهش دما، بیان همراه با چپرون ها و ... ارائه دهد.

۱۵-۳- درک کنید که چگونه روش‌های مختلف خالص‌سازی(affinity, ion exchange, size exclusion chromatography) را می‌توان برای جداسازی پروتئین‌ها بر اساس ویژگی‌های آن‌ها به کار برد.

۱۵-۴- تکنیک های خالص سازی اولیه مانند کروماتوگرافی میل پیوندی (مانند Ni-NTA برای پروتئین‌های His-tagged) را انجام دهد.

هدف کلی جلسه شانزدهم: بررسی داده ها و عیب یابی

اهداف ویژه جلسه شانزدهم: تجزیه و تحلیل نتایج و عیب یابی هر مرحله ناموفق.

در پایان دانشجو قادر باشد

۱۶-۱- تجزیه و تحلیل نتایج تجربی و تفسیر یافته های کلیدی از هر مرحله از فرآیند شبیه سازی.

۱۶-۲- منابع احتمالی خطا را شناسایی کند و راهبردهای عیب‌یابی را برای بهبود کارایی شبیه‌سازی پیشنهاد کند.

۱۶-۳- مشکلات رایجی که در بیان پروتئین با آن مواجه می شوند، مانند بیان کم، تجمع یا تخریب را عیب یابی کند.

۱۶-۴- راه حل هایی را برای بهبود بیان و حلالیت پروتئین پیشنهاد کند (به عنوان مثال، تغییر دما، غلظت IPTG یا استفاده از سویه های مختلف).

۱۶-۵- پیشنهاد بهبود های بالقوه برای آزمایشات بیان پروتئین در آینده.

هدف کلی جلسه هفدهم: گزارش پروژه و نتیجه گیری

اهداف ویژه جلسه هفدهم: نتایج تجربی را از طریق گزارش های کتبی یا شفاهی به اشتراک بگذارد.

در پایان دانشجو قادر باشد

۱۷-۱- نتایج تجربی را در یک گزارش کتبی یا شفاهی، شامل داده‌های بیان پروتئین، SDS-PAGE و وسترن بلات خلاصه کند.

۱۷-۲- موفقیت و محدودیت های فرآیند بیان پروتئین را به طور انتقادی تجزیه و تحلیل کند.

۱۷-۳- در مورد نتایج تجربی بحث کند و تغییراتی را برای آزمایش‌های آینده پیشنهاد کند.

منابع:

Molecular cloning: a laboratory manual. J Sambrook - Cold Spring Habor Laboratory, 2003

روش تدریس: سخنرانی، نمایش اسلاید و فیلم و پرسش و پاسخ برای یادگیری تئوری و ارائه زمینه برای جلسات عملی. تمرین عملی در یک محیط آزمایشگاهی جایی که دانشجویان به طور فعال تکنیک هایی مانند جداسازی DNA، PCR، هضم محدودالاثر، ligation و ترانسفرماسیون و.. را انجام می دهند.

وسایل آموزشی : تجهیزات و ابزار آزمایشگاهی مانند ترموسیکلر، تجهیزات الکتروفورز، اسپکتروفتومتر، میکروپیپت ها، انکوباتورشیکردار، سانتریفیوژ و ... ؛ نرم ابزارهای بیوانفورماتیک و محاسباتی؛ دستورالعمل های آزمایشگاهی و پروتکل ها

سنجش و ارزشیابی

آزمون	روش	سهم از نمره کل(ر حسب درصد)	تاریخ	ساعت
کوئیز	آزمون ها و بررسی های مفهومی	٪۱۰	طی ترم	//////////////////////
گزارش آزمایشگاهی	نوشتن گزارش کار آزمایشگاه برای ثبت مشاهدات، روش ها و نتایج	٪۵۰	طی ترم	
آزمون پایان ترم	برای ارزیابی درک دانش نظری	٪۲۰	۱۴۰۳/۱۰/۳۰	
ارزیابی‌های عملی	ارزیابی‌های عملی و حضور فعال در کلاس و بحث های گروهی	٪۲۰	طی ترم	

مقررات کلاس و انتظارات از دانشجو:

- **حضور مستمر و منظم در کلاس درس**
- **توجه کامل به کلاس در حین تدریس و پرهیز از ایجاد اختلال در امر یاددهی و یادگیری**
- **مطالعه‌ی مطالب هر جلسه قبل از حضور در کلاس**
- **موارد ممنوعه: استفاده از تلفن همراه، خوردن و آشامیدن، حرف زدن با همدیگر.**

نام و امضای مدرس: **نام و امضای مدیر گروه:** **نام و امضای**

مسئول EDO دانشکده:

تاریخ تحویل: **تاریخ ارسال:** **تاریخ ارسال :**

جدول زمانبندی درس مهندسی ژنتیک عملی

روز و ساعت جلسه : سه شنبه ها ۱۲-۸

جلسه	تاریخ	موضوع هر جلسه	مدرس
۱	۴۰۳/۰۶/۲۷	مقدمه ای بر مهندسی ژنتیک و طرح ریزی کلون سازی مولکولی	دکتر سارا محمدزاده
۲	۴۰۳/۰۷/۰۳	جداسازی و خالص سازی DNA	دکتر یداله بهرامی
۳	۴۰۳/۰۷/۱۰	تکثیر PCR	دکتر یداله بهرامی
۴	۴۰۳/۰۷/۱۷	جداسازی و خالص سازی DNA پلاسمیدی	دکتر سارا محمدزاده
۵	۴۰۳/۰۷/۲۴	هضم با آنزیم های محدودالاثر	دکتر سارا محمدزاده
۶	۴۰۳/۰۸/۰۱	الحاق (Ligation)	دکتر سارا محمدزاده
۷	۴۰۳/۰۸/۰۸	ترانسفورماسیون سلولهای مستعد *E. coli*	دکتر سارا محمدزاده
۸	۴۰۳/۰۸/۱۵	غربالگری و کلونی PCR	دکتر سارا محمدزاده
۹	۴۰۳/۰۸/۲۲	تایید پلاسمید نوترکیب	دکتر سارا محمدزاده
۱۰	۴۰۳/۰۸/۲۹	مقدمه ای بر بیان پروتئین در *E. coli*	دکتر سارا محمدزاده
۱۱	۴۰۳/۰۹/۰۶	راه اندازی کشت بیانی در مقیاس کم	دکتر سارا محمدزاده
۱۲	۴۰۳/۰۹/۱۳	القای بیان پروتئین	دکتر سارا محمدزاده
۱۳	۴۰۳/۰۹/۲۰	برداشت و لیز سلول	دکتر سارا محمدزاده
۱۴	۴۰۳/۰۹/۲۷	SDS-PAGE و وسترن بلات	دکتر یداله بهرامی
۱۵	۴۰۳/۱۰/۰۴	حلالیت و خالص سازی پروتئین	دکتر یداله بهرامی
۱۶	۴۰۳/۱۰/۱۱	بررسی داده ها و عیب یابی	دکتر سارا محمدزاده
۱۷	۴۰۳/۱۰/۱۲	گزارش پروژه و نتیجه گیری	دکتر سارا محمدزاده

جدول بلوپرینت EDC

رتبه علمی: نام گروه آموزشی: بیوتکنولوژی پزشکی تعداد سوال: ۱۷

جدول بلوپرینت آزمون: مهندسی ژنتیک عملی نیمسال تحصیلی : اول ۱۴۰۴-۱۴۰۳

دانشکده: پزشکی گروه آموزشی: بیوتکنولوژی پزشکی

ردیف	عنوان محتوای آموزشی	مدت زمان آموزش (ساعت)	درصد زمان اختصاص داده شده	تعداد سؤالات	تعداد سؤالات مربوط به هر یک از سطوح اهداف یادگیری		
					حیطه ی شناختی	حیطه ی مهارتی	حیطه ی نگرشی
۱	مقدمه ای بر مهندسی ژنتیک و طرح ریزی کلون سازی مولکولی	۴	۵/۸۸	۱			۱
۲	جداسازی و خالص سازی DNA	۴	۵/۸۸	۱	۱		
۳	تکثیر PCR	۴	۵/۸۸	۱		۱	
۴	جداسازی و خالص سازی DNA پلاسمیدی	۴	۵/۸۸	۱	۱		
۵	هضم با آنزیم های محدودالاثر	۴	۵/۸۸	۱		۱	
۶	الحاق (Ligation)	۴	۵/۸۸	۱		۱	
۷	ترانسفورماسیون سلولهای مستعد *E. coli*	۴	۵/۸۸	۱	۱		
۸	غربالگری و کلونی PCR	۴	۵/۸۸	۱	۱		
۹	تایید پلاسمید نوترکیب	۴	۵/۸۸	۱		۱	
۱۰	مقدمه ای بر بیان پروتئین در *E. coli*	۴	۵/۸۸	۱		۱	
۱۱	راه اندازی کشت بیانی در مقیاس کم	۴	۵/۸۸	۱	۱		
۱۲	القای بیان پروتئین	۴	۵/۸۸	۱		۱	
۱۳	برداشت و لیز سلول	۴	۵/۸۸	۱	۱		
۱۴	SDS-PAGE و وسترن بلات	۴	۵/۸۸	۱	۱		
۱۵	حلالیت و خالص سازی پروتئین	۴	۵/۸۸	۱		۱	
۱۶	بررسی داده ها و عیب یابی	۴	۵/۸۸	۱		۱	
۱۷	گزارش پروژه و نتیجه گیری	۴	۵/۸۸	۱			۱