University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

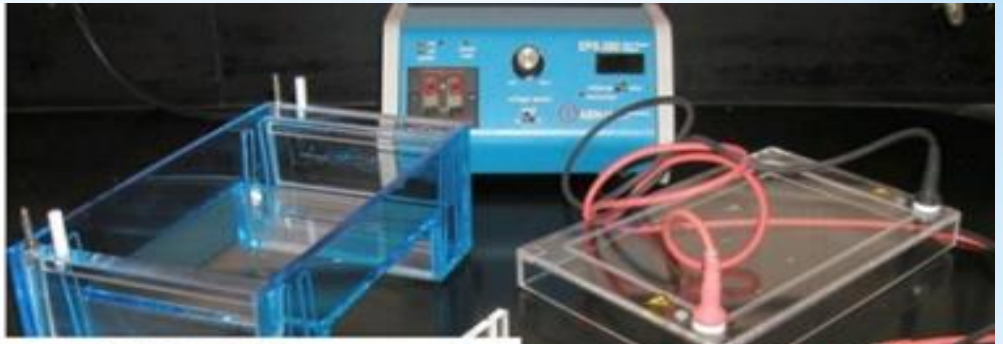
عنوان
آشنایی با اصول الکتروفورز و جداسازی ماکرومولکولهااز هم یا غربالگری مولکولی

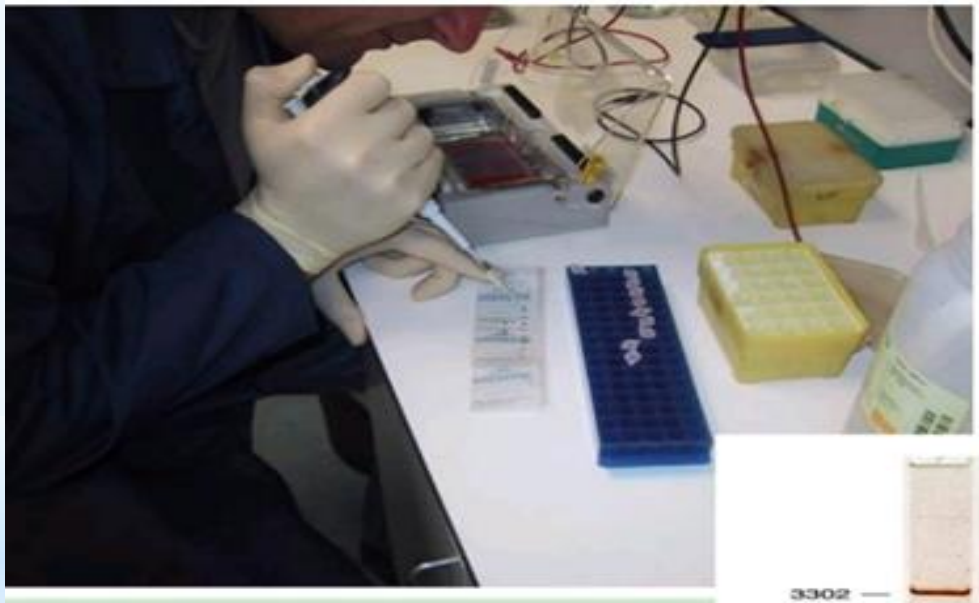
ELECTROPHORESIS

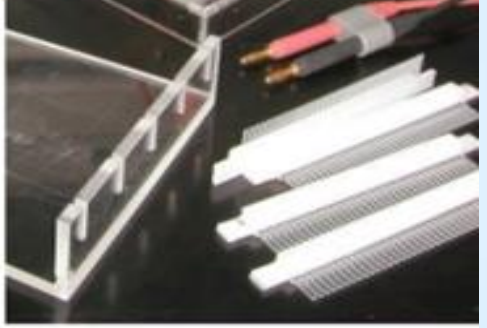
اهداف

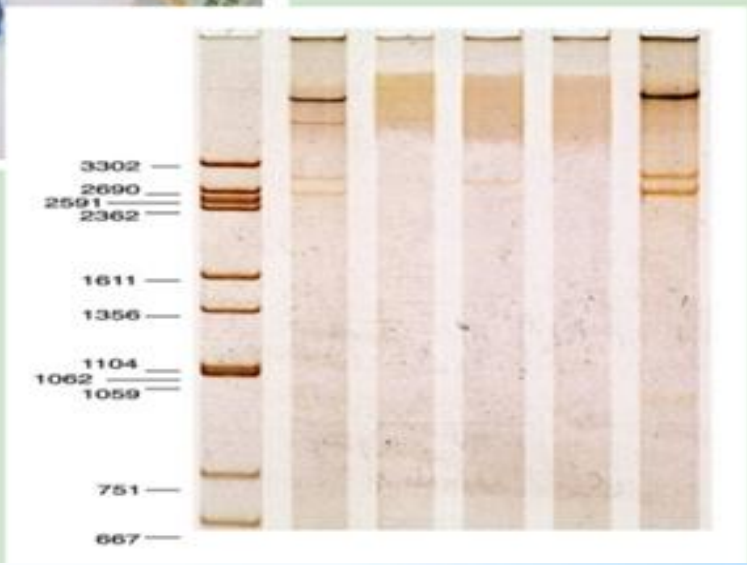
۱–انجام الکتروفورز افقی و جداسازی DNA ژنومی خون انسان

۲–آشنایی با اهداف گسترده الکتروفورز









آزمایشگاه زیست شناسی سلولی و مولکولی-فرزانه فروهر فر

مفهوم الکتروفورز

Electro(الکتریکی)Phoresis(حرکت)

الکتروفورز در حقیقت نوعی کروماتوگرافی است که جهشی بزرگ در توانایی جداسازی ماکرومولکولها به خصوص پروتئین‌ها و دی ان ای به وجود آورد. جداسازی با این روش از هر نوع کروماتوگرافی بهتر صورت می‌گیرد. به این معنا که ماکرومولکول ها با وزن مولکولی نزدیک و بار مشابه که جداسازی آن‌ها به روش‌های دیگر ممکن نیست در الکتروفورز به خوبی تفکیک می‌شوند.

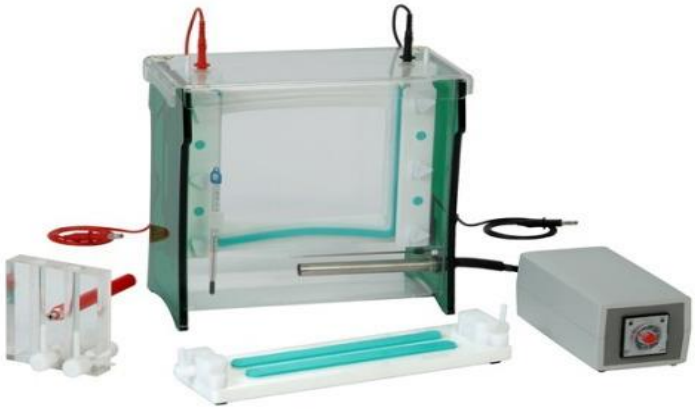
در واقع در الکتروفورز ماکرومولکول‌ها در یک میدان الکتریکی قرار گرفته و به واسطه بار الکتریکی، شکل، اندازه و ساختمان فضایی و وزن مولکولی که دارند دراین میدان حرکت کرده و ازهم تفکیک می‌شوند.

الکتروفورز عموماً به دو روش صورت می‌گیرد:

۱: الکتروفورز افقی که ژل در آن به حالت افقی قرار داشته و برای جداسازی قطعات DNA و RNA بزرگتر از ۵۰۰ bp به کارمی‌رود.

۲: الکتروفورز عمودی که در آن ژل به حالت عمودی قرار دارد و بیشتر جهت جداسازی آنزیم‌ها و پروتئین های غیر فعال و قطعات DNAکوچکتر از ۵۰۰ bpبکار می‌رود.

الکتروفورز افقی



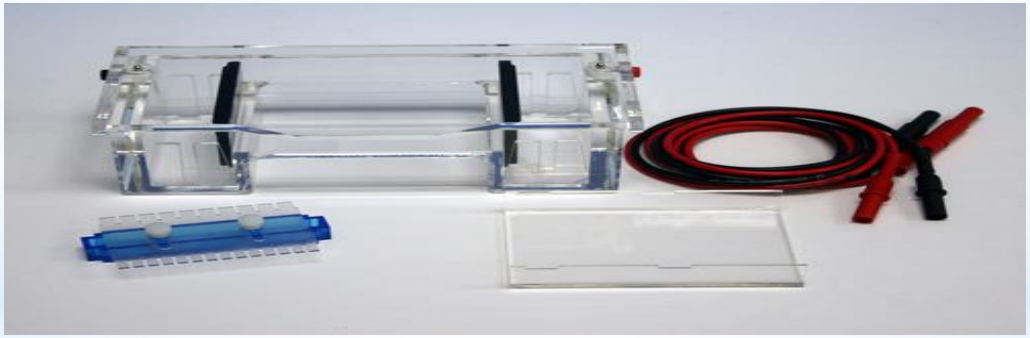
الکتروفورز عمودی

قسمت‌های مختلف دستگاه الکتروفورز

سیستم الکتروفورز شامل دو قسمت اصلی می‌باشد:

۱–تانک الکتروفورز و ملزومات آن

شامل تانک یا بدنه اصلی الکتروفورز مجهز به الکترودهایی از جنس فلزهای رسانای مرغوب، سینی ژل، میز ژل، شانه، گیره، تیغه می‌باشد که هرکدام ازجنس ترکیبات مقاوم به اسید و ترکیبات شیمیایی می‌باشند.



اجزا دستگاه الکتروفورز

۲–منبع تغذیه یا پاور سوپلای

این دستگاه همزمان ولتاژ و آمپراژ لازم را جهت انجام الکتروفورز تأمین می‌کند و قابلیت تنظیم مدت زمان انجام الکتروفورز را دارد.

انواع منبع تغذیه یا پاور سوپلای

انواع سمپلر و سر سمپلر و رک سر سمپلر

انواع ژل

۱–ژل پلی‌آکریل‌آمید

این ماده نوعی کربوهیدرات است که در شرایط خاص و مناسب به حالت پلیمریزه و ژله مانند در می‌آید. این ماده تا زمانی‌که پلیمریزه نشده و به حالت مایع است، بسیار خطرناک و جهش زا می‌باشد. اما وقتی به حالت ژل درآمد، بی‌خطر است. معمولاً ژل‌های عمودی جهت جداسازی پروتئین‌ها و آنزیم‌ها به کار می‌رود.اگر الکترفورز با این ژل انجام شود، اصطلاحاً به آن پلی اکریلامید ژل الکتروفورسیس یا PAGE می گوییم.

۲–ژل آگارز

نوعی آگار خالص و تصفیه شده با درجه خلوص بالاست و برای ژل‌های افقی جهت جداسازی DNAو RNAکاربرد دارد. این ترکیب پلی ساکاریدی از نوعی جلبک قرمز دریایی استخراج و خالص سازی می‌شود.اگر الکترفورز با این ژل انجام شود، اصطلاحاً به آن اگارز ژل الکتروفورسیس یا AGEمی گوییم.

۳– ژل نشاسته‌ای

به صورت هیدرولیز شده و خالص جهت جداسازی آنزیم‌ها و ایزوزیم‌ها یا فرمهای مختلف یک انزیم مصرف می‌شود. این ژل‌ها معمولا هنگام تهیه با ضخامتی حدود ۱ سانتی متر اماده می‌شوند.

درصد ژل تهیه شده جهت انجام الکتروفورز در جداسازی ماکرومولکولها تأثیر بسزایی دارد.هرچه درصد ان بالاتر باشد جداسازی ماکرومولکول بهتر و دقیق تر انجام می شود.

مقایسه دو ژل اگارز و پلی اکریلامید

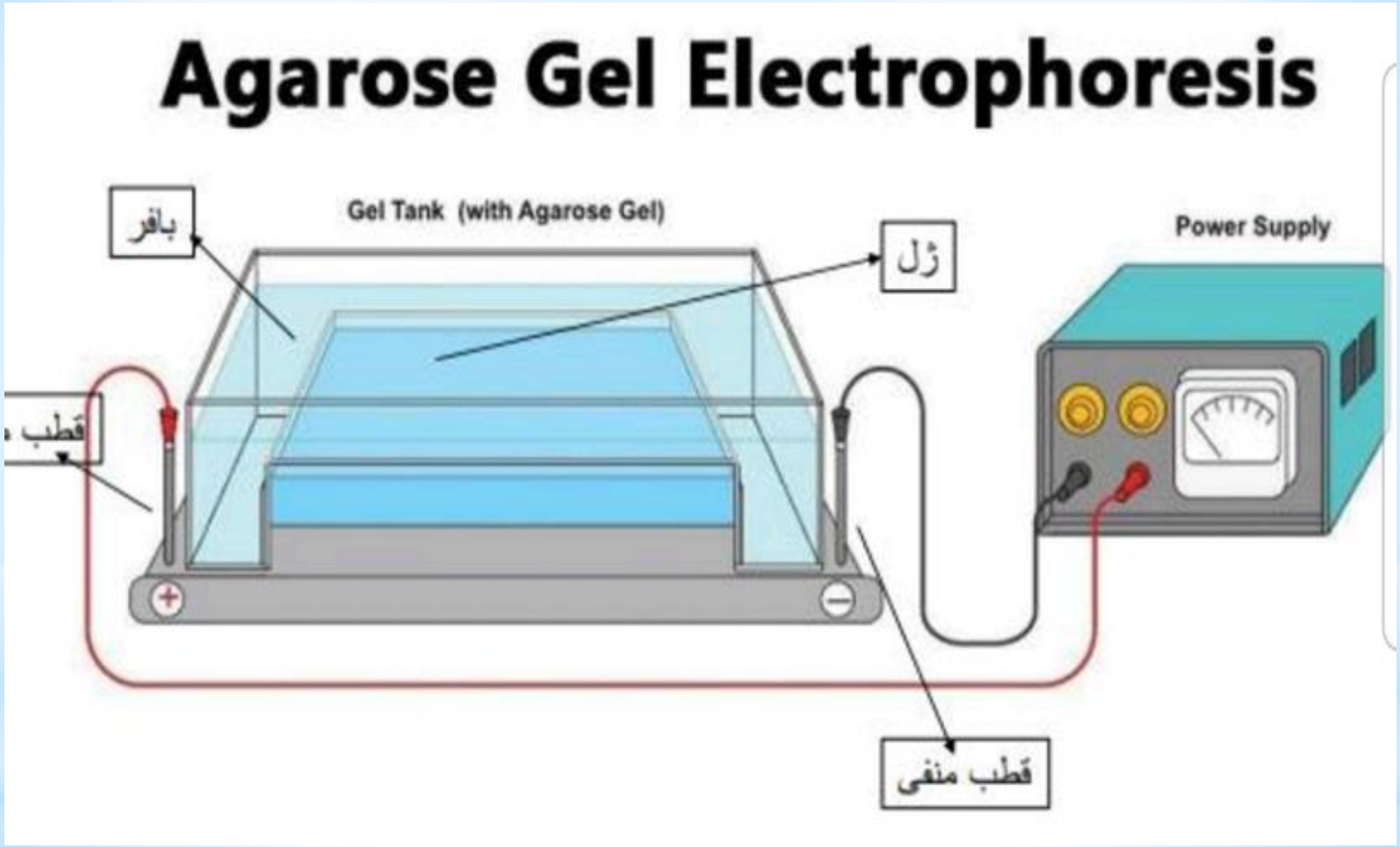
ژل آگاروز	ژل پلی‌آکریلامید
از پلی‌ساکارید جلبک‌های دریایی تهیه می‌شود.	از ایجاد اتصالات عرضی پلیمر آکریلامید تهیه می‌شود.
درون کاست افقی شکل می‌گیرد.	درون کاست عمودی شکل می‌گیرد.
غیرسمی است.	سمی و خطرناک است.
مولکول‌های بزرگ را از هم جدا می‌کند.	مولکول‌های کوچک را از هم جدا می‌کند.
برای جداسازی DNA مناسب است.	برای جداسازی DNA و پروتئین‌ها مناسب است.
دارای منافذ بزرگ است.	دارای منافذ کوچک است.
ساختار ساده دارد.	ساختار سخت و پیچیده دارد.

انواع بافر

بافر بستری را جهت هدایت الکتریکی یون ها و PH مناسب قلیایی در زمان انجام الکتروفورز را فراهم می کند.

چند نوع بافر مورد استفاده در انجام الکتروفورز معمولاً TBE (تریس، بوریک اسید، EDTA) یا TPE (تریس، فسفیک اسید، EDTA) و یا TAE (تریس، استیک اسید، EDTA) می باشد که تنها اسید مورد استفاده در آن‌ها متفاوت است.

pH	نوع بافر
7.0	Phosphate Buffer
8.0	Tris-Borate-EDTA Buffer (TBE)
8.0	Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE)
8.5	Tris-Glycine Buffer (TG)
7.0	Tris-Citrate-EDTA Buffer (TCE)
8.0	Tris-EDTA Buffer
7.5	Tris-Maleic acid-EDTA Buffer (TME)
8.6	Lithium-Borate Buffer (LB)

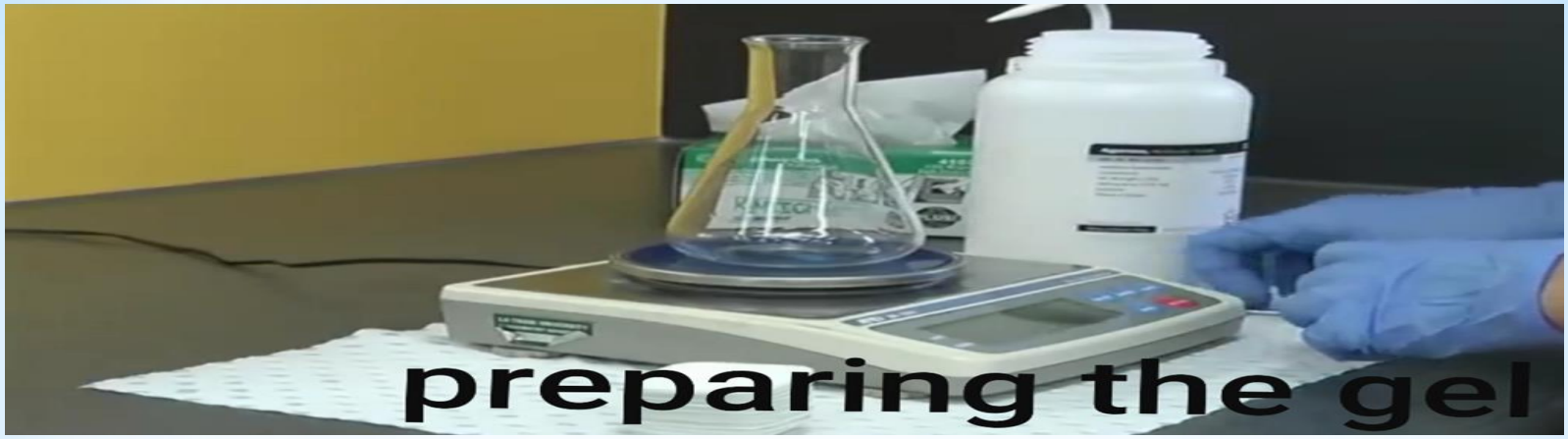

Agarose Gel Electrophoresis
بافر
Gel Tank (with Agarose Gel)
ژل
Power Supply
قطب
قطب منفی

مراحل انجام الکتروفورز

جهت جداسازی قطعات DNA یا RNA توسط الکتروفورز افقی، مراحل زیر صورت می‌گیرد:

۱-آماده سازی ماکرومولکول Preparing the DNA

ماکرومولکول‌ها با استفاده از تکنیک‌های جداسازی اجزاء درون‌سلولی، طی روش های دقیق مربوط به هر نمونه بایستی جدا شوند. (در این آزمایش ماکرومولکول‌های DNA استخراج شده از خون انسان که قبلا اماده شده جهت آنالیز مورد استفاده قرار می‌گیرد).



۲– تهیه ژل Preparing the gel

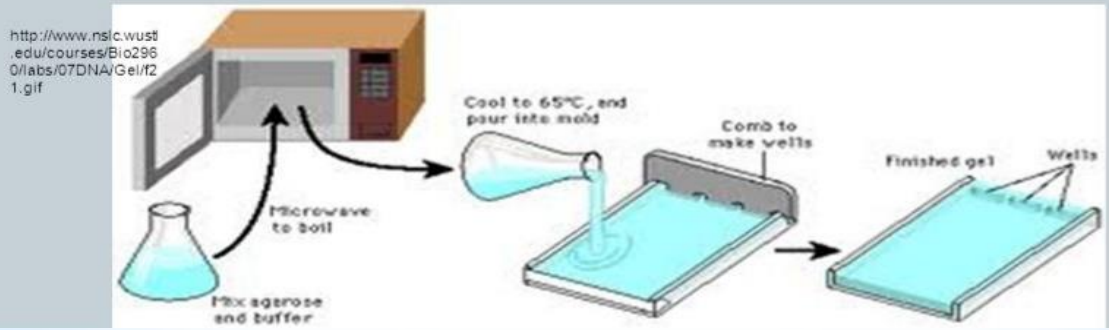
ژل آگارز با درصد مشخص در بافر TBEتهیه می‌شود (دقت شود که درصد ژل تأثیر بسزایی در جداسازی ماکرومولکول‌ها دارد). هنگام ساخت ژل یکسری چاهک توسط شانه‌های مخصوص درون آن‌ها تعبیه می‌شود، که محل تزریق نمونه ماکرومولکول در ژل است.

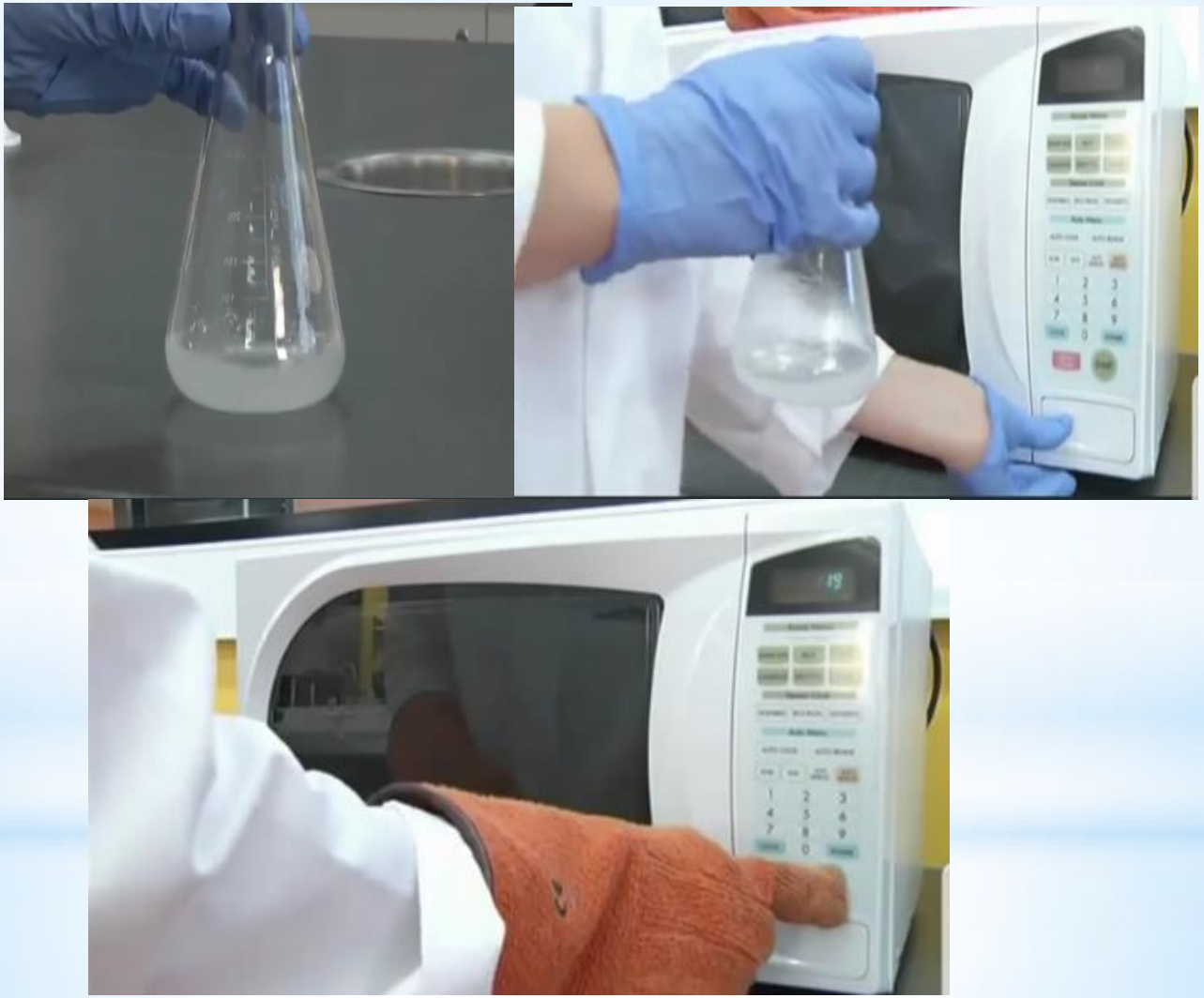
مراحل تهیه ژل اگارز

Agarose Gel Preparation:

11

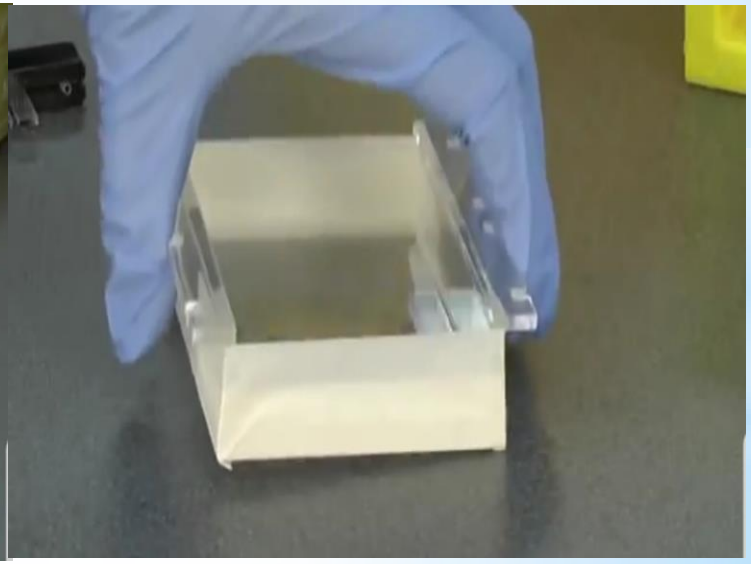
- Dissolve powdered agarose into electrophoresis buffer
- Boil to dissolve the agarose
- Pour into gel trays and insert comb to form loading wells
- Allow to harden at room temperature
- Remove comb to reveal loading wells





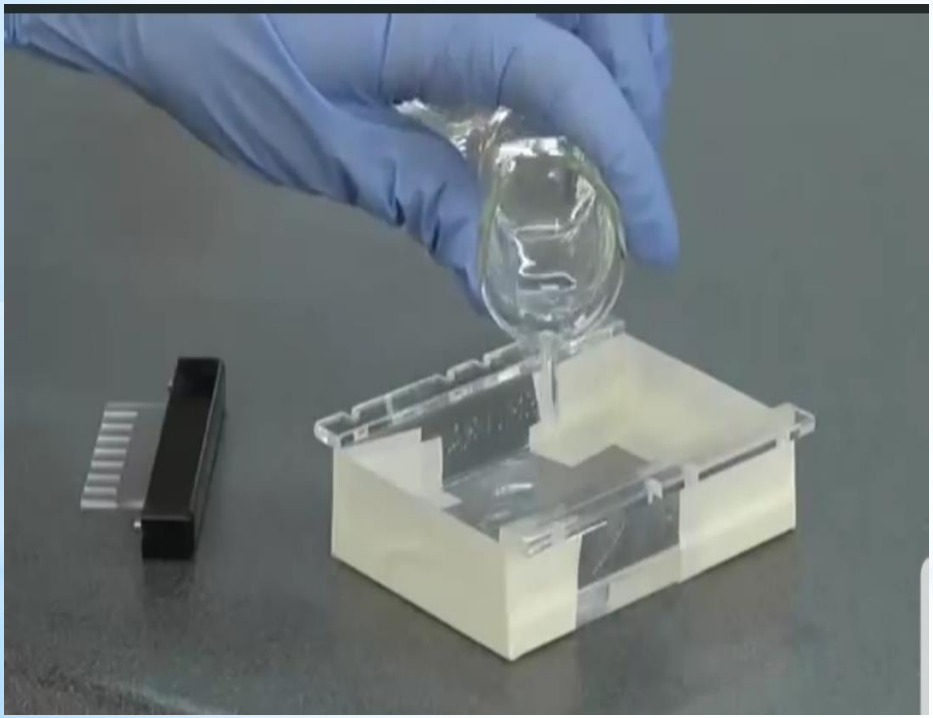
Casting

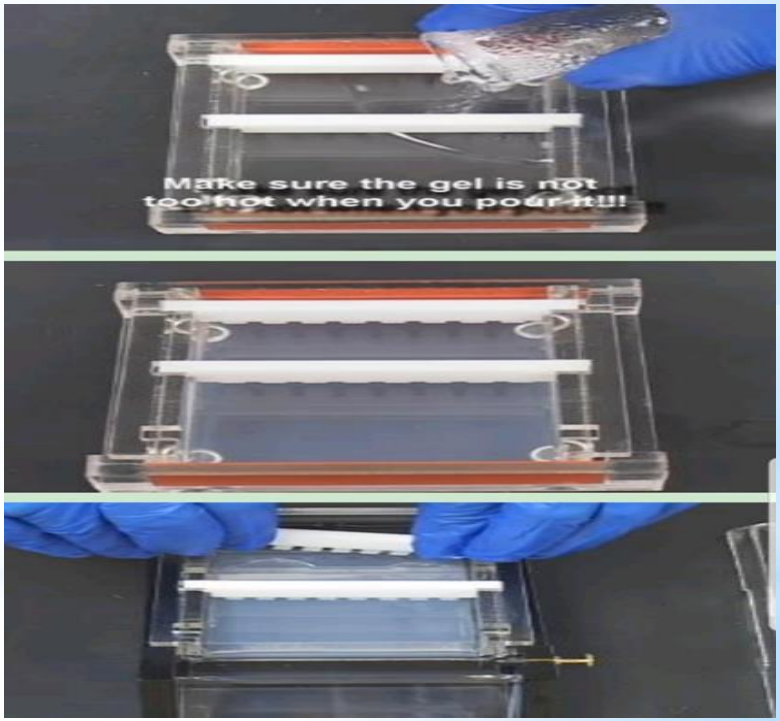
powder-free nitrile exam gloves
Silkfit
M



۳– ریختن ژل در سینی CASTING

ژل به صورت مذاب در سینی ریخته و در جای مسطح مناسبی قرار داده می‌شود تا منعقد گردد.





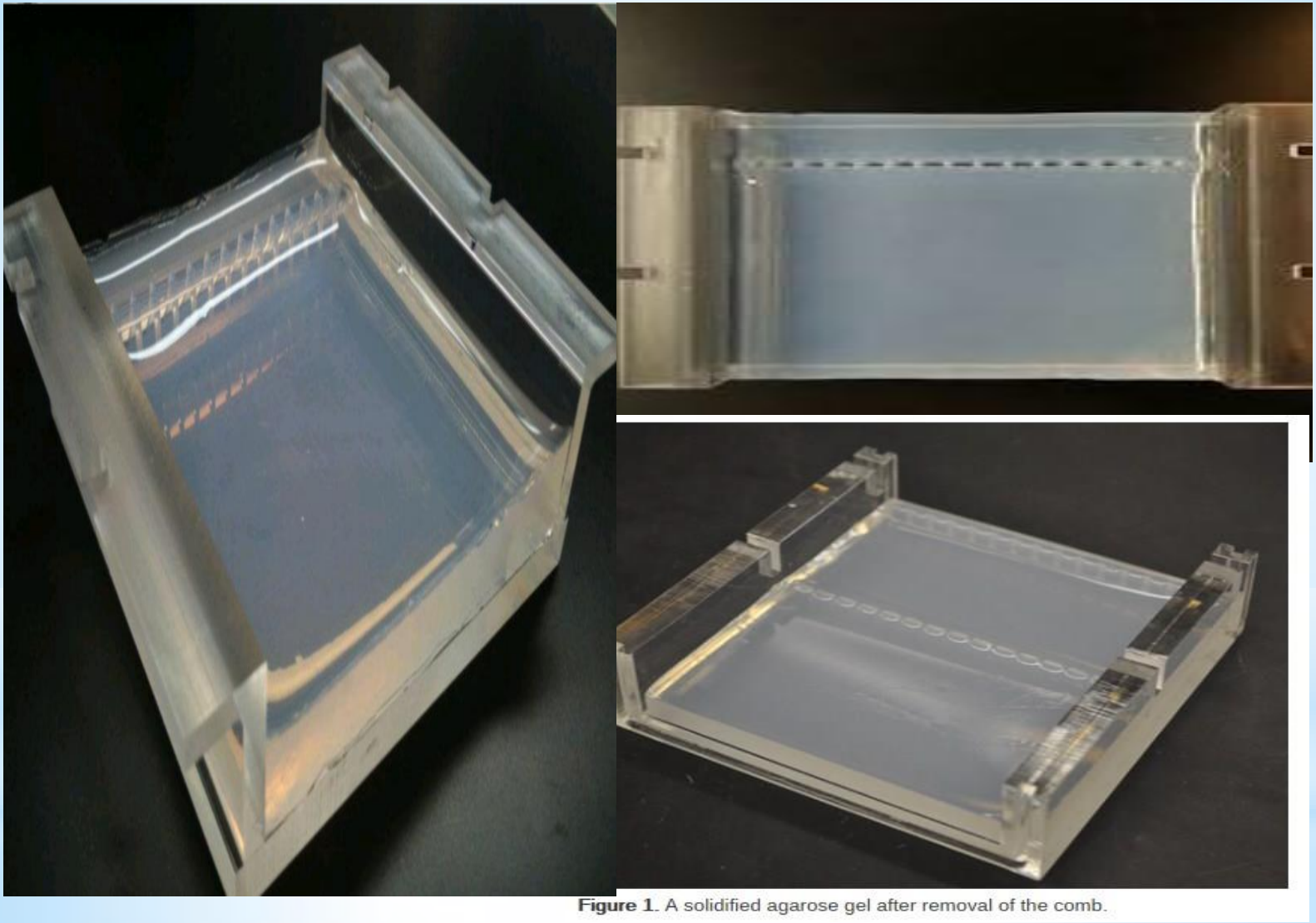
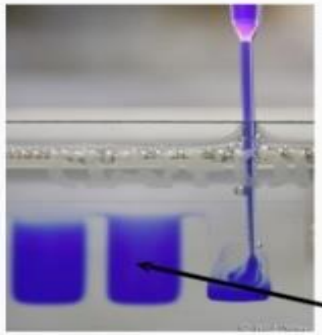
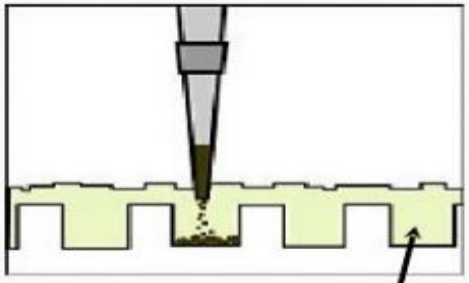


Figure 1. A solidified agarose gel after removal of the comb.

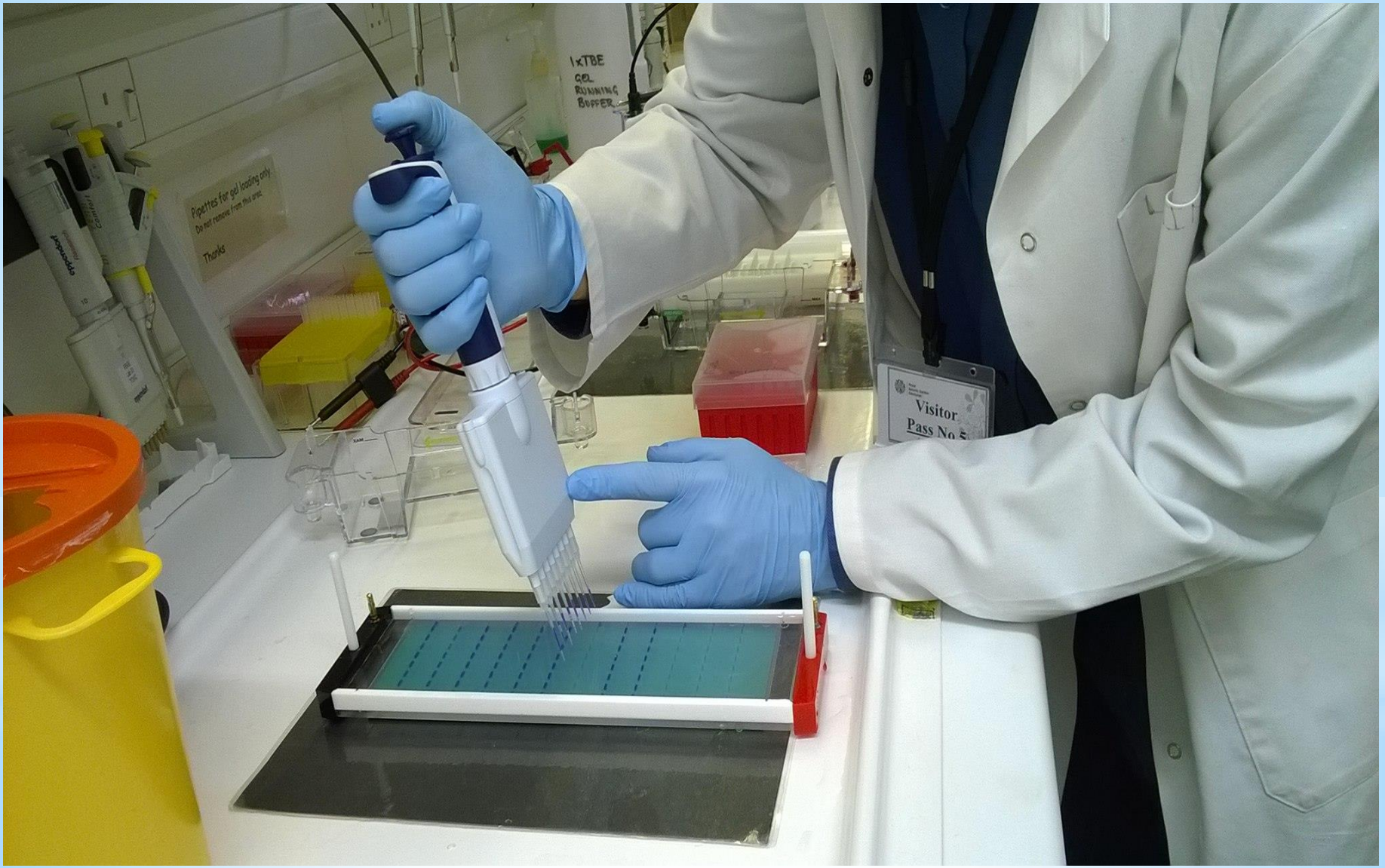
- Dye DNA and place into gel



The gel is made out of agarose, which is similar to jello.



The gel is made with wells at one end so that the DNA can be loaded into the gel.

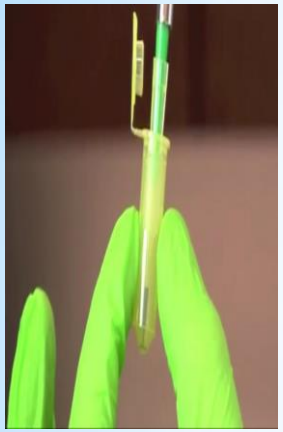
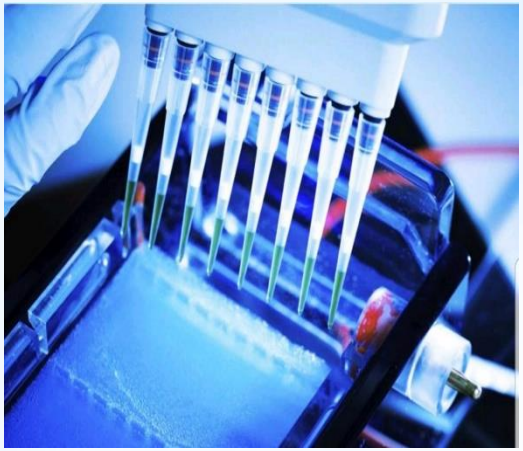
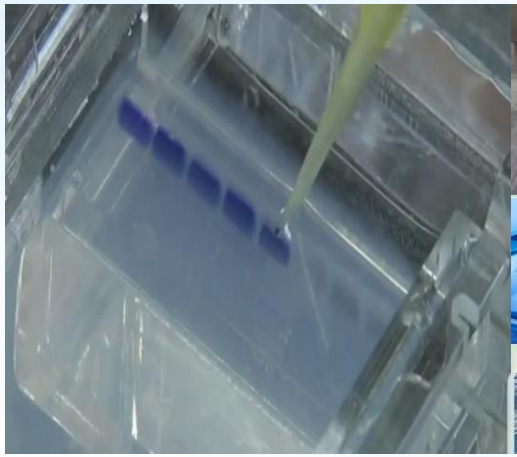
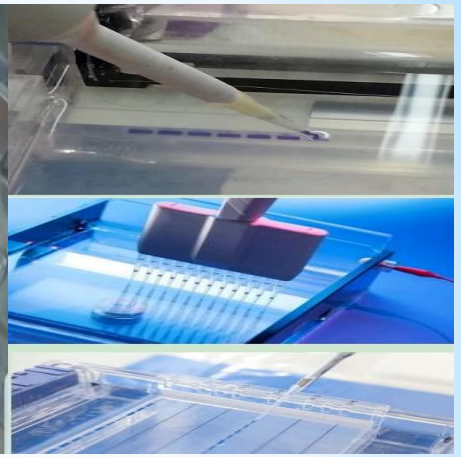
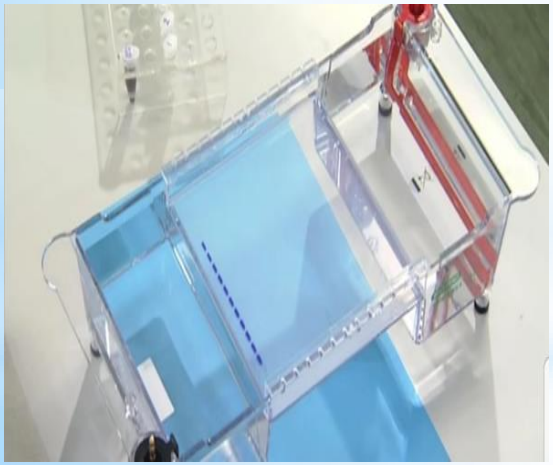
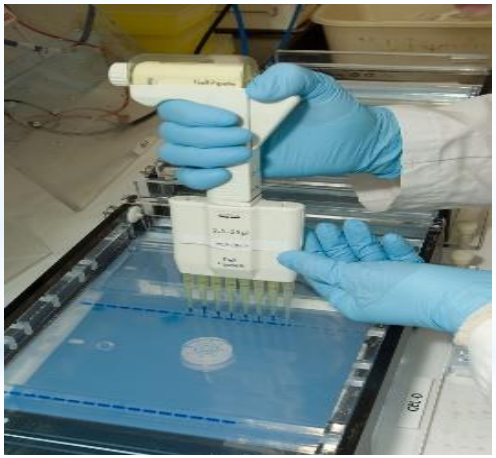

1xTBE
GEL
RUNNING
BUFFER
Pipettes for gel loading only
Do not remove from this area
Thanks
Visitor

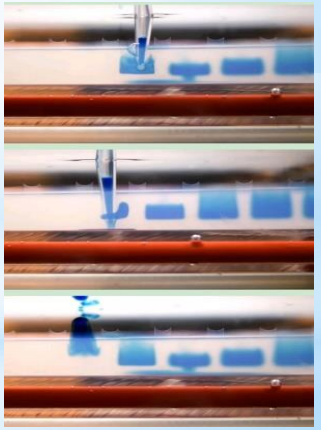
۴- ریختن نمونه در چاهک‌ها LOADING

در این مرحله نمونه حاوی ماکرومولکول به درون چاهک ریخته می‌شود. به عمل ریختن نمونه در چاهک‌ها لودینگ می‌گویند. برای انجام این مرحله ماکرومولکول‌ها بایستی با ترکیبی خاص به نام بافربارگذاری ترکیب شوند که حاوی چندین ماده از جمله گلیسرول (جهت سنگین کردن ماکرومولکول‌ها برای انتقال آن‌ها به درون چاهک) و یک ماده رنگی به نام برومونفل بلو (جهت رنگی‌کردن محیط ماکرومولکول‌ها) می‌باشد. مخلوط کردن این ماده با ماکرومولکول علاوه بر موارد فوق به چند منظور انجام می‌شود:

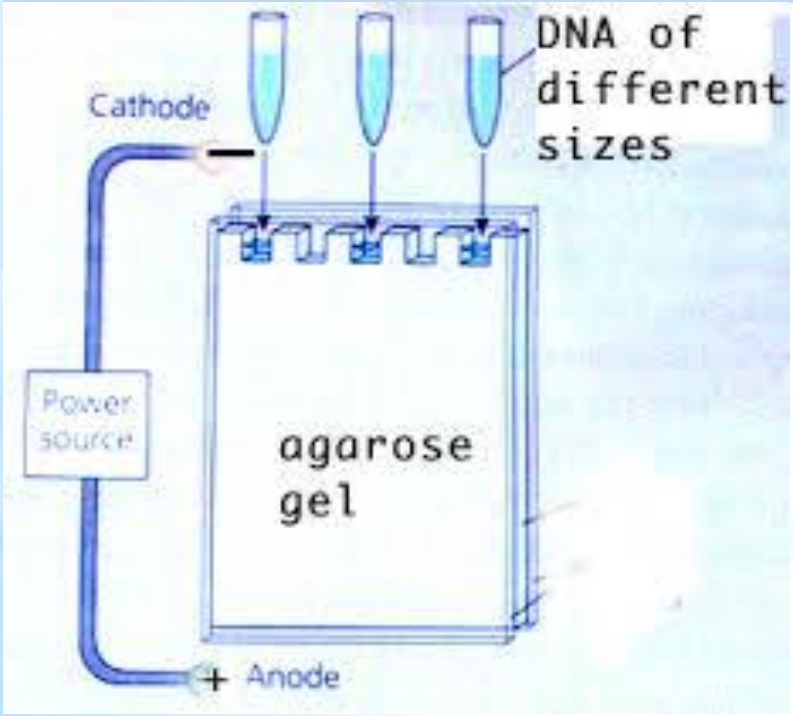
الف) موقع ریختن ماکرو مولکول در چاهک به واسطه وجود ماده رنگی عمل لودینگ دقیق‌تر انجام می شود.

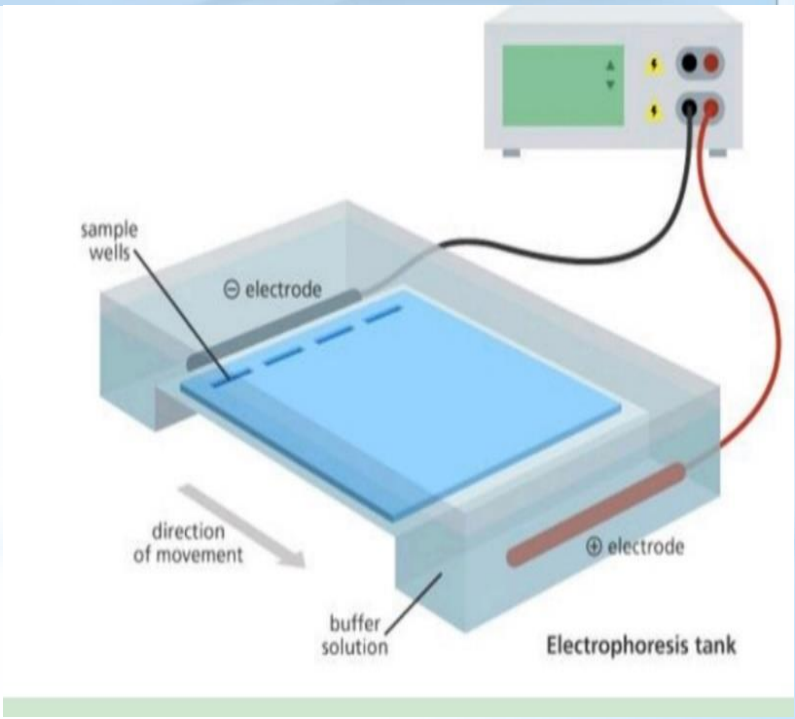
ب) ماده رنگی به عنوان خط نشانه عمل می‌کند و با استفاده از آن مسیر حرکت ماکرومولکول و میزان حرکت آن را روی ژل می‌توان تشخیص داد.هم‌چنین برای محاسبه‌ی Rfمورد استفاده قرار می‌گیرد.

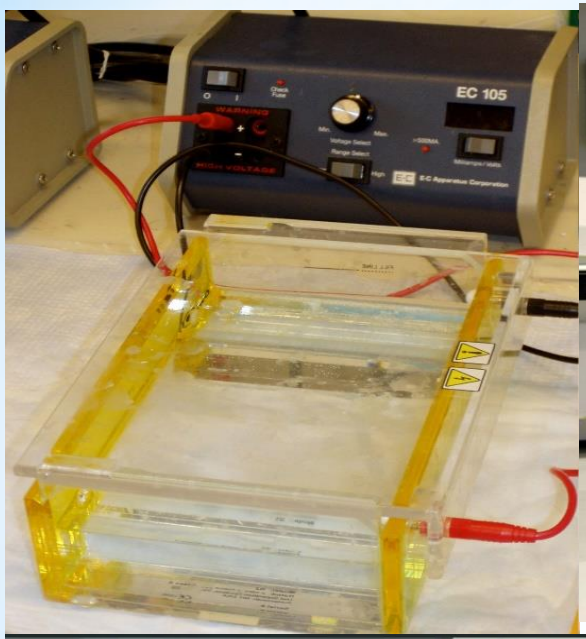







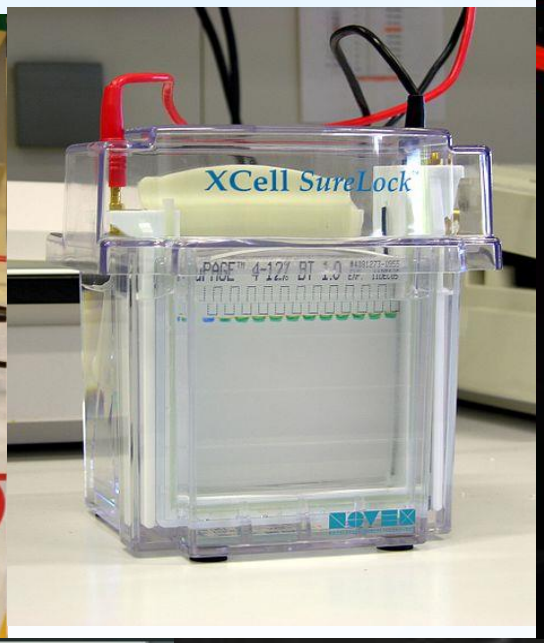


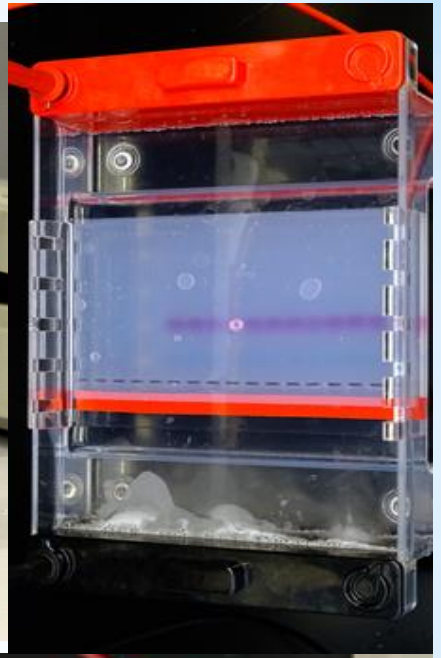
Running the Gel

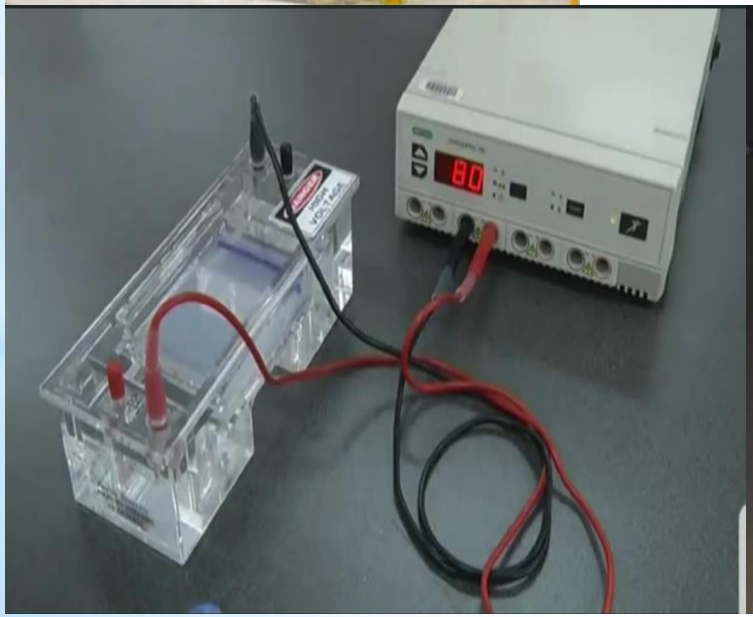

DNA of different sizes
Cathode
Power source
agarose gel
Anode

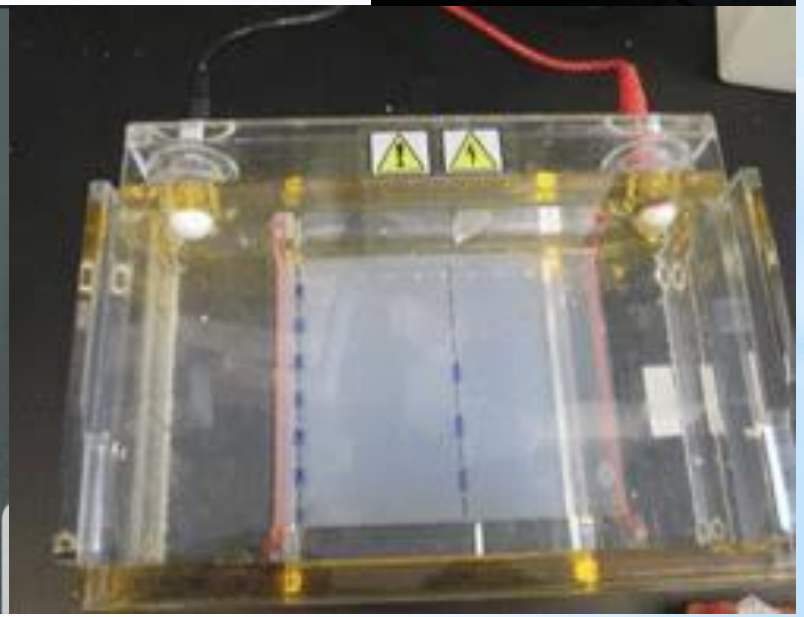

sample wells
⊖ electrode
direction of movement
⊕ electrode
buffer solution
Electrophoresis tank







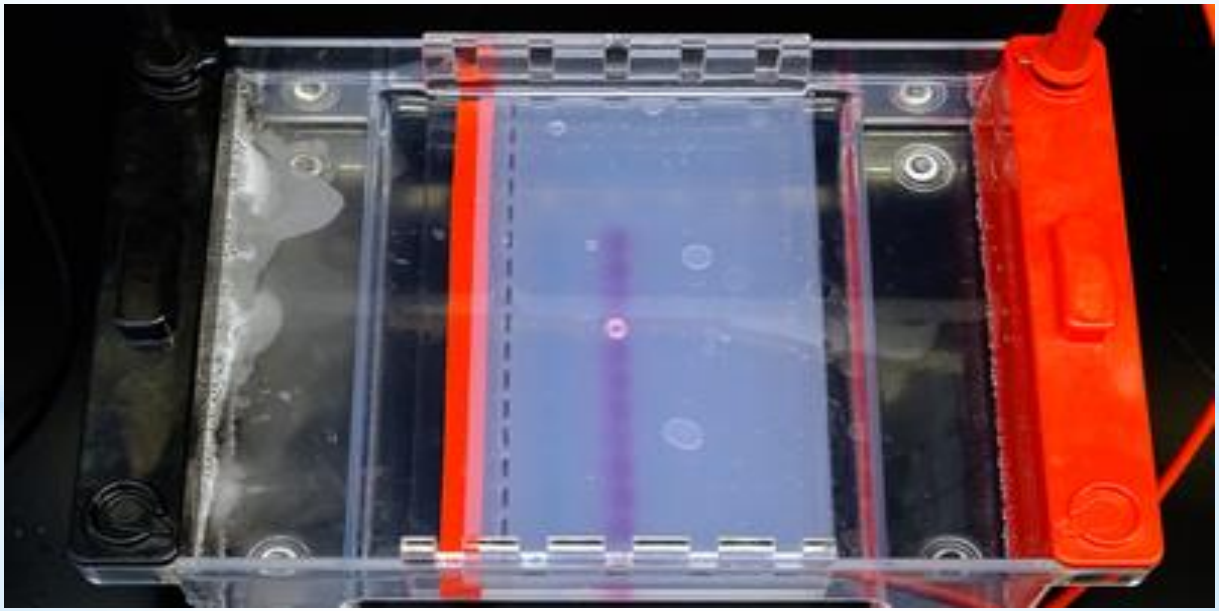




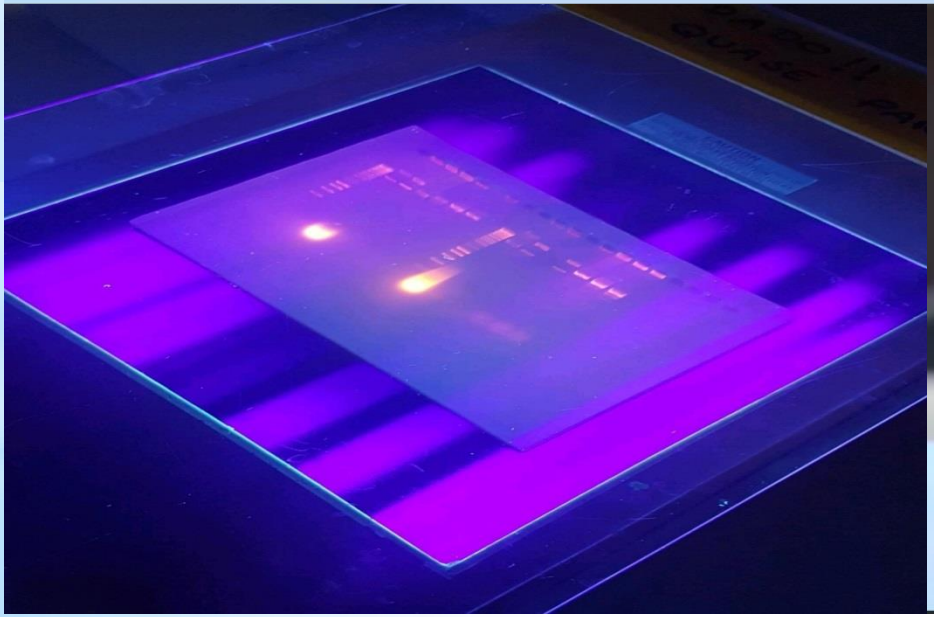
آزمایشگاه زیست شناسی سلولی و مولکولی-فرزانه فروهر فر

۵–برقراری جریان الکتریکی و حرکت ماکرومولکول‌ها Running

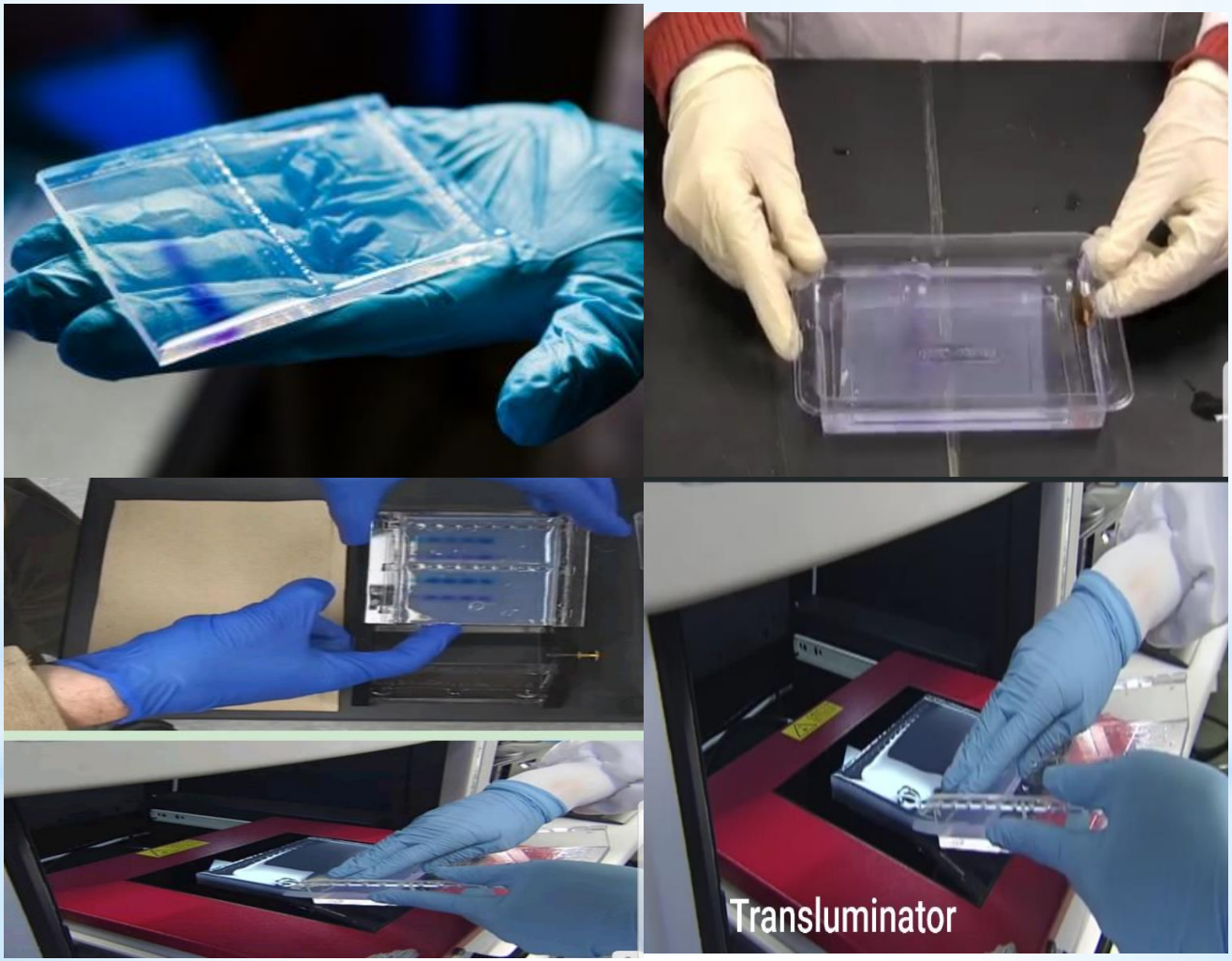
با قرار دادن ژل درون تانک الکتروفورز حاوی بافر، ریختن ماکرومولکول‌ها در چاهک و اتصال آن به جریان برق، در ولتاژ و آمپراژ مناسب ماکرومولکول‌ها به حرکت درآمده و جداسازی صورت می‌گیرد. حرکت الکترون‌ها از قطب منفی به قطب مثبت باعث حرکت ماکرومولکول‌ها می‌شود.



Visualising
the Nucleic Acids



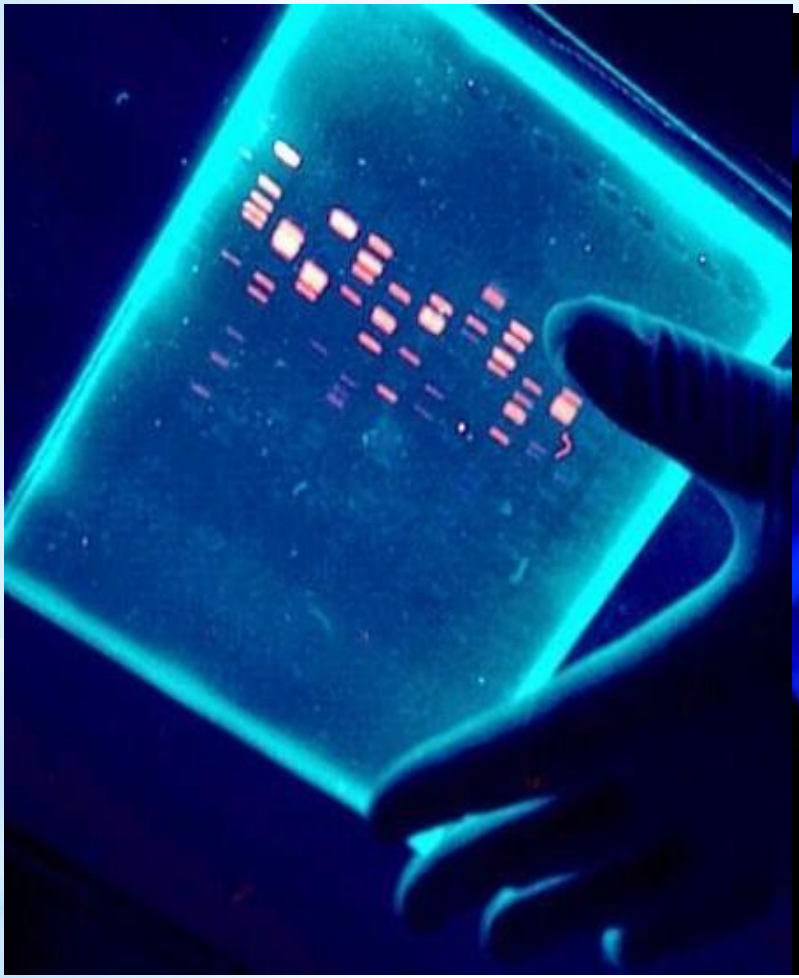
Ethidium Bromide

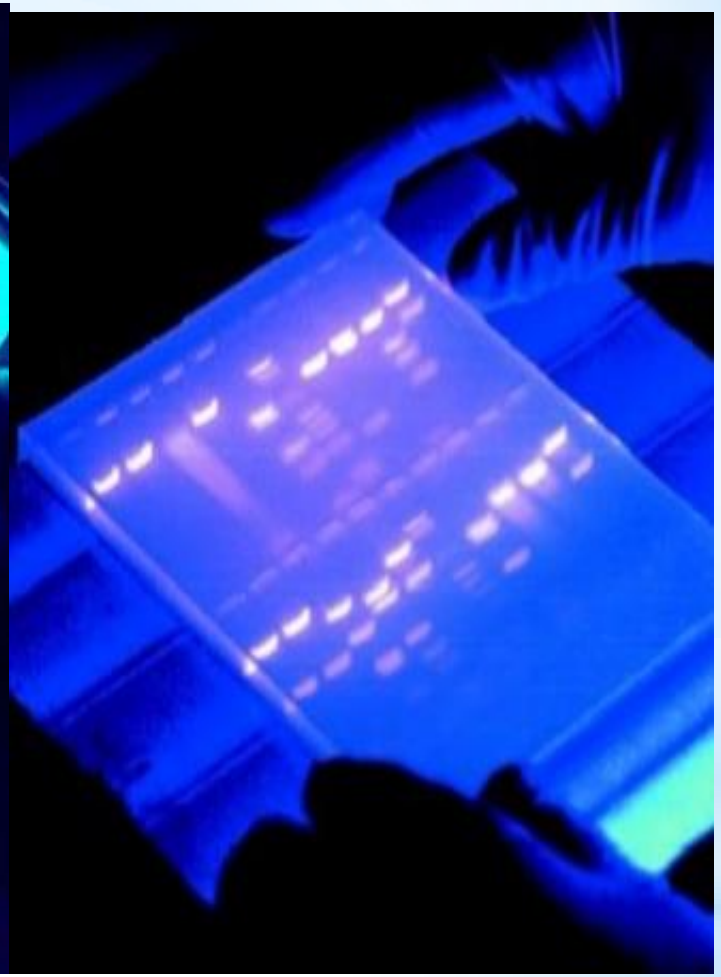

Transluminator

۶–رنگ‌آمیزی Staining

پس از مرحله فوق،ماکرومولکول تفکیک شده بر روی ژل را بایستی رنگ‌آمیزی کرد که این عمل به صورت اختصاصی و برحسب نوع ماکرومولکول با مواد رنگی خاصی صورت می‌گیرد. رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها توسط ماده رنگی کوماسی بلو یا کوماسی آبی انجام می‌شود که پروتئین‌ها را به رنگ آبی در می‌آورد و رنگ‌آمیزی DNAو RNA توسط ماده‌ای به نام اتیدیوم بروماید صورت می‌گیرد. اتیدیوم بروماید بسیار سمی و خطرناک است و یک ماده موتاژن یا جهش زا می‌باشد.

DNAرنگ شده با اتیدیوم بروماید تحت تأثیر امواج ماوراءبنفش در دستگاه اشکارساز یاترانس لومیناتور به رنگ نارنجی براق دیده می‌شود.

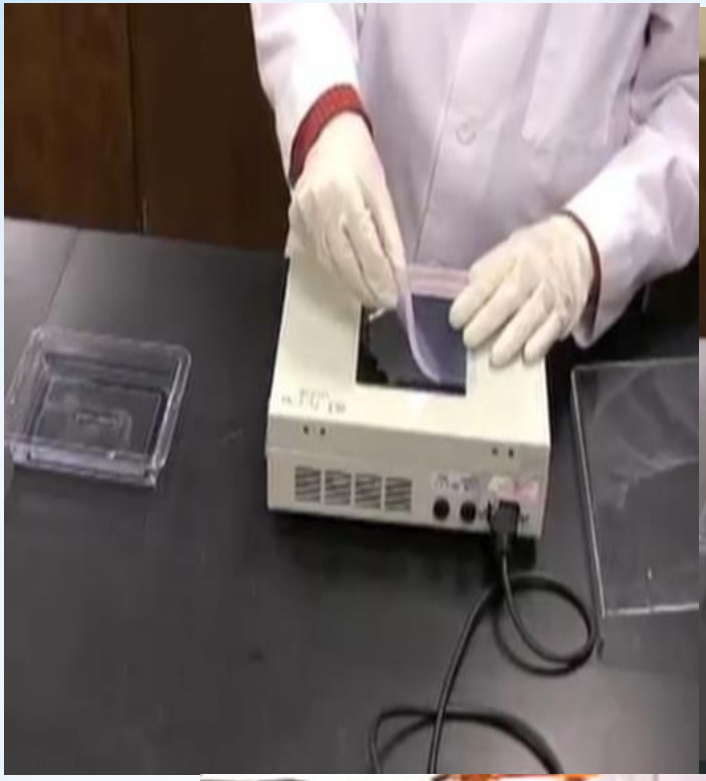


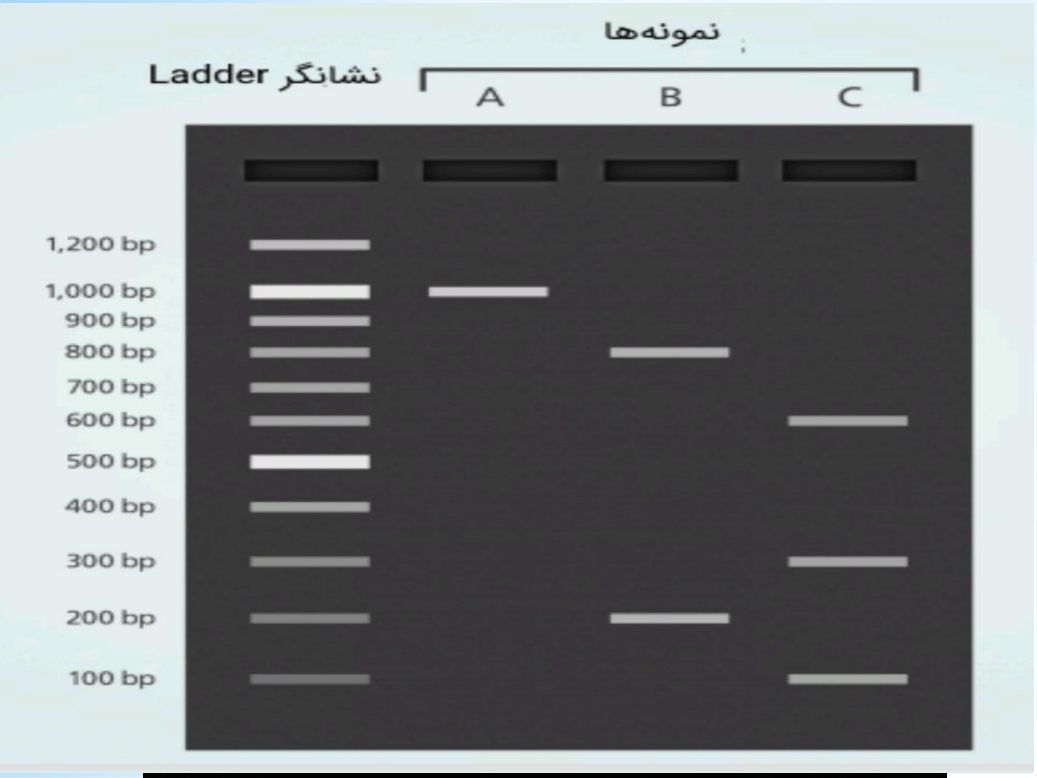


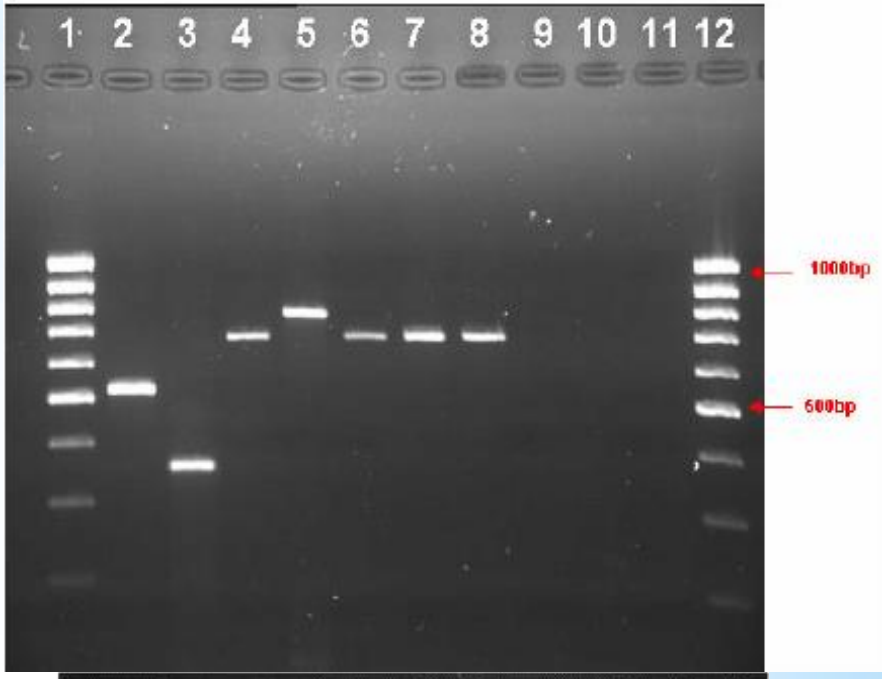
۷. عکسبرداری Photography

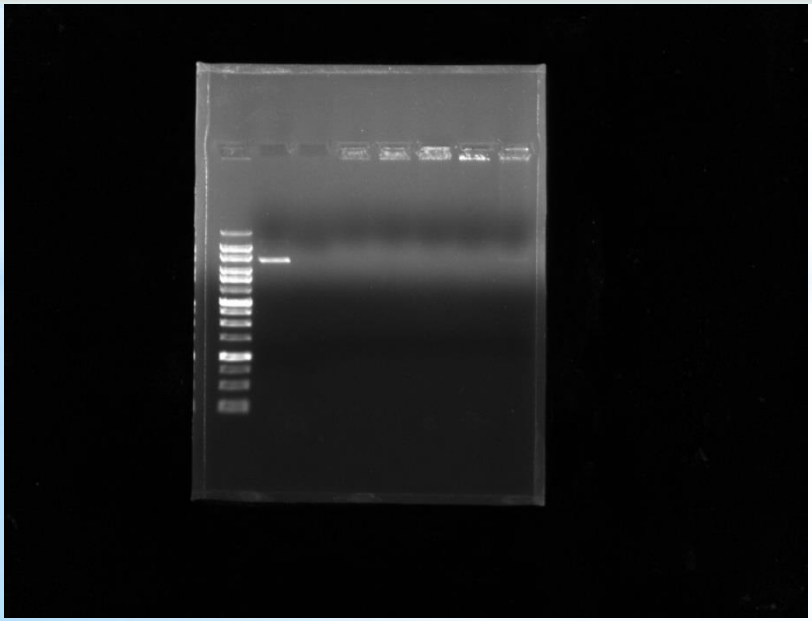
در پایان جهت ثبت و انتشار نتایج حاصل از انجام الکتروفورز ماکرومولکول می توان از ان توسط دستگاه ژل داک یا Gel Documentation عکسبرداری نمود.

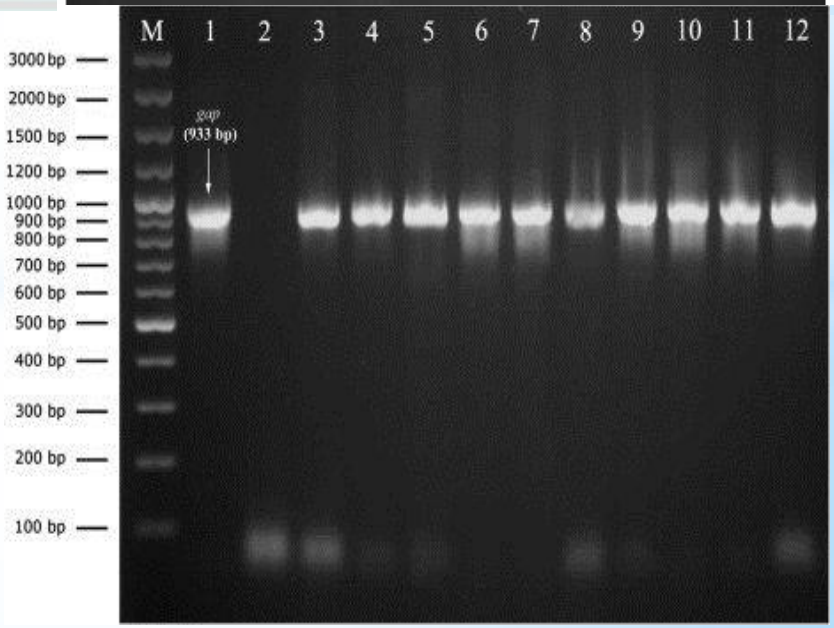
Gel documentation



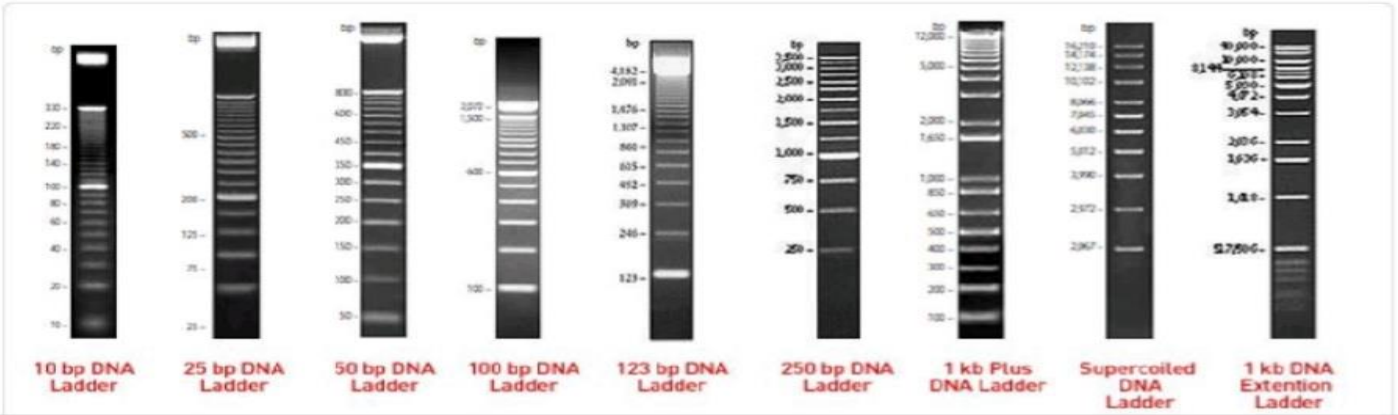

نمونه‌ها
نشانگر Ladder
A
B
C
1,200 bp
1,000 bp
900 bp
800 bp
700 bp
600 bp
500 bp
400 bp
300 bp
200 bp
100 bp


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
1000bp
600bp

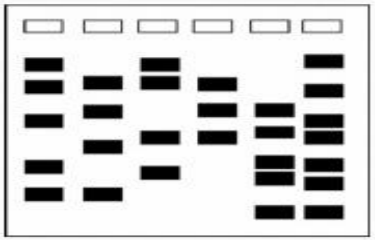


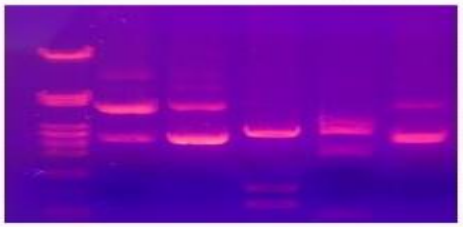

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
3000 bp
2000 bp
1500 bp
1200 bp
1000 bp
900 bp
800 bp
700 bp
600 bp
500 bp
400 bp
300 bp
200 bp
100 bp
gap
(933 bp)

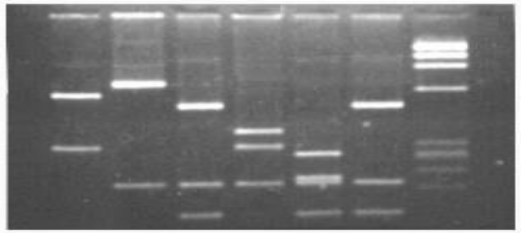
Molecular-weight size Ladder



- Smaller pieces of DNA travel farther than Larger pieces of DNA







End result!

الکتروفورز هوشمند

امروزه الکتروفورز هوشمند نیز اختراع و طراحی شد که قادر است پس از رویت باند های آبی رنگ در محل خاص خود تماس تلفنی با کاربر برقرار کرده و دستور خاموش شدن دستگاه را بصورت تلفنی دریافت کند و همچنین بطور هوشمند از طریق سیستم پمپینگ بافر را توسط cooler(خنک کننده)خنک کرده و ضمن کنترل دما ان را در حد مطلوب نگه دارد تا افزایش دما به ماکرومولکول آسیب نرساند و سبب تغییر شکل یا تخریب آن نشود و احیاتا موارد بحرانی و خاص و غیر منتظره را نیز اطلاع می دهد.که از مزیت های استفاده از الکتروفورز هوشمند است.

مواد و وسایل مورد نیاز

DNA استخراج شده از بافت خون انسان

پودر آگارز

بافر بارگذاری یا لودینگ بافر

دستگاه الکتروفورز افقی

سمپلر یا میکروپی پت و سر سمپلر

دستگاه ترانس لومیناتور یا اشکارساز و دستگاه ژل داک

شعله یا ماکروفر

اتیدیوم‌برماید

منبع تغذیه

بافرTBE

چسب کاغذی

قیچی

دستکش غیرقابل نفوذ

ترازو

ارلن یا بشر

روش کار

در این جلسه جهت آنالیز و الکتروفورز DNA ژنومی خون انسان، موارد زیر را انجام دهید:

۱-ابتدا بایستی با حرارت دادن مقدار مشخصی از پودر آگارز (۱گرم) در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر TBE، ژل را تهیه کنید تا زمانی که کاملاً شفاف و یک دست شود.ژل بدست امده در این حالت ۱ درصد می باشد.

۲-سپس سینی ژل را اگر تیغه عایق نداشت از دو طرف با نوار چسب کاغذی مسدود کرده و شانه را به طور مناسب جهت ساخت چاهک‌ها در یک انتهای سینی ژل قرار دهید. باید دقت شود شانه به کف سینی برخورد نکند و حداقل ۱ میلیمتر از آن بالاتر باشد. چون در غیر این صورت به جای چاهک در ژل سوراخ ایجاد می‌شود و نمونه هنگام لود شدن از طرف دیگر ژل خارج می‌شود و وارد تانک الکتروفورز می‌شود.

۳- سینی را برروی یک سطح صاف قرار داده و ژل مذاب را در سینی بریزید و صبر کنید تا در دمای محیط منعقد شود. سپس به آرامی و با دقت شانه را به طور عمودی از ژل خارج کنید تا دیواره بین چاهک‌ها خراب نشود. سینی ژل را از جهتی در تانک الکتروفورز قرار دهید که چاهک ها که در واقع محل لود کردن ماکرومولکولها می باشند نزدیک قطب منفی قرار بگیرند، سپس بافر را در تانک روی ژل بریزید بنحوی که کاملا روی ژل را بپوشاند.

۴-توسط سمپلر DNA را با مقدار مشخصی لودینگ بافر یا بافر بارگذاری ترکیب و در چاهک‌ها لود کنید.

۵-سپس الکترود ها یا قطب های مثبت و منفی تانک را به طور صحیح به دستگاه منبع تغذیه وصل کنید. ولتاژ و آمپراژ لازم را تنظیم کنید.دقت شود ولتاژ مناسب جهت الکتروفورز DNA و RNA بین ۷۰-۴۰ ونهایتا ۱۰۰ ولت و برای پروتئین‌ها بین ۱۵۰-۱۰۰ ولت است. در حین انجام الکتروفورز اگر ولتاژ زیاد باشد حتماً بایستی تانک را خنک نمود، چون گرم‌شدن توسط جریان الکتریسیته ممکن است ژل را ذوب کند. پس از رسیدن ماده رنگی به دو سوم طول ژل جریان الکتریکی را قطع کنید.

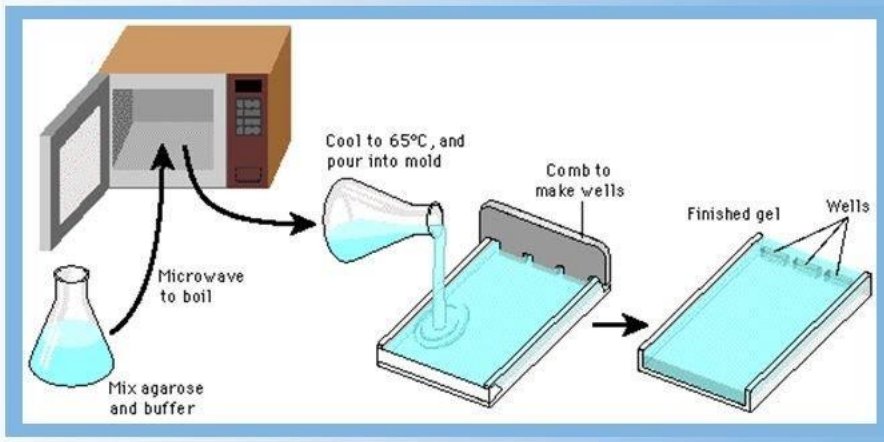
۶- ژل حاوی DNAرا جهت رنگ‌آمیزی DNAبا مقدار مشخصی اتیدیوم برماید به مدت حداقل ۲۰ دقیقه ترکیب کرده و سپس ژل را در اتاق تاریک بر روی دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده کنید.
در قسمت‌هایی از ژل که DNAوجود دارد تحت تاثیر امواج ماوراء بنفش نارنجی براق بنظر میرسد.

مقدار R_f را برای هر باند DNA با خط‌کش اندازه گیری کنید. این مقدار برای هر ماکرومولکول منحصربفرد و خاص همان ماکرومولکول می باشد و همیشه از واحد یا از عدد یک کمتر می باشد.

$$R_f = \frac{\text{distance of macromolecules from beginning}}{\text{distance of color object from beginning}}$$

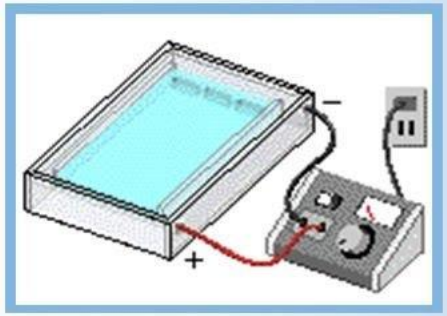
Agarose Gel Electrophoresis

Step 1: Making the Gel



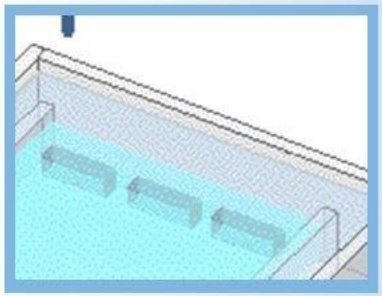
A common material used for gel electrophoresis of DNA is agarose. Agarose gels are made by first boiling a mixture of powdered agarose and buffer. When the mixture is cooled to about 65C, the solution is poured into a gel mold. When further cooled to room temperature, the agarose solidifies to produce the gel with indentations called wells.

Step 2: Setting up the Apparatus



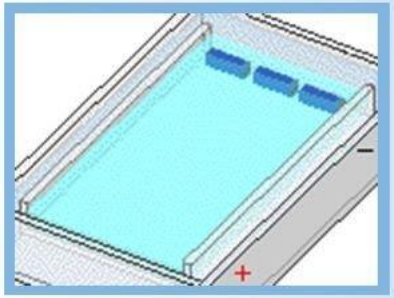
The agarose gel is placed in an electrophoresis apparatus and buffer is added to cover the gel.

Step 3: Loading DNA into the Gel



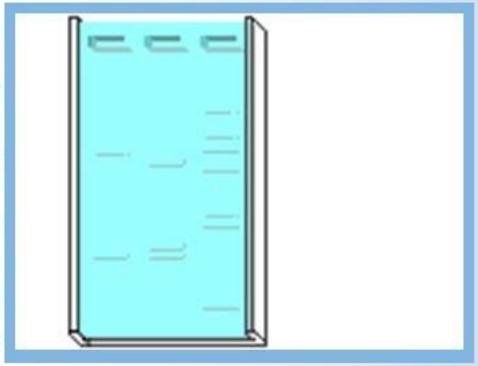
DNA is loaded into the wells using a micropipettor. Each DNA sample has tracking dyes added to it (usually blue) and either sucrose or glycerol to make the solution dense and "sink" into the well.

Step 4: Movement of DNA Fragments



After the wells are filled, the power supply is turned on and the DNA moves towards the + pole. At this stage the DNA band(s) cannot be seen, but the tracking dye (dark blue) allows the progress of the electrophoresis to be followed. The smallest DNA fragments typically follow the blue dye down the gel.

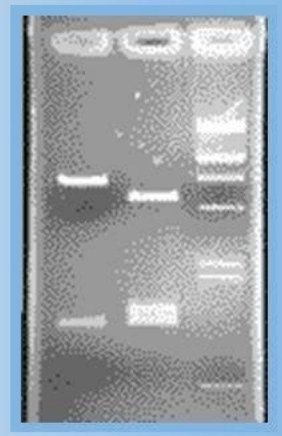
Step 5: Staining the DNA Bands



The DNA is visualized by staining, for example with ethidium bromide (EtBr), and then destaining in water. The EtBr binds to the DNA and makes it fluoresce orange under UV light.

Step 6: Photographing the Results

A photograph of the results is taken and used for analysis and for a permanent record of the experiment.



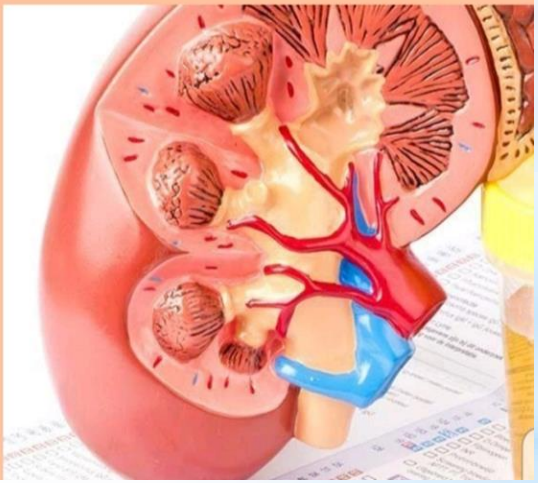
برخی از کاربرد های الکتروفورز
کاربردهای بالینی

الکتروفورسیس الکتروفورز سرم خون

در آزمایشات تشخیصی پزشکی و بالینی تشخیص برخی از آنزیم ها یا پروتیینها و وجود یا عدم وجود آنها در سرم خون از جمله فاکتور های بسیار مهمی است که توسط الکتروفورز شناسایی می شوند و بیانگر صدمات مغزی،انفارکتوس (صدمات قلبی)،دیستروفی عضلانی ویا بیماری های کبدی است.

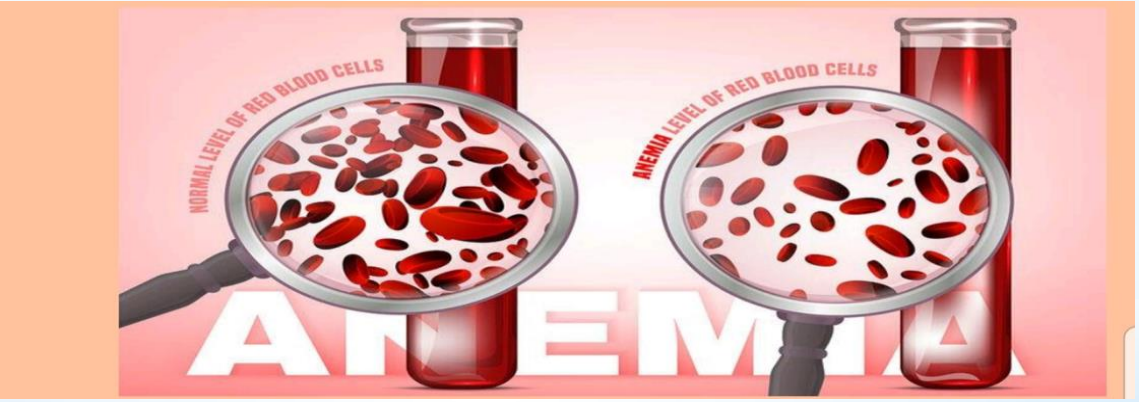
الکتروفورز پروتینهای ادرار

در بیماری های اتوایمنیون که سیستم ایمنی درگیر می شود مانند بیماری های کبدی، کلیوی و وجود التهابات حاد و مزمن الکتروفورز پروتیینهای ادرار توسط پزشک درخواست می شود.



تشخیص انواع کم خونی و الکتروفورز هموگلوبین خون

هموگلوبین A بیشترین هموگلوبین در افراد بالغ و سالم است.در بیماری های تالاسمی و کم خونی داسی شکل هموگلوبین نوع A کاهش می یابد.



کاربردهای دیگر الکتروفورز

امروزه الکتروفورز از مرز آزمایشگاه های علوم پایه،مهندسی ژنتیک و تشخیص طبی و پزشکی قانونی فراتر رفته و به عنوان شاهد و یکی از مهمترین ادلّه برای وکلا، قضات، هیئت منصفه در امور قضایی نیز محسوب می شود.برای مثال در موارد تعیین هویت و تعیین والدین و تشخیص قرابت های خانوادگی کاربرد بسیار زیادی در علوم ژنتیک پیدا کرده است.