



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

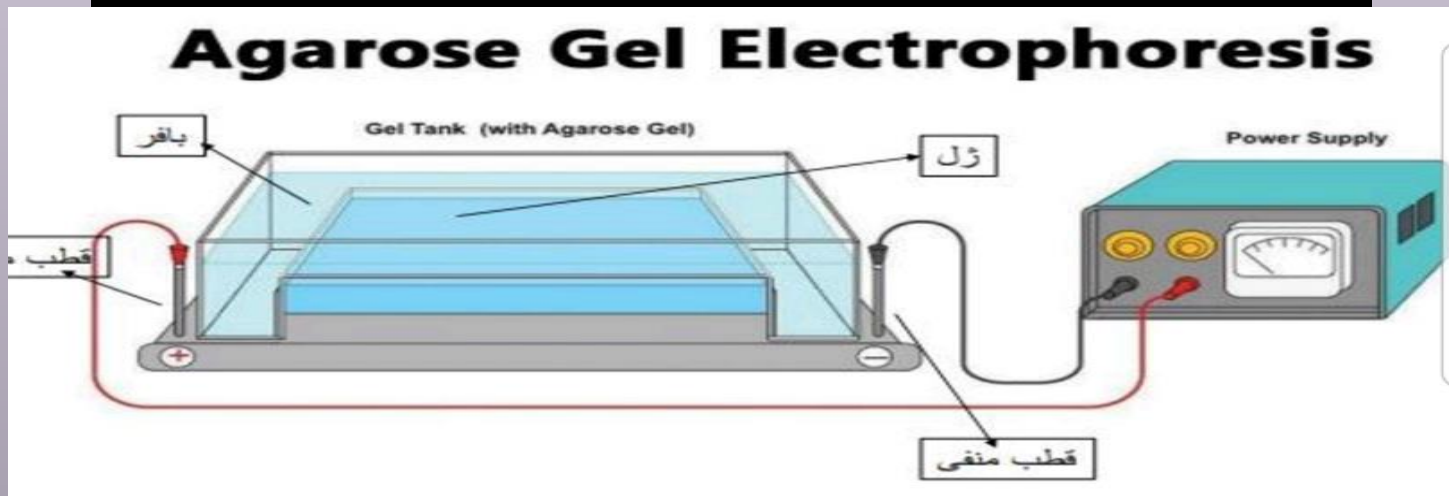
عنوان

آشنایی با اصول الکتروفورز و
جداسازی ماکرومولکولها
یا غربالگری مولکولی

اهداف

آشنایی با اصول الکتروفورز ژل آگارز
الکتروفورز افقی و جداسازی دی ان ای ژنومی خون انسان
ارزیابی کیفیت دی ان ای استخراج شده
آشنایی با اهداف گسترده الکتروفورز

Agarose Gel Electrophoresis



مفهوم الکتروفورز

(حرکت) Phoresis (الکتریکی) Electro

الکتروفورز در حقیقت نوعی کروماتوگرافی است که جهشی بزرگ در توانایی جداسازی ماکرومولکولها به خصوص پروتئینها و دیانای به وجود آورد. جداسازی با این روش از هر نوع کروماتوگرافی بهتر صورت میگیرد. به این معنا که ماکرومولکولها 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 در این میدان حرکت کرده و از هم تفکیک میشوند.

الکتروفورز ژل آگارز یک روش آزمایشگاهی است که برای جداسازی مولکولهای دیانای با توجه به اندازه، وزن مولکولی و ساختمان فضایی آنها در یک میدان الکتریکی استفاده میشود. در این آزمایش، این تکنیک برای بررسی کیفیت و اندازه مولکولهای DNA استخراج شده مورد استفاده قرار میگیرد.

این تکنیک‌های مهم و پرکاربرد در زیست‌شناسی مولکولی به‌طور ویژه برای جداسازی، تحلیل و شناسایی مولکول‌های DNA، RNA و پروتئین‌ها استفاده می‌شود. این روش بر اساس حرکت ذرات باردار در میدان الکتریکی عمل می‌کند، جایی که مولکول‌ها بسته به شکل، اندازه و بار خود در ژل آگارز از یکدیگر جدا می‌شوند. از آنجایی که DNA یک مولکول باردار است، هنگامی که آن را در یک ژل آگارز قرار داده و تحت میدان الکتریکی قرار می‌دهیم، DNA به سمت قطب مثبت حرکت می‌کند. سرعت این حرکت بستگی به اندازه مولکول دارد؛ مولکول‌های کوچک‌تر سریع‌تر حرکت می‌کنند در حالی که مولکول‌های بزرگ‌تر کندتر حرکت می‌کنند.

در این آزمایش، هدف اصلی بررسی نحوه انجام الکتروفورز ژل آگارز پس از استخراج DNA است تا بتوان به‌طور دقیق کیفیت و کمیت DNA استخراج شده را ارزیابی کرد. استخراج DNA از نمونه‌های مختلف، به‌ویژه از نمونه‌های زیستی مانند خون یا بافت‌های مختلف گیاهی، جانوری و باکتریایی، اولین گام در اکثر آزمایش‌های مولکولی است. بنابراین، ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده برای اطمینان از صحت نتایج آزمایش‌های بعدی ضروری است.

انواع الکتروفورز:

الکتروفورز می‌تواند به صورت افقی یا عمودی انجام شود، که هر کدام ویژگی‌ها و کاربردهای خاص خود را دارند.

1. الکتروفورز افقی

الکتروفورز افقی یکی از روش‌های متداول در جداسازی مولکول‌های DNA و RNA است که بیشتر برای آزمایش‌های مربوط به شناسایی و تحلیل دی‌ان‌ای کاربرد دارد. در این روش، ژل به صورت افقی در محفظه الکتروفورز قرار می‌گیرد و بارگذاری نمونه‌ها در چاهک‌هایی که در یک طرف ژل قرار دارند، انجام می‌شود. سپس یک میدان الکتریکی ایجاد می‌شود که باعث حرکت مولکول‌ها به سمت قطب مثبت می‌شود. در این فرآیند، مولکول‌های کوچک‌تر سریع‌تر حرکت کرده و مولکول‌های بزرگ‌تر کندتر حرکت می‌کنند.

سهولت در مشاهده نتایج: باندهای دی‌ان‌ای به طور معمول به صورت عمودی در ژل در حال حرکت هستند و پس از اتمام الکتروفورز به راحتی می‌توان آنها را زیر نور UV مشاهده کرد و برای جداسازی قطعات DNA و RNA بزرگتر از 500 bp به کار می‌رود.

ویژگی‌های الکتروفورز افقی:

استفاده گسترده در جداساز DNA: این روش بیشتر برای جداسازی DNA در آزمایشاتی مانند بررسی طول اندازه قطعات و تجزیه و تحلیل توالی‌ها، استفاده می‌شود.

راحتی در استفاده: در الکتروفورز افقی، ژل معمولاً در یک محفظه مستطیلی شکل قرار می‌گیرد و بارگذاری نمونه‌ها در چاهک‌ها به راحتی انجام می‌شود.

سهولت در مشاهده نتایج: باندهای DNA به‌طور معمول به‌صورت عمودی در ژل در حال حرکت هستند و پس از اتمام الکتروفورز به راحتی می‌توان آنها را زیر نور UV مشاهده کرد.

2. الکتروفورز عمودی

الکتروفورز عمودی بیشتر برای جداسازی پروتئین‌ها یا و در برخی موارد برای دی‌ان‌ای با اندازه‌های خاص مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش، ژل به صورت عمودی در محفظه الکتروفورز قرار می‌گیرد و نمونه‌ها از بالا به پایین وارد می‌شوند. مشابه با الکتروفورز افقی، یک میدان الکتریکی اعمال می‌شود که باعث حرکت مولکول‌ها به سمت قطب مثبت می‌شود. این روش برای جداسازی مولکول‌هایی که نیاز به دقت بالاتر دارند و بیشتر جهت جداسازی آنزیم‌ها و پروتئین‌های غیر فعال و قطعات کوچکتر از ۵۰۰ زوج باز دی‌ان‌ای بکار می‌رود.

ویژگی‌های الکتروفورز عمودی:

کاربرد: الکتروفورز عمودی بیشتر در جداسازی پروتئین‌ها و در مطالعات مربوط به ساختار و ویژگی‌های پروتئین‌ها استفاده می‌شود. به‌ویژه در روش‌هایی مانند SDS-PAGE برای جداسازی پروتئین‌ها کاربرد دارد.

دقت بالا: الکتروفورز عمودی معمولاً با دقت بالاتر مورد استفاده قرار می‌گیرد و برای جداسازی مولکول‌هایی با اندازه‌های دقیق‌تر مناسب است.

نیاز به تجهیزات خاص: این روش نیاز به تجهیزات و ژل‌های مخصوص دارد که برای استفاده در الکتروفورز عمودی طراحی شده‌اند.

تفاوت‌های کلیدی:

در الکتروفورز افقی، مولکول‌ها از چاهک‌های جانبی به سمت قطب مثبت حرکت می‌کنند، در حالی که در الکتروفورز عمودی، حرکت مولکول‌ها از بالای ژل به پایین آن است.

الکتروفورز افقی بیشتر برای جداسازی دی‌ان‌ای و قطعات بزرگتر از ۵۰۰ زوج باز استفاده می‌شود، در حالی که الکتروفورز عمودی بیشتر در تحقیقات پروتئینی و قطعات دی‌ان‌ای کوچکتر از ۵۰۰ زوج باز و برخی کاربردهای خاص در زیست‌شناسی مولکولی به‌کار می‌رود.

محفظه‌های افقی معمولاً بزرگتر هستند و امکان بارگذاری تعداد بیشتری نمونه را فراهم می‌کنند و ژل ضخیم‌تر است در حالی که در الکتروفورز عمودی، ژل‌ها معمولاً نازک‌تر و هستند.

در نهایت، انتخاب بین الکتروفورز افقی و عمودی بستگی به نوع مولکول‌هایی دارد که قرار است جداسازی شوند.

انواع ژل

1-ژل پلی آکریل آمید

این ماده نوعی کربوهیدرات است که در شرایط خاص و مناسب به حالت پلیمریزه و ژله مانند در می آید. این ماده تا زمانی که پلیمریزه نشده و به حالت مایع است، بسیار خطرناک و جهش زا می باشد. اما وقتی به حالت ژل درآمد، بی خطر است. معمولاً ژل های عمودی جهت جداسازی پروتئین ها و آنزیم ها به کار می رود. اگر الکتروفورز با این ژل انجام شود، اصطلاحاً به آن پلی اکریلامید ژل الکتروفورسیس یا SDS PAGE می گوئیم.

2-ژل آگارز

نوعی آگار خالص و تصفیه شده با درجه خلوص بالاست و برای ژل های افقی جهت جداسازی DNA و RNA کاربرد دارد. این ترکیب پلی ساکاریدی از نوعی جلبک قرمز دریایی استخراج و خالص سازی می شود. اگر الکتروفورز با این ژل انجام شود، اصطلاحاً به آن آگارز ژل الکتروفورسیس یا AGE می گوئیم.

3- ژل نشاسته ای

به صورت هیدرولیز شده و خالص جهت جداسازی آنزیم ها و ایزوزیم ها یا فرم های مختلف یک آنزیم مصرف می شود. این ژل ها معمولاً هنگام تهیه با ضخامتی حدود ۱ سانتی متر آماده می شوند.

ژل پلی آکریلامید	ژل آگاروز
از ایجاد اتصالات عرضی پلیمر آکریلامید تهیه می شود.	از پلی ساکارید جلبک های دریایی تهیه می شود.
درون کاست عمودی شکل می گیرد.	درون کاست افقی شکل می گیرد.
سمی و خطرناک است.	غیرسمی است.
مولکول های کوچک را از هم جدا می کند.	مولکول های بزرگ را از هم جدا می کند.
برای جداسازی DNA و پروتئین ها مناسب است.	برای جداسازی DNA مناسب است.
دارای منافذ کوچک است.	دارای منافذ بزرگ است.
ساختار سخت و پیچیده دارد.	ساختار ساده 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. در جدول زیر چند نوع بافر با اسیدیته مشخص آورده شده است.

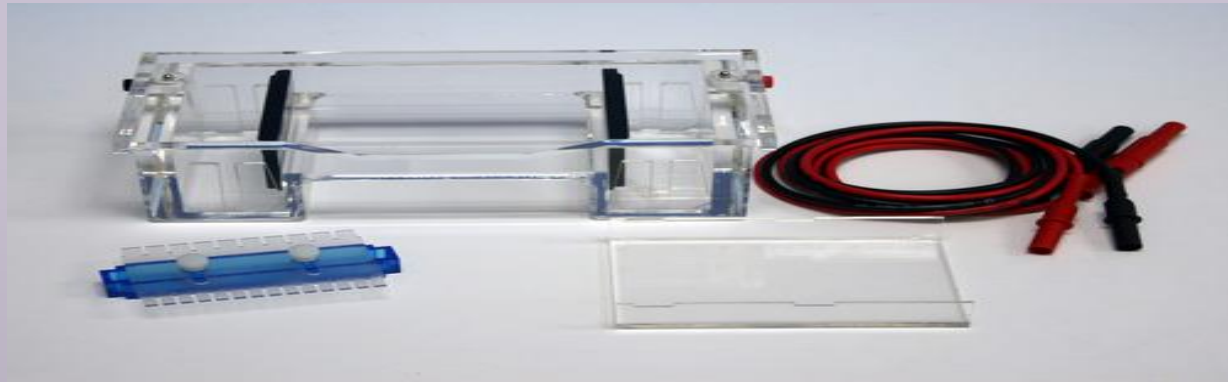
نوع بافر	pH
Phosphate Buffer	7.0
Tris-Borate-EDTA Buffer (TBE)	8.0
Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE)	8.0
Tris-Glycine Buffer (TG)	8.5
Tris-Citrate-EDTA Buffer (TCE)	7.0
Tris-EDTA Buffer	8.0
Tris-Maleic acid-EDTA Buffer (TME)	7.5
Lithium-Borate Buffer (LB)	8.6

قسمت‌های مختلف دستگاه الکتروفورز افقی

سیستم الکتروفورز شامل دو قسمت اصلی می‌باشد:

1- 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 از جنس ترکیبات مقاوم به اسید و ترکیبات شیمیایی می‌باشند.



اجزا دستگاه الکتروفورز

2- 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



کاربردهای الکتروفورز ژل آگارز

بررسی محصولات PCR

الکتروفورز ژل آگارز به‌طور گسترده برای تایید صحت و کیفیت محصولات PCR استفاده می‌شود. مشاهده باندهای DNA با اندازه‌های مورد انتظار نشان‌دهنده موفقیت PCR است.

جداسازی و تخلیص DNA

قطعات DNA پس از جداسازی می‌توانند از ژل استخراج شوند و برای مراحل بعدی مانند کلونینگ یا توالی‌یابی استفاده شوند.

.

تحلیل RNA

این روش برای بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده و اطمینان از عدم تخریب RNA مفید است.

بررسی تغییرات ژنتیکی

از الکتروفورز ژل آگارز می‌توان برای شناسایی تغییرات ژنتیکی استفاده کرد.

تحلیل نتایج کلونینگ

این روش برای تایید ورود پلاسمید یا ژن مورد نظر به میزبان در فرآیند کلونینگ کاربرد دارد.

الکتروفورسیس الکتروفورز سرم خون

در آزمایشات تشخیصی پزشکی و بالینی تشخیص برخی از آنزیم‌ها یا پروتئین‌ها و وجود یا عدم وجود آنها در سرم خون از جمله فاکتورهای بسیار مهمی است که توسط الکتروفورز شناسایی می‌شوند و بیانگر صدمات مغزی، انفارکتوس (صدمات قلبی)، دیستروفی عضلانی و یا بیماری‌های کبدی است.

الکتروفورز پروتئینهای ادرار

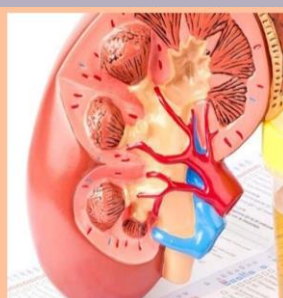
در بیماری های اتوایمنیون که سیستم ایمنی درگیر می شود مانند بیماری های کبدی، کلیوی و وجود التهابات حاد و مزمن الکتروفورز پروتئینهای ادرار توسط پزشک درخواست می شود.

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 ادله 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.



الکتروفورز هوشمند

امروزه الکتروفورز هوشمند نیز اختراع و طراحی شد که قادر است پس از رویت باند های رنگی 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 (خنک کننده) خنک کرده و ضمن کنترل دما آن را در حد مطلوب نگه دارد. تا افزایش دما به ماکرومولکول آسیب نرساند و سبب تغییر شکل یا تخریب آن نشود و احیایا 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

مواد و وسایل مورد نیاز

1. دی‌ان‌ای استخراج شده از نمونه‌های زیستی (حدود 5 تا 10 میکروگرم برای هر نمونه).

2. پودر آگارز (برای تهیه ژل 1.5% از 1.5 گرم آگارز در 100 میلی‌لیتر محلول بافر استفاده می‌شود).

3. بافر TBE 1X

4. Ethidium Bromide برای رنگ‌آمیزی دی‌ان‌ای یا رنگ سایبر سیف Syber safe

5. دستگاه الکتروفورز افقی (برای جداسازی مولکول‌ها در ژل).

6. بافر بارگذاری یا لودینگ بافر Loading buffer

7. محفظه الکتروفورز و ملزومات آن

8. منبع تغذیه Power supply

9. سیستم مشاهده UV برای مشاهده باندهای DNA یا ترنس‌لومیناتور

انواع سمپلر



انواع سر سمپلر و رک سر سمپلر



انواع لودینگ بافر



روش کار



مراحل انجام الکتروفورز

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

آماده سازی ماکرومولکول DNA

ماکرومولکول‌ها با استفاده از تکنیک‌های جداسازی اجزاء درون سلولی، طی روش‌های دقیق مربوط به هر نمونه بایستی جدا شوند. (در این آزمایش ماکرومولکول‌های DNA استخراج شده از خون انسان که قبلاً آماده شده جهت آنالیز مورد استفاده قرار می‌گیرد) 5 میکرولیتر از دی‌ان‌ای استخراج شده را با 1 میکرولیتر بافر بارگذاری X6 مخلوط کنید.

Step 1

- Place DNA into tubes

DNA can come from tissue or body fluid, such as cheek cells, blood, skin, and hair.

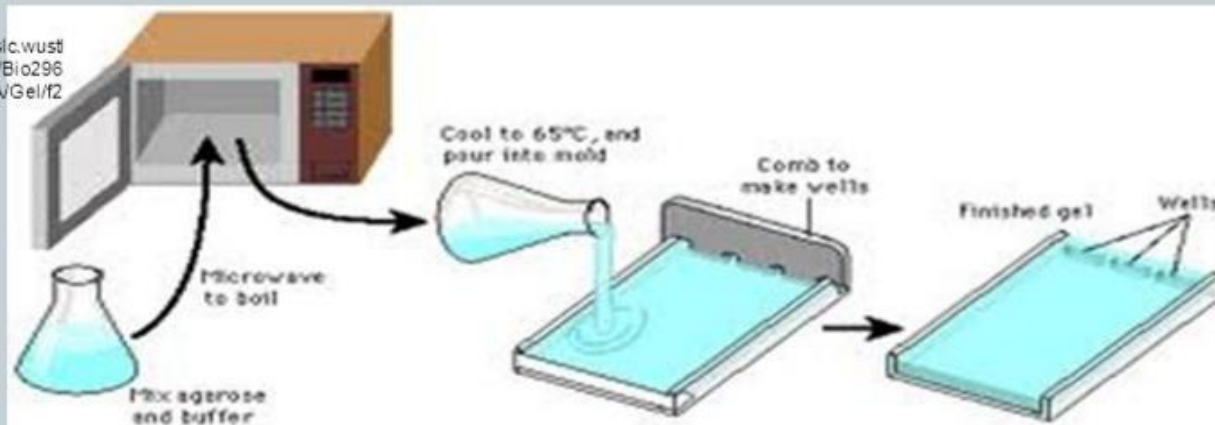


Agarose Gel Preparation:

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

<http://www.nslc.wustl.edu/courses/Bio2960/labs/07DNA/Gel/f21.gif>



1. آماده‌سازی ژل آگارز:

1.5 گرم آگارز را در 100 میلی‌لیتر بافر TBE 1X حل کنید.

پودر آگارز را در یک فلاسک مناسب ریخته و با حرارت دادن در مایکروویو (برای 30-45 ثانیه) یا بر روی هات پلیت به دمای ذوب رسانده تا محلول شفاف حاصل می‌شود.

پس از خنک شدن (حدود 50 درجه سانتیگراد)، 1.5 تا 2 μ L از محلول Ethidium Bromide یا سایر سیف را به آن اضافه کنید.

برای SYBR سیف معمولاً به ازای هر 100 میلی‌لیتر محلول آگارز، طبق دستور تولیدکننده به ژل اضافه می‌شود.

این مقدار کافی است تا رنگ‌آمیزی مناسبی برای مشاهده باندهای دی‌ان‌ای تحت تابش uv فراهم کند. اگر ژل در این مرحله توسط ماده رنگی یو وی رنگ‌آمیزی شود حالت prestain می‌باشد در اینصورت مولکولهای دی‌ان‌ای در هنگام الکتروفورز با مولکولهای رنگ باند شده و تحت نور یو وی در پایان الکتروفورز مشاهده می‌گردند.

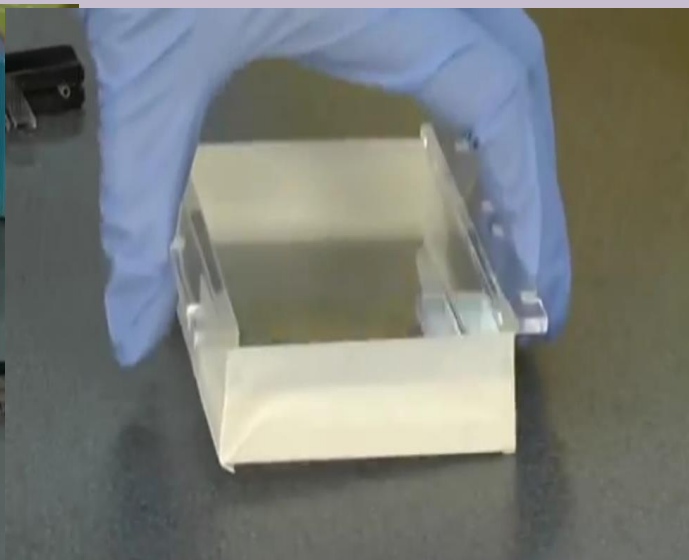
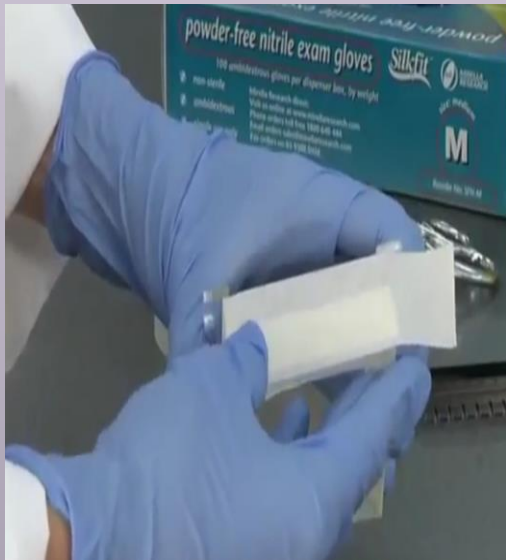
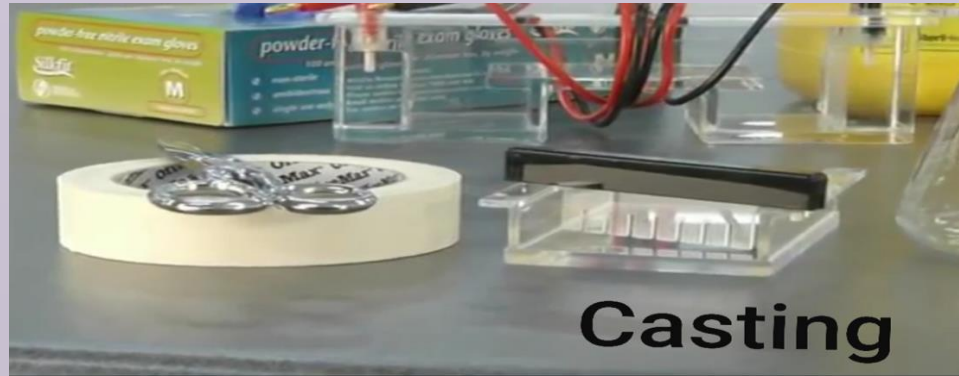
2- تهیه ژل Preparing the gel

ژل آگارز با درصد مشخص در بافر TBE تهیه 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.



3- ریختن ژل در سینی CASTING

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



4- 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 بافر بارگذاری یا لودینگ بافر 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 بروموفنل بلو (جهت رنگی کردن 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 می‌شود.

(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 محاسبه R_f یا Relative mobility factor فاکتور تحرک نسبی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

5 میکرولیتر از نمونه‌ها را در هر چاهک به آرامی بارگذاری کنید.

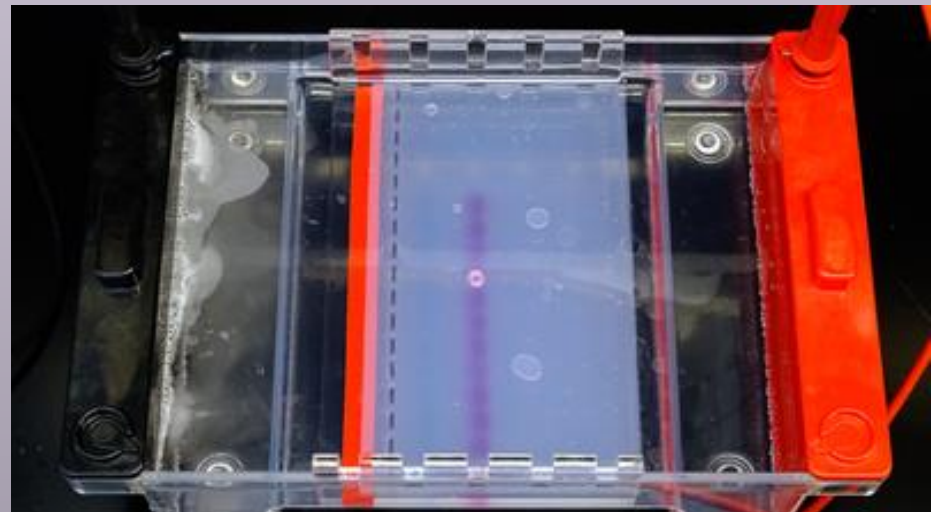
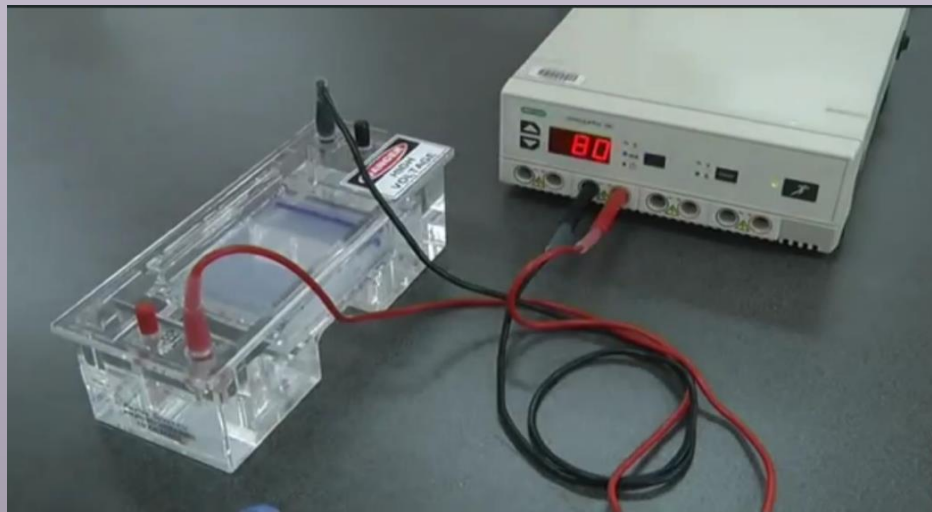


5-برقراری جریان الکتریکی و حرکت ماکرومولکول‌ها Running

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. ولتاژ دستگاه را روی 80-100 ولت تنظیم کنید.

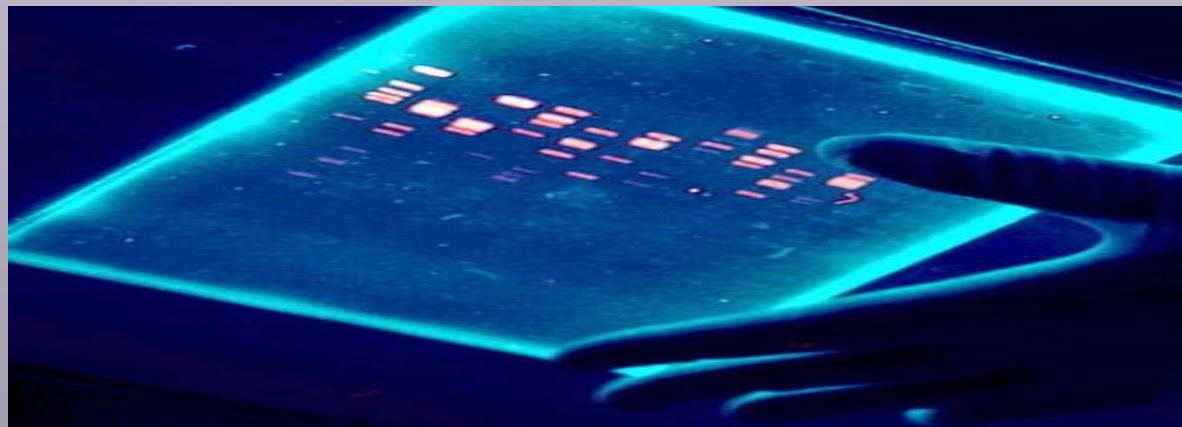
زمان الکتروفورز را برای حدود 40-45 دقیقه تنظیم کنید یا تا زمانی که رنگ‌های نشانگر موجود در بافر بارگذاری به اندازه مناسب جداسازی شوند و حدود دو سوم طول ژل را طی کنند.

در طول فرآیند، باندهای DNA در ژل شروع به حرکت از قطب منفی به جهت قطب مثبت می‌کنند.



6-رنگ آمیزی Staining

پس از مرحله فوق، ماکرومولکول تفکیک شده بر روی ژل را بایستی رنگ آمیزی کرد که این عمل به صورت اختصاصی و برحسب نوع ماکرومولکول با مواد رنگی خاصی صورت می گیرد. رنگ آمیزی پروتئین ها توسط ماده رنگی کوماسی بلو یا کوماسی آبی انجام می شود که پروتئین ها را به رنگ آبی در می آورد و رنگ آمیزی DNA و RNA توسط ماده ای به نام اتیدیوم بروماید صورت می گیرد. اگر در این مرحله رنگ آمیزی صورت گیرد حالت post stain می باشد. اتیدیوم بروماید بسیار سمی و خطرناک است و یک ماده موتاژن یا جهش زا می باشد. بجای انجام این مرحله میتوان در مرحله تهیه ژل پس از خشک شدن به آن رنگ سایبر سیف اضافه نمود که حالت pre stain می باشد. DNA رنگ شده تحت تأثیر امواج ماوراء بنفش در دستگاه اشکارساز یا ترانس لومیناتور به رنگ براق و درخشان دیده می شود.



برای رنگ آمیزی پس از الکتروفورز:

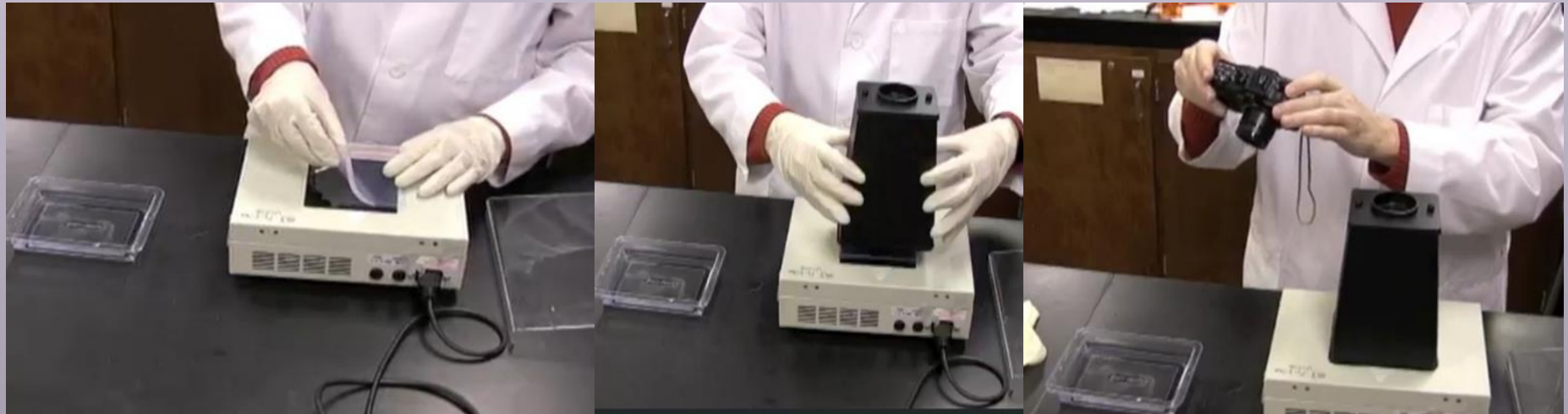
پس از الکتروفورز، ژل را به مدت 10-15 دقیقه در محلول SYBR SAFE قرار دهید. سپس ژل را تحت نور UV مشاهده نمایید.

در هر دو مورد، اتیدیوم بروماید و SYBR SAFE باید با احتیاط استفاده شوند زیرا هر دو مواد شیمیایی به نور UV حساس بوده و باید در محیط‌های ایمنی و با دستکش‌های مناسب استفاده شوند.

محلول را در ظرف مناسب بریزید و بگذارید ژل به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق سرد شود.

7. عکسبرداری Photography

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



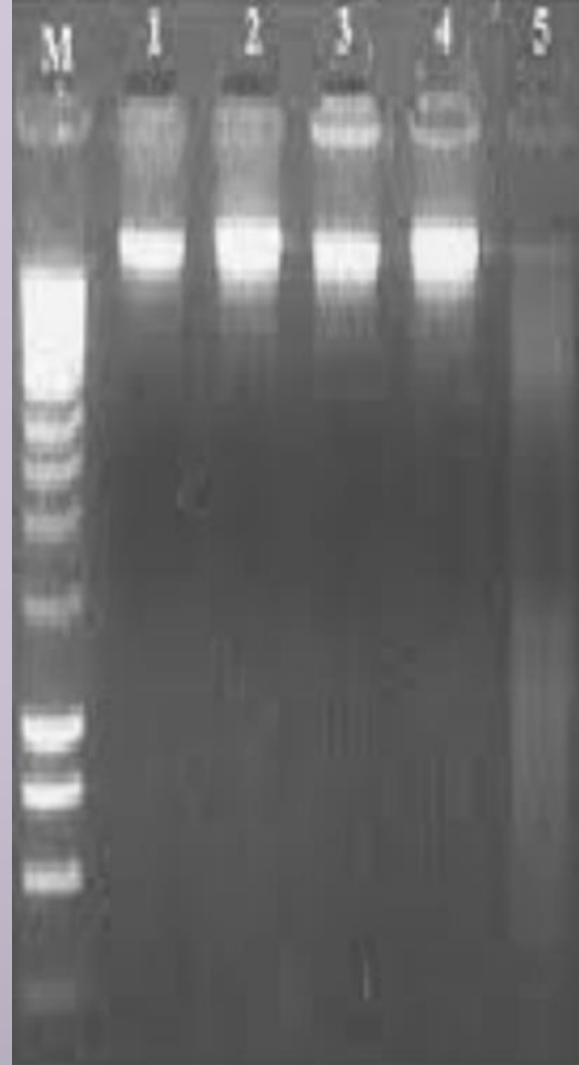
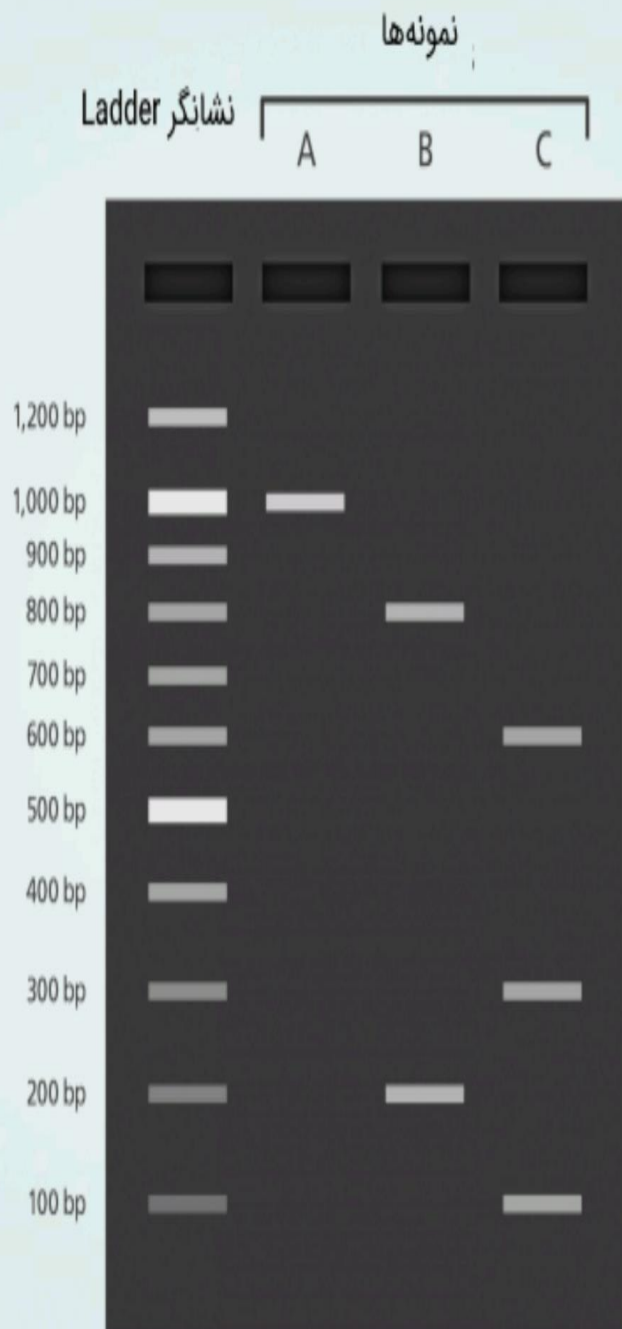
8. مشاهده نتایج:

پس از اتمام الکتروفورز، ژل را از دستگاه خارج کرده و آن را در سیستم مشاهده UV قرار دهید تا باندهای دی‌ان‌ای رنگی مشاهده شوند.

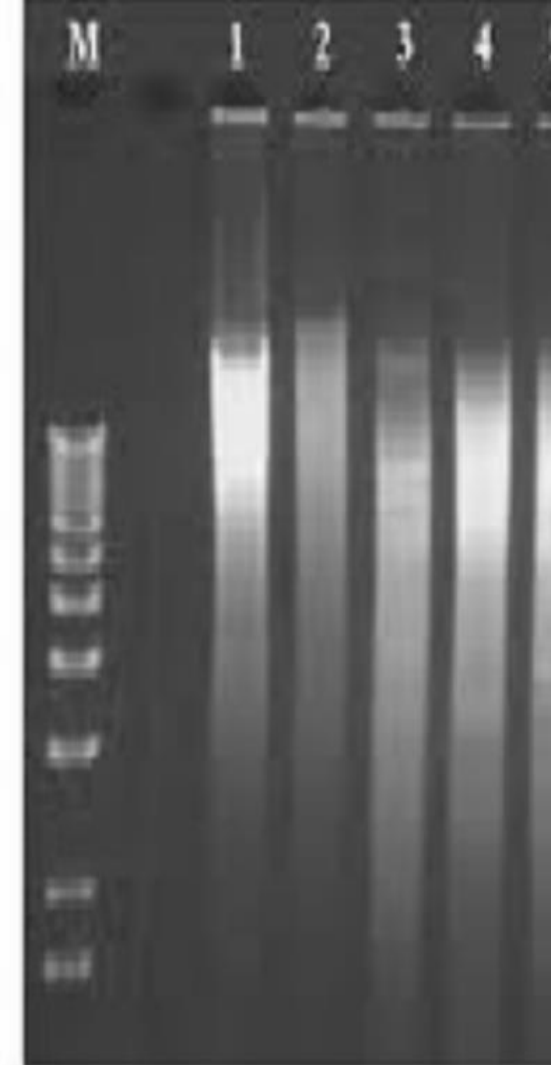
اگر باندها واضح و بر اساس اندازه قابل تشخیص باشند، نشان‌دهنده دی‌ان‌ای با کیفیت خوب است.

9. تحلیل و تفسیر نتایج

اگر باندها واضح و به طور مشخص در مکان‌های مختلف ژل قرار گرفته باشند، دی‌ان‌ای به درستی جدا شده است. باندهای کدر یا نامشخص نشان‌دهنده آلودگی یا آسیب به دی‌ان‌ای می‌باشد. دی‌ان‌ای با کیفیت خوب باید باندهای مشخص و ضخیم داشته باشد که نشان‌دهنده دی‌ان‌ای با کمیت و کیفیت مناسب است. باندهای ضعیف یا در هم نشان‌دهنده آلودگی یا مشکل در استخراج هستند. باندهای واضح و غیر مبهم نشان‌دهنده دی‌ان‌ای با کیفیت خوب هستند. اگر باندهای مختلف یا بیشتر از یک باند مشاهده شود، ممکن است RNA یا سایر ناخالصی‌ها وجود داشته باشد.



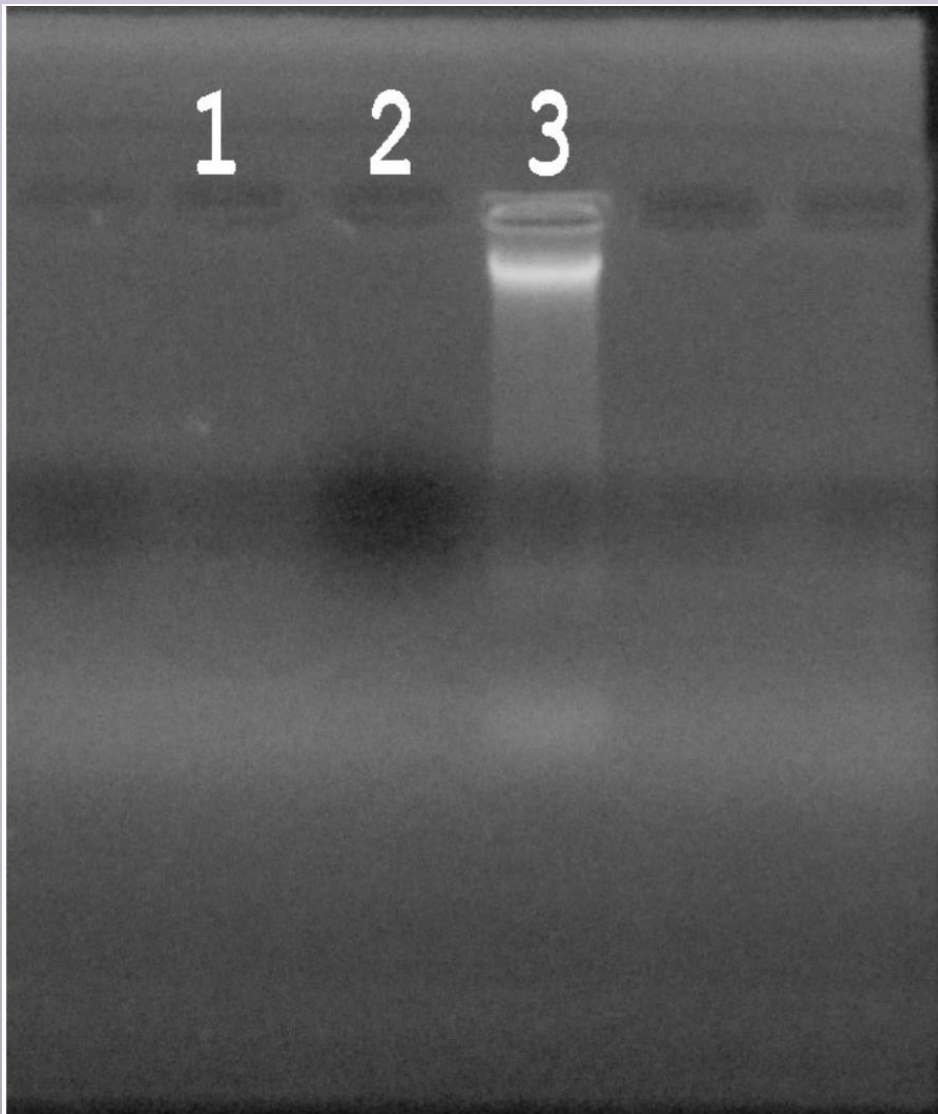
high-quality
DNA



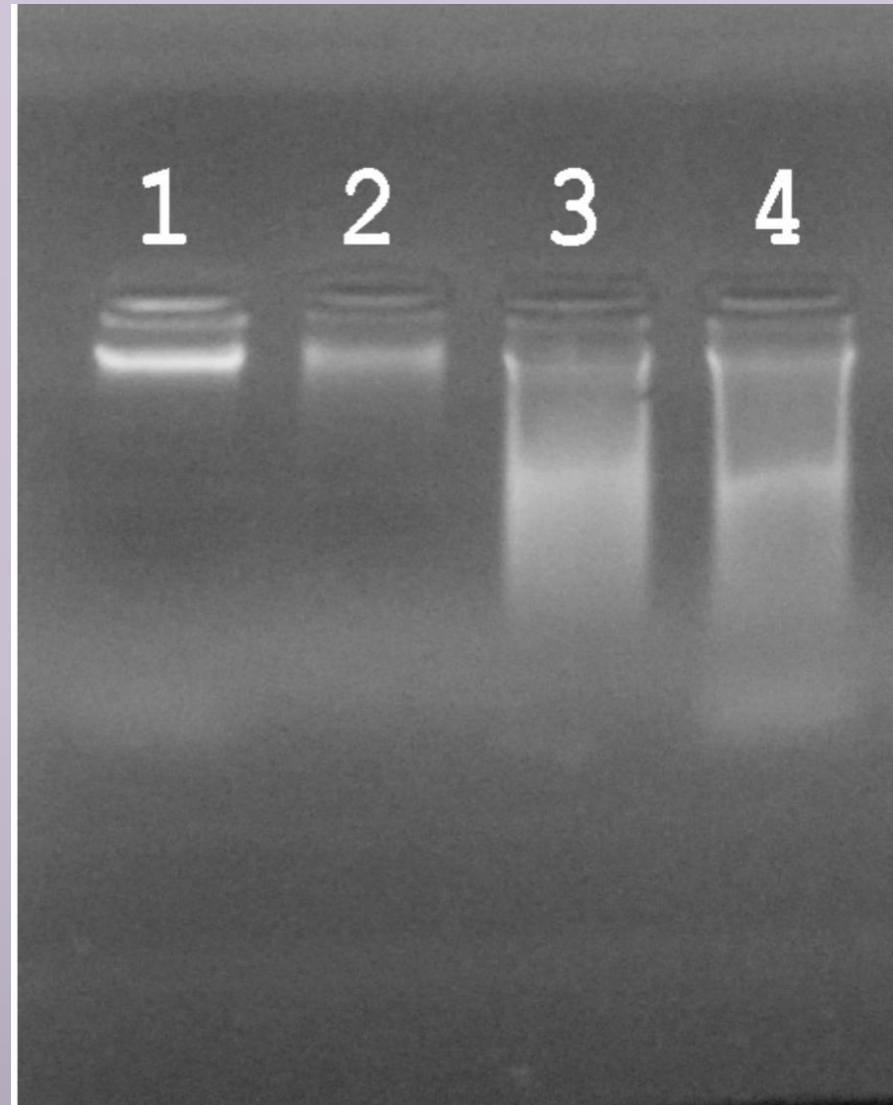
low-quality
DNA

Troubleshooting DNA

تراپلشوتینگ
استخراج DNA



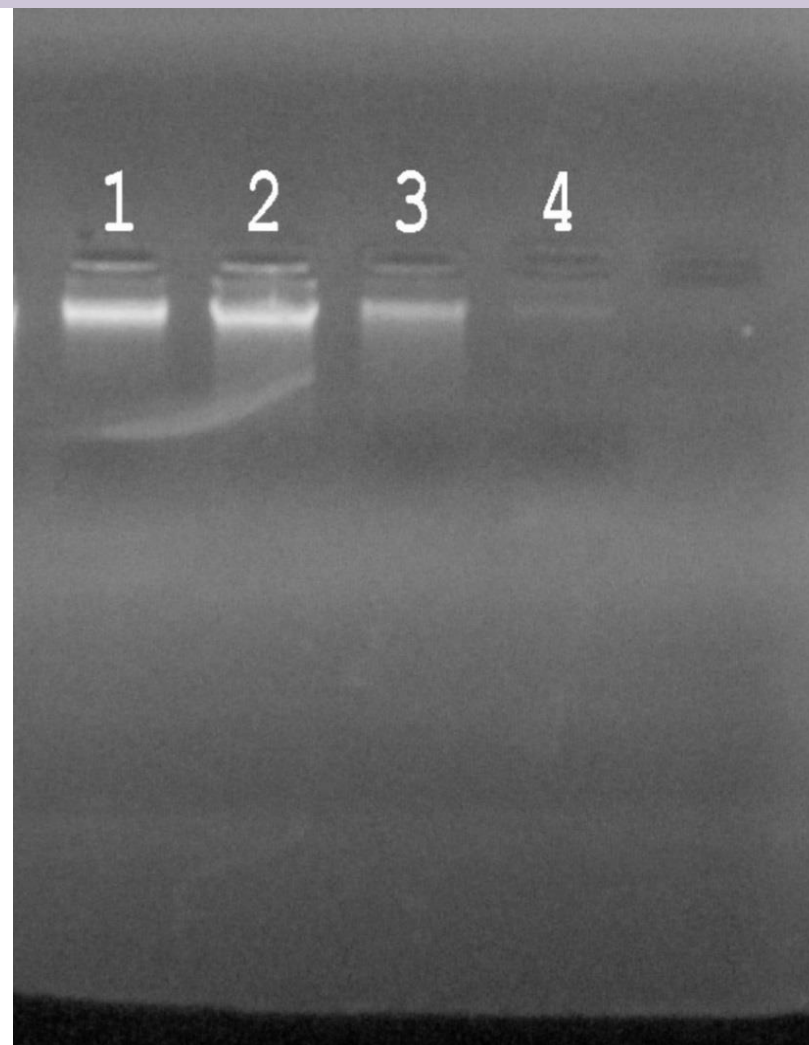
شکل ۱- در چاهک نمونه ۱ و ۲ هیچ ژنومی مشاهده نمی شود. نمونه ۳ دارای ژنوم می باشد.



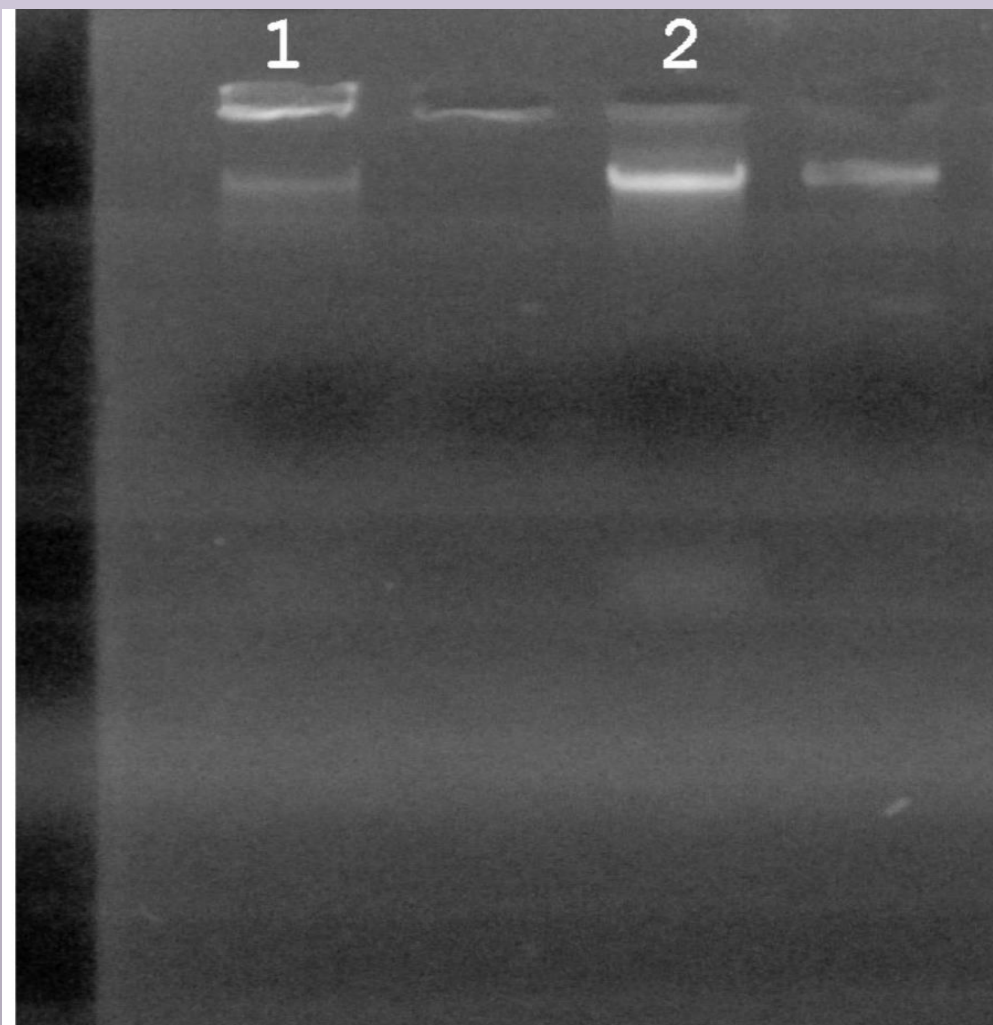
شکل ۲- در نمونه شماره ۱ و ۲ استخراج به خوبی انجام شده است. اما در نمونه ۳ و ۴ باندهای اسمیر مشاهده می شود.



شکل ۳- در صورت عمل نکردن آنزیم *RNase* باند محوی در انتهای ژل مشاهده خواهد شد.

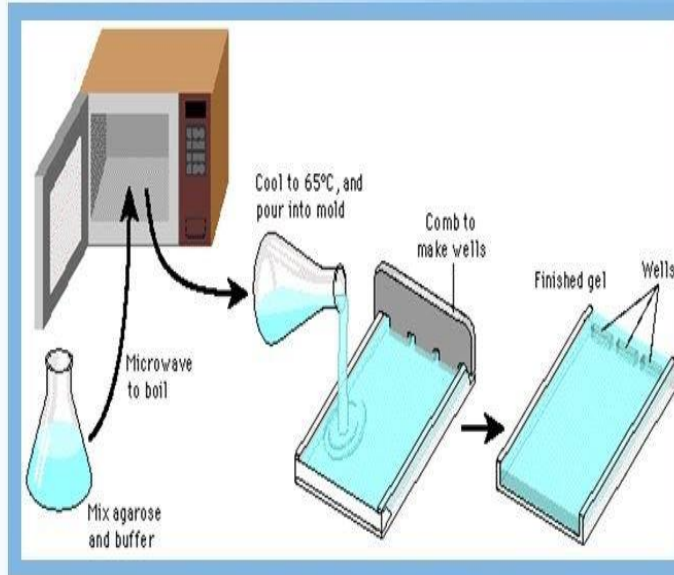


شکل ۴- نمونه استخراج ضعیف را در باند شماره ۴ م. توانید مشاهده کنید.



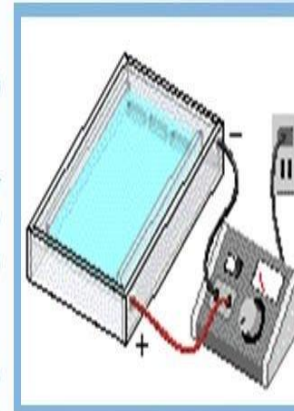
شکل ۵- همانطور که مشخص است در نمونه شماره ۱ چاهک نور UV را بازتاب داده و اصطلاحاً رنگ دارد.

Step 1: Making the Gel



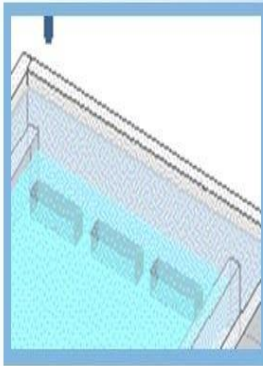
A common material used for gel electrophoresis of DNA is agarose. Agarose gels are made by first boiling a mixture of powdered agarose and buffer. When the mixture is cooled to about 65°C, the solution is poured into a gel mold. When further cooled to room temperature, the agarose solidifies to produce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

Step 2: Setting up the Apparatus



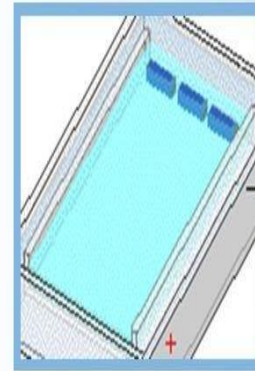
The agarose gel is placed in an electrophoresis apparatus and buffer is added to cover the gel.

Step 3: Loading DNA into the Gel



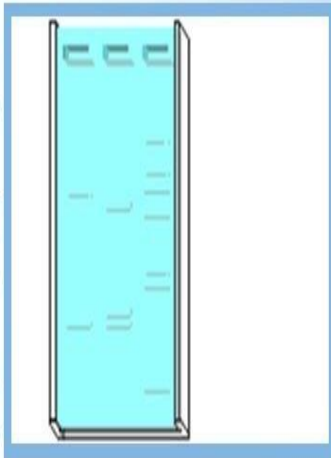
DNA is loaded into the wells using a micropipettor. Each DNA sample has tracking dyes added to it (usually blue) and either sucrose or glycerol to make the solution dense and "sink" into the well.

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.

