Archive of SID

الکتروفورز افقی پلی‌اکریل‌آمید با استفاده از چاهک‌های ژل‌آگارز

Horizontal Polyacrylamide Gel Electrophoresis by Agarose Slots

محمدحسین صفری[۱] و اصغر میرزائی اصل[۲*]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۹/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۰۶

چکیده

الکتروفورز افقی ژل‌آگارز، یکی از ابزارهای پایه در زیست‌شناسی مولکولی است. این روش آسان و سریع بوده، استفاده از آن نیاز به مهارت زیادی ندارد. یکی از معایب ژل آگارز این است که جداسازی قطعات کوچک DNA با تفاوت‌های ناچیز در حد چند جفت باز و همچنین تفکیک قطعات کوچک مولکول‌های DNA و پروتئین در این ژل به‌خوبی امکان‌پذیر نیست که به‌طور متداول در این موارد از ژل پلی‌اکریل‌آمید استفاده می‌شود. الکتروفورز عمودی ژل پلی‌اکریل‌آمید علی‌رغم مزایایی که دارد ولی روشی پیچیده، گران و زمان‌بر می‌باشد. اخیراً روشی برای الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید به‌صورت افقی معرفی شده است که ضمن داشتن مزایا نسبت به روش عمودی، نیازمند ساخت دستگاهی جدید جهت انجام عمل الکتروفورز می‌باشد. در این پژوهش از دستگاه الکتروفورز افقی ژل آگارز با اندکی تغییرات، به‌منظور انجام الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید برای قطعات DNA تکثیر شونده توسط نشانگرهای ریزماهواره‌ای استفاده شد. در این روش عمل الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید، به‌صورت افقی و با استفاده از ژل دو قسمتی آگارز و پلی‌اکریل‌آمید انجام شد. نتایج نشان داد باندهای حاصل از الکتروفورز کاملاً شفاف و واضح می‌باشند. همچنین در این روش، مشکلات تشکیل حباب در ژل و پارگی ژل، در هنگام جداسازی شیشه از ژل، وجود ندارد. دستگاه الکتروفورز معرفی شده، دو منظوره است که می‌توان از آن هم برای ژل آگارز و هم برای ژل پلی‌اکریل‌آمید استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: الکتروفورز افقی، ژل پلی‌اکریل‌آمید، ژل آگارز

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

۲. استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

*: نویسنده مسوول Email: a.mirzaie@basu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

الکتروفورز افقی آگارز یکی از ابزارهای اساسی برای زیست‌شناسی مولکولی است. ریختن آگارز مذاب در داخل سینی ژل، پلیمریزاسیون سریع و ساده بودن استفاده از آن، از مزایای استفاده از این تکنیک است. با این وجود متأسفانه پروتئین‌ها و قطعات کوچک DNA در منافذ درشت ژل آگارز به شکل مؤثری از هم جدا نمی‌شوند. رشته‌های به هم مرتبط پلی‌اکریل‌آمید، که در سال ۱۹۵۹ به‌عنوان بستری برای الکتروفورز توسط *ریموند* و *واینتراب* (Raymond and Weintraub, 1959) معرفی شد، امروزه به‌عنوان بستری طبیعی برای الکتروفورز قطعات دو رشته‌ای DNA براساس اندازه و برای الکتروفورز قطعات تک‌رشته‌ای DNA براساس اندازه و ترکیب، کاربرد دارد. در مقایسه با ژل آگارز، ژل پلی‌اکریل‌آمید دارای سه ویژگی ذیل می‌باشد؛ ۱- داشتن قدرت جداسازی که بسیار بیشتر از آگارز است، به‌طوری‌که قادر است قطعاتی با ۰/۱ درصد اختلاف طول (۱ نوکلئوتید در ۱۰۰۰ نوکلئوتید) را از هم جدا کند، ۲- پلی‌اکریل‌آمید می‌تواند مقادیر بیشتری از DNA را نسبت به آگارز در خود جای دهد. بیش از ۱۰ میکروگرم DNA را می‌توان در یک چاهک با اندازه (۱میلی‌متر در ۱ سانتی‌متر) در یک ژل معمولی پلی‌اکریل‌آمید بدون کاهش معنی‌دار وضوح به‌کار برد. ۳- DNA به‌دست آمده از احیای ژل پلی‌اکریل‌آمید را می‌توان در بسیاری از اهداف به‌کار برد. بر این اساس یک زمینه ریزتری از منافذ نظیر ژل پلی‌اکریل‌آمید برای جداسازی آن‌ها نیاز است. با توجه به این‌که پلیمریزاسیون ژل پلی‌اکریل‌آمید در حضور اکسیژن رخ نمی‌دهد، در الکتروفورز عمودی ژل پلی‌اکریل‌آمید ژل به درون دو صفحه شیشه‌ای ریخته می‌شود و با گیره بسته می‌شود تا عمل پلیمره شدن انجام شود *سامبروک* و همکاران (Sambrook *et al.*, 2001).

روش معمول الکتروفورز عمودی ژل پلی‌اکریل‌آمید به تجهیزات اختصاصی، نظیر دستگاه الکتروفورز عمودی، مواد آزمایشگاهی لازم برای تهیه ژل و موادی جهت جداسازی ژل از شیشه‌ها، نیاز دارد. در این روش صفحه متحرک (شیشه‌ای که ژل بر روی آن می‌چسبد) با الکل شسته شده، سپس با مخلوط اسیداستیک و بایند که ترکیب پروپیل متاکریلیت است، آغشته می‌گردد. صفحه ثابت نیز با الکل شسته می‌شود و با محلول ریپل تیمار می‌گردد. از مهم‌ترین مشکلات موجود در استفاده از این روش نشت ژل در هنگام تزریق ژل در بین دو سطح شیشه و همچنین ایجاد حباب در ژل می‌باشد. از طرفی در هنگام باز کردن دو سطح شیشه‌ای از هم اغلب باعث ایجاد پارگی در قسمت‌هایی از ژل می‌گردد *سامبروک* و همکاران (2001).

از آن‌جایی‌که در روش عمودی تجهیزات اختصاصی و اقلام زیادی از مواد مورد نیاز است، این روش نیازمند صرف هزینه‌های زیادی می‌باشد. از طرفی پیچیده‌بودن آن نیاز به مهارت زیادی برای موفقیت در آن است. باید توجه داشت در اغلب موارد استفاده از ژل پلی‌اکریل‌آمید تنها برای بررسی چندشکلی قطعات کوچک‌تر DNA می‌باشد که نیازی به استفاده از صفحات بزرگ شیشه‌ای برای تفکیک این قطعات ندارد.

روش الکتروفورز افقی برای اولین‌بار توسط *بریگام* و همکاران (Bridghan *et al.*,1994) ابداع شد و تاکنون روش‌های مختلفی برای الکتروفورز پلی‌اکریل‌آمید ارائه شده، یا به‌کار رفته است *مارچیلو و همکاران*، *گومز و همکاران* و *ایزو و همکاران* (Marcheylo *et al.*, 1989، Gomez *et al.*, 2008، Izzo *et al.*, 2006). در مطالعه *ایزو* و همکاران (2006) روشی برای انجام الکتروفورز نمونه‌های DNA و پروتئین بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ارائه شده است که در این روش با ساخت دستگاهی اختصاصی به‌منظور الکتروفورز افقی ژل پلی‌اکریل‌آمید انجام شده، با به‌کار بردن مواد شیمیایی ژل مورد نظر به یک سطح شیشه‌ای می‌چسبد و ادامه الکتروفورز بر روی آن انجام می‌شود. با این وجود این روش نیز نیازمند طراحی و ساخت دستگاه اختصاصی برای انجام الکتروفورز پلی‌اکریل‌آمید بوده، از طرفی نیازمند استفاده از باند سیلین برای چسباندن ژل به سطح شیشه است. در این پژوهش روشی سریع، آسان، کم‌هزینه و در عین حال کارآمد برای الکتروفورز پلی‌اکریل‌آمید با استفاده از همان تجهیزات الکتروفورز آگارز معرفی می‌گردد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور انجام الکتروفورز افقی از سینی ژل آگارز جهت ریختن ژل پلی‌اکریل‌آمید استفاده شده است. ابتدا با نوار چسب دو طرف باز سینی ژل بسته شد. سینی بر روی یک سطح افقی قرار داده شد و تعداد چهار قطعه شیشه ۲ میلی‌متری، به‌عنوان پایه، در چهار گوشه آن قرار گرفت. ابعاد سینی ژل مورد استفاده ۱۶×۱۶ سانتی‌متر بود از این رو یک قطعه شیشه با ابعاد ۱۵×۱۵ سانتی‌متر برش داده شده، به‌طور افقی بر روی چهار پایه، داخل سینی قرار گرفت. پایه‌های ۲ میلی‌متری که بین سینی ژل و شیشه بالایی قرار گرفتند، تعیین‌کننده ضخامت نهایی ژل بودند که می‌توان با ضخامت دلخواه تهیه نمود. شیشه بالایی به نحوی در داخل سینی قرار گرفت که به نوار چسب پایین ژل متصل گردید و یک سانتی‌متر با نوار چسب ابتدای ژل فاصله داشت که این فاصله یک سانتی‌متری

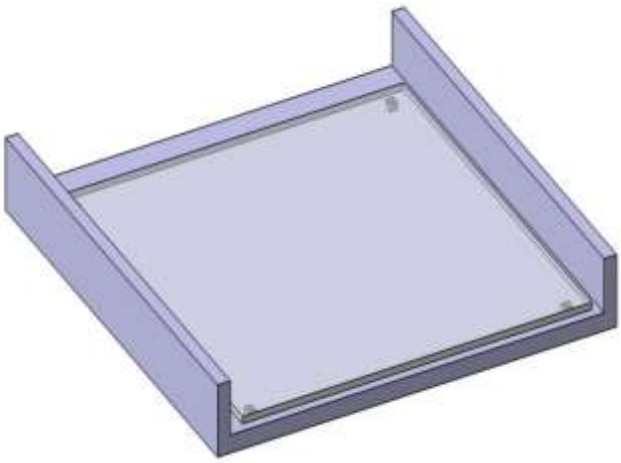
www.SID.ir

Archive of SID

محل قرارگیری شانه بود (شکل ۱). قبل از ریختن ژل یک قطعه شیشه ۱۵×۱ سانتیمتری در بالادست شیشه به‌جای شانه قرار داده شد که محل ریختن ژل آگارز پس از تهیه ژل آکریل‌آمید است. شیشه بالایی از دو طرف لبه‌های سینی ژل نیز ۰/۵ سانتی‌متر فاصله داشت که برای ریختن ژل از آن استفاده گردید. براساس ابعاد سینی، ۷۵ میلی‌لیتر ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد تهیه شد. سپس ۳۰ میکرولیتر تمد و ۷۰۰ میکرولیتر آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد به آن اضافه گردید. ژل از طریق شکاف نیم سانتی‌متری کنار شیشه با استفاده از یک قیف کوچک ریخته شد تا ژل در تمام سطح سینی پخش گردد سپس یک وزنه ۱۰۰ گرمی روی شیشه بالایی قرار داده شد.

پس از حدود ۱ ساعت ژل اکریل‌آمید آماده گردید. شیشه ۱۵×۱ سانتی‌متری از ابتدای ژل برداشته شده، شانه به‌جای آن قرار گرفت (شکل ۲ الف). مقدار کمی ژل‌آگارز ذوب شده (بسته به اندازه سینی حدوداً ۸-۴ میلی‌لیتر) در اطراف شانه ریخته و پس از ۱۵ دقیقه شانه خارج گردید (شکل ۲ ب).

مطابق روش آگارز سینی در درون تانک الکتروفورز افقی قرار گرفته و بافر TBE 1x به درون تانک ریخته شد. مقدار ۷ میکرولیتر محصول PCR حاصل از آغازگرهای SSR چغندرقند به‌همراه یک میکرولیتر بافر بارگیری مخلوط شد و در درون چاهک‌ها بارگیری شد. همچنین مقدار ۶ میکرولیتر از محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن Flowering locus control (FLC) بر روی cDNA چغندرقند نیز استفاده شد. الکتروفورز به‌مدت ۶ ساعت با ولتاژ ۸۰ ولت انجام شد. بعد از اتمام الکتروفورز و رسیدن رنگ به انتهای ژل، سینی از درون تانک خارج شده، قطعه شیشه‌ای ۱۵×۱۵ از روی ژل برداشته شد. ژل پلی‌اکریل‌آمید از درون سینی برداشته شد و در درون محلول اتیدیوم بروماید قرار گرفت. رنگ‌آمیزی به‌مدت ۱۵-۱۰ دقیقه انجام شد و پس از شستشوی سطحی با آب مقطر در درون دستگاه ژل داک تحت تابش نور UV باندها ظاهر گردید.



شکل ۱: شیشه بالایی ژل که بر روی چهار پایه ۲ میلی‌متری در گوشه‌های سینی قرار گرفته است

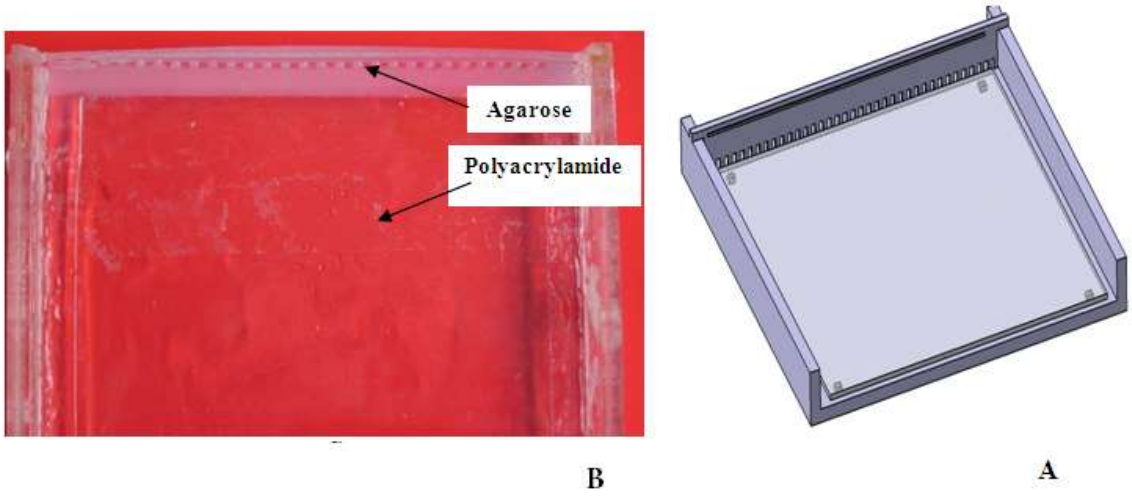
Fig. 1: The glass on top of gel has been placed on 2 mm-diameter bases on corners

نتایج و بحث

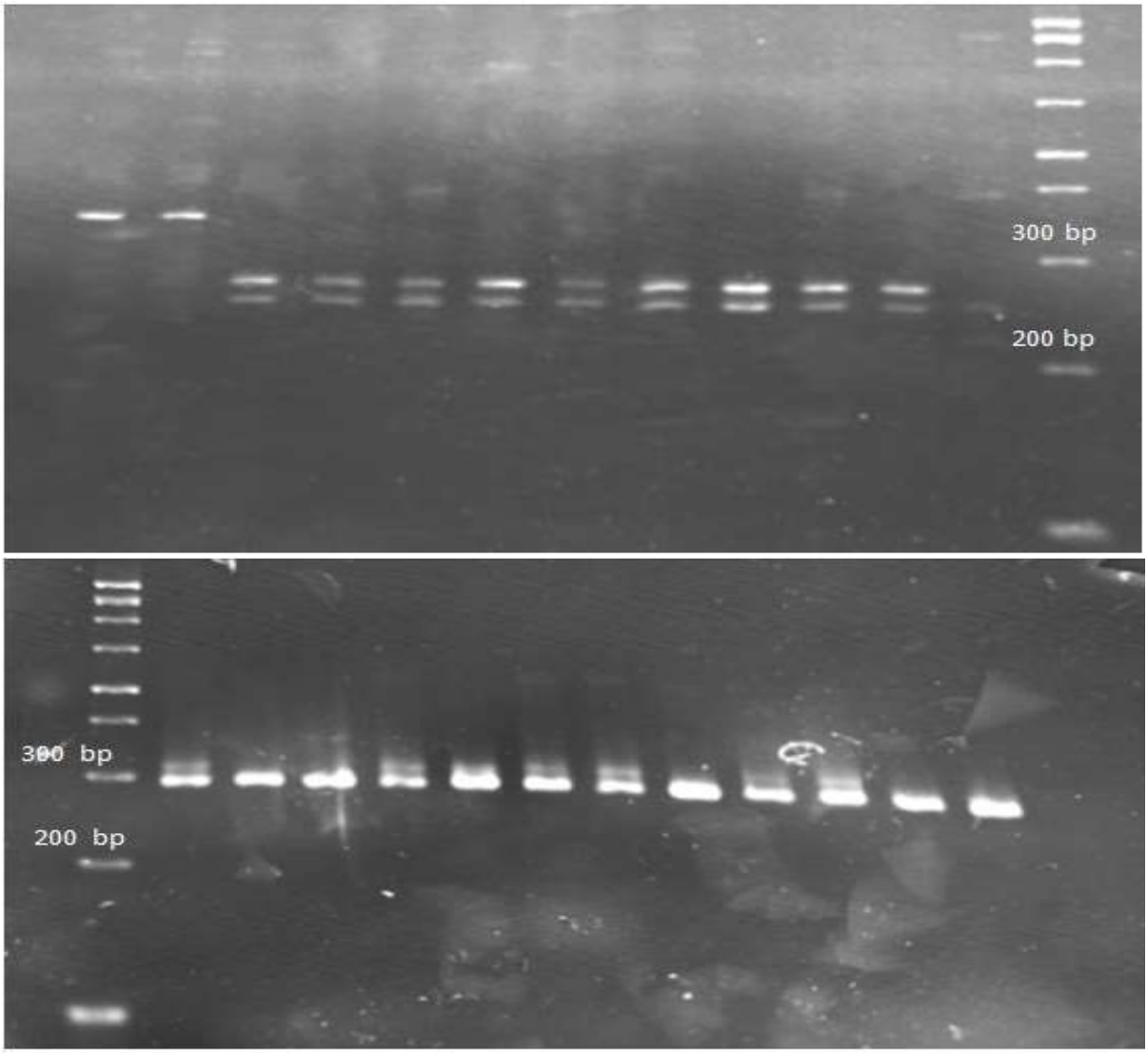
نتایج الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نیز نشان داد، قطعات DNA به‌راحتی از چاهک‌هایی از جنس آگارز وارد ژل پلی‌اکریل‌آمید شده، در آن حرکت کردند که در نهایت با رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید باندهای واضح و شفاف از آن‌ها به‌دست آمد. در شکل ۳ نشان داده شده است که چنان‌چه قطعات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در یک اندازه باشند به یک میزان در ژل تهیه شده حرکت خواهند نمود. همچنین مارکر bp ۱۰۰ به‌خوبی در این الکتروفورز تفکیک شده است که کارآیی الکتروفورز را تأیید می‌نماید (شکل ۳). با این روش قطعات چند شکل حاصل از نشانگرهای SSR به‌خوبی قابل تشخیص است (شکل ۳). در الکتروفورز این روش در مدت زمان طولانی‌تر، مشابه با الکتروفورز عمودی ژل پلی‌اکریل‌آمید، می‌توان قدرت تفکیکی معادل با روش الکتروفورز عمودی ژل پلی‌اکریل‌آمید و روش‌های افقی مشابه انتظار داشت. چنان‌چه طول ژل تهیه شده افزایش یابد، می‌توان از این روش برای نشانگرهای چند مکانی نظیر AFLP استفاده نمود. در شکل ۴ قدرت تفکیک این روش در مقایسه با ژل آگارز نشان داده شده است. رونوشت ژن FLC چغندرقند دارای پردازش‌های مختلف است که در ژل آگارز مشخص نبوده ولی در نتیجه حاصل از الکتروفورز افقی پلی‌اکریل‌آمید به‌خوبی نمایان است.

www.SID.ir

Archive of SID



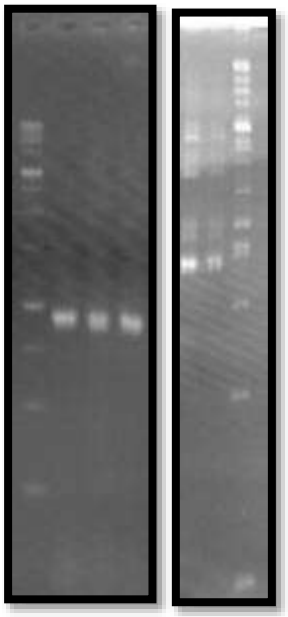
شکل ۲: الف: محل قرار گرفتن شانه در بالادست ژل و ب: چاهک‌های بالادست ژل از جنس آگارز
Fig. 2: (a) Location of the comb on top of tray and (b) sample slot that's made by agarose



شکل ۳: نتایج الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نشانگرهای SSR بر روی ژل ۸ درصد پلی اکریل آمید افقی
Fig. 3: Electrophoresis of polymerase chain reaction products of SSR markers in 8% horizontal polyacrylamide gel

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴: مقایسه الکتروفورز افقی ژل آگارز (سمت چپ) و الکتروفورز افقی ژل پلی‌اکریل‌آمید با استفاده از چاهک‌های ژل آگارز (سمت راست). یک میزان محصول PCR برای ژن FLC بر روی cDNA چغندرقند در چاهک‌ها ریخته شده است. در ژل پلی‌اکریل‌آمید باندهای مربوط به پردازش‌های گوناگون رونوشت محصول ژن مشاهده می‌شود. این پردازش‌ها در ژل آگارز ۲ مشخص نیست

Fig. 4: Comparison of Agarose gel electrophoresis (left) and horizontal polyacrylamide gel electrophoresis using agarose gel Slots (right). The same amount of PCR product from cDNA sugar beet template added in each slot. In polyacrylamide gel, the bands of different splicing of mRNA can be observed. In 2% agarose gel, different bands of this gene are not detectable

در روش‌های معمول الکتروفورز عمودی پلی‌اکریل‌آمید یکی از مشکلات عمده استفاده‌کنندگان این سیستم مشکل بودن تزریق ژل و تشکیل حباب بر سر مسیر حرکت DNA می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد در این روش به دلایلی از جمله عدم استفاده از سرنگ جهت ریختن ژل، احتمال تشکیل حباب بسیار پایین است. از طرفی در روشهای معمول الکتروفورز عمودی برای اطمینان از عدم تشکیل حباب ژل را با زدن ضرباتی بر سطح شیشه به‌سمت پایین هدایت می‌کردند که این امر موجب می‌شد در برخی موارد فرصت کافی برای ریختن ژل وجود نداشته باشد و ژل در درون سرنگ و یا درون ظرف خود ببندد. در این روش ژل به‌صورت یک‌جا و در مدت زمان کمی به درون سینی ریخته شد و تشکیل حباب نیز در آن دیده نشد.

بعد از اتمام الکتروفورز شیشه موجود در روی ژل، بدون نیاز به استفاده از مواد شیمیایی جهت ممانعت از چسبیدن ژل به شیشه، به آرامی از آن جدا شد. همچنین این ژل را می‌توان به‌راحتی با دست جابه‌جا کرد. این در حالی است که در بسیاری از موارد در روش‌های عمودی در هنگام جداسازی شیشه‌ها و همچنین در زمان رنگ‌آمیزی احتمال پارگی در ژل بالا می‌باشد.

یکی دیگر از مزایای روش معرفی شده جایگزین‌کردن اتیدیوم بروماید به‌جای سایر روش‌های رنگ‌آمیزی نظیر نیترات نقره است که روشی گران‌قیمت، زمان‌بر و دشوار است. نتایج فوق نشان داد این روش سریع و کم‌هزینه بوده، در عین حال باندهای حاصله بسیار واضح و شفاف می‌باشد. همچنین به‌علت سادگی انجام این روش نیازمند تجهیزات خاص و جداگانه جهت الکتروفورز پلی‌اکریل‌آمید نمی‌باشد.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه ۸ متن انگلیسی مراجعه شود.

www.SID.ir