

الکتروفورز افقی پلی‌اکریل‌آمید با استفاده از چاهک‌های ژل آگارز

Horizontal Polyacrylamide Gel Electrophoresis by Agarose Slots

محمدحسین صفری^۱ و اصغر میرزائی اصل^{۲*}

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۰۶

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۹/۱۰

چکیده

الکتروفورز افقی ژل آگارز، 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 به خوبی امکان‌پذیر نیست که به طور 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 به صورت 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، به منظور انجام الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید برای قطعات DNA تکثیر شونده توسط نشانگرهای ریزماهورای استفاده شد. در این روش عمل الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید، به صورت 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

Email: a.mirzaie@basu.ac.ir

*: نویسنده مسوول

مقدمه

از آنجایی که در روش عمودی تجهیزات اختصاصی و اقلام زیادی از مواد مورد نیاز است، این روش نیازمند صرف هزینه‌های زیادی می‌باشد. از طرفی پیچیده بودن 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 اولین بار توسط بریگام و همکاران (Bridghan *et al.*, 1994) ابداع شد و تاکنون روش‌های مختلفی برای الکتروفورز پلی‌اکریل‌آمید ارائه شده، یا به کار رفته است مارچلو و همکاران، گومز و همکاران و ایزو و همکاران (Marcheylo *et al.*, 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 به منظور الکتروفورز افقی ژل پلی‌اکریل‌آمید انجام شده، با به کار 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

به منظور 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، به عنوان 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، به طور 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

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 به عنوان بستری برای الکتروفورز توسط ریموند و واینتراب (Raymond and Weintraub, 1959) معرفی شد، امروزه به عنوان 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، به طوری که 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 (۱ میلی‌متر در ۱ سانتی‌متر) در یک ژل معمولی پلی‌اکریل‌آمید بدون کاهش معنی‌دار وضوح به کار برد. ۳- DNA به دست آمده از احیای ژل پلی‌اکریل‌آمید را می‌توان در بسیاری از اهداف به کار برد. بر این اساس یک زمینه ریزتری از منافذ نظیر ژل پلی‌اکریل‌آمید برای جداسازی آن‌ها نیاز است. با توجه به این که 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 نشد 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).

اتیدیوم بروماید قرار گرفت. رنگ آمیزی به مدت 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.

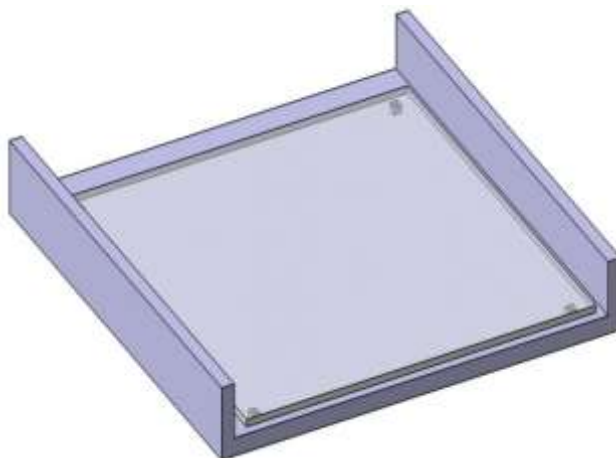
نتایج و بحث

نتایج الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نیز نشان داد، قطعات DNA به راحتی از چاهک‌هایی از جنس آگارز وارد ژل پلی‌اکریل‌آمید شده، در آن حرکت کردند که در نهایت با رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید باندهای واضح و شفاف از آن‌ها به دست آمد. در شکل ۳ نشان داده شده است که چنانچه قطعات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در یک اندازه باشند به یک میزان در ژل تهیه شده حرکت خواهند نمود. همچنین مارکر ۱۰۰ bp به خوبی در این الکتروفورز تفکیک شده است که کارایی الکتروفورز را تأیید می‌نماید (شکل ۳). با این روش قطعات چند شکل حاصل از نشانگرهای SSR به خوبی 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 چغندر قند دارای پردازش‌های مختلف است که در ژل آگارز مشخص نبوده ولی در نتیجه حاصل از الکتروفورز افقی پلی‌اکریل‌آمید به خوبی نمایان است.

محل قرارگیری شانه بود (شکل ۱). قبل از ریختن ژل یک قطعه شیشه ۱۵×۱ سانتیمتری در بالادست شیشه به جای شانه قرار داده شد که محل ریختن ژل آگارز پس از تهیه ژل آکریل‌آمید است. شیشه بالایی از دو طرف لبه‌های سینی ژل نیز ۵/۰ 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.

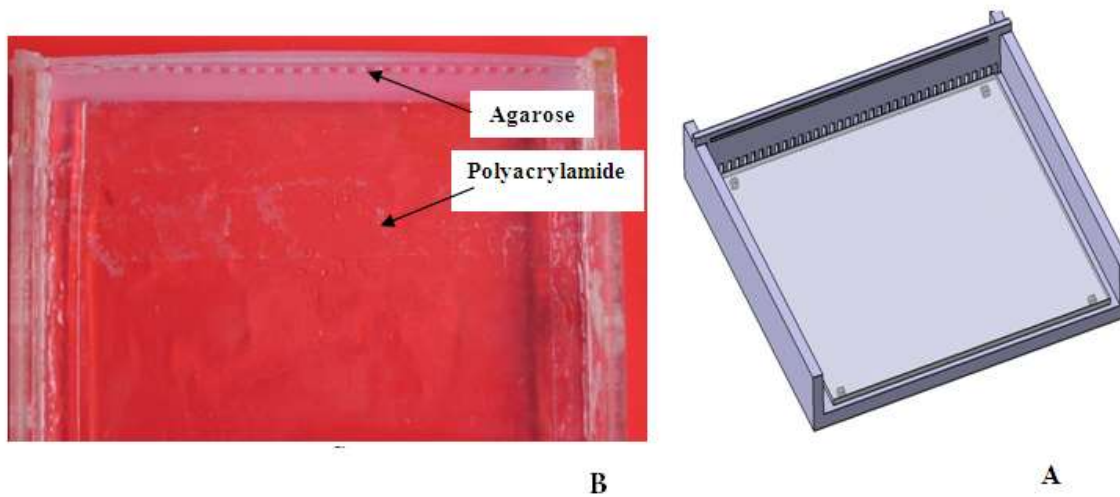
پس از حدود ۱ ساعت ژل آکریل‌آمید آماده گردید. شیشه ۱۵×۱ سانتی‌متری از ابتدای ژل برداشته شده، شانه به جای آن قرار گرفت (شکل ۲ الف). مقدار کمی ژل آگارز ذوب شده (بسته به اندازه سینی حدوداً ۸-۴ میلی‌لیتر) در اطراف شانه ریخته و پس از ۱۵ دقیقه شانه خارج گردید (شکل ۲ ب).

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 چغندر قند به همراه 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 چغندر قند نیز استفاده شد. الکتروفورز به مدت 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

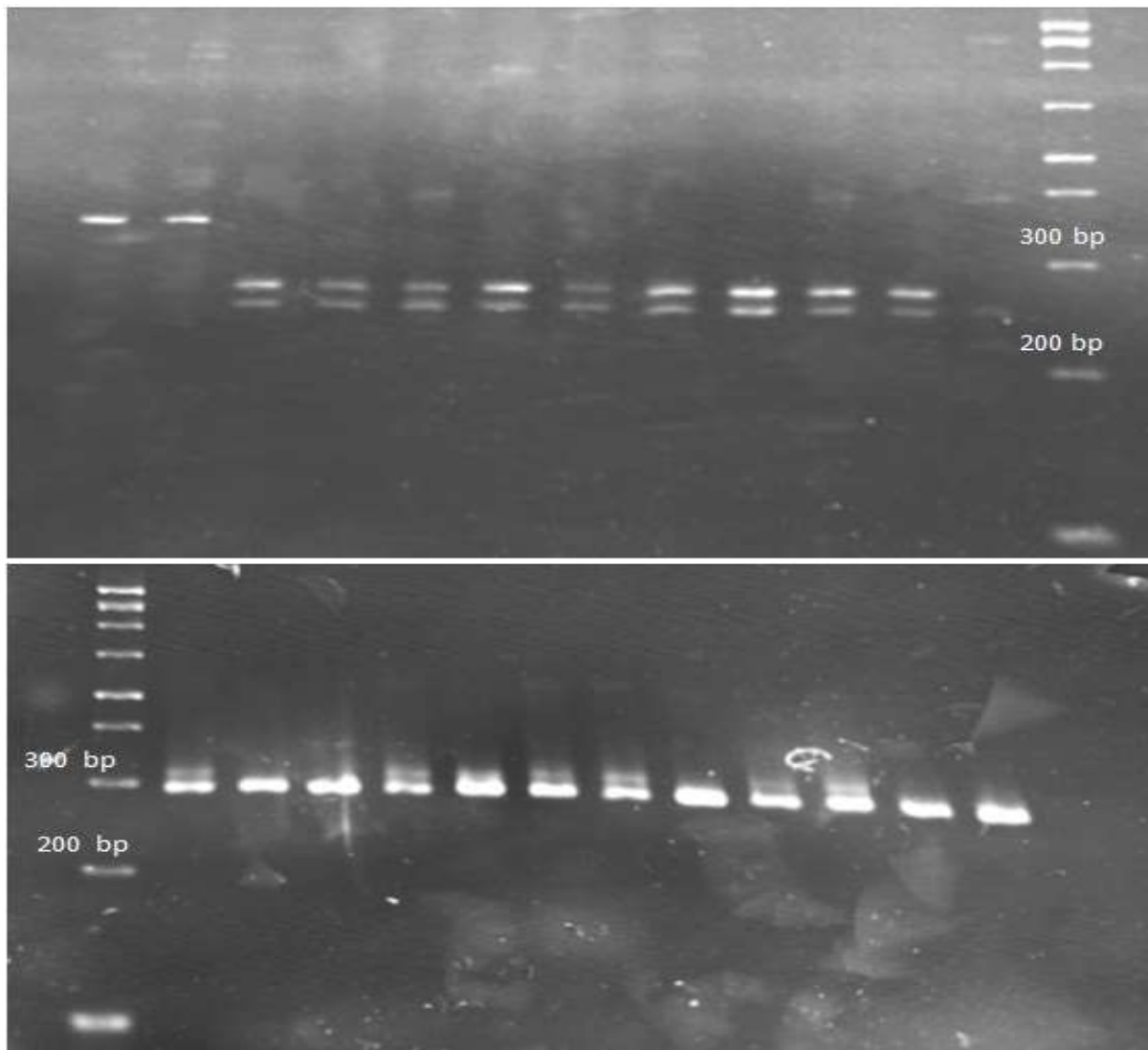


شکل ۱: شیشه بالایی ژل که بر روی چهار پایه ۲ میلی‌متری در گوشه‌های سینی قرار گرفته است

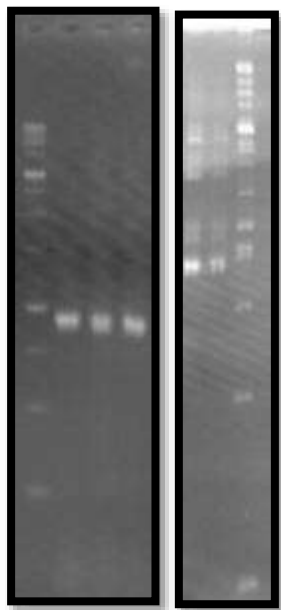
Fig. 1: The glass on top of gel has been placed on 2 mm-diameter bases on corners



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 پلیمرز نشانگرهای SSR بر روی ژل ۸ درصد پلی‌اکریل‌آمید افقی
Fig. 3: Electrophoresis of polymerase chain reaction products of SSR markers in 8% horizontal polyacrylamide gel



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 چغندر قند 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

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 به راحتی 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 جایگزین کردن اتیدیوم بروماید به جای 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 به علت سادگی انجام این روش نیازمند تجهیزات خاص و جداگانه جهت الکتروفورز پلی‌اکریل‌آمید نمی‌باشد.

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 به سمت 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 به صورت یک‌جا و در مدت زمان کمی به درون سینی ریخته شد و تشکیل حباب نیز در آن دیده نشد.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه ۸ متن انگلیسی مراجعه شود.