University of Isfahan

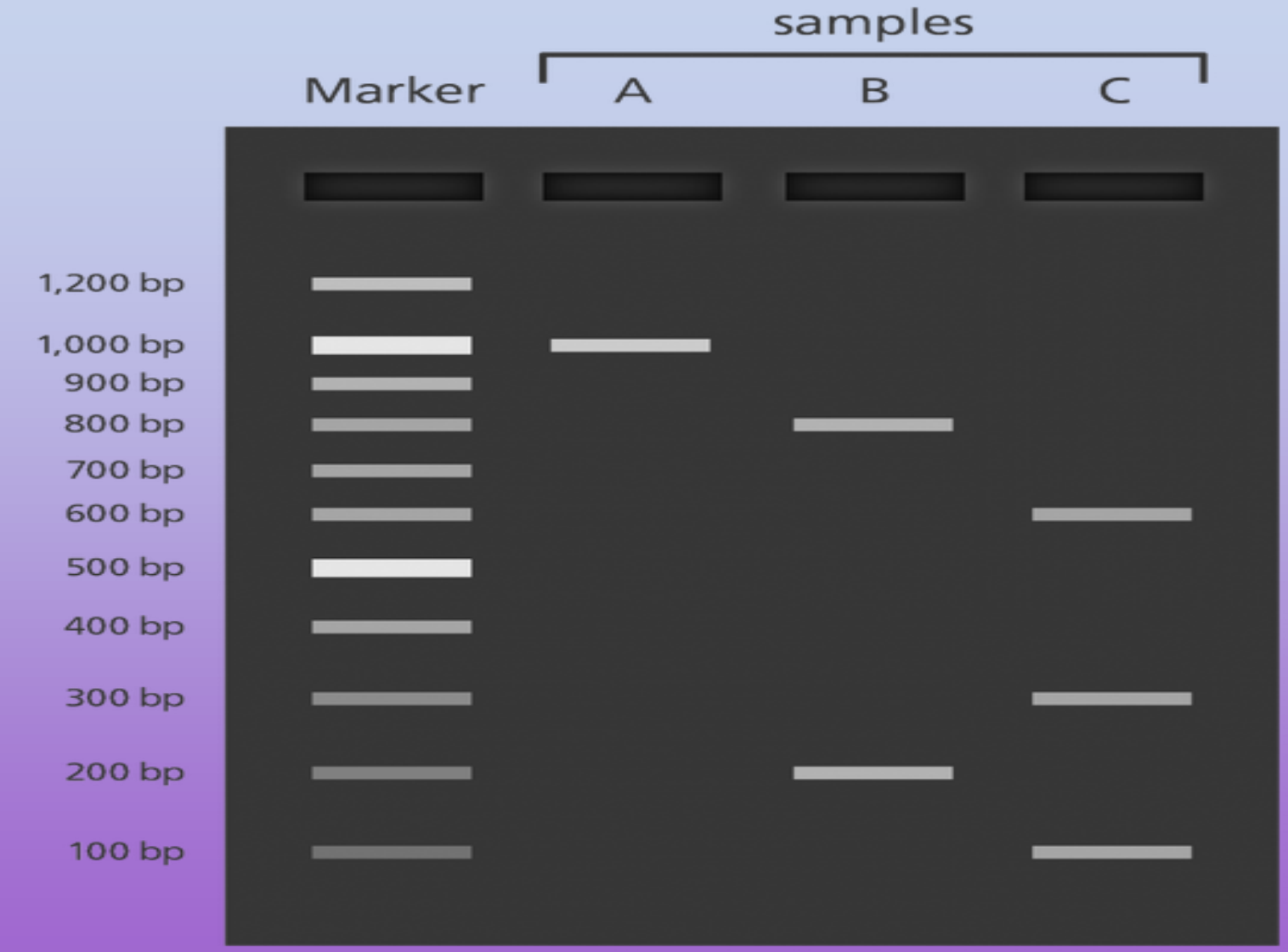
Faculty of Biological Science and Technology

Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology

Farzaneh Forouharfar

تعیین اندازه و غلظت DNA توسط الکتروفورز
(Determination of Size and Concentration of DNA by Electrophoresis)

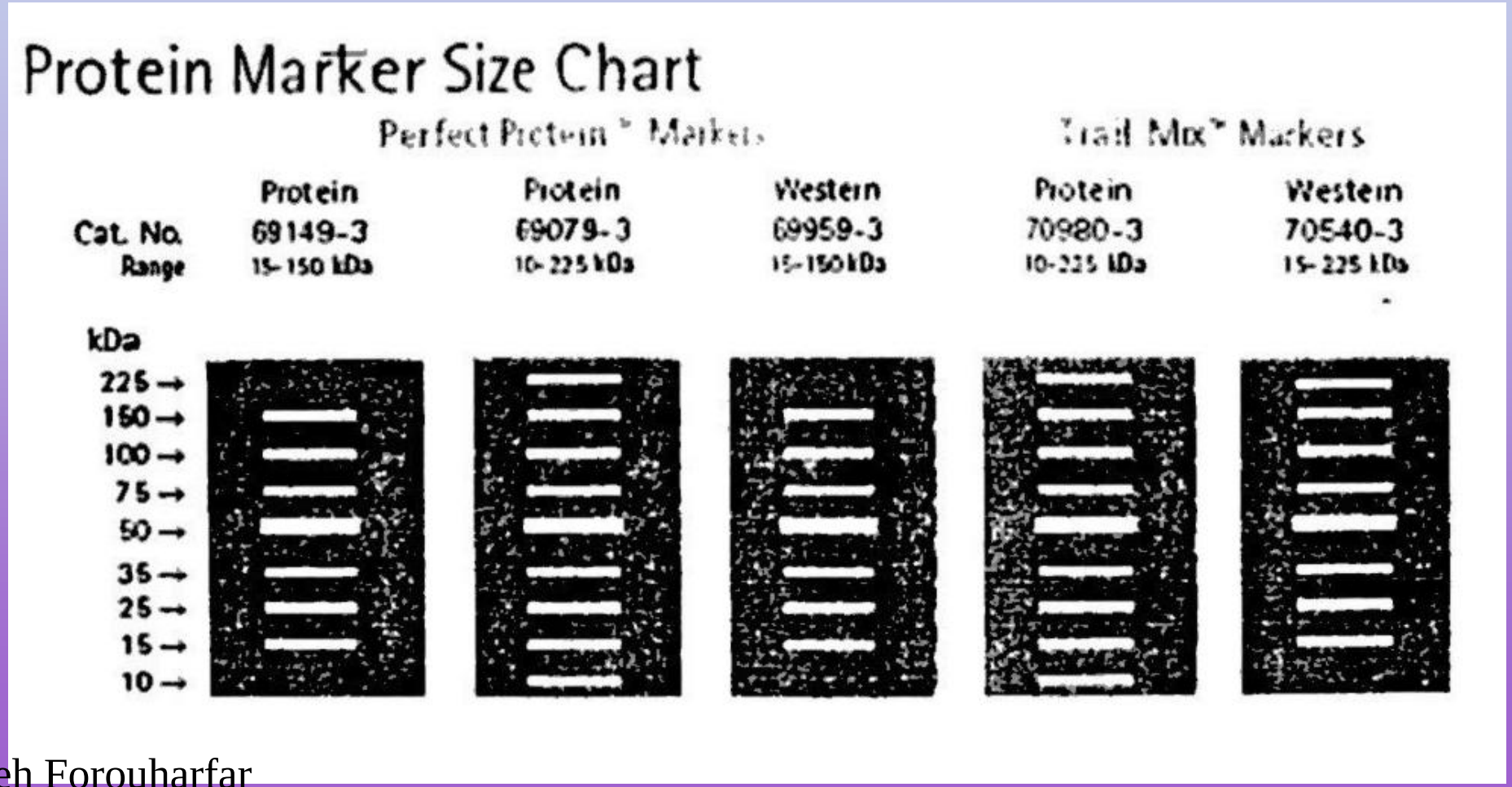
Farzaneh Forouharfar


samples
Marker
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

اهداف آزمایش:

- ✓ آشنایی با مارکر و انواع آن
- ✓ تعیین غلظت DNA توسط اسپکتروفتومتر
- ✓آشنایی با ژل الکتروفورز
- ✓ تعیین غلظت و اندازه DNA از روی ژل

براي تعيين غلظت DNA ،RNA و يا پروتئين توسط الكتروفورز انواع متفاوت ماركر (RNA-DNA-پروتئين) وجود دارد.



مارکر ژنتیکی
(Genetic Marker)

مارکرها یا نشانگرهای ژنتیکی مکانهایی بر روی کروموزوم ها هستند که در آنالیز و مطالعه ژنوم موجودات مورد استفاده قرار می‌گیرند.

به عبارت دیگر مارکر، یک ژن یا بخشی از توالی دی‌ان‌ای است که جایگاه شناخته‌شده‌ای بر روی کروموزوم دارد و آن را می‌توان برای شناسایی افراد یا گونه‌ها به‌کار برد. دگرگونی در یک مارکر ژنتیکی می‌تواند درپی یک جهش ژنی یا دگرگونی در جایگاه کروموزومی دیده شود.

یک مارکر ژنتیکی می‌تواند تنها بخش کوتاهی از دی‌ان‌ای باشد، یا بخش درازتری از دی‌ان‌ای باشد.

انواع مارکرها

مارکرها انواع مختلفی دارند. در یک تقسیم بندی کلی می توان مارکرها را به صورت زیر دسته بندی کرد:

۱-مارکرهای فنوتیپی: مارکرهای فنوتیپی همانگونه که از نام آنها مشخص است از روی فنوتیپ ارزیابی می شوند و لذا ارزیابی آنها خیلی ساده است. تعداد این مارکرها کم است و پلی مورفیزم کمی نیز تولید می کنند. از طرفی در اغلب موارد مارکر فنوتیپی در واقع یک صفت نامطلوب است، مثلا کوتولگی بوته، ابلق بودن برگ ها و ... لذا امروزه از این نوع مارکرها استفاده نمی شود.

۲-مارکرهای مولکولی: مارکرهای مولکولی خود به دو دسته زیر تقسیم می شوند:

- مارکرهای بیوشیمیایی
- مارکرهای DNA

مارکرهای بیوشیمیایی

مارکرهای بیوشیمیایی شامل موارد متعددی است. این نوع مارکرها امروزه کارایی زیادی ندارند چرا که تعداد آنها کم است.

این گروه را می توان به دسته های زیر تقسیم کرد:

الف. مولکول های بیوشیمیایی کوچک: مثل ترکیبات فنلی، ترکیبات معطر و ...

ب. پروتئین های ذخیره ای: مثل گلوتنین و گلیادین که در گندم خصوصا در تعیین ارزش نانوایی کاربرد دارد.

ج. آیزوزایم ها: اینها در واقع فرم های مختلف یک آنزیم هستند که یک واکنش را کاتالیز می کنند ولی ممکن است سرعت فعالیت آنها متفاوت باشد. ان مارکرها در دهه ۸۰ کاربرد زیادی داشتند. تنکسلی توانست بر اساس آیزوزایم ها در گوجه فرنگی اولین نقشه لینکاژی را طراحی نماید.

مارکر های DNA

مارکرهای DNA در واقع مهمترین و کاربردی ترین سیستم های مارکری هستند که گستردگی زیادی داشته و هر روزه در حال توسعه و تکامل هستند. از آنجا که در اولین سطح بیان ژن مطرح می شوند، خیلی دقیق بوده، دارای تنوع زیاد و پلی مورفیزم بالا هستند.

براون (۱۹۹۹) مارکرهای DNA را به ساختمان ها و اماکن مهم در یک شهر تشبیه می کرد که می توان نقاط شهر را نسبت به آنها آدرس داد و مکان یابی نمود.

مارکرهای DNA انواع بسیار زیادی دارند. تقسیم بندی رایج به صورت زیر است:

- **مارکرهای مبتنی بر هیبریداسیون**

بازرترین نوع این مارکرها RFLP می باشد. VNTRها و میکروستلیت ها نیز در این گروه قرار دارند. در این نوع مارکرها یک قطعه DNA نشاندار شده (پروب) جهت هیبریداسیون استفاده می شود.RFLP در سال ۱۹۸۰ توسط Botstain ابداع شد و دقت بسیار زیادی دارد، لیکن امروزه صرفا به دلیل وقت گیر و پر زحمت بودن آن، کمتر استفاده می شود.

- **مارکرهای مبتنی بر واکنش زنجیرهای پلیمراز(PCR)**

مارکرهای مبتنی بر PCRآنهایی هستند که برای آشکار سازی از پرایمر (۱ یا ۲ پرایمر) استفاده می کنند. این گروه شامل طیف وسیعی از مارکرها می باشد و از آنجا که خیلی سریع قابل انجام هستند، هر روزه گسترش بیشتری می یابند. RAPD،DAF، AFLP، SSR، STS، SCAR ، ALP و ... نمونه هایی از این مارکرها هستند.

بررسی وجود DNA با استفاده از اسپکتوفوتومتری

به منظور ارزیابی کمیت و کیفیت DNA و آگاهی از میزان غلظت و خلوص آن می توان از روش اسپکتروفتومتری استفاده کرد. در این روش ساده و دقیق ، میزان جذب اشعه UV توسط بازهای DNA اندازه گرفته می شود.مولکول های DNA به علت حضور بازهای آروماتیک آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین دارای جذب نوری زیاد در محدوده ماوراء بنفش می باشند. بنابراین اندازه گیری جذب نوری محلول های DNA شاخص خوبی برای درجه خلوص آن می باشد.

حداکثر جذب مولکول DNA در طول موج ۲۶۰ nm است. از طرفی معمولاً محلول های DNA مقداری آلودگی پروتئینی دارند که حداکثر جذب محلول های پروتئینی نیز به علت حضور اسیدهای آروماتیک مانند تریپتوفان فنیل، تیروزین و آلانین در طول موج ۲۸۰ nmمی‌باشد. بنابراین نسبت جذب در طول موج ها ۲۶۰/۲۸۰ را مشخص می کنند. جذب نوری معیار مناسبی برای تعیین نسبت Protein/DNA در یک نمونه و به عبارتی درجه خلوص خواهد بود. به همین علت جهت تعیین غلظت DNA محلول ، باید جذب آن را در طول موج های ۲۶۰ nm و ۲۸۰ مشخص نمود.

برای تعین کمیت: می توان از فرمول زیر استفاده نمود:

dsDNA(µg/ml)= OD260×50×Dilution Factor

بنابراین هر واحدOD260، یعنیA=۱ تقریباً معادل با ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر DNA دو رشته ای است.

برای تعیین کیفیت: میزان خالص بودن DNA را می توان از نسبت دو جذب به صورت زیر محاسبه نمود:

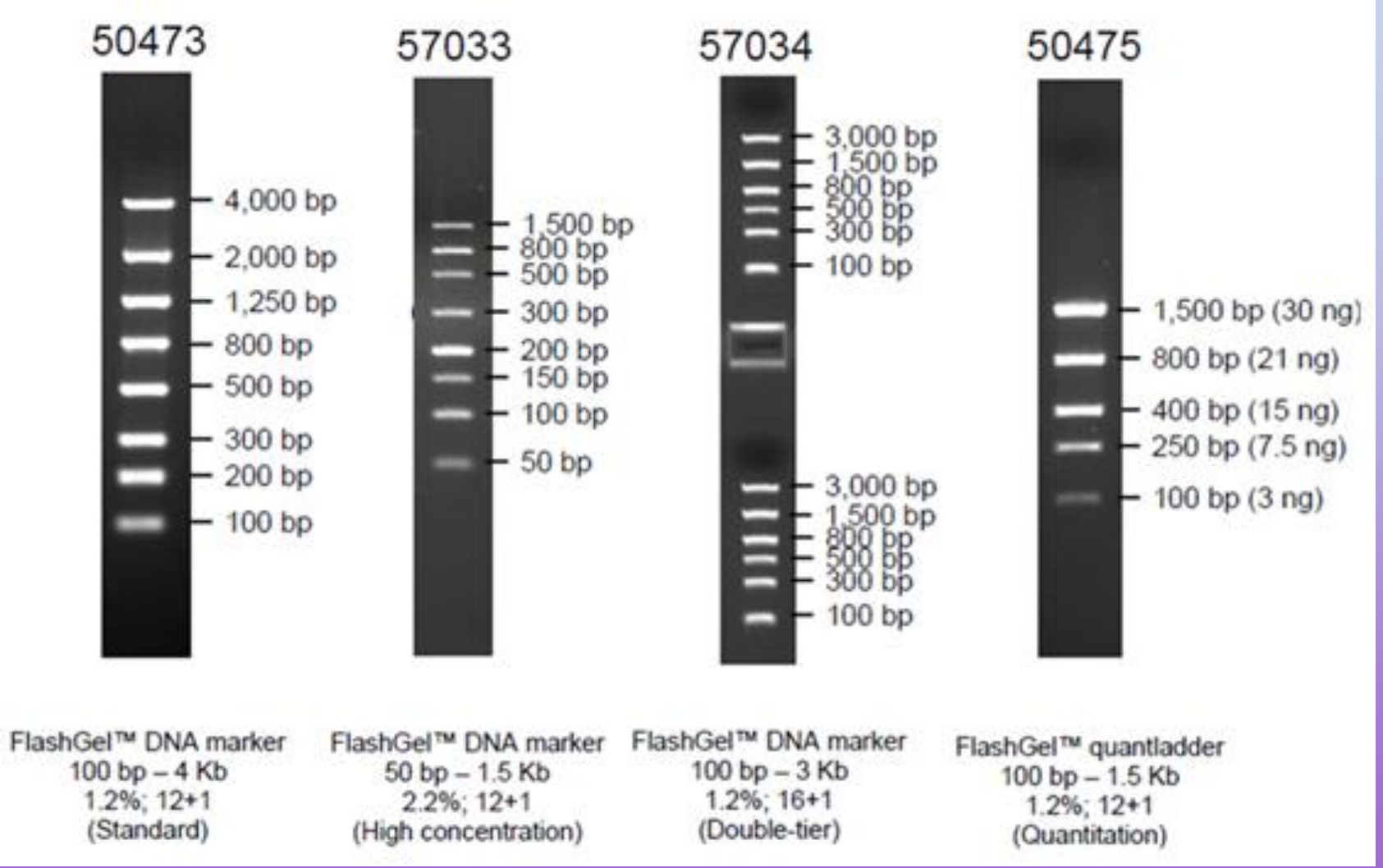
جذب در280nm/ جذب در 260nm = نسبت جذب(A)

A<۸/۱ ← غلظت پروتئین بالا است

A>۸/۱ ← غلظت RNA بالا است

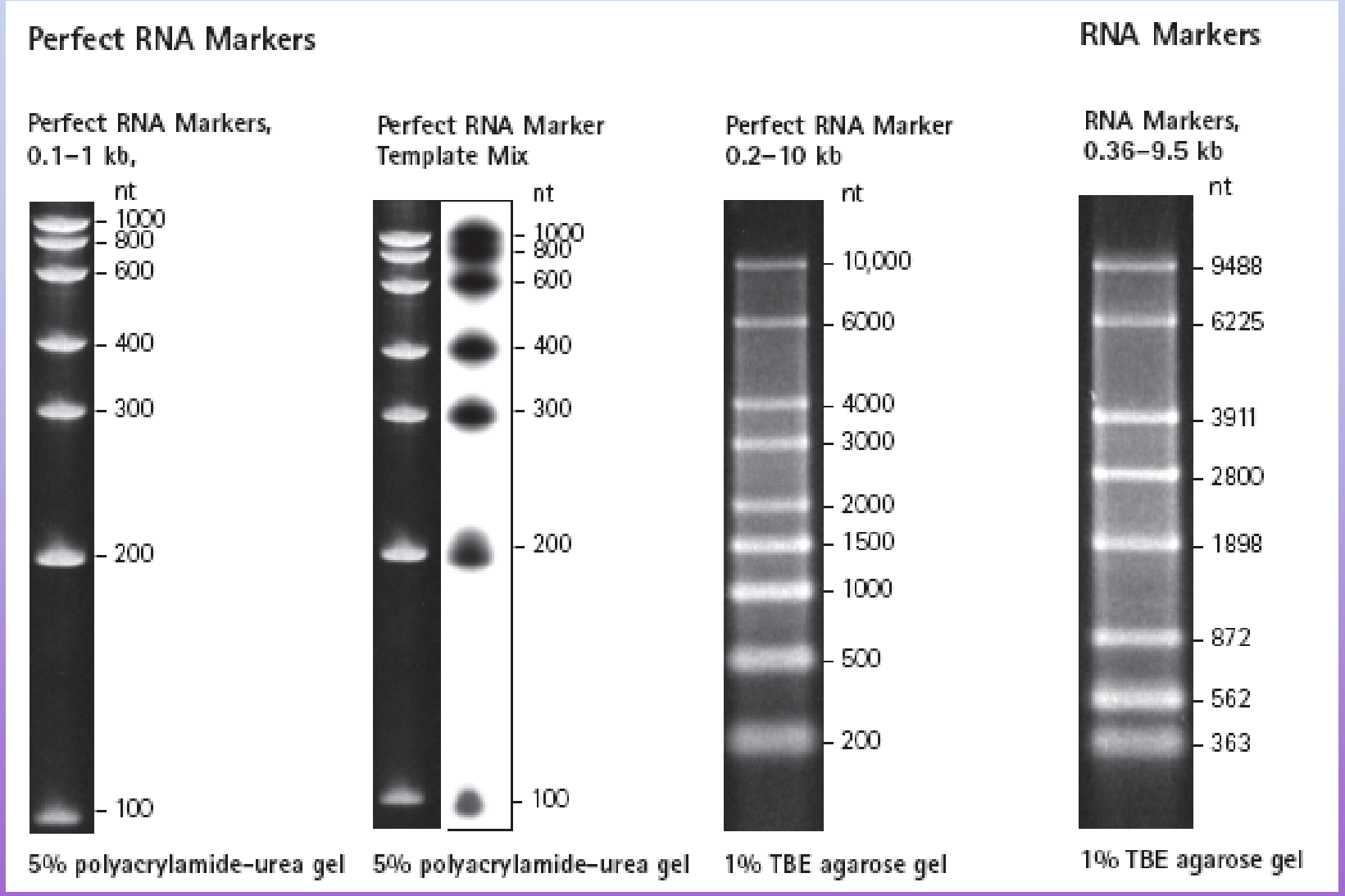
جهت انجام این کار از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده می شود. ابتدا محلول DNA را به نسبت ۱ به۲۰ رقیق می‌کنیم. جهت بلانک (Blank) کردن دستگاه مقدار ۱۰۰µl محلول TE مورد استفاده قرار می گیرد. سپس میزان جذب نوری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ خوانده می شود و نسبت این جذب (۲۸۰/۲۶۰) در هر مورد محاسبه می گردد که برای تمامی DNA های مورد بررسی بین ۷/۱ الی ۲ می باشد. غلظت DNA نیز توسط دستگاه محاسبه می‌شود که بین ۵/۰ الی ۲ µg/µl بود .

مارکر های DNA



Farzaneh Forouharfar

مارکر های RNA

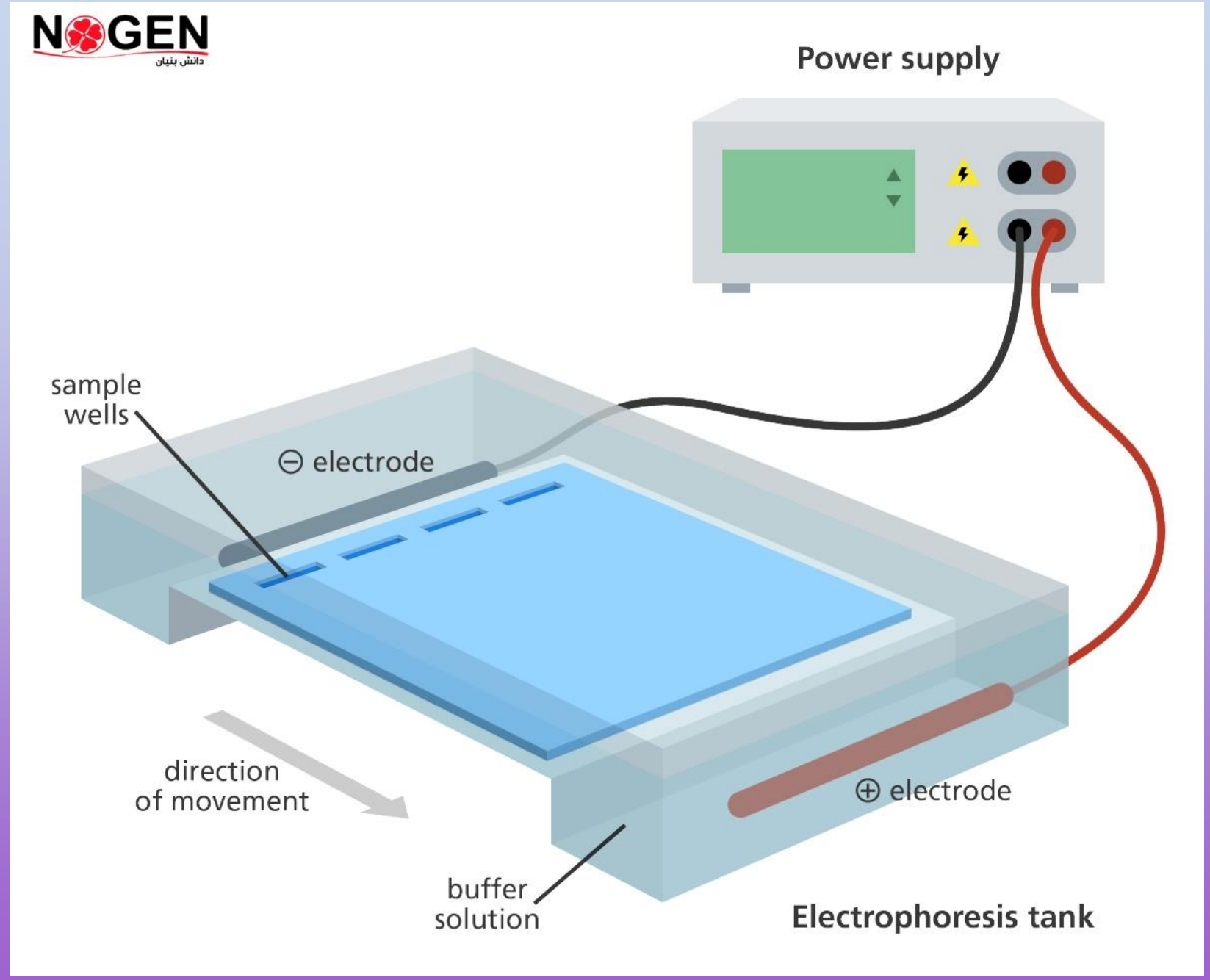


Farzaneh Forouharfar

تکنیک ژل الکتروفورز
(Gel Electrophoresis)

از روش های آزمایشگاهی مرسوم جهت جداکردن مولکولهای باردار تکنیک ژل الکتروفورزمیباشد .این جداسازی با توجه به اندازه، بار و جرم مولکولی آنها انجام میگیرد. فرایند کلی این تکنیک به این صورت است که با برقراری جریان در ژل الکتروفورز ، دو سمت ژل دارای دو قطب مخالف مثبت و منفی میشود که باعث میشود مولکول های باردار به سمت قطب مخالف خود حرکت کنند.این عمل حرکت مولکول ها تحت اصطلاح " مهاجرت " شناخته شده است. دلیل این مهاجرت ساختار ماتریکس نفوذپذیر ژل است که مولکول‌ها را قادر میسازد از میان منافذ موجود در آن عبور و در طول ژل حرکت کنند.

اساس کار این تکنیک اعمال جریان الکتریکی است که منجر به جداسازی و شناسایی مولکول ها میشود . همان گونه که در بالا شرح دادیم کاربرد این روش در آزمایشگاه های مولکولی و بیوشیمی برای جداسازی مولکول‌های باردار مانند RNA، DNAو پروتئین است. ژلی که برای این تکنیک استفاده میشود از پودر آگاروز (آگارز) و یا پلی آکریلامید است . ساختار این ژل ها منفذ دار است و همین امر موجب میشود ، مولکول‌ها با اندازه‌های متفاوت به راحتی از آن عبور کند. برای کوچک یا بزرگ کردن این منافذ جهت حرکت مولکول های کوچکتر و یا بزرگتر ، میتوانیم غلظت ژل های مورد استفاده درالکتروفورز را کمتر و یا بیشتر کنیم.


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

کاربردهای تکنیک ژل الکتروفورز

کاربرد اصلی این متد در آزمایشگاه ها به دو بخش اصلی تقسیم میشود :

- جداسازی مولکولهای DNAکه یا بصورت استخراج شده هستند و یا محصول PCR، ریل تایم و یا کلونیگ ژن
- بررسی و مطالعه کیفیت محصول PCR

منافذ بزرگ ژل آگاروز قطری حدود ۱۰۰ تا ۵۰۰ نانومتردارد که کاملا متناسب برای جداسازی مولکول‌های DNAبا طول بالا میباشد.

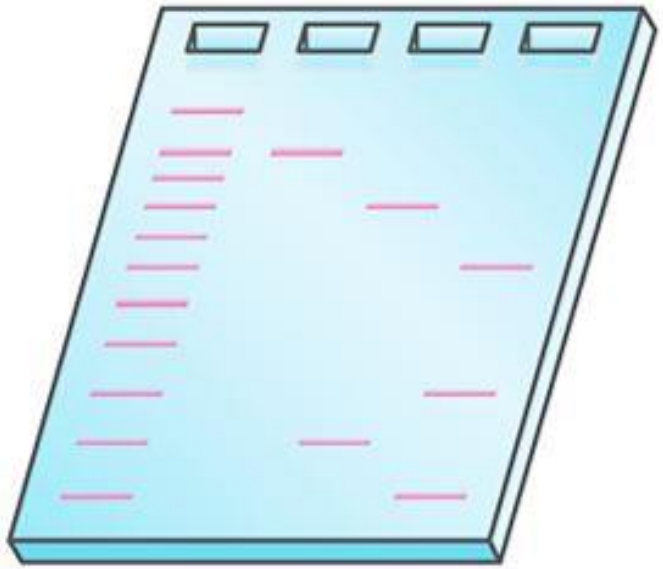
عملکرد الکتروفورز به دو روش عمودی یا افقی میباشد که هر یک کاربردهای مخصوص به خود را دارد.

از تفاوت های آشکار این دو جهت قرارگیری ژل است :

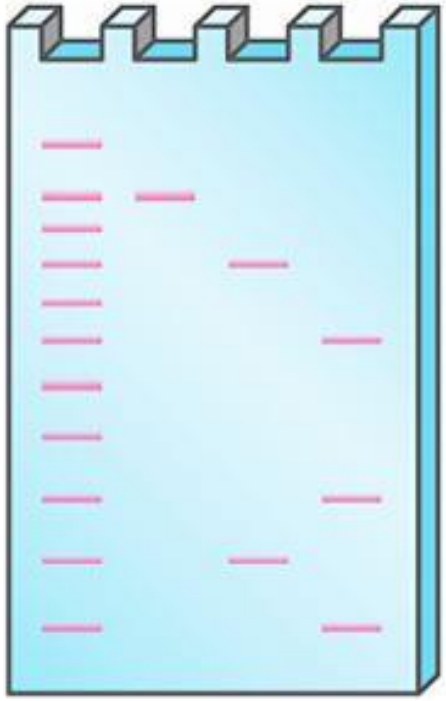
در الکتروفورز افقی، ژل مورد استفاده آگاروز است و نیز قرارگیری ژل به صورت افقی در محیط بافر است،

الکتروفورز عمودی ، ژل مورد استفاده پلی آکریلامید است و قرارگیری ژل به صورت عمودی و درون محفظه الکتروفورز است و تماس آن با بافر محدود است.

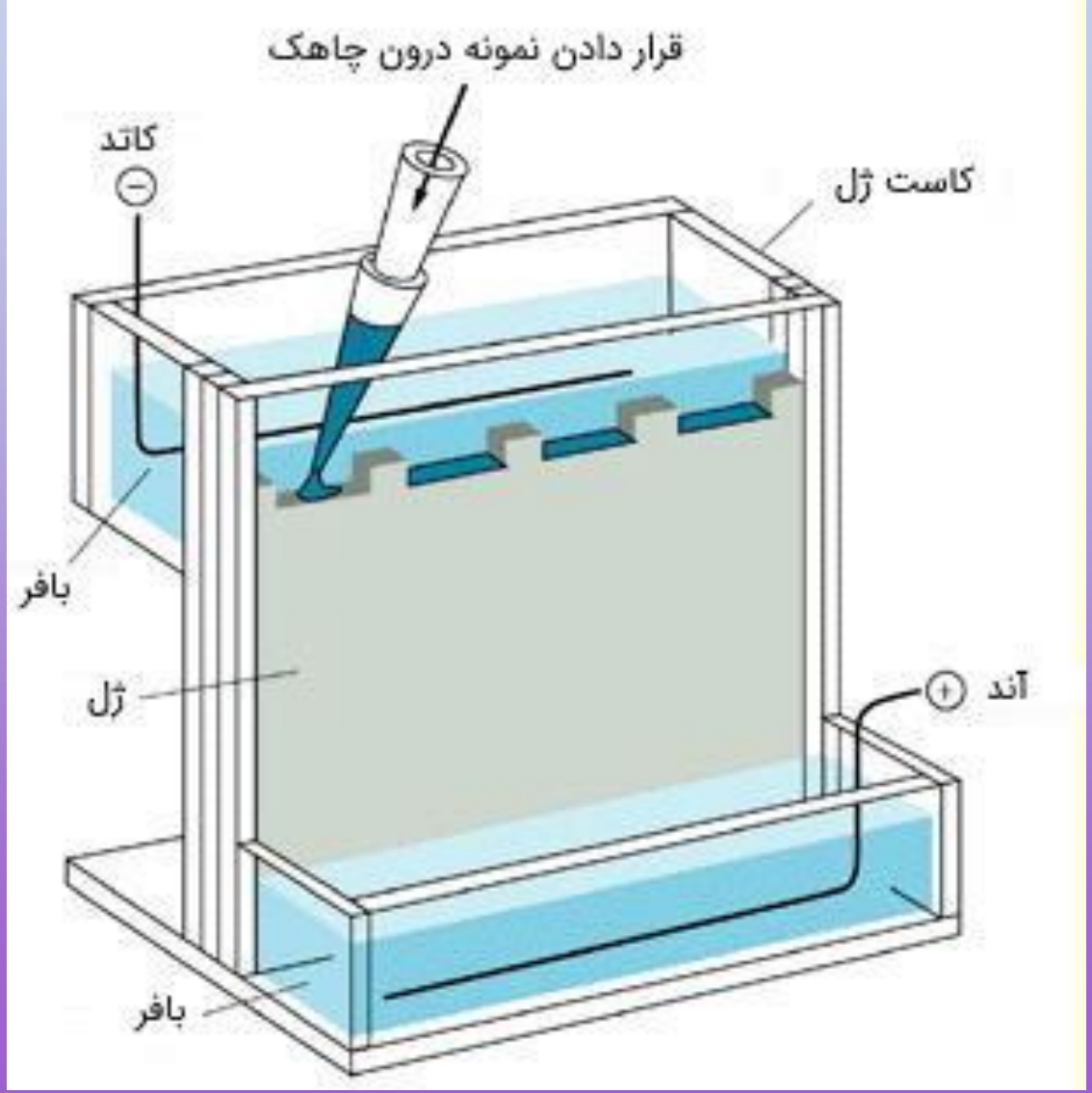
الکتروفورز افقی



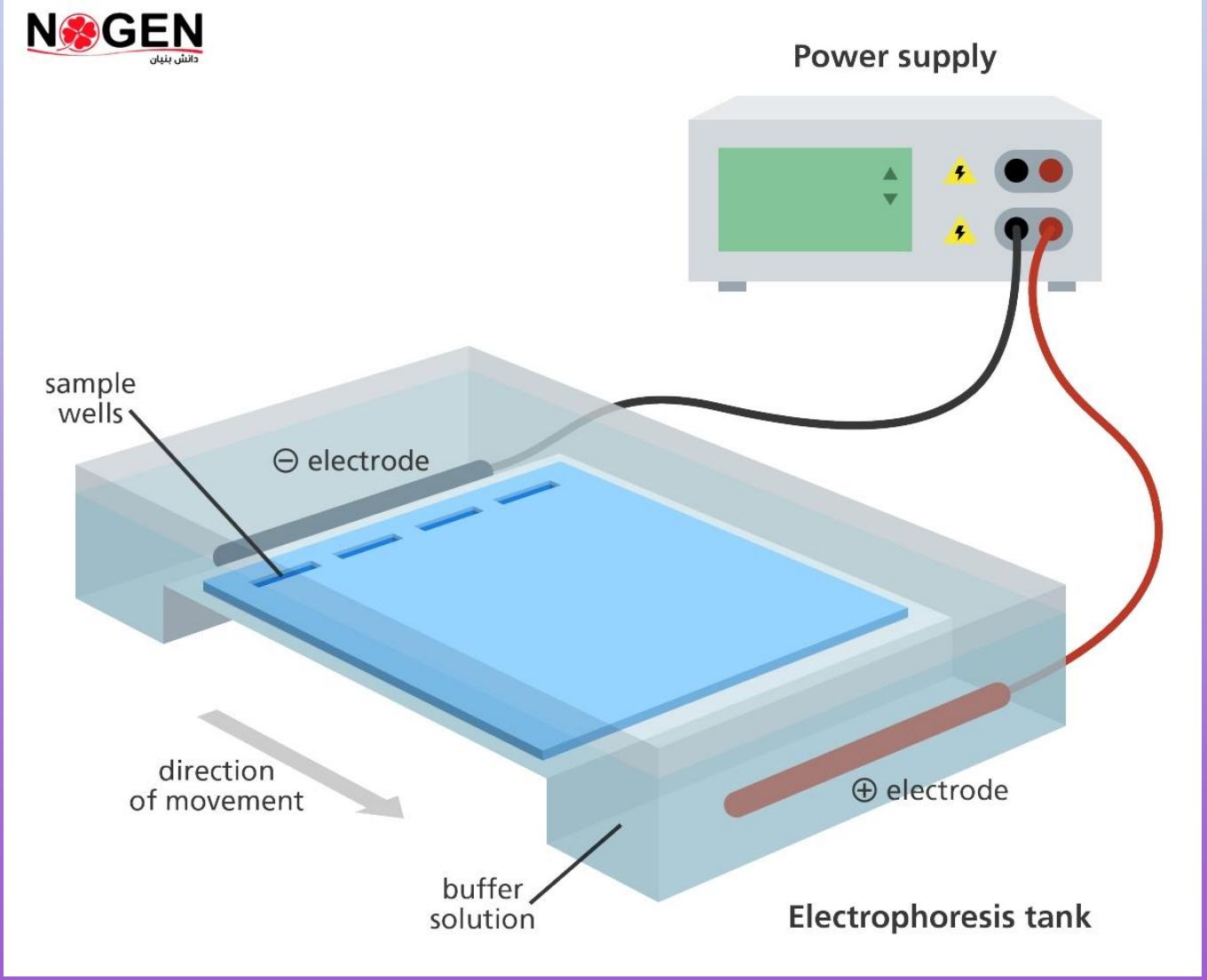
الکتروفورز عمودی



ژل عمودی



ژل افقی


NOGEN
دانش بنیان
Power supply
sample wells
⊖ electrode
direction of movement
⊕ electrode
buffer solution
Electrophoresis tank

تهیه ژل برای انجام الکتروفورز

با توجه به تکنیک مورد نظر از از آگاروز و یا پلی آکریلامید استفاده میشود. این مواد بصورت پودر در اختیار کاربر قرار میگیرد و پس از مخلوط با بافرهای مخصوص و حرارت دادن به یک مایع شفاف تبدیل میشود. بر اساس غلظت مورد نظر ، مقدار مشخصی از پودر را در بافر TAEو یا TBEمخلوط و حل میکنند. سپس مایع شفاف به دست آمده را درون کاست ژل و در محفظه ای بنام تانک الکتروفورز ریخته و توسط شانه چاهک ، چاهک‌هایی برای قراردادن نمونه آماده می‌شود . مایع بعد از خنک شدن، بصورت ژل بسته شده و خنک میشود.

خاصیت بافر درون تانک الکتروفورز ، آسان کردن عبور جریان از ژل است . این تانک با دو الکترود به یک منبع الکتریکی برای ایجاد جریان الکتریکی متصل می‌شود.

برای مشاهده نمونه‌ها روی ژل، هنگام قرار دادن آن‌ها درون چاهک،از رنگ‌های قابل مشاهده با نور UV مانند DNA safe stainاستفاده میشود. البته در گذشته، از اتیدیوم بروماید برای رنگ‌آمیزی استفاده می‌شد، اما به دلیل سمی و جهش‌زا بودن آن ها، کار با آن‌ها در آزمایشگاه ها ممنوع اعلام شد. پس از پایان حرکت مولکول‌ها به سمت قطب مخالف، جریان الکتریکی قطع می‌شود و ژل توسط دستگاهی به نام ژل داک تصویربرداری میشود.

الکتروفورز مولکول‌های DNA

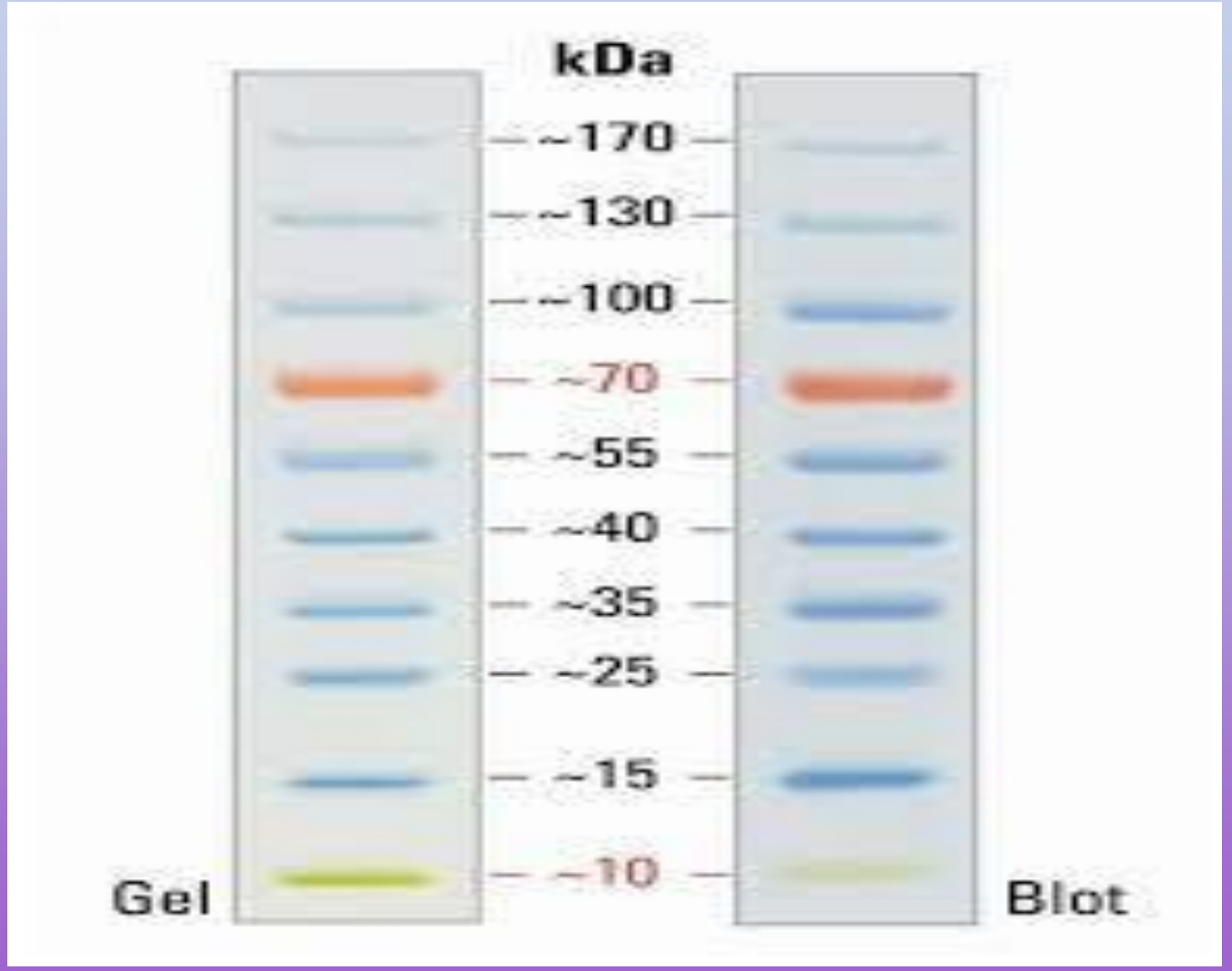
با این تکنیک کاربر قادر به شناسایی مولکولهای DNA با طول های متفاوت است. از آنجاییکه مولکول‌های DNA دارای بار منفی هستند زمانی که روی ژل و تحت جریان الکتریی قرار میگیرند به سمت الکترود مثبت حرکت می‌کنند. در این شرایط ، جداسازی مولوکول های DNA ، تنها بر اساس اندازه و سایز آنها انجام می‌شود. حرکت رشته‌های کوتاه DNA سرعت بیشتری نسبت به مولکول‌های بلندتر دارند، بنابراین جداسازی مولکول‌های DNA با اندازه‌های متفاوت آسان تر انجام میشود.همانطور که قبلا هم اشاره کردیم ردیابی نمونه ها، با اضافه کردن رنگهای فلورسنت درون چاهک ژل انجام میگیرد. بعضی از کاربران، رنگ‌های فلورسنت را با ژل ، درست قبل از انتقال آن به قالب الکتروفورز مخلوط میکنند که در این شرایط ، نیاز به اضافه کردن رنگ هنگام لود نمونه نیست. الکتروفورز برای مولکول‌های DNA به صورت افقی انجام می‌گیرد که روشی ساده‌تر نسبت به روش عمودی است.

بعد از توقف جریان، باند مولکول‌های DNA در اندازه‌های مختلف بر روی ژل نمایان است که جهت تعیین اندازه باند نمونه، از یک نشانگر و یا در اصطلاح (Ladder) به عنوان استاندارد استفاده می‌شود. لدر روی ژل به صورت باندهایی با طول معین نمایان بوده و با استفاده از آن اندازه باندهای نمونه بر روی ژل را می توان ارزیابی کرد.

تعیین غلظت و اندازه DNA از روی ژل

مارکرها همانند یک راهنما در تعیین اندازه و غلظت محلول مورد نظر مناسب می‌باشند.
اندازه هر باند مارکر از قبل توسط کارخانه سازنده مشخص شده است. مثلا برای مارکری که ۰.۵ میکروگرم است به صورت ng/0.5g تعریف شده است. بنابراین می‌توان با مقایسه شدت باندهای مارکر و باندی که در نتیجه load کردن DNA مشاهده می کنید، غلظت این باند را تخمین بزنید.
از طرفی می توان اندازه قطعه مورد نظر را نیز به وسیله مارکر به دست آورد، چون هر باند مارکر bp خاص خود را دارد.

Farzaneh Forouharfar


kDa
~170
~130
~100
~70
~55
~40
~35
~25
~15
~10
Gel
Blot

مثال: اگر از مارکری که ۰.۵ میکروگرم است، ۰.۲ میکروگرم لود کنید، اعدادی که به همراه مارکر داده م ی‌شوند تغییر خواهد کرد و اگر غلظت یک باند آن ngr ۲۶.۱ بود، در ۰.۲ میکرو گرم خواهید داشت:

این عدد نشان دهنده غلظت باند مورد نظر نسبت به ۰.۲gr مارکر لود شده است. حال می توان غلظت باند DNA معادل آن رانیز به دست آورد. اما در اینجا نیز باید دقت شود که چند میکرو لیتر از نمونه DNA لود شده است. مثلا اگر ۴ میکرولیتر از نمونه DNA مورد نظر لود شده است، غلظت به دست آمده در ۴ میکرولیتر است و چون به دست آوردن میزان DNA در یک میکرولیتر مورد نظر است، می‌بایست عدد به دست آمده بر ۴ تقسیم شود.

این عدد غلظت باند مورد نظر را در نمونه اولیه نشان می دهد که واحد آن مایکروگرم بر مایکرولیتر است.