University of Isfahan

Faculty of Biological Science and Technology

Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology

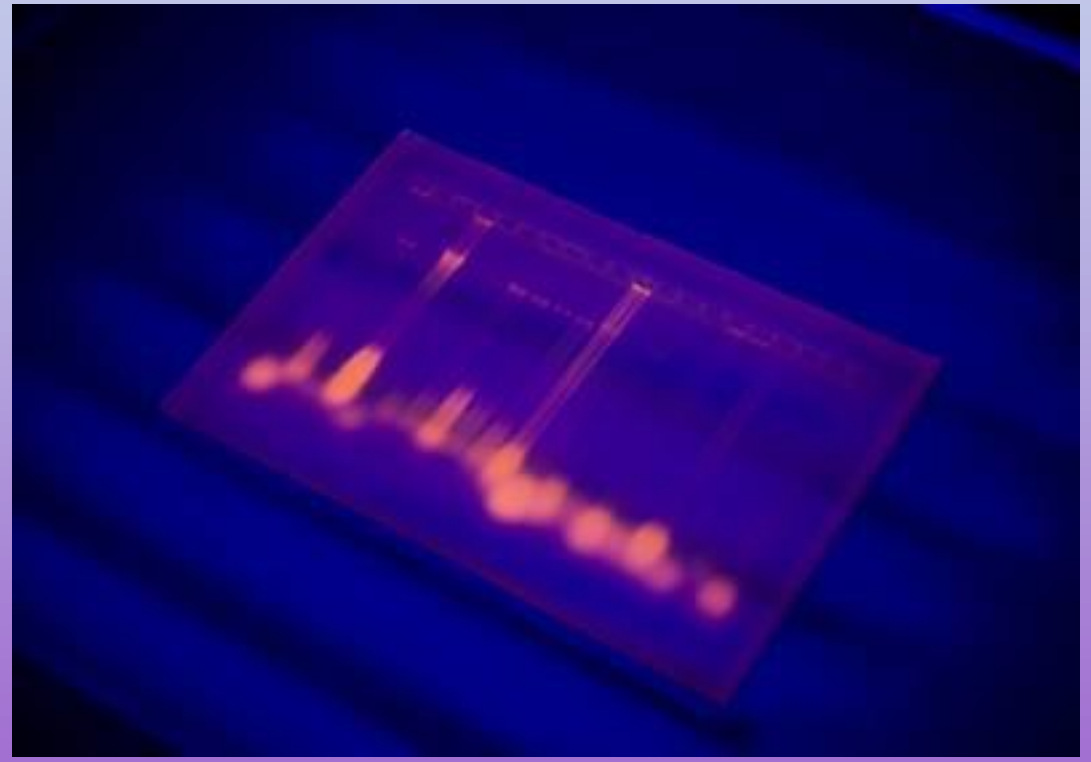
Farzaneh Forouharfar

استخراج DNA از ژل آگارز
(Extraction of Digested DNA From Agarose Gel)

Farzaneh Forouharfar

اهداف آزمایش:

- ✓ تهیه ژل آگارز
- ✓ بریدن قطعه DNAمورد نظر از روی ژل
- ✓ استخراج DNA (ناقل و insert) از ژل
- ✓ تعیین غلظت DNAنهایی مجددا توسط ژل الکتروفورز



مقدمه

الکتروفورز عبارت است از مهاجرت یون‌ها در یک میدان الکتریکی و یکی از روش هاي تشخیص و اندازه گیری مولکول‌های باردار محسوب می‌شود. به این صورت که با ایجاد یک میدان الکتریکی باعث حرکت اجسام دارای بار منفی به قطب مثبت و اجسام دارای بار مثبت به طرف قطب منفی می‌شود.

DNA و RNA به دلیل یون های فسفات و هم چنین به دلیل اتصال مولکول‌های SDS به آنها، (مولکول‌های SDS بار منفی دارند)، دارای بار منفی زیادی می‌باشند و به همین دلیل به طرف قطب مثبت حرکت می‌کنند. از آنجا که سرعت قطعات سبک‌تر در حرکت از قطعات سنگین‌تر بیشتر است، قطعات مختلف DNA از هم جدا می‌شوند و نوارهای مختلفی را تشکیل می‌دهند. با استفاده از قطعات شاهد با وزن مولکولی مشخص(مارکر) می‌توان وزن مولکولی قطعات مجهول را پیدا کرد.

ژل الکتروفورز
- پلي‌آکریل آمید 50-500bp: دقت بالا، تفاوت‌های تك نوکلئوتیدی را هم نشان می‌دهد.
- آگارز:مناسب برای بیش‌تر از 500bp .درصدهای متفاوتی دارد.

جذب اسپکتوفتومتر ۲۶۰/۲۸۰

- ۱.۸
- بیشتر: آلودگي به RNA
- کمتر: آلودگي به پروتئين

Farzaneh Forouharfar

عوامل موثر بر حرکت مولکول ها در الکتروفورز:

۱- شدت بار الکتریکي: هر چه بار الکتریکی مولکول‌ها بیشتر باشد، حرکت سریع‌تر خواهد شد.

۲- ولتاژ جریان الکتریکی: با افزایش اختلاف پتانسیل بین دو قطب، مولکول‌ها سریع‌تر حرکت می‌کنند.

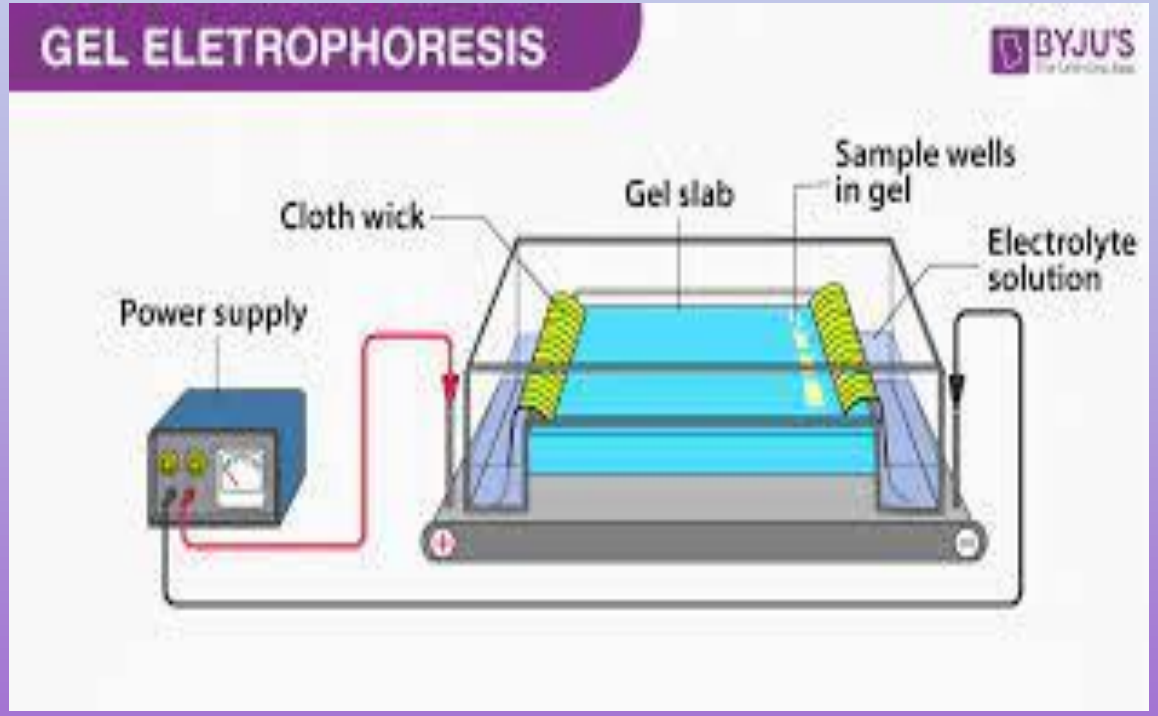
۳- حجم مولکول ها: مولکول‌های درشت‌تر، آهسته‌تر حرکت می کنند.

۴- ویسکوزیته محیط: مولکول‌ها در محیطی که چسبندگی آن زیاد باشد آهسته‌تر حرکت می‌کنند.

۵- شکل مولکول‌ها: مولکول‌ها با شکل منظم، سریع‌تر و با شکل نامنظم،کندتر حرکت می‌کنند.

۶- دما: افزایش دما باعث افزایش سرعت حرکت مولکول‌ها می‌شود ولی در

مورد مولکول‌هایی مانند پروتئین‌ها، باید دناتوره شدن آن ها را نیز در نظر گرفت.


GEL ELETROPHORESIS
BYJU'S
Sample wells in gel
Gel slab
Cloth wick
Electrolyte solution
Power supply

روش تهیه ژل آگارز برای جداسازی DNA و RNA:

درصد ژل آگارز معرف میزان آگارز بکار رفته واندازه خلل و فرج ژل است. (با توجه به اندازه قطعه)

۱. در این آزمایش ابتدا ژل ۱ درصد آگارز تهیه مي شود. یعنی ۱ گرم آگارز را در ۱۰۰ سی‌سی بافر TBE ریخته و برای تغییر حجم از یک تناوب ساده استفاده می‌شود. مثلاً اگر بخواهید ۲۰ سی‌سی ژل آگارز تهیه کنید، میزان آگارز مورد نیاز ۰.۲ خواهد بود.
در این مرحله پودر و بافر همراه آن را روی حرارت بگذارید تا پودر حل شود و یک محلول رقیق به دست آید. بعد آن را از روی حرارت بردارید و صبر کنید تا خنک شود، به اندازه‌ای که دست نسوزد. در این مرحله به آن اتیدیوم برمايد اضافه کنید تا حد که ژل رنگ بگیرد. قبل از اینکه ژل بسته شود باید آن را به سینی که قبلا آماده کرده‌اید منتقل کنید. برای آماده کردن سینی، لبه‌های آن را با چسب اتوکلاو ببندید و شانه را در محل خود گذاشته و سینی را روی پایه مخصوص در وضعیت افقی قرار دهید.

۲. آگارز مذاب را که تا دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد سرد شده به آرامی در سینی ژل بریزید. ضخامت ژل باید حدود ۵ میلی‌متر باشد، بطوریکه چاهک‌هایی که توسط شانه ایجاد می‌شوند بسته نشوند.گاهی اوقات همان طور که اشاره شد می‌توان به محلول اتیدیوم برومايد اضافه کرد. در این صورت پس از پایان الکتروفورز نیازی به رنگ آمیزی نیست.

Farzaneh Forouharfar

۳. پس از بسته شدن کامل ژل و برداشتن شانه و چسب‌های اتوکلاو، ژل روی تانک الکتروفورز سوار می‌گردد. به هنگام سوار کردن ژل باید دقت شود که چاهک‌ها به سمت قطب منفی باشند. در تانک الکتروفورز از همان بافر TBE استفاده می شود. یعنی هم نوع بافری که در تهیه ژل بکار می‌رود.

۴. پس از قرار دادن تمام نمونه‌ها در داخل چاهک‌های ژل و بستن در تانک، دستگاه را روشن کنید. همان طور که گفته شد، سیم‌های رابط باید به گونه‌ای متصل باشند که DNA از قطب منفی به قطب مثبت حرکت کند. یک بافر loading به همراه نمونه‌ها در چاهک دارید که به محلول DNA و TBEرنگ می‌دهد و شما می‌توانید حرکت این بافر را ببینید. این بافر برموفنول بلو است و به خاطر داشتن گلیسین در آن، DNAسنگین می‌شود و در ته چاهک می‌نشیند. علاوه بر این، بافر loading از DNA جدا شده و جلوتر حرکت می‌کند و با دنبال کردن حرکت آن می‌توان از میزان حرکت DNA اطلاع یافت و قبل از اینکه نمونه از ژل خارج شود، جریان برق را قطع کرد.

۵. پس از اتمام مدت الکتروفورز و خاموش کردن دستگاه، با احتیاط ژل را از درون آن خارج کنید. در صورتی که اتیدیوم برماید در داخل ژل موجود باشد، ژل بلافاصله زیر لامپ UV مشاهده می‌گردد. در غیر این صورت پس از قرار دادن ژل به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در محلول ۰.۵-۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر اتیدیوم برماید، جهت رنگ آمیزی و ۵ دقیقه در بافر TBE یا بافر E جهت شستشوی رنگ اضافی، نوارهای DNA روی لامپ UV مورد مشاهده قرار می‌گیرند.

Farzaneh Forouharfar

نکاتی در رابطه با ژل الکتروفورز:

- علاوه بر بافر TBE ، بافرهای TA، TB، TAE نیز استفاده می‌شود. TA و TB فاقد EDTA است. ولی بهترین بافر همان TBE است و حسنی که دارد این است که بارها می‌تواند استفاده شود حتی اگر رنگش عوض شود. در صورتی که رنج جداسازی DNA بالا باشد و تعداد قطعات زیاد باشد، از بافر TAE استفاده می‌شود تا قدرت حل کردن ژل بالا رود، ولی چون یک بار مصرف است و استفاده از آن مشکل‌تر است، از TAE کمتر استفاده می‌شود.

  برای جداسازی قطعات کوچکتر از 200b از ژل پلی‌آکریل آمید استفاده می‌شود.

- از همان بافری که در تهیه ژل استفاده می‌شود در تانک نیز استفاده می‌شود. با این تفاوت که بافر موجود در ژل یک بار مصرف است ولی بافری که در تانک ریخته می‌شود می‌تواند چند بار مصرف باشد.

- درصد ژل بین ۰.۷-۲.۵ است. هر چه درصد ژل بالاتر باشد یعنی منافذی که در ژل ایجاد می‌شود کوچکتر است و قدرت ژل برای جداسازی قطعات کوچکتر بالاتر می رود.

Farzaneh Forouharfar

- انواعی از ژل آگارز مانند low melting temperature وجود دارد که برای جداسازی آسان‌تر DNA از ژل استفاده می‌شود و در دمای پایین ذوب می‌شود. ولی قیمت این ژل بسیار گران است.
- ژل را نباید داغ ریخت زیرا موجب ذوب شدن چسب‌های مورد استفاده در سینی می‌شود.
- زمانی که شانه را در سینی قرار می‌دهید باید فاصله مناسبی تا کف سینی داشته باشد، به طوری که یک برگ کاغذ به راحتی از زیر آن عبور کند.
- اتیدیوم برماید یک ماده موتاژن قوی است و هنگام کار با آن باید مواظب بود. اتیدیوم برماید را باید پس از ولرم شدن ژل، اضافه کنید. این ماده خاصیت فلورسنت دارد و زیر نور UV، DNA را قابل مشاهده می‌کند.
- به چهار علت DNAرا الکتروفورز مي كنند:

۱. مشاهده ۲. جداسازی ۳. تعیین غلظت و ۴. تعیین وزن مولکولی

این آزمایش به منظور جداسازی ژن اینترفرون به همراه جایگاه برش EcoRI در دو طرف صورت می گیرد. در این آزمایش یک قطعه 1.5 KB از روی ژل جدا می‌گردد.

Farzaneh Forouharfar

Agarose Gel Electrophoresis
Gel Tank (With Agarose Gel)
Power Supply
Universe84a

مراحل کار:

الف)

۱. توسط razer، باند مورد نظر را از روی ژل در زیر نور UV جدا کنید. در حین جداسازی باید دقت شود کمترین میزان ژل بریده شود و آسیبی به باند DNA نرسد. ژل های بریده شده را در ایندروف قرار دهید و مراحل زیر را روی آن انجام دهید :

۲. وزن قطعه ژل حاوی DNA مورد نظر را به دست آورید و با دانستن اینکه ۱ گرم معادل ۱ میلی لیتر است حجم قطعه ژل حاوی DNA را به دست آورید.

اگر وزن قطعه ژل کمتر با برابر ۰.۴ گرم باشد، بهتر است و می‌توان تمام مراحل بعدی را در یک ایندروف ۱.۵ میکرولیتری انجام داد. در صورتیکه میزان قطعه بیش از این مقدار باشد باید آن را به ۲ قسمت تقسیم کرد.

ب) جدا نمودن DNA از قطعه ژل حاوی آن

۱. سه برابر حجم به دست آمده در مرحله سوم، محلول binding به اپندروف اضافه کنید.

۲. اپندروف‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری انکوبه می‌کنیم و هر ۲ تا ۳ دقیقه یک بار ورتکس مختصری انجام دهید تا محلول پخش شده و کاملا در ژل نفوذ کند.

۳. به میزان ۵ میکرولیتر از محلول silica powder اضافه کنید.

۴. نمونه‌ها را در بن ماری ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه قرار دهید. (رسوب DNA)

۵. به مدت ۵ ثانیه با حداکثر سرعت، سانتریفوژ کنید.

۶. محلول رویی را به یک ویال دیگر منتقل کنید.

۷. مجددا ویال حاوی پودر سیلیکا را به مدت ۲ تا ۳ دقیقه سانتریفوژ کرده و محلول رویی را توسط سمپلر به ویال حاوی محلول اولی اضافه کنید.

۸. ۳۰۰ میکرولیتر از محلول binding را به رسوب حاصله اضافه کنید و سپس تکان داده، آن را به مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار دهید و سپس آن را با حداکثر سرعت سانتریفوژ کرده و محلول رویی را دور بریزید.

۹. بافر شستشو را روی یخ بگذارید تا کاملا سرد شود. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از آن را به رسوب اضافه کنید.

۱۰. ۳ تا ۵ ثانیه با حداکثر سرعت سانتریفوژ کنید و محلول رویی را جدا کرده و دور بریزید. این محلول حاوی پودر سیلیکا و بافر شستشو می باشد.

این مرحله را سه بار تکرار کرده و هر بار ۵ میکرولیتر از محلول را جدا کنید.

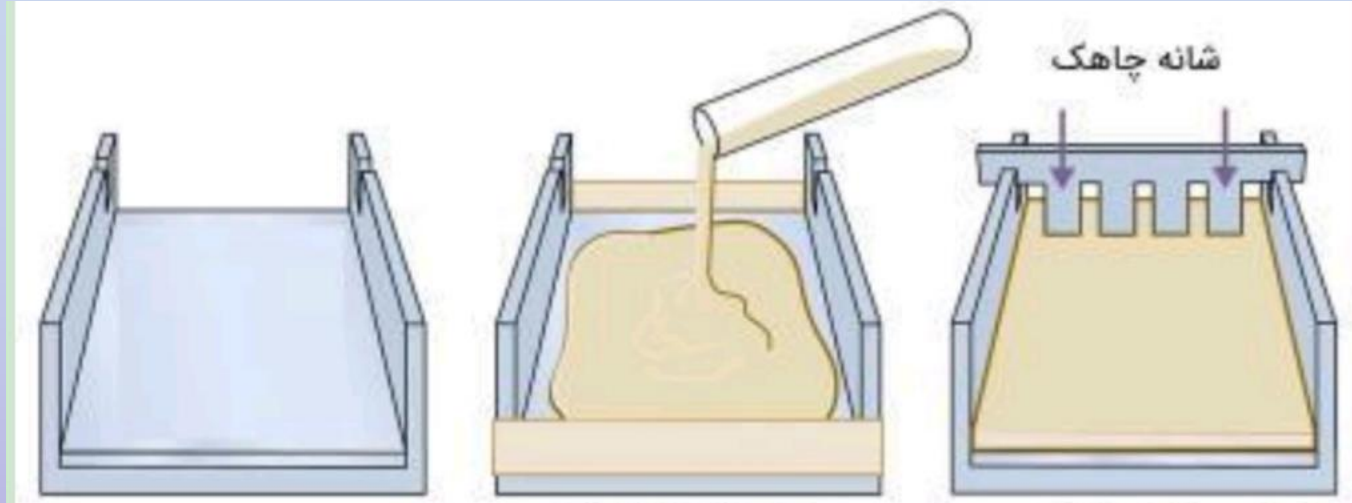
در انتها اپندروف را به مدت ۳۰ ثانیه در دور 11k سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را به یک ویال جدید منتقل کنید تا اگر بقایایی از سیلیکا وجود دارد خارج گردد.

در اینجا نمونه ها آماده ligation هستند. حتی می‌توان بر روی آنها PCR انجام داد. هم چنین برای تائید عملکرد مراحل می‌توانید مجددا ۱ میکرولیتر از نمونه‌های حاصل را روی ژل TBE لود کنید و به این ترتیب غلظت نمونه‌ها کاملا مشخص شود.

محلول مارکری که استفاده می شود شامل ۲ میکرولیتر مارکر، ۱ میکرولیتر باقر لودینگ و ۳ میکرولیتر TE است.

نکاتی در رابطه با استخراج DNA هضم شده از ژل:

- DNA را روی ژل TAE ، لود کنید زیرا در TBE بوریک اسید وجود دارد که از اتصال قطعات DNA به سیلیکا جلوگیری می کند.
- محلول binding در اتصال DNA به سیلیکا کمک می کند. سیلیکا باعث سنگینی DNA و رسوب آن و جدا شدن از آگارز می‌شود.

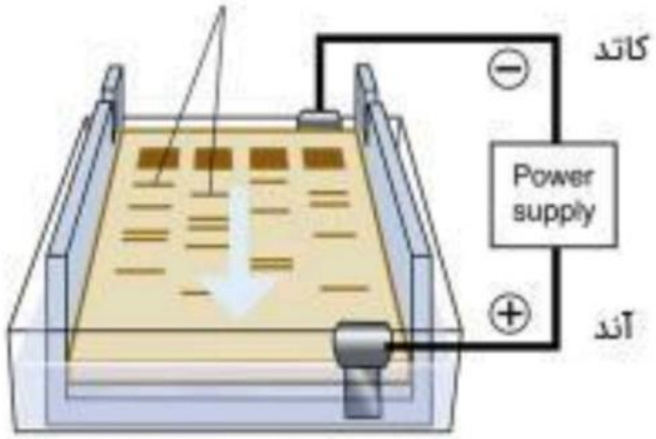


قرار دادن شانه چاهک روی ژل

ریختن ژل در کاست و
مسدود کردن کاست

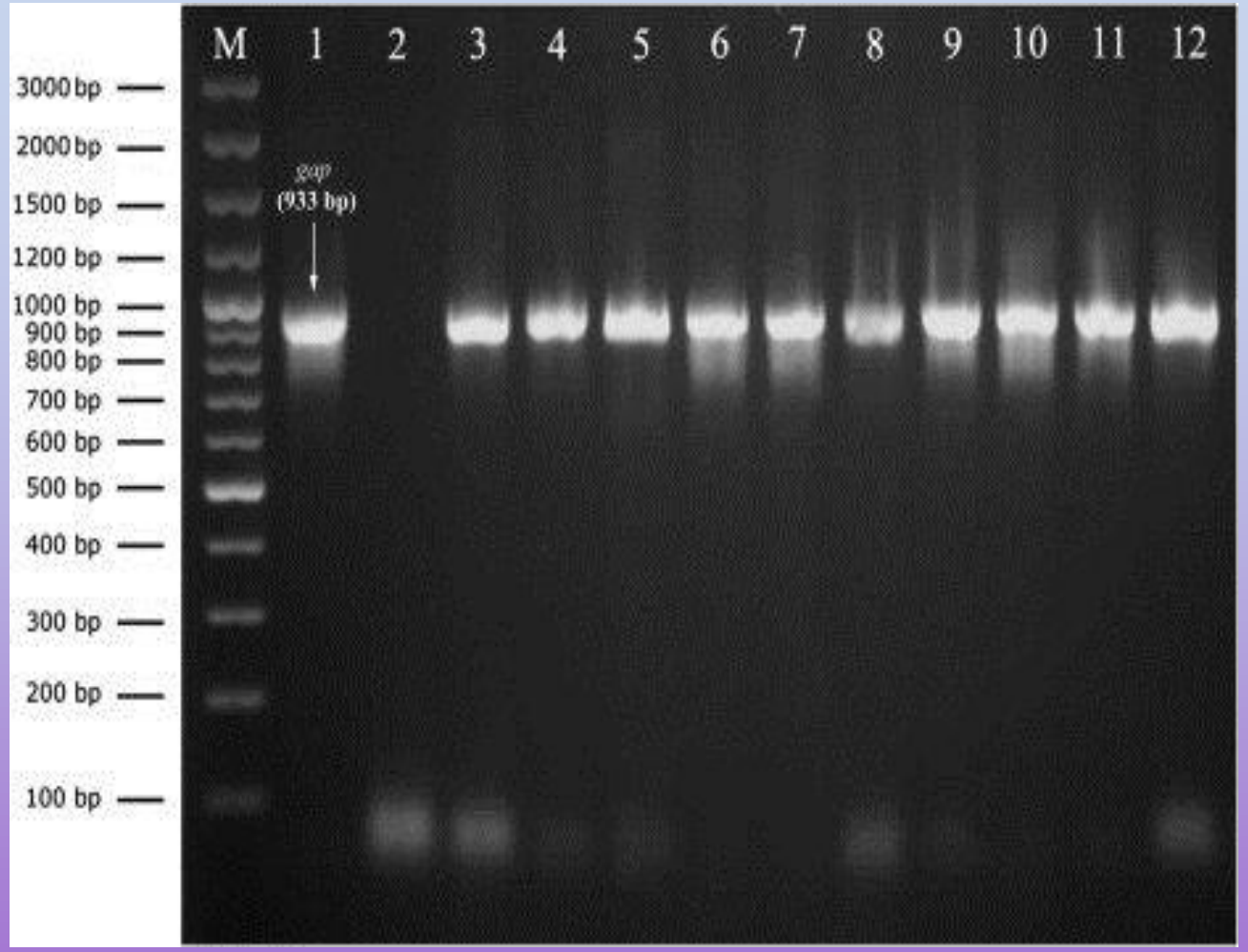
کاست ژل

نمونه‌ها در طول ژل به سمت قطب مثبت حرکت می‌کنند



DIGITAL ELECTROPHORESIS POWER SUPPLY
MAINS
OFF
ON
VOLTMETER
AMP METER
EROSE
OUTPUT
300VDC
100mA
VOLT

300
C.B.S. SCIENTIFIC


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)