الکتروفورژ

الکتروفورژ یک تکنیک آزمایشگاهی است که از میدان الکتریکی برای جداسازی مولکول‌هایDNA ، RNAیا پروتئین بر اساس اندازه، بار الکتریکی و ساختار آنها استفاده می‌کند.

۱.اصول عملکرد(Working Principle)

در الکتروفورژ، مولکول‌های باردار در یک میدان الکتریکی درون یک ماتریکس ژل) آگارز برای DNA/RNA یا پلی‌آکریل آمید برای پروتئین‌ها (مهاجرت می‌کنند .مولکول‌های کوچک‌تر سریع‌تر حرکت می‌کنند و مسافت بیشتری را طی می‌کنند، در حالی که مولکول‌های بزرگ‌تر کندتر حرکت می‌کنند.

مقایسه انواع الکتروفورز:

نوع	ماتریکس	کاربرد اصلی
الکتروفورژل آگارز	آگارز	جداسازی DNA و) RNA قطعات بزرگ(
الکتروفورژ ژل پلی‌آکریل آمید(SDS-PAGE)	پلی‌آکریل آمید	جداسازی پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی
الکتروفورژ مویرگی(Capillary Electrophoresis)	مویرگ	آنالیز با وضوح بالا، توالی‌یابیDNA

۲.تجهیزات و مواد مصرفی(Equipment & Consumables)

تجهیزات اصلی:

جزء	توضیح
پاور ساپلای(Power Supply)	تأمین ولتاژ و جریان الکتریکی ثابت
تانک الکتروفورز(Electrophoresis Tank)	محفظه حاوی بافر و ژل، مجهز به الکترودهای مثبت و منفی
قالب ریخته‌گری ژل(Gel Casting Assembly)	شامل صفحات شیشه‌ای با فاصله‌انداز (۱,۵/۱,۰/۰,۷۵ میلی‌متر)
سیستم مستندسازی ژل(Gel Documentation)	برای مشاهده و ثبت تصاویر ژل زیر نورUV
میکروپیپت و نوک	برای بارگذاری نمونه‌ها در چاهک‌ها

مواد مصرفی رایج برای) SDS-PAGE پروتئین:[citation](

ماده	نقش
اکریل آمید/بیس‌اکریل آمید(Acrylamide/Bis)	تشکیل ماتریکس ژل برای جداسازی پروتئین‌ها
بافر تریس(Tris Buffer)	حفظ pH پایدار) بافر جداکننده pH ۸,۸، بافر چگالنده pH ۶,۸(
) SDSسدیم دودسیل سولفات(	دناتوره کردن پروتئین‌ها و ایجاد بار منفی یکنواخت
) APSآمونیوم پرسولفات(	آغازگر پلیمریزاسیون (محلول ۱۰٪ در آب)
TEMED	شتاب‌دهنده پلیمریزاسیون
بافر رانینگ(Running Buffer)	محیط هدایت جریان الکتریکی :TGS) تریس-گلیسین(SDS-

---

۳. هشدارهای ایمنی ⚠ – (Safety Hazards) بسیار مهم

الکتروفورز دارای خطرات جدی است که باید رعایت شوند:

خطرات الکتریکی:(Electrical Hazards)

خطر	اقدام ایمنی
شوک الکتریکی کشنده	دستگاه‌های الکتروفورز در ولتاژ ۱۰۰ ولت می‌توانند شوک ۲۵ میلی‌آمپر (کشنده) ایجاد کنند
اتصالات مرطوب	هرگز با دست خیس به سیم‌ها و دستگاه دست نزنید
اتصال کوتاه	قبل از اتصال سیم‌ها، پاور را خاموش کنید

قوانین طلایی ایمنی الکتریکی:[citation]

- ✅همیشه قبل از باز کردن درب تانک، پاور را خاموش و سیم‌ها را جدا کنید
- ✅از پاورهایی با قفل ایمنی (Safety Interlock) استفاده کنید
- ✅دستگاه را بدون مراقبت روشن نگذارید
- ✅تانک الکتروفورز باید حتماً درب داشته باشد

خطرات شیمیایی:[citation](Chemical Hazards)

ماده	خطر
اکریل آمید(Acrylamide)	سرطان‌زا، نوروتوکسین، تحریک‌کننده
اتیدیوم بروماید(Ethidium Bromide)	جهش‌زا(Mutagen) ، تحریک‌کننده
فنول(Phenol)	خورنده، سمی
کلروفرم(Chloroform)	سرطان‌زا، سمی

اقدامات ایمنی:

- تهیه ژل و کار با مواد خطرناک در هود شیمیایی انجام شود
- از دستکش نیتریل (نه لاتکس) استفاده کنید
- از عینک ایمنی استفاده کنید

خطرات اشعه:UV

هنگام مشاهده ژل روی ترانس‌ایلومیناتورUV ، از عینک یا محافظ صورت مناسب استفاده کنید.

---

۴. روش کار گام به گام(Step-by-Step Procedure)

این روش برای الکتروفورز پروتئین (SDS-PAGE) با استفاده از سیستم Bio-Rad ارائه شده است.[citation]

مرحله ۱: آماده‌سازی بافر رانینگ(Running Buffer Preparation)

از بافر **TGS (Tris-Glycine-SDS)**استفاده کنید.

تهیه بافر مادر ۱۰×:

ماده	مقدار برای ۱۰۰۰ میلی‌لیتر
تریس(Tris)	۳۰٫۲۸ گرم
گلیسین (Glycine)	۱۴۴٫۱۳ گرم
SDS	۱۰ گرم

pHنهایی باید حدود ۸٫۳ باشد.

تهیه بافر کار ۱ :× ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر مادر + ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر

مرحله ۲: آماده‌سازی ژل(Gel Preparation)

انتخاب درصد ژل بر اساس وزن مولکولی پروتئین‌ها:

درصد ژل	محدوده وزن مولکولی مناسب
۶٪	۵۰-۲۰۰ کیلودالتون
۸٪	۳۰-۱۲۰ کیلودالتون
۱۰٪	۲۰-۸۰ کیلودالتون
۱۲٪	۱۰-۵۰ کیلودالتون
۱۵٪	< ۳۰ کیلودالتون

تهیه ژل جداکننده (Resolving Gel) ۱۰٪) برای دو ژل ۱,۵ میلی‌متری:(

ماده	مقدار
آب مقطر	۳,۹۶ میلی‌لیتر
۳۰٪ آکریل آمید	۳,۳۴ میلی‌لیتر
۱,۵ Mتریس pH) ۸,۸(	۲,۵۰ میلی‌لیتر
SDS۱۰٪	۱۰۰ میکرولیتر
APS۱۰٪	۵۰ میکرولیتر
TEMED	۵ میکرولیتر

تهیه ژل چگالنده:(Stacking Gel)

ماده	مقدار
آب مقطر	۲,۸۵ میلی‌لیتر
۳۰٪ آکریل آمید	۰,۷۵ میلی‌لیتر
۱,۰ Mتریس pH) ۶,۸(	۱,۲۵ میلی‌لیتر
SDS۱۰٪	۵۰ میکرولیتر
APS۱۰٪	۲۵ میکرولیتر
TEMED	۵ میکرولیتر

مراحل ریختن ژل:[citation]

۱. صفحات شیشه‌ای را تمیز و مونتاژ کنید
۲. مواد ژل جداکننده را به ترتیب اضافه کنید TEMED) را آخر اضافه کنید(
۳. محلول را بین صفحات بریزید (تا حدود ۱,۵ سانتی‌متر از بالای صفحه کوتاه)
۴. روی ژل آب مقطر بریزید تا سطح صاف شود
۵. بگذارید ۴۰-۲۰ دقیقه پلیمریزه شود
۶. آب رویی را تخلیه کنید

۷. مواد ژل چگالنده را مخلوط کرده و روی ژل جداکننده بریزید
۸. شانه را وارد کرده و بگذارید پلیمریزه شود

مرحله ۳: آماده‌سازی نمونه[citation](Sample Preparation)

جزء	نمونه احیاشده (Reduced)	نمونه غیراحیاشده(Non-Reduced)
نمونه پروتئین	Xمیکرولیتر	Xمیکرولیتر
بافر لودینگ ۴×	۲٫۵ میکرولیتر	۲٫۵ میکرولیتر
عامل احیا DTT) یا-β ME)	۱ میکرولیتر	—
آب دیونیزه	۶٫۵ X - میکرولیتر	۷٫۵ X - میکرولیتر
حجم نهایی	**۱۰ میکرولیتر**	**۱۰ میکرولیتر**

نکات مهم:[citation]

- نمونه را به مدت **۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد** حرارت دهید (هرگز نجوشانید)
- قبل از بارگذاری، نمونه را به آرامی سانتریفیوژ کنید
- حداکثر حجم بارگذاری: ۸۰ میکرولیتر برای ژل ۱۰ چاهکی

مرحله ۴: مونتاژ تانک الکتروفورز[citation]

۱. واشرهای سیلیکونی را در موقعیت صحیح قرار دهید) اگر از ژل mPAGE استفاده می‌کنید، واشرها را برعکس کنید تا نشتی بافر جلوگیری شود(
۲. کاست ژل را با صفحه کوتاه رو به داخل هسته مرکزی قرار دهید
۳. کاست دوم را در سمت دیگر قرار دهید
۴. هسته مرکزی (Core) را در تانک الکتروفورز قرار دهید
۵. بافر رانینگ ۱× را داخل هسته بریزید (تا بالای چاهک‌ها)
۶. بافر را در بیرون هسته (محفظه خارجی) بریزید

مرحله ۵: بارگذاری نمونه و اجرای ژل

بارگذاری نمونه:[citation]

- نوک پیپت را به صورت عمودی وارد چاهک کنید
- نمونه را به آرامی تزریق کنید
- از ایجاد حباب خودداری کنید

شرایط اجرا:[citation]

بافر	ولتاژ	زمان تقریبی
MES برای پروتئین‌های >۲۰ کیلودالتون)	۱۸۰ ولت	۴۰-۲۲ دقیقه
MOPS برای پروتئین‌های <۲۰ کیلودالتون)	۲۰۰ ولت	۳۶-۲۷ دقیقه

نکته : MES سریع‌تر اجرا می‌شود و جداسازی بهتری برای پروتئین‌های با وزن مولکولی پایین دارد .MOPS برای پروتئین‌های با وزن مولکولی متوسط و بالا مناسب‌تر است.[citation]

مرحله ۶: خارج کردن ژل[citation]

۱. پاور و سیم‌ها را جدا کنید
۲. درب تانک را بردارید
۳. کاست‌ها را از هسته خارج کنید
۴. با استفاده از ابزار بازکننده کاست(Gel Cassette Opener) ، صفحات را از دو طرف باز کنید
۵. ژل را به آرامی از صفحه جدا کرده و برای رنگ‌آمیزی یا وسترن بلات در بافر مناسب قرار دهید

---

۵. انتخاب بافر مناسب[citation](MES vs MOPS)

بافر	زمان اجرا	محدوده وزن مولکولی بهینه
MES	سریع‌تر (۳۰-۲۲ دقیقه)	پروتئین‌های کوچک (< ۲۰ کیلودالتون)
MOPS	کندتر (۳۶-۳۱ دقیقه)	پروتئین‌های متوسط تا بزرگ (> ۲۰ کیلودالتون)

---

۶. عیب‌یابی مشکلات رایج (Troubleshooting)

مشکل	علت احتمالی	راه‌حل
باندها کشیده یا پخش شده	نمونه بیش از حد بارگذاری شده	مقدار نمونه را کاهش دهید
باندهای کج (Smiling Effect)	حرارت نامناسب، بافر کهنه	از بافر تازه استفاده کنید، ولتاژ را کاهش دهید
عدم مشاهده باند	نمونه کم، رنگ‌آمیزی نامناسب	مقدار نمونه را افزایش دهید، روش رنگ‌آمیزی را بررسی کنید
نویز پس‌زمینه بالا	ژل کثیف، بافر آلوده	از بافر تازه استفاده کنید، ژل را در آب مقطر بشویید
نشتی بافر	واشرها معیوب هستند	واشرها را بررسی و تعویض کنید

۷.چک‌لیست سریع برای کاربران

مرحله	اقدام	انجام شد؟
۱	دستکش نیتریل، روپوش و عینک ایمنی پوشیده شده؟	☐
۲	بافر رانینگ تازه تهیه شده؟	☐
۳	ژل پلیمریزه شده و شانه بدون آسیب خارج شده؟	☐
۴	نمونه‌ها با بافر لودینگ مخلوط و حرارت دیده) ۷۰°C، ۱۰ دقیقه(؟	☐
۵	تانک مونتاژ و از نظر نشتی بررسی شده؟	☐
۶	نمونه‌ها در چاهک‌ها بارگذاری شده (نوک عمودی)؟	☐
۷	ولتاژ صحیح تنظیم شده و اجرا شروع شده؟	☐
۸	پس از پایان، پاور خاموش و سیم‌ها جدا شده؟	☐
۹	ژل خارج شده و برای مرحله بعد آماده است؟	☐

✨جمع‌بندی نهایی

الکتروفورزیکی از اساسی‌ترین تکنیک‌های زیست‌شناسی مولکولی برای جداسازیDNA ، RNAو پروتئین‌ها است. با رعایت اصول زیر می‌توانید نتایج قابل اعتمادی به دست آورید:

۱. 🔒**ایمنی اولویت اول** –قبل از باز کردن تانک، پاور را خاموش کنید. همیشه از دستکش نیتریل و عینک ایمنی استفاده کنید[citation]

۲. ⚙**انتخاب ژل مناسب** –درصد ژل را بر اساس وزن مولکولی هدف انتخاب کنید

۳. 🌡**دما و ولتاژ صحیح** –نمونه را در ۷۰ درجه سانتی‌گراد حرارت دهید (هرگز نجوشانید)[citation]

۴. **بافر تازه** –از بافر رانینگ تازه و با pH صحیح استفاده کنید
۵. **بارگذاری یکسان** –حجم و غلظت نمونه را در لاین‌های مختلف یکسان کنید
۶. **انتخاب بافر مناسب** MES –برای پروتئین‌های کوچک، MOPSبرای پروتئین‌های بزرگ[citation]