مجله علوم دانشگاه تهران
جلد بیست و نهم (۱۳۸۲) شماره ۲ (۲۹۲-۲۷۹)

طراحی و ساخت الکتروفورز میدان‌پالسی و بررسی‌کارآئی‌آن درجداسازی اسیدهای‌نوکلئیک

هدایت اله قورچیان[۱] و نعمت‌اله دوستی[۲]
۱ـ مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران
E-mail: hadi@ibb.ut.ac.ir
۲ـ دانشکده فنی، دانشگاه تهران
(دریافت: ۸۰/۱/۲۷ ؛ پذیرش:۸۱/۹/۹)

چکیده

الکتروفورز میدان پالسی روشی است که از طریق جداسازی و شناسائی مولکول‌های درشت DNA نقش مهمی در توسعه فناوری نوترکیب و دست یابی به‌اطلاعاتی از ساختار ژن و عملکرد آن و در نهایت تهیه نقشه‌های ژنی داشته است. درطی بیست سال گذشته طرح‌های مختلفی از این روش به بازار عرضه شده است که در این تحقیق یکی از کارآترین آنها به عنوان الگو در نظر گرفته شده و دستگاهی‌بر اساس آن طراحی و ساخته شده است. در گزارش حاضر ضمن بررسی اجزاءِ این‌طراحی و مراحل ساخت آن، اصول کار این روش و کارآیی دستگاه ساخته شده مورد بررسی قرار گرفته است. آزمایش‌های انجام شده نشان داد که دستگاه ساخته‌شده قادر است نمونه‌های سنگین DNA در گستره‌ای از وزن مولکولی $۱۰^{۹}$ - ۵×۱۰^{۷} (۲۲۰۰ - ۹۰ Kbp) را تفکیک نماید . مطالعه بیشتر برای بهینه‌نمودن شرایط کار دستگاه ادامه دارد.

واژه‌های کلیدی: *الکتروفورز میدان‌پالسی، ژل‌الکتروفورز، الکتروفورز اسیدهای‌نوکلئیک، آگارز الکتروفورز.*

مقدمه

الکتروفورز: وقتی‌که ذرات باردار معلق دریک محیط مناسب، مثل یک ژل، تحت‌اثر میدان الکتریکی خارجی قرار گیرند، به سوی قطب مخالف به حرکت در می‌آیند به گونه‌ای که سرعت حرکت آنها توسط نسبت بار به وزن کنترل می‌شود. به این‌روش که منجر به جداسازی ذرات از یکدیگر می‌شود الکتروفورز (Electrophoresis)گفته می‌شود .مولکول‌های زیستی مانند اسیدهای آمینه، پپتیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک دارای گروه‌های یونیزه شونده هستند و درمحیط‌های آبی تفکیک شده به صورت ذرات باردار در می‌آیند، از این رو می‌توان‌آنها را به روش الکتروفورز از همدیگر جداسازی نمود.

محیط‌های جداسازی: محیط‌های مناسبی که تاکنون برای الکتروفورز مورداستفاده قرار گرفته است شامل کاغذ، سلولز استات، سیلیکا، آلومین، نشاسته، پلی‌اکریل آمید و آگارز است. ژل پلی‌اکریل‌آمید که از پلیمریزه شدن مونومرهای اکریل‌آمید توسط تابش ماورای بنفش یا آمونیوم پرسولفات ایجاد می‌شود معمولاً برای جداسازی پروتئین‌ها مناسب است. درحالیکه ژل آگارز که دارای منافذ درشت‌تری است معمولاً برای جداسازی اسیدهای نوکلئیک مورد استفاده قرار می‌گیرد. ژل‌های اکریل‌آمید و آگارز دارای منافذی است که اندازه آنها توسط غلظت مونومر مربوطه کنترل می‌شود. این ژل‌ها در حکم غربال مولکولی عمل نموده مولکول‌ها را از هم جدا می‌کنند. ژل اکریل‌آمید به دلیل خنثی بودن شیمیایی، در گستره وسیعی‌ازpH، دما و قدرت‌یونی پایدار بوده محیط مناسبی را برای الکتروفورز پروتئین‌ها فراهم می‌نماید. لیکن ژل آگارز برای جداسازی ساختارهای بیولوژیکی درشت‌تری‌مانند اسیدهای نوکلئیک یا ویروس‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

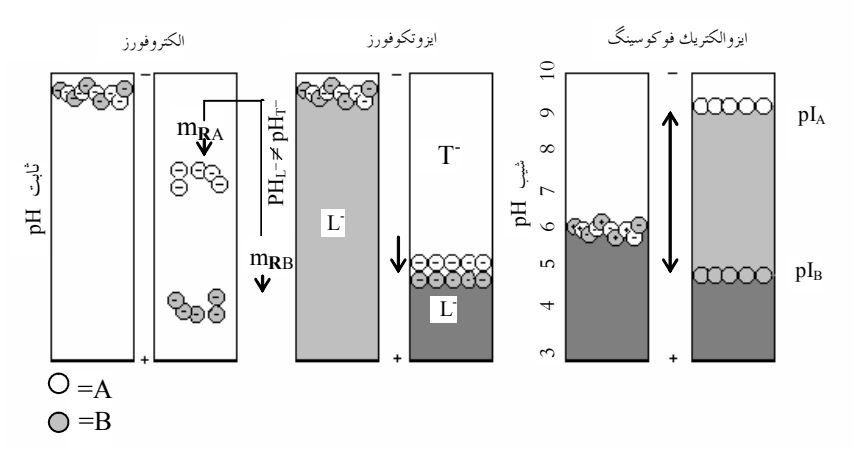
روش‌های الکتروفورز: به دلیل تعدد عوامل تأثیرگذار، الکتروفورز دارای روش‌های متنوعی است. دسته‌ای از روش‌های الکتروفورز که به لحاظ اصول نظری‌کاملا مشابه بوده لیکن در جزئیات تفاوت می‌کنند به شرح زیرند:

۱ـ الکتروفورز معمولی یا ناحیه‌ای (Zone electrophoresis)، که درآن سیستم بافری پیوسته با pH یکسان درسراسر مسیر الکتروفورز قرار می‌گیرد. از مشکلات‌این روش همرفت ناشی از گرمای تولید شده در اثر عبور جریان است که منجر به بی‌نظمی باندها در محیط نیمه جامد و بویژه در محیط مایع می‌شود.

۲ـ ایزوتکوفورز (Isotachophoresis)، که عمدتاً برای اهداف کمی مورد استفاده قرار گرفته و در آن جداسازی پروتئین‌ها در یک سیستم بافری ناپیوسته صورت می‌گیرد. در این روش اجزای نمونه درحین عبور از ژل، در حد فاصل دو الکترولیت جلودار و تعقیب کننده به حرکت

درمی‌آیند. سریعترین جزء در پشت یون‌های‌جلودار و کندترین جزء جلوتر از یون‌های تعقیب کننده به صورت لایه‌های نازک ومجزا قرار می‌گیرند.

۳ـ ایزوالکتریک فوکوسینگ (Isoelectric fucosing)، که با اهداف بررسی‌های کیفی، بررسی خلوص یا تهیه پروتئین صورت می‌گیرد و درآن از یک شیب pH برای جداسازی مواد آمفوتری مانند پروتئین‌ها و پپتیدها استفاده می‌شود. در این‌روش مولکول‌های پروتئین تا رسیدن بـهpH ایزوالکتریک خود حرکت نموده و درآن نقطه از حرکت باز می‌ایستند. البته اگر مولکول‌ها در اثر انتشار کمی جابجا شوند مجدداً باردار شده به موقعیت قبلی خود باز می‌گردند. به همین دلیل به آن الکتروفوکسینگ یا تمرکز در نقطه بی‌بار گفته می‌شود. شکل۱ اساس جداسازی‌هر یک از سه روش فوق را نشان می‌دهد (مصطفایی، ۱۳۷۸).



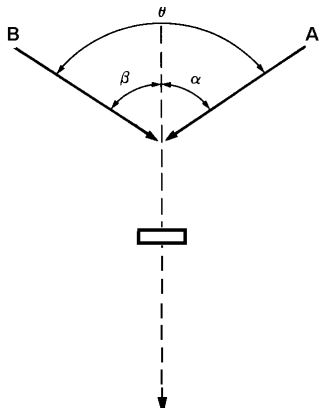
شکل۱- اساس جداسازی پروتئین‌ها در سه روش الکتروفورز متفاوت. A و B اجزای نمونه هستند. T و L نیز به ترتیب یون‌های الکترولیت تعقیب‌کننده و یون‌های الکترولیت جلودار را نشان می‌دهند.

دسته‌بندی دیگری از روش‌های الکتروفورز وجود دارد که براساس نوع میدان الکتریکی مورد استفاده در آنها می‌باشد. براین مبنا دو روش وجود دارد: الـف- الکتروفـورز میـدان‌پیوسـته یـا معمولی (Single field electrophoresis) که انواع آن در بالا اشاره شد. ب- الکتروفورز میـدان پالسی (Pulsed field electrophoresis) که درذیل به آن می‌پردازیم.

الکتروفورز میدان‌پالسی:درطی بیست سال گذشته، الکتروفـورز میـدان‌پالسـی ازطریـق جداسازی و شناسائی درشت مولکول‌هـای DNA، نقـش مهمـی درتوسـعه فنـاوری نوترکیـب (Recombinant DNA) داشته و منجربه دست‌یابی به‌اطلاعاتی‌از ساختار ژن و عملکرد آن شده اسـت (Berthlot–Herault *et al.,* 2002; Amigo *et al.,* 2002; Cornillot *et al.,* 2002

Simpson, *et al.,* 2002; Wang *et al.,* 2001; Mulvey *et al.,* 2001; Wagner *et al.,* 1994; Chambach *et al.,* 1991). ضرورت ابداع این روش از آنجا ناشی شد که الکتروفورز معمولی قادر به جداسازی مولکول‌های درشت DNA (بیش از ۵۰ کیلوباز) نبود. بررسی‌ها نشان می‌دهد که اگر اندازه مولکول از یک حد بزرگترشود، افزایش میدان نه تنها موجب جداسازی مولکول‌ها نمی‌شود بلکه بیشتر آنهارا با ژل درگیر(Self-trapping) می‌نماید (Noolandi *et al.,* 1987) ولی اگر دراین حالت برای مدتی‌میدان قطع شود یا میدان تغییر جهت دهد، مولکول فرصتی پیدا می‌کند که به حالت اولیه خود برگردد و در این حین با اعمال مجدد میدان در مسیر تازه‌ای قرار گیرد. این روش که در آن میدان الکتریکی یکنواخت نبوده بلکه به تناوب تغییر جهت می‌دهد را الکتروفورز میدان پالسی گویند. با بهره‌گیری از الکتروفورز میدان‌پالسی به جای الکتروفورز معمولی (میدان پیوسته) می‌توان مولکول‌های درشت‌تر از ۵۰ کیلو باز را از هم جدا نمود.

مکانیزم‌عمل در الکتروفورز میدان‌پالسی: با وجود استفاده شایانی‌که ازالکتروفورز میدان پالسی درمطالعه درشت مولکول‌ها شده‌است هنوز فهم نظری ما از این روش در مقیاس‌های مولکولی بسیار ناچیز است. لیکن همانطورکه در شکل۲ ملاحظه می‌شود دراین نوع الکتروفورز معمولاً دو میدان الکتریکی به‌تناوب و تحت زاویه‌ای مناسب نسبت به مسیر حرکت اعمال می‌شوند (Chambach *et al.,* 1991) شدت و زمان پالس‌ها دربرخی از انواع الکتروفورزها تا پایان عملیات ثابت است و دربرخی دیگر طی یک برنامه مشخص و متناسب با تنوع مولکول‌های موجود در نمونه‌تغییر می‌کند.



شکل۲- نمودار زوایای میدانهای الکتریکی و زاویه برهم‌کنش در الکتروفورز میدان‌پالسی. میدانA تحت زوایه α نسبت به مرکز ژل و میدانB تحت زاویه β نسبت به مرکز ژل (مسیرحرکت نمونه) اعمال‌می‌شود. θ زاویه برهم‌کنش است که از جمع دو زاویه α و β به‌دست می‌آید.

برای توصیف نحوه عملکرد الکتروفورز میدان پالسی، نظریه‌ای تحت عنوان‌الگوی خزیدن (Reptation model) ارائه شده است (De Gennes, 1971; Holmes & Stellwagen, 1990).

به طورخلاصه از نظراین مدل، مولکول دراثر پالس‌های متناوب از حالت کلاف خارج شده و به صورت‌رشته‌های کرم مانند درمی‌آید. آنگاه مولکول‌های DNA از درون مسیرهای لوله مانندی که از به دنبال هم قرارگرفتن منافذ در درون شبکه ژل ایجاد می‌شود همانندکرم می‌خزند (Holmes & Stellwagen, 1990; Lerman & Frisch, 1982). دراثر اعمال میدان الکتریکی متناوب و همچنین دراثر تغییردما و ایجاد حرکت‌های بروانی (Brownian motion)، مولکول DNAاز مسیر خودمنحرف شده وارد مسیرهای لوله مانند جدید می‌شوند Lalande *et al.,* 1987) (Shwartz & Cantor, 1984 و بدین‌ترتیب از گیرافتادن دریک مسیر خلاص شده دائماً به سمت جلو تغییر مسیر می‌دهد. در الکتروفورز میدان پالسی در هر تناوب جداسازی مولکول در درون ژل طی‌سه مرحله صورت می‌گیرد. نخست میدان الکتریکی در مدت محدودی (از چندمیکرو ثانیه تا چند ثانیه) به مولکول‌ها نیرو وارد نموده و آنها را به حرکت وادار می‌کند. در مرحله دوم شدت میدان برای مدت محدودی (از چند میکرو ثانیه تاچند ثانیه) تغییر می‌کند. این تغییر ممکن است به یکی از دو صورت زیر باشد:

الف- نیرو کاملاً قطع می‌شود و شدت آن پس از مدت کوتاهی به صفر می‌رسد. دراین صورت چون درمدت قطع میدان هیچ نیرویی به مولکول وارد نمی‌شود مولکول درجهت بازگشت به حالت اولیه خود به حرکت درمی‌آید. این حرکت تابع وزن مولکولی است و به طورجزئی موجب جدا شدن مولکول‌ها از هم می‌شود چرا که درمرحله بازگشت به حالت اولیه، مولکول راستای خود را به طور کاتوره‌ای (Random) از دست داده در مسیردیگری قرار می‌گیرد. این فرآیند برای مولکول‌های درشت‌تر نیازمند زمان بیشتری است (Lerman & Frisch, 1982; Lalande *et al.* 1988).

ب- نیرو قطع نمی‌شود بلکه برای مدت معینی جهت آن تغییر می‌کند. یعنی نیرو۱۸۰ درجه یا کمتر نسبت به حالت قبل تغییر جهت می‌دهد. دراین حالت مولکول‌ها برای قرار گرفتن درراستای جدید دچار تغییر شکل می‌شوند .سرعت‌این فرآیند از وزن مولکولی تبعیت می‌کند. یعنی مولکول‌های درشت‌تر برای قرارگرفتن در راستای جدید نیازمند زمان بیشتری هستند.

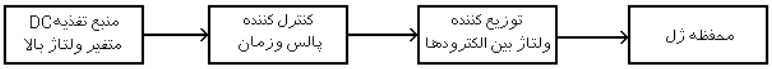
در مرحله سوم که مجدداً میدان برقرار می‌شود، به مولکول‌ها نیرویی وارد می‌شود که مجدداً به طورکامل یا جزیی آنها را درجهت حرکت قبلی خود (قبل‌ازقطع یا تغییرجهت میدان) قرار می‌دهد. بدیهی‌است که مولکول‌های درازتر نیازمند زمان طولانی‌ترند تا در راستای حرکت قبلی خود قرار گیرند. بدین‌ترتیب با تغییر مکرر میدان الکتریکی یعنی ایجاد پالس‌های الکتریکی، ضمن اینکه تغییری درسرعت حرکت مولکول‌ها بر حسب وزن مولکولی و طول آنها پدید می‌آید با اعمال‌هر پالس الکتریکی انتهای هر مولکول درمسیر جدیدی قرار می‌گیرد و بدین

وسیله‌گیرافتادن مولکول‌ها درشبکه ژل مرتفع می‌گردد. در اثر تناوب اعمال میدان‌های الکتریکی تحت زاویه خاص نسبت به یکدیگر، مولکول‌های DNA در پیکره ژل آگارز به حرکت زیگ زاگ وادار می‌شوند که درنتیجه مولکول‌های درشت هنگام حرکت در سرپیچ‌ها یا هنگام تغییر جهت به سمت جلو و عقب از مولکول‌های کوچکتر عقب مانده و از آنها جدا می‌شوند(Wrestler *et al.,* 1996).

طراحی و ساخت

اصولاً در بیست سال گذشته طرح‌های متنوعی از الکتروفورزهای میدان پالسی برای جداسازی گستره‌های متفاوتی از اسیدهای نوکلئیک ساخته و به بازار عرضه شده است (Mc Peek *et al.,* 1986; Smith *et al.,* 1988; Carle & Olson, 1984; Clark *et al.,* 1988; Southern *et al.,* 1987; Smith *et al.,* 1989; Bancroft & Wolk, 1988; Carle & Frank, 1986) درهریک از این طراحی‌ها، سعی شده‌است ازعوامل مؤثر در الکتروفورز درجهت افزایش توان جداسازی (Resolution) به بهترین وجه‌استفاده شود. با وجود این هریک از روش‌های ارائه شده دارای محدودیت‌ها ونقصان‌هائی هستند (دوستی، ۱۳۷۸). یکی‌از بهترین روش‌هایی‌که به طورنسبی موفقیت‌هایی دراین زمینه کسب نموده‌است روش‌موسوم به میدان‌های‌الکتریکی همگن، متشکل‌از خطوط هم‌پتانسیل‌موازی (Contour Clamped Homogeneous Electric Fields, CHEF) می‌باشد (Gardiner *et al.,* 1986; Chu *et al.*, 1986). ما درطراحی خود که به اختصار درزیر می‌آید از این ایده استفاده نموده‌ایم (دوستی، ۱۳۷۸).

به طورکلی الکتروفورز میدان پالسی شامل چهار جزء است که درشکل۳ نشان داده‌شده است.



شکل۳- اجزای الکتروفورز میدان پالسی

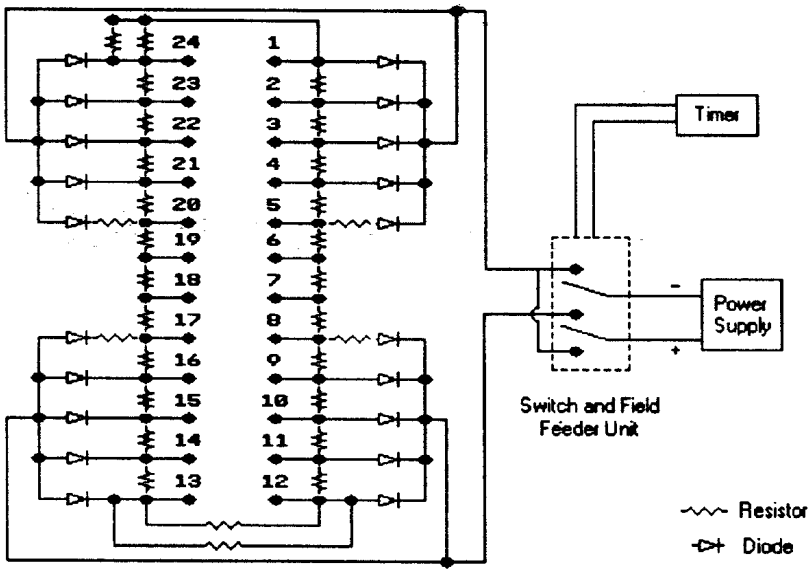
همانطور که در شکل مزبور مشخص شده است، ولتاژ تولید شده توسط منبع تغذیه به ورودی مدار کنترل‌کننده پالس داده می‌شود. این مدار حسب مورد پالس‌هایی از ولتاژ را به صورت پلکانی یا ثابت تولید نموده به مدار توزیع کننده ولتاژ الکترودها، انتقال می‌دهد. مدار توزیع کننده قادر است درهرپالس ولتاژهای مشخصی را بین ۲۴ الکترود توزیع کند به گونه‌ای که از این توزیع ولتاژ، یک میدان الکتریکی یکنواخت در محفظه ژل تولید شود. در پالس

بعدی، ولتاژ هر یک از الکترودها تغییر نموده، میدان الکتریکی یکنواخت دیگری که با میدان قبلی ۱۲۰ درجه اختلاف جهت دارد ایجاد می‌شود.

دراثر اعمال این میدان‌ها در طول آزمایش، مولکول‌های DNA از یکدیگر جدا شده، الگوی جداسازی که دریک مسیر مستقیم صورت می‌گیرد با یک مولکول شاهد مقایسه می‌شود.

منبع تغذیه - منبع تغذیه مورد استفاده در این طراحی، از نوع منبع متغیر بوده، توانایی ایجاد اختلاف پتانسیل تا ۵۰۰ ولت را دارد. منبع تغذیه‌ای که برای این‌منظور در آزمایشگاه ساخته شد دارای قابلیت تغییر ولتاژ با دقت یک ولت و کنترل جریان با دقت ۰/۵ آمپر بود.

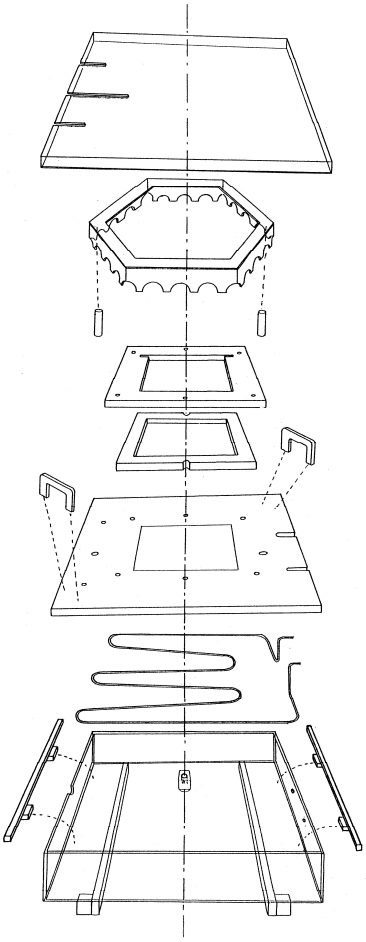
توزیع‌کننده ولتاژ بین الکترودها - توزیع‌کننده ولتاژ، دستگاه الکترونیکی مستقلی است که ضمن توزیع ولتاژ بین ۲۴ الکترود موجود درمحفظه الکتروفورز، ولتاژ هریک از الکترودها را نیز روی مقدار خاصی ثابت نگه می‌دارد. طراحی این دستگاه به‌گونه‌ای است که تنظیم ولتاژ الکترودها به طور دینامیک و مستقل از ابعاد، رسانایی یا دمای ژل صورت می‌گیرد. شکل۴ مدار طراحی و ساخته شده برای این منظور را نشان می‌دهد .در این مدار خروجی‌های ۱ تا ۲۴ توسط یک کانکتور (Connector) ۲۴ شاخه (پین) به الکترودها متصل می‌شود.



شکل۴- مدار توزیع کننده ولتاژ بین الکترودها. در این مدار مقاومتها ۱۴۷۰ اهمی هستند.

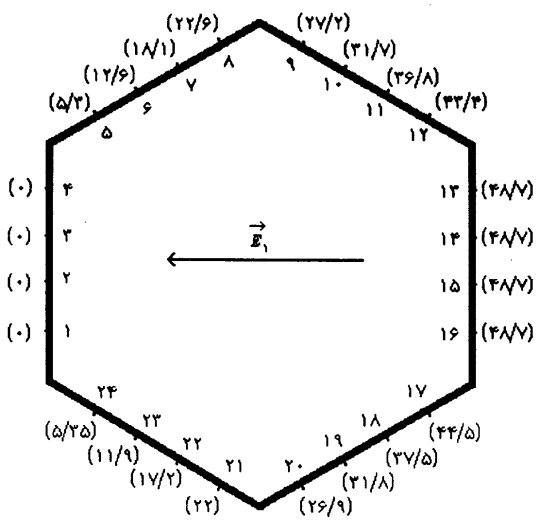
کنترل‌کننده پالس و زمان - این قسمت وظیفه کنترل زمان هر پالس(Pulse time)، زمان آزمایش (Run time) و کلیدزنی (Switching function) را بر عهده دارد. شرایط آزمایش از قبیل زمان شروع و خاتمه آزمایش، گرادیان ولتاژ و طول آزمایش‌مستقیماً دراین قسمت برنامه‌ریزی می‌شود. نقشه بخش سخت‌افزاری و همچنین‌الگوریتم برنامه نرم‌افزاری آن و جزئیات طراحی درمرجع (دوستی، ۱۳۷۸) آمده است.

محفظه ژل الکتروفورز - به دلیل عبور جریان الکتریکی از بافر داخل محفظه وایجاد گرما، لازم است جنس محفظه نسبت به برق و حرارت عایق باشد. بنابراین، برای این منظور از جنس پلکسی گلاس شفاف استفاده شد. همانطور که در شکل۵ ملاحظه می‌شود، این محفظه از سه بخش تشکیل شده است.



شکل۵- اجزاء محفظه ژل دستگاه الکتروفورز میدان پالسی.

شش‌ضلعی نگهدارنده الکترودها (شکل ۵ - الف)، که در هر ضلع آن چهارالکترود عمودی از جنس پلاتین تعبیه شده است. درشکل۶ سطح مقطع شش‌ضلعی نگهدارنده الکترودها نشان داده شده است. شماره ۱ تا ۲۴ آرایش الکترودها را در این شش‌ضلعی نشان می‌دهد. وقتی الکترودها در بافر قرار داده می‌شوند، در هر پالس، دارای ولتاژ خاصی می‌شوند. اعداد داخل پرانتز درشکل (۵ - الف)، نشان‌دهنده مقدار ولتاژ هر الکترود دریک پالس نمونه است. چنانچه ملاحظه‌می‌شود، دراین پالس، گرادیان ولتاژ و به تبع آن میدان الکتریکی یکنواخت، فقط بین دو طرف چپ و راست برقرار است.



شکل۶- نحوه توزیع ولتاژها دریکی از پالس‌ها. اعداد داخل چندضلعی شماره الکترودها و اعداد داخل پرانتز ولتاژ هر الکترود را دریک پالس نوعی نشان می‌دهد.

قاب نگهدارنده ژل، متشکل از یک صفحه است که محل قرار گرفتن ژل روی آن جاسازی شده است (شکل ۵ – ب). قالب ژل روی آن قرار گرفته محلول ژل را در قالب ریخته، ژل در آنجا منعقد می‌شود. پس از آن، قالب از ژل جدا شده قاب نگهدارنده ژل را به همراه ژل در داخل محفظه بافر قرار داده، شش‌ضلعی الکترودها روی آن قرار می‌گیرد به طوری‌که ژل در معرض خطوط میدان الکتریکی برقرار شده بین‌الکترودها واقع می‌شود.

محفظه بافر (شکل ۵ - ج)، که ژل و الکترودها در آن قرار می‌گیرد تا حدود یک میلی‌متر بالای سطح ژل پر از بافر می‌شود. یک سیرکولاتور سردکننده، ثابت نگهداشتن دمای بافر را بر عهده دارد. محلول بافر توسط پمپ سیرکولاتور به درون آن مکیده شده پس از تنظیم دما، مجدداً به دورن محفظه بر می‌گردد.

بررسی کارآئی دستگاه ساخته شده

پس از طراحی و ساخت هریک از چهار جزء، این اجزاء را به هم متصل نموده، برای جداسازی نمونه‌های بیولوژیک استفاده شد (دوستی، ۱۳۷۸). مراحل کار شامل موارد زیر است:

۱ـ تهیه بافر: مقدار ۵۴ گرم تریس باز، ۵/۲۷ گرم بوریک‌اسید و ۷/۳ گرم از EDTA را درآب مقطر حل نموده حجم آن را به یک لیتر می‌رسانیم. بدین ترتیب‌بافر TBE با غلظت ۰/۵

مولار(۰/۵x) به دست می‌آید که درهنگام استفاده با ده بار رقیق‌کردن غلظت آن را به ۰/۰۵ مولار می‌رسانیم.

۲ـ تهیه ژل: برای تهیه ژل ۱%، ۱/۱ گرم پودر آگارز را در ۱۱۰ میلی لیتر بافرTBE حل نموده، محلول را جوشانده تا یکنواخت شود. سپس آن را در قالب ۱۵×۱۵سانتیمتر ریخته، شانه تولید کننده چاهک را درجای خود قرار می‌دهیم .آنگاه، اجازه می‌دهیم تا با سرد شدن محلول، ژل تشکیل شود.

۳ـ نمونه گذاری: پس‌از خارج نمودن شانه از ژل به جای دندانه‌های آن چاهک‌هایی در ژل باقی می‌ماند که نمونه‌های DNA با غلظت ۱ میلی‌گرم درمیکرولیتر را با مهارت خاصی در چاهک‌ها قرار می‌دهیم.

۴ـ عملیات الکتروفورز: ژل حاوی نمونه که روی سینی نصب شده است را درون محفظه ژل قرار داده، درون محفظه را آنقدر بافر می‌ریزیم تا حدود یک میلیمتر روی‌سطح ژل را فرا گیرد. آنگاه الکترودها را درجای خود قرار داده پس از اتصال کانکتورها، تنظیم زمان پالس، زمان آزمایش و دما، منبع تغذیه را روشن می‌کنیم. ولتاژ را روی عدد مورد نظر قرار می‌دهیم. درخاتمه عملیات، ابتدا ولتاژ را به‌حداقل رسانده سپس منبع تغذیه را خاموش می‌کنیم.

۵ـ رنگ‌آمیزی نمونه: ابتدا ژل را از محفظه خارج نموده آنرا از سینی جدا کرده دریک تشت پلاستیکی قرار می‌دهیم. سپس روی آن ۵۰۰ میلی‌لیتر بافر و۰/۵ میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید یک میکروگرم در میلی‌لیتر می‌ریزیم .پس از ۳۰ دقیقه ژل را از بافر خارج نموده پس ازشستشو تحت تابش UV عکسبرداری می‌نمائیم.

نتیجه و بحث

نمونه‌های مختلفی‌از اسیدهای نوکلئیک با استفاده از دستگاه ساخته‌شده جداسازی شد. یک نمونه آن مخمر با گستره‌ای از وزن مولکولی Kbp ۹۰ تا Mbp ۲ بود که درالکتروفورز میدان پالسی به عنوان مارکر (Marker) مورد استفاده قرار می‌گیرد. این نمونه از شرکت بوهرینگر (Bohringer) آلمان خریداری شد و توسط دستگاه ساخته شده مورد آنالیز قرار گرفت. شکل۷ نتیجه جداسازی این مخمر را به عنوان نمونه نشان می‌دهد. شرایط عملیات الکتروفورز در جدول۱ خلاصه شده است.

جدول۱- شرایط عملیات الکتروفوز جهت جداسازی اجزاء نمونه مخمر استاندارد.

مراحل کار	زمان(h)	ولتاژ(V)	جریان(A)	دما (°C)	زمان پالس (S)
مرحله اول	۷	۱۸۰	۰/۱۶	۱۴	۹۰
مرحله دوم	۲۲/۲	۱۲۰	۰/۱	۱۴	۱۰۵
مرحله سوم	۲۴/۴	۱۲۰	۰/۱	۱۴	۱۲۰
مرحله چهارم	۱۶/۴	۶۰	۰/۵	۱۴	۱۲۰

شکل۷- نحوه جداسازی اجزاء نمونه مخمر استاندارد.

همانطور که دراین شکل مشاهده می‌شود حدود پانزده باند قابل تشخیص است که نتیجه رضایتبخشی است. البته تفکیک باندها هنوز در وضعیت بهینه خود نمی‌باشد که می‌توان با بررسی بیشتر این نقص را نیز برطرف نمود. اصولاً دراینگونه جداسازی‌ها عواملی مانند نوع ژل آگارز و غلظت آن، نوع بافر و غلظت آن، دمای بافر، زمان تناوب (پالس)، زمان عملیات و شدت میدان نقش مؤثری ایفا می‌کنند. با هماهنگی گستره وزن مولکولی نمونه، با عواملی مانند درصد ژل، شدت میدان وزمان تناوب می‌توان به تفکیک بهتری دست یافت. برای جدا نمودن باندهای بسیارنزدیک افزایش غلظت آگارز تا حدود ۱/۵ درصد می‌تواند کمک مؤثری نماید. از طرف دیگر افزایش شدت میدان (ولتاژ) موجب تحرک بیشتر مولکولها می‌شود ولی پهن شدن باندها را در پی‌دارد. بنابراین هر قدر مولکولها درشت‌تر باشند می‌بایست شدت میدان را

ضعیف‌تر نمود تا اولا مولکول‌ها وارد ژل شوند و درثانی‌تفکیک آنها در شـرایط بهتـری صـورت گیرد. تحقیقات برای بهینه نمودن شرایط کار دستگاه ادامه دارد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از شورای محترم پژوهشی دانشگاه تهران که اعتبار مورد نیاز این پژوهش را تامین نمودند صمیمانه قدردانی می‌شود.

References

Amigo, J.M., Gracia, M.P., Salvado, H., and Vivares, C.P. (2002). Pulsed Field Gel Electrophoresis of three microsporidian parasites of fish, Acta Protozool, **41**, 11-16.

Bancroft, I., and Wolk, C.P. (1988). Pulsed homogeneous orthogonal field gel electrophoresis (PHOGE), Nucleic Acids Res., **16**, 7405-7418.

Berthlot-Herault, F., Marois, C., Goltschalk, M., and Kobisch, M.N. (2002). Genetic diversity of *Streptococcus svis* strains isolated from pigs and humans as revealed by pulse field gel electrophoresis, Journal of Clinical Microbiology, **40(2),** 615-619.

Carle, G.F., and Olson, M.V. (1984). Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal – field – alteration gel electorphoresis, Nucleic Acids Res., **12,** 5647-5664.

Carle, G.F., Frank, M., and Olson, M. V., (1986). Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field, Science, **232,** 65-68.

Chambach, A., Dunn, M.J., and Radola, B.J. (1991). Advances in Electrophoresis, **V**.4, VCH.

Chu, G., Vollrath, D., and Davis, R.W. (1986). Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields, Science, **234,** 1582-1585.

Clark, S.M., Lai, E., Birren, B.W., and Hood, L. (1988). A novel instrument for separating large DNA molecules with pulsed homogeneous electric fields, Science, **241,** 1203-1205.

Cornillot, E., Keller, B., Cushion, M.T., Metenier, G., Vivares, C.P. (2002). Fine analysis of the *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* genome by two-dimensional pulsed-field gel electrophoresis, Gene, **293,** 87-95.

DeGennes, P.G. (1971). Scaling concepts in polymer physics, J. Chem. Phys., **55,** 572-579.

Gardiner, K., Lass, W., and Patterson, D.S. (1986). Fractionation of large mammalian DNA restriction fragments using vertical pulsed field gradient gel electrophoresis, Somatic Cell Molec. Genet., **12,** 185-195.

Holmes, D.L., and Stellwagen, N.C. (1990). The electric field dependence of DNA mobilites in agarose gels: a reinvestigation, Electrophoresis, **11,** 995-997.

Lalande, M., Noolandi, J., Turmel, C., Rousseau, J., and Slater, G.W. (1987). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. **84,** 8011-8015.

Lalande, M., Noolandi, J., Turmel, C., Rousseau, J., and Slater, G.W. (1988). Scrambling of bands in gel electrophoresis of DNA, Nucleic Acid Res, **16,** 5427-5437.

Lerman, L.S., and Frisch, H.L. (1982). Why does the electrophoretic mobility of DNA in gels vary with the length of the molecule, Biopolymers, **21,** 995-997.

Mcpeek, F.D., Coyle-Morris, J.F., and Gemmill, R.M. (1986). Separation of large DNA molecules by modified pulsed field gradient gel electrophoresis, Anal. Biochem., **156,** 274-285.

Mulvey, M.R., Chui, L., Ismail, J., Louie, L., Murphy, C., Chang, N., and Alfa, M. (2001). Development of a Canadian Standardized Protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphyloco aureus* using pulsed-field gel electrophoresis, Journal of Clinical Microbiology, **39(10),** 3481-3485.

Nooladi, J., Rousseau, J., Slater, G.W., Turmel, C., and Lalande, M. (1987). Self-trapping and anomalous dispersion of DNA in electrophoresis, Phys. Rev. Lett., **58,** 2428-2431.

Schwartz, D.C., and Cantor, C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis, Cell, **37,** 67-75.

Simpson, P.J., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P. (2002). Genomic diversity within the genus *Pediococcus* as revealed by randomly amplified polymorp DNA PCR and pulsed-field gel electrophoresis, Applied and Environmental Microbiology, **68(2),** 765-771.

Smith, C.L., Klco., R.R., and Cantor, C.R., in: Davies, K. (Ed), (1998). Genomic Analysis: A Practical Approach. IRL Press Inc. Mclean, 41-72.

Smith, S.B., Aldridy, P.K., and Calliass, J.B. (1989). Observation of individual DNA molecules undergoing gel electrophoresis, Science, **243,** 203-206.

Southern, E.M., Anand, R., Brown, W.R.A., and Fletcher, D.S. (1987). A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis, Nucleic Acids Res., **15,** 5925-5943.

Wagner, L., and Lai, E. (1994). Separation of large DNA - molecules with high-voltage pulsed- field gel electrophoresis, Electrophoresis, **15 (8-9),** 1078-1080.

Wang, D.Y., Keller, J.M., and Carson, C.A. (2001). Pulsed field gel electrophoresis pattern recognition of bacterial DNA: A systemic approach, Pattern Analysis and Applications, **4(4),** 244-255.

Wrestler, J.C., Lipes, B.D., Birren, B.W., and Lai, E. (1996). Pulsed-field gel electrophoresis, Methods in Enzymology, **270,** 255-272.

دوستی، ن. (۱۳۷۸) طراحی و ساخت الکتروفورز میدان پالسی (PFGE) و بررسی عوامل مؤثر در عملکرد آن، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، ۷۷-۴۱.

مصطفایی، ع. (۱۳۷۸) راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ژل (انتشارات تزکیه، تهران)، ۱۴-۱۲.