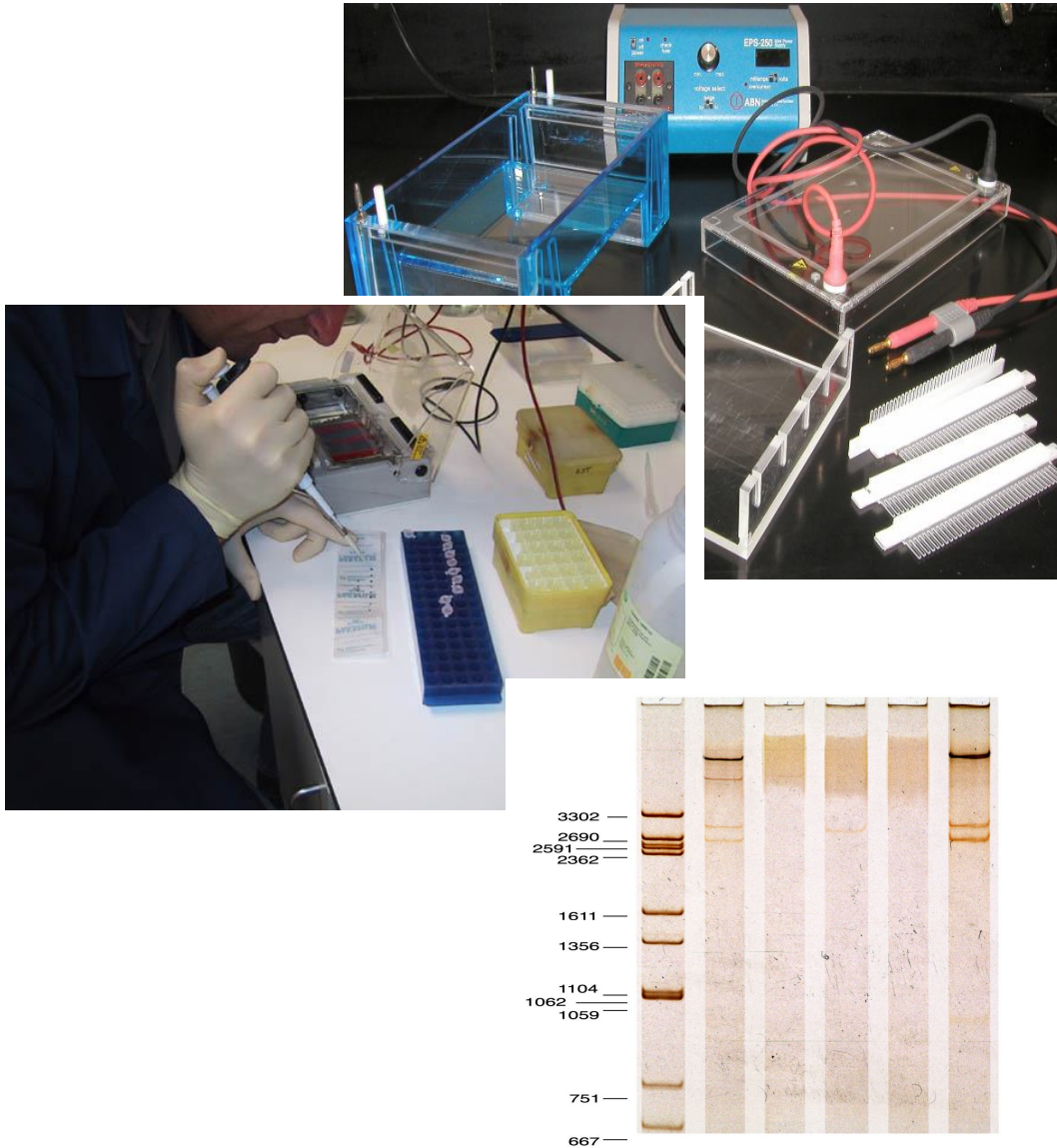


اصول کلی روش الکتروفورز (Electrophoresis)



بیوشیمی عملی - رشته علوم آزمایشگاهی

تهیه کننده: حسین پیری

گروه بیوشیمی و ژنتیک دانشکده پزشکی شهید بابایی

الکتروفورز (Electrophoresis)

الکتروفورز یکی از تکنیکهای آنالیتیکی قدرتمند در جداسازی و آنالیز دامنه وسیعی از آنالیتهای یونیزه محسوب میگردد. آنالیتهایی که بطور ویژه مورد توجه قرار میگیرند عبارتند از: پروتئینها، پپتیدها، آمینواسیدها، اسیدهای نوکلئیک و اولیگونوکلئوتیدها، نوکلئوزیدها، اسیدهای آلی و آنیونها و کاتیونهای کوچک موجود در مایعات و بافتهای بدن. اصطلاح الکتروفورز اشاره به حرکت همه ترکیبات یا ذرات باردار در یک محلول (محیط مایع) تحت تاثیر جریان الکتریکی دارد.

ترکیبات شیمیایی دارای بار الکتریکی به سمت قطب آند و یا کاتد (با توجه به نوع بار الکتریکی) حرکت مینمایند. آمفولیتها (Ampholytes) ترکیباتی هستند که وابسته به نوع محیط (قلیایی بودن یا اسیدی بودن) دارای بار منفی یا بار مثبت میباشند. از آنجایی که پروتئینها حاوی گروههای $-COOH$ ، $-NH_2$ میباشند و نیز بارهای موجود در اسیدهای نوکلئیک میتوانند به صورت مثبت و یا منفی باشند، در محلولها دارای رفتاری مشابه رفتار آمفولیتها میباشند.

سرعت حرکت ترکیبات موجود در یک نمونه در الکتروفورز به عوامل زیر وابسته است:

1. بار الکتریکی خالص یون .
2. اندازه و شکل یون .
3. شدت میدان الکتریکی.
4. خواص محیط پایه (Support medium) .
5. دمای محیط الکتروفورزی.

حرکت الکتروفورزی (μ) برحسب تعریف عبارت است از میزان حرکت ذرات (برحسب cm/s) در واحد میدان الکتریکی (برحسب $Volt/cm$) که با μ نشان داده میشود و برحسب $cm^2/V.s$ بیان میگردد:

$$\mu = \frac{Q}{6\pi r\eta}$$

μ : حرکت الکتروفورزی

Q : بار الکتریکی خالص یون

r : شعاع یون

η : ویسکوزیته محیط (بافر)

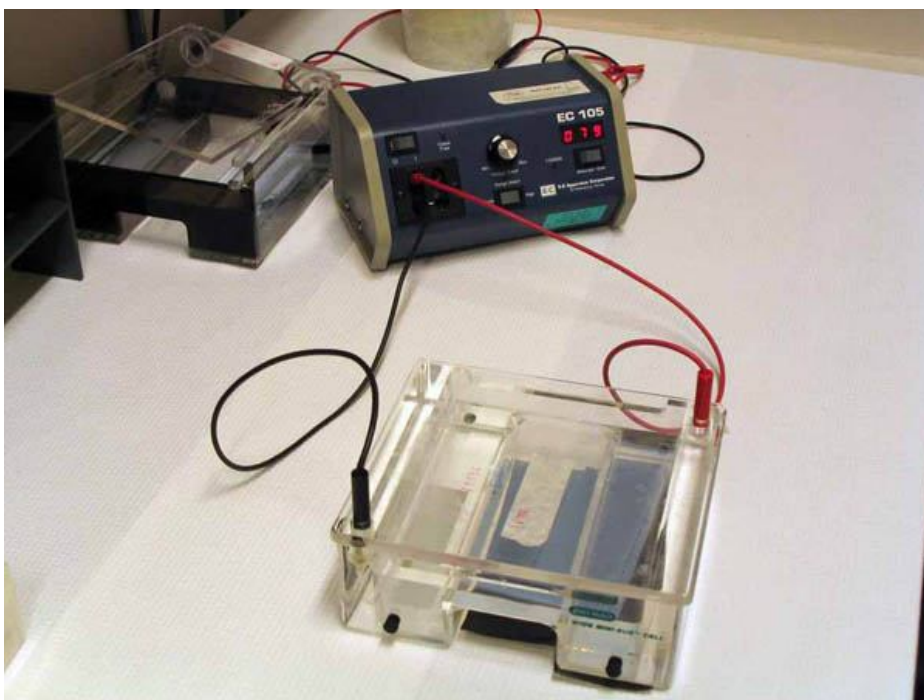
بطور کلی نیروهای تاثیر گذارنده بر حرکت الکتروفورزی را میتوان به دو گروه تقسیم نمود:

1. نیروی رانشی یا جلوبرنده (Driving force) که مرتبط با میدان الکتریکی یون مربوطه میباشد.
2. نیروی بازدارنده (Retarding force) که مربوط به مقاومت محیط نگهدارنده میباشد.

با توجه به معادله بالا مشخص میگردد که حرکت الکتروفورزی ارتباط مستقیم با بار خالص یون (Q) و ارتباط معکوس با اندازه ملکول (r) و ویسکوزیته محیط الکتروفورزی (η) دارد. هنگامی که الکتروفورز در حال انجام میباشد به مرور دمای محیط پایه و بافرها افزایش می یابد که منتج به تبخیر حلال می گردد، این اثر (خشک کنندگی) سبب صعود بافر از هردو بخش بافری (درون دو تانک بافری) به درون محیط پایه می گردد، این جریان دوطرفه بر حرکت یونها تاثیر می گذارد (Wick flow) .

وسایل و مواد مورد نیاز:

- یک دستگاه (سیستم) الکتروفورز شامل بخشهای زیر می باشد:
- دو تانک بافر (Buffer boxes) که بافرهای الکتروفورزی در آن ریخته می شود
- الکترودها
- محیط پایه الکتروفورزی (Support media)
- صفحه پوشاننده (Cover) جهت جلوگیری از تبخیر .
- سیستم تامین کننده جریان الکتریکی (Power supply)
- بافر (تامپون)

**محیط پایه الکتروفورزی (Support media)**

ژل نشاسته نخستین ژلی بود که برای جداسازی الکتروفورزی استفاده گردید. در حال حاضر از آگارز ، استات سلولز و پلی آکرلامید استفاده می گردد.

آگارز (Agarose) :

آگار پلی ساکارید اسیدی کمپلکسی می باشد که محتوی منومرهایی از گالاکتوز سولفات می باشد. آگارز در واقع همان آگاری می باشد. آگارز در واقع همان آگاری می باشد که فاقد گروه سولفات می باشد. ناخالصی در آگارز و وجود آگار و آگاروپکتین (که دارای گروههای سولفات و کربوکسیلیک اسید می باشند) موجب اختلال در حرکت ملکولها و نیز در رنگ آمیزی می گردد ولی در آگارز خالص به دلیل اینکه گروههای قابل یونیزه مذکور وجود ندارد ، کارایی

بهتری در جداسازی ترکیبات به روش الکتروفورز (نسبت به ترکیبات مذکور) دارد. از لحاظ عملی محلولهای بافر حاوی 0/5 - 1 gr/dL آگارز ، ایجاد کننده ژل با قدرت یونی مناسب برای جداسازی پروتئینها و قطعات DNA با طول 0/5 تا 20 هزار جفت باز (kilo base pair = kbp) می باشد.

اندازه حفره موجود در ژل ، بستگی به غلظت آگارز در بافر دارد. هر باند تفکیک شده حاوی چندین پروتئین با حرکت الکتروفورزی یکسان می باشد. در این نوع از محیطهای الکتروفورزی ، باندها بیشتر به صورت پهن دیده می - شوند زیرا ژل آگارز نسبت به محیطهای دیگر مانند استات سلولز نسبت پروتئینها از نفوذپذیری بالایی برخوردار می - باشد.

استات سلولز:

کاغذها بیشتر از جنبه جداسازی ترکیبات با وزن ملکولی پایین حائز اهمیت می باشند. مزیت اصلی این محیطها نازک بودن و قدرت مکانیکی آنهاست. این محیطها دارای حساسیت بیشتری می باشند زیرا به نمونه کمتری برای ایجاد لکه ها یا باندهای قابل تشخیص دارند. کاغذ استات سلولز از جمله این محیطهاست. استات سلولز بوسیله قرار دادن کاغذ سلولز در مجاورت انیدرید استیک ایجاد می گردد. گروه استیل بر روی گروههای هیدروکسیل قند قرار می گیرد.

پلی آکرلامید:

از پلیمریزاسیون آکرلامید در حضور حرارت ایجاد می گردد که ممکن است دارای پیوندهای متقاطع یا فاقد پیوندهای متقاطع (Cross link) باشد. ژل پلی آکرلامید پایدار در برابر حرارت بوده و شفاف می باشد و همچنین فاقد بار الکتریکی می باشد به همین دلیل تداخلی که در ژل آگارز وجود داشت در اینجا وجود ندارد. به علت خاصیت کارسینوژنیک (سرطانزایی) آکرلامید ، باید توجه داشت که این ترکیب با سطح پوست برخورد نداشته باشد. ژل پلی - آکرلامید از ترکیب آکرلامید و یک ماده رابط بنام N,N - متیلن بیس آکرلامید (بیس آکرلامید) شکل می گیرد. بدین صورت که ملکولهای آکرلامید بصورت طولی به هم متصل می گردند و ماده رابط نیز مسئول تولید پلهای عرضی متعدد بین رشته های آکرلامید است. خصوصیات فیزیکی ژل از قبیل اندازه منافذ ، خاصیت الاستیکی ، چگالی ژل و قوام مکانیکی متاثر از غلظت دو جزء تشکیل دهنده آن است. پلیمریزاسیون آکرلامید یک واکنش رادیکالی است که توسط پراکسیداز یا انرژی فتوشیمیایی شروع می شود.

بافرها:

اعمال بافرها در فرایند الکتروفورز عبارت است از:

1. عبور دادن جریان الکتریکی
2. ثابت نگه داشتن pH محیط
3. تعیین بار الکتریکی سطح ترکیب موجود در نمونه

نوع بافر و خصوصیات آن از قبیل قدرت یونی، ظرفیت بافری و pH از عوامل بسیار اساسی در الکتروفورز محسوب می‌گردد. جداسازی ملکولها در الکتروفورز در یک با pH معین و قدرت یونی خاص صورت می‌گیرد.

رنگ آمیزی ژلهای الکتروفورزی (Staining):

رنگ آمیزی ژلهای (محیطهای پایه) الکتروفورزی جهت آشکار شدن جایگاه باندهای پروتئین و ... صورت می‌گیرد. انتخاب رنگها با توجه به نوع ژل و نوع ترکیب مورد جداسازی صورت می‌گیرد. میزان رنگ هر باند با میزان پروتئین موجود در آن باند ارتباط دارد ولی این میزان تحت تاثیر عوامل دیگری نظیر نوع پروتئین و میزان دنا تورا سیون آن قرار می‌گیرد. وقتی از رنگ آمیزی پروتئینها استفاده می‌شود بخش لیپیدی لیپوپروتئینها یا کربوهیدراتی گلیکوپروتئینها رنگ نمی‌شود. لذا مقادیر آنها کمتر از میزان واقعی برآورد خواهد شد.

- برای رنگ آمیزی پروتئینها: استفاده از رنگهای آمیدوبلاک (Amido black) ، کوماسی بریلیانت بلو (CBB) ، پانسو (Panseau S) و نیترا ت نقره .

- برای رنگ آمیزی لیپوپروتئینها :

استفاده از رنگهای سودان بلاک (Sudan black) ، کوماسی بریلیانت بلو (Oil Red 0) ، (CBB) .

- برای رنگ آمیزی گلیکوپروتئینها :

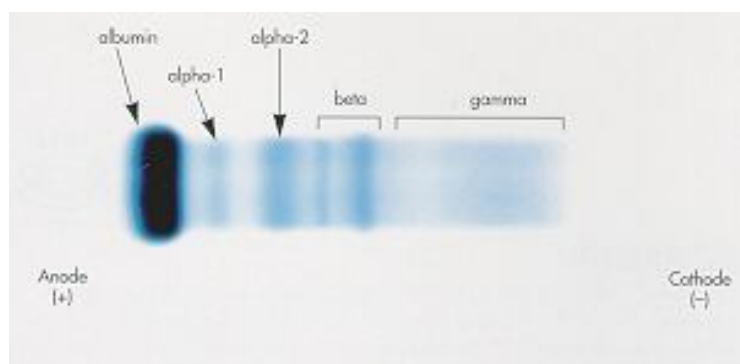
استفاده از رنگ (PAS) Periodic Acid Schiff .

- برای رنگ آمیزی اسیدهای نوکلئیک :

استفاده از اتیدیم بروماید (Ethidium bromide) و نیترا ت نقره .

- برای رنگ آمیزی دهیدروژنازاها :

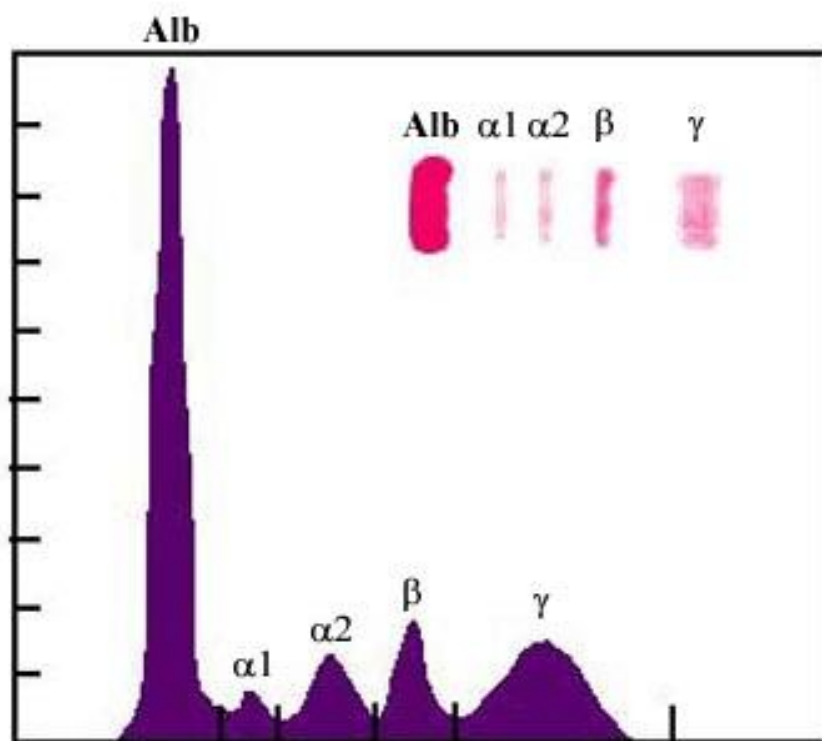
استفاده از NADH (دارای خاصیت فلورسان) و نمک تترازولیوم (نیتروبلوتترازولیوم) .



تشخیص و تعیین کمی اجزای باندهای تشکیل شده :

معمولترین روش تعیین مقدار اجزای باندهای الکتروفورزی، چگالی سنجی یا دانسیتومتری (Densitometry) است (به دستگاه مزبور نیز دانسیتومتر گفته می‌شود که به عنوان یک فتومتر فیلتردار و وسیله رسم منحنی محسوب می‌گردد) که در آن از باندهای مختلف یک محیط الکتروفورتیک شفاف (فاقد رنگ زمینه‌ای) و

ثابت شده، اسکن تهیه و این اسکن به صورت توالی از قله‌های مجزا، به نام الکتروفور توگرام نمایش داده می‌شود. سطح منحنی زیر این قله‌ها متناسب با غلظت پروتئین‌های موجود در هر باند می‌باشد. برای مثال، به این طریق می‌توان درصد پروتئین‌های موجود در هر کدام از باندهای الکتروفور تیک پروتئین‌های سرم را بدست آورد. با ضرب کردن این درصدها در میزان تام پروتئین‌های سرم، غلظت هر باند محاسبه می‌گردد (شکل زیر).



انواع روشهای الکتروفورزی

بسته به اینکه الکتروفورز در یک سطح افقی انجام گیرد یا در یک سطح عمودی به ترتیب به نوع روشهای مذکور الکتروفورز افقی و الکتروفورز عمودی گفته می‌شود. از سوی دیگر براساس نوع محیط پایه و مواد شیمیایی مورد استفاده و همچنین نوع مکانیسم جداسازی، روشهای الکتروفورزی تنوع زیادی پیدا کرده‌اند. از جمله میتوان انواع زیر را نام برد:

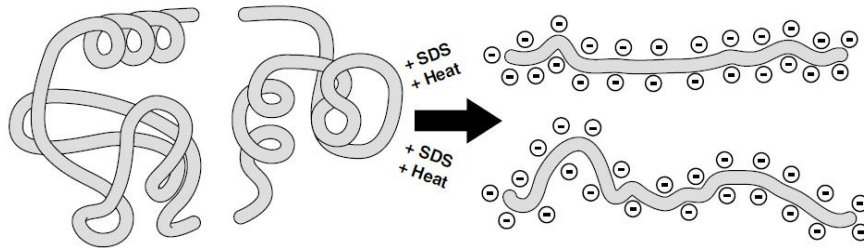
- الکتروفورز بر روی ژل آگارز (Agarose Gel Electrophoresis or AGE)

- الکتروفورز بر روی استات سلولز (Cellulose Acetate Electrophoresis or CAE)

- الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریلامید (Polyacrylamide Gel Electrophoresis or **PAGE**)

- روش SDS-PAGE

(که همان روش PAGE می‌باشد بعلاوه اینکه در اینجا از یک دترژانت به نام سدیم دو دسیل سولفات یا SDS استفاده می‌گردد که باعث اتصال به سطح ترکیباتی مانند پروتئینها گردیده و باعث ایجاد بار منفی بر سطح همه آنها می‌گردد (شکل پایین). میزان بار منفی تشکیل شده بر سطح پروتئینها به اندازه و وزن ملکولی آنها بستگی دارد، بنابراین جداسازی در این روش بر اساس وزن ملکولی ترکیبات صورت خواهد گرفت).



- ایزوالکتریک فوکوسینگ (Isoelectric focusing or IEF) که در این روش از محیط الکتروفورزی با گرادینانی (شیبی) از pH استفاده می‌گردد که پروتئینها براساس pH ایزوالکتریک‌شان جداسازی می‌گردند.