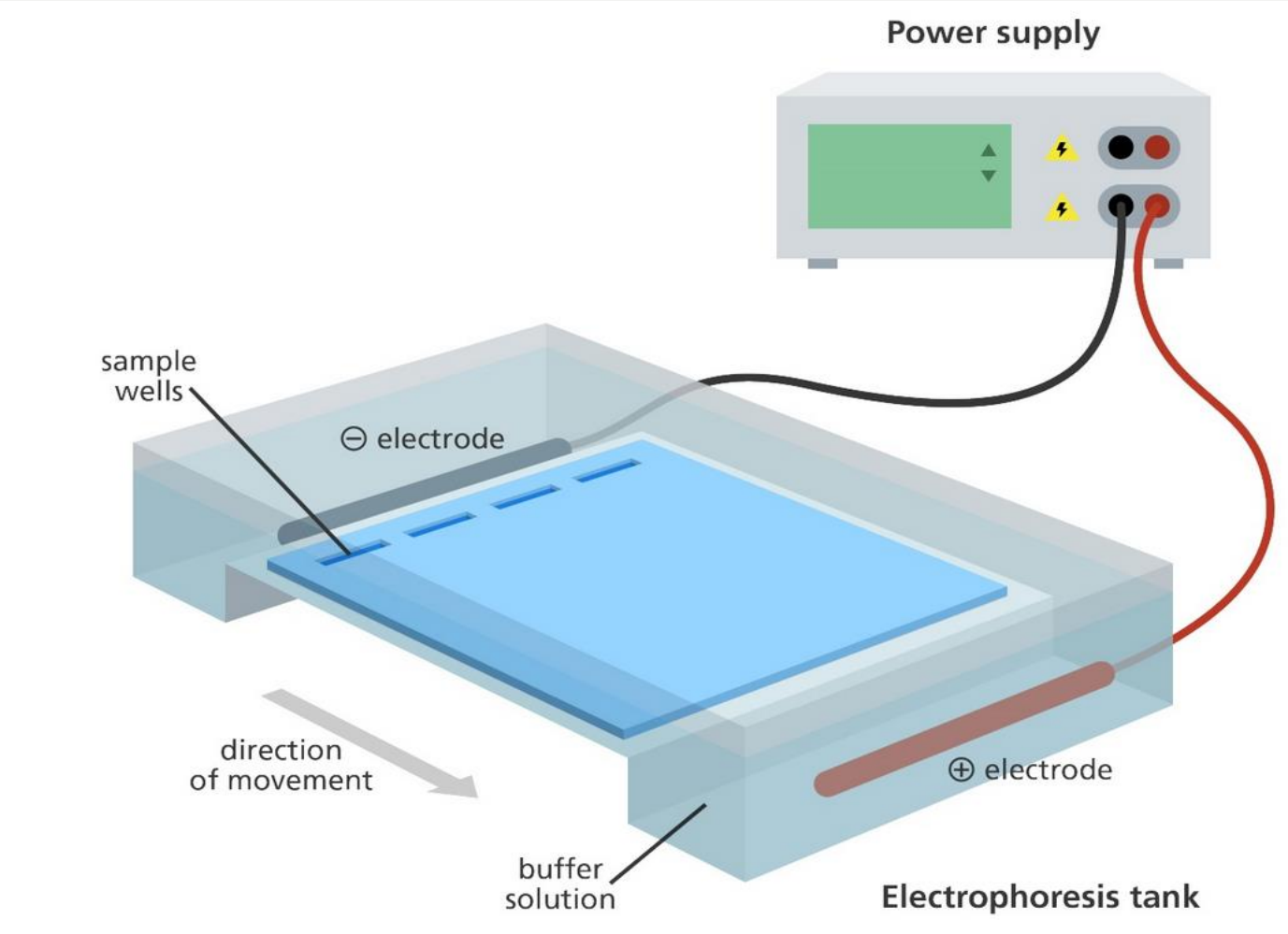
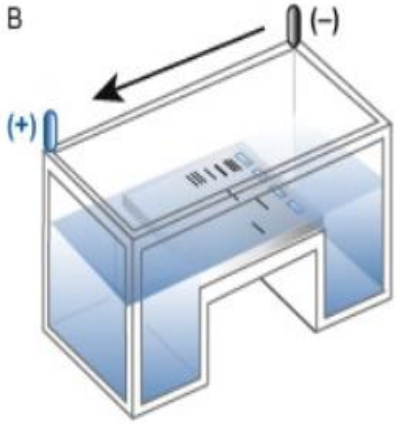
الکتروفورز و تکنیک های Blotting

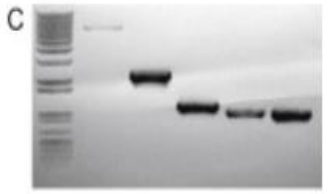
The term gel electrophoresis refers to a technique used for separation and analysis of DNA, RNA, and proteins based on their **size and charge**. The **suffix *phoresis*** means "**migration**" or "**movement**", while the **prefix *electro*** indicates the use of electricity as a mean to separate molecules

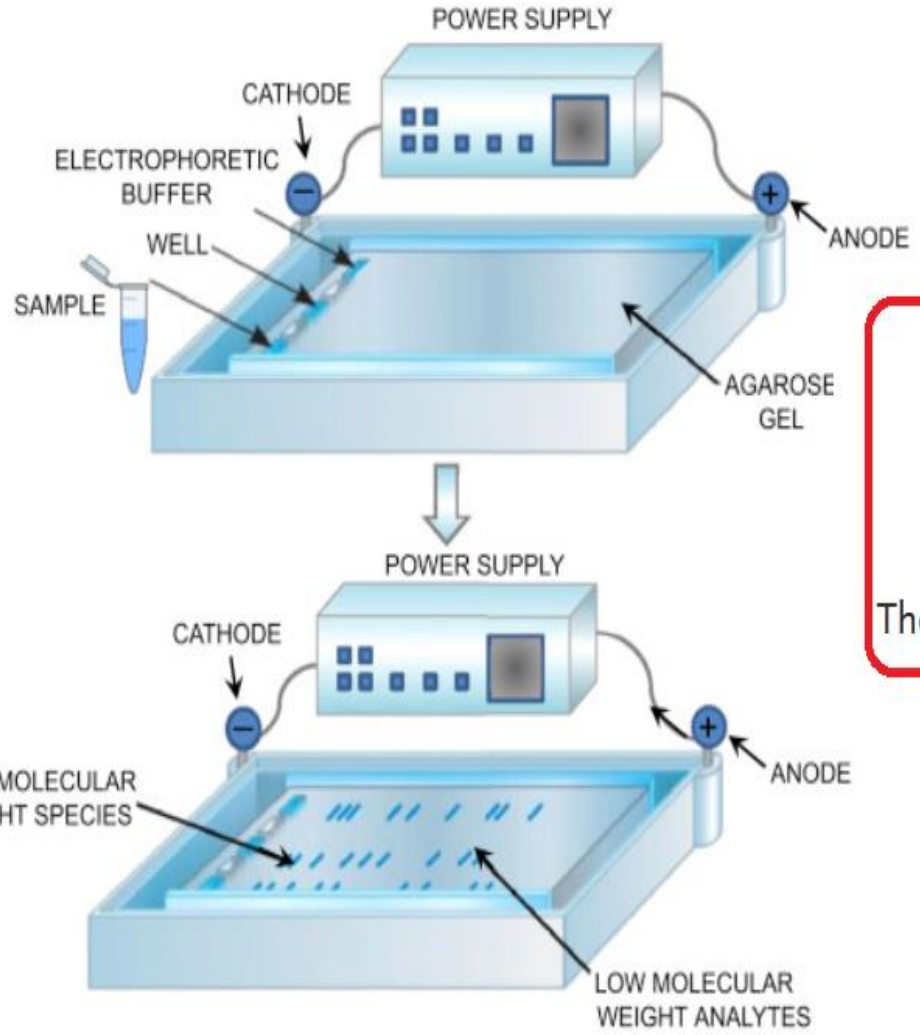


Agarose gel electrophoresis









size and charge

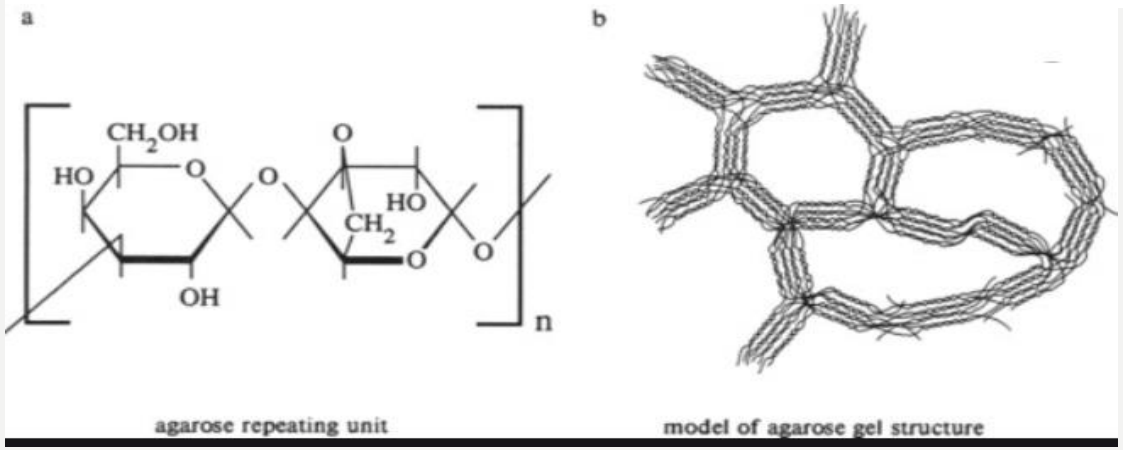
pore size

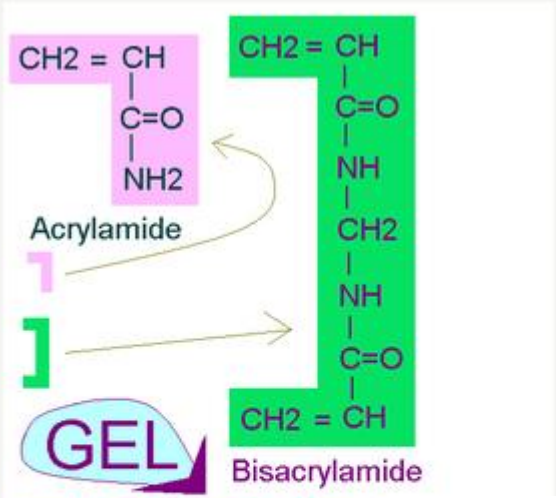
ionic strength

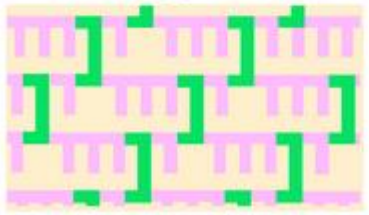
The electrical conductance of the gel

What is the difference between agarose and polyacrylamide gels?

Agarose is a polysaccharide, generally extracted from certain red seaweed. It is a linear polymer made up of the repeating unit of agarobiose, which is a disaccharide made up of D-galactose and 3,6-anhydro-L-galactopyranose.







Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) is probably the most common analytical technique used to separate and characterize proteins. A solution of **acrylamide and bisacrylamide** is polymerized. **Acrylamide** alone forms linear polymers. The **bisacrylamide** introduces crosslinks between **polyacrylamide** chains.

DNA samples are loaded into wells

Power is turned on and DNA fragments migrate through gel

Largest fragment will travel shorter than the smallest fragments

The fragments are now separated by size

Medium	Principal Uses
Polyacrylamide gel	Proteins and nucleic acids
Agarose gel	Nucleic acids and nucleoproteins, etc.

Agarose gels have a smaller resolving power than polyacrylamide gels (**10-200 KDa**) but a greater range of separation - from **200 bp (122 KDa) to >50 kb (30500 KDa)** using standard gels and electrophoresis equipment.

1. Agarose به صورت افقی ریخته می شود ، در حالی که پلی آکریل آمید به صورت عمودی ریخته می شود.
2. Agarose گرانتر از پلی آکریل آمید است.
3. Agarose از مولکولهای زیادی تشکیل شده است ، در حالی که پلی آکریل آمید تنها از یک مولکول بزرگ تشکیل شده است.
4. بر خلاف پلی آکریل آمید ، آگارز می تواند دوباره گرم شود.
5. آگارز به عنوان یک ماده غیر سمی در تمام اشکال آن در نظر گرفته می شود ، در حالی که پودر پلی آکریل آمید به عنوان سمی تعیین می شود.

Percent Agarose Gel (w/v)	DNA Size Resolution (kb = 1000)
0.5%	1 kb to 30 kb
0.7%	800 bp to 12 kb
1.0%	500 bp to 10 kb
1.2%	400 bp to 7 kb
1.5%	200 bp to 3 kb
2.0%	50 bp to 2 kb

میزان حرکت DNA در الکتروفورز بستگی دارد به:

1. اندازهDNA
2. شکل فضایی DNA
3. غلظت ژل آگارز
4. ولتاژ جریان الکتریکی
5. ویسکوزیته محیط (هدایت رسانایی و قدرت یونی)
6. دما

تهیه ژل آگارز و تهیه بافرهای تانک الکتروفورز

- تریس ۱۰۰ گرم
- اسید بوریک ۵۵ گرم
- EDTA نیم مولار با PH=8 ۲۰ میلی لیتر
- آب مقطر تا یک لیتر

- PH=8.3

TAE buffer preparation

از این بافر برای تهیه ژل اگارز و همچنین به عنوان بافر تانک الکتروفورز استفاده شد. برای تفکیک قطعات بزرگتر از 10kb و محصولاتی که به منظور کلون کردن و هضم آنزیمی از ژل استخراج می شوند، این بافر توصیه شده است چرا که یون بورماید موجود در بافر TBE ممکن است برخی آنزیم ها را غیرفعال نماید. از مزایای دیگر استفاده از این بافر می توان به امکان الکتروفورز طولانی بدون نیاز به تعویض بافر اشاره نمود. بافر TAE را مولا بصورت 50X تهیه و درهنگام تهیه ژل آگارز و همچنین برای تانک الکتروفورز به میزان یک پنجاهم رقیق کرده و بصورت TAE 1X استفاده شد. طرز تهیه ۱ لیتر از بافر TAE 50X در زیر نشان داده شده است.

طرز تهیه یک لیتر از بافر TAE 50X:

- 242 g Tris
- 57.1 ml glacial acetic acid
- 100 ml EDTA (0.5 M, pH 8)

→ To 1 litre with ddH_2O

Loading buffer

آب، گلیسیرین/سوکروز، برموفنول بلو، گزیلن سیانول

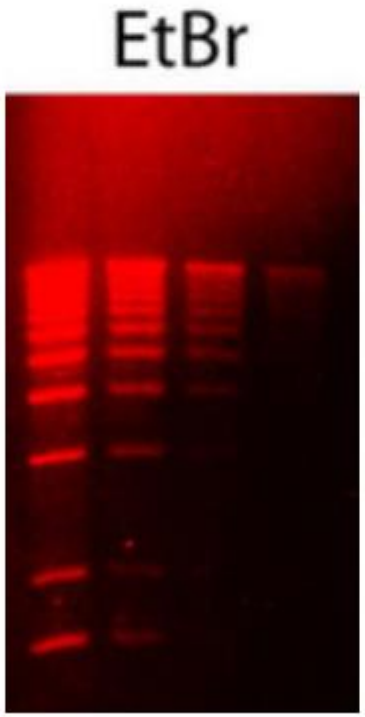
1. کمک می کند نمونه مستقیم به ته چاهک بچسبد و پخش نشود
2. پایان عمل الکتروفورز را مشخص می نماید

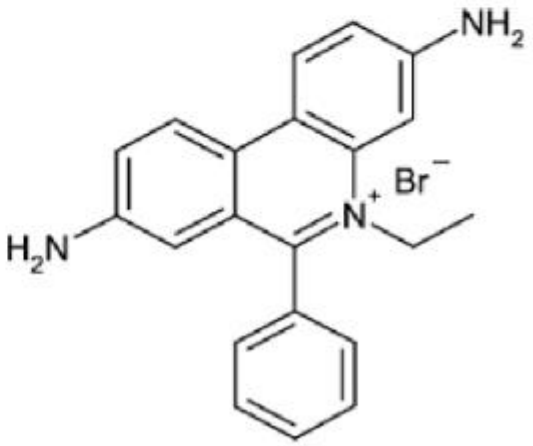
برموفنل بلو	۲۵۰ میلی گرم
گلیسیرین	٦۰ میلی لیتر
تریس اسیدی (۱۵۰ میلی مولار)	۳۳ میلی لیتر
آب مقطر	۷ میلی لیتر

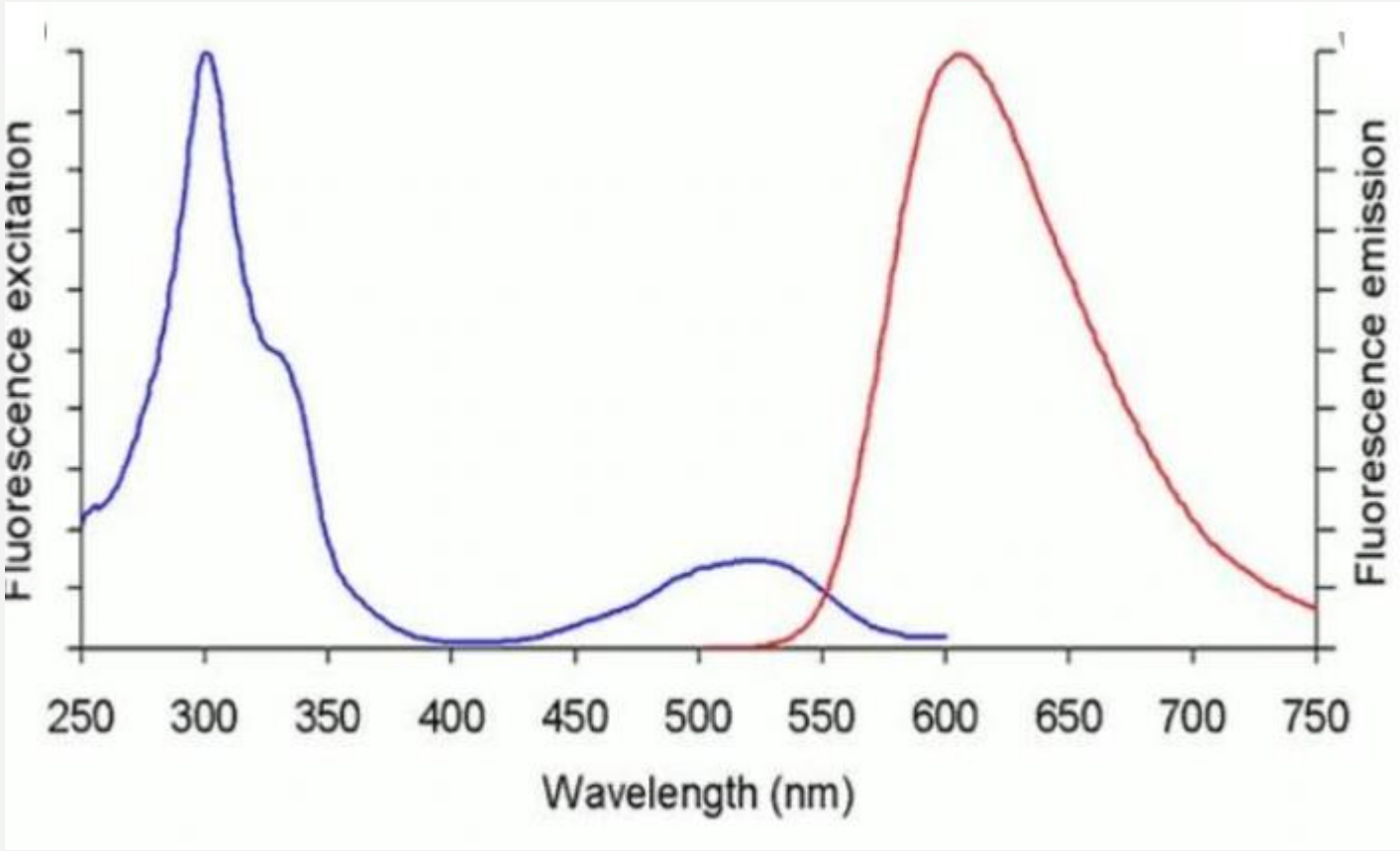
DNA staining

Ethidium Bromide Solution, 10 mg/ml

اتیدیوم بروماید برای مشاهده نوارهای اسیدهای نوکلئیک در الکتروفورز به کار می‌رود. اتیدیوم بروماید یک ماده جامد غیر فرار کمی محلول در آب و به رنگ قرمز تیره می‌باشد که در مقابل نور فرابنفش به رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز در می‌آید.






Fluorescence excitation
Fluorescence emission
250
300
350
400
450
500
550
600
650
700
750
Wavelength (nm)

SYBR Safe

SYBR safe یک رنگ تجاری برای رنگ آمیزی DNA است که به وسیله کپانی Invitrogen تولید می شود. تبلیغ تجاری این ماده سمیت بسیار کمتری را نسبت به اتیدیوم بروماید نشان می دهد. برتری دیگر آن حساسیت بسیار بالای این رنگ است که همانند اتیدیوم بروماید می باشد اما برای تشخیص نیاز به نور UV نبوده و در نور مرئی قابل مشاهده است.

روش کار: SYBR safe تنها به صورت رنگ درون ژلی مورد استفاده قرار می گیرد. این ماده به صورت بافرهای آماده ارائه می شود در نتیجه غلظت آن نامشخص است.

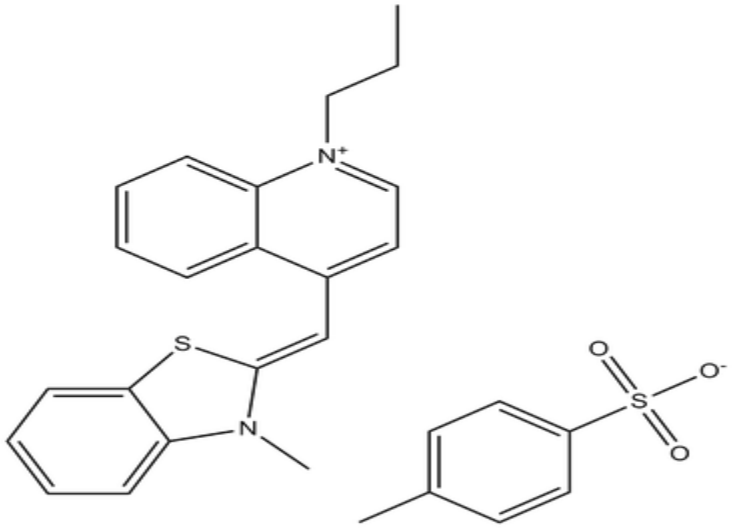
تشخیص: نور مرئی

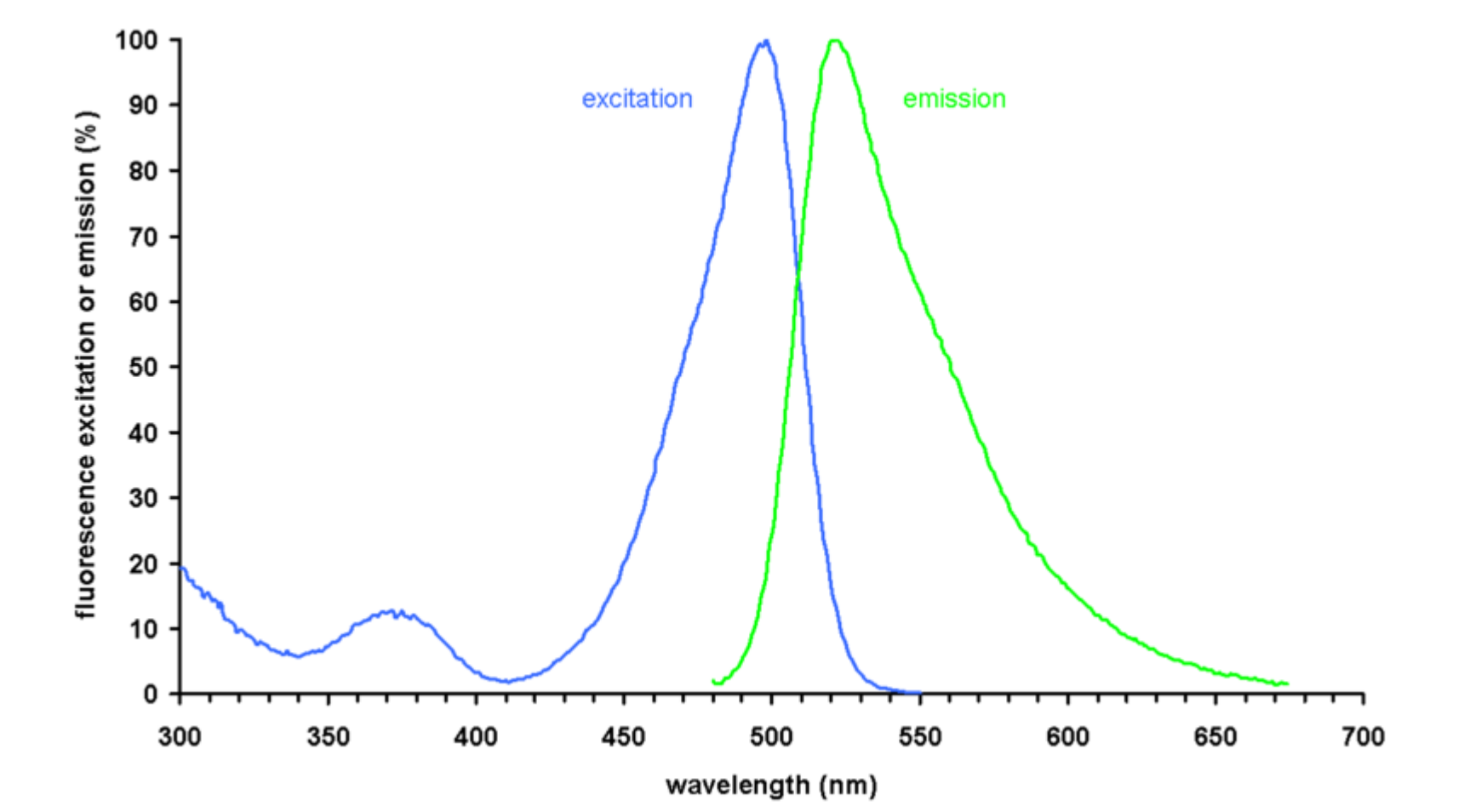
حساسیت: همانند اتیدیوم بروماید باند های ۱-۵ نانوگرمی قابل تشخیص می باشند.

سمیت: گزارش شده است که جهش زایی آن کمتر از اتیدیوم بروماید است اما می تواند مسمومیت ایجاد کند.

SYBR Safe DNA Gel Stain

Safe and sensitive DNA/RNA gel stain




excitation
emission
fluorescence excitation or emission (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
300
350
400
450
500
550
600
650
700
wavelength (nm)

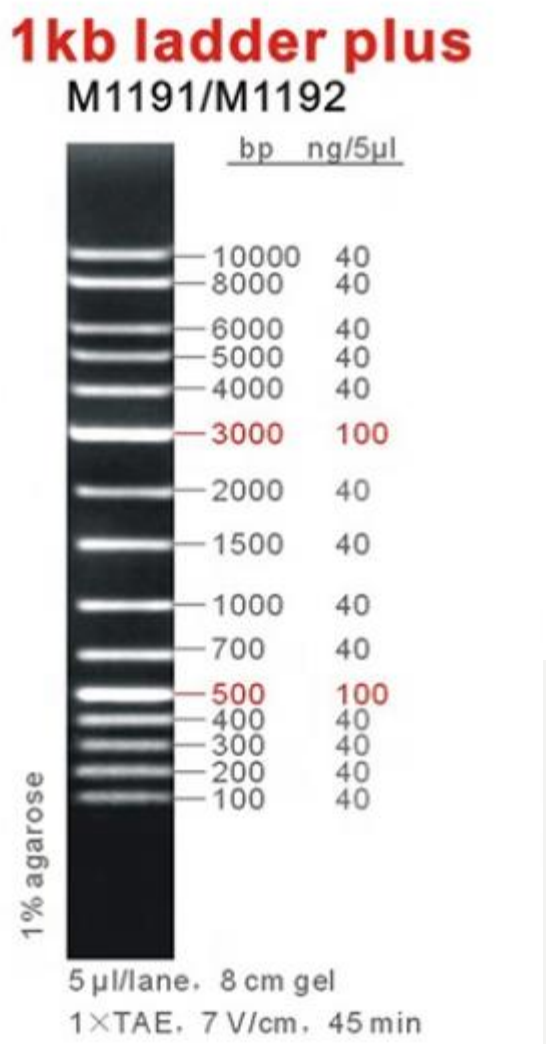


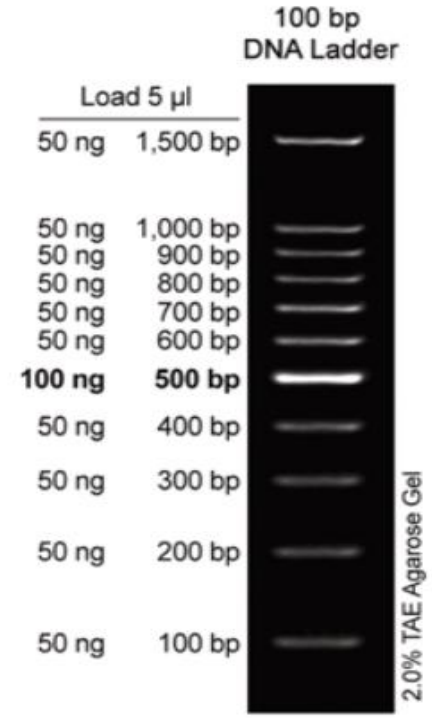
تصویر برداری از ژل توسط
Gel documentation system

- ژل داک یا تصویر بردار ژل، دستگاهی است که کاربردی اساسی در بیولوژی مولکولی دارد
- با استفاده از این دستگاه می توان به تصویر برداری از باندهای جدا شده اسیدهای نوکلئیک و پروتئین ها پرداخت
- این ژل ها معمولا با استفاده از اتیدیوم برماید و یا فلوروفورهای دیگر مانند سایبر گرین و ... رنگ امیزی می شوند

مارکرهای وزن ملکولی (DNA marker)

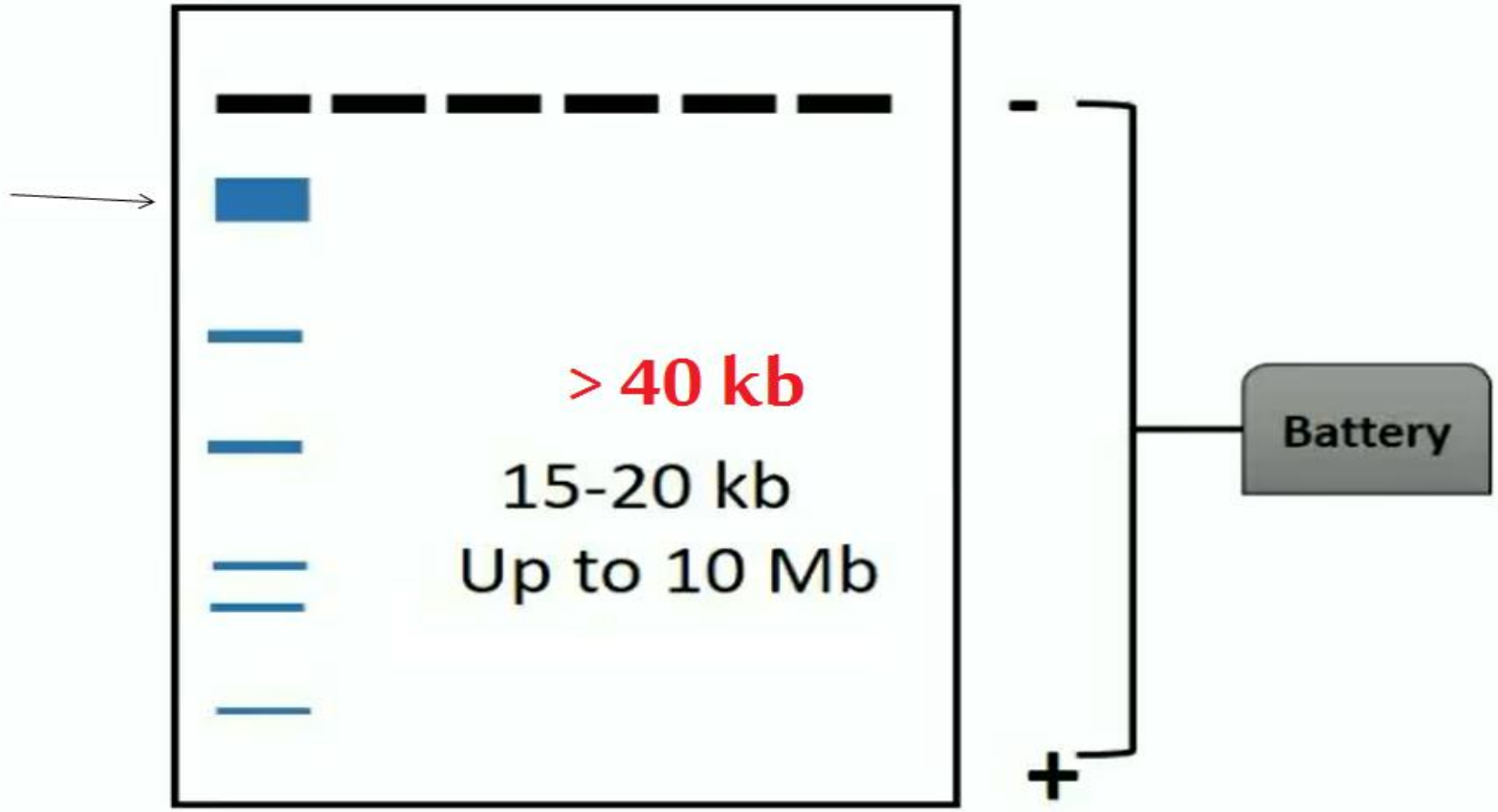
مارکرها دارای قطعاتی از DNA در اندازه های استاندارد تعیین شده هستند که از روی اندازه قطعات آنها می توان حدود اندازه قطعات DNA مورد آزمایش را تخمین زد. از مارکرها همچنین برای تعیین غلظت DNA مورد آزمایش استفاده می شود. با توجه به اینکه غلظت هر باند مارکر از قبل توسط کارخانه سازنده مشخص شده است بنابراین می توان با مقایسه شدت و پهنای باندی که از مارکر بدست می آید با باندی که در نتیجه لود کردن DNA مشاهده شده است، غلظت باند DNA مورد نظر را تخمین زد. تخمین غلظت DNA مورد نظر جهت ارسال به تعیین توالی بسیار مهم می باشد.





What is PFGE?

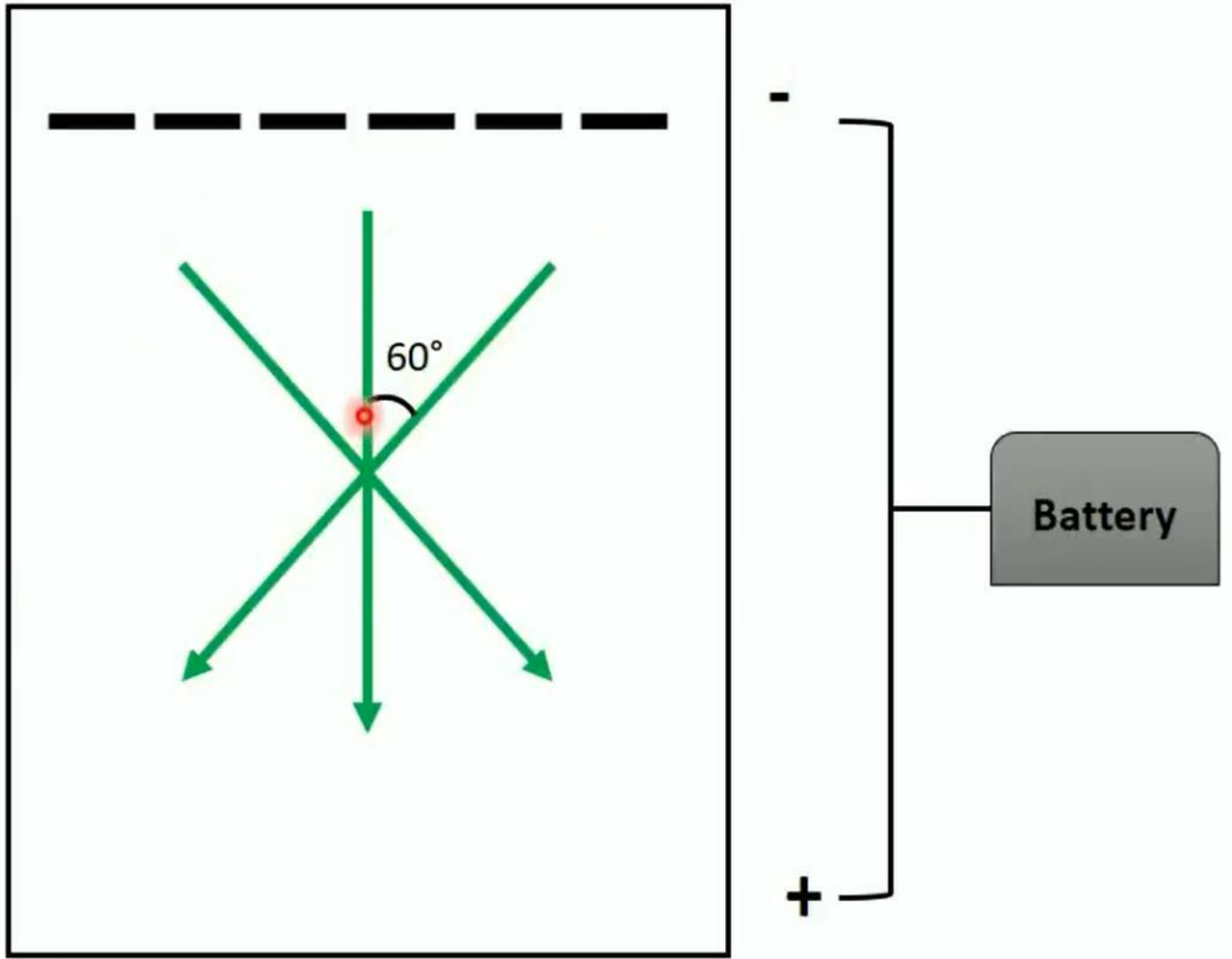
- Is a technique developed from agarose gel elechtrophoresis
- Used to separate large fragments of DNA molecules

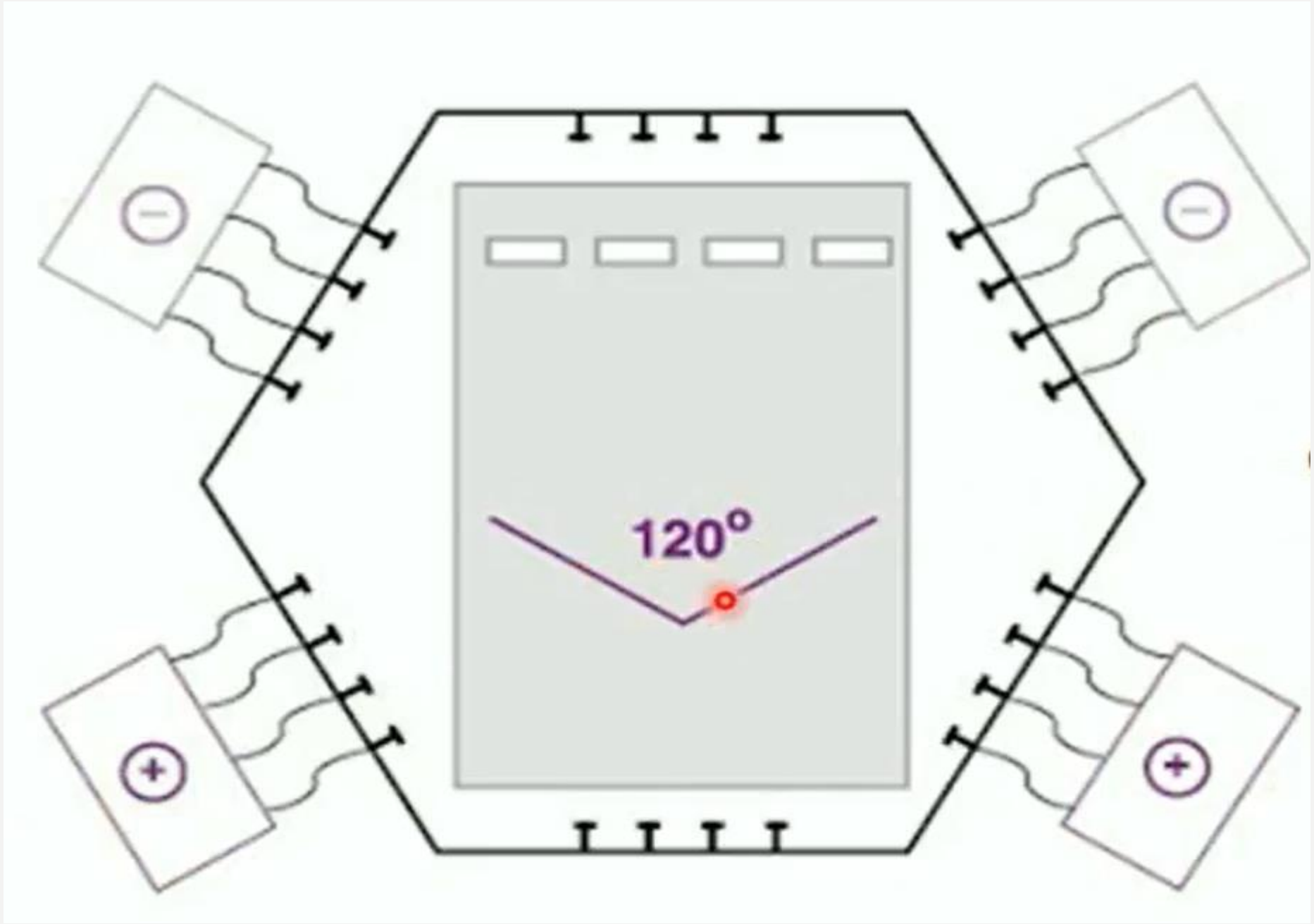


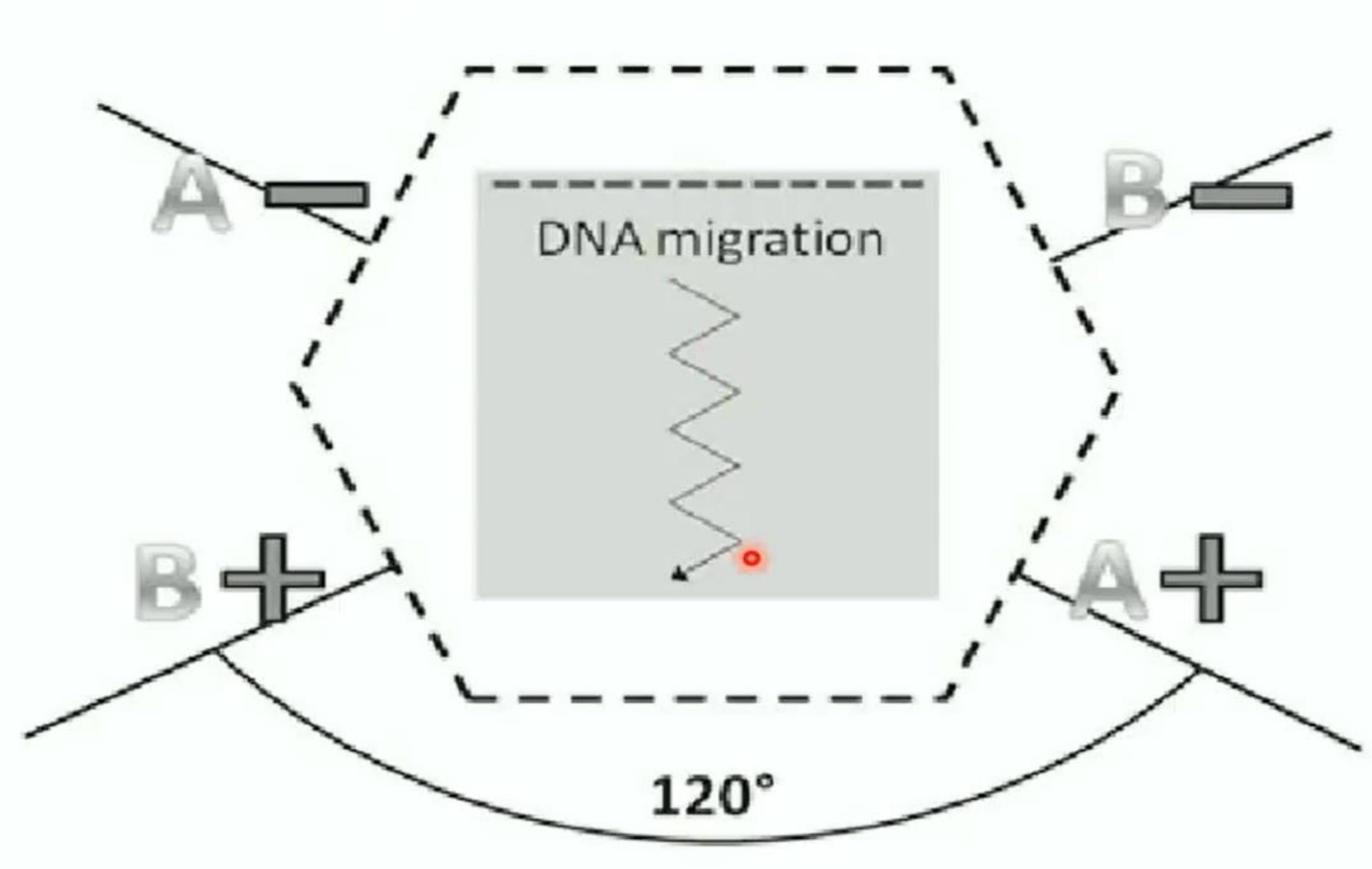
What Modifications?

1- Low concentration of the agarose solution (1%)

2- Change the **direction** of the electrical field




120°

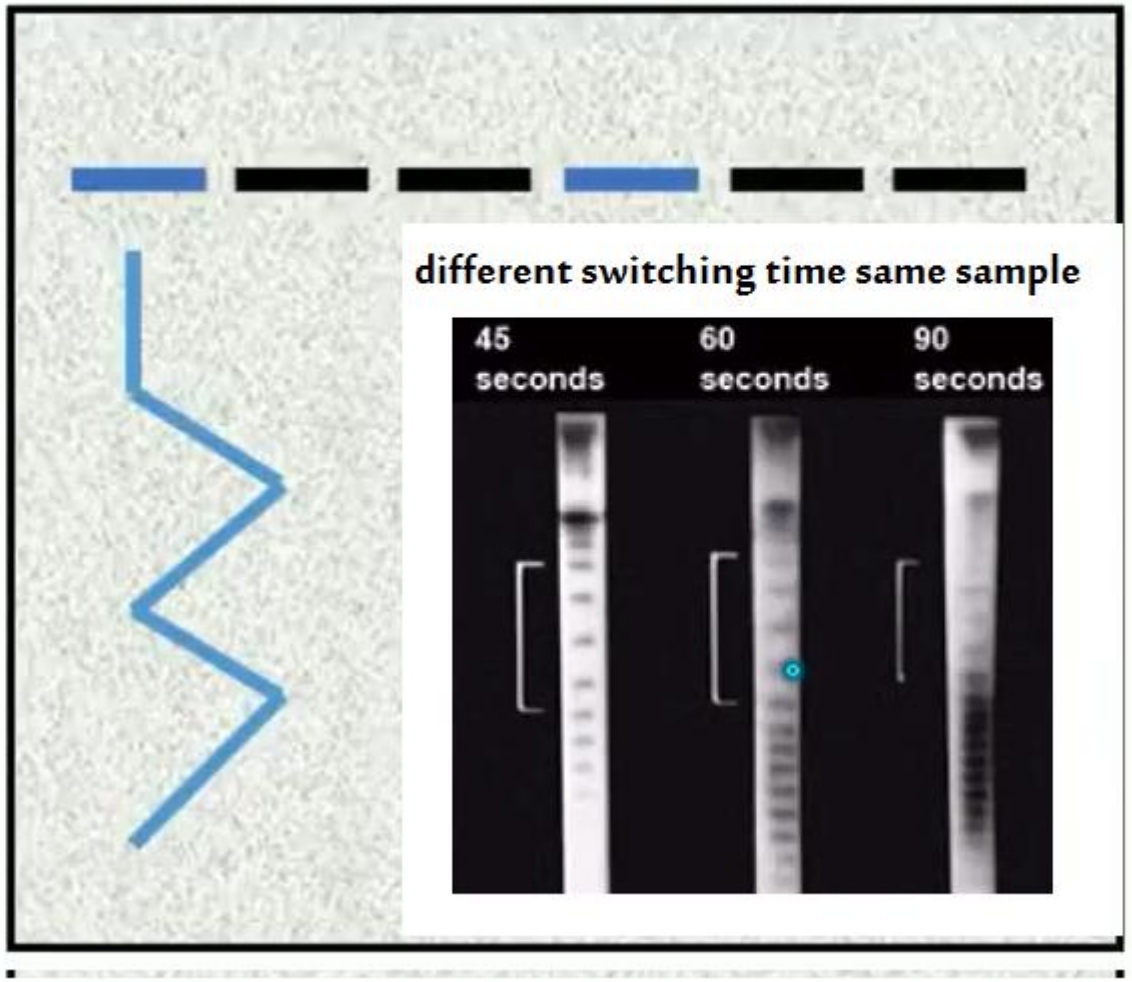

A
B
DNA migration
B
A
120°

What Important Parameters

1- Voltage (V/cm)

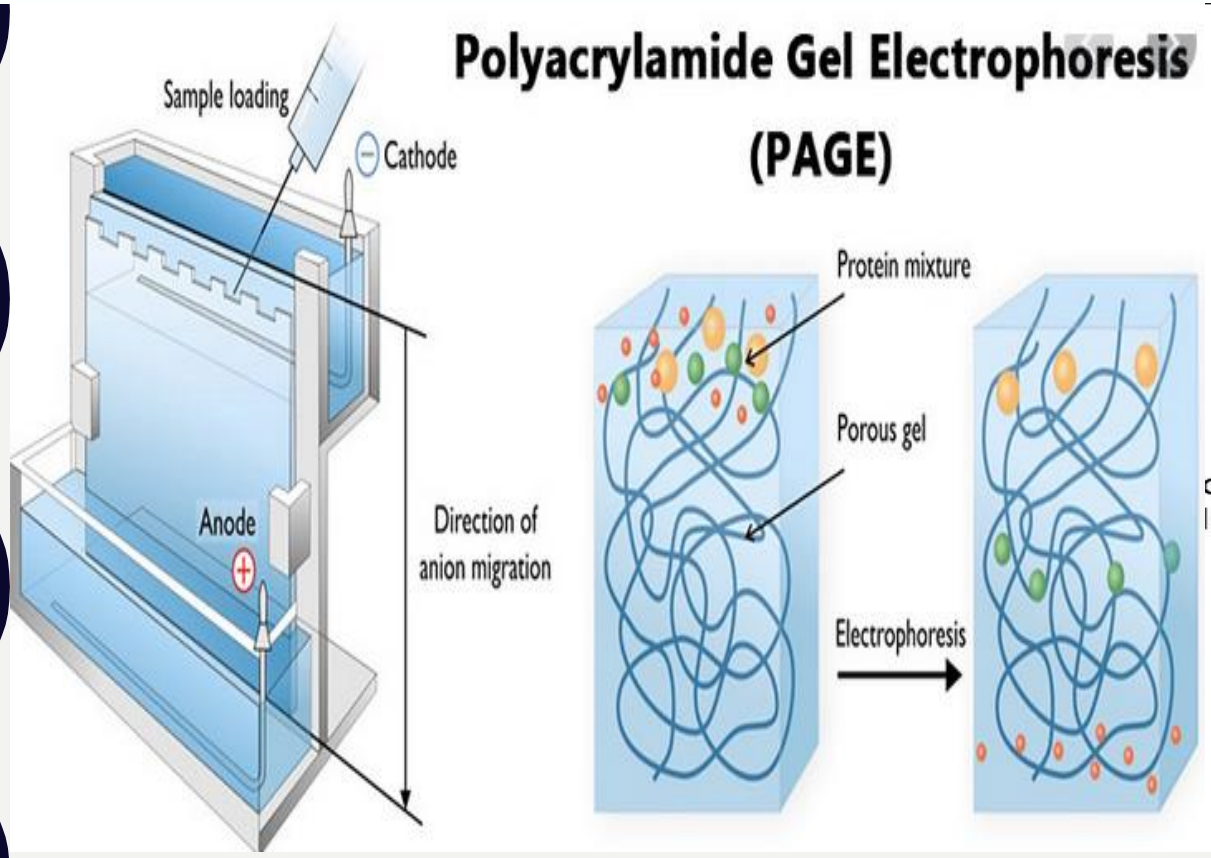
2- The angle:
Smaller angle (106°) gives better resolution with larger segments.

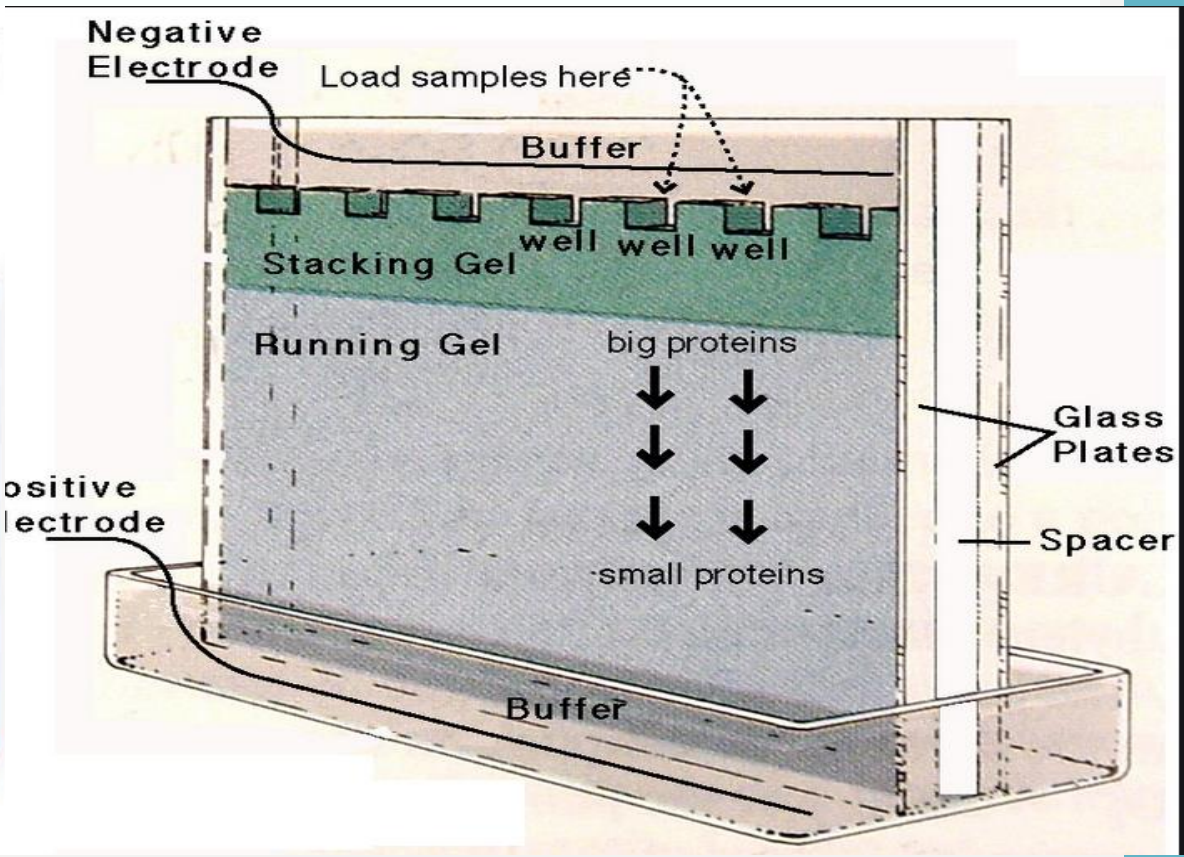
3- The switching time:
The longer the switching time is, the further the large segments will migrate throw the gel.



SDS-PAGE

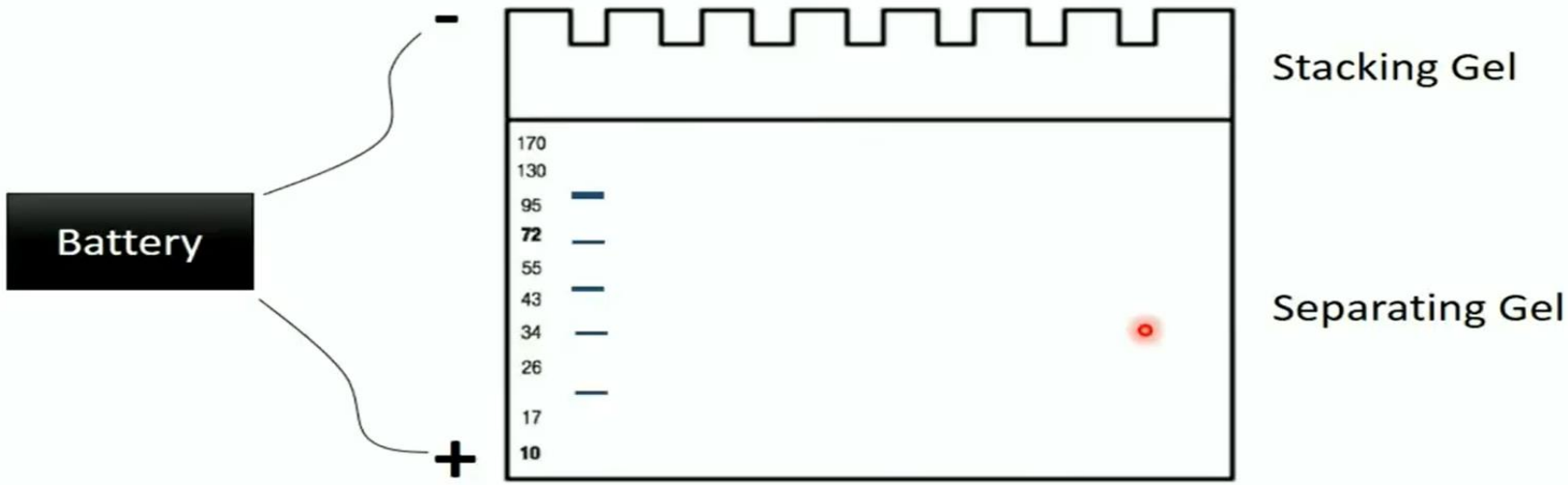
Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis





SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

- Protein separation
- PolyAcrylamide gel



سیستم بافری

ژل پلی اکریل آمید از دو قسمت ژل متراکم کننده (Stacking gel) و ژل جداکننده (resolving gel) تشکیل شده است. ژل متراکم کننده در بالا قرار گرفته است و مواد تشکیل دهنده آن با ژل جدا کننده متفاوت می باشد. در ژل متراکم کننده به دلیل تراکم یکسان بار الکتریکی کلیه پروتئین ها حرکت آنها با سرعت یکسانی می باشد و به صورت یک لایه نازک در می آیند. اما با رسیدن مجموعه پروتئینی به ابتدای ژل جدا کننده ، جداسازی آنها بر اساس وزن مولکولی شروع می شود. بار خالص پروتئین SDS -در دامنه PH بین ۷-۱۰ تغییر چندانی نمی کند و حرکت پروتئین ها در این دامنه نیز تفاوت محسوسی ندارد.

Sample preparation

Denaturation Buffer

- Tris-HCl PH 6.8
- SDS
- β-Mercaptoethanol
- Bromophenol Blue
- Glycerol
- ddH2O

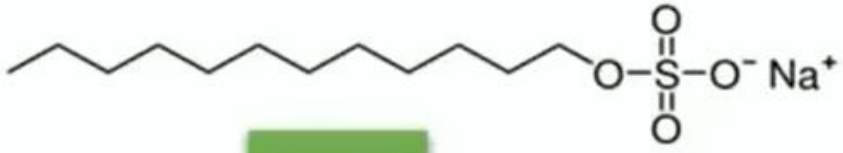
(loading buffer)

Proteins



1.4 g SDS : 1 g protein

1 SDS: 2 amino acid



SDS

- Anionic detergent
- When dissolved it gives a net negative charge
- Function:

➢ Binds to the amino acids side chains giving the protein a net negative charge

➢ Breaks the non-covalent bonds

β-Mercaptoethanol

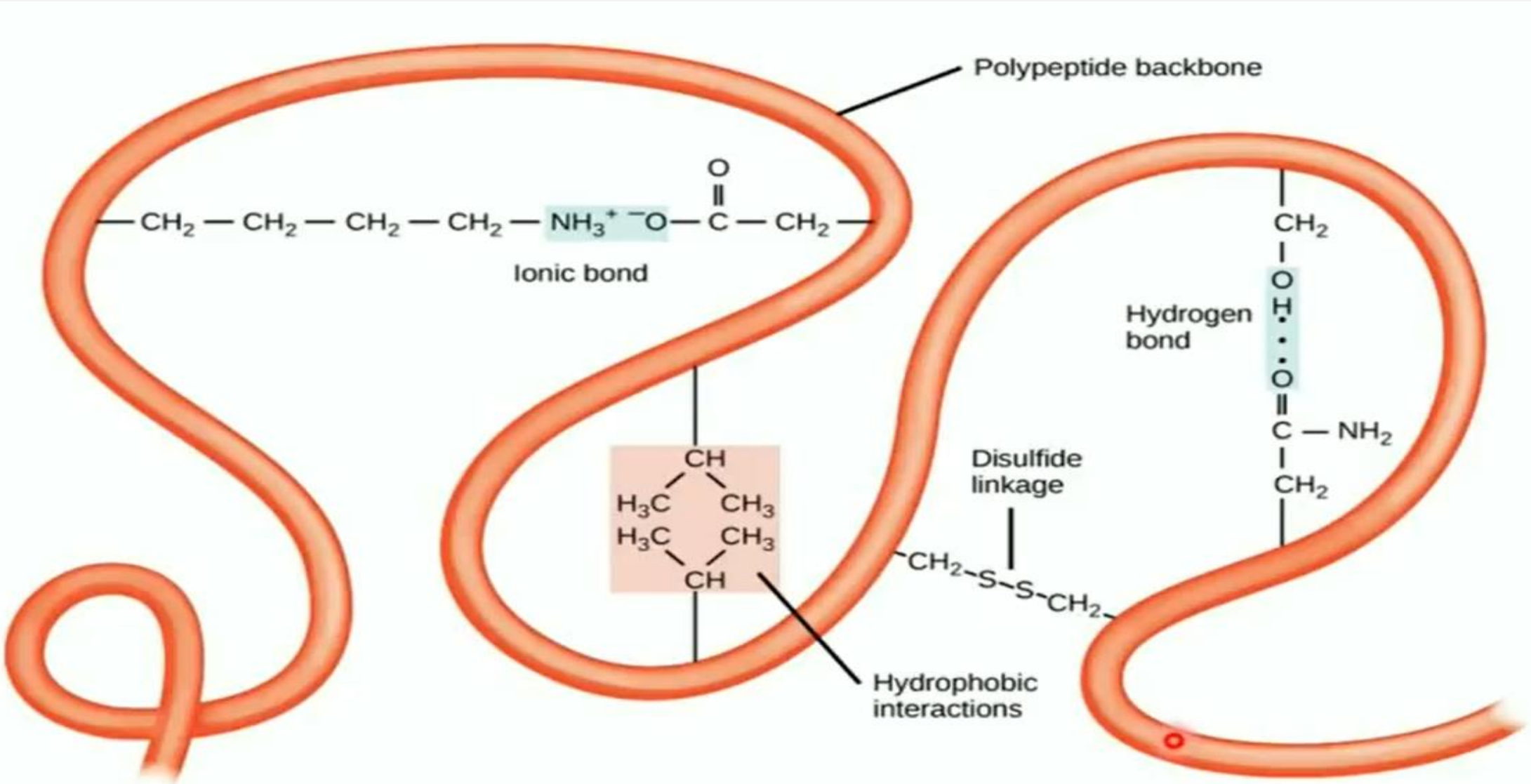
- Reducing agent
- Reduces the disulfide bonds in the proteins

Protein — S — S — Protein

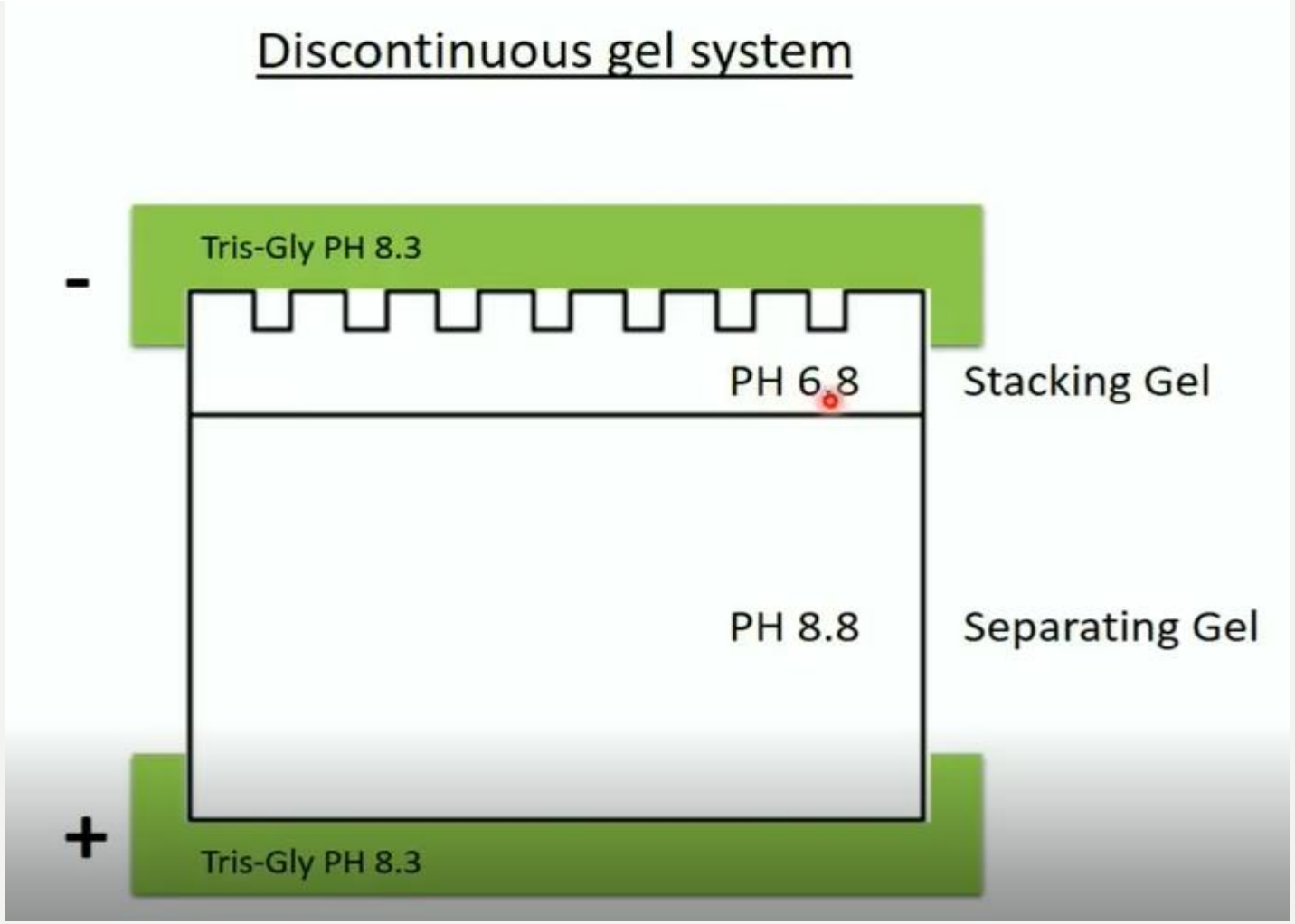
↓

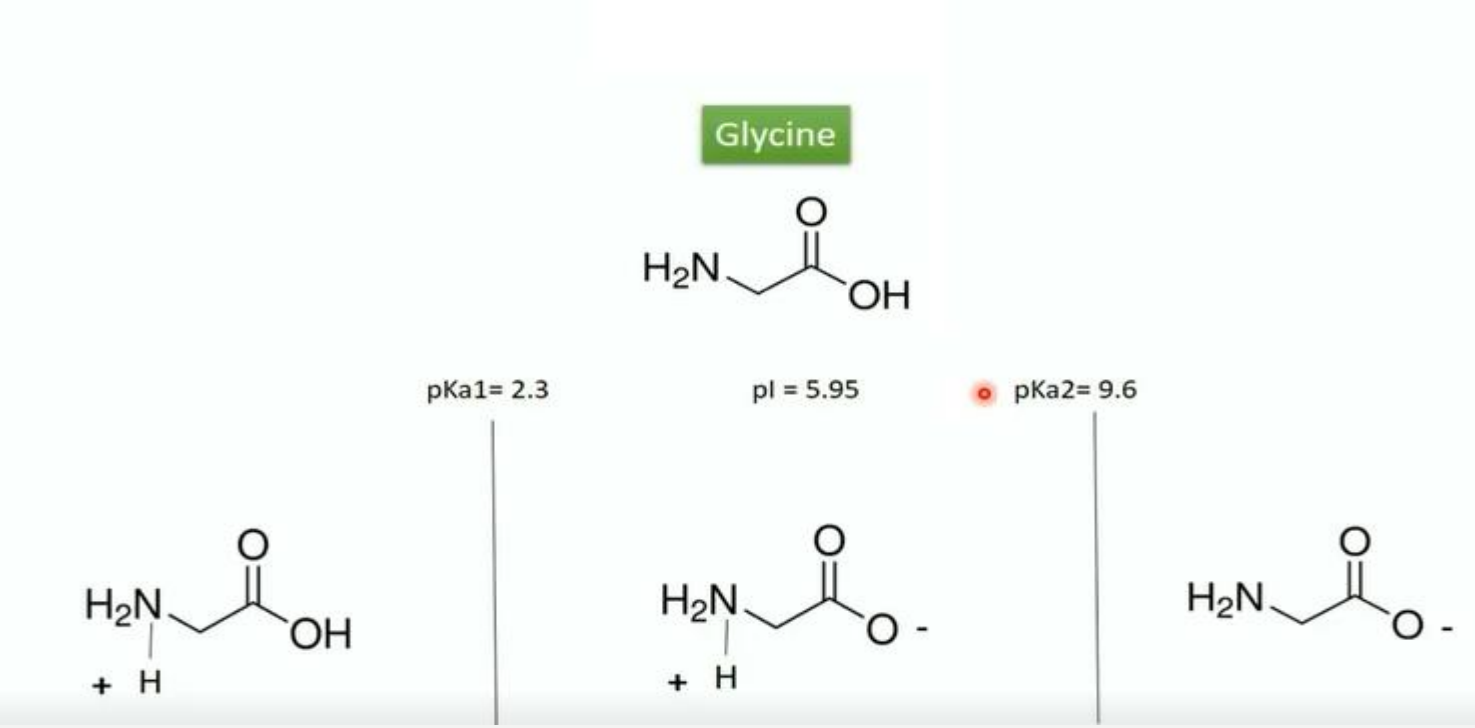
Protein — SH HS — Protein

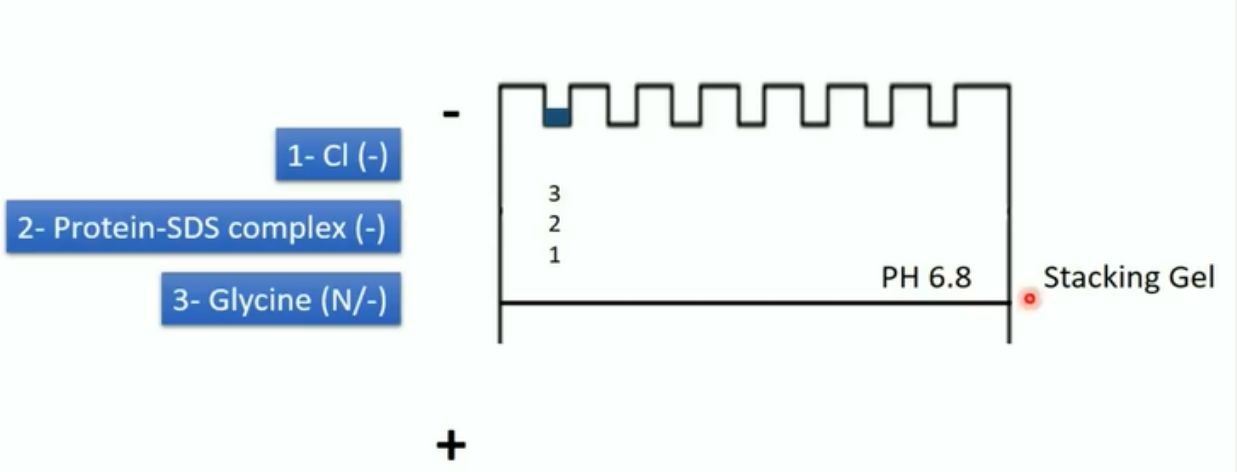
SDS ME

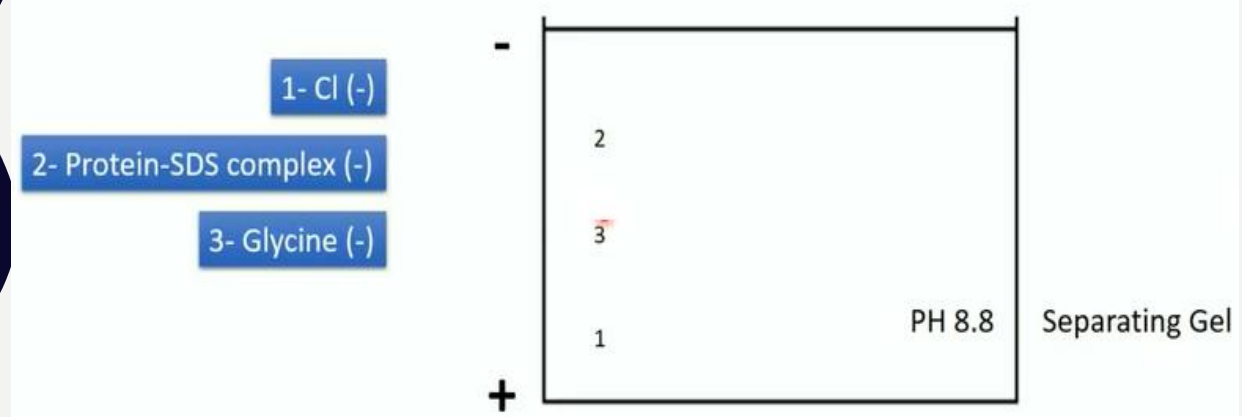

Polypeptide backbone
Ionic bond
Hydrogen bond
Disulfide linkage
Hydrophobic interactions

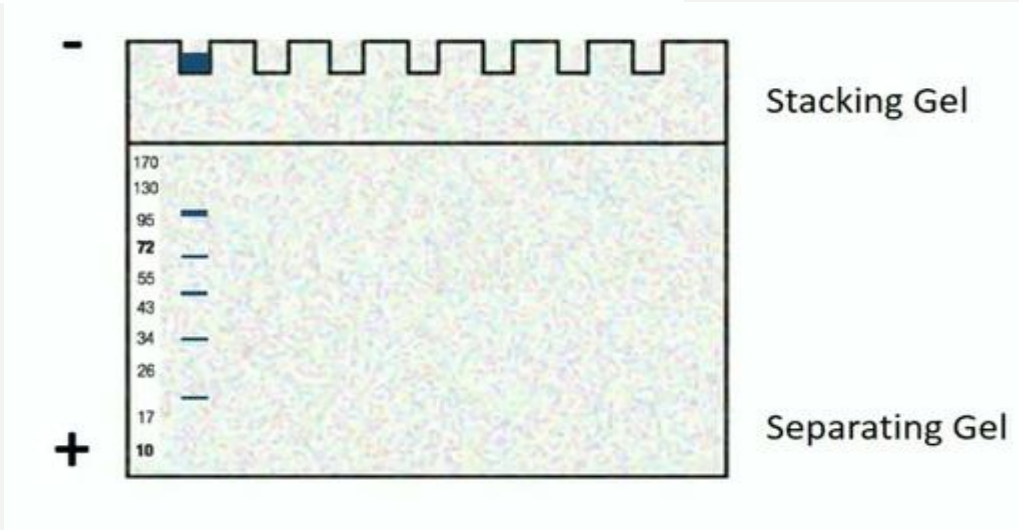
در سیستم بافری پیوسته غلظت و ترکیب یون ها و PH در سراسر مسیر الکتروفورز یکسان می باشد.
سیستم بافری لاملی متداولترین سیستم بافری ناپیوسته در الکتروفورز می باشد. در این سیستم نمونه پروتئین و و ژل بالا حاوی بافر تریس- هیدروکلرید با PH=6.8 و ژل پایین حاوی بافر تریس هیدروکلرید با PH=8.8و بافر مخازن (بافر الکترودها) شامل تریس-گلیسین با PH=8.3 می باشد.




Glycine
pKa1= 2.3
pI = 5.95
pKa2= 9.6


1- Cl (-)
2- Protein-SDS complex (-)
3- Glycine (N/-)
-
3
2
1
PH 6.8
Stacking Gel
+


1- Cl (-)
2- Protein-SDS complex (-)
3- Glycine (-)
-
2
3
1
PH 8.8
Separating Gel
+


-
170
130
95
72
55
43
34
26
17
10
+
Stacking Gel
Separating Gel

The SDS PAGE gel in a single electrophoresis run can be divided into **stacking gel** and separating gel. Stacking gel (acrylamide 5%) is poured on top of the separating gel (after solidification) and a gel comb is inserted in the stacking gel. The acrylamide percentage in SDS PAGE gel depends on the size of the target protein in the sample. (details shown below)

Acrylamide %	M.W. Range
7%	50 kDa - 500 kDa
10%	20 kDa - 300 kDa
12%	10 kDa - 200 kDa
15%	3 kDa - 100 kDa

Volumes of stacking gel and separating gel differ according to the thickness of gel casting:

Thickness of the gel	Vol. of stacking gel	Vol. of separating gel
0.75mm	2ml	4ml
1.0mm	3ml	6ml
1.5mm	4ml	8ml

- **For a 5 ml stacking gel:**

H_2O	2.975 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml
10% (w/v) SDS	0.05 ml
Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0.8% w/v)	0.67 ml
10% (w/v) ammonium persulfate (AP)	0.05 ml
TEMED	0.005 ml

- **For a 10ml separating gel:**

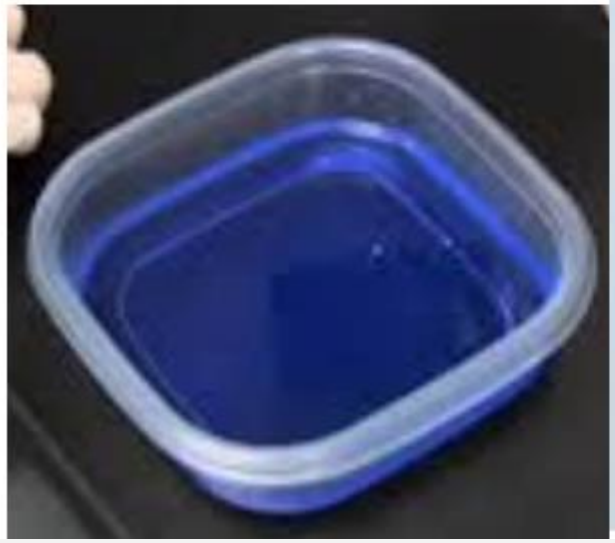
Acylamide percentage	6%	8%	10%	12%	15%
H_2O	5.2ml	4.6ml	3.8ml	3.2ml	2.2ml
Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0.8% w/v)	2ml	2.6ml	3.4ml	4ml	5ml
1.5M Tris(pH=8.8)	2.6ml	2.6ml	2.6ml	2.6ml	2.6ml
10% (w/v)SDS	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml
10% (w/v) ammonium persulfate (AP)	100μ l	100μ l	100μ l	100μ l	100μ l
TEMED	10μ l	10μ l	10μ l	10μ l	10μ l

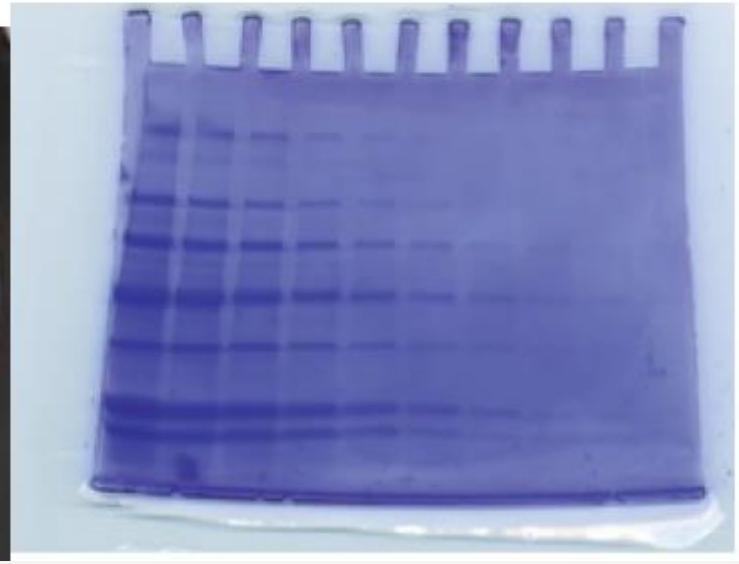
رنگ آمیزی

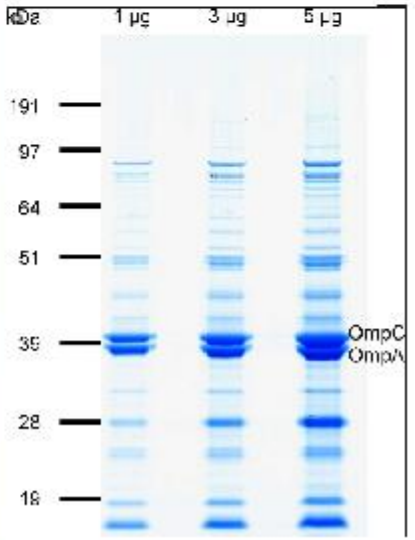
رنگ آمیزی پروتئین ها در ژل پلی اکریل آمید با روش های متنوعی امکان پذیر است. کوماسی بلو انواع R و Gو نیترات نقره از پر استفاده ترین مواد برای رنگ آمیزی پروتئین ها هستند.

رنگ آمیزی با کوماسی بلو**R-250**

کوماسی بلو R-250 معمولترین رنگ برای رنگ آمیزی پروتئین ها است. سادگی رنگ آمیزی، هزینه کم، ثبات رنگ برای مدت طولانی و حساسیت نسبتا بالا از مزایای آن می باشند. حساسیت این روش ۰,۵-۰,۲ میکروگرم پروتئین در هر باند می باشد. در این روش مراحل تثبیت و رنگ آمیزی پروتئین ها به طور همزمان صورت می گیرد.







1. حمام رنگ جهت رنگ آمیزی پروتئین ها در ژل اکریل آمید.

2. مواد

- *محلول رنگ آمیزی: ۰,۲۵ گرم کوماسب بلو R-250 را در ۱۲۵ میلی لیتر متانول حل کنید. سپس ۲۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه نمایید. غلظت رنگ در این محلول حدود ۰,۱ درصد وزنی/حجمی است .قبل از استفاده محلول رنگ را با کاغذ واتمن شماره ۱ صاف کنید. این محلول می تواند به عنوان تثبیت کننده پروتئین ها نیز عمل کند.

- *محلول رنگ بر: ۲۰۰ میلی لیتر متانول، ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و ۷۰۰ میلی لیتر آب مقطر را به هم بیفزایید.

روش رنگ آمیزی

- ژل را در ظرف درب دار قرار دهید. حجم کافی از محلول رنگ (مثلا ۱۰۰ میلی لیتر برای یک ژل کوچک) اضافه کنید. در ظرف را بسته و آن ربا ۱-۲ ساعت روی شیکر قرار دهید.

- محلول رنگ را تخلیه کنید. ژل را کاملا با آب معمولی شسته، سپس محلول رنگ بر اضافه کنید. در ظرف را بسته، آن را روی شیکر قرار دهید. پس از تیره شدن محلول رنگ بر، آن را با محلول تازه تعویض کنید. این عمل را چند بار تکرار کنید تا زمینه ژل شفاف گردد و باندهای پروتئینی به وضوح مشاهده شوند.

- ژل را در محلول ۷ درصد اسید استیک قرار دهیدو در ظرف را ببندید. ژل در این حالت برای مدت طولانی قابل نگهداری است.