

۱- محمد جواهریان؛ کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
 ۲- فاطمه فرجی مزرعه خلف؛ کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
 ۳- سعید شیرین زاده؛ کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (PAGE)

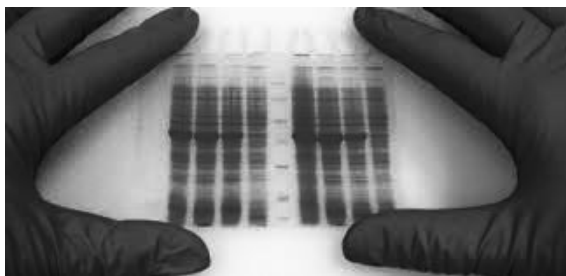
توسط ماکرومولکول ها را در هنگام عبور از ژل در طول PAGE تعدیل می کند، بنابراین بر وضوح جداسازی تأثیر می گذارد.

- ژل های شل (۴ تا ۸ درصد آکریل آمید) به مولکول های با وزن مولکولی بالاتر اجازه می دهند سریع تر از ژل عبور کنند در حالی که ژل های سخت (۱۲ تا ۲۰ درصد آکریل آمید) مهاجرت مولکول های بزرگ را محدود می کنند و به طور انتخابی اجازه می دهند تا مولکول های کوچک در ژل حرکت کنند.

پروتکل SDS-PAGE

۱. آماده سازی نمونه

نمونه های پروتئینی با حرارت دادن آنها با مواد شوینده SDS و مرکاپتواتانول دنا توره می شوند. اولی به شدت به پروتئین ها متصل می شود و بار منفی زیادی به آنها می دهد در حالی که دومی گروه های سولفیدریل را آزاد می کند، بنابراین زنجیره های پلی پپتیدی حامل بار منفی اضافی و نسبت بار به جرم مشابه تولید می کند. این به وضوح پروتئین ها بر اساس اندازه آنها در طول الکتروفورز ژل کمک می کند.



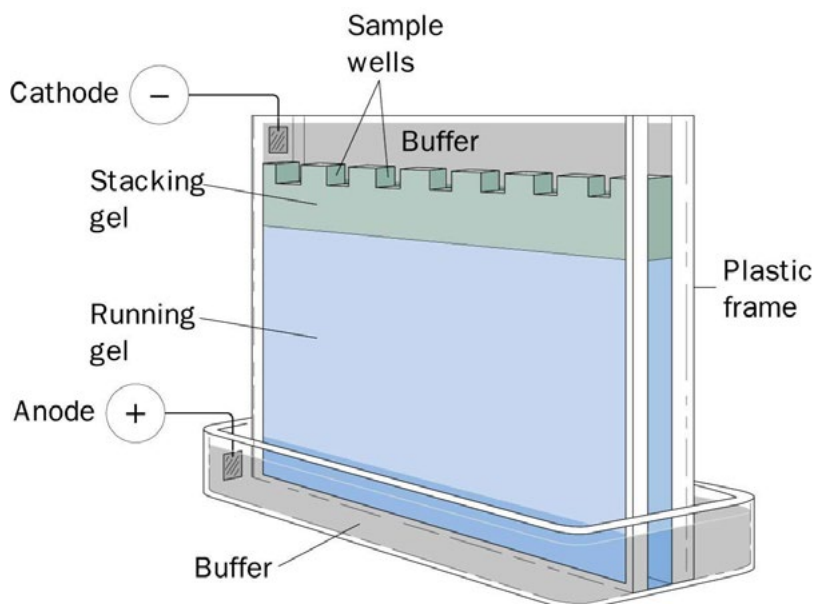
در روش های الکتروفورز، مولکول های باردار در میدان الکتریکی جدا می شوند. تحرک یک مولکول با اندازه آن نسبت معکوس و با بار آن نسبت مستقیم دارد. در فرآیند الکتروفورز، پروتئین ها به سمت یک الکترود با بار مخالف در یک میدان الکتریکی حرکت می کنند و سرعت حرکت آنها در یک سیستم الکتروفورتیک علاوه بر ویژگی های ذاتی مانند اندازه، بار و شکل پروتئین ها توسط چندین عامل مانند دما، pH و غلظت بافر کنترل می شود. جداسازی الکتروفورتیک پروتئین ها صرفاً بر اساس وزن مولکولی آنها تنها در صورتی امکان پذیر است که بار تمام مولکول های پروتئین را بتوان یک سان دستکاری کرد. در چنین حالتی، تحرک مولکول های پروتئین تنها به اندازه آنها بستگی دارد. الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (PAGE) تکنیکی بر اساس این ایده است و برای جداسازی پروتئین ها بر اساس اندازه آنها استفاده می شود.

اساس الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید

- در PAGE، یک شوینده آنیونی به نام سدیم دودسیل سولفات (SDS) برای اتصال به پروتئین ها و دادن بار منفی به آنها استفاده می شود. سپس پروتئین ها با استفاده از یک ماتریس ژل ساخته شده از پلی آکریل آمید در یک میدان الکتریکی به صورت الکتروفورز بر اساس اندازه آنها جدا می شوند.

- پلی آکریل آمید در نتیجه واکنش پلیمریزاسیون بین آکریل آمید و یک محلول به نام (BIS) N,N' -methylene-bis-acrylamide با استفاده از یک کاتالیزور تولید می شود. درجه پلیمریزاسیون یا اتصال عرضی را می توان با تنظیم غلظت آکریل آمید و BIS کنترل کرد.

- هر چه اتصال عرضی بیشتر باشد ژل سخت تر می شود. سختی ژل، به نوبه خود، اصطکاک تجربه شده



۲. تهیه ژل

ژل الکتروفوریتیک معمولاً دارای اجزای مختلفی از جمله آکریل آمید، BIS و بافر است. این مخلوط برای جلوگیری از تشکیل حباب در حین پلیمریزاسیون ژل، گاز زدایی می شود. پرسولفات آمونیوم، یک منبع رادیکال آزاد و یک تثبیت کننده برای شروع پلیمریزاسیون اضافه می شود. BIS همچنین برای ایجاد پیوندهای متقابل بین مولکول های آکریل آمید تا زمانی که یک ژل در نهایت تشکیل شود اضافه می شود.

۳. الکتروفورز

با اعمال جریان الکتریکی، پروتئین ها از طریق ژل به الکتروود مثبت مهاجرت می کنند زیرا دارای بار منفی هستند. هر مولکول بر اساس وزن مولکولی خود با سرعت متفاوتی حرکت می کند - مولکول های کوچک سریعتر از مولکول های بزرگتر در ژل حرکت می کنند. مهاجرت معمولاً در ولتاژهای بالاتر سریعتر است. پس از چند ساعت، مولکول های پروتئین همه بر اساس اندازه از هم جدا می شوند.

۴. رنگ آمیزی و آشکار سازی

هنگامی که الکتروفورز کامل شد، ژل را می توان با استفاده از رنگ های رنگی مانند Blue Brilliant Coomassie یا اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی کرد تا پروتئین های جدا شده به صورت نوارهای رنگی متمایز روی ژل ظاهر شوند. رنگ بدون چسب از ژل شسته می شود. سپس ژل های رنگ آمیزی شده خشک می شوند تا بتوان شدت رنگ نوارهای پروتئینی را اندازه گیری کرد. باندهای پروتئین های رادیواکتیو را می توان

با اتورادیوگرافی تشخیص داد. پروتئین ها را نیز می توان کمیت کرد زیرا محتوای پروتئین به طور مستقیم با مقدار رنگ متصل است.

برخی از سیستم های ژل یک رنگ ردیابی مانند بروموفنول آبی را همراه با نمونه پروتئین معرفی می کنند - مسافت قابل مشاهده پیموده شده توسط رنگ روی ژل به تعیین مدت زمان مورد نیاز الکتروفورز کمک می کند. بروموفنول آبی همراه با مولکول های نمونه حرکت می کند تا در نهایت به انتهای ژل برسد. الکتروفورز باید در این نقطه متوقف شود تا اطمینان حاصل شود که هیچ مولکول پروتئینی از ژل و داخل بافر الکتروفورز نمی شود.

منبع:

This is a translation into Farsi of an article originally published in English: CheriyeDath, Susha, What is Polyacrylamide Gel Electrophoresis) PAGE.?(<https://www.news-medical.net/life-sciences>, Last Updated: Jun 28, 2019.

**نسخه آنلاین هر شماره را می توانید از لینک های زیر دانلود کنید
و ورق بزنید:**



www.tashkhis.ir



@tashkhis_magazine