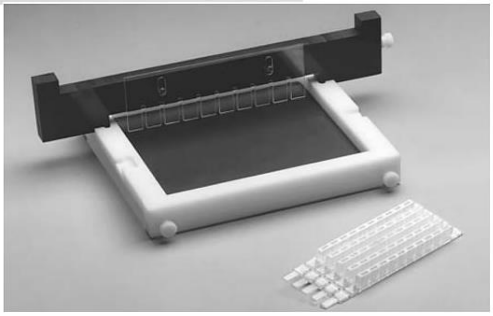


آشنایی با دستگاه الکتروفورز ژل میدان ضربانی Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

دانشکده پزشکی

گروه میکروب‌شناسی

آشنایی با دستگاه الکتروفورز ژل میدان ضربانی Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

حمید معتمدی

دانشجوی دکتری میکروب شناسی

(PFGE)

الکتروفورز ژل میدان ضربانی، تکنیک ژنوتایپی قدرتمندی است که برای جداسازی مولکول‌های DNA بزرگ (کل DNA ژنومی) پس از هضم (digesting) آن با آنزیم‌های محدودکننده منحصر به فرد و اعمال بر روی ژل در زیر میدان الکتریکی که به طور دوره‌ای تغییر جهت می‌دهد، استفاده می‌شود. PFGE یکی از بهترین روش‌هایی است که برای تایپینگ و مطالعات اپیدمیولوژی در مناطق مختلف کاربرد دارد. این روش به دلیل قدرت افتراق، تکرارپذیری و سهولت اجرا، تفسیر داده‌ها، اغلب به عنوان استاندارد طلایی در امر تایپینگ در نظر گرفته می‌شود.

کار با دستگاه CHEF Mapper

دستگاه را با کلید پاور در قسمت پایین سمت چپ روشن کنید (شکل شماره 1). در مطالب زیر به توضیحات اساسی در ارتباط با هر کدام از اجزای دستگاه پرداخته‌ایم:

- **Auto Algorithm:**

FIGE ° 180: با فشار دادن این کلید پیامی که بر روی دستگاه نمایان می‌شود این است که آخرین برنامه را می‌خواهید پاک شود- آیا ادامه می‌دهید؟ دکمه 1 را برای بله وارد کنید. با این کار آخرین برنامه موجود در حافظه کاری حذف می‌شود. هیچ برنامه ذخیره شده‌ای را پاک نمی‌کند.

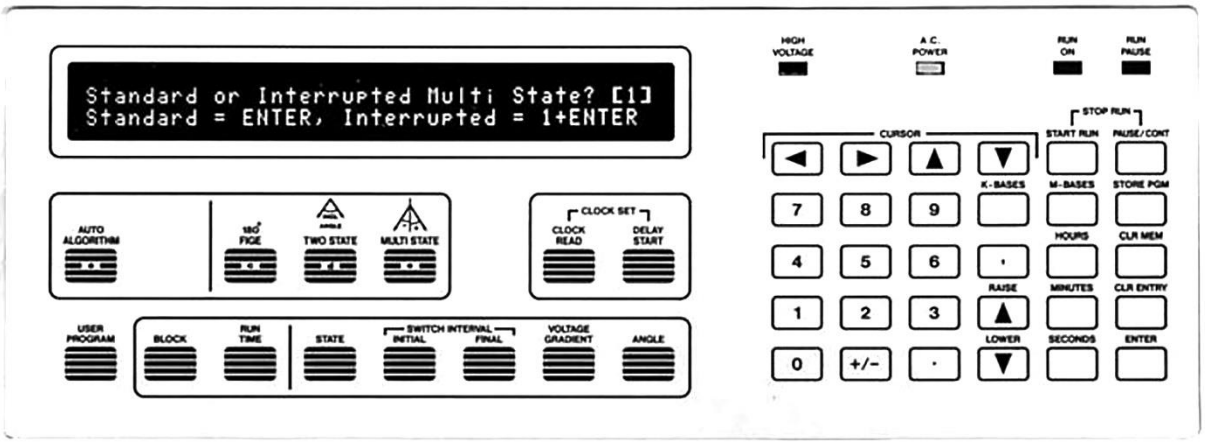
A. C. Power: هنگامی‌که برق سیستم CHEF Mapper روشن می‌شود این گزینه نیز روشن می‌شود.

Run On: هنگامی که START RUN فعال می‌شود روشن می‌شود، و هنگامی که اجرا به پایان می‌رسد یا زمانی که برنامه در حالت مکث است خاموش می‌شود.

ولتاژ بالا: در حین اجرا روشن می‌شود و زمانی که اجرا به پایان می‌رسد یا زمانی که برنامه در حالت مکث است خاموش می‌شود.

توجه: هنگامی که چراغ ولتاژ بالا روشن است، هرگز کلید برق CHEF Mapper را خاموش نکنید. از STOP RUN برای پاک کردن برنامه اجرا استفاده کنید، سپس دستگاه را خاموش کنید.

Run Pause: برای توقف یک اجرا فشار داده می‌شود (توجه: چراغ ولتاژ بالا 5 تا 25 ثانیه طول می‌کشد تا خاموش شود).



شکل شماره 1: **دستگاه CHEF Mapper**

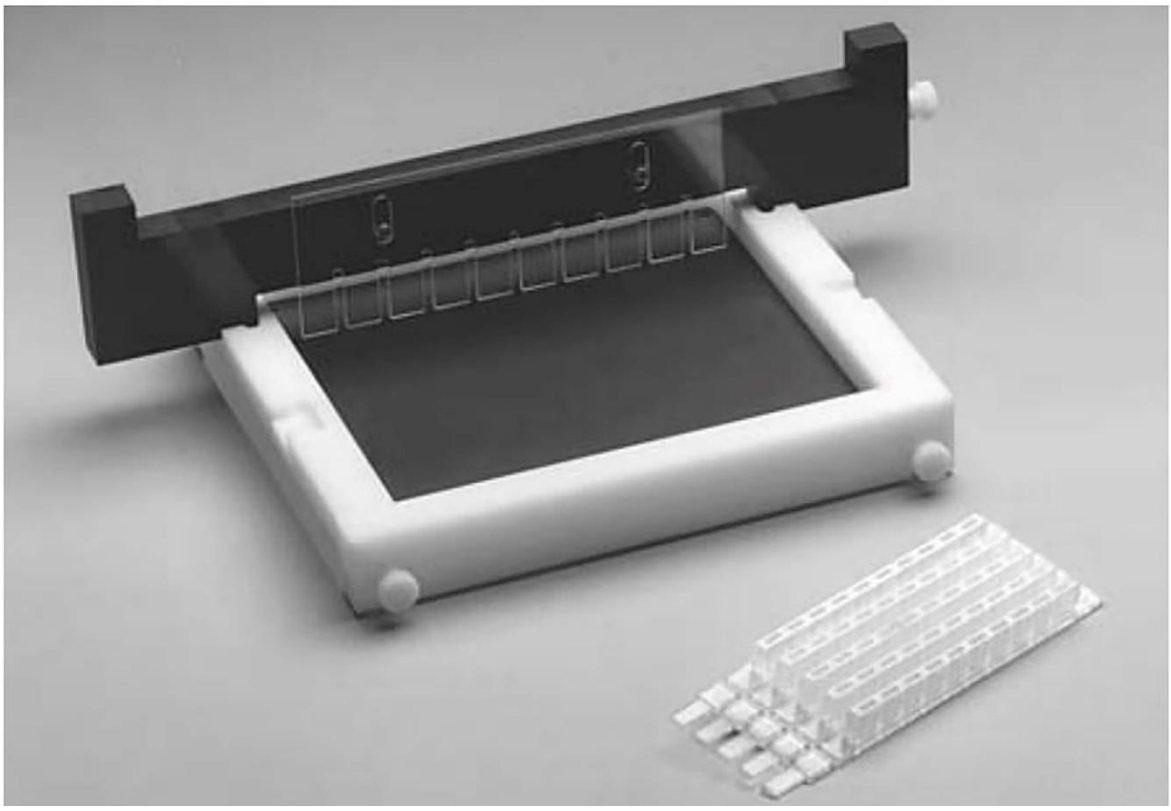
ژل الکتروفورز

- **کست ژل**

برای آماده کردن ژل از یک کست با صفحات قابل جابجایی، platform، شانه و نگهدارنده شانه استفاده کنید (شکل ...). کست ژل را روی یک سطح صاف قرار دهید (شکل شماره 2).

- بارگذاری نمونه (Sample Loading).

DNA را در یک پلاگ نمونه روی سطح صاف قرار دهید و با استفاده از تیغ یا کاردک به اندازه برش دهید. نمونه ها باید کمتر از 90 درصد ارتفاع چاه ها باشند. پلاگ‌ها را با استفاده از یک کاردک روی دیواره‌های جلویی چاهک‌های نمونه قرار دهید و به آرامی آن‌ها را به کف چاهک‌ها فشار دهید. هر نمونه را به خوبی با آگارز آماده شده با درجه ذوب پایین پر کنید و اجازه دهید آگارز به مدت 10 تا 15 دقیقه در دمای اتاق سفت شود.



شکل شماره 2: کست CHEF Mapper، نگهدارنده شانه و قالب‌های یکبار مصرف.

شرایط میدان ضربانی بر اساس اندازه DNA

جدول زیر پارامترهای اجرای پیشنهادی را نشان می‌دهد که می‌توانند برای محدوده‌های مختلف اندازه DNA ذکر شده استفاده شوند.

	DNA 1–100 kb	DNA 0.1–2.0 mb	DNA 2–4 mb	DNA > 4 mb
% Agarose	1.0–1.2%	0.8–1.2%	0.6–1%	0.5–0.8%
Buffer	0.5x TBE	0.5x TBE	1.0x TAE	1.0x TAE
Temperature	14 °C	14 °C	14 °C	14 °C
Voltage	6–9 V/cm	4.5–6 V/cm	2–3 V/cm	1.5–2.5V/cm
Pulse parameters	0.05–10 sec	10–200 sec	200–1,800 sec	10–60 min
Run times	2–15 hr	15–30 hr	24–72 hr	72–144 hr
Angle	0° + 180°, 120°	120°	120°, 106°	106°

نکات قابل توجه:

- جداسازی مولکول‌های DNA بزرگ در ژل آگارز تحت تأثیر غلظت آگارز، غلظت بافر، دمای بافر، زمان سوئیچ، ولتاژ، زاویه ضربانی و زمان اجرای الکتروفورز کل غلظت آگارز قرار می‌گیرد.
- غلظت آگارز، محدوده اندازه مولکول‌های DNA جدا شده و وضوح باندها را تعیین می‌کند. غلظت 1% آگارز در جداسازی مولکول‌های DNA تا اندازه 3 mb مفید است.
- غلظت ژل زیر 1٪ (0.5-0.9٪) در جداسازی DNA با وزن مولکولی بسیار بالا، بیشتر از 3 mb مفید است، اگرچه باندها پراکنده‌تر هستند.
- در الکتروفورز میدان ضربانی، تحرک DNA به تغییرات دمای بافر حساس است. با افزایش دمای بافر، تحرک DNA افزایش می‌یابد، اما وضوح کاهش می‌یابد. بافر را تا 14 درجه سانتیگراد خنک کنید تا وضوح باند حفظ شود و گرمای تولید شده در طول کارهای طولانی مدت دفع شود. ولتاژ بالا (300 ولت) بیش از 1 روز نیاز به تغییر بافر پس از هر دوره 24 ساعته دارد تا از تخریب بافر جلوگیری شود.
- بافر تریس بورات Tris borate با غلظت 0.5X رایج‌ترین بافر مورد استفاده در الکتروفورز میدان ضربانی است.
- بافر تریس استات Tris-acetate با غلظت 1.0X می‌تواند به جای TBE استفاده شود.
- سرعت حرکت مولکول‌های DNA از راه ژل آگارز به زمان ضربانی، ولتاژ (قدرت میدان)، زاویه ضربانی و زمان اجرا بستگی دارد. در الکتروفورز میدان ضربانی، مولکول‌های DNA در معرض میدان‌های الکتریکی متناوب قرار می‌گیرند که برای دوره‌ای به نام زمان سوئیچ اعمال می‌شوند. هر بار که میدان تغییر می‌کند، مولکول‌های DNA باید جهت خود را تغییر دهند یا در ماتریس ژل تغییر جهت دهند. جهت‌گیری مجدد مولکول‌های بزرگتر به زمان بیشتری نیاز دارد و در طول هر ضربانی زمان کمتری برای حرکت دارند، بنابراین آهسته‌تر از مولکول‌های کوچکتر حرکت می‌کنند. بنابراین، با افزایش اندازه DNA، زمان ضربانی باید افزایش یابد تا مولکول‌ها تجزیه شوند.
- حرکت DNA با افزایش ولتاژ یا قدرت میدان افزایش می‌یابد. با این حال، مهاجرت بیشتر با کاهش وضوح باند همراه است. به طور کلی، با افزایش اندازه مولکول‌های DNA، قدرت میدان باید کاهش یابد. در شدت میدان بالا 6 V/cm مقداری از DNA بسیار بزرگ (بیش از 3 مگابایت) روی ژل قابل حل نیست و قدرت میدان باید کاهش یابد. علاوه بر این، برخی از مولکول‌های بزرگ DNA با قدرت میدان بالا وارد ژل نمی‌شوند. بنابراین، در انتخاب قدرت میدان برای یک آزمایش، سازش بین زمان اجرا و وضوح باید انجام شود.
- سیستم CHEF Mapper اجازه می‌دهد تا جداسازی‌ها با بردارهای میدان الکتریکی جهت‌گیری در هر جهت در صفحه ژل (0-360 درجه) انجام شود.
- نشان داده شده است که کاهش زاویه شامل از 120 درجه به 94 درجه، سرعت DNA را افزایش می‌دهد. همین اثر روی DNA کوچک را می توان با زمان تعویض طولانی مشاهده کرد. هنگام جداسازی مولکول های DNA بزرگتر از 1 mb، زاویه موجود (<120 درجه) را کاهش دهید.
- با کاهش سرعت حرکت مولکول‌های DNA، زمان اجرای الکتروفورز باید افزایش یابد تا مولکول‌های DNA مورد نظر به اندازه کافی حل شوند.

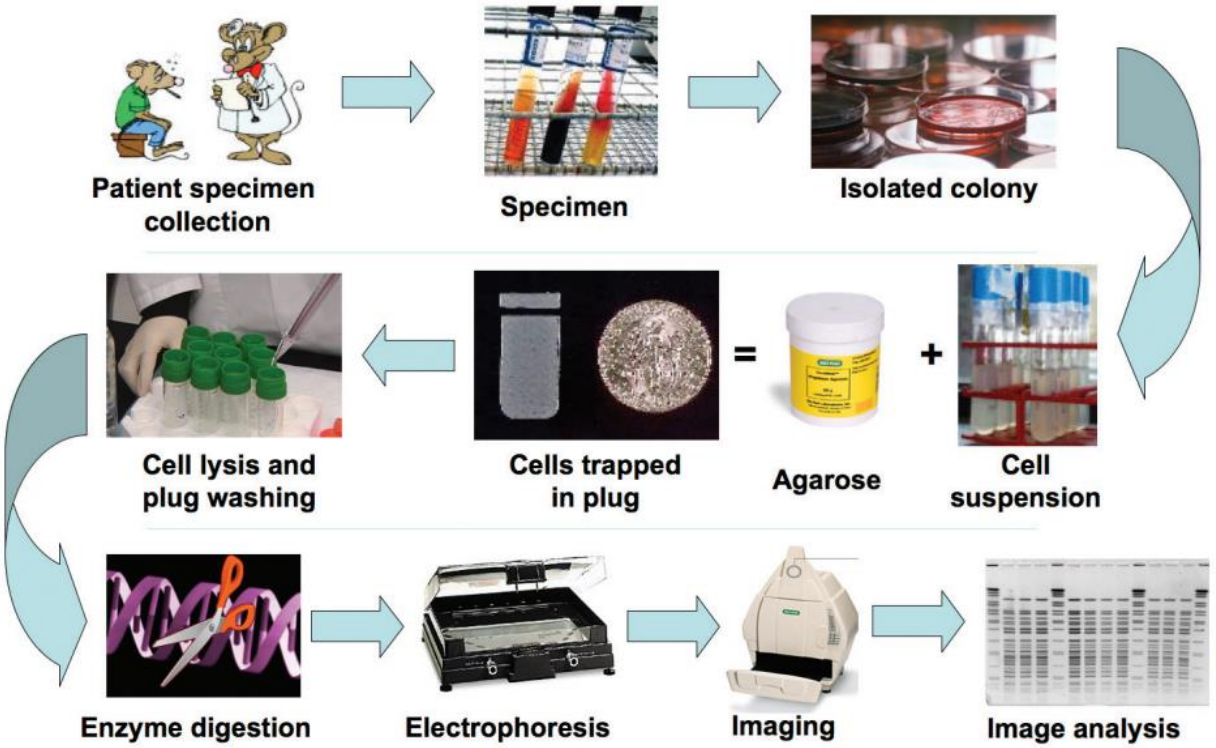
محدودیت‌های PFGE

- ✓ زمان بر
- ✓ گران بودن وسایل و دستگاه
- ✓ بین همه ایزوله‌های نامرتبط تبعیض قائل نمی‌شود.
- ✓ نمی توان جداسازی را در هر قسمت از ژل به طور همزمان بهینه کرد.
- ✓ تغییر در یک جایگاه محدود می‌تواند منجر به تغییر بیش از یک باند شود.

راهنمای عیب‌یابی Troubleshooting Guide

مشکل	راه‌حل
باندها به صورت اسمیر یا مبهم هستند	1. ولتاژ یا قدرت یونی بافر را کاهش دهید. 2. درصد ژل خیلی کم است. افزایش دهید. 3. ناخالصی آگارز 4. کم بودن غلظت نمونه
پس زمینه بالا در خطوط (High background in lanes)	1 .شستشوی ناکافی نمونه‌ها 2 .نمونه ممکن است با RNA یا مواد دیگر آلوده شده باشد. 3. غلظت DNA خیلی بالاست.
باندهای ضخیم	1 .از چاهک‌های نازک‌تر استفاده کنید. 2. نمونه کمتری بارگیری کنید.
DNA های بزرگ حل نشده‌اند	1. گرادیان ولتاژ را به کمتر ازV/cm 2 کاهش دهید. 2. زمان سوئیچ را افزایش دهید. 3. ناخالص بودن آگارز
الگوهای باند ژل بسیار غیرمعمول به نظر می-رسند. خطوط بسیار منحنی شک هستند،	1. بررسی کنید که بافر با سطح ژل هم سطح باشد. 2. الکترود آسیب دیده را تعویض کنید

شماتیکی از پروتوکل اجرایی PFGE


Patient specimen collection
Specimen
Isolated colony
Cell lysis and plug washing
Cells trapped in plug
=
Agarose
+
Cell suspension
Enzyme digestion
Electrophoresis
Imaging
Image analysis