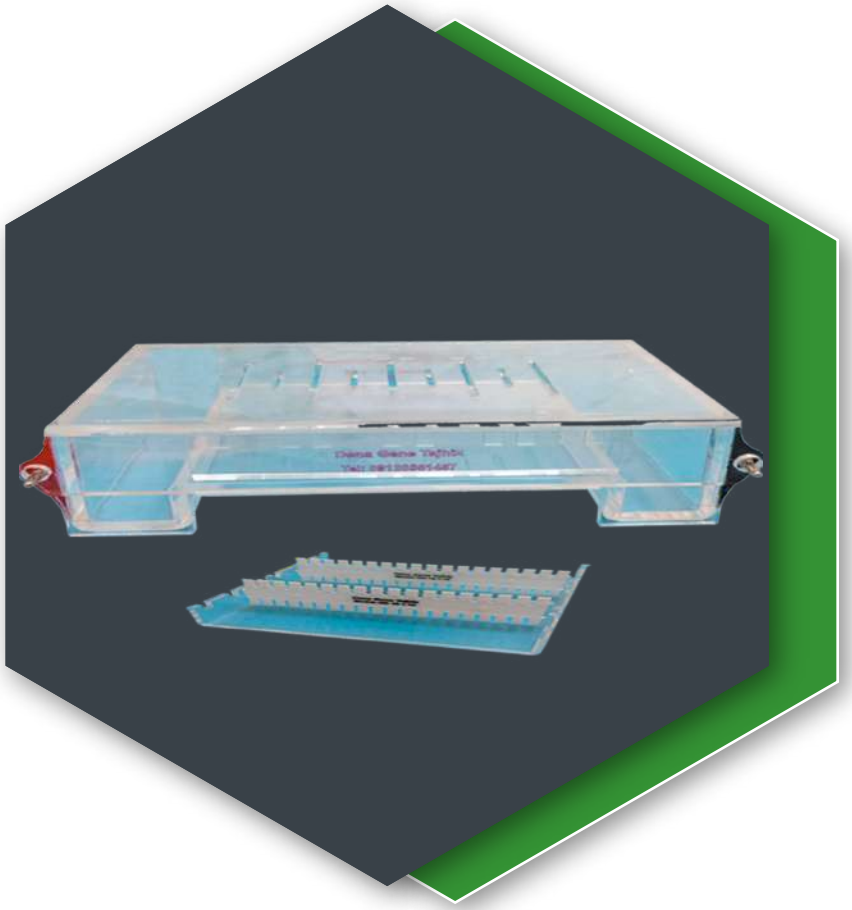
دفترچه راهنما الکتروفورز افقی

شرکت دانش بنیان دناژن تجهیز

طراح و تولیدکننده تجهیزات آزمایشگاهی و بیوتکنولوژی



الکتروفورز افقی (Horizontal Electrophoresis)

www.Denagene.com

از اینکه دستگاه الکتروفورز افقی دناژن تجهیز را انتخاب نموده‌اید خرسندیم. این دفترچه راهنما تنها برای مشتریان شرکت دناژن تجهیز طراحی و تدوین شده است تا با استفاده بهینه از اطلاعات و راهنمایی‌های موجود در این دفترچه از دستگاه ها به بهترین نتایج برسید.

لطفا قبل از شروع به کار دستورالعمل‌های لازم را بخوانید. این دستگاه فقط برای استفاده تحقیقاتی و تشخیصی مناسب است. که باید توسط پرسنل متخصص استفاده گردد. در صورت هرگونه استفاده غیرمعمول و نیز تغییرات ایجاد شده در آن توسط افراد فاقد صلاحیت، شرکت دنا ژن تجهیز مسئولیت هر گونه صدمه وارد شده به دستگاه را تقبل نمی کند. این راهنمای استفاده برای کلیه دستگاه های الکتروفورز افقی ساخت شرکت دنا ژن تجهیز قابل استفاده می‌باشد.

تمامی محتوا و اطلاعات موجود در دفترچه راهنما تحت حفاظت حقوق کپی‌رایت دناژن تجهیز می‌باشد. هرگونه استفاده غیرمجاز از این محتوا تحت پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت. استفاده از این مطالب برای مقاصد تجاری یا در دسترس افراد و شرکت‌های غیرمجاز ممنوع است.

در صورت بروز هر گونه سوال یا نیاز به پشتیبانی، با تیم پشتیبانی تماس حاصل فرمایید

فهرست

مقدمه ۱

هشدار ۲

مراقبت و نگهداری ۳

مشخصات فنی ٤

لیست قطعات و لوازم همراه الکتروفورز ۵

ویژگی های ژل آگارز ۷

فاکتورهای تاثیرگذار بر مهاجرت

اسیدهای نوکلئیک در ژل ۸

مهاجرت غیرطبیعی ۹

مکانسیم مهاجرت DNA و جداسازی آن ۹

عمل الکتروفورز ۱۰

تهیه ژل ۱۰

بارگیری نمونه‌ها ۱۱

شروع عمل الکتروفورز ۱۲

رنگ آمیزی و مشاهده ۱۳

بافرها ۱۵

کاربردها ۱٦

مشکلات الکتروفورز DNA و دلایل احتمالی آنها ۱۷

مقدمه

الکتروفورز آگارز نوعی از ژل الکتروفورز می باشد که در زمینه های بیوشیمی ، ژنتیک و دیگر زیر گروه های علوم سلولی و مولکولی جهت جداسازی انواع توالی DNA ، RNA و یا پروتئین در یک بستر ایجاد شده با استفاده از ژل آگارز مورد استفاده قرار می گیرد.

معمولا جداسازی مولکول های زیستی با اعمال نمودن یک میدان الکتریکی بر روی این بستر رخ می دهد.

ژل های آگارز به راحتی قابل شکل گیری می باشند و مهم ترین گزینه جهت جداسازی انواع مختلف DNA در آزمایشگاه می باشند.

DNA جدا سازی شده را می توان با رنگ آمیزی زیر نور مناسب مشاهده نمود.

قبلا از رنگ اتیدیوم بروماید جهت مشاهده باندهای DNA استفاده می شد که قابلیت مشاهده با استفاده از نور UV را دارد. اما امروز رنگ های مختلف با کیفیت مناسب و قابلیت جهش زایی کم تر نسبت به اتیدیوم بروماید در بازار موجود است که با نورهای مریی هم قابل مشاهده می باشند.

در سیستم های الکتروفورزی ساخت دنا ژن تجهیز انواع مدل های با کاربری آسان الکتروفور افقی به منظور جداسازی اسیدهای نوکلئیک موجود می باشد.

ژل های آگارز به راحتی با استفاده از سیستم ژل کستینگ مناسب تهیه می شوند.

سیستم های الکتروفورزی دنا ژن تجهیز به گونه ای طراحی شده اند که برای سال ها قابلیت استفاده با کیفیت بالا را دارند.

⚠ هشدار

- قبل از هرگونه استفاده راهنمای استفاده را به طور کامل مطالعه نمایید.
- سیستم های الکتروفورزی ساخت دنا ژن تجهیز با حداکثر امنیت استفاده کاربر طراحی شده اند.
- قبل از هرگونه استفاده سیم های رابط، سیر فیش ها، محفظه تانک و منبع تغذیه را چک نمایید که کاملا سالم باشند.
- به جهت استفاده از ولتاژ های بالا از منابع تغذیه با امنیت بالا استفاده شود، منبع تغذیه مدل DGT-UNIVERSAL ساخت دنا ژن تجهیز برای این منظور پیشنهاد می شود.
- در صورت هرگونه استفاده غیر معمول و نیز تغییرات ایجاد شده در آن توسط افراد فاقد صلاحیت، شرکت دنا ژن تجهیز مسئولیت هر گونه صدمه وارد شده به دستگاه را تقبل نمی کند.

مراقبت و نگهداری

همه اجزای تانک های الکتروفورز افقی باید با استفاده از محلول دترجنت ملایم در آب گرم شسته شوند.
توجه شود که سیم الکترود در هنگام تمیزکاری پاره نشود و یا صدمه نبیند.
جهت حفظ ماندگاری و عمر دستگاه مواد شوینده سازگار با دستگاه باید جهت شستشو استفاده شوند.

این مواد شامل:
محلول های صابونی و دترجنت های ملایم
حلال های آلی مانند: هگزان و هیدروکربن های آلیفاتیک
نکته: اجزای پلاستیکی را بیش از ۳۰ دقیقه در دترجنت نگذارید.
از مواد شیمیایی زیر جهت تمیز کردن دستگاه استفاده نشود، زیرا می توانند موجب خوردگی و از بین بردن قطعات دستگاه شوند:

"کلروفرم، تتراکلرید کربن، بنزن، فنول، تولوئن، متیل اتیل کتون، استون، متانول، اتانول، ایزوپروپیل الکل"

دستگاه را در دمای بالاتر از ۶۰ درجه سانتیگراد قرار ندهید. همچنین اجزای دستگاه را با استفاده از اتوکلاو تمیز نکنید.
جهت از بین بردن آنزیم های RNase در دستگاه، آن را به مدت ۱۰ دقیقه با هیدروژن پراکسید تیمار نمایید و سپس با آب DEPS treated ۰/۱ درصد شستشو نمایید.

توجه شود که DEPC یک عامل مشکوک به سرطانزایی است. پس لازم است هنگام کار با آن نکات ایمنی را کاملا رعایت نمایید.

مشخصات فنی

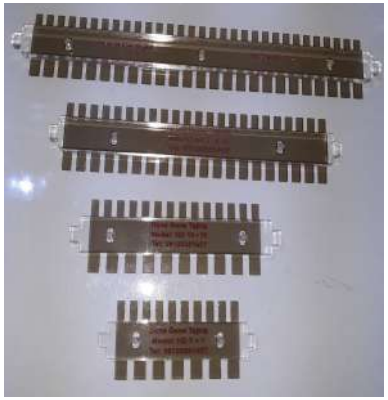
مدل	۱۰×۱۰ Midi HD	۲۰×۲۰ Maxi Plus HD
ابعاد ژل (cm)	۱۰×۱۰ & ۱۰×۷	۲۰×۲۰ & ۲۰×۱۵
حجم بافر (ml)	۳۰۰	۱۲۰۰
تعداد چاهک	۱۴ & ۱۰	۳۱ & ۲۵
حداکثر نمونه	۲۸	۱۲۴

لیست قطعات و لوازم همراه الکتروفورز افقی

با توجه به این نکته که گاها مشتریان جهت خرید الکتروفورز افقی و اینکه چه قطعات و لوازمی و هر قطعه چه تعداد از آن همراه دستگاه می باشد، در ذیل لیست قطعات همراه با هر مدل الکتروفورز افقی با جزئیات آمده است.

تانک الکتروفورز افقی: در شکل رو به رو ، تانک الکتروفورز افقی به همراه کلیه قطعاتی که همراه آن است، آورده شده است.

سیم رابط جهت اتصال به منبع تغذیه



تری: هر مدل تانک الکتروفورز افقی کامب و تری مخصوص خود را دارد. همچنین تعداد کامب و تری هر الکتروفورز متفاوت می باشد.

کامب مخصوص تانک الکتروفورز: در شکل رو به رو انواع سایز کامب الکتروفورز افقی کنار هم آمده است. هر سایز مربوط به یک مدل خاص الکتروفورز می باشد.

جدول مربوط به سایز و تعداد کامب و تری انواع مدل الکتروفورز افقی

مدل	کامب	تری (سینی ژل)
Mini HD 7x7	7x7	7x7
Midi HD 10x10	10x10	7x10
		10x10
Maxi HD 15x15	15x15	10x15
		15x15
Maxi plus HD 20x20	20x20	10x20
		15x20
		20x20

ویژگی های ژل آگارز

ژل آگارز نوعی ماتریکس سه بعدی تشکیل شده از مولکول های هلیکسی آگارز می باشد که با کنار هم قرار گرفتن به صورت سه بعدی منافذی ایجاد می نمایند که جهت جداسازی بیو مولکول ها فوق العاده مناسب می باشند.

تمام این ساختار سه بعدی تشکیل شده حاصل پیوند های هیدروژنی می باشد که می توان با افزایش درجه حرارت آن را از بین برد. دمای ژله ای شدن آگارز بسیار متفاوت از دمای ذوب آن می باشد. بسته به نوع منبع، آگارز دارای دمای ژله ای شدن بین ۴۲-۳۵ درجه سانتی گراد می باشد و دمای ذوب آن حدود ۹۵-۸۵ درجه سانتی گراد می باشد.

ژل آگارز به دلیل اندازه بزرگ منافذ و قدرت ژل بالای آن برای الکتروفورز پروتئین های بزرگ و نیز DNA بسیار مناسب می باشد. ژل آگارز ۱٪ دارای منافذ در حدود ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر می باشد. غلظت های پایین ژل بسیار ظریف می باشند و جابجایی آنها خیلی مشکل دارد. ژل آگارز به دلیل اندازه بزرگ منافذ، قدرت جداسازی و تفکیک پایین تری نسبت به اکریل آمید برای DNA دارد، اما دامنه جداسازی آن بسیار وسیع تر می باشد.

حداکثر بازه جداسازی توسط این نوع ژل حدود ۷۵۰ کیلو باز می باشد، اما برای جداسازی های در حد ٦ مگا باز از تکنیک PFGE استفاده می شود. این تکنیک همچنین برای جداسازی پروتئین های بزرگ نیز کاربرد دارد و می تواند با کارآیی بالایی ذرات دارای شعاع موثر بیشتر از ۱۰-۵ نانومتر را جدا سازد. یک ژل آگارز ۰,۹ ٪ آنقدر بزرگ می باشد که باکتریوفاژ T٤ بتواند وارد آن شود.

DNA size resolution (kb 1000)	percent Agarose gel (W/V)
1 kb to 30 kb	۰,۵٪
800 bp to 12 kb	۰,۷۵٪
500 bp to 10 kb	۱,۰٪
400 bp to 7 kb	۱,۲٪
200 bp to 3 kb	۱,۵٪
50 bp to 2 kb	۲,۰٪

غلظت های مختلف آگارز جهت جداسازی قطعات DNA با اندازه های متفاوت

پلیمر آگارز دارای یک سری بارهای منفی بر روی گروه های باردار پیرووات و سولفات می باشد. این گروه های با بار منفی طی فرایندی به نام الکترواندو اسموزیس (EEO) موجب حرکت جریان آب به سمت مخالفت حرکت DNA می گردند. همین امر موجب ایجاد تاخیر در حرکت مولکول DNA و متعاقبا جداسازی آن می گردد که موجب ضعیف شدن باندهای تشکیل شده می گردد.

فاکتورهای تاثیرگذار بر مهاجرت اسیدهای نوکلئیک در ژل

فاکتورهای زیادی می توانند مهاجرت اسیدهای نوکلئیک را تحت تاثیر قرار دهد: اندازه های منافذ ژل (غلظت ژل)، اندازه قطعات DNA، ولتاژ اعمال شده، قدرت یونی بافر، و غلظت رنگ DNA (مانند DeNA Gel Stain) درصورتی که در طی الکتروفورز افزوده شود. مولکول های کوچک تر سریعتر از مولکول های بزرگتر در ژل حرکت می کنند و DNA دو رشته ای با نرخ LOG/1 تعداد بازها در ژل حرکت می کند. اما این رابطه برای توالی های با طول بسیار بلند صادق نمی باشد. افزایش غلظت ژل موجب کاهش سرعت حرکت DNA بر روی ژل می شود. از طرف دیگر کنفورماسیون DNA می تواند حرکت آن را بر روی ژل تحت تاثیر قرار دهد. به عنوان مثال DNA سوپر کویل شده دارای حرکتی سریع تر از DNA ریلکس می باشد، زیرا DNA سوپرکویل شده فشرده تر می باشد و از این رو راحت تر بر روی ژل حرکت می کند.
ژل الکتروفورز مولکول های پلاسمیدی نشان دهنده حالت سوپر کویل منفی می باشد. اما مولکول DNA حلقوی باز (Nicked) و فرم های ریلکس حلقوی به صورت باندهای کوچکتر ظاهر می شوند.

DeNA Gel Stain که به دو رشته DNA متصل می شود، می تواند بار، طول و نیز حالت سوپرکویل مولکول DNA را تحت تاثیر قرار دهد و بنابراین حضور آن در ژل در هنگام عمل الکتروفورز حرکت DNA را تحت تاثیر قرار می دهد. ژل الکتروفورز آگارز می تواند جهت جداسازی انواع DNA حلقوی با توپولوژی سوپرکویلینگ مختلف نیز مورد استفاده قرار بگیرد.

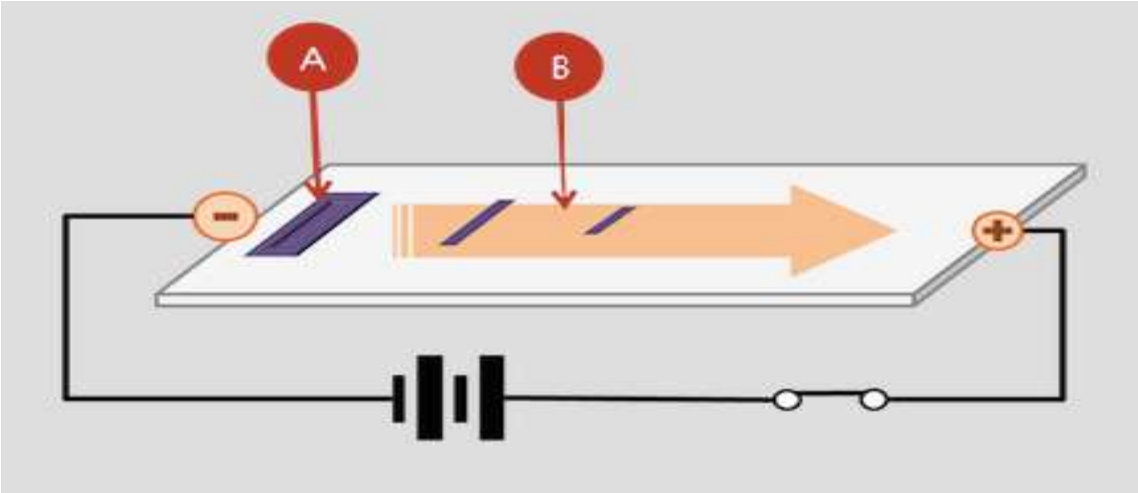
مهاجرت غیرطبیعی

ژل خندان (smiley gel): این حالت زمانی رخ می دهد که ولتاژ اعمال شده برای غلظت های ژل مورد استفاده خیلی زیاد باشد.
بیش از اندازه DNA ریختن: این امر موجب حرکت کند قطعات DNA خواهد شد.

کثیف شدن ژل: وجود ناخالصی هایی مانند نمک ها و یا پروتئین ها می تواند حرکت DNA را تحت تاثیر قرار دهد.

مکانیسم مهاجرت DNA و جداسازی آن

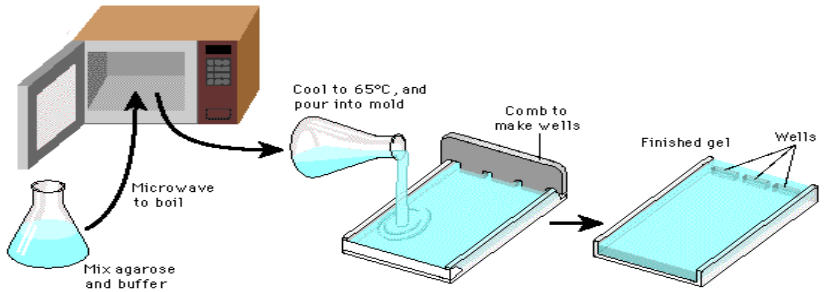
بار منفی چارچوبه های فسفاتی مولکول DNA را به سمت آند دارای قطب مثبت حرکت می دهد. باید در نظر گرفته شود که در عدم حضور ماتریکس ژلی مهاجرت مولکول DNA مستقل از وزن مولکولی و اندازه آن می باشد. پس می توان گفت نقش ماتریکس ژلی جداسازی DNA بر اساس اندازه طی عمل الکتروفورز می باشد.



شکل ۳. شمای کلی عمل الکتروفورز و جهت حرکت اسیدهای نوکلئیک

عمل الکتروفورز

فرایند الکتروفورز آگارز چندین مرحله متوالی دارد که به صورت خلاصه تهیه ژل، بارگزاری نمونه ها، شروع عمل الکتروفورز و نهایتا مشاهده نتایج می باشد. در پایین به صورت مفصل هر مرحله توضیح داده شده است.



تهیه ژل

ژل آگارز را می توان با حل نمودن پودر آگارز در بافر مناسب (مانند TAE یا TBE) بدست آورد. پودر آگارز ابتدا در بافر مورد نظر حل می شود و سپس تا نزدیک دمای جوش گرم می شود، اما باید دقت کرد که نجوشد.

آگارز ذوب شده قبل از ریختن در ژل تری به خوبی سرد شود. اگر دمای آن بسیار بالا باشد، ممکن است تری ژل سوراخ شود.

شانه را قبل از ریختن آگارز ذوب شده در تری قرار داده تا به خوبی چاهک های مخصوص بارگیری نمونه تشکیل شوند. غلظت ژل ۱ ٪ معمولا برای یک عمل الکتروفورز روتین تهیه می شود.

بارگیری نمونه ها

هنگامی که ژل بسته شد، شانه را از آن بیرون آورده و حالا می توان با قرار دادن آن در محفظه تانک و ریختن بافر تازه به اندازه کافی نمونه ها را بارگذاری کرد.

باید دقت کرد که قبل از بارگذاری نمونه ها، آنها را با بافر Loading مخلوط نمود تا به راحتی در چاهک ها قرار بگیرند. معمولا بافر loading از یک ترکیب با چگالی بالا مانند گلیسرول، ساکاروز و یا فیکول می باشد که چگالی کلی نمونه ها را بالا می برد و نمونه DNA به راحتی در ته چاهک قرار خواهد گرفت.

بافر Loading همچنین شامل رنگ هایی مانند زایلن سیانول و برموفنول بلو می باشد. این رنگ ها به منظور نشان دادن میزان پیشرفت نمونه ها بر روی ژل مورد استفاده قرار می گیرند (اصطلاحا به این رنگ ها Tracing Dyes گفته می شود). حالا نمونه های DNA را با استفاده از پیپت بارگذاری کنید.

شروع عمل الكتروفورز

شروع عمل الکتروفورز

ژل الکتروفورز آگارز معمولا در سیستم های الکتروفورز submarine (حالت های الکتروفورز که ژل در بافر غوطه ور می شود) ران می شود و در حین عمل الکتروفورز ژل کاملا در بافر غوطه ور می شود.

همچنین می توان این نوع الکتروفورز را در سیستم الکتروفورزی عمودی انجام داد، اما کمتر از این نوع روش جهت الکتروفورز آگارز استفاده می شود.

باید دقت شود که ولتاژ بالاتر موجب جداسازی سریع تر نمونه ها خواهد شد، اما موجب ذوب شدن ژل و نیز بافر می گردد و از این رو جداسازی نمونه ها با کیفیت خوبی صورت نگیرد. ولتاژ پایین نیز می تواند موجب پهن شدن باندها برای قطعات کوچک DNA شود.

به دلیل آنکه مولکول DNA در نور معمولی قابل مشاهده نمی باشد، همراه آنها رنگ هایی نیز بارگذاری می گردد. زایلن سیانول (آبی کم رنگ) به همراه مولکول های بزرگ DNA مهاجرت می کند، اما برومونفل بلو (آبی تیره) همراه با قطعات کوچک تر DNA مهاجرت می کند.

همچنین طی بارگزاری نمونه ها یک مارکر DNA نیز در چاهک جداگانه ای افزوده می شود. این مارکر حاوی قطعاتی از مولکول DNA با وزن های مشخص می باشد که برای تخمین وزن مولکول های DNA مورد استفاده قرار می گیرد. باید در نظر گرفته شود که حرکت مولکول های حلقوی DNA (مانند پلاسمید) متفاوت از حرکت مولکول های خطی DNA می باشد و نمی توان با مارکر های معمول به تخمین وزن آنها پرداخت. از این رو لازم است قبل از ران نمودن آنها بر روی ژل با استفاده از آنزیم های محدود الاثر آنها را به صورت خطی در آورد.

مولکول های DNA و RNA در ریل تایم الکتروفورز قابلیت رنگ آمیزی با کلیه رنگ ها به جز اتیدیوم برماید را دارند. رنگ هایی که می توان از آنها برای رنگ آمیزی جهت مشاهده در ریل تایم الکتروفورز استفاده نمود عبارتند از: دنا ژل استین، سایبرگرین، ژل رد، رنگ های خانواده safe. در جدول پایین تعداد بیشتری از رنگ های مورد استفاده در ریل تایم الکتروفورز آمده است.

نکته: در صورتی که مرکز تحقیقات یا آزمایشگاه شما از یک رنگ خاص استفاده می کند که در لیست ارایه شده در این جا موجود نمی باشد، قبل از اقدام به خرید جهت اطمینان بهتر با شرکت مشاوره کنید.

تست ایمز قابلیت موتاژنیک (جهش زایی) را نشان می دهد. جهت مشاهده نمونه ها با استفاده از سایبرگرین لازم است که از ترانسلومیناتور با رنگ آبی استفاده گردد. با توجه با راهنمای رنگ آمیزی با استفاده از رنگ ها که در شکل زیر آمده است، کاربران قابلیت استفاده از کلیه رنگ های سالم تولید شده امروزی را دارا می باشند.

البته شرکت دنا ژن تجهیز خود نیز رنگ خاصی را تولید کرده است که با توجه به نتایج تست ایمز در رده رنگ های safe قرار گرفته است و تحت نام تجاری DeNA gel stain در بازار عرضه می شود. این رنگ بهترین نتایج را با دستگاه ریل تایم الکتروفورز داده است. از این رو به محققین و متخصصین توصیه می شود با در نظر گرفتن قیمت مناسب و همچنین کیفیت بالای این رنگ، از آن جهت مشاهده باندهای DNA استفاده شود.

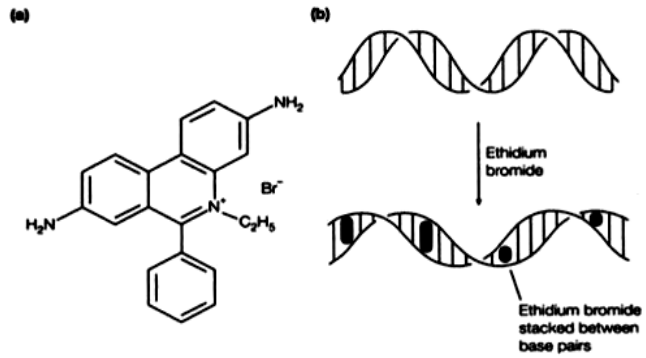
Selection Guide

Cat. No.	UV Light	Blue Light
SYBR® Green I (DNA)	√	√√
SYBR® Green II (RNA)	√	√√
SYBR® Gold	√	√√
Midori Green Driect	√	√√
Hydra Green™ Safe DNA Dye	√	√√
HD Green™ DNA Stain	√	√√
Novel Juice	√	√√
SafeView DNA Stain	√√	√√
SYBR® Safe	√	√√
Midori Green	√	√√
Midori Green Advanced	√	√√
GelGreen ™	√	√√
GelRed ™	√√	√
Ethidium Bromide	√√	
Serva DNA Stain Clear G	√√	
HealthView ™	√√	

√√ Excellent √ Good

قبلا رنگ معمول و مناسب جهت رنگ آمیزی اسیدهای نوکلئیک اتیدیوم بروماید بود. این رنگ با قرار گرفتن در شیار بزرگ DNA می تواند زیر نور UV فلوئورسانس ساتع نماید و با استفاده از دستگاه ترانسلومیناتور یا ژل داکیومنت مشاهده گردد.

اتیدیوم بروماید را می توان قبل از بسته شدن به ژل آگارز اضافه نمود و یا می توان قبل از عمل الکتروفورز به نمونه ها افزود و به صورت premix استفاده کرد.



اما با وجود داشتن کیفیت بالای رنگ آمیزی اتیدیوم برماید، ثابت شده این رنگ قابلیت سرطان زایی دارد. به همین دلیل امروزه مولکول های DNA و RNA به طور معمول با استفاده از رنگ های safe رنگ آمیزی می شوند که شرکت دناژن تجهیز خود تولید کننده یک نمونه رنگ سیف با نام تجاری DeNA gel stain می باشد.

این رنگ به صورت افزودنی به ژل مورد استفاده قرار می گیرد و قابلیت مشاهده با کلیه انواع طول موج (۲۵٤، ۳۱۲ و ٤۷۰ نانومتر) ژل داکیومنت را دارد.

رنگ های دیگری که می توان از آنها برای رنگ آمیزی استفاده نمود عبارتند از: سایبرگرین، ژل رد، متیلن بلو، بریلیان کریستال بلو، کریستال ویولت. تست ایمز قابلیت موتاژنیک (جهش زایی) را نشان می دهد.

جهت مشاهده نمونه ها با استفاده از سایبرگرین لازم است که از ترانسلومیناتور با رنگ آبی استفاده گردد.
DNA رنگ آمیزی شده با استفاده از کریستال ویوله قابلیت مشاهده در نور معمولی را دارد که نیازی به استفاده از ترانسلومیناتور ندارد، اما این نور زیاد قوی نمی باشد.

معمولا ترانسلومیناتورهای معمول از طول موج های ۲۵٤ و ۳۱۲ نانومتر (UV-Bو UV-C) و اخیرا هم طول موج ٤۷۰ نانومتر استفاده می کنند.

همواره باید این نکته را در نظر گرفت که تابش نور UV به مدت ٤۵ ثانیه می تواند موجب صدمه به DNA بشود و از این رو فرایندهای بعدی که DNA لازم است (مانند PCR و ترانسفورماسیون) کارآیی کمتری پیدا کنند.

استفاده از دستگاه های UV با طول موج بلندتر ۳۶۵ نانومتر (دامنه UV-A) موجب صدمه کمتر به DNA می شود، اما معمولا رنگ هایی که به صورت روتین در ایران استفاده می شوند با این طول موج به صورت با کیفیت قابل مشاهده نمی باشند. طول موج ۴۷۰ نانومتر باعث به حداقل رساندن صدمه به DNA می شود و از سوی دیگر رنگ های روتین مورد استفاده در ایران نیز با کیفیت بالایی قابلیت مشاهده با این رنگ را دارا می باشند.

گاها لازم است برای فرایندی از طول موج های ترکیبی استفاده شود، به عنوان مثال از طول موج ۲۵۴ نانومتر برای یک عمل و ۳۱۲ نانومتر برای عمل مشاهده طولانی و برش استفاده شود.

لازم است کاربران این نکته را در نظر گیرند که مکانیسم طول موج مریی و uv با هم ست نمی باشد و لازم است جداگانه ترانسلومیناتور آنها خریداری شود.

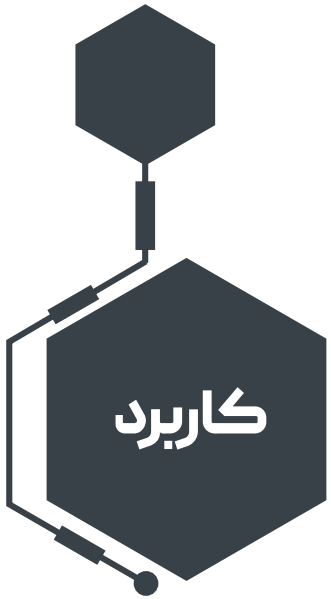
بافرها

در واقع بار خالص ماکرومولکول های زیستی بسیار وابسته به pH محیط می باشد. به منظور کاهش تغییرات pHی ایجاد شده در اثر میدان الکتریکی، عمل الکتروفورز در محیط بافری صورت می گیرد. به طور معمول بافر ایده آل باید دارای هدایت پذیری بالا باشد و همچنین گرمای کمتری تولید کند و زمان ابقا طولانی داشته باشد.

تعدادی از بافرها که برای الکتروفورز آگارز جهت جداسازی اسیدهای نوکلئیک استفاده می شوند عبارتند از: تریس استات (TAE) EDTA و تریس بورات (TBE) EDTA. بافرهای دیگری نیز مورد استفاده قرار می گیرند که نسبت به دو بافر ذکر شده کاربری بسیار کمتری دارند.

بافر تریس دارای ظرفیت بافری بالایی می‌باشد اما در صورتی که DNA استخراج شده در واکنش حساس با فسفات مورد استفاده قرار می گیرد، نمی توان از آن استفاده کرد. بافر TAE دارای کمترین ظرفیت بافری می باشد اما قدرت تفکیک آن برای مولکول های بزرگ DNA بسیار خوب می باشد. معمولا بافرهایی که حاوی EDTA هستند، جهت غیر فعالسازی انواع نوکلئازهایی که نیازمند کاتیون های دوظرفیتی جهت فعالیت خود می‌باشند، استفاده می کنند.

در صورتی که باید جداسازی در حد جفت باز صورت گیرد، باید از ژل با ۳٪ آگارز و نیز محیط با هدایت پذیری فوق العاده پایین که توسط بافر ا میلی مولار لیتیوم بورات ایجاد می گردد، استفاده شود. در صورت استفاده از بافرها برای مدت طولانی، ظرفیت بافری آنها کم خواهد شد و شاید نتواند دیگر محیط لازم جهت انجام عمل الکتروفورز را فراهم آورد.



- تخمین اندازه مولکول‌های DNA بعد از برش با آنزیم های محدودالاثر: به عنوان مثال نقشه یابی DNA کلون شده بعد از در معرض قرار گرفتن آنزیم های محدود الاثر.
- مشاهده باندهای مختلف DNA
- آنالیز محصولات PCR : به عنوان مثال استفاده در تشخیص ژنتیک و یا Genetic fingerprinting
- جداسازی قطعات DNA برای استخراج و تخلیص
- جداسازی DNA ژنومی بریده شده قبل از انتقال ساترن و یا برای RNA قبل از انتقال نورترن بلاتینگ ((northern blotting

نکته

ژل های آگارز به راحتی قابل شکل گیری و جابجایی هستند و همچنین اسیدهای نوکلئیک هیچ گونه واکنش شیمیایی با آنها انجام نمی دهند. نمونه ها در آن به راحتی قابل جستجو هستند. بعد از اتمام آزمایش، ژل بدست آمده را می توان در یک نایلون قرار داد و در یخچال نگهداری کرد.

مشکلات الکتروفورز DNA و دلایل احتمالی آنها

شدت پایین همه یا تعدادی از باندهای DNA

- بارگذاری مقدار کم DNA Ladder
- رنگ آمیزی ناکافی و یا ناهمگون
- خارج شدن DNA از ژل
- نفوذ و پخش شدن DNA در ژل
- پوشیده شدن DNA توسط رنگ های مورد استفاده در رنگ آمیزی

اسمیر شدن باندها

- تجزیه شدن DNA توسط نوکلئازها
- شرایط نامناسب الکتروفورز
- اثر Gel shift
- بارگزاری بیش از اندازه DNA
- غلظت بالای نمک در نمونه
- شکل گیری نامناسب چاهک های ژل

مهاجرت غیرطبیعی

- ژل خندان (gel smiley): بیش از اندازهDNA ریختن
- کثیف شدن ژل: وجود ناخالصی هایی مانند نمک ها و یا پروتئین ها می تواند حرکت دهد

باندهای منحنی شکل DNA

- ژل به طور کامل در بافر الکتروفورز قرار نگرفته است
- حجم نمونه ها کم می باشد
- شرایط عمل الکتروفورز نامناسب است
- حباب ها و یا ذرات بزرگی در چاهک های ژل و یا خود ژل موجود می باشند

الگوهای باند غیر معمول

- قبل از باگیری DNA مارکر گرم نشده است
- دناتوره شدن DNA
- شرایط بارگیری متفاوت برای نمونه DNA و مارکر DNA
- شرایط نا مناسب الکتروفورز
- استفاده از درصد ناصحیح ژل و یا بافر
- مهاجرت غیر معمول به دلیل توالی ها و یا ساختارهای مختلف DNA
- اثر Gel shift
- غلظت بالای نمک در نمونه ها

باقی ماندن DNA در ژل

- شکل گیری نامناسب چاهک های ژل
- بارگیری بیش از اندازه DNA
- آلوده شدن نمونه DNA
- اثر Gel shift

تعیین مقدار غلظت

- شرایط بارگیری متفاوت بین مارکر DNA و نمونه ها
- تعیین باند غلط مارکر برای تعیین مقدار نمونه
- استفاده از روش تعیین مقدار نامناسب
- رنگ آمیزی ناهمگون ژل و نیز رنگ شدن پس زمینه می تواند بر نتایج تعیین مقدار ژل اثر بگذارد
- پوشیده شدن DNA توسط رنگ های مسیریابی

برای دریافت آخرین خدمات و اطلاعات پشتیبانی، به آدرس اینترنتی زیر مراجعه کنید