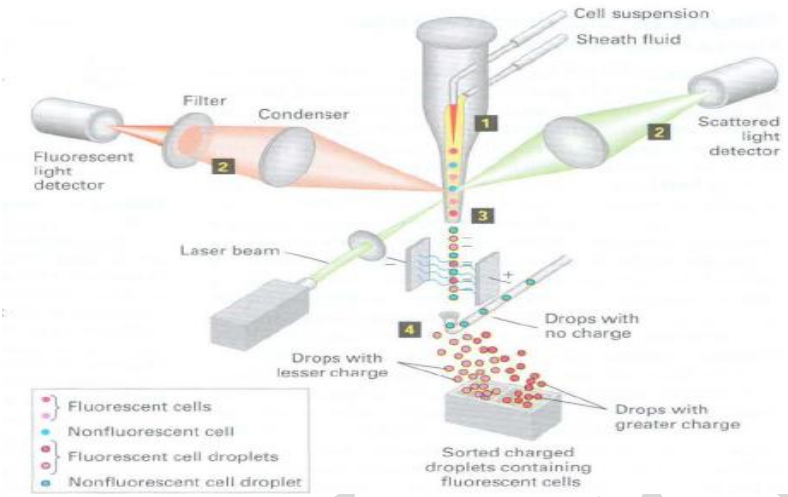
متدها و روش‌های شناسایی مولکولی و سلولی سلول:

- تخریب غشا سلول
  - قراردادن سلول در محیط هیپوتونیک (محیط کم‌غلظت) و جذب آب توسط سلول و پاره‌شدن غشا
  - استفاده از روش‌های فیزیکی
    - استفاده از هاونگ سنگی و در حضور نیتروژن مایع برای بافت گیاهی و قارچی
    - هموژنالیزر: خردکردن سلول جانوری در فضای کم میان یک سیلندر شیشه‌ای و پیستون
    - استفاده از امواج فراصوت یا گرم و سرد کردن محیط
  - استفاده از روش‌های شیمیایی
    - استفاده از آنزیم‌ها
      - شکستن ترکیبات پلی‌مریک دیواره‌ها
      - استفاده از دترجنت‌ها برای حل کردن لیپید غشا
    - خنثی کردن یونهای پایدار کننده غشا

- فلوسیتومتری Flow cytometry
  - کاربرد
    - تمایز سلولها از یکدیگر: سلولهای مختلف دانسیته متفاوتی دارند، به واسطه محاسبه نور منتشر شده از سلولهای مختلف و فلورسنسی که توسط آنها از طریق یک اشعه لیزر ساطع می‌شوند (شناسایی گلبولهای سفید)
    - تعیین شکل عمومی و اندازه سلول: برحسب نور منتشر شده از سلول
    - تعدادی محتوای DNA سلول: برحسب فلورسنس ساطع شده از یک رنگ متصل به DNA
  - FACS: Cellsorter فعال شده با فلورسنس است و به کمک آن ۱ سلول از میان هزاران سلول شناسایی می‌شود.

هر گونه کپی و واگذاری به غیر شرعاً حرام است

تهران- ضلع جنوب غربی میدان انقلاب- جنب سینما پارس- مجتمع تجاری پارس- طبقه اول - شماره تماس ۶۶۵۶۸۶۲۱-۰۲۱ -website:www.DKG.ir



سانتریفیوژ:

ویژگی سانتریفیوژ
- اساس کار: براساس نیروی گریز از مرکز دو ذره ناتوده (حجم) و چگالی مختلف در یک محلول در سرعت‌های مختلف، ته لوله رسوب می‌کنند.
- اهداف استفاده
  - تکنیک آماده‌سازی برای جداسازی یک ماده از ماده دیگر
  - تکنیک آنالیزی: اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکی ماکرومولکولها
    - چگالی
    - شکل
    - وزن مولکولی
    - ثابت تعادل اتصال
- ثابت رسوب یک پروتئین (S) = میزان رسوب Pr
- سرعت رسوب: مولکول با چگالی و وزن بیشتر با سرعت بیشتری ته لوله رسوب می‌کند

انواع روش‌های سانتریفیوژ

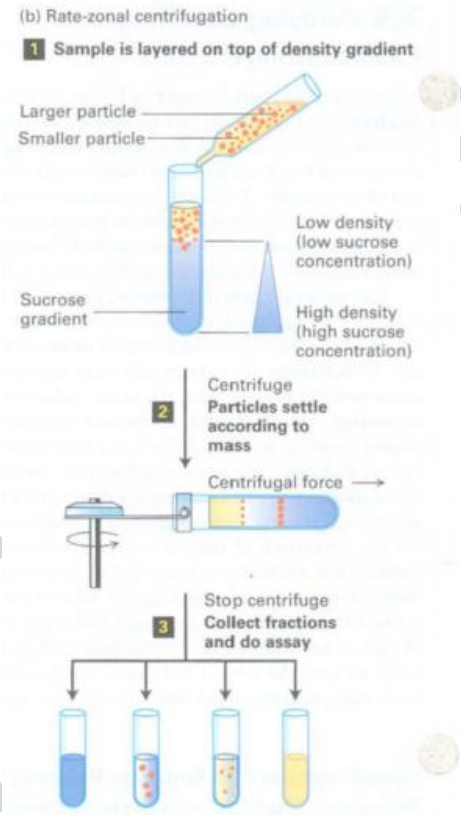
۱) سانتریفیوژ افتراقی
- جداسازی پروتئین‌های بزرگ و نامحلول از مواد محلول
- جداسازی اندامک‌ها

هر گونه کپی و واگذاری به غیر شرعاً حرام است

تهران- ضلع جنوب غربی میدان انقلاب- جنب سینما پارس- مجتمع تجاری پارس- طبقه اول - شماره تماس ۶۶۵۶۸۶۲۱-۰۲۱ -website:www.DKG.ir

۲) سانتریفیوز Rate –Zonal گرادیان چگالی

- روش کار: گرادیانی (شیبی) از غلظت محلول سوکروز ایجاد می‌کنیم، ذرات در شیب غلظت نفوذ می‌کنند و تا سطحی نفوذ می‌کنند که تعادل میان اثر نیروی گریز از مرکز و تمایل ذره به معلق ماندن وجود داشته باشد.
- جداسازی مولکولهایی با شکل و چگالی یکسان ولی با جرم متفاوت
- این روش برای تعیین دقیق وزن مولکولی مناسب نیست، زیرا تغییر شکل و حجم در رسوب‌گذاری موثر است.

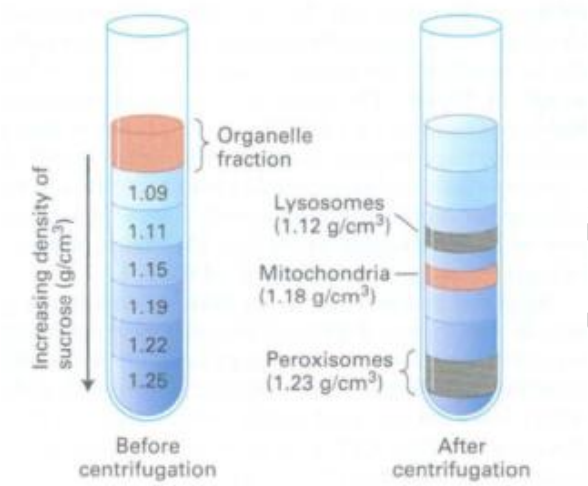


نکته

ترتیب جداسازی اجزاء سلول طی سانتریفیوژ ← هسته ← کلروپلاست، میتوکندری، لیزوزوم، پراکسی‌زوم ← میکروزوم ← زیرواحدهای ریبوزوم ← مواد محلول در سیتوپلاسم

هر گونه کپی و واگذاری به غیر شرعاً حرام است

تهران- ضلع جنوب غربی میدان انقلاب- جنب سینما پارس- مجتمع تجاری پارس- طبقه اول - شماره تماس ۰۲۱-۶۶۵۶۸۶۲۱ -website:www.DKG.ir



الکتروفورز:

- اساس کار: جداسازی مولکولهای یک مخلوط در بسته الکتریکی
- ویژگی الکتروفورز
  - رایج‌ترین روش برای مطالعه
    - پروتئین
    - اسید نوکلئیک
  - سرعت حرکت مولکول: بستگی به نسبت بار به جرم دارد، برای مثال، دو مولکول با جرم و شکل یکسان مولکولی که بارخالص بیشتر دارد، سریع‌تر به سمت الکترود مخالف می‌رود.

انواع الکتروفورز:

۱- الکتروفورز ژل پلی آکریلامید (PAGE) - SDS

- اساس کار SDS-PAGE
  - اساس کارش به جرم است ← ذرات کوچکتر سریع‌تر از ذرات بزرگتر از مناقد ژل عبور می‌کنند.
  - شکل مولکول میزان مهاجرت را تحت تأثیر قرار می‌دهد، یک مولکول کروی سریع‌تر از مولکول غیرقرینه بزرگ از مناقد عبور می‌کند.

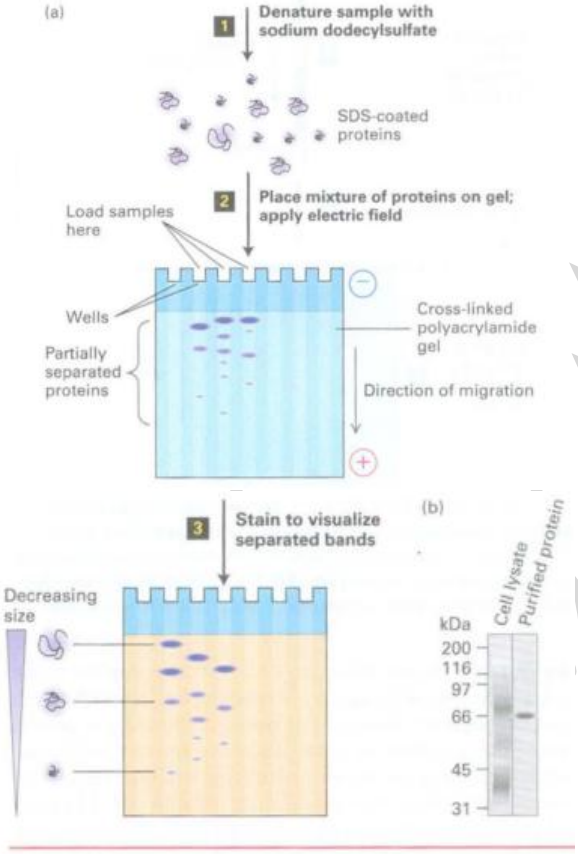
هر گونه کپی و واگذاری به غیر شرعاً حرام است

عوامل موثر به میزان حرکت پروتئین
- اندازه حفرات ژل
- توان الکتریکی میدان الکتروفورزی

ویژگی‌ها
- اختلاف ۱۰٪ میان وزن مولکولی Prها هم قابل تشخیص است
- قوی‌ترین و دقیق‌ترین تکنیک تمایز پروتئین ← چون Prها تحت اثر به صورت زنجیره پلی‌پپتید درمی‌آید که طول زنجیره پلی‌پپتید ارتباط مستقیم با جرم آن و در نتیجه تنظیم مهاجرت Pr بر روی ژل دارد
  - دترجنت یونی سدیم دو دسیل سولفات ⇐ ناپایداری پیوندهای هیدروفوبیک
  - حرارت
  - مواد احیاکننده ← شکسته شدن پیوند دی‌سولفید
- شناسایی وزن مولکولی Pr که وزن مولکولی آنرا نمی‌دانیم ← مقایسه فاصله‌ای که پروتئین ناشناخته پیموده با فاصله‌ای که Pr مشخص بر روی ژل پیموده (وجود رابطه خطی میان فاصله مهاجرت و لگاریتم وزن مولکولی)

هر گونه کپی و واگذاری به غیر شرعاً حرام است

تهران- ضلع جنوب غربی میدان انقلاب- جنب سینما پارس- مجتمع تجاری پارس- طبقه اول - شماره تماس ۶۶۵۶۸۶۲۱-۰۲۱ -website:www.DKG.ir



الکتروفورز دوبعدی

برای جداسازی Pr با جرم مشابه از اختلاف در، بارالکتریکی آنها استفاده می‌شود در محیط با گرادیان pH و حضور گروه‌هایی با شارژ مثبت و منفی

ویژگی:
- استفاده برای مقایسه پروتئین‌های:
  - سلولهای تمایز یافته و تمایز نیافته
  - سلول سرطانی و سلول طبیعی
  - نمونه‌های مجزا ولی مشابه: بافت طبیعی و جهش یافته
- ابتدا به واسطه اختلاف بارالکتریکی و سپس به وسیله اختلاف جرم جداسازی می‌شوند

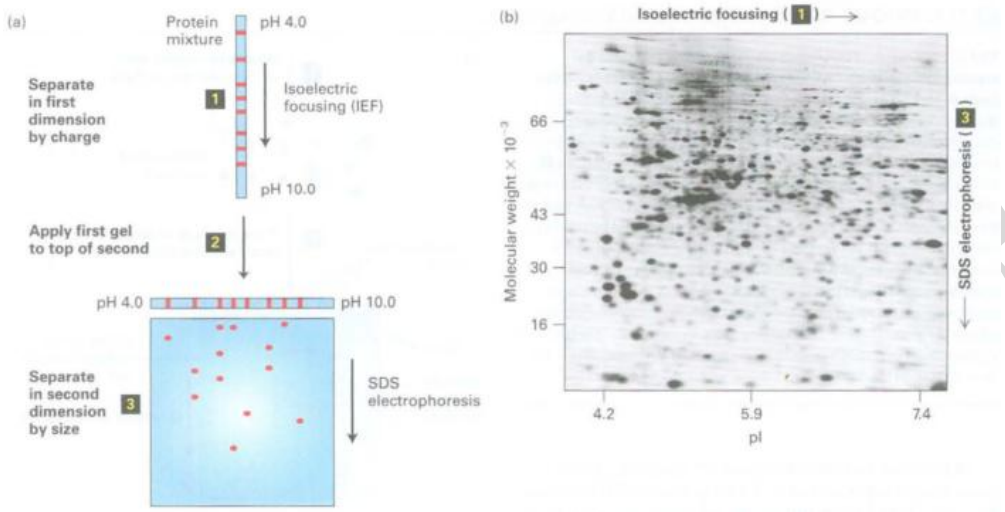
مراحل کار:

۱ ← ابتدا عصاره سلولی به وسیله اوره دناتوره می‌شود. از SDS استفاده نمی‌شود، زیرا خودش باردار است و شارژ پروتئین را تغییر می‌دهد.

۲ ← عصاره دناتوره شده روی ژل دارای گرادیان pH برده می‌شود ← جداسازی براساس بارالکتریکی

هر گونه کپی و واگذاری به غیر شرعاً حرام است

تهران- ضلع جنوب غربی میدان انقلاب- جنب سینما پارس- مجتمع تجاری پارس- طبقه اول - شماره تماس ۶۶۵۶۸۶۲۱-۰۲۱ -website:www.DKG.ir



ویژگی تکنیک تمرکز ایزوالکتریک (IEF)

آنیونی‌ترین ذرات محیط (ژل) در یک سو و کاتیونی‌ترین ذرات ژل در سوی دیگر قرار می‌گیرد. Pr باردار در طول گرادیان حرکت کرده و در نقطه ایزوالکتریک خود توقف می‌کند) نقطه ایزوالکتریک = بار خالص Pe برابر با صفر است)

ویژگی ژل (IEF) ← جدا شدن Prهایی که حتی ۱ واحد بارالکتریکی با هم تفاوت دارند

۳ ← جداسازی براساس وزن مولکولی: ژل IEF را 90° چرخانده و در یک انتهای ژل پلی‌آکریلامید قرار می‌دهیم با برقراری میدان الکتریکی Prها از ژل IEF به ژل SDS – PAGE مهاجرت کرده و براساس جرم جداسازی می‌شوند.

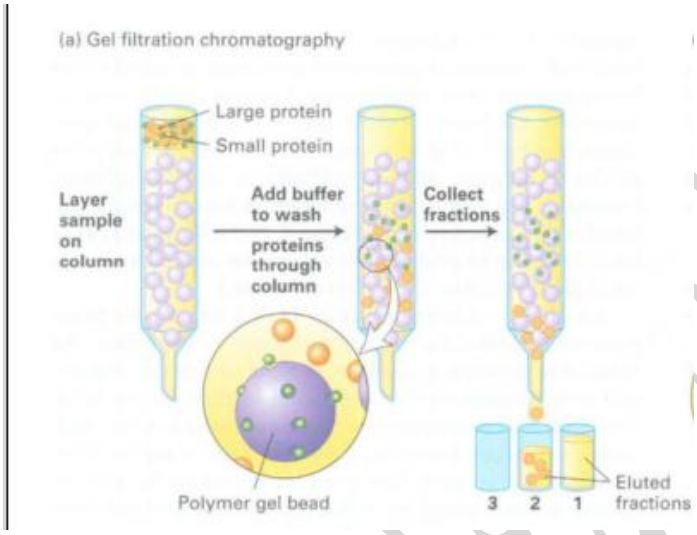
کروماتوگرافی: امکان تفکیک پروتئین ها را بر اساس جرم ، بار الکتریکی و میل اتصالی آنها فراهم می کند

هر گونه کپی و واگذاری به غیر شرعاً حرام است

تهران- ضلع جنوب غربی میدان انقلاب- جنب سینما پارس- مجتمع تجاری پارس- طبقه اول - شماره تماس ۶۶۵۶۸۶۲۱-۰۲۱ -website:www.DKG.ir

انواع کروماتوگرافی:

۱ - کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون



اساس کار:

جنس ستون از دانه‌های منفذ دار است، پروتئین در مقایسه با عبور از اطراف دانه‌های کروی زمان بیشتری را صرف عبور از منافذ درون دانه‌های ستون می‌کند

← پروتئین هر چه کوچکتر باشد از منافذ درون دانه‌ها عبور کرده و با سرعت کمتری از ستون خارج می‌شود.

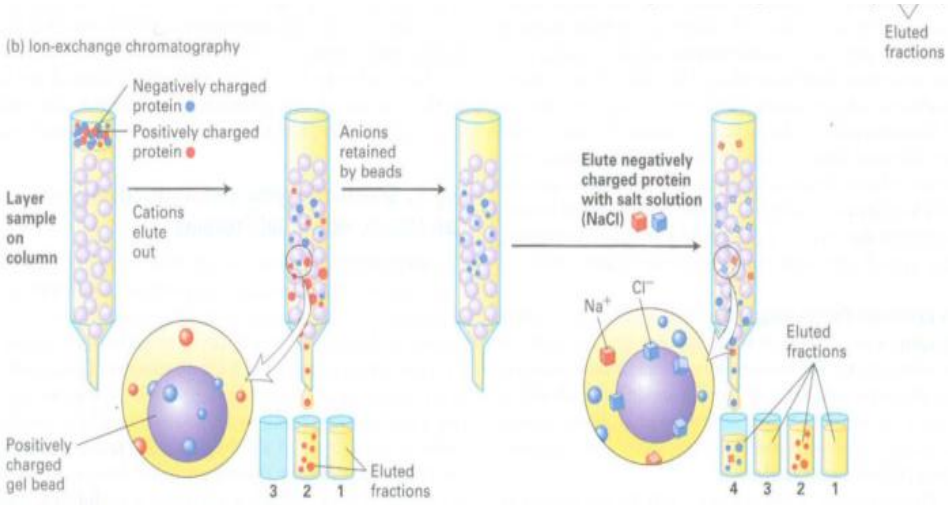
- ویژگی‌ها
  - جنس ذرات کروی منفذدار
    - آگارز
    - دکستران
    - پلی‌آکریل آمید
  - حجم مایع مورد نیاز برای شستن یک Pr از ستون به جرم پروتئین بستگی دارد، البته شکل Pr نیز بر میزان مایع مورد نیاز تأثیرگذار است.
  - موارد استفاده
    - جداسازی
      - Pr
      - لیپید
      - اسید نوکلئیک
      - پلی ساکارید
    - تعیین وزن مولکولی عناصر ناشناخته
  - اساس جداسازی Pr ها از یکدیگر
    - جرم
    - شکل

هر گونه کپی و واگذاری به غیر شرعاً حرام است

تهران- ضلع جنوب غربی میدان انقلاب- جنب سینما پارس- مجتمع تجاری پارس- طبقه اول - شماره تماس ۶۶۵۶۸۶۲۱-۰۲۱ -website:www.DKG.ir

۲- کروماتوگرافی تعویض یونی

اساس کار: جداسازی پروتئین‌ها براساس بار الکتریکی



ویژگی

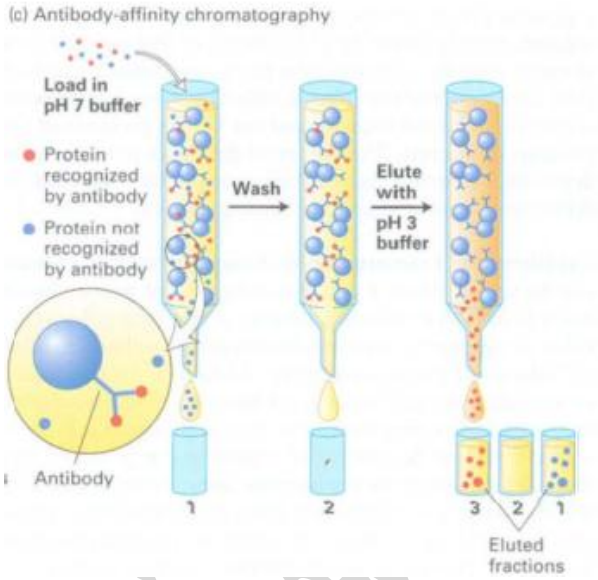
- موارد استفاده
  - Pr
  - اسید نوکلئیک
- جداسازی پروتئین
  - ستون حاوی ذرات دی‌اتیل آمینواتیل سلولز (+) باشد، تبادل آنیونی صورت می‌گیرد.
  - ستون حاوی ذرات کربوکسی متیل سلولز (−) باشد، تبادل کاتیونی صورت می‌گیرد
- روش کار: برای مثال ستون حاوی دی‌اتیل آمینو اتیل سلولز با شارژ مثبت است Pr ← خنثی و Pr قلیایی (+) از ستون خارج شده و پروتئین اسیدی(−) به ذرات متصل می‌شود ← برای جداسازی Pr اسیدی از عبور یک محلول با گرادیان (شیب) افزایش غلظت نمک استفاده می‌شود ← ذرات دارای بار منفی نمک جایگزین Pr اسیدی شده و به ستون متصل می‌شوند و پروتئین اسیدی براساس تعداد بار خالص (−) به تدریج از ستون جدا می‌شود.

هر گونه کپی و واگذاری به غیر شرعاً حرام است

تهران- ضلع جنوب غربی میدان انقلاب- جنب سینما پارس- مجتمع تجاری پارس- طبقه اول - شماره تماس ۶۶۵۶۸۶۲۱-۰۲۱ -website:www.DKG.ir

۳- کروماتوگرافی افینیتی:

اساس کار: توانایی Pr در اتصال اختصای به سایر مولکولها



- روش کار: لیگاند (مولکولی که توانایی اتصال به پروتئین را دارد) به صورت کووالان به ستون متصل است. مخلوط حاوی Pr مورد نظر را دارد ستون می‌کنیم. فقط پروتئین با افینیتی (تمایل) ؟ به لیگاند متصل می‌شود و سایر Pr ها از ستون خارج میشوند.
- رایج‌ترین فرم: ایمونو افینیتی، لیگاندها در حقیقت آنتی‌بادی اختصاصی پروتئین مورد نظر هستند
- ویژگی‌ها
  - جداسازی پروتئین مورد نظر از لیگاند
    - اضافه کردن فرم محلول لیگاند
    - تغییر در غلظت نمک
    - تغییر در غلظت pH
  - موارد استفاده: جداسازی
    - ایمونوگلوبولین‌ها (Ig)
    - رسپتور برخی هورمون‌ها
    - آنزیم‌ها
    - mRNA
  - مناسب برای بررسی
    - واکنش آنزیم با سوبسترا
    - آنتی‌بادی (Ab) با آنتی‌ژن (Ag)
    - پیوند هیدروژنی بین نوکلئوتیدها

هر گونه کپی و واگذاری به غیر شرعاً حرام است

تهران- ضلع جنوب غربی میدان انقلاب- جنب سینما پارس- مجتمع تجاری پارس- طبقه اول - شماره تماس ۶۶۵۶۸۶۲۱-۰۲۱ -website:www.DKG.ir