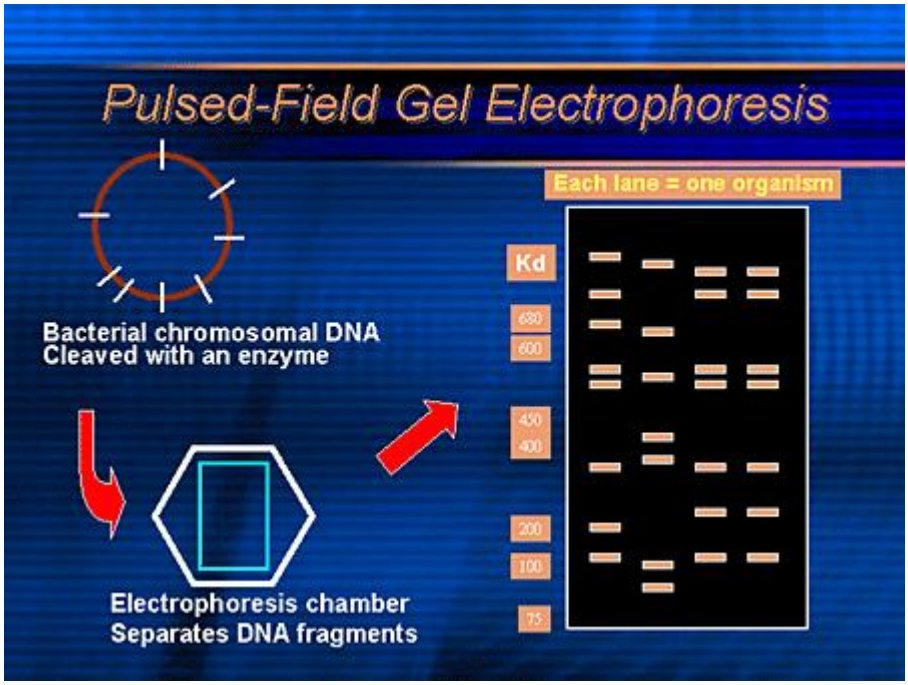
PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

PFGE روش استاندارد طلائی برای تعیین بسیاری از گونه‌های باکتریائی محسوب می‌شود. اگرچه این روش بسیار پرزحمت است، ولی تجهیزات مورد نیاز آن در حال حاضر نه تنها در آزمایشگاه‌های مرجع یافت می‌شود بلکه در آزمایشگاه‌های بیمارستان‌ها هم قابل مشاهده است. به طور معمول ApaI برای برش DNA کروموزومی مورد استفاده قرار می‌گیرد. سپس قطعات کروموزومی ایجاد شده توسط الکتروفورز از یکدیگر جدا می‌شوند و نمودارهای انگشت نگاری شده به صورت چشمی و یا با استفاده از برنامه‌های کامپیوتری مورد مقایسه قرار می‌گیرند. این سیستم قادر به شناسائی سویه‌های اپیدمیک می‌باشد و همچنین شناسائی اولیه‌ی سویه‌هایی که در چندین بیمارستان و یا در سطح یک کشور پراکنده شده‌اند را ممکن می‌سازد. همان طور که در دیگر سویه‌ها مشاهده شد قدرت تشخیصی PFGE بسیار بالا است به طوریکه می‌توان مطالعات جمعیتی وسیعی را با آن انجام داد. اساس الکتروفورز در این روش مانند روش استاندارد الکتروفورز معمولی می‌باشد، ولی تفاوت آن با الکتروفورز معمولی این است که در این روش DNA در چند جهت مختلف متناوباً تحت اثر جریان الکتریکی قرار می‌گیرد. در این روش ولتاژ به صورت تناوبی در 3 جهت عوض شده و زمان برای هر جهت یکسان است که این امر باعث حرکت قطعات DNA بر اساس سایزشان می‌شود. عموماً قطعات کوچک راهشان را در خلال ژل بسیار آسان‌تر از قطعات بزرگ پیدا می‌کنند، در عـــــــــــوض قطعات بین (30-50 kb)که بزرگ‌تر هستند سخت‌تر می‌توانند در خلال ژل حرکت کنند، لذا با تغییرات متناوب جریان قطعات DNA با طول‌های مختلف به این تغییرات دوره‌ای پاسخ داده و در امتداد هم قرار می‌گیرند (شکل1).



شکل1: نحوه اجرای تکنیک PFGE

اشکال مختلف PFGE عبارتند از:

Field Inversion Gel Electrophoresis (FIGE)

آسان‌ترین تجهیزات طراحی شده برای الکترفورز قطعات بزرگ DNA، تکنیک FIGE است که توسط Carle olson در سال 1986 ابداع شد. در این روش قطبیت در 2 جهت به طور تناوبی در خلال الکتروفورز عوض می‌شود (شکل2).

Transverse Alternating Field Electrphiresis (TAFE)

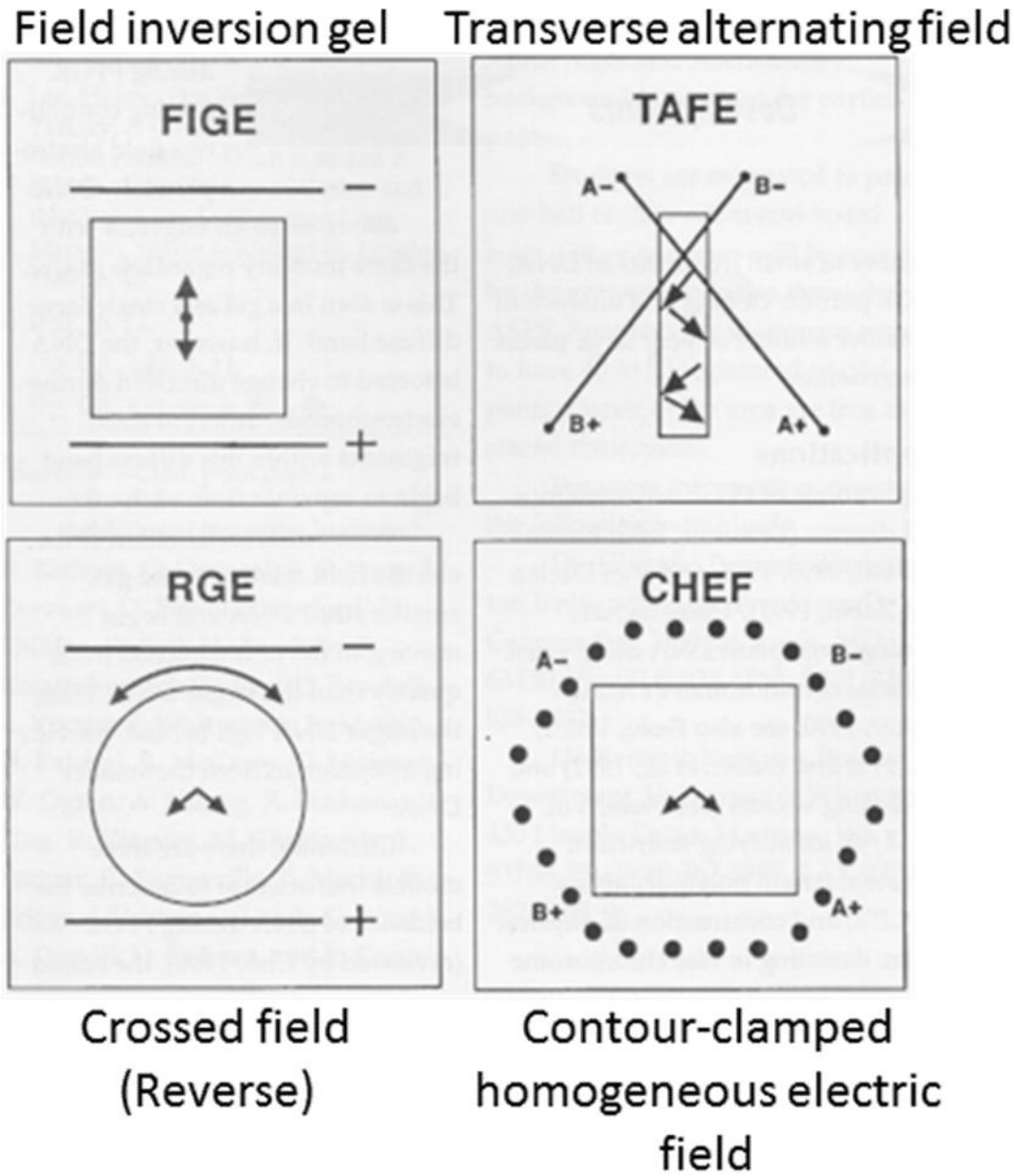
توسط *Gardiner* در سال 1987 ابداع شد. 4 الکترود در 4 سوی ژل قرار می‌گیرد، بنابراین ملکول‌های DNA به صورت زیگزاگ حرکت می‌کنند. در این روش که جریان مورب با زاویه کوچکتر است برای DNAهایی با اندازه کوچکتر *(120-96 درجه)* ابداع شده که سبب می‌شود DNA همیشه به سمت جلو به شکل زیگزاک حرکت کند (شکل2).

Contour Clamped Homogeneouselectric Field (CHEF)

توسط Ehu در سال 1990 ابداع شد. در این روش 24 الکترود یکسان دور محیطی 6 وجهی قرار می‌گیرد و ولتاژ به طور یکسان در همه جا تقسیم می‌شود. این دستگاه قدرت ران کردن یکسانی را در همه جای ژل ایجاد می‌کند، حد فاصل بین الکترودها جریان متناوباً عوض می‌شود. در این دستگاه زاویه حرکت بین قطب‌ها 120 درجه است این دستگاه برای جداسازی ملکول‌های .DNA بیش از 7000kb استفاده می‌شود (شکل2).

Rotating Gel Electrophoresis (RGE)

در سال 1987 توسط Southern استفاده شد. این روش که جریان الکتریکی در آن به صورت چرخشی عوض می‌شود، انعطاف بیشتری دارد. در این روش ملکول‌های DNA بین 50 تا 6000 کیلوباز می‌توانند جدا شوند (شکل 2).



شکل2: *اشکال مختلف تکنیک PFGE*

پارامترهای جداسازی (Separation Parameters)

عوامل مختلفی در اجرای PFGE نقش دارند که عبارتند از ولتاژ، الکتروفورز قطعات DNA، طول رشته‌ها، زمان، زاویه چرخش120، بافرها مثل TBE و TE، نوع آگاروز مورد استفاده و دمای بافر موجود در chamber.

***1*- زمان (pulsed time)**

زمان انجام الکتروفورز در اینجا بنابر سایز قطعات متفاوت است و به طور کلی زمان طولانی‌تر منجر به جدا شدن قطعات بزرگتر DNA خواهد شد.

2 ـ ژل آگارز (Agarose Gel)

در رابطه با ژل آگارز، ژل‌هایی که میزان کمتری Electro Endosmosis (EEO) دارند، استاندارد بالاتری برای الکتروفورز دارند و برای *(PFGE)* مناسب‌ترند. آگارز با میزان EEO کمتر سرعت بیشتری را برای جداسازی فراهم می‌کند.

3 ـ طول رشته‌ها (Field Strength)

طول رشته‌ها روی جداسازی PEGE اثر دارد و تعیین کننده زمان جداسازی می‌باشد.

***4* ـ زاویه چرخ (Reorientation Angle)**

هر زاویه‌ای بین 165-96 درجه به صورت قدرتمندی برای جداسازی قطعات مناسب است. زاویه‌های کوچکتر اگرچه حرکت DNA را سرعت می‌بخشند، ولی برای قطعات کوچکتر DNA مناسب‌ترند؛ به طور کلی برای جداسازی قطعات بزرگ DNA زاویه‌های بین *105-96* درجه مناسب‌تر می‌باشند.

***5*- بافرها (Buffers)**

بافرهای مورد نیاز PFGE شامل *(TBE,TE)* بوده که دارای قدرت یونی پائینی هستند که این مسئله در حرکت بیشتر و بهتر قطعات DNA تأثیر بسزایی دارد.

6- دما (Temperature)

به دلیل اینکه جداسازی قطعات DNA وابسته به دمای جداسازی است، دما باید حین اجرای PFGE ثابت باقی بماند. اگرچه دماهای بالاتر باعث افزایش میزان حرکت DNA می‌شوند، ولی در کل باعث کاهش resolution و افزایش اسمیر در جواب‌ها می‌گردند، لذا در حین کار نباید دما زیاد بالا برود.

7- تهیه نمونه (Sample Preparation)

برای انجام بهتر PFGE باید از کشت تازه میکروبی استفاده گردد. در ادامه دیواره سلولی با روش‌های شیمیایی و فیزیکی شکافته شده و قطعات DNA در مجاورت آنزیم‌های محدودالاثر قرار می‌گیرند و پس از برش خوردن توسط این آنزیم‌ها به ژل آگارز منتقل خواهند شد.