الجامعة	**الانبار**
الكلية	**التربية للبنات**
القسم	**علوم الحياة**
المرحلة	**الرابعة**
اسم المادة باللغة العربية	**البايولوجي الجزيئي**
اسم المادة باللغة الانكليزية	**Molecular biology**
اسم التدريسي	**م.م. نبأ قيس جميل**
عنوان المحاضرة باللغة العربية	**الترحيل الكهربائي**
عنوان المحاضرة باللغة الإنكليزية	**Electrophoresis**
رقم المحاضرة	**9**
المصادر او المراجع	**Bergtrom,Gerald.Basic Cell and Molecular Microbiology and Molecular Biology Reviews**

الترحيل الكهربائي: Electrophoresis

يعرف الترحيل الكهربائي بأنه حركة الأيونات والجزيئات العملاقة المشحونة charged macromolecules (كالـ DNA, RNA, proteins) خلال وسط معين (هلام الأكاروز أو هلام متعدد الأكريلامايد) الحادثة عند تسليط تيار كهربائي.

إذا كان للجزيئة محصلة شحنة سالبة أو موجبة، فإنها سوف تهاجر في المجال الكهربائي – إن الجزيئة ذات الشحنة السالبة (الأنيون anion) تهاجر وتنجذب إلى القطب الموجب (الأنود anode)، والجزيئات ذات الشحنة الموجبة (الكاتايون cation) سوف تهاجر وتنجذب نحو القطب السالب (الكاثود cathode). يتم الترحيل في هلام يتكون من ثقوب مجهرية دقيقة microscopic pores ، ويقوم هذا الهلام بإعاقة حركة الجزيئات المختلفة من خلال التأثير المنخلي sieving effect لثقوبه الدقيقة، حيث إن الجزيئات الصغيرة أو المدمجة تهاجر بشكل أسرع خلال الهلام من الجزيئات الأكبر أو غير المتناظرة، والتي تواجه مقاومة احتكاكية frictional resistance أثناء حركتها في شبكة الهلام الدقيقة gel meshwork. لذا تستخدم تقنية الترحيل الكهربائي بشكل واسع في علم الخلية cytology وفي الوراثة الجزيئية molecular genetics لفصل الجزيئات الكبيرة العملاقة macromolecules. يمكن معرفة حجم هذه الجزيئات المفصولة على الهلام من خلال مقارنتها بواسمات جزيئية قياسية standard molecular markers والتي ترحل بموازاة العينة الغير معروفة خلال الترحيل الكهربائي في الهلام.

تحمل جزيئات الـ DNA والـ RNA شحنة سالبة بسبب عمودها الفقري المحتوي على الفوسفات. أما البروتينات، فإنها تحمل شحنات مختلفة على سطحها باختلاف شحنات الأحماض الأمينية الموجودة فيها. ولهذا وبالنسبة للبروتينات فقط، فان محصلة شحنة الجزيئات تلعب دورا مهما في حركتها في الهلام.

العوامل المؤثرة على هجرة الدنا خلال هلام الاكاروز

1. الشحنة charge (فيما إذا لو كانت سالبة أو موجبة)
2. حجمها أو وزنها الجزيئي formula weight (فالجزيئات الصغيرة تتحرك خلال الهلام بصورة أسرع من الجزيئات الكبيرة)
3. حجم الثقوب pore size (كلما كان حجم الثقوب صغيرا كلما كان ذلك ملائما لفصل الجزيئات الصغيرة والعكس بالعكس)
4. قوة التيار الكهربائي the strength of the electrical field (يستخدم التيار الكهربائي العالي للفصل السريع للجزيئات الصغيرة بشكل عام ولكن على أن لا يكون عالي جدا لأن هذا يؤدي إلى تحطم الجزيئات عند تعرضها إليه. أما التيار الواطيء فيستخدم عادة لفصل الجزيئات الكبيرة التي تتشوه عند الارتفاع البسيط لقوة التيار، ولكن على أن لا يكون التيار واطيء جدا لأنه كلما كان التيار واطئا كان وقت الترحيل كبيرا، وكلما ازداد وقت الترحيل ازدادت نسبة تعرض حزم الجزيئات المرحلة إلى حالة الانتشار band diffusion والذي هو غير مرغوب أثناء عملية الترحيل في الهلام)

5. المحتوى النوعي للقواعد في الدنا و درجة الحرارة

لا يتأثر الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز بما يحتويه الدنا من قواعد نايتروجينية كما يحدث لو استعمل هلام الاكرلمايد كما ان تغير درجة الحرارة لا تؤثر في سرعة الترحيل

حيث تهاجر جزيئات الـ DNA ثنائية الشريط بشكل مختلف اعتمادا على كون الـ DNA دائري circular أو خطي linear. تهاجر الجزيئات الخطية عبر ثقوب الأكاروز بشكل يشبه الأفعى من خلال الثقوب. أما الجزيئات الدائرية المغلقة تساهمياً covalently closed circular molecules أو CCC فأنها مدمجة compact أكثر لذا تهاجر عبر الثقوب بسهولة أكبر. وغالبا ما تهاجر الجزيئات الخطية ببطء أكثر مقارنة بجزيئات الـ CCC.

هنالك نوعين من الـ DNA الدائري: النوع المغلق closed، والنوع المفتوحopened. وفي حالة النوع المغلق أو CCC، فان كل أحماضها النووية ترتبط بواسطة آصرة فوسفاتية ثنائية الأستر phosphodiester bond

وتكون كذلك ملتفة بشكل فائق supercoiled. أما النوع المفتوح(OC) open circle ، فلها على الأقل آصرة من نوع phosphodiester مكسورة. يدعى الـ opened DNA بالـ DNA المسترخي أو relaxed DNA، لأن الضغط الموجود في جزيئات الـ CCC قد تم تحريره.

انواع الهلام المستخدم في الترحيل الكهربائي Types of Gel Using in Gel Electrophoresis

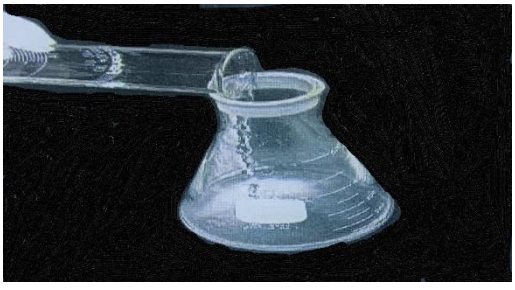
- ✓ هلام الأكاروز (Agaros Gel Electrophoresis (AGE
- ✓ هلام اكريلامايد متعدد (Polyacrylamide Gel Electrophoresis PAGE)

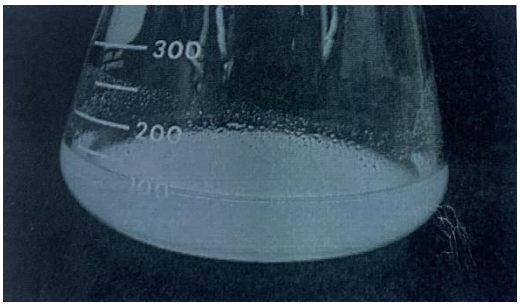
طريقة العمل Procedure

١ـ تحضير الاكاروز

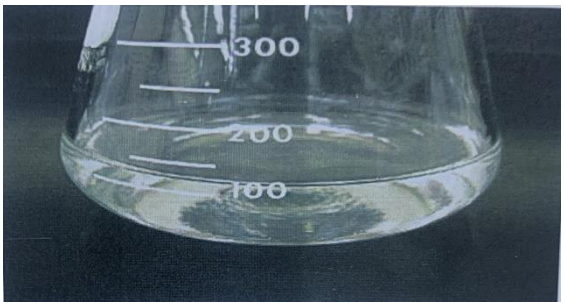
يحضر هلام الاكاروز حسب سعة الصينية في جهاز الترحيل و عادة يوزن 1 غم من الاكاروز ويوضع في دورق مخروطي ثم يضاف له 100 مل من محلول دارئ Buffer (TBE) محضر مسبقا وتتم الاذابة بواسطة الحرارة ويفضل استخدام جهاز Microwave ولمدة دقيقتين حيث يجب ان يكون صافي وذو لون مائي يترك لفترة 3-5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة لتصل درجة حرارة المحلول الى 55-50 درجة مئوية .

1-Weighting





2-Buffering

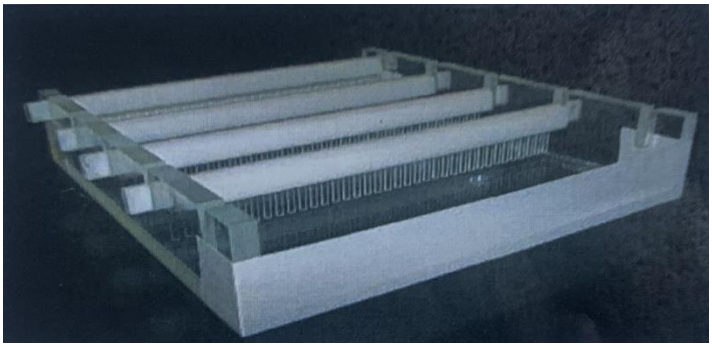


3-

Heating

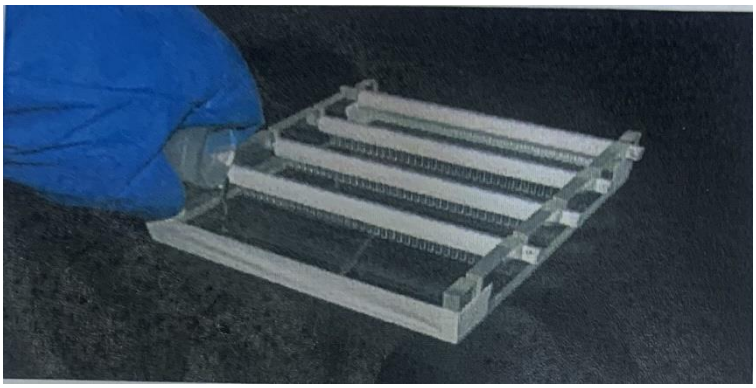
٢ـ تحضير الصينية

تحضر الصينة (الحوض) بربط الاطراف بشكل جيد و توضع على سطح مستوي (المنضدة) يوضع المشط في احد اطراف الصينية و في بعض الاحيان يستخدم اكثر من مشط في نفس الوقت.



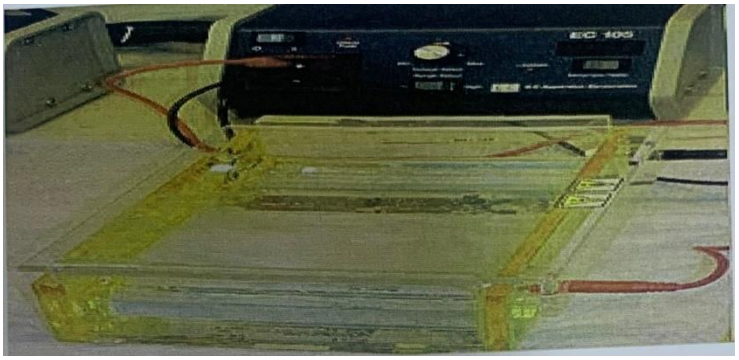
٣ـ صب الهلام

يصـــب الهلام في الصـــينية بهدوء ومن احد الأطراف لمنع تكون الفقاعات في الهلام وفي حال تكون الفقاعات يتم ازالتها مباشرة بواسطة نهاية ال Tip المعقم و يترك الهلام ليتصلب ثم يرفع المشط برفق وبشكل عمودي.



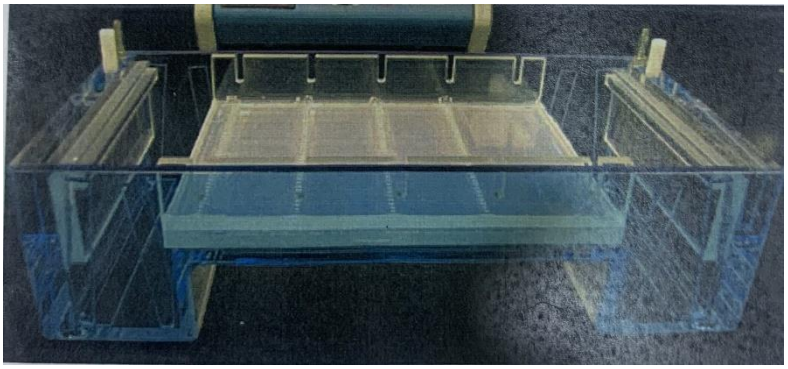
٤- تحضير الخزان

يوضع الخزان Tank على مكان مستوي (المنضدة) حبث يحتوي على قاعدة وسطية لوضع الحوض الحاوي على الهلام عليها يملئ الخزان بدارئ TEB بحيث يغمر الهلام بالمحلول يزود الخزان بغطاء والذي تربط معه الأقطاب السالبة و الموجبة من جانب ومن الجانب الاخر تربط الأقطاب مع مجهز القدرة Power Supply.



٥- وضع الهلام داخل الخزان

يوضـــع الهلام في الخزان في موقعة على ان يغطى محلول TEB الهلام ويجب ان تكون الحفر من جهة القطب السالب.

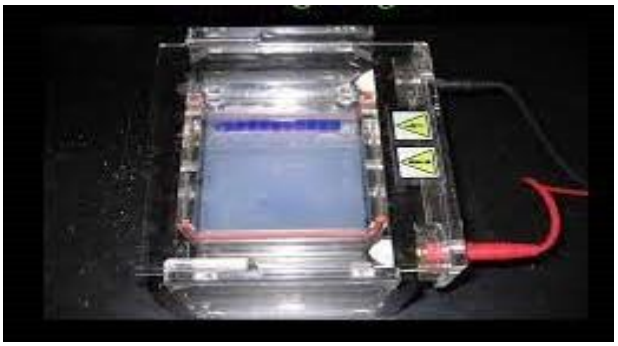


٦- تحضير نموذج الدنا

يضـاف دارئ التحميل Loading buffer بنسـبة 7 حجم من الدارئ الى 3 حجم من الدنا لكل عينة وتخلط بشـكل جيد باستخدام ال Tip المرتبطة بالماصة الدقيقة Micropipette ثم يسحب المزيج بالكامل بأستخدام نفس ال Tip و ينقل الى الحفرة الموجودة في الهلام .

٧- تشغيل الجهاز

يوضـــع غطـاء الخزان بـالشـــكل الصـحيح لضمان الترحيل من القطـب الســـالـب الى القطـب الموجـب ويتم تشـــغيـل مجهز القدرة على فولتية 45 و امبيرية 180 Mili- amber لمدة 15 دقيقة كمرحلة اولى بعد انتهاء 15 دقيقة نعدل الفولتية الى 80 و امبيرية 180 Mili-amber لمدة ساعة .



٨- تصبيغ الهلام

بعد اتهاء وقت الترحيل يتم حمل الهلام برفق الى حوض يحتوي على صـبغة Ethidium Bromide لمدة سـاعة والحذر عند التعامل مع هذه الصـبغة بأرتداء القفازات السـميكة لكونها مادة مسـرطنة . ان فتئدة هذه الصـبغة تتمثل بقدرتها على الارتباط بجزيءة الدنا DNA المزدوجة الخيط اكثر من ارتباطها بالجزيئة المفردة الخيط الرنا RNA بعد انتهاء مدة التصـبيغ يحمل الهلام برفق الى جهاز الاشـعة فوق البنفسـجية UV-Transiluminator يوضـع غطاء الجهاز ثم يشغل

نتيجة ارتباط صبغة ال Ethidium Bromide مع جزيئات الدنا و قدرتهالا على التألق عند تعرضـها للأشعة فوق البنفسجية نلاحظ وجود حزم باللون الوردي وهي حزم الدنا .