الكلية	التربية للعلوم الصرفة
القسم	علوم حياة
المادة باللغة الانجليزية	Practical Molecular Biology
المادة باللغة العربية	البايولوجي الجزيئي العملي
المرحلة الدراسية	الرابعة
اسم التدريسي	م.م. حسين رياض عبدالكريم
عنوان المحاضرة باللغة الانجليزية	Gel Electrophoresis
عنوان المحاضرة باللغة العربية	الترحيل الكهربائي
رقم المحاضرة	7
المصادر والمراجع	Watson, J.D.; Baker, T.A,; Bell, S.P.; Gann, A. (2004). Molecular .Biology of the Gene. 5th Ed. Pearson edution
	Clark, D. (2006). Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution. Elsevier Inc.
	Santos, D.M. (2011). Genetic Engineering, Recent Developments in application. Apple Academic press.
	عماش، هدى صالح مهدي.(١٩٩٤). مبادئ علم الحياة الجزيئي. كلية العلوم . جامعة بغداد.
	البكري ، غالب حمزة.(١٩٩٠). مبادئ الهندسة الوراثية. جامعة البصرة.

محتوى المحاضرة

UNIVERSITY OF ANBAR

البايولوجي الجزيئي العملي

لطلاب كلية التربية للعلوم الصرفة \ قسم علوم الحياة \ المرحلة الرابعة

المختبر السابع : الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis

الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis:

يعرف الترحيل الكهربائي بانه حركة الايونات والجزيئات العملاقة المشحونة charged macromolecules (كـ DNA او RNA او Proteins)خلال وسط معين (هلام الاكاروز Agarose gel او هلام متعدد الاكريلامايدPoly achrylamide) عند تسليط تيار كهربائي.

أنواع الهلام المستخدم في الترحيل الكهربائي:

1. هلام الأگاروز Agarose Gel Electrophoresis (AGE)

إن هلام الأگاروز المستخدم بشكل واسع في هذه التقنية عبارة عن سلسلة متشابكة من السكريات المتعددة المكونة من الكالكتوز ومشتقاته والمرتبطة مع بعضها بأواصر هيدروجينية لتكوين شبكة معقدة، تعتمد فتحاتها على تركيز الأگاروز فكلما كان التركيز عالياً كلما كانت الفتحات أصغر والعكس صحيح، يتضح من ذلك إن قابلية الهلام على فصل القطع تعتمد على تركيزه فكلما زاد التركيز كلما زادت قابلية الفصل. إن تركيز هلام الأگاروز يتراوح بين 0.5–2 % وبطول 12 سم، والأكثر استخداماً هو 0.7–1 % والذي يستخدم لفصل قطع دنا كبيرة الوزن الجزيئي 200bp – 20Kbp.

2. هلام أكريل أمايد متعدد Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

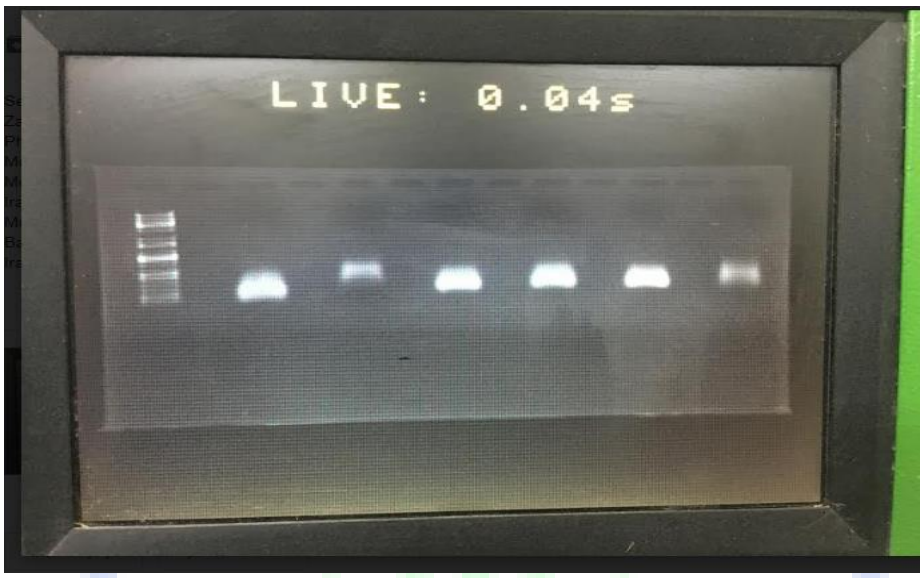
هو عبارة عن ناتج ارتباط مادة الأكريل أمايد المتبلورة مع مادة Bis-acrylamide لتكوين شبكة معقدة ذات ثقوب أصغر قطراً من تلك الموجودة في هلام الأكاروز، ولهذا السبب فان هلام أكريل أمايد متعدد أكثر ملائمة في فصل قطع الدنا الأصغر والتي تتراوح بين 1–200 bp ويكون التركيز الأفضل للأكريل أمايد متعدد هو 7.5 % ولكن من مساوئ هذا النوع من الهلام انه أصعب وذو كلفة عالية بالمقارنة مع الأگاروز.

♦ تعتبر عملية الترحيل الكهربائي بواسطة هلام الأگاروز واحدة من الطرق الفيزيائية المهمة التي يمكن بواسطتها الكشف عن الـ DNA وتحديد حجمه. إن مبدأ هذه الطريقة، هو هجرة الـ DNA من خلال فتحات صغيرة موجودة ضمن الأگاروز عند تسليط تيار كهربائي وتكون هذه الهجرة من القطب السالب (الأسود) باتجاه القطب الموجب (الأحمر) نظراً لكون الشحنة التي يحملها الـ DNA شحنة سالبة بسبب وجود مجموعة الفوسفات. أي إن الجزيئة ذات الشحنة السالبة (anion) تهاجر وتنجذب إلى القطب الموجب (anode), والجزيئات ذات الشحنة الموجبة (cation) سوف تهاجر وتنجذب نحو القطب السالب (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.

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. يمكن ربط جهاز الترحيل الكهربائي بـ جهاز تصويري gel documentation system والذي يساعد في تاكيد رؤية الجزيئات المفصولة والتاكد من وزنها الجزيئي كما في الصورة ادناه

1987 1428
UNIVERSITY OF ANBAR



العوامل المؤثرة على هجرة الدنا خلال هلام الأگاروز

1. **الشحنة charge** (فيما إذا لو كانت سالبة أو موجبة)
2. **الحجم والوزن الجزيئي للدنا:** فالجزيئات الصغيرة تتحرك خلال الهلام بصورة أسرع من الجزيئات الكبيرة.
3. **تركيز الأگاروز**: تختلف سرعة رحيل الجزيئات المتشابهة بتغير تركيز الأگاروز المستعمل لعملية الفصل.
4. **الشكل البنائي للدنا:** تختلف أشكال الدنا البنائية الفيزيائية في سرعة جريانها في هلام الأگاروز 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 أو CCC فأنها مدمجة compact أكثر لذا تهاجر عبر الثقوب بسهولة أكبرمن الجزيئات الحلقية المفتوحة Opened circle(OC) وغالبا ما تهاجر الجزيئات الخطية Linear ببطء أكثر مقارنة بجزيئات الـ CCC.
5. **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)

الادوات والمواد الواجب توفرها لغرض الترحيل الكهربائي

يتألف جهاز الترحيل الكهربائي من :

1-مجهز الطاقة Power supply

2-وحدة الترحيل الكهربائي Electrophoresis chamber

3- وعاء صب الهلامGel casting Try

4- المشط Comb

5- جهاز الاشعة فوق البنفسجية UV trans illuminator gel electrophoresis

المواد المستخدمة في الترحيل الكهربائي

1-Buffer -10X TBE(Tris-borate-EDTA):وهو عبارة عن محلول الكتروليتي يقوم بنقل التيار الكهربائي بين القطب الموجب والسالب لوحدة الترحيل الكهربائي ولولا وجود هذا المحلول لما انتقل التيار الكهربائي . ويكون هذا المحلول بنوعين فاما يتكون من tris-acetate-EDTA ويسمى بمحلول TAE او Tris-borate-EDTA ويدعى TBE

2- محلول التحميل صبغة برومو فينول الزرقاء (DNA Loading Dye)

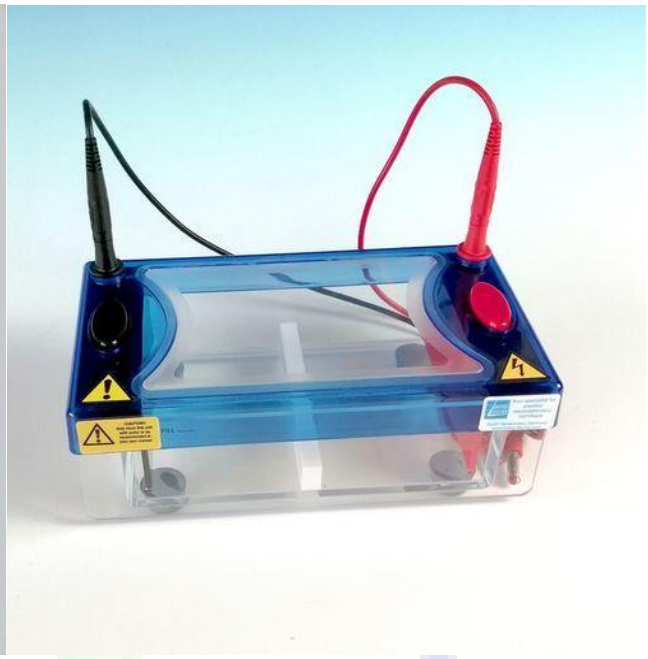
داريء التحميل loading buffer، والذي يتألف من مكون أساسي كثيف (كالكليسرول glycerol) لكي يسمح للعينة بأن "تسقط" بالحفرة المراد ترحيلها منها. (ففي حالة ترحيل الـ DNA) وبسبب الكثافة النوعية العالية للكليسرول، فانه يحتل الموقع العلوي، أما محلول الـ DNA، فانه يحتل الموقع السفلي، وهذا يعمل بدوره على تثبيت جزيئات الـ DNA في الهلام، وفي حالة عدم وجود الكليسرول أو أية مادة كثيفة أخرى، فان هذا قد يؤدي بدوره إلى عدم تثبيت الـ DNA في الهلام وبالتالي تحدث فيه حالة الانتشار diffusion الغير مرغوبة. ويتألف داريء الترحيل كذلك من صبغة أو صبغتين للتعقب tracking dyes (bromophenol blue أو xylene cyanol)، والتي تهاجر في الهلام مع العينة وتسمح بالمراقبة العينية لمسافة التي قطعتها العينات أثناء ترحيلها كهربائياً في الهلام. كما انها تعرف مقدار المسافة المقطوعة من قبل الجزيئات المرحّلة، وهذا بدوره يسهل لنا معرفة توقيت الانتهاء من الترحيل.

3- صبغة البروميد الاثيديوم Ethidium bromide

4-هلام الاكاروز Agarose gel

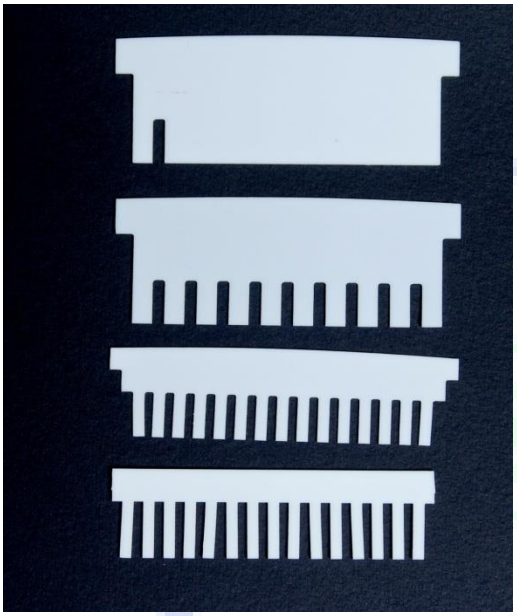
5-عينة DNA نقية

6- ماء مقطر Distilled Water



Ethidium صبغة البروميد الاثيديوم bromide	**Electrophoresis وحدة الترحيل الكهربائي chamber**

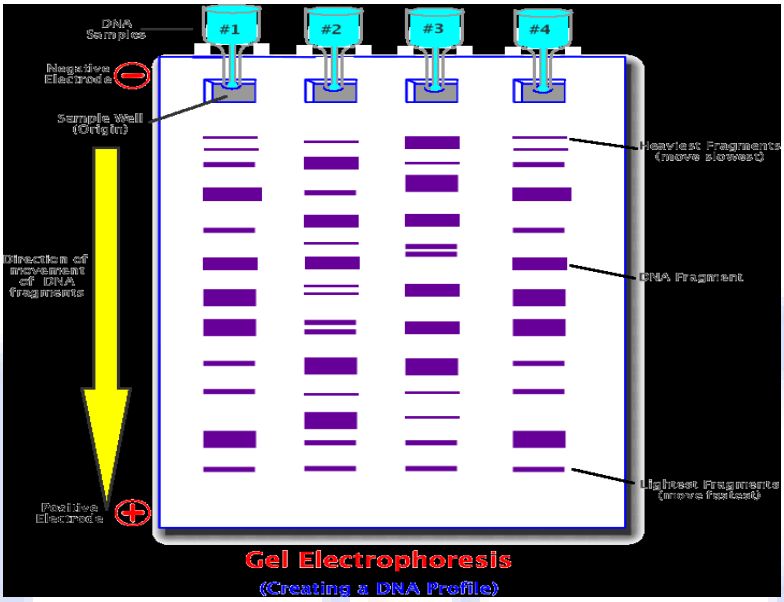
Gel casting Try وعاء صب الهلام



Comb المشط

Power supply مجهز الطاقة

جهاز الاشعة فوق البنفسجية UV transilluminator gel electrophoresis



صورة ظهور حزم DNAعلى هلام الاكاروز بواسطة جهاز الاشعة فوق البنفسجية

خطوات او طريقة العمل

١- تلحم حافات وعاء صب الهلام بشريط شفاف، أو بالماسكات الموفرة مع الوعاء من قبل الشركة المجهزة. وتجري عملية اللحم عادة لمنع تسرب الهلام خلال عملية التصلب. يوضع الوعاء بوضع أفقي على الطاولة. لاحظ اتزان المستوى الأفقي لطاولة من خلال الموازن balance.

٢- تحضّر كميات كافية من داريء الترحيل الكهربائي، كما في داريء 0.5 X TBE، لملىء غرفة الترحيل الكهربائي ولتحضير الهلام. أضف كمية مناسبة من مسحوق الأكاروز إلى كمية محسوبة من داريء الترحيل الكهربائي في قارورة flask ذات سدادة رخوة. يجب أن لا يحتل الداريء أكثر من 50% من حجم القارورة.

ملاحظة: من المهم استخدام نفس الداريء في غرفة الترحيل الكهربائي وفي الهلام، حيث إن اختلافات بسيطة سواءً في القوة الأيونية ionic strength أو في الأس الهيدروجيني pH تخلق جبهات على الهلام تؤثر تأثيراً كبيراً على حركة جزيئات الـ DNA.

٣- اقفل فتحة القارورة برخاوة. يجب التأكد من رخاوة سداد القارورة. سخّن القارورة بحمام مائي بدرجة حرارة 100°C (درجة حرارة الغليان) إلى أن يذوب الأكاروز.

٤- برّد المحلول إلى درجة حرارة 60°C، وإذا كان ذلك مرغوباً، تضاف صبغة بروميد الاثيديوم، وتمزج بشمولية.

ملاحظة: عند إضافة صبغة بروميد الاثيديوم إلى هلام الأكاروز قبل تصلبه، فان هذا له فائدة ومضرة، أما الفائدة هي قدرة الباحث في تعقب عينة الـ DNA نفسها في أي وقت من أوقات الترحيل الكهربائي، أما المضرّة، فتتمثل من احتمال تشوه عينات الـ DNA بسبب تداخل هذه الصبغة في جزيئات الـ DNA، وهذا يفقد جزيئات الـ DNA فعاليتها البايولوجية.

٥- يوضع المشط بارتفاع 0.5 – 1.0 mm فوق وعاء صب الهلام لكي تتكون حفرة كاملة عند إضافة الأكاروز. وإذا كان المشط أقرب إلى صفيحة وعاء صب الهلام، فان هنالك خطر يتمثل

جامعة الانبار
1987 1428
UNIVERSITY OF ANBAR

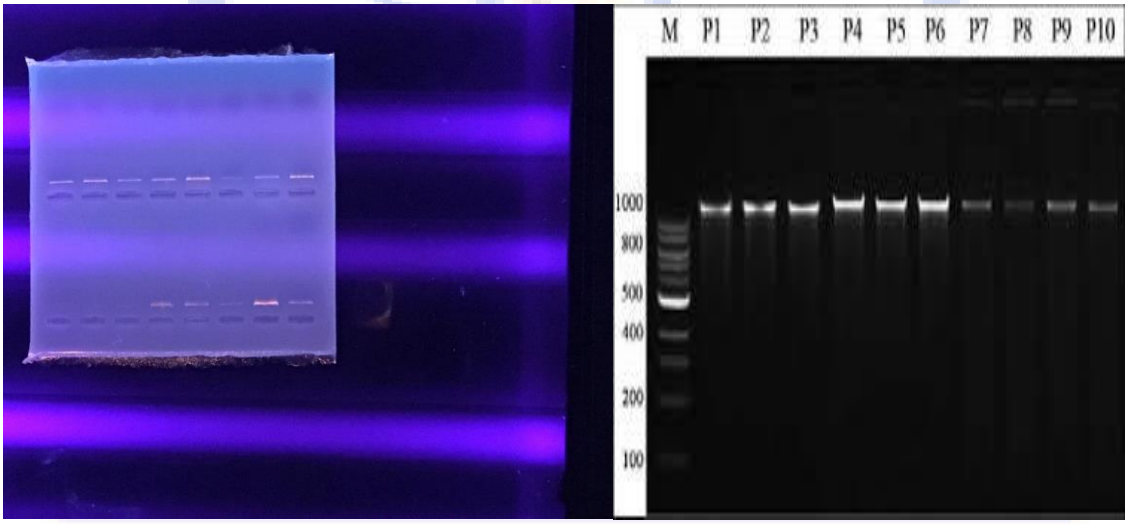
بتمزق قاعدة الحفرة عندما يسحب المشط، وهذا بدوره يسمح للعينة بأن تتسرب مابين الهلام والصفيحة.

٦- اسكب محلول الهلام الساخن على وعاء صب الهلام. يجب أن يكون سمك الهلام ما بين 3 mm إلى 5 mm. افحص لتطمئن عدم وجود فقاعات هوائية air bubbles، لأن وجود الفقاعات يعمل على تحطيم الـ DNA عند مروره بها.

٧- بعد أن يتصلب الهلام بشكل كامل، (30 إلى ٤٥ دقيقة بدرجة حرارة الغرفة)، يزال المشط بحذر وتبعد الماسكات (أو الشريط الشفاف) عن وعاء صب الهلام

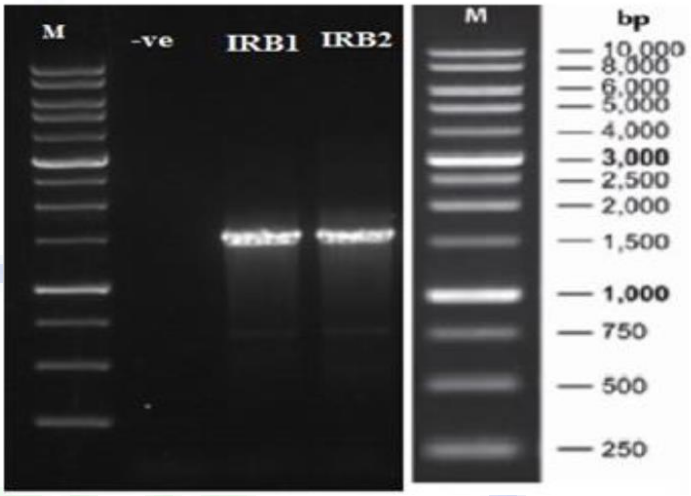
٨- تخلط العينات (عينات الـ DNA) مع داريء التحميل loading buffer.

٩- وباستخدام micropipette مناسب،توضع العينات الممزوجة مع داريء التحميل في حفر العينات، ويوضع الوعاء في غرفة الترحيل الكهربائي.



UNIVERSITY OF ANBAR

a



Thank you
for listening

1987 1408
UNIVERSITY OF ANBAR