Gel electrophoresis

محاضرة رقم (5)

Patel, D., 1994. *Gel Electrophoresis*. Chichester: Wiley.

Rickwood, D. and Hames, B., 1990. *Gel Electrophoresis Of Nucleic Acids*. IRL Press, Oxford.

الترحيل الكهربائي: - حركة الأيونات والجزيئات العملاقة المشحونة charged macromolecules مثل DNA, RNA, proteins خلال وسط معين (agarose and Polyacrylamide gel poly) عند تسليط تيار كهربائي

العوامل التي تتحكم بحركة جزيئات الـ DNA

1 الشحنة charge (فيما إذا لو كانت سالبة أو موجبة)

2. وزنها الجزيئي 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

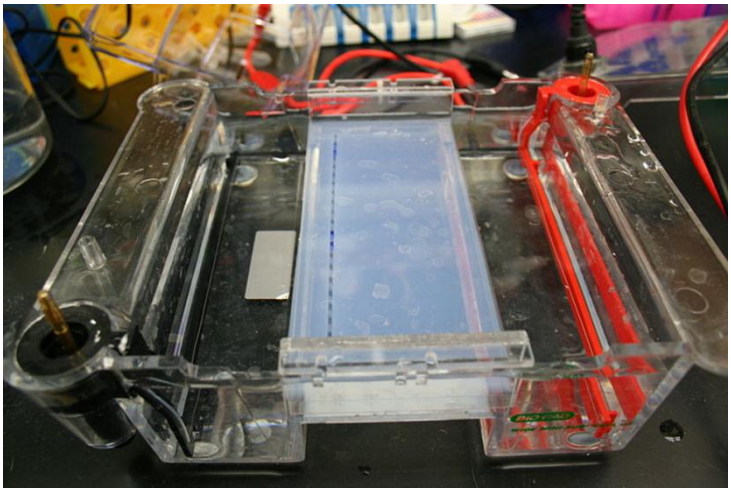
4. قوة التيار الكهربائي the strength of the electrical field.

حيث تقاس الفولتية اللازمة للترحيل عن طريق قياس المسافة بين الانود والكاثود بالسنتمترات ويضرب الناتج بالرقم 5، نحصل بذلك على الفولتية اللازمة للترحيل

ماهي الأدوات الواجب توفرها لغرض الترحيل gel electrophoresis

اولا. غرفة ترحيل كهربائي electrophoresis chamber

والذي يتوفر بحجوم متعددة، ويتألف من بلاستك نفاذ للأشعة فوق البنفسجية UV.



ثانيا. المشط comb

التي يتصلب هلام الأكاروز حوله، والذي عند رفعه يتكون ما يعرف بالحفر wells، والتي تمثل - أي الحفر- الأماكن التي توضع بها عينات الـ DNA المراد ترحيلها كهربائيا

ثالثا. معادل الترحيل الكهربائي electrophoresis buffer

هو الذي يساعد على نقل التيار الكهربائي بين القطب الموجب والقطب السالب لوحدة الترحيل الكهربائي، ولولا وجود هذا الـ buffer لما انتقل التيار ولما اكتملت الدائرة الكهربائية. يكون المعادل الذي يستخدم في ترحيل الأحماض النووية عادة بنوعين، فأما أن يتألف من المكونات tris-acetate-EDTA ، ويدعى TAE أو أن يتألف من المكونات tris-borate-EDTA، ويدعى TBE

رابعا. loading buffer

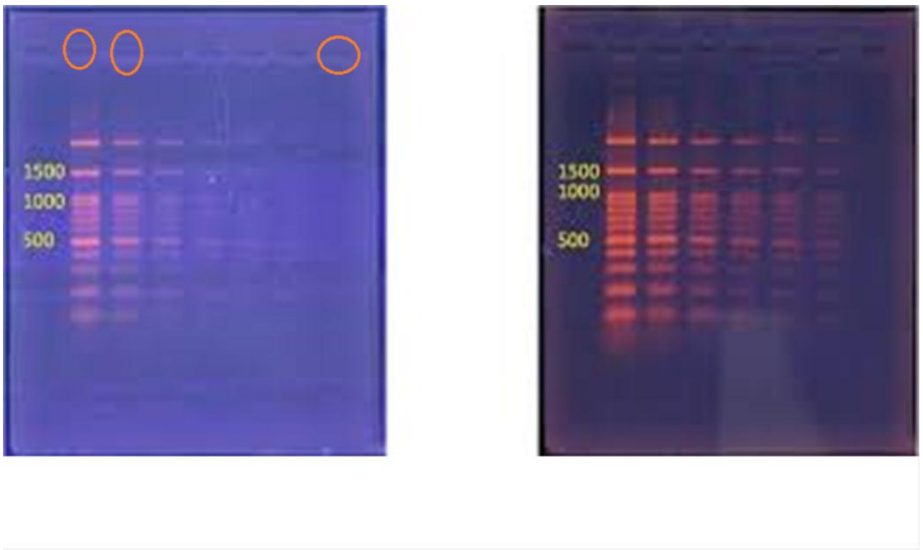
يتألف من مكون أساسي كثيف مثل glycerol لكي يسمح للعينة بأن "تسقط" بالحفرة المراد ترحيلها منها. ففي حالة ترحيل الـ DNA وبسبب الكثافة النوعية العالية للكليسرول، هذا يعمل بدوره على تثبيت جزيئات الـ DNA في الحفر، وفي حالة عدم وجود الكليسرول أو أية مادة كثيفة أخرى، فان هذا قد يؤدي بدوره إلى عدم تثبيت الـ DNA في الحفر وبالتالي تحدث فيه حالة الانتشار diffusion الغير مرغوبة. ويتألف loading buffer 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.

خامسا. صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium bromide:

يتم معرفة مواقع جزيئات الـ DNA من خلال التصبيغ، وهو عادة ما يحصل باستخدام صبغة بروميد الاثيديوم ethidium bromide والتي هي عبارة عن جزيئة ترتبط بالـ DNA.

بعد الارتباط بالصبغه تصبح جزيئة الDNA مشعة بالوان حسب الصبغة المستخدمه، فمثلا تظهر باللون الاحمر عند وضعها في جهازالـ UV transluminator والذي يستعمل للكشف عن الجينات المرحلة

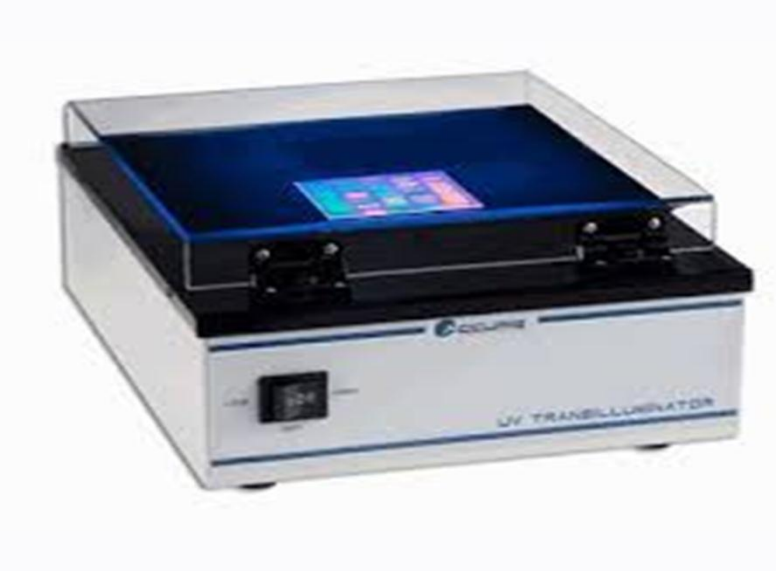
ملاحظة: إن صبغة بروميد الاثيديوم هي مادة مطفرة معروفة، ويجب أن تعامل كمادة كيمياوية خطرة – لذا يجب لبس القفازات عند التعامل مع هذه المادة



سادسا. جهاز الـ transluminator

والذي يعرف أيضا بصندوق ضوء الأشعة فوق البنفسجية UV lightbox، يستخدم هذا الجهاز لرؤية جزيئات الـ DNA المصبوغة بصبغة بروميد الاثيديوم في الهلام.

ملاحظة: يجب استعمال واقيات للعين عند مشاهدة جزيئات الـ DNA بهذا الجهاز، وذلك لحماية العينين من الأشعة فوق البنفسجية



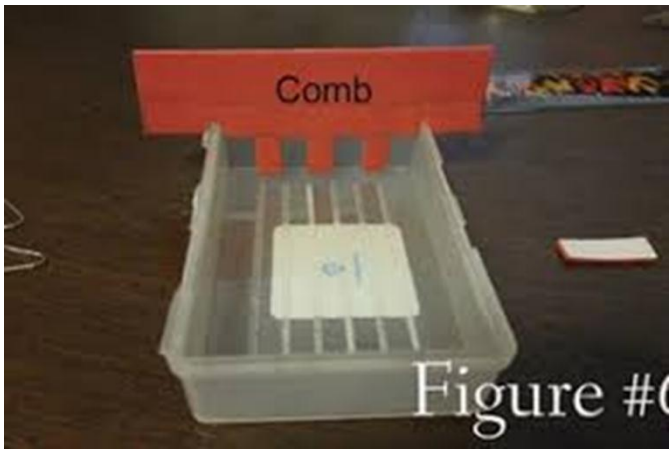
خطوات الترحيل الكهربائي

1- بعد تحضير الجل من خلال اذابة نسبة معينه من مسحوق الجل حسب الاستخدام اي حسب الوزن الجزيئي للمادة المراد ترحيلها والتي تتناسب عكسيا مع الوزن الجزيئي. اي كلما زاد الوزن الجزيئي قل تركيز الاكاروز، يذاب المسحوق في electrophoresis buffer ويسخن الى ان يذوب المسحوق

2- تحضير محلول electrophoresis buffer

ملاحظة: من المهم استخدام نفس electrophoresis buffer في غرفة الترحيل الكهربائي وفي الهلام.

3- برّد المحلول إلى درجة حرارة 60، تضاف صبغة بروميد الاثيديوم، وتمزج.



4- يوضع المشط فوق وعاء صب الهلام لكي تتكون حفرة كاملة عند إضافة الأكاروز.

5- 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.

6- بعد أن يتصلب الهلام بشكل كامل، (30 إلى 45 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة)، يزال المشط بحذر عن وعاء صب الهلام.

7- تخلط عينات الـ DNAمع loading buffer

8- وباستخدام micropipette مناسب، توضع العينات الممزوجة مع loading buffer في حفر العينات، ويوضع الوعاء في غرفة الترحيل الكهربائي.

9- أضف كمية كافية من electrophoresis buffer إلى أن يرتفع هذا المحلول بمقدار 1 mm فقط عن الهلام. لأنه إذا ارتفع أكثر من ذلك فان هذا سوف يشوه العينات، وإذا كان أقل من 0.5 mm فان هذا يؤدي إلى جفاف الهلام وفشل عملية الترحيل الكهربائي.

10- يوضع الغطاء lid على غرفة الترحيل الكهربائي، ثم يوضع القطبين الكهربائيين بحيث يهاجر الـ DNA نحو الأنود (القطب الأحمر). وإذا وصلت الأقطاب بشكل صحيح، فلابد من تولّد الفقاعات عند قطبي الأنود والكاثود. وفي دقائق معدودة، يجب أن تهاجر صبغة الـ bromophenol blue والـ xylene cyanol إن وجدت إلى مسافة مناسبة في الهلام.

11- بعد انتهاء الترحيل الكهربائي، يطفيء التيار الكهربائي، وتزال الأقطاب الكهربائية والغطاء من غرفة الترحيل الكهربائي. يرفع وعاء صب الهلام ويوضع في جهاز UV transluminator ، يتم مشاهدة عينات الـ DNA وهي مصبوغة بصبغة بروميد الاثيديوم.