وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الانبار
كلية العلوم

القسم: علوم الحياة
المادة: بايولوجي جزيئي عملي
عنوان المختبر: الترحيل الكهربائي

المختبر السادس

اعداد مدرس مساعد هاله مهدي حمد
كلية العلوم قسم علوم الحياة

فصل نواتج تفاعلات الكوثرة

- بعد انتهاء تفاعل الكوثرة تستعمل النواتج اما مباشرة, او تفصل لاجراء الدراسات عليها او التاكد من وجودها. وعمليات الفصل تتم بالترحيل الكهربائي بواسطة الترحيل الكهربائي Electrophoresis باستعمال الهلام Gel. ويعني الهلام الارضية او الوسط الذ تتحرك فيه الجزيئات الكبيرة مثل DNA, RNA و البروتينات اعتمادا على مواصفات خاصة مثل الحجم والطول بالنسبة للحوامض النووية او الشحنات بالنسبة للبروتينات او بالاعتماد على صفات فيزيائية اخرى بعد تسليط مجال كهربائي لتحريك الجزيئات خلال ارضية الهلام ضمن ظاهرة النخل Sieving وتحدد بحجم الثقوب التي يمكن

اليات الفصل في الهلام

- تختلف اليات الفصل اعتمادا على الجزيئات فالبعض يحمل مجاميع متاينة تحدد السرعة التس ستتحرك بها الجزيئات في وسط الهلام. ومن الجدير بالذكر ان جزيئات DNA تتصرف على انها قضبان طويلة لذلك تكون حركتها في الهلام معتمدة على حجمها. اما الجزيئات الحلقية فتكون حركتها معتمدة على نصف قطر التدوير, فالجزيئات مثل البلازميدات يمكن ان تظهر عدة حزم والحركة او الهجرة تكون معتمدة فيما اذا كانت الجزيئة في حالة ارتخاء او ملتفة. اما الجزيئات ذات الاشرطة المفردة مثل DNA و RNA والتي تميل للانطواء وتكوين جزيئات معقدة الاشكال فانها تهاجر خلال الهلام بنمط معقد معتمدا على التركيب الثلاثي. لذلك فان من العوامل التي تكسر الاواصر الهيدروجينية NaOH و Formamide تستعمل لمسخ الحوامض النووية وتجعلها تتحرك كقضبان طويلة.

استعمالات الهلام للفصل

تستعمل انواع الهلام لاغراض عدة وذلك لسهولة التعامل معه. فهو يستعمل في فصل الجريئات النانوية Nanoparticles. وكذلك يستعمل كاحد التقنيات الحيوية المهمة لدراسة اساسيات الحياة وتشخيص الامراض وتطوير علاجات جديدة. وكذلك في التعامل الوراثي للدراسة مثل دراسة المواد الوراثية بعد تقطيعها بانزيمات القطع. لذا يمكن استعمالها في فصل وتنقية قطعة معينة تحتوي على الجين المطلوب والتي يمكن ان تسترد من الهلام وهي بحالة طبيعية. كما يستعمل الهلام في التعرف على الاختلافات الوراثية والعلاقات التطورية بين الانواع. كما انه يستعمل في فصل جزيئات RNA.

واهم استعمالات الهلام هي فصل نواتج الكوثرة والتي قد تقطع بالانزيمات القاطعة لاستعمالها في الكلونة او تجارب اخرى بعد استردادها من الهلام.

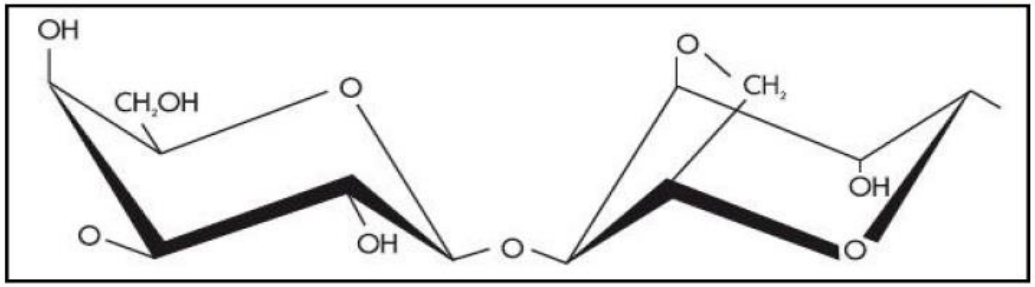
مواد الهلام

هناك عدد من المواد تصلح لتكوين الهلام لتكون أرضية صلبة حاوية على الثقوب ومنها النشا بتركيز 5 –10٪ ولكن فائدته قليلة .

ولكن كل من الاكاروز Agarose وهلام متعدد الاكريلاميد Polyacrylamide هي الأكثر استعمالا في فصل منتجات تفاعل الكوثرة ولكن ببعض التقييدات وهي التي سيتم تناولها ببعض التفصيل .

هلام الاكاروز Agarose

الاكاروز متعدد للـ Galactan يتكون من ارتباط Agarobioses بارتباطات 3 –1 و 4 –1 كما موضح في الشكل 12 .



شكل 12 : التركيب الكيماوي للاكاروز

ويكون بشكل سلاسل طويلة غير متفرعة وغير مشحونة من الكربوهيدرات وبدون اتصالات عرضية Cross links ، هذه التركيبة تؤدي الى تكوين ثقوب كبيرة ملائمة لفصل الجزيئات الكبيرة او المعقدات الجزيئية الكبيرة .

مواصفات الاكاروز

تركيبة الاكاروز تعطيه القابلية لتكوين الهلام الذي يكون مقاوما حتى عند التراكيز الواطئة . يمتلك هلام الاكاروز تركيب بشكل شبكة مفتوحة يمكن التحكم بها بواسطة تغيير التركيز والشبكة او التركيب الشبكي Macroreticule يتكون بواسطة الأواصر الهيدروجينية التي تجعل الهلام متلائما مع درجات الحرارة اذ يكون Thermoreversible ، فهو ينصهر بالتسخين عند درجة حرارة 80 – 95 ºم ويكون هلام بدرجات حرارية 32– 45 ºم ، ويمكن ان تحور درجات الحرارة لأغراض خاصة . والاكاروز مادة متعادلة وغير سامة لذلك يمكن التعامل معها بحرية .

الاكاروز سهل الصب والتداول مقارنة بالمواد الأخرى وبما ان عملية تكوين الهلام هي عملية فيزياوية وليست كيماوية لذلك يمكن استخلاص المواد منه بسهولة ، ويمكن بعد انتهاء التجارب خزن الهلام في أوعية بلاستيكية في الثلاجة . وبالرغم من هذه المواصفات فان الاكاروز يمكن ان يتأثر بطبيعة المواد التي يذاب فيها ، فالمواد التي تدمر الأواصر الهيدروجينية (كما في بعض أنواع الدواريء) تؤدي الى تقليل درجة الانصهار وقوة الهلام ويمكن ان تثبط عملية تكوين الهلام .

هلام متعدد الاكريلاميد Polyacrylamide gel

يمثل النوع الثاني من أنواع الهلام المستعملة في فصل نواتج الكوثرة وأساسا يستعمل لفصل البروتينات بحجم 5 –2000 كيلو دالتون وكذلك في الدراسات المناعية وتحليل نظائر Isoforms البروتينات نظرا لتجانس الثقوب الموجودة فيه والتي يسيطر عليها بالتلاعب بتركيز المادة الأساسية Bis-acrylamide و Acrylamide والمواد الأخرى المشاركة في تكوين الهلام . والمادة الأولية فيه تكون سامة للأعصاب سواء كانت بشكل مسحوق او سائل لذلك يتم تجنب استعماله عند إمكانية الاستغناء .

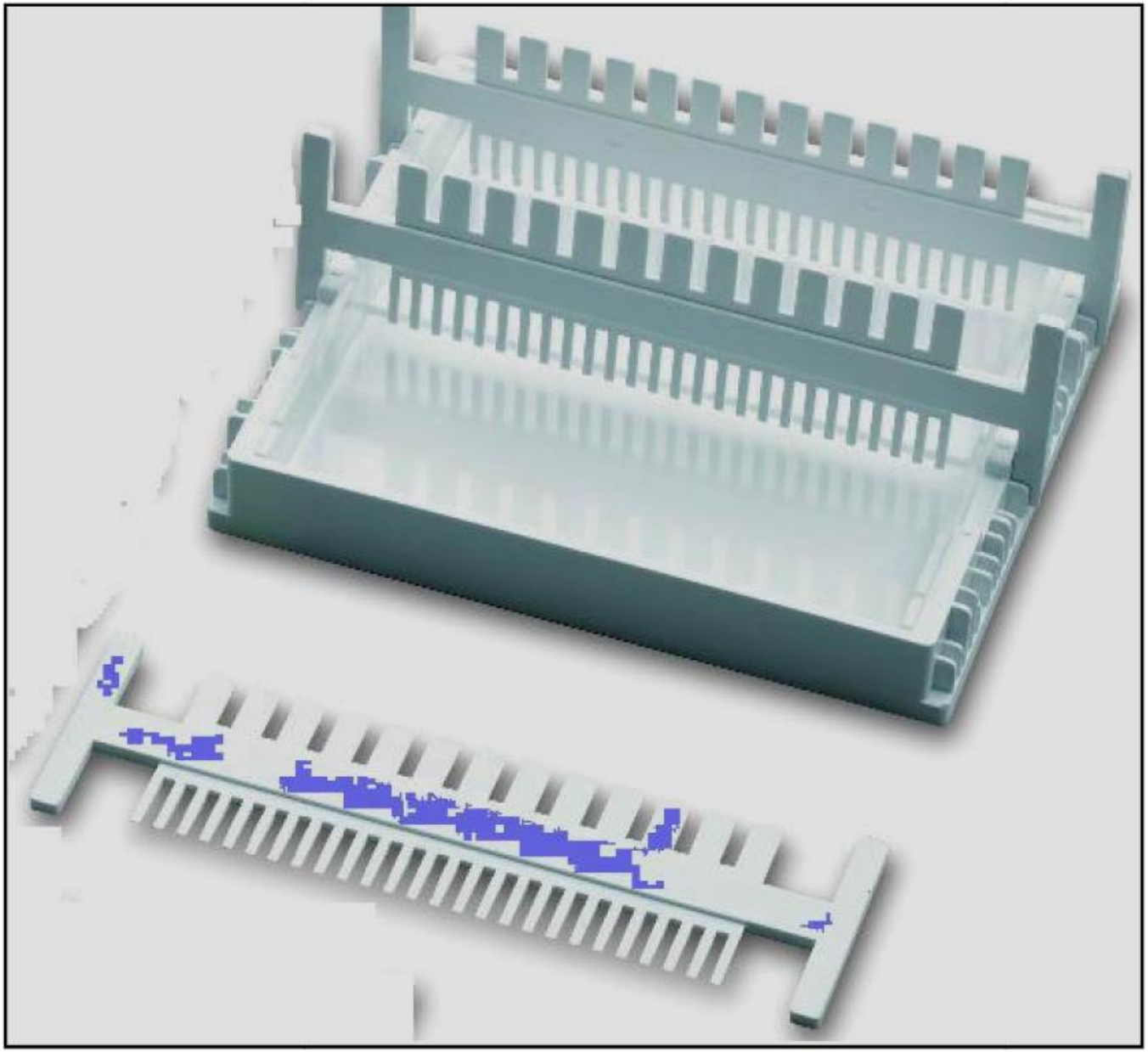
يستعمل الهلام في بعض الطرق مثل تحديد التواليات باستعمال طريقة Maxam and Gilbert او Sanger لفصل قطع DNA المراد تحديد تواليا تها ، لان هذه الطريقة تكون حساسة جدا في الفصل خاصة للقطع الصغيرة من DNA ، ولو انه في الوقت الحاضر يستعمل الاكاروز لهذه الأغراض ما عدا عندما تكون قطع DNA صغيرة جدا .

يستعمل الهلام بتراكيز 6 ٪ ، 8 ٪ ، 10٪ ، 12٪ ، 15٪ ، لتكوين الهلام Slab بشكل متجانس ولزيادة وضوح الحزم فيه تستعمل التراكيز المتدرجة بدا من 5٪ الى 15٪ (Gradient gel) . ويستعمل الهلام اللازم لوضع النماذج Stacking gel بتركيز 5٪ وفيه يتم إدخال المشط Comb لعمل الثقوب لوضع النماذج . والنسبة المئوية للتركيز يتم اختيارها اعتمادا على حجم البروتين المراد فصله ، فالأوزان الصغيرة تستعمل لها نسب مئوية عالية من الهلام ، كما يمكن زيادة المعلومات التي يتم الحصول عليها من عملية الترحيل بالتلاعب بالدواريء المستعملة .

الأجهزة المستعملة في الترحيل

تستعمل أوعية او خزانات مختلفة لصب الهلام وإجراء عملية الترحيل الكهربائي وأفضلها استعمال الصغيرة منها Mini gels التي تكون بأبعاد 8× 10 سم التي تكون اقتصادية وملائمة للحجوم التي يتعامل معها تفاعل الكوثرة ، كما انها كافية لإعطاء صور واضحة ، وهذه تحتاج الى حوالي 30 – 50 مللتر من الهلام اما الأوعية الكبيرة التي تستعمل لتطبيقات خاصة مثل إجراء Southern blot او Northern blot فتحتاج الى حوالي 250 مللتر من الهلام .

وبعد صب الهلام في الأوعية الخاصة به ، يوضع المشط Comb بشكل عمودي لغرض تكوين الحفر لوضع النماذج ويغطى الوعاء ويترك ليبرد ويتصلب الهلام ويحدد حجم الحفر اعتمادا على حجم نموذج DNA الذي سيستعمل وكذلك عدد النماذج . بعض الأمشاط تعطي ثقوب تستوعب 10 مايكرولتر من النموذج وهذه غير ملائمة للنماذج المستعملة عموما اذ يتم وضع 20 مايكرولتر بعد إضافة داريء التحميل لها والذي قد يصل حجمه الى 5 مايكرولتر . اما عدد الحفر فيفضل ان تكون بعدد النماذج مضافا اليها 1–2 لوضع الواسمات الوزنية ، مع الأخذ بنظر الاعتبار ترك بعض المسارات لمعاملات السيطرة . والجهاز موضح في الشكل الآتي (شكل 13) .



شكل 13 : جهاز الترحيل الكهربائى

ملاحظات عامة عند تحضير الهلام واستعمالاته

هناك بعض الملاحظات العامة التي يجب الالتفات اليها لغرض إنجاح عملية تحضير الهلام ومنها :

- تفادي تغير حجم محلول الهلام نتيجة للتسخين ولذلك يغطى وعاء التحضير او يعدل الحجم بالماء المقطر الحار للحفاظ على الحجم الأصلي .
- تغطية الهلام بعد صبه وتركه ليبرد لتفادي التبخر ، ويترك ليتصلب تماما وبالتدريج .
- بعد اكتمال تصلب الهلام التدريجي (وإلا سيعطي حزم منتشرة وغير واضحة او يعطى مسحة من DNA) يغمر تماما بالداريء الذي سيستعمل في الترحيل (مثل استعمال TBE) لعمق 2- 5 ملم والتأكد من ان الهلام مغطى تماما ويمكن ان يخزن في الثلاجة لعدة أيام .
- هلام الاكاروز يمكن ان يعاد صهره وصبه عدة مرات دون التأثير في صفاته ، لذلك يمكن تحضير كميات كبيرة منه توزع على وجبات صغيرة وتستعمل عند الحاجة .
- يجب استعمال الداريء نفسه الذي استعمل في تحضير الهلام في عملية الترحيل.
- يضاف النموذج بعد خلطه مع داريء التحميل الذي يحوي على الكليسرول او السكروز او Ficoll لجعل الكثافة عالية ويمكن من غطس النموذج والاستقرار في الحفرة .
- عند استعمال الهلام يفضل عدم استعمال المسارات Lanes الجانبية اي الخارجية لان النماذج فيها تكون عرضة للحركة بشكل منحرف ، لذلك يفضل استعمال المسارات الوسطية .

ظروف الترحيل الكهربائي

تشمل مدة الترحيل وحرارة الترحيل وكذلك الفولتية (فرق الجهد) والتيار المستعملة لتوليد المجال لكهربائي . ويمكن ان تتأثر ظروف الترحيل بحجم قطع DNA وتركيزها لذلك يفضل في البداية التعرف على مثل هذه المعلومات ويفضل ترحيل قطع سليمة (Uncut DNA) بتراكيز مختلفة على هلام واحد مع قطع معروفة التركيز (المقاسة باستعمال الطول موجي A_{260}) ثم مقارنة الكثافة بالنظر بين القطع غير معروفة التركيز او الوزن مع القطع المعروفة مثل استعمال واسمات Hind III λ او اي واسمات أخرى .

- **المجال الكهربائي** : بعد تحضير الهلام وتسليط المجال الكهربائي يجب بداية التأكد من سريان التيار الكهربائي وذلك بفحص مزود القدرة الكهربائية ، ولكن الأفضل ملاحظة ظهور الفقاعات الغازية عند الأقطاب والتي يجب ان تؤخذ بنظر الاعتبار خاصة عند

- **الجهد الكهربائي** : يعتمد على الظروف مثل تركيز الاكاروز ، داريء الترحيل ، حجم القطع المرحلة .

والفولتية المستعملة عامة تكون بحدود 4 –8 فولت /سم من طول الهلام ويجب ان تكون ثابتة . اما التيار الذي تنتجه فيعتمد على نوعية المواد التي يسري فيها التيار وقيم المقاومة لها . وقيم الفولتية قد لا تكون مهمة جدا عندما يراد التعرف فيما اذا كانت النواتج موجودة او لا .

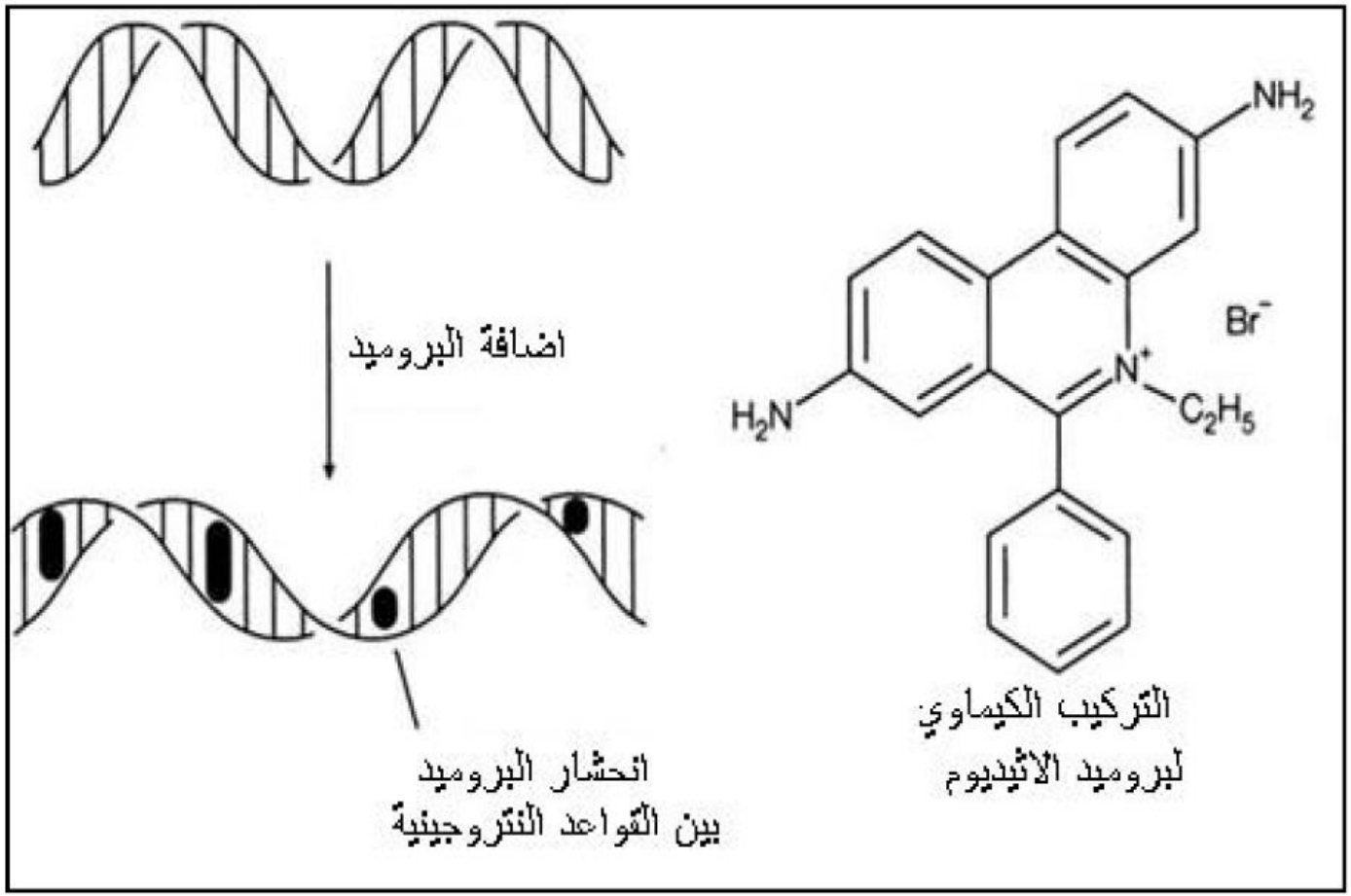
معاملات السيطرة Controls

لابد من استعمال بعض معاملات السيطرة عند ترحيل النماذج في الهلام ومن هذه السيطرات

- السيطرة السالبة وتستعمل لغرض الكشف عن النتائج الموجبة الكاذبة الناتجة عن التلوث . وتتكون من كل مكونات التفاعل مثل البواديء والدواريء ما عدا DNA القالب المراد تضخيمه .
- السيطرة الموجبة وتستعمل للتأكد من ان الدواريء وغيرها من مكونات خليط التفاعل تعمل بشكل جيد وعند الحد الأمثل ، وتزود بعض الشركات بنماذج للسيطرة الموجبة للتأكد من مكونات العدد التي تبيعها .
- السلم المعياري او الواسمات الوزنية Ladder وهو خليط من قطع معروفة الحجم تستعمل لمقارنة الحزم ، وقد تكون هذه مكونة من بلازميدات او عاثيات او اي قطع أخرى معروفة الحجم والتوالي وتهضم بالإنزيمات القاطعة لإعطاء سلسلة من القطع بأحجام مختلفة ، او تكون محضرة صناعيا . ويستعمل السلم المعياري لغرض أمثُلة ظروف أخرى مثل الفولتية المستعملة والوقت ودرجات الحرارة وغيرها من الظروف .
- سيطرات أخرى يمكن ان تستعمل لمعرفة مدى جودة أداء مخاليط الدواريء مثل Premix او Master mix .

إظهار النواتج Product visualization

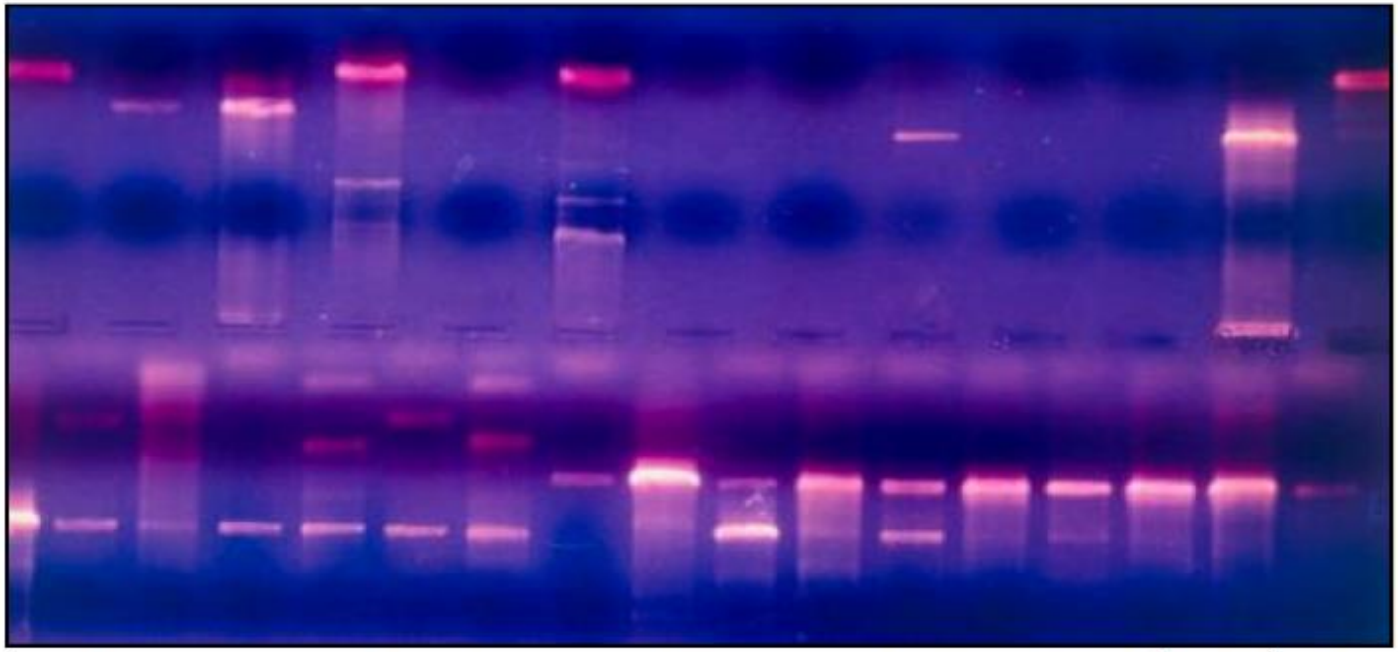
بعد انتهاء عملية الترحيل يتم إظهار النواتج باستعمال صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium bromide او اي صبغة أخرى او طريقة أخرى وتركيب الصبغة موضح في الآتي :



شكل 14 : تركيب جزيئة بروميد الاثيديوم

وفي أكثر تطبيقات تفاعلات الكوثرة يستعمل البروميد بتراكيز مختلفة والتي تتراوح بين 0.1 –0.5 مايكروغرام /مللتر . واستعماله يعتمد على الغرض من عملية الترحيل . والبروميد مادة سامة ومطفرة لذلك يمكن تلافي الأذى باستعمالها بشكل حبوب Tablets بدلا من المسحوق . ويحضر بشكل محلول خزين Stock solution يخزن في الظلام بعد تعليمه بانه محلول خطر .

يتم إظهار الصور تحت الضوء فوق البنفسجي حيث يعطي البروميد المرتبط بقوة بقواعد DNA (خاصة في الأخدود الكبير لجزيئة DNA) تألقا برتقاليا كما في الصورة التالية (شكل 14 \ أ) .



شكل 14\ أ : التألق البرتقالي لبروميد الاثيديوم تحت الضوء فوق البنفسجي

المصادر

- الخفاجي, زهرة محمود. وابو المعالي, حسن محمود. تفاعلات الكوثرة وتصميم البوادئ. 2013. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد. معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الحيوية للدراسات العليا.