

المحاضرة الثامنة

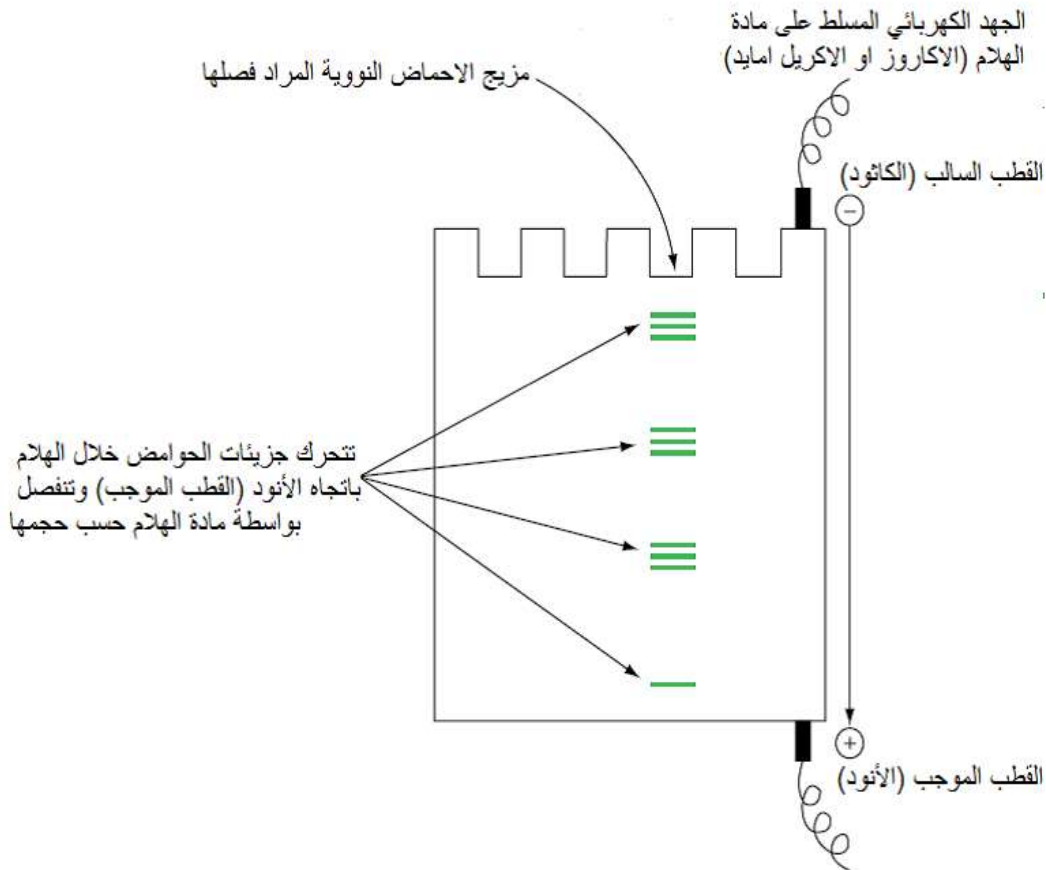
الترحيل الكهربائي في الجل (الهلام)

Gel Electrophoresis

هي تقنية أساسيه مستخدمه بكثره في مختبرات الكيمياء الحيوية (biochemistry labs) ومختبرات الأحياء الجزيئية (Molecular biology labs). حيث أن الكثير من العمليات التي تتم داخل المختبرات تعتمد عليها كخطوه من أحد خطواتها والهدف من هذه التقنية هي فصل وتحليل الجزيئات او القطع المشحونة كهربائيا (مثل ، المادة الوراثية (DNA) ، البروتينات ، RNA ، وغيرها من المواد التي تحتوي على شحنات).

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

إذا كان للجزيئة محصلة شحنة سالبة أو موجبة، فإنها سوف تهجر في المجال الكهربائي ، إن الجزيئة ذات الشحنة السالبة (الأنيون anion) تهجر وتتجذب إلى القطب الموجب (الأنود anode) ، والجزيئات ذات الشحنة الموجبة (الكاتيون cation) سوف تهجر وتتجذب نحو القطب السالب (الكاثود cathode).



المحاضرة الثامنة

يتم الترحيل في هلام يتكون من ثقب مجهرية دقيقة , microscopic pores ويقوم هذا الهلام بإعاقه حركة الجزيئات المختلفة من خلال التأثير المنخلي sieving effect لثقبه 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 بواسطة جزيئية قياسية standard molecular markers والتي ترحل بموازاة العينة الغير معروفة خلال الترحيل الكهربائي في الهلام.

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

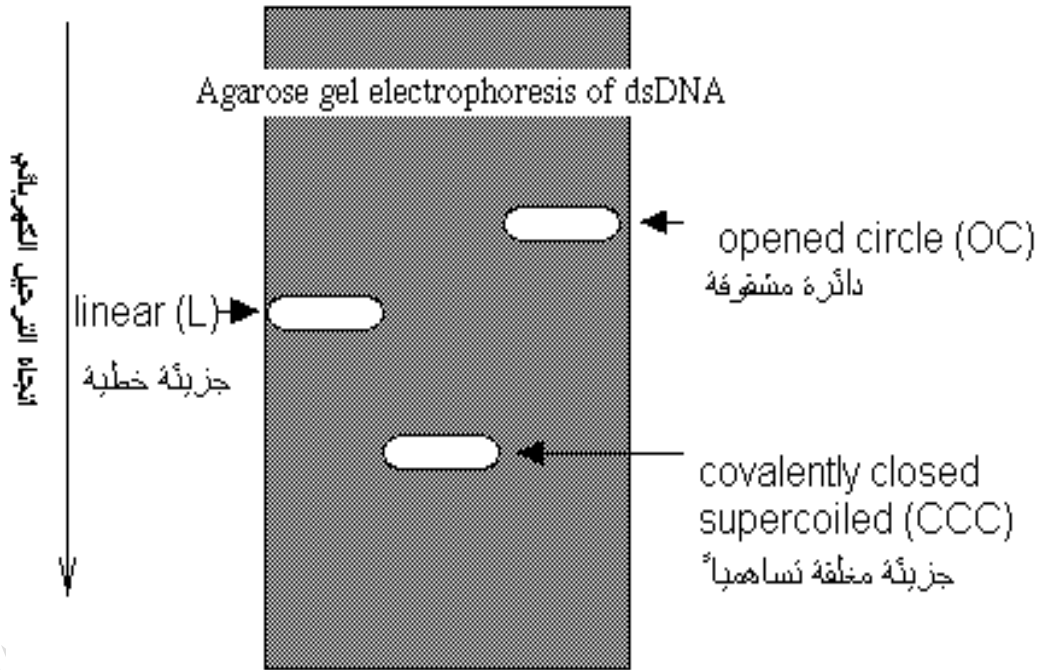
العوامل التي تتحكم بحركة جزيئات الـ DNA في الهلام :

- 1 - الشحنة charge (فيما إذا كانت سالبة أو موجبة) .
 - 2 - حجمها أو وزنها الجزيئي formula weight (فالجزيئات الصغيرة تتحرك خلال الهلام بصورة أسرع من الجزيئات الكبيرة) .
 - 3 - حجم الثقب pore size (كلما كان حجم الثقب 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 تنتشوه 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 .
- تهاجر جزيئات الـ DNA ثنائية الشريط بشكل مختلف اعتمادا على كون الـ DNA دائري circular أو خطي linear. تهاجر الجزيئات الخطية عبر ثقب الأكاروز بشكل يشبه الأفعى من خلال الثقب. أما الجزيئات الدائرية المغلقة تساهمياً covalently closed circular molecules أو CCC فأنها مدمجة compact أكثر لذا تهاجر عبر الثقب بسهولة أكبر، وغالبا ما تهاجر الجزيئات الخطية ببطء أكثر مقارنة بجزيئات الـ CCC.

المحاضرة الثامنة

هنالك نوعين من الـ DNA الدائري:

النوع المغلق, closed, والنوع المفتوح. opened. وفي حالة النوع المغلق أو CCC فان كل أحماضها النووية ترتبط بواسطة أصرة فوسفاتية ثنائية الأستر phosphodiester bond وتكون كذلك ملتفة بشكل فائق. supercoiled. أما النوع المفتوح (OC) open circle فلها على الأقل أصرة من نوع phosphodiester مكسورة. يدعى الـ opened DNA بالـ DNA المسترخي أو relaxed DNA, لأن الضغط الموجود في جزيئات الـ CCC قد تم تحريره، حيث أن شقا واحدا في الأصرة phosphodiester هو كفيلا بالتخلص من عملية اللف الفائق supercoiling بشكل كامل.



شكل يبين ترحيل ثلاث جزيئات DNA لها نفس التسلسل إلا أنها تختلف بالشكل فقط.

ولو أن كل جزيئات الـ DNA أعلاه لها نفس عدد النيوكليوتيدات ونفس الـ formula weight, إلا أنها تهاجر بشكل مختلف خلال الهلام.

المحاضرة الثامنة

الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز

Agarose gel electrophoresis

ماهي الأدوات الواجب توفرها لغرض الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز؟

1. غرفة ترحيل كهربائي Electrophoresis chamber
2. وعاء صب الهلام, gel casting tray, والذي يتوفر بحجوم متعددة، ويتألف من بلاستيك نفاذ للأشعة فوق البنفسجية. UV. تغلق النهايات الحرة بشريط شفاف tape (عند عدم توفر الماسكات النموذجية) قبل صب الهلام. ثم يزال الشريط قبل القيام بعملية الترحيل الكهربائي.
3. المشط, comb, والتي 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 كهربائياً.
4. داريء الترحيل الكهربائي, electrophoresis buffer, وهو الذي يضطلع بنقل التيار الكهربائي بين لقطب الموجب والقطب السالب لوحدة الترحيل الكهربائي، ولولا وجود الداريء لما انتقل التيار ولما اكتملت الدائر الكهربائية. يكون الداريء الذي يستخدم في ترحيل الأحماض النووية عادة بنوعين، فأما أن يتألف من المكونات, tris-acetate-EDTA, ويدعى بداريء TAE, أو أن يتألف من المكونات-tris-borate-EDTA, ويدعى بداريء TBE.
5. داريء التحميل, loading buffer, والذي يتألف من مكون أساسي كثيف (كالكليرول glycerol) لكي يسمح للعينة بأن "تسقط" بالحفرة المراد ترحيلها منها. (في حالة ترحيل الـ DNA) وبسبب الكثافة النوعية العالية للكليرول، فإنه يحتل الموقع العلوي، أما محلول الـ DNA، فإنه يحتل الموقع السفلي، وهذا يعمل بدوره على تثبيت جزيئات الـ DNA في الهلام، وفي حالة عدم وجود الكليرول أو أية مادة كثيفة أخرى، فإن 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 المرحلة، وهذا بدوره يسهل لنا معرفة توقيت الانتهاء من الترحيل.

المحاضرة الثامنة

6. 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 مسطحة planar molecule ترتبط بالـ DNA ثنائي الشريط بواسطة التداخل intercalation بين أزواجه القاعدية. عندما تدخل الصبغة إلى منطقة الـ DNA الداخلية الكارهة للماء, hydrophobic interior والتي تتمثل بالازواج القاعدية، فإنها تصبح أكثر تفورا more fluorescent من الصبغة الحرة في المحلول. هذا ولا يمكن رؤية الصبغة بالعين المجردة ولكن، بدلا من ذلك، يستخدم جهاز الـ UV transilluminator والذي يستعمل فيه الطول الموجي 300 – 360 nm والذي يبعث أو يشع الضوء في المنطقة الحمراء – البرتقالية للطيف الضوئي.

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

7. جهاز الـ transilluminator والذي يعرف أيضاً 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.

8. الموازن, balance وهو تركيب يشبه البوصلة، وهو ليس بالمكون الأساسي لوحدة الترحيل الكهربائي، لأنه يستخدم في معرفة مقدار الاتزان الحادث في المنضدة التي يوضع عليها الهلام. وذلك لأنه لو كانت المنضدة غير متزنة يكون الهلام الذي يرحل عليه الـ DNA غير متساوياً، وهذا يعمل على عدم توزيع التيار الكهربائي بصورة متساوية على الهلام، وبالتالي فإن عملية الهجرة لا تعكس الوزن لجزيئي الصحيح لجزيئات الـ DNA.

المحاضرة الثامنة

خطوات الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز

1 - 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.

2 - تحضّر كميات كافية من داريء الترحيل الكهربائي، كما في داريء 0.5 X TBE, لمليء غرفة الترحيل الكهربائي ولتحضير الهلام. أضف كمية مناسبة من مسحوق الأكاروز إلى كمية محسوبة من داريء الترحيل الكهربائي في قارورة flask ذات سداة 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 ال-DNA.

3 - اقلق فتحة القارورة برخاوة. يجب التأكد من رخاوة سداد القارورة. سخّن القارورة بحمام مائي بدرجة حرارة 100 درجة مئوية (درجة حرارة الغليان) إلى أن يذوب الأكاروز.

4 - برّد المحلول إلى درجة حرارة 60 درجة مئوية وإذا كان ذلك مرغوباً، تضاف صبغة بروميد الاثيديوم، وتمزج بشمولية.

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

5 - 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، فإن هنالك خطر يتمثل بتمزق قاعدة الحفرة عندما يسحب المشط، وهذا بدوره يسمح للعينة بأن تتسرب ما بين الهلام والصفيحة.

6 - 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 ال-DNA عند مروره بها.

7 - بعد أن يتصلب الهلام بشكل كامل، (30 إلى 45 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة)، يزال المشط بحذر وتبعد الماسكات (أو الشريط الشفاف) عن وعاء صب الهلام

المحاضرة الثامنة

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

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

10 - أضف كمية كافية من داريء الترحيل الكهربائي إلى أن يرتفع الداريء بمقدار 1 mm فقط عن الهلام. لأنه إذا ارتفع الداريء أكثر من ذلك فإن هذا سوف يشوه حزم الـ DNA الناتجة، فمثلاً قد ينحرف شكل الحزمة الناتجة إلى شكل مائل وتدعى الحزم هنا بالحزم المبتسمة. smiled bands. وإذا كان الداريء بارتفاع أقل من 0.5 mm فإن هذا يؤدي إلى جفاف الهلام وفشل عملية الترحيل الكهربائي.

11 - يوضع الغطاء lid على غرفة الترحيل الكهربائي، ثم يوضع القطبين الكهربائيين بحيث يهاجر الـ DNA نحو الأنود (القطب الأحمر). وإذا وصلت الأقطاب بشكل صحيح، فلا بد من تولد 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.

12 - بعد انتهاء الترحيل الكهربائي، يطفئ التيار الكهربائي، وتزال الأقطاب الكهربائية والغطاء من غرفة الترحيل الكهربائي. يرفع وعاء صب الهلام ويوضع في وعاء التصنيع ببروميد الاثيديوم. باستخدام جهاز UV transilluminator، يتم مشاهدة عينات الـ DNA وهي مصبوغة بصبغة بروميد الاثيديوم، باستخدام طول موجي 300-360 nm.

