المختبر العاشر :الترحيل الكهربائي بواسطة هلام الأگاروز

يعرف الترحيل الكهربائي بأنه حركة الأيونات والجزيئات الكبيرة المشحونة كالـ (DNA, RNA, proteins) خلال وسط معين (هلام الأگاروز أو هلام متعدد الأكريلامايد) 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 200 – bp 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.

الترحيل الكهربائي بواسطة هلام 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.

العوامل المؤثرة على هجرة الدنا خلال هلام الأگاروز

1. الوزن الجزيئي للدنا: يعتمد جريان جزيئات الدنا على أوزانها الجزيئية، فجزيئات الدنا قد تكون خطية (مفردة أو مزدوجة) أو على شكل حلزون وهي بذلك تختلف في البنية والوزن الجزيئي. تهاجر جزيئات الدنا بسرعة تتناسب تناسباً عكسياً مع لوغارتم 10 لوزنها الجزيئي.
2. تركيز الأگاروز: تختلف سرعة رحيل الجزيئات المتشابهة بتغير تركيز الأگاروز المستعمل لعملية الفصل.
3. الشكل البنائي للدنا: تختلف أشكال الدنا البنائية في سرعة جريانها في هلام الأگاروز. الشكل الدائري المغلق والشكل الدائري المفتوح والشكل المستقيم ذوات الأوزان الجزيئية المتشابهة تهاجر في تركيز معين من هلام الأگاروز بسرع مختلفة.
4. كمية التيار الكهربائي: تتناسب سرعة جريان جزيئات الدنا الخطية مع كمية الفولتية المستعملة للترحيل.

Agarose Gel Electrophoresis Instruments

1. Loading buffer
2. Red safe solution
3. Electrophoresis-grade agarose
4. Horizontal gel electrophoresis apparatus
5. Gel casting platform
6. Gel combs (slot formers)
7. DC power supply
8. Microwave Oven

- صبغة الترحيل هي عبارة عن محلول يتكون من السكروز أو الگليسرول حاوي على صبغة، ووظيفة هذه الصبغة هي جعل عملية الترحيل الكهربائي مرئية يمكن تتبعها من خلال النظر إلى وعاء الترحيل، أما السكروز أو الگليسرول

نعمل على زيادة كثافة العينة عند وضعها في حفرة الهلام وبالتالي نضمن عدم طفو العينة للأعلى وإستقرارها في أسفل الحفرة.

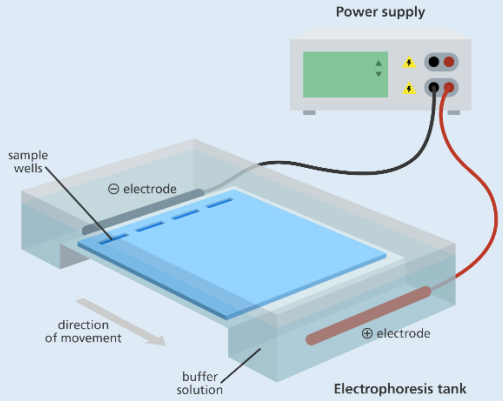
 لتحضير محلول SB 10X يوزن (4) غرام من مادة NaOH و (20) غرام من الـ Boric acid، توضع سوياً في بيكر سعة واحد لتر على درجة حرارة خفيفة في (800) مل من الماء المقطر ثم تعدل قيمة pH المحلول إلى (8,5) ويكمل الحجم إلى (1000) مل.

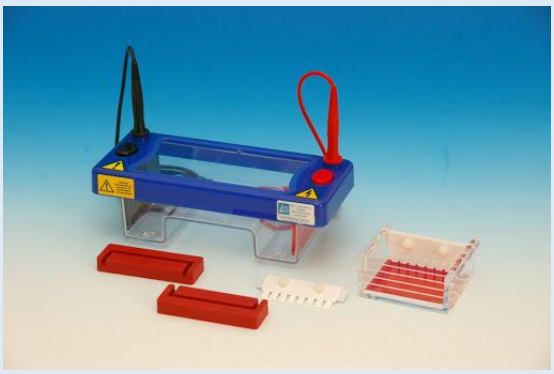
طريقة العمل:

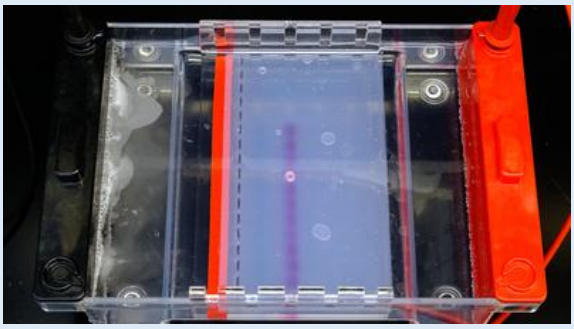
1. لترحيل الدنا المجيني والكشف عنه تم تحضير هلام الأگاروز بتركيز 1% أما لتفاعلات الـ PCR فقد تم تحضيره بتركيز مناسب لحجم قطعة الدنا للجينات المدروسة بتركيز 2%، (كما في الجدول أدناه).
2. يتم إذابة الأگاروز في محلول الـ SB باستخدام جهاز Microwave حتى الغليان ثم يترك ليبرد إلى درجة حرارة 50–60 ْم.
3. يتم إضافة صبغة الـ Red Save بمقدار (3) مايكروليتر لمحلول الأگاروز وتمزج بشكل جيد.
4. يتم تركيب حوض الهلام ثم وضع المشط comb لصنع الحفر wells التي تستخدم لتحميل عينات الـ DNA ثم تم صب الأگاروز بعناية في الحوض ويترك إلى أن يتصلب الهلام.
5. يوضع الحوض مع الهلام في الحوض المملوء بدارئ SB 10X حيث يغطى هذا الدارئ سطح الهلام.
6. يتم مزج (3) مايكروليتر من دارئ التحميل Loading buffer مع (5) مايكروليتر من نماذج الـ DNA، أما ناتج الـ PCR فيرحل بشكل مباشر وتُحمل بعناية في الحفر ومن ثم تشغيل مجهز القدرة .Power supply
7. يتم فحص الهلام المصبغ بواسطة جهاز الاشعة فوق البنفسجية .U.V

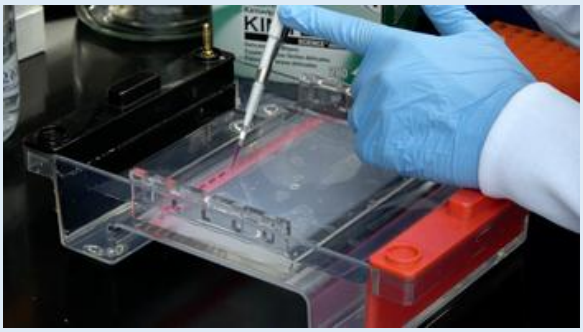
جدول تركيز الأگاروز المستخدم وحجم محلول الترحيل الكهربائي

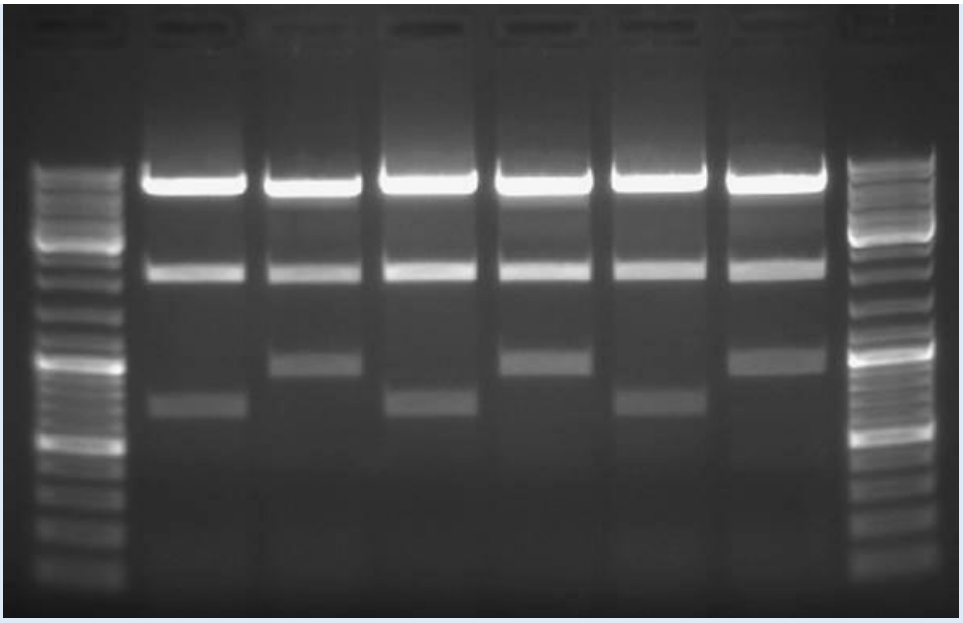
NO	Size of tray	The concentration	Amount of agarose	SB volume
.1	10×10	1%	0.5g	50 ml
		2%	0.7g	50 ml
.2	10×15	1%	0.8g	80 ml
		2%	1.6g	80 ml

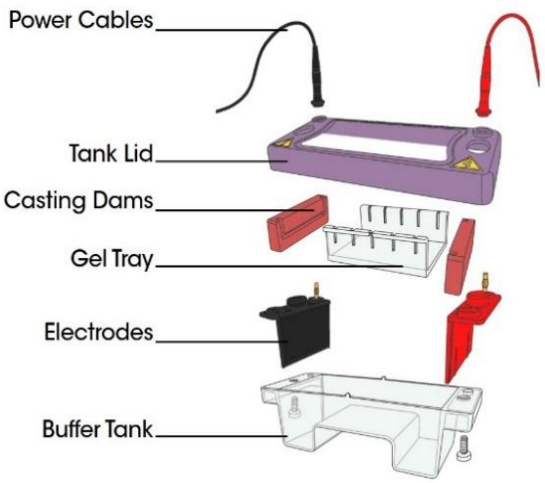











Power Cables
Tank Lid
Casting Dams
Gel Tray
Electrodes
Buffer Tank