

بسم الله الرحمن الرحيم

٢٥١ حلق

الأحياء الجزيئية

الفصل الكهربائي لعينة DNA
بواسطة Gel Electrophoresis

الفصل الكهربائي بواسطة جل الأجاروز

♣ الفصل الكهربائي بواسطة الجل من أكثر التقنيات استعمالاً لتحليل الأحماض النووية والبروتين.

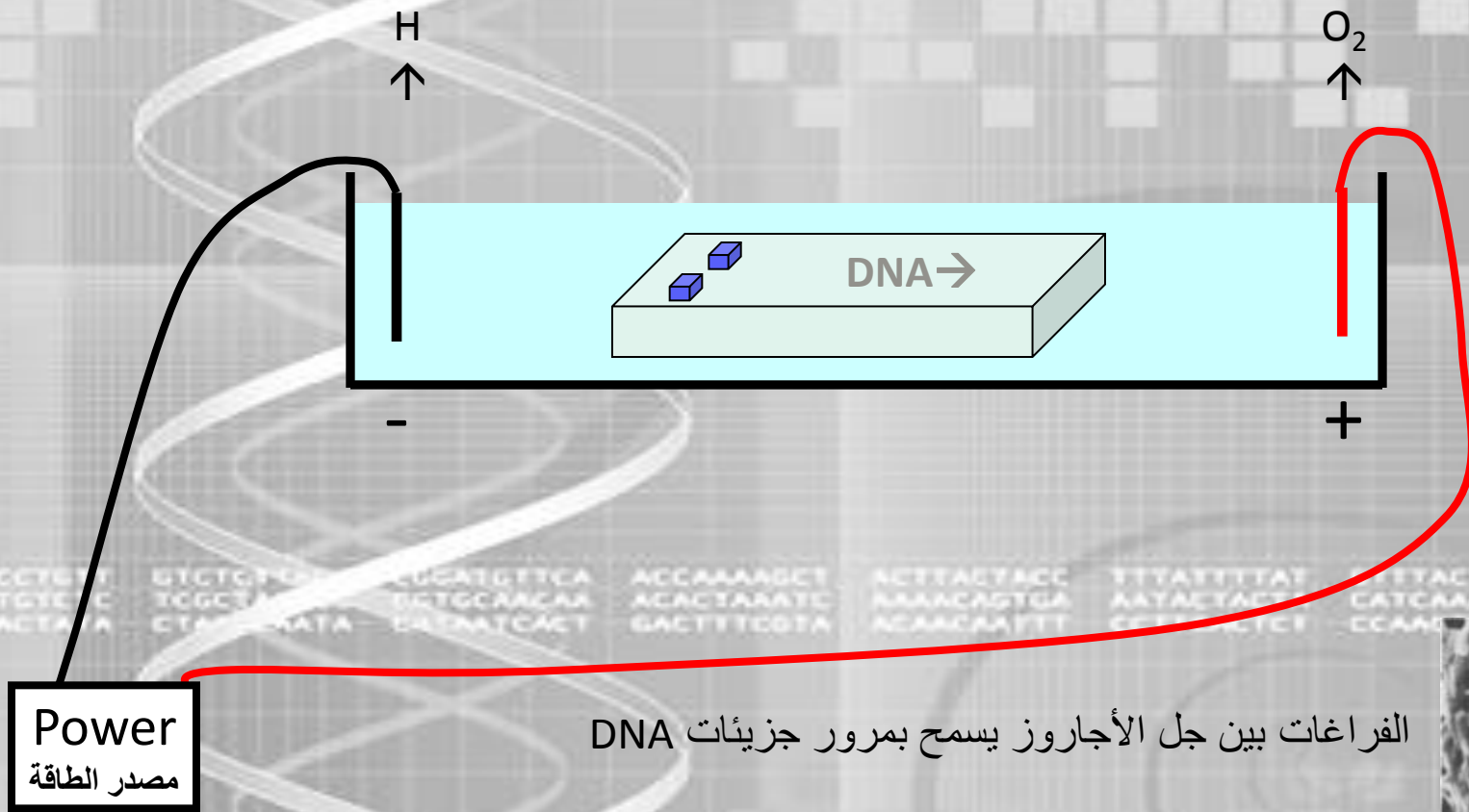
♣ جل الأجاروز يستعمل غالباً لتحضير وتحليل الحمض النووي DNA.

♣ الفصل الكهربائي بواسطة الجل يعمل على فصل الجزيئات على الحركة داخل الجل تحت تأثير المجال الكهربائي.

الحمض النووي DNA يحمل شحنة سالبة.

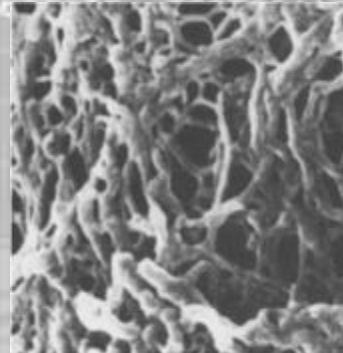
عندما نضع الحمض النووي DNA في مجال كهربائي فإنه سوف يهاجر أو (يرحل) للقطب الموجب "المصعد".

جل الأجاروز يستعمل لفصل وتحرك جزيئات DNA اعتماداً على حجم الحمض النووي DNA



الفراغات بين جل الأجاروز يسمح بمرور جزيئات DNA

صورة من المجهر الإلكتروني الماسح لجل
الأجاروز (1×1 μm) →

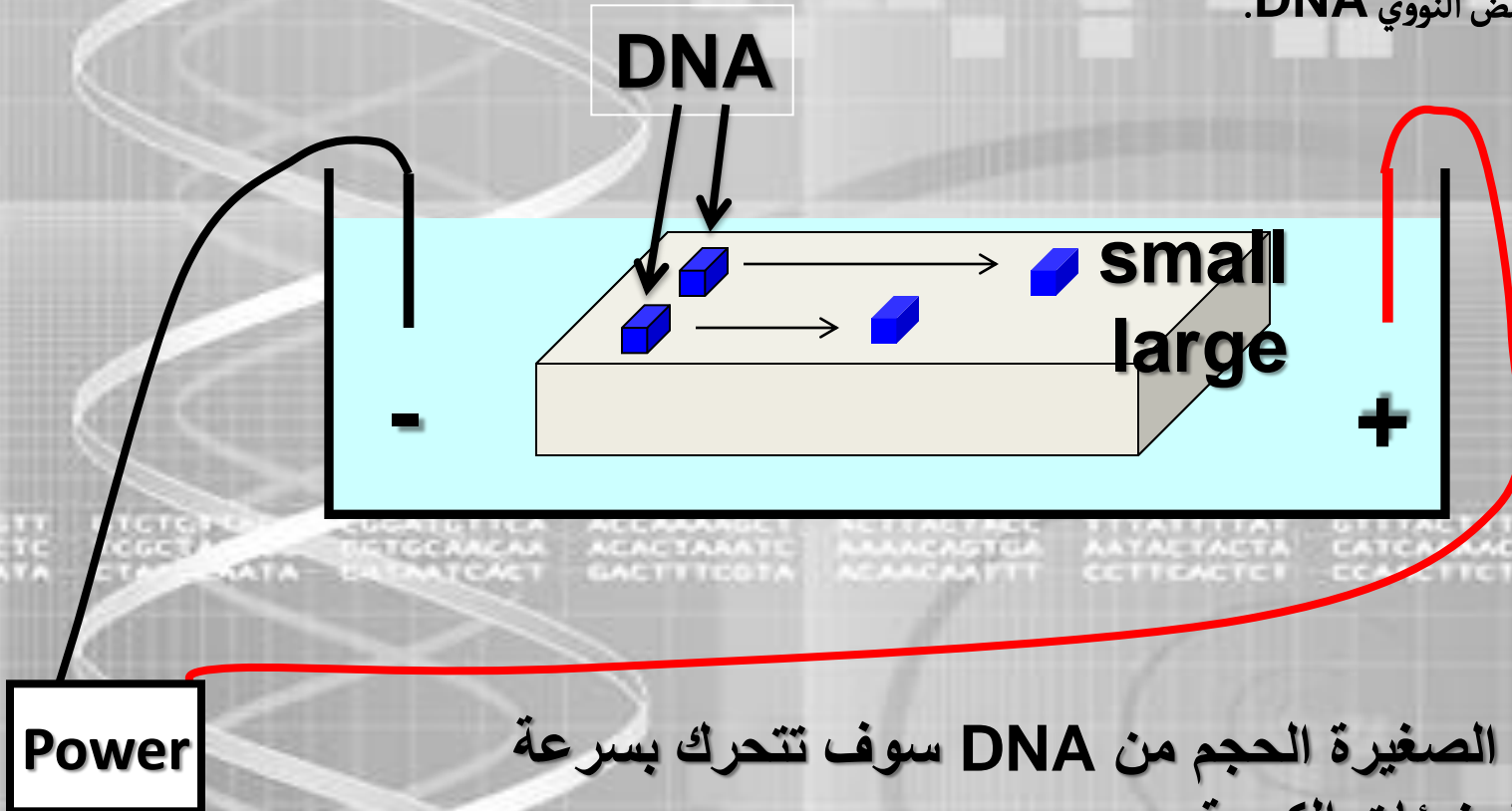


CGTACCTCC AAGCCGTGTT GTCTCTTACC CGGATGTTCA ACCA
TACCTCC GACCTCTC TCGCTAGCG CGTGCAACAA ACAC
ATCTCTTATCACT

س: كيف سيرحل DNA بسرعة ???

اعتماداً على:-

- ١- قوة المجال الكهربائي.
- ٢- المحلول المنظم.
- ٣- كثافة جل الأجاروز.
- ٤- حجم الحمض النووي DNA.



الجزيئات الصغيرة الحجم من DNA سوف تتحرك بسرعة أكثر من الجزيئات الكبيرة.

أجزاء جهاز الفصل (الرحلان) الكهربائي

Power supply →
مصدر الطاقة

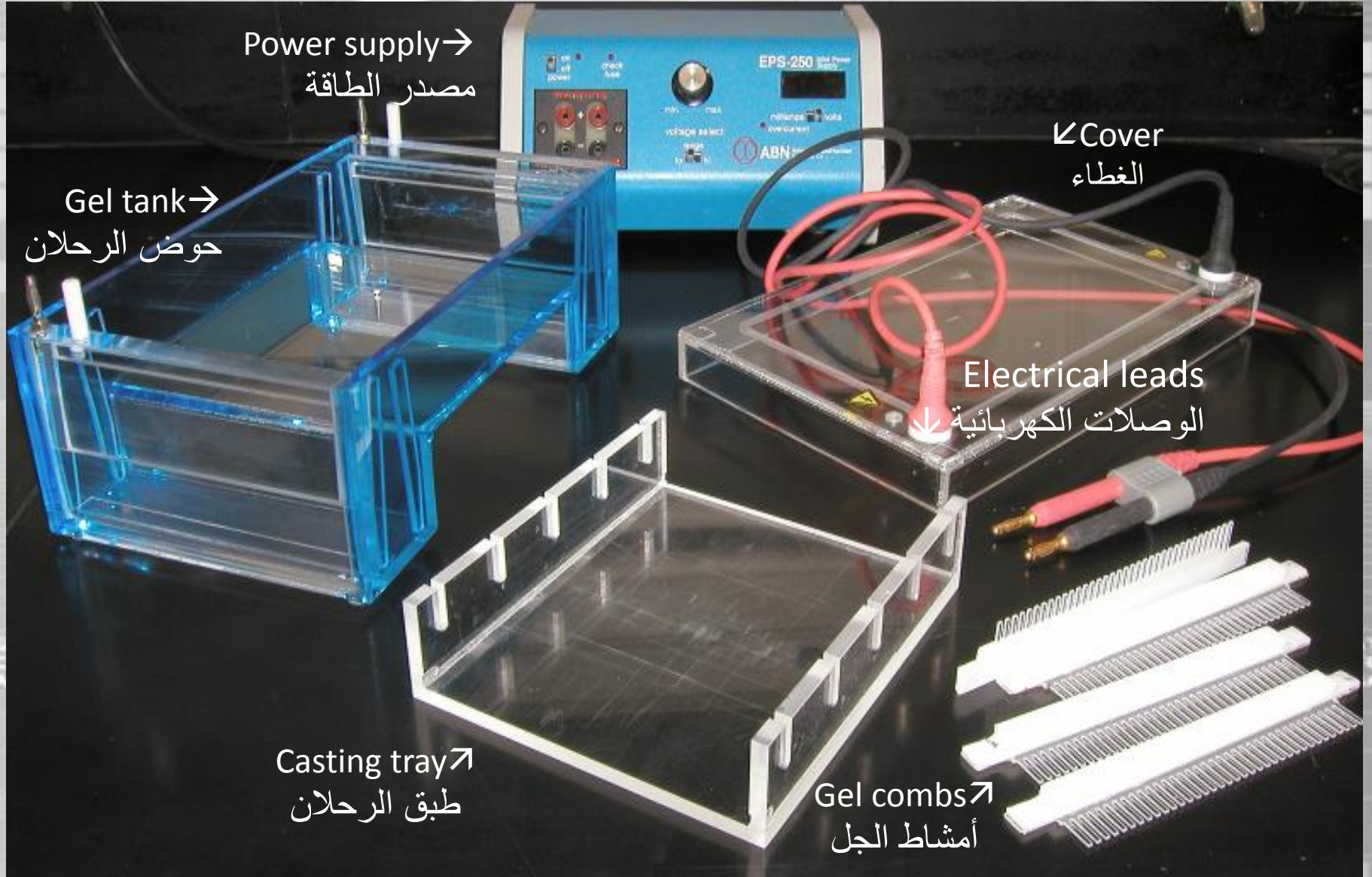
Gel tank →
حوض الرحلان

↙ Cover
الغطاء

Electrical leads
الوصلات الكهربائية

Casting tray ↗
طبق الرحلان

Gel combs ↗
أمشاط الجل



CGTACCTCC AAGCCCTGTT
TACTCTTCC CACTGCTCTC
ATTCTTACC ATTAATAAT/

GTCTCTTACC
TCGCTACTGC
CTAGCAATA

CGGATGTTCA
CGTGCAACAA
CTTATCACT

ACCA
ACAC
GAG

تحضير العينة

AGCCCTGTT
ACTTGTCTC
TATACATA

GTCTCTTACC
TCGCTACTGC
CTAGCAATA

CGGATGTTCA
CGTGCAACAA
CTTATCACT

ACCAAAAGCT
ACACTAATC
GACTTTCGTA

ACTTACTACC
AAACAGTGA
ACAACAAFTT

TTTATTTTAT
AAYACTACTA
CCTTCACTCT

GTTFACFTTT
CATCAAACG
CCAACFTTCT

TATAGATTGT
CATATTCCCT
TGCTCGAATC

DNA Sample

- عينة بها بعض الخلايا المكتسبة
- غمر الخلايا في محلول مغذي على الطبق ، وتترك لتنمو وتتضاعف .
- الخلايا المتجمعة تجمد للاستعمال المستقبلي .
- الـ DNA يكون مكتسب من هذه الخلايا .



Restriction Enzyme



• نستعمل

restriction enzyme

لتقطيع الـ DNA إلى أجزاء .

ACCAAAGCT
ACACTAATC
GACTTTCGT

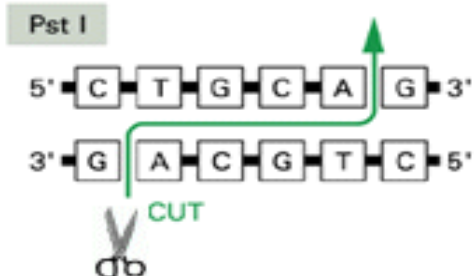
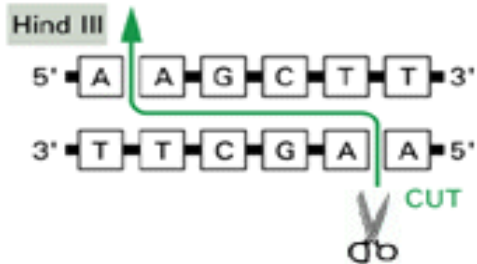
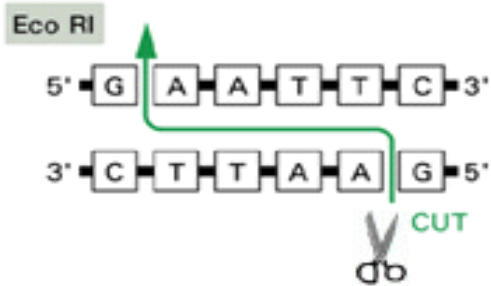
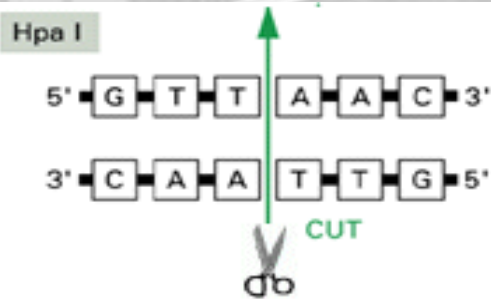
ACTTACTAC
AAACAGTGA
ACAACTTT

TTTATTTTAT
AAYACTACTA
CCTTCACTCT

GTTTACTTTT
CATCAAACG
CCAACCTCTC

TATAGATTGT
CATATTCCCT
TGCTCGAATC

Restriction Enzyme



تسلسل مواقع القطع Recognition Sites لبعض الإنزيمات القاطعة

المقطع الذي تُميزة

المصدر

الإنزيم القاطع

GGATCC	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	BamHI
GAATTC	<i>Escherichia coli</i> RY13	EcoRI
GGCC	<i>Haemophilus aegyptius</i>	HaeIII
AAGCTT	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	HindIII
GTTAAC	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	HpaI
CCGG	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	HpaII
GATC	<i>Moraxella bovis</i>	MboI
GCGGCCGC	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	NotI
GGCCNNNNGGCC	<i>Streptomyces fimbriatus</i>	SfiI
TCGA	<i>Thermus aquaticus</i>	TaqI

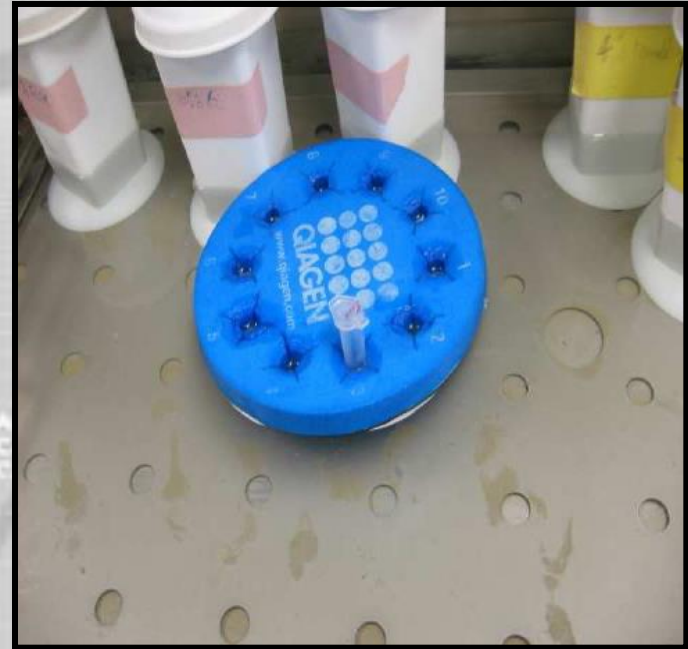
Apply Enzyme



• عينة الـ DNA وانزيم القطع
توضع في الأنبوب .

• تعريض الأنبوبة للهز
والدوران حتى يخلط الـ DNA
الانزيم.

Water Bath



AGCCCTGTT
ACTTGTCTC
TATACATA

GTCTGTC
TCGCTA
CTAATA

CGGATGTTCA
GTCGACAA
CATNATCACT

ACCAAAGCT
ACACTAATC
GACTTTCOTA

ACTTA
AAAC
ACAA

TAGATTGT
TATTCCCT
CTCGAATC

Water Bath

• وضع الأنبوبة في حمام مائي عند $37^{\circ}C$.

• تترك لمدة ٣٠ دقيقة .

• وهذا هو الوقت الذي يحتاجه Hind III ليأخذ مكانه على الـ DNA .

Preparing the Gel



• في هذه الأثناء يحضر
الجل ، وذلك باستخدام
مسحوق الـ Agarose.

• خلط المسحوق مع الماء في دورق .



Preparing the Gel



• يسخن الدورق في
المايكرويف عند الحاجة
حتى يذوب المسحوق
بالكامل في الماء .

• يصبح المحلول صافي

Preparing the Gel

CCA
CAC
AG

- صب الجل السائل في الصندوق الداخلي .

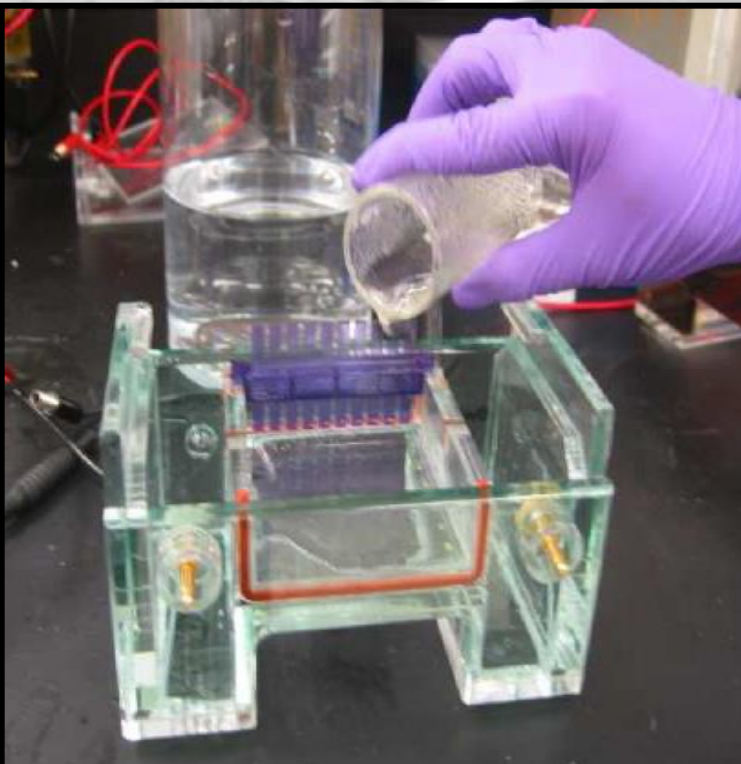
- توضع قطعة المشط في الصندوق الداخلي .

- يترك الهلام السائل حتى يبرد ويتصلب

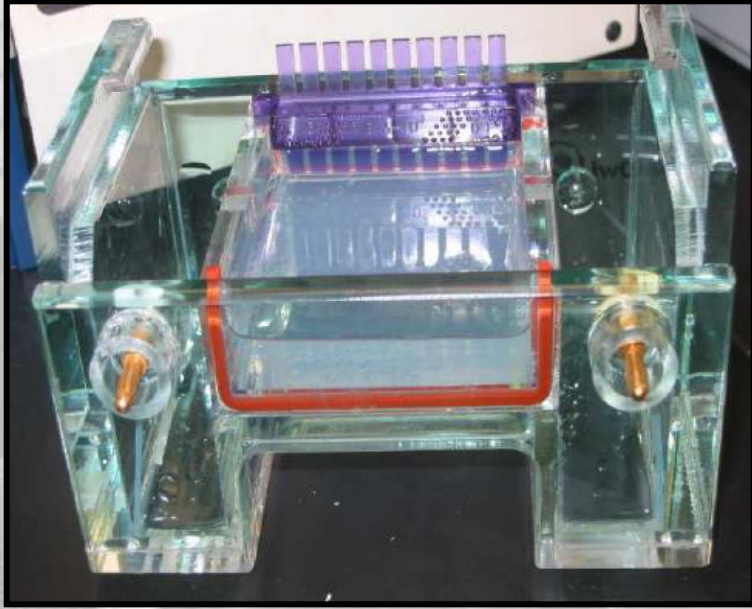
- (ويمكن استخدام الثلاجة) .

- عندما يتصلب الجل، هذا المشط يصنع الآبار التي يوضع فيها DNA

.

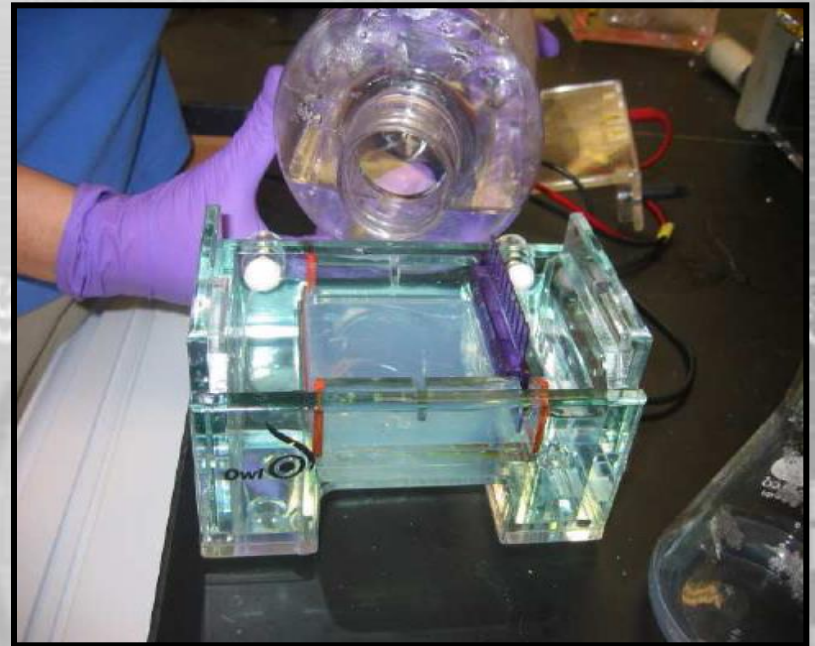


Gel Ready

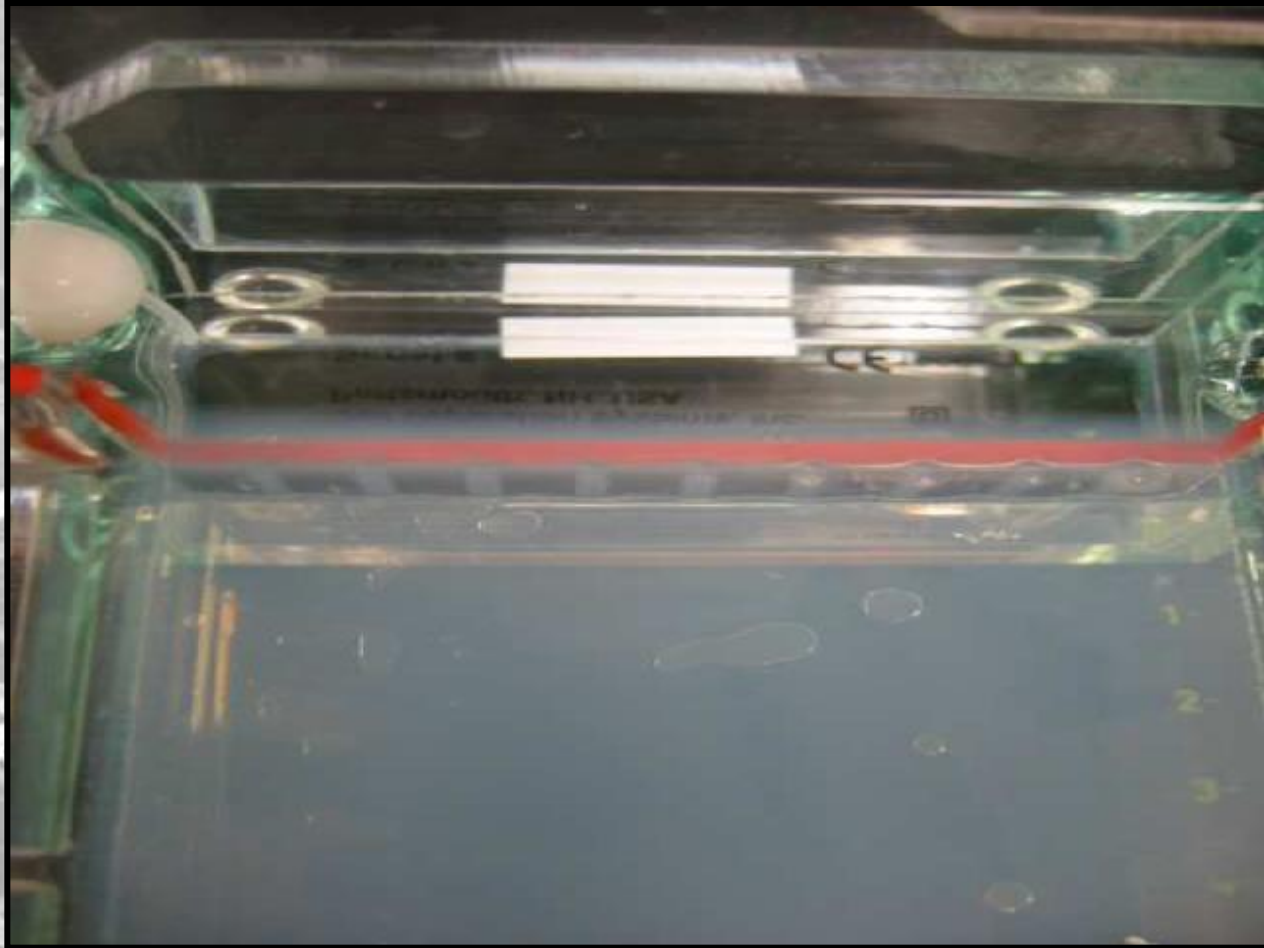


• الجل أصبح جاهز.

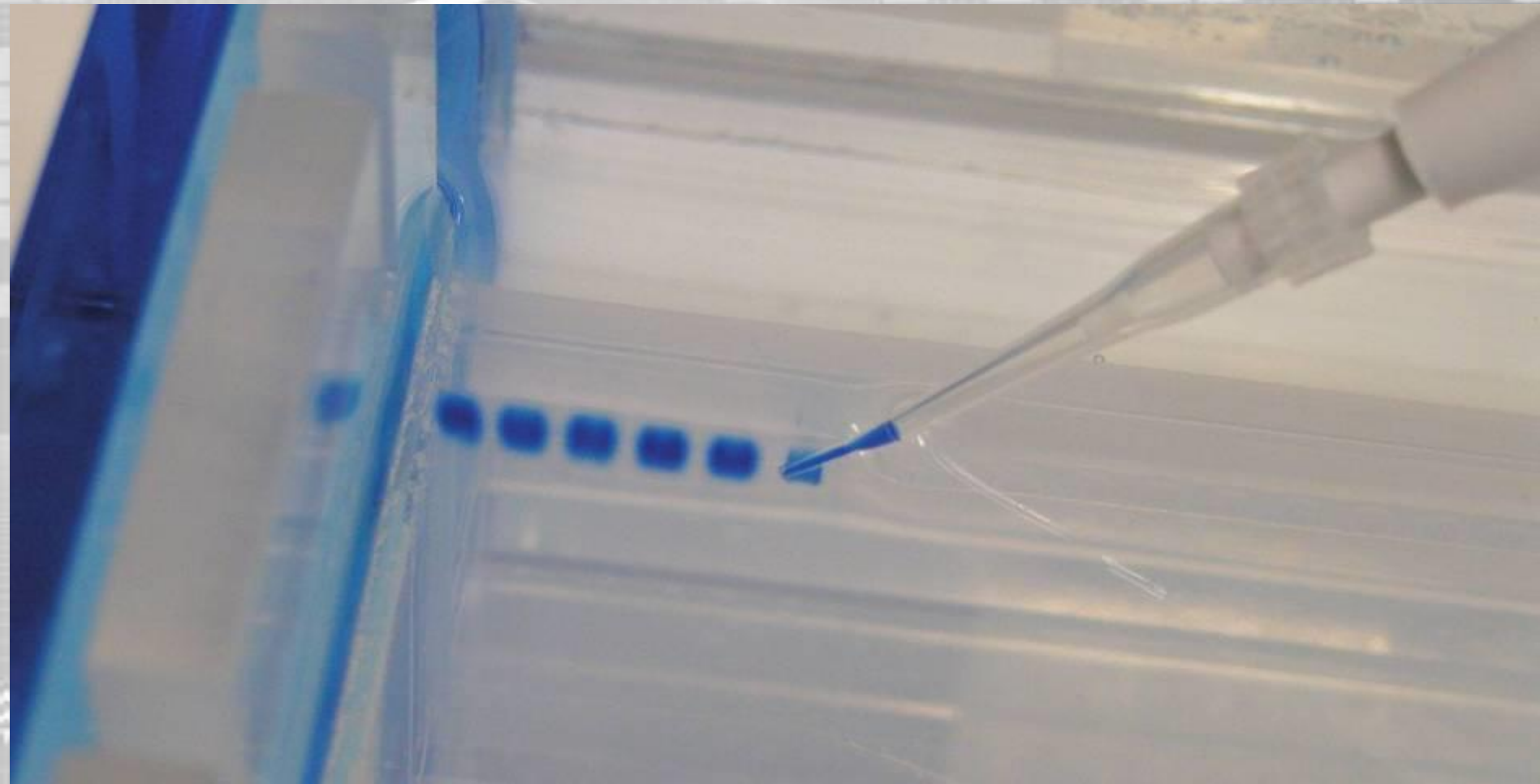
• يصب المحلول النظم في الحاوية.



• يزال المشط .

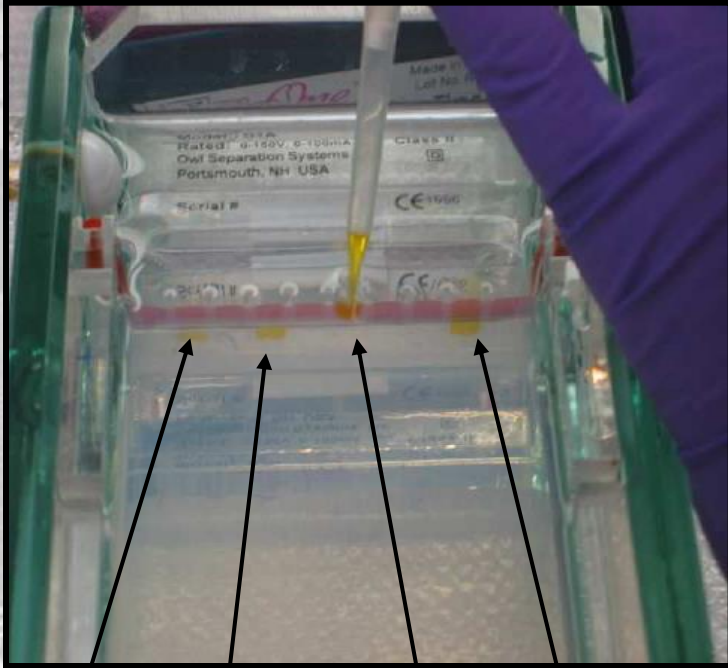


• تحميل العينة على الجل



- عينة DNA في الغالب تكون شفافة، لذلك نمزج معها صبغة (3مايكروليتر + 5 مايكروليتر من العينة).
- بحرص شديد أنزل العينة بالماصة الإلكترونية داخل فتحات الجل.

Putting DNA on the Gel



• يخلط الـ DNA مع محلول ملون (مشع) حتى يرى تحت الـ U.V .

• تدخل عينات الـ DNA إلى الآبار .

• وضع محلول يحتوي على قطع من الـ DNA

(called ladder) تستعمل للمقارنة .

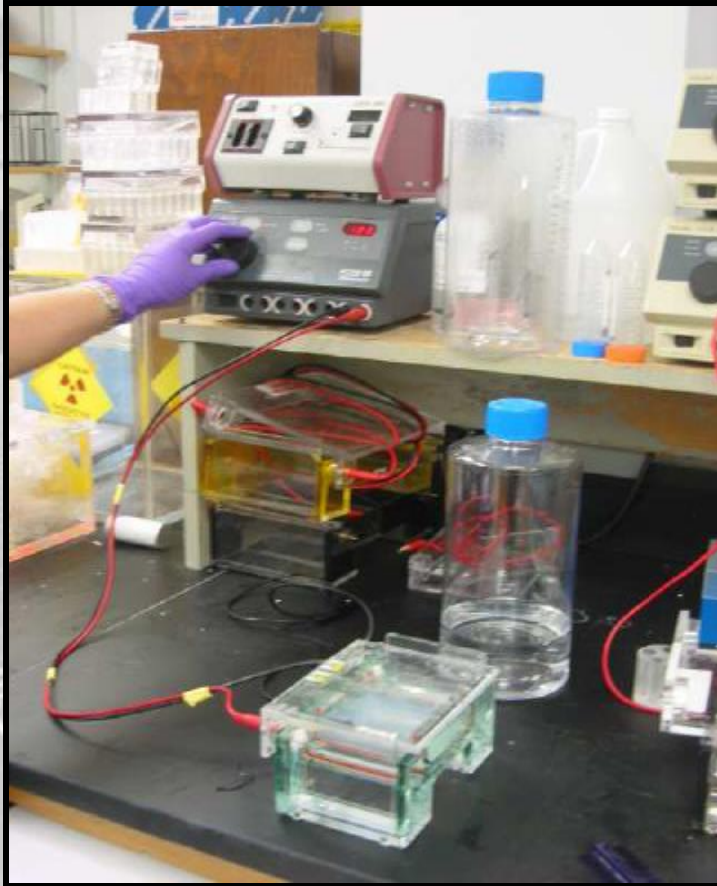
ladder 1

ladder 2

original uncut DNA

DNA cut by Hind III

Run the Gel



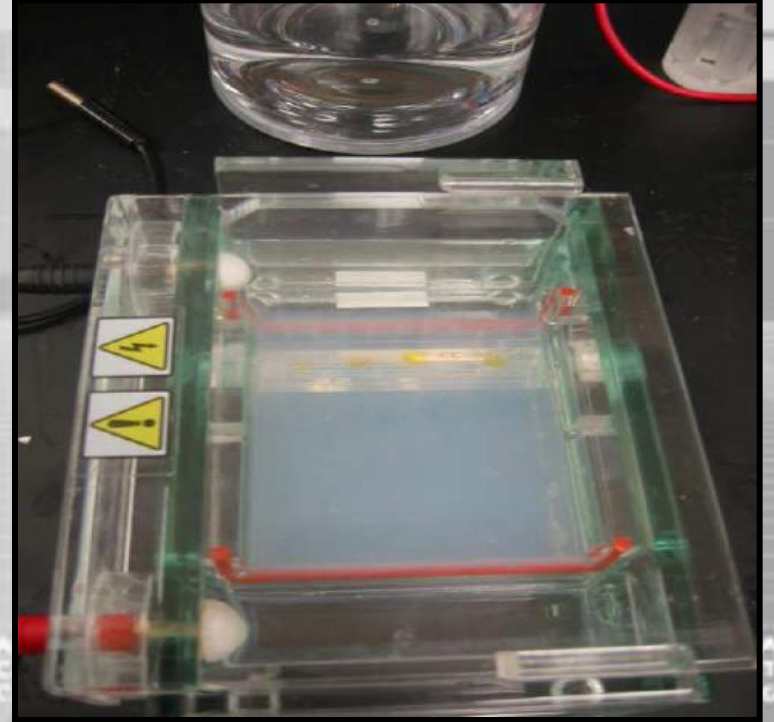
• وصل التيار الكهربائي .

• بما أن الـ DNA ذو شحنة سالبة فهو يتحرك إلى القطب الموجب من الحاوية .

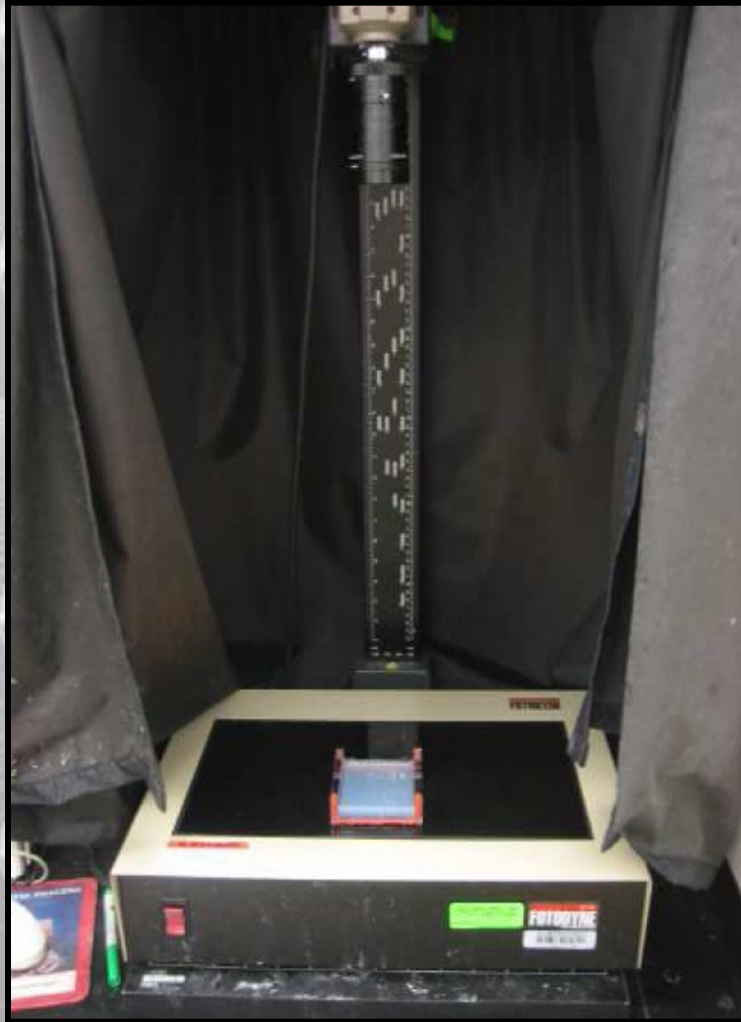
• والأجزاء الصغيرة تتحرك أسرع .

DNA Fragments Move

• يوضح لنا الصبغة
الملونة تحرك الـ DNA
في الجل .



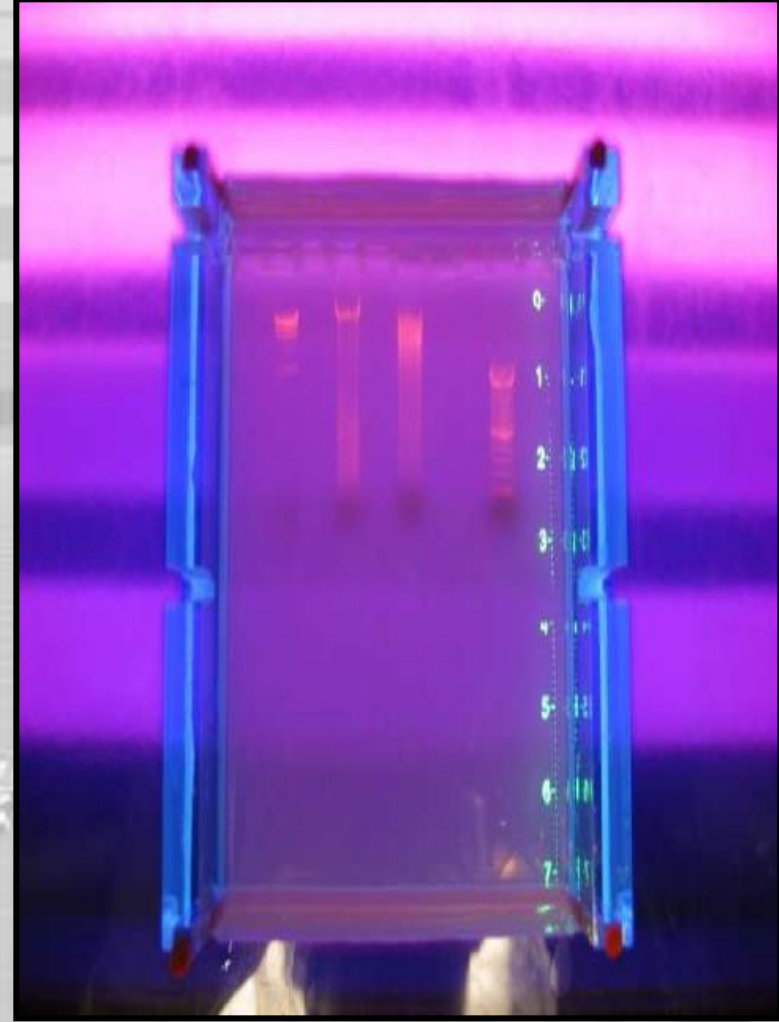
Viewing



• مشاهدة الجل تحت
الـ U.V .

Viewing

- عينة الـ DNA الأصلي غير المقطع
كونت قطعة كبيرة في البداية
(one big fragment).
- عينات الـ DNA مع انزيم القطع
كونت العديد من الأجزاء ، أي أن
القطع ذات أحجام مختلفة .
- استخدام السلالم للمقارنة لأنها
تحتوي على الأجزاء المعينة المطلوبة
تترك عملية التحرك في الجل لوقت
طويل حتى نضمن تفرق الـ DNA .



الجل بعد عملية التصوير

CGTACCGCTEC AAGCCGCTGTACC CGGATGTGTTCA ACCA
 TACTCTTCCG CAAGTGTGTGC CGTGCAACAA ACAC
 ATTCTTCTAGTAT7 CTACGCAATCAAT GAG

DNA ladder

السلم المدرج



1

2

3

4

5

6

7

8

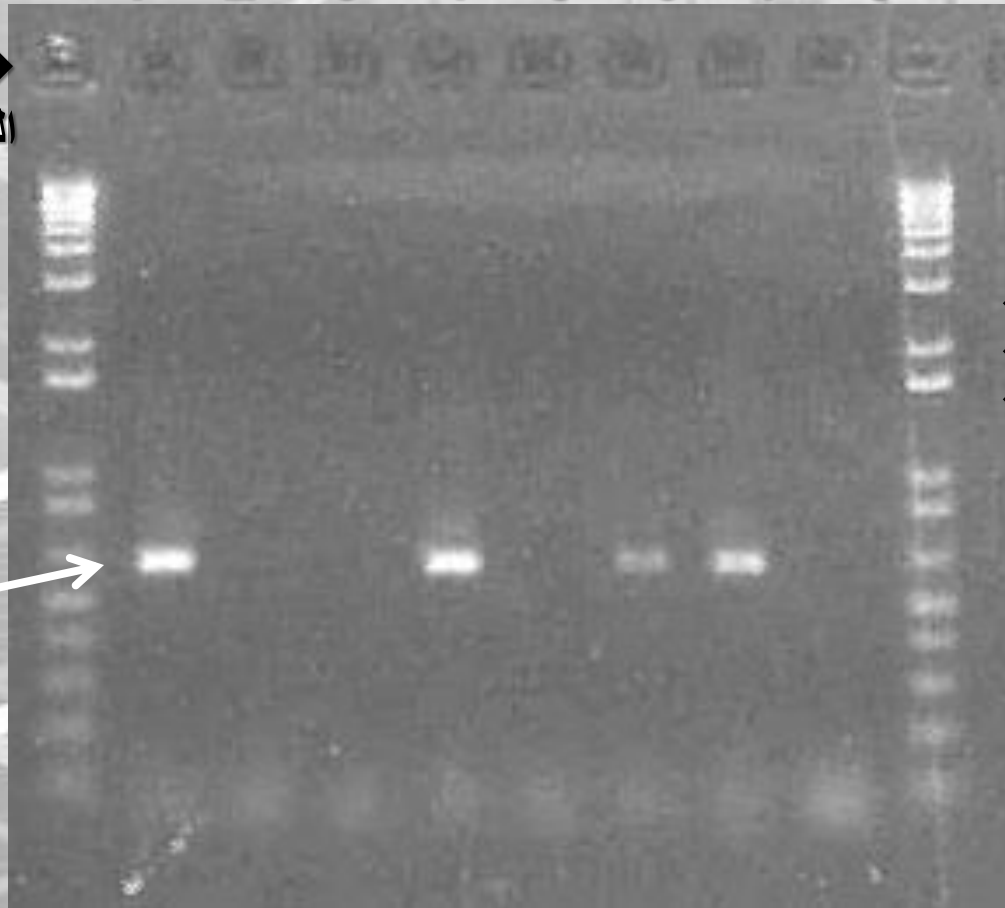
DNA ladder

السلم المدرج



Wells →

الفتحات



5,000 bp ←

← 2,000

← 1,650

← 1,000

← 850

← 650

← 500

← 400

← 300

← 200

← 100

DNA



+

-

-

+

-

+

+

-

العينات رقم: ١، ٤، ٦ و ٧ تظهر بها الحمض النووي DNA

CGTACCTCC AAGCCCTGTT GTCTCTTACC CGGATGTTCA ACCA
TACTCTTCC CACTCTCTC TCGCTACTGC CGTGCAACAA ACAC
ATTCTTACC ATCTACTAT/ CTAGCAATA ETTATCAAT GAG

Good Luck

أ. شروق الشهراني

AGCCCTGTT GTCCTTCC CCGATGTTCA ACCAAAAGCT ACTTACTACC TTTATTTTAT GTTACTTTT TATAGATTGT
ACTTGTCTC TCGCTTCC CCGTGCAACAA ACACIAAATC AAACAGTGA AAYACTACTA CATCAAACG CATATTCCCT
TATACATA CTATCAATA CATNATCACT GACTTTGATA ACAACAAFTT CCTTCACCTT CCAACTTCTC TGCTCGAATC