بسم الله الرحمن الرحيم

٢٥١حدق

الأحياء الجزيئية

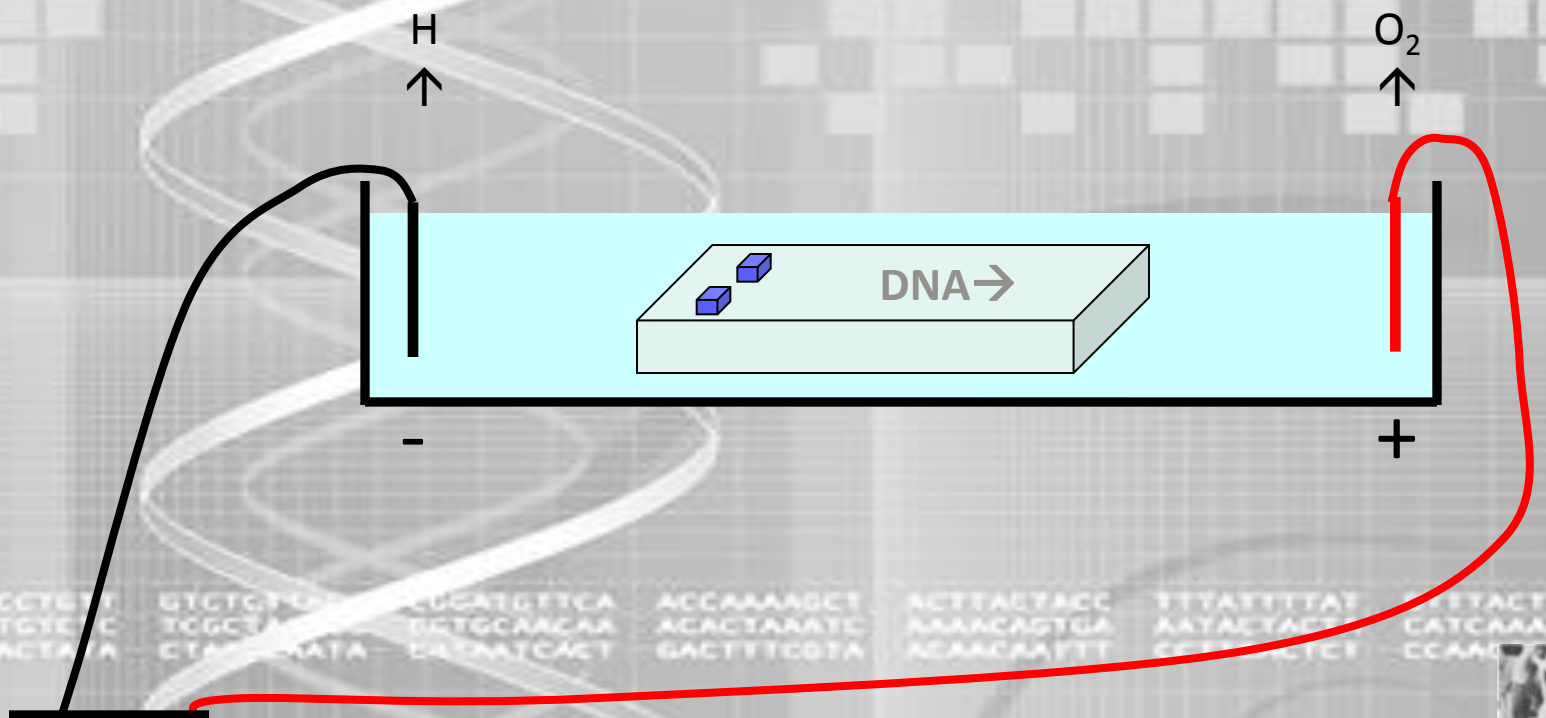
الفصل الكهربائي لعينة DNA

بواسطة Gel Electrophoresis

الفصل الكهربائي بواسطة جل الأجاروز

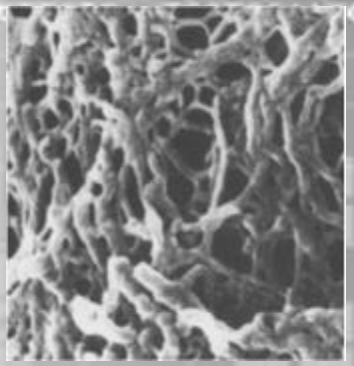
- الفصل الكهربائي بواسطة الجل من أكثر التقنيات استعمالاً لتحليل الأحماض النووية والبروتين.
- جل الأجاروز يستعمل غالباً لتحضير وتحليل الحمض النووي DNA.
- الفصل الكهربائي بواسطة الجل يعمل على فصل الجزيئات على الحركة داخل الجل تحت تأثير المجال الكهربائي.

- الحمض النووي DNA يحمل شحنة سالبة.
- عندما نضع الحمض النووي DNA في مجال كهربي فإنه سوف يهاجر أو(يرحل) للقطب الموجب"المصعد".
- جل الأجاروز يستعمل لفصل وتحرك جزيئات DNA إعتماداً على حجم الحمض النووي DNA



الفراغات بين جل الأجاروز يسمح بمرور جزيئات DNA

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



س: كيف سيرحل DNA بسرعة ؟؟؟

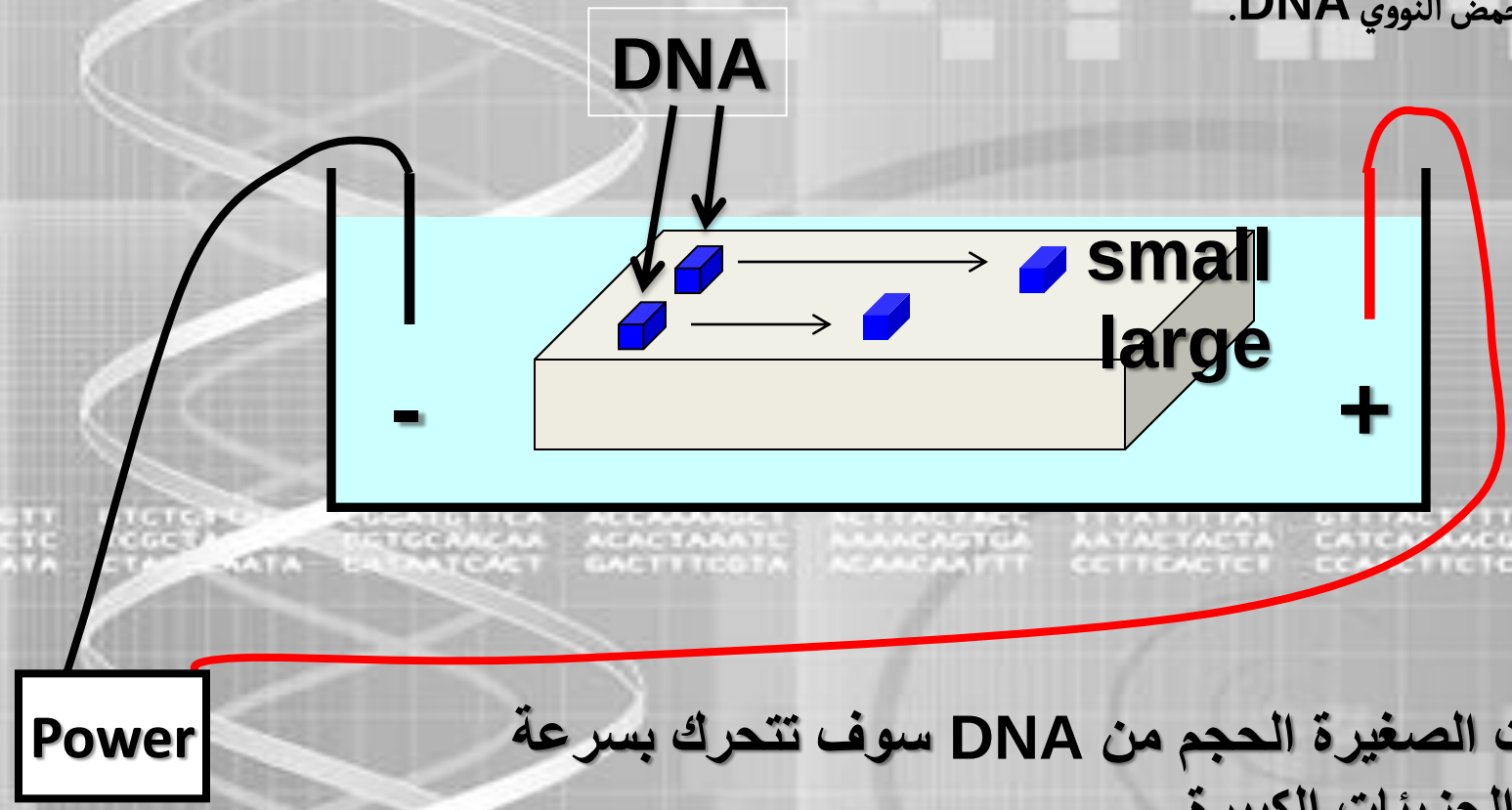
اعتماداً على:-

١- قوة المجال الكهربي.

٢- المحلول المنظم.

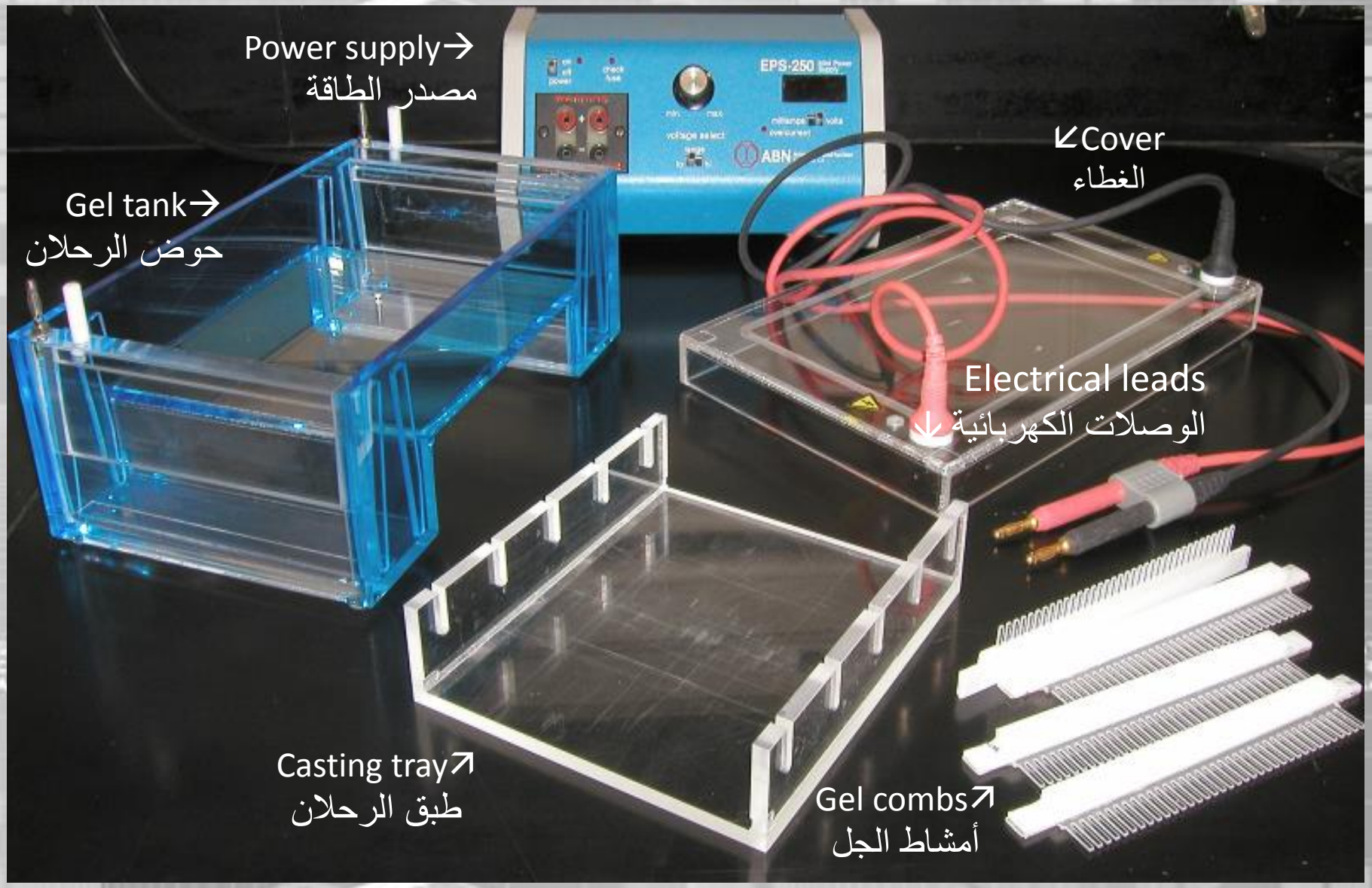
٣- كثافة جل الأجاروز.

٤- حجم الحمض النووي DNA.



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

أجزاء جهاز الفصل(الرحلان)الكهربائي



تحضير العينة

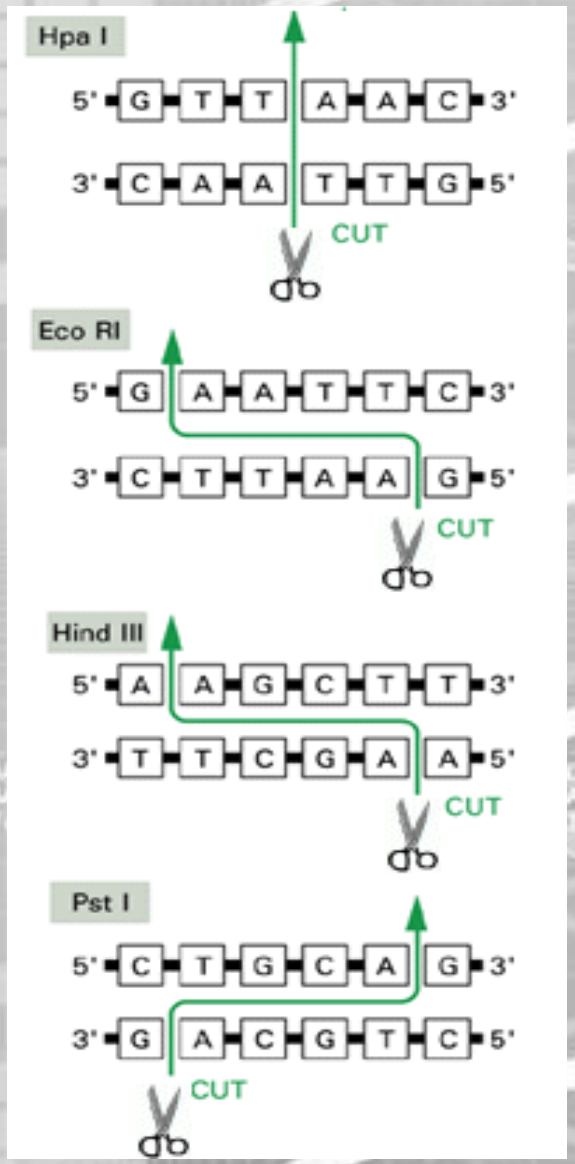
DNA Sample

- 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 .

Restriction Enzyme



تسلسل مواقع القطع Recognition Sites لبعض الإنزيمات القاطعة

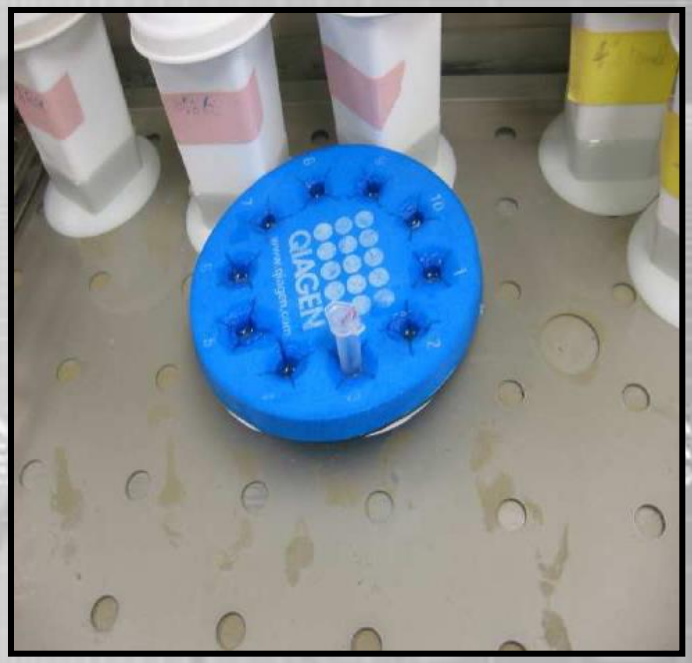
الإنزيم القاطع	المصدر	المقطع الذي تُميزة
BamHI	*Bacillus amyloliquefaciens* H	**GGATCC**
EcoRI	*Escherichia coli* RY13	**GAATTC**
HaeIII	*Haemophilus aegyptius*	**GGCC**
HindIII	*Haemophilus influenzae* Rd	**AAGCTT**
HpaI	*Haemophilus parainfluenzae*	**GTTAAC**
HpaII	*Haemophilus parainfluenzae*	**CCGG**
MboI	*Moraxella bovis*	**GATC**
NotI	*Nocardia otitidis-caviarum*	**GCGGCCGC**
SfiI	*Streptomyces fimbriatus*	**GGCCNNNNNGGCC**
TaqI	*Thermus aquaticus*	**TCGA**

Apply Enzyme

- عينة الـ DNA وانزيم القطع توضع في الأنبوب .

- تعريض الأنبوبة للهز والدوران حتى يخلط الـ DNA الأنزيم.

Water Bath



Water Bath

- وضع الأنبوبة في حمام مائي عند C 37° .
- تترك لمدة ٣٠ دقيقة .
- وهذا هو الوقت الذي يحتاجه Hind III ليأخذ مكانه على الـ DNA .

Preparing the Gel

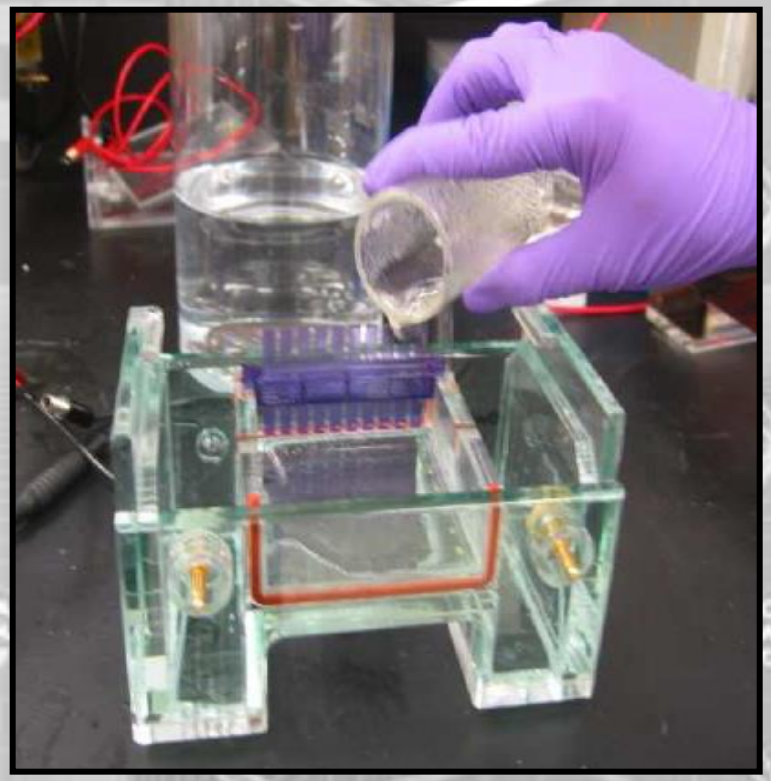
- في هذه الأثناء يحضر الجل ، وذلك باستخدام مسحوق الـ Agarose.

- خلط المسحوق مع الماء في دورق .

Preparing the Gel

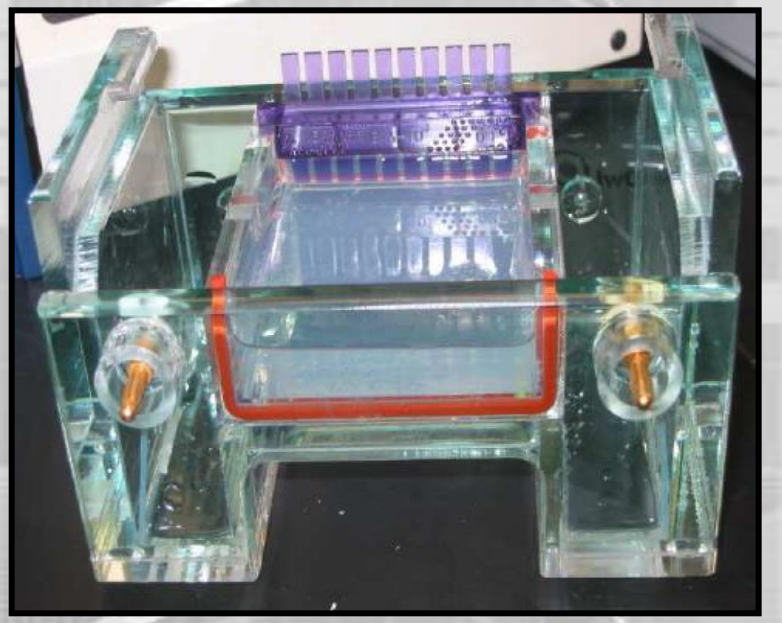
- يسخن الدورق في المايكرويف عند الحاجة حتى يذوب المسحوق بالكامل في الماء .
- يصبح المحلول صافي

Preparing the Gel

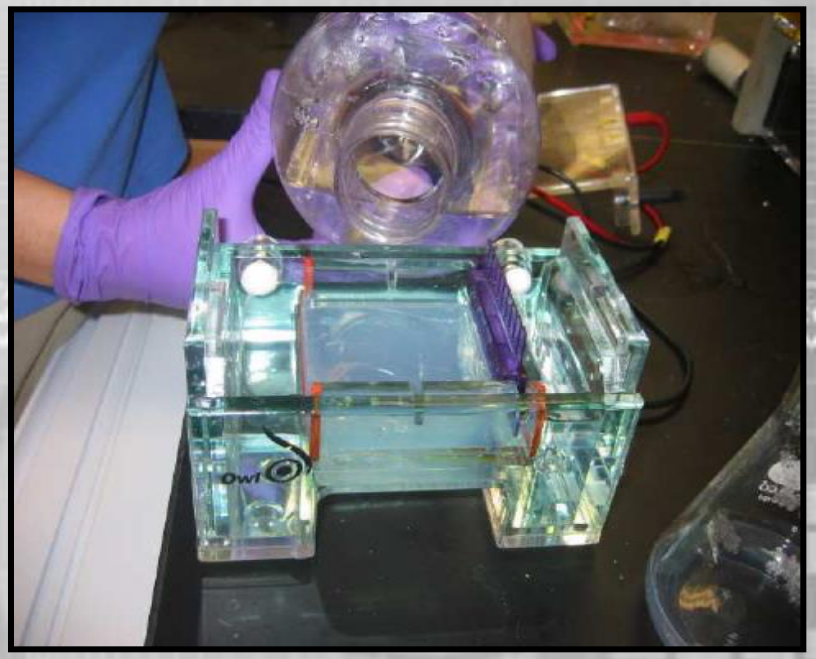


- صب الجل السائل في الصندوق الداخلي .
- توضع قطعة المشط في الصندوق الداخلي .
- يترك الهلام السائل حتى يبرد ويتصلب
(ويمكن استخدام الثلاجة) .
- عندما يتصلب الجل، هذا المشط يصنع الآبار التي يوضع فيها DNA .

Gel Ready

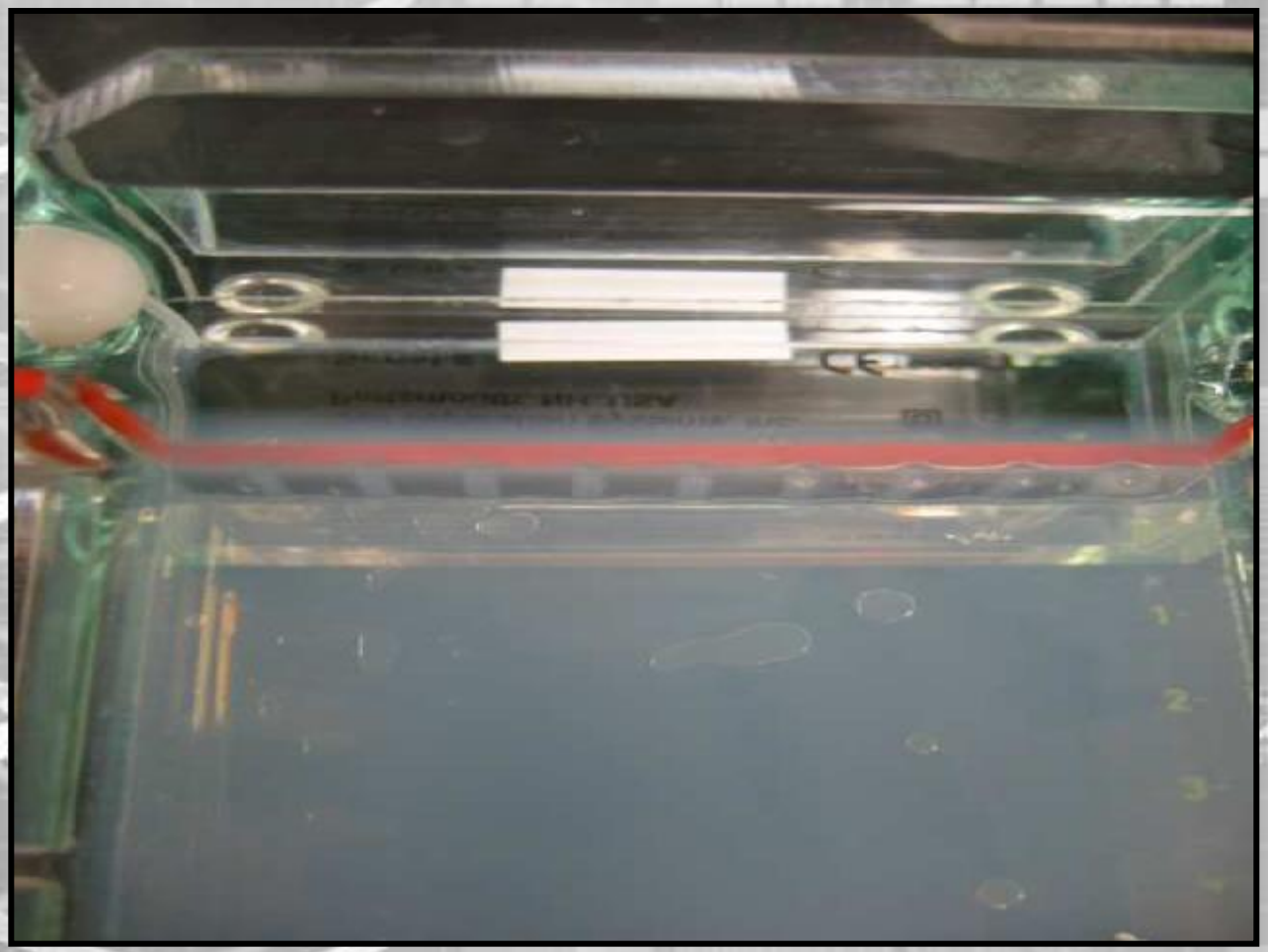


- الجل أصبح جاهز.

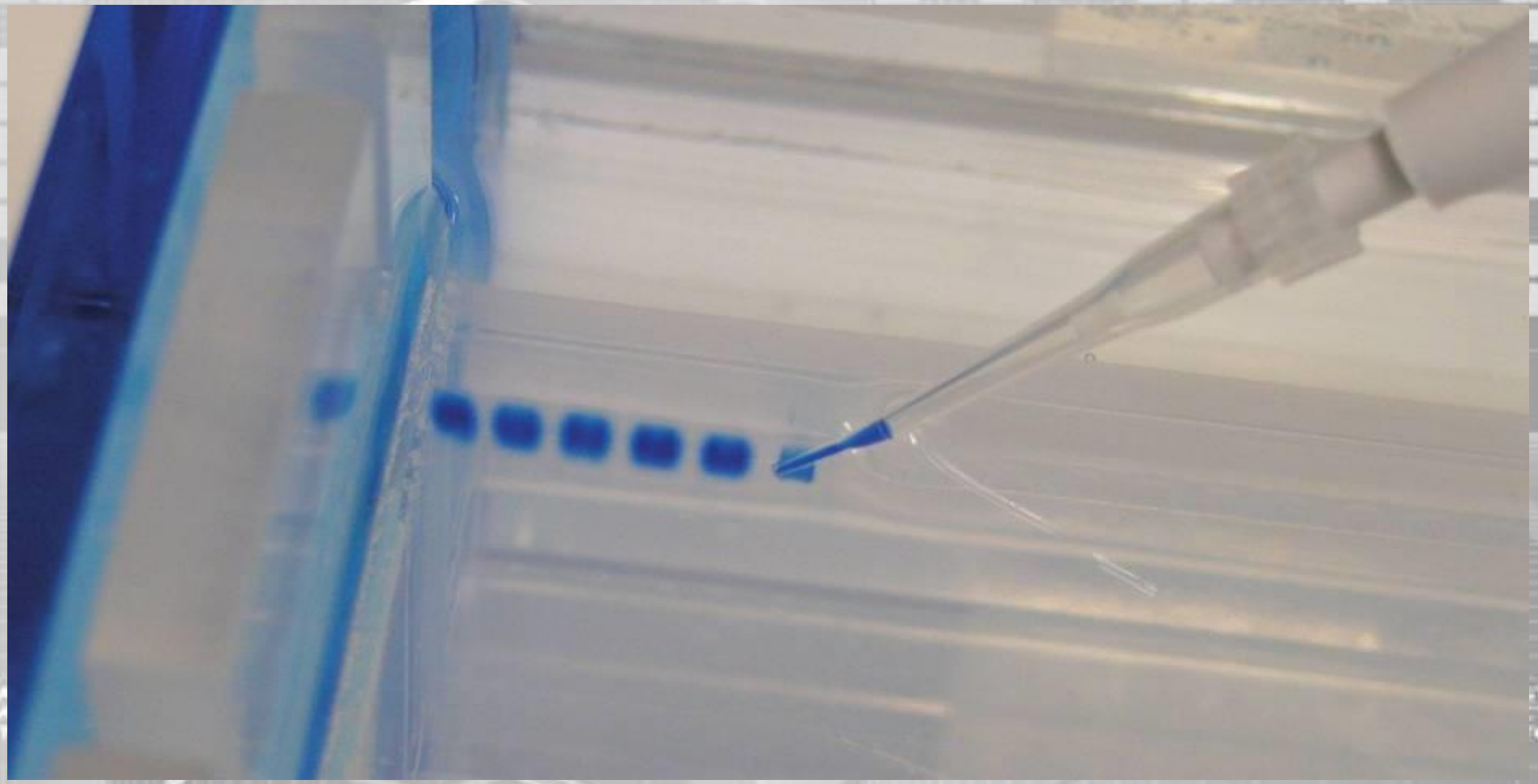


- يصب المحلول النظم في الحاوية .

- يزال المشط.

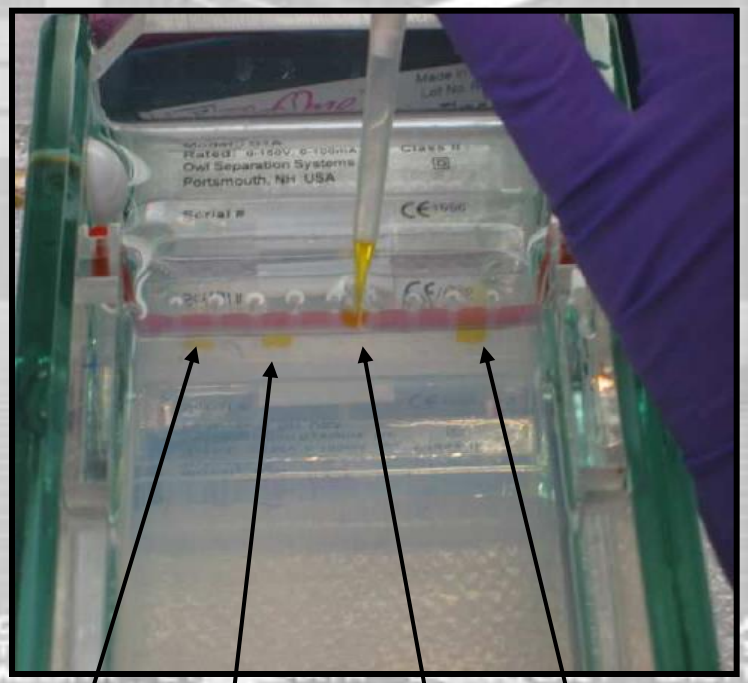


• تحميل العينة على الجل



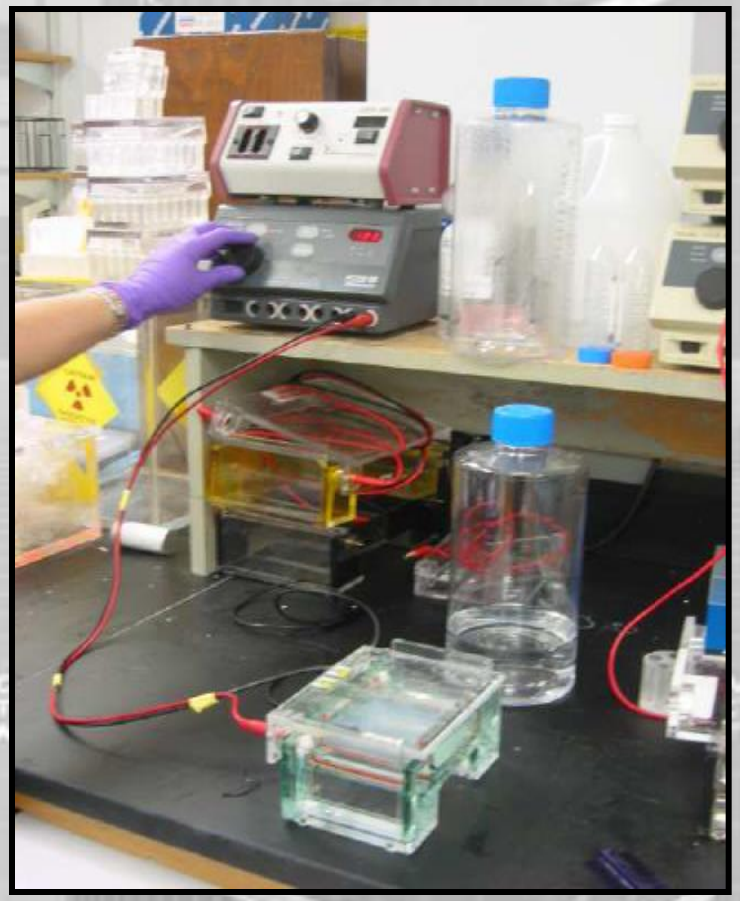
- عينة DNA في الغالب تكون شفافة، لذلك نمزج معها صبغة (٣مايكروليتر + ٥ مايكروليتر من العينة).
- بحرص شديد أنزل العينة بالماصة الإلكترونية داخل فتحات الجل.

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 تستعمل(called ladder) للمقارنة .

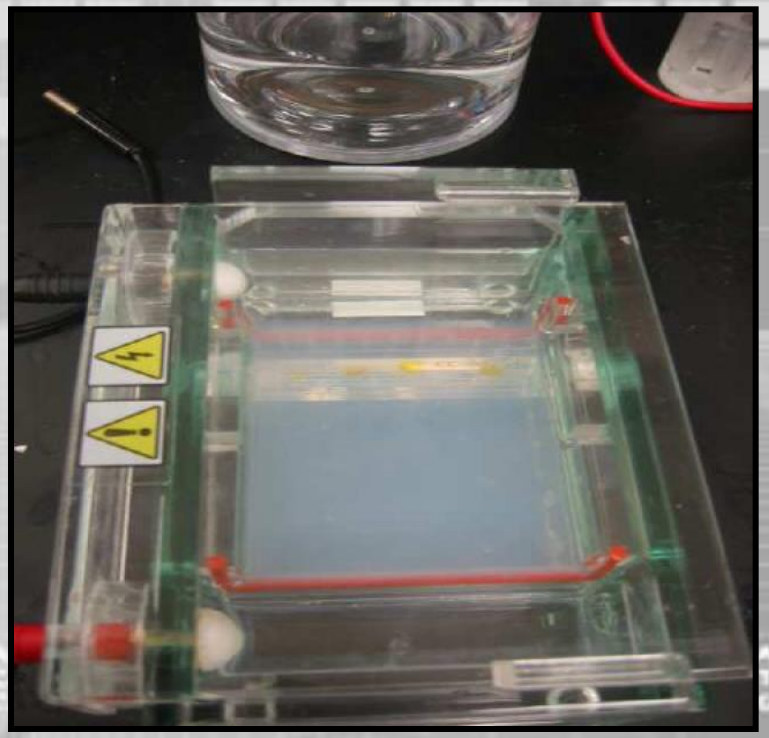
Run the Gel



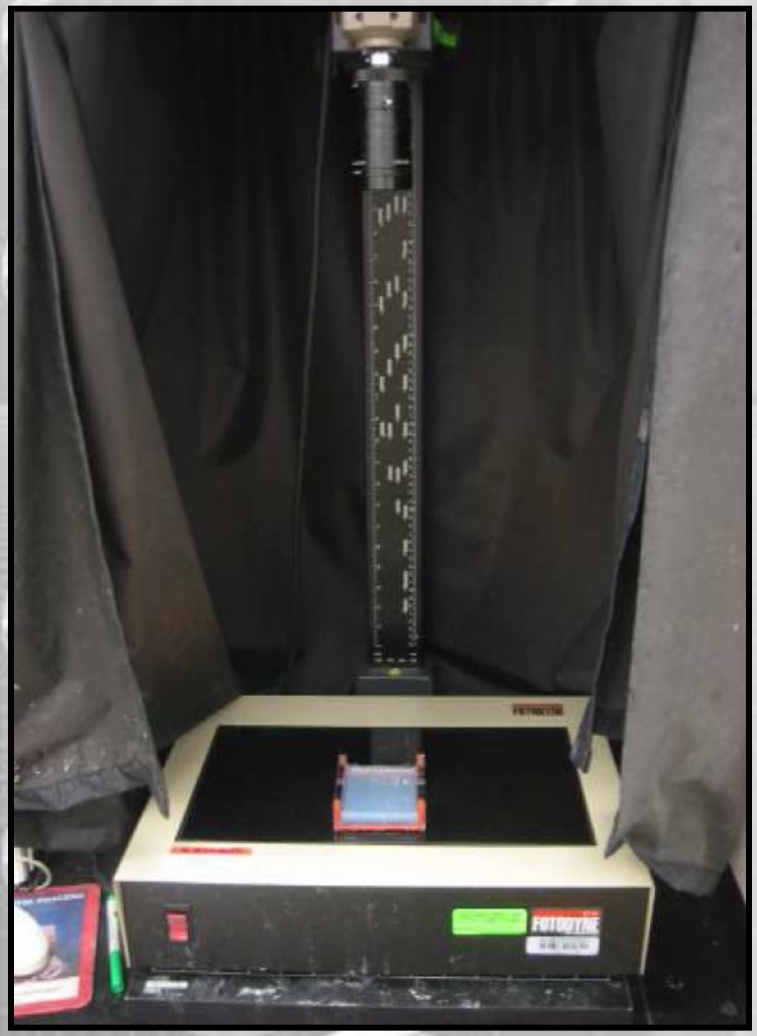
- وصل التيار الكهربائي .
- بما أن الـ DNAذو شحنة سالبة فهو يتحرك إلى القطب الموجب من الحاوية .
- والأجزاء الصغيرة تتحرك أسرع .

DNA Fragments Move

- يوضح لنا الصبغة الملونة تحرك الـDNA في الجل .



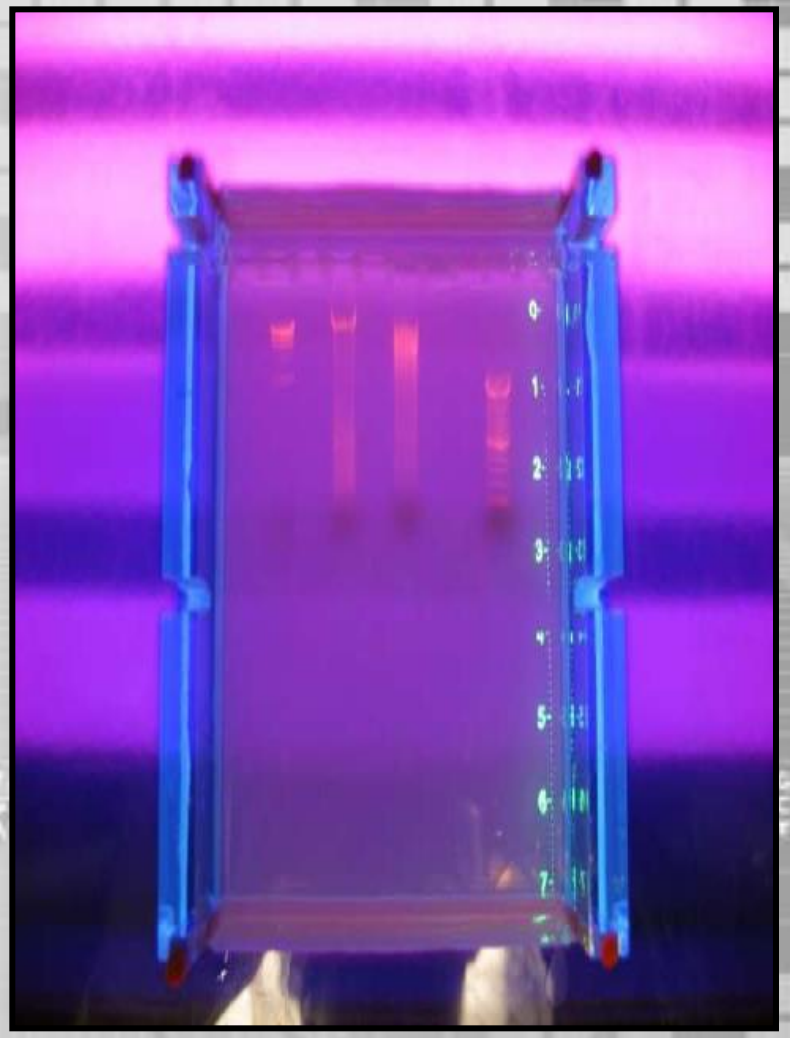
Viewing



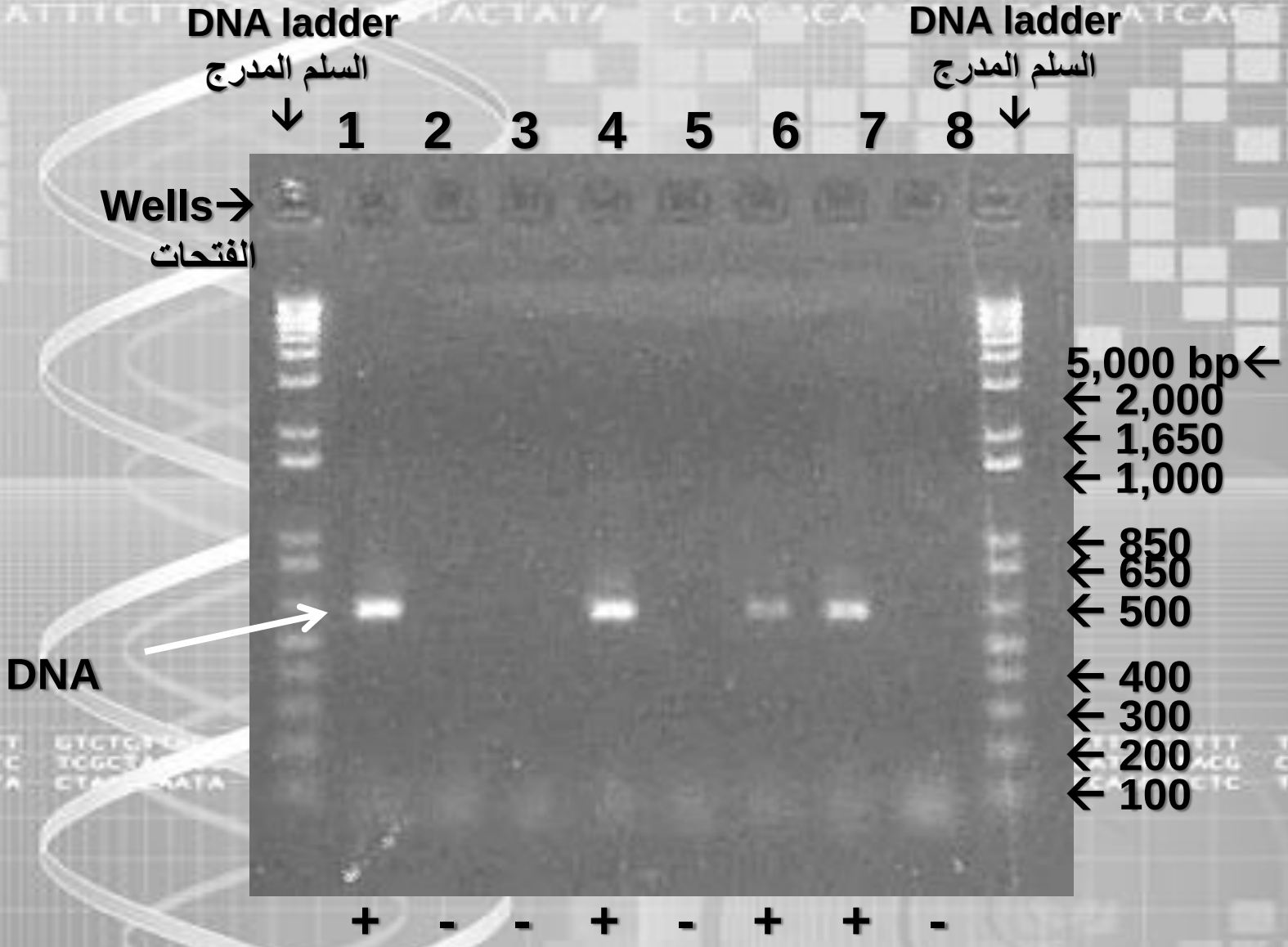
- مشاهدة الجل تحت الـ U.V .

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



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

Good Luck

أ. شروق الشهراني