الترحيل الكهربائي بالهلام

gel electrophoresis

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

إذا كان للجزيئة محصلة شحنة سالبة أو موجبة، فإنها سوف تهاجر في المجال الكهربائي – إن الجزيئة ذات الشحنة السالبة (الأنيون anion) تهاجر وتنجذب إلى القطب الموجب (الأنود anode)، والجزيئات ذات الشحنة الموجبة (الكاتايون cation) سوف تهاجر وتنجذب نحو القطب السالب (الكاثود cathode). يتم الترحيل في هلام يتكون من ثقوب مجهرية دقيقة microscopic pores ، ويقوم هذا الهلام بإعاقة حركة الجزيئات المختلفة من خلال التأثير المنخلي sieving effect لثقوبه 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 الذكهربائي 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 بواسمات 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، فان محصلة شحنة الجزيئات تلعب دورا مهما في حركتها في الهلام.

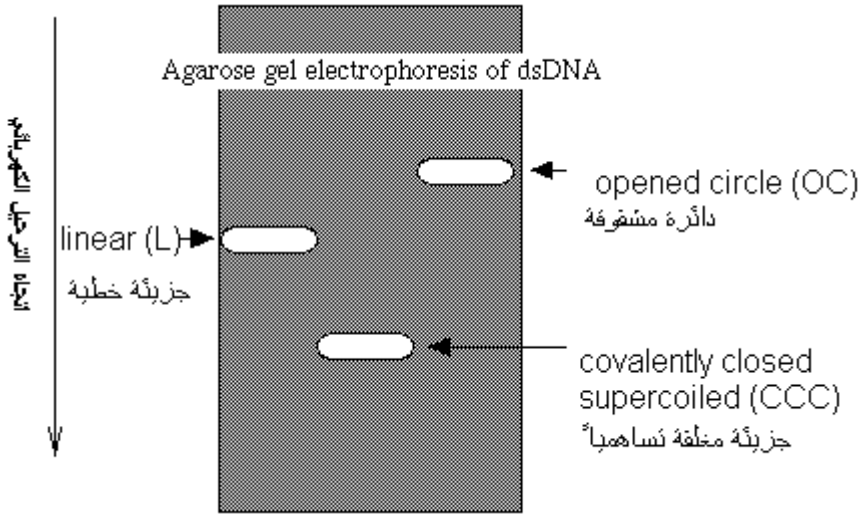
- **العوامل التي تتحكم بحركة جزيئات الـ DNA في الهلام:**

١. الشحنة charge (فيما إذا لو كانت سالبة أو موجبة)
٢. حجمها أو وزنها الجزيئي formula weight (فالجزيئات الصغيرة تتحرك خلال الهلام بصورة أسرع من الجزيئات الكبيرة)
٣. حجم الثقوب pore size (كلما كان حجم الثقوب صغيرا كلما كان ذلك ملائما لفصل الجزيئات الصغيرة والعكس بالعكس)
٤. 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 تتشوه 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 ثقوب الأكاروز بشكل يشبه الأفعى من خلال الثقوب. أما الجزيئات الدائرية المغلقة تساهميا ً covalently closed circular molecules أو CCC فأنها مدمجة compact أكثر لذا تهاجر عبر الثقوب بسهولة أكبر. وغالبا ما تهاجر الجزيئات الخطية ببطء أكثر مقارنة بجزيئات الـ CCC.

هنالك نوعين من الـ DNA الدائري: النوع المغلق closed، والنوع المفتوحopened. وفي حالة النوع المغلق أو CCC، فان كل أحماضها النووية ترتبط بواسطة آصرة فوسفاتية ثنائية الأستر phosphodiester bond وتكون كذلك ملتفة بشكل فائق supercoiled. أما النوع المفتوح open circle (OC)، فلها على الأقل آصرة من نوع phosphodiester مكسورة. يدعى الـ opened DNA بالـ DNA المسترخي أو relaxed DNA، لأن الضغط

الموجـود فـي جزيئـات الـ CCC قـد تـم تحريـره، حيـث أن شـقا واحـدا فـي الآصـرة phosphodiester هو كفيل 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.

الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز *Agarose gel electrophoresis*

تحضير وترحيل هلام الأكاروز المثالي

ماهي الأدوات الواجب توفرها لغرض الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز؟

- غرفة ترحيل كهربائي electrophoresis chamber
- وعاء صب الهلام gel casting tray، والذي يتوفر بحجوم متعددة، ويتألف من بلاستك 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.
- 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.
- 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.
- داريء التحميل loading buffer، والذي يتألف من مكون أساسي كثيف (كالكليسرول glycerol) لكي يسمح للعينة بأن "تسقط" بالحفرة المراد ترحيلها منها. (ففي حالة ترحيل الـ DNA) وبسبب الكثافة النوعية العالية للكليسرول، فانه يحتل الموقع العلوي، أما محلول الـ DNA، فانه يحتل الموقع السفلي، وهذا يعمل بدوره على تثبيت جزيئات الـ DNA في الهلام، وفي حالة عدم وجود الكليسرول أو أية مادة كثيفة أخرى، فان 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 المرحّلة، وهذا بدوره يسهل لنا معرفة توقيت الانتهاء من الترحيل.

- 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 transluminator 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 كيمياوية خطرة – لذا يجب لبس القفازات عند التعامل مع هذه المادة.

- جهاز الـ transluminator، 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.

- 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 فان عملية الهجرة لا تعكس الوزن لجزيئي الصحيح لجزيئات الـ DNA.

خطوات الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز

١- 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.

٢- تحضّر كميات كافية من داريء الترحيل الكهربائي، كما في داريء 0.5 X TBE، لملىء غرفة الترحيل الكهربائي ولتحضير الهلام. أضف كمية مناسبة من مسحوق الأكاروز إلى كمية محسوبة من داريء الترحيل الكهربائي في قارورة flask ذات سدادة 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 الـ DNA.

٣- اقفل فتحة القارورة برخاوة. يجب التأكد من رخاوة سداد القارورة. سخّن القارورة بحمام مائي بدرجة حرارة 100°C (درجة حرارة الغليان) إلى أن يذوب الأكاروز.

٤- برّد المحلول إلى درجة حرارة 60°C، وإذا كان ذلك مرغوباً، تضاف صبغة بروميد الاثيديوم، وتمزج بشمولية.

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

٥- يوضع المشط بارتفاع 1.0 mm – 0.5 فوق وعاء صب الهلام لكي تتكون حفرة كاملة عند إضافة الأكاروز. وإذا كان المشط أقرب إلى صفيحة وعاء صب الهلام، فان هنالك خطر يتمثل

بتمزق قاعدة الحفرة عندما يسحب المشط، وهذا بدوره يسمح للعينة بأن تتسرب مابين الهلام والصفيحة.

٦- 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 الـ DNA عند مروره بها.

٧- بعد أن يتصلب الهلام بشكل كامل، (30 إلى ٤٥ دقيقة بدرجة حرارة الغرفة)، يزال المشط بحذر وتبعد الماسكات (أو الشريط الشفاف) عن وعاء صب الهلام

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

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

١٠- أضف كمية كافية من داريء الترحيل الكهربائي إلى أن يرتفع الداريء بمقدار 1 mm فقط عن الهلام. لأنه إذا ارتفع الداريء أكثر من ذلك فان هذا سف 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 فان هذا يؤدي إلى جفاف الهلام وفشل عملية الترحيل الكهربائي.

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

١٢- بعد انتهاء الترحيل الكهربائي، يطفيء التيار الكهربائي، وتزال الأقطاب الكهربائية والغطاء من غرفة الترحيل الكهربائي. يرفع وعاء صب الهلام ويوضع في وعاء التصبيغ ببروميد

الاثيـديوم.باسـتخدام جهـاز UV transluminator ، يـتم مشـاهدة عينـات الـ DNA وهـي مصبوغة بصبغة بروميد الاثيديوم، باستخدام طول موجي 300-360 nm.