مختبر ٦

الترحيل الكهربائي Electrophoresis

الترحيل الكهربائي بواسطة هلام الأگاروز

Agarose Gel Electrophoresis

تُعتبر عملية الترحيل الكهربائي بواسطة هلام الأگاروز واحدة من الطرق الفيزيائية المهمة التي يمكن بواسطتها تحديد حجم الـ DNA. إن مبدأ هذه الطريقة، هو هجرة الـ DNA من خلال فتحات صغيرة موجودة ضمن شبكة معقدة لمادة الاگاروز عند تسليط تيار كهربائي وتكون هذه الهجرة من القطب السالب (الأسود) بإتجاه القطب الموجب (الأحمر) نظراً لكون الشحنة التي يحملها الـ DNA شحنة سالبة بسبب وجود مجموعة الفوسفات. هناك ثلاثة عوامل تؤثر على هجرة الـ DNA ضمن هلام الاگاروز وهي; حجم الـ DNA وشكله والقوة الأيونية للمحلول المنظم (buffer) وعادة يُستخدم TBE كمحلول منظم لجميع التجارب المستخدمة في هذا الموضوع لذا ستكون القوة الأيونية ثابتة.

تشبه عملية الترحيل الكهربائي بعملية النخل (sieving process) إذ تهاجر قطع الـ DNA ذات الأحجام الصغيرة بصورة أسرع من تلك القطع التي تتميز بكبر أحجامها، لذا تكون العلاقة خطية بين الحجم ومعدل الهجرة ويُستثنى من ذلك القطع ذات الأحجام الكبيرة جداً إذ تتطلب مثل هذه القطع وقت إضافي لكي تستطيع إختراق فتحات هلام الأگاروز وإتمام عملية الهجرة لذا فلا تنطبق العلاقة الخطية عليها. يمكن التحكم في أحجام فتحات هلام الأگاروز من خلال تركيزه فكلما زاد التركيز سيزداد تماسك هلام الأگاروز وبالتالي تقل أحجام الفتحات وكلما قل التركيز ستزداد أحجام الفتحات، إلا أن التركيز القياسي لهلام الأگاروز هو 1% والذي يمكن أن يرحل من خلاله قطع DNA تتراوح أحجامها من 0.2-30 kb.

أكثر أنواع الـ DNA المستخدم في الهندسة الوراثية عبارة عن بلازميدات، ويُعرف البلازميد على إنه قطع DNA تكون أما على شكل تركيب ملتف بشدة Super coiled أو على شكل دائري مفتوح Open-circular أو على شكل خيطي Linear إذ توجد هذه القطع داخل خلايا الكائن الحي وتكون مستقلة عن الكروموسوم.

تختلف معدل هجرة البلازميدات خلال هلام الأگاروز إعتماداً على أشكالها في حالة تساوي الحجوم، إذ نلاحظ أن الشكل Super coiled يكون أكثر سرعة في هجرته من الشكل Open−circular نتيجة لقلة

الاحتكاك مع هلام الأگاروز وبالتالي تكون الإعاقة قليلة خلال الحركة، كذلك الحال بالنسبة إلى الشكل الخطي Linear أيضا تكون قوة الإحتكاك أقل مما هو عليه في Open-circular إلا إنها أكثر من Super coiled. يمكن القول من خلال ماتقدم أن لشكل الـ DNA تأثير كبير على سرعة هجرة DNA خلال هلام الأگاروز إذ نلاحظ ثلاثة حزم لـ DNA غير المهضوم بإنزيمات التقييد على هلام الأگاروز في مواقع مختلفة إعتماداً على سرعة هجرتها. في حالة ترحيل DNA بشكليه Super coiled و Open-circular مقطوعين بإنزيم تقييد واحد سيتحول هذين الشكلين إلى الشكل الخطي وبالتالي ستكون الحزم في موقع واحد.

يوجد عدد مختلف من الصناديق (الأوعية) لأجهزة الترحيل الكهربائي وتكون بحجمين أساسين، يُطلق عليها إسم الغواصة (submarine) وذلك لأن شريحة الهلام تكون مغطاة بصورة كلية بمحلول منظم الترحيل الكهربائي (buffer). يسمى النوع الكبير BRL موديل H5 (وتكون أبعاد الوعاء الخاص بشريحة الهلام 11×14 cm) ويمتاز هذا النوع بإمكانية نقل صينية الهلام وهي حاوية على الهلام من مكان لآخر خارج صندوق الجهاز. بينما النوع الصغير (baby gel) هو BRL موديل H6 (وتكون أبعاد الوعاء الخاص بشريحة الهلام 50×75 mm) ففي هذا النوع لايمكن نقل صينية الهلام خارج الصندوق وذلك لأنها ملتصقة بالصندوق ولايمكن فصلها عنه. توجد أنواع أخرى من (baby gel) تكون مصنوعة من قبل Carolina Biological ففي هذه الأنواع يمكن تحريك صينية الهلام كما في النوع H5. تنوعت أحجام أجهزة الترحيل الكهربائي لأغراض خاصة ويبقى النوع H5 هو الأكثر إستعمالاً، بينما يلجأ عادة إلى baby gel للفحوصات السريعة لاتتجاوز مدة الترحيل فيها على 40-30 دقيقة إلا أن كفاءتها لاتكون كبيرة، إن الأنواع H5 و Carolina boxes يمكن أن يُستعمل فيها مشط واحد يوضع في أعلى الهلام أو أن يُستخدم فيها مشطين إذ يوضع المشط الآخر بمنتصف الهلام وبهذه الطريقة يمكن مضاعفة عدد العينات المراد الكشف عليها.

صبغة الترحيل Tracking Dye

صبغة الترحيل هي عبارة عن محلول يتكون من السكروز أو الكليسرول حاوي على صبغة، ووظيفة هذه الصبغة هي جعل عملية الترحيل الكهربائي مرئية يمكن تتبعها من خلال النظر إلى وعاء الترحيل، أما السكروز أو الكليسرول تعمل على زيادة كثافة العينة عند وضعها في حفرة الهلام وبالتالي نضمن عدم طفو العينة للأعلى وإستقرارها في أسفل الحفرة.

هناك العديد من الصبغات المستخدمة لهذا الغرض إلا أن أكثرها شيوعاً وإستعمالاً هي صبغة Bromophenol blue أو Orange G. تعتمد عملية إختيار الصبغة على أحجام قطع الـ DNA المراد

ترحيلها وبالتالي على سرعة عملية الترحيل الكهربائي، نلاحظ أن صبغة Bromophenol blue تكون أقل سرعة من حركة Orang G لذا فإذا أردنا تتبع عملية الترحيل إلى النهاية نستخدم Bromophenol blue. من هذا نستنتج إنه يجب إتخاذ القرار منذ البداية أي من الصبغتين يجب إستعمالها إعتماداً على حجم قطع الـ DNA وسرعة عملية الترحيل.

Orange G: 0.25% ORANGE g (Sigma cat # O-1625) dissolved in 50% sucrose.

Bromophenol Blue: 0.25 g bromophenol blue

0.25 g xylene cyanol

1.0 ml 1M Tris, pH 8

49 ml water

50 ml glycerol

خطوات طريقة عمل الترحيل الكهربائي

General Protocol or Running

١- حضر 1% من الأگاروز في 200 ml من TBE إذ يعتبر هذا التركيز هو التركيز المثالي إلا أنه يجب تقليل هذا التركيز في حالة ترحيل قطع كبيرة من DNA أو زيادته في حالة القطع الصغيرة.

تُضاف صبغة Ethidiume bromide بتركيز 0.5 µl في هذه المرحلة أي إلى كل من المحلول المنظم (buffer) والأگاروز إلا أنه في بعض الأحيان لاتُضاف هذه الصبغة في هذه المرحلة وإنما تُضاف في نهاية عملية الترحيل إلى الهلام، لكن من الأفضل إضافة صبغة Ethidiume bromide في بداية الترحيل وذلك لكي يتسنى الكشف عن الحزم تحت UV بين فترة وأخرى أثناء عملية الترحيل ثم يُكمل الترحيل. يجب أن لايغيب عن البال أن صبغة Ethidiume bromide هي مادة لها القابلية على التداخل مع DNA وبالتالي ستغير من حالة الـ DNA مما يؤدي إلى تأثيرها على معدل الهجرة، وأن هذا التغير لا يكون بنسبة ثابتة نظراً لكون القطع الكبيرة من الـ DNA تحتوي على كمية أكبر من هذه الصبغة مقارنة مع قطع DNA الصغيرة الحجم وبالتالي ستكون هذه الحالة إحدى المشاكل التي قد تؤثر على صحة النتائج وخصوصاً إذا كان الغرض من التجربة هو رسم خارطة القطع أو التحديد الدقيق لأحجام قطع الـ DNA لذا يُفضل في بعض الأحيان أن تُجرى عملية الترحيل الكهربائي بغياب صبغة Ethidiume bromide.

٢- يتم إذابة الأگاروز في Microwave على درجة لمدة 2.5 دقيقة ويجب الإنتباه إليه وعدم تركه إلى أن يذوب تماماً (في حالة غليان الأگاروز أكثر من الحد المسموح به سيؤدي ذلك إلى إتلاف المكان فيجب في هذه الحالة إزالة الأگاروز وتنظيف المكان جيداً) بعد إذابته تماماً يبرد الأگاروز بواسطة الحمام المائي بدرجة حرارة 60°C حتى نستطيع مسكه باليد. في حالة صب الأگاروز وهو لازال حاراً سيؤدي ذلك إلى إلتواء الوعاء البلاستيكي المخصص للهلام في جهاز الترحيل الكهربائي.

٣- يجب سد نهايات صينية الهلام بشريط لاصق.

٤- يُصب الأگاروز في صينية الجهاز بسمك 5-7 mm ثم يوضع المشط ويترك إلى أن يتصلب.

٥- بعد تصلب الأگاروز تماماً يُزال الشريط اللاصق من النهايات وتوضع صينية الهلام في مكانها أي في صندوق الترحيل، ثم يُضاف المحلول المنظم (buffer) حتى يغطي الهلام بإرتفاع 2 mm.

٦- تُضاف العينات إلى هلام الأگاروز ثم توصل الأقطاب، يجب على الباحث أن يتذكر دائماً أن شحنة الـ DNA سالبة فيجب وضع العينات بالقرب من القطب السالب (الأسود) لكي تكون الحركة بإتجاه القطب الموجب (الأحمر).

٧- يتم تشغيل الجهاز بعد ضبط الفولتية والوقت إعتماداً على نوع جهاز الترحيل ففي حالة Baby gel يكون مقدار الفولتية لها 80 فولت لمدة 40 دقيقة، أما في حالة H5 فيكون مقدار الفولتية 125-110 فولت لمدة ساعتين أو 15 فولت ليوم كامل. إن إستعمال فولتيات عالية في الترحيل الكهربائي سيؤدي إلى زيادة حرارة الهلام وبالتالي تشوه الحزم.

٨- بعد إنتهاء عملية الترحيل الكهربائي يجب إطفاء الجهاز وفصل الأقطاب.

٩- يؤخذ الهلام ويوضع في جهاز الـ U.V. Transluminator وذلك لفحص حزم الـ DNA المتكونة بعد الترحيل (تقرأ نتائج الترحيل بملاحظة تكون حزم وهاجة برتقالية ناتجة من ارتباط صبغة Ethidiume bromide مع الـ DNA)

الملاحظات:

* تعتبر صبغة Ethidiume bromide مادة مسرطنة فيجب التعامل معها بحذر أي إرتداء الكمامات والكفوف والصداري.

* يمكن التخلص من صبغة بروميد الأثيديوم الزائدة عن طريق غسل الهلام بالماء ويمكن الإحتفاظ بهذه الصبغة الزائدة للإستعمالات اللاحقة.

* تظهر في بعض الأحيان الحزم بصورة باهتة (أي مختفية تقريباً عند فحصها تحت UV) تكون هذه الحالة بسبب الإمتصاص الزائد للصبغة من قبل الهلام فيتم إزالة هذه الصبغة الزائدة بواسطة عملية Destaining وذلك بتغطية الهلام بالماء لمدة ساعة.