**المختبر السابع**

**الترحيل الكهربائي Gel Eletrophoresis**

يعرف الترحيل الكهربائي بأنه حركه الايونات والجزيئات العملاقه المشحونه charged macromolecules مثل البروتينات والـ DNA والـ RNA خلال وسط معين (agarose or polyacrylamide) عند تسليط تيار كهربائي.

**يوجد نوعان من المواد المستخدمه في الترحيل الكهربائي لكل ماده مواصفات خاصه واستخدامات خاصه تميزها عن الماده الاخرى**

1. **هلام الاكاروز Agarose**

ماده سكريه تستخدم بتراكيز من 0.5- 2% فكلما كان حجم قطع الـ DNA المراد فصلها اصغر كلما ازداد تركيز الاكاروز ( لماذا),يعتبر الاكاروز اكثر استخداما بسبب رخص ثمنه وسهوله تحضيره وهو ماده غير سامه كما ان نسبه وضوح العينه المفصوله بواسطته تكون اقل وضوحا من النوع الاخرو يستخدم هذا الهلام لفصل جزيئات DNA يتراوح وزنها الجزيئي بين 200pb الى 50000pb

1. **متعدد الاكريلمايد** **Polyacrylamide**

هو عباره عن بوليمر خليط من الاكريلامايد والـbis-acrylamide يمتاز بكون ثقوب مادته اصغر من ثقوب الاكاروز لذا فهو يستخدم في فصل جزيئات الـDNA الاصغر من 500pb العينه تكون اكثر وضوحا من الاكاروز ويستخدم ايضا في فصل البروتينات والانزيمات الا ان طريقه تحضيره اكثر تعقيدا من الاكاروز وتعتبر ماده الاكريلاميد ماده سامه للاعصاب

**العوامل التي تتحكم بحركه جزيئات الـ DNA في الاكاروز**

1. الشحنه charge (ماهي شحنه الDNA وما اتجاه حركتها؟)
2. الحجم و الوزن الجزيئي للجزيئات ( اي الجزيئات تتحرك اسرع؟)
3. حجم ثقوب الهلام (كلما كان حجم الثقوب صغيره كلما كان ذلك ملائما لفصل الجزيئات الصغيره)
4. قوه التيار الكهربائي ( يستخدم التيار الكهربائي العالي للفصل السريع للجزيئات الصغيره بشكل عام ولكن على ان لا يكون عالي جدا لان هذا يؤدي الى تحطم الجزيئات ,اما التيار الواطئ فهو يستخدم لفصل الجزيئات الكبيره)

ان لشكل جزيئه الـ DNA اهميه في سرعه حركتها فالجزيئات العاليه الالتفاف covalently closed supercoiled (CCC) تكون اسرع من الجزيئات الخطيه linear (L) والتي تكون اسرع من النوع الحلقي المفتوح Opened circle (OC)

**المواد و الاجهزه المستخدمه في الترحيل الكهربائي**

1. جهاز الترحيل الكهربائي المؤلف من
2. مجهز الطاقه power supply
3. وحده الترحيل الكهربائي electrophoresis chamber
4. وعاء صب الهلام gel casting tray مصنوع من بلاستيك شفاف يسمح بنفاذ الاشعه الفوق بنفسجيه ,يجب غلق صرفي الوعاء بالسدادات المطاطيه الخاصه قبل صب الهلام ( لماذا)
5. المشط comb هو اداه تستخدم لعمل حفر لوضع عينه الـ DNA في الهلام
6. UV-transluminator جهاز الاشعه فوق البنفسجيه
7. المواد المستخدمه
8. TBE buffer
9. Loading buffer ( ماهي مكوناته ولماذا يستخدم)
10. صبغه الـ ethidium bromide هي عباره عن صبغه متفلوره تتداخل بين ازواج القواعد النايتروجينيه لشريطي الـ DNA وعند تعرض هذه الصبغه للاشعه فوق البنفسجيه فأنها يعطي منطقه مشعه برتقاليه او حمراء اللون . هذه الصبغة مسرطنة واستبدلت بصبغات امينة وغير مسرطنة مثل Simplsafe.
11. هلام الكاروز
12. عينه DNA نقيه

**طريقه العمل**

1. يتم إذابة 1 غم من الاكاروز في 100 مليلتر من درائ TBE بتركيز (0.5X) ورقم هيدروجيني 8 في الحمام المائي و بعدها يترك الهلام ليبرد لتصل حرارته الى 50 م. ثم يضاف 2 مايكروليتر من محلول بروميد الاثيديوم بتركيز 2 ملغم/مليلتر ويمزج جيدا.
2. يحضر قالب صب الهلام (Tray) وذلك باحاطة حافتي القالب بالقطع المطاطيه الخاصه ويثبت مشط تكوين الحفر (Comb) على بعد واحد سنتمتر من احدى حافتي القالب, ثم يصب الهلام داخل القالب الموضوع في وضع أفقي تماما وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة وفيما بعد رفع المشط القطع المطاطيه برفق ويوضع القالب داخل حوض الترحيل الكهربائي المحتوى على دارئ TBE بحيث يغمر هلام الاكاروز.
3. تجرى عملية تحميل عينات الدنا في حفر الهلام بعد مزج 10 مايكروليتر من محلول الدنا مع 3 مايكروليتر من دارئ التحميل(Loading buffer) .
4. يتم ترحيل العينات كهربائيا تحت فرق جهد قدره 4-3 فولت/سم وبمعدل مرور للتيار 20 ملي أمبير ولمدة 3-1.5 ساعة حسب التجربة.
5. تم فحص الهلام بواسطة جهاز UV- Transilluminator بطول موجي مقداره 256 نانوميتر, ثم يصور بوساطة الكاميرا(Canon) .













