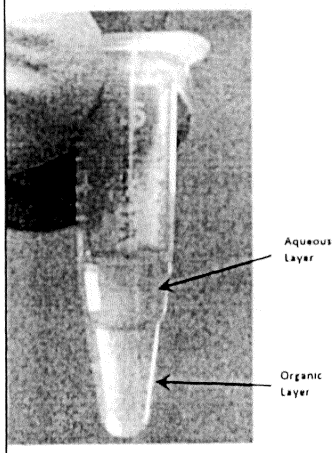
الفينول محل عضوي لا يمتزج مع الماء
يستعمل لتخلص من البروتينات واللبيدات التي تشوب محلول ما من الحموض النووية.



حيث تبقى الحموض النووية منحلة في المحاليل المائية في حين أن البروتينات واللبيدات تنحل بسهولة في الفينول الذي لا يستطيع حل الحموض النووية.

الترسيب الكحولي

يهدف الترسيب الكحولي إلى الحصول على الحموض النووية الموجودة في محلول ما بشكل صلب مما يمكّننا من إعادة حلها في محلول جديد بغية تغيير تركيز هذه الحموض، أو تغيير الدارئة المنحلة فيها.

أهم أنواع الترسيب الكحولي:

- الترسيب باستخدام الكحول الإيتيلي (الإيتانول):

إن إنجاز هذا النوع من الترسيب يتطلب شرطيين:

الأول: استخدام دارئة ذات قوة أيونية عالية تحوي على ملح أحادي التكافؤ

الثاني: استخدام إيتانول عالي التركيز (ثلاثة حجوم من الإيتانول المطلق لكل حجم من العينة).

في هذه الشروط تترسب الحموض النووية بشكلٍ كاملٍ تقريباً.

يقدر الزمن اللازم للترسيب **بعدة ساعات** وذلك حسب تركيز الحموض النووية في العينة حيث يزداد هذا الزمن مع انخفاض تركيز الحموض النووية في المحلول ويمكن أن **تسرع العملية بالتبريد** إلى الدرجة -20 م°.

- الترسيب باستخدام الإيزوبروبانول:

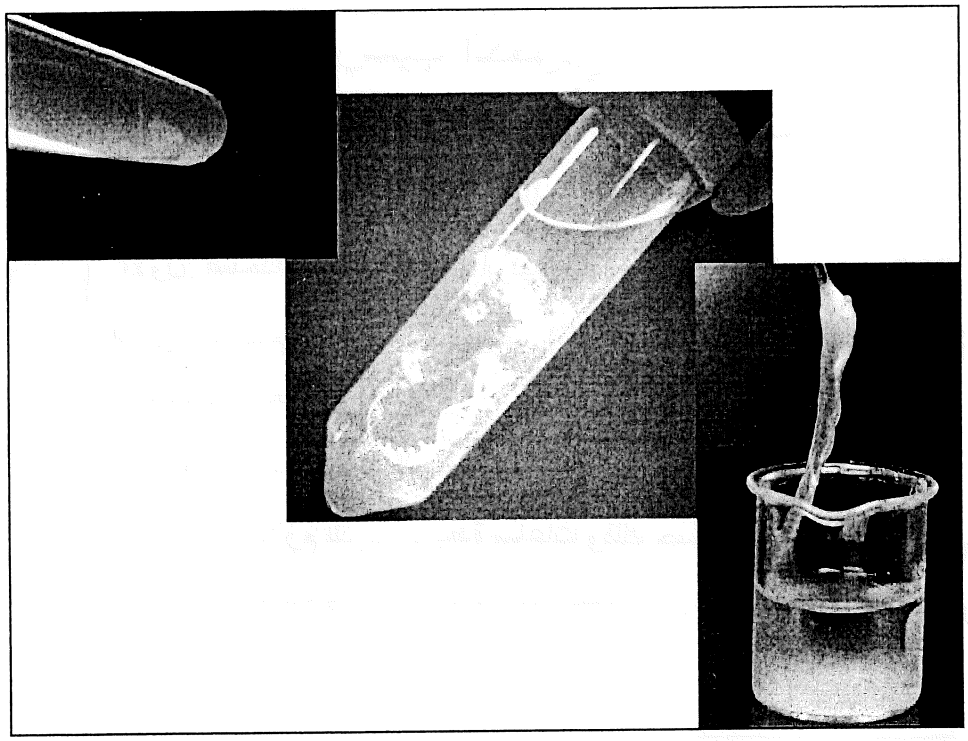
المبدأ هو نفسه فيما يتعلق بالترسيب بالإيتانول مع فرقين أساسيين:

الأول: ليس هناك من ضرورة لاستخدام أي نوع من الأملاح.

والثاني: يجب أن يساوي الحجم المستخدم من الإيزوبروبانول حجم العينة.

يتميز الترسيب باستخدام الإيزوبروبانول بأنه **ترسيب فوري** (لا داعي للانتظار لساعات) وأن **الشدف الصغيرة من DNA لا تترسب** باستخدام هذه الطريقة.

ومهما كانت الطريقة المستخدمة للترسيب يجب **غسل الرسابة** بعدها **بالكحول الإيتيلي بتركيز 70%** (لاحتوائه على كمية من الكحول كافية لإبقاء DNA مترسب وكمية كافية من الماء لحل الأملاح) لإزالة الأملاح العالقة بالحموض النووية وبعدها تجفف الرسابة ويعاد حلها ضمن الماء المقطر أو ضمن دارئة من TE (Tris+EDTA).



تحضير RNA الكلي Total RNA:

تعتبر دراسة RNA أكثر صعوبة من دراسة DNA وذلك لضعف بنيتها في مقاومة الريبونكلياز كـ RNaseA.

يتم مجانسة النسيج أو الخلايا التي يراد استفراد RNA ابتداءً منها، وذلك ضمن دارئة مناسبة تحوي مواد مثبطة لعمل الريبونكلياز.

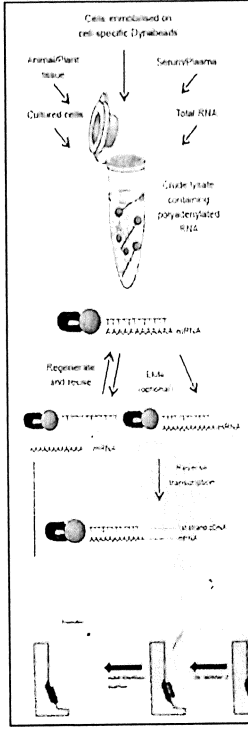
نحصل على جناسه تحوي البروتينات والحموض النووية.

للحصول على RNA غير المشوب بـDNA يمكن اللجوء إلى طريقة سريعة تقوم على **الترسيب التفاضلي لكل من DNA وRNA** بالاعتماد على pH الوسط والتركيز الكحولي المستخدم، كما يمكن تحطيم DNA بوساطة أنزيم نكلياز مناسب.

نلجأ إلى الاستخلاص الفينولي لتخلص من البروتينات.

والترسيب الكحولي للحصول على RNA الكلي.

تحضير mRNAs (Messenger) الكلي

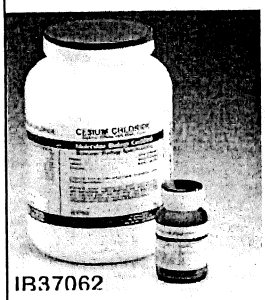


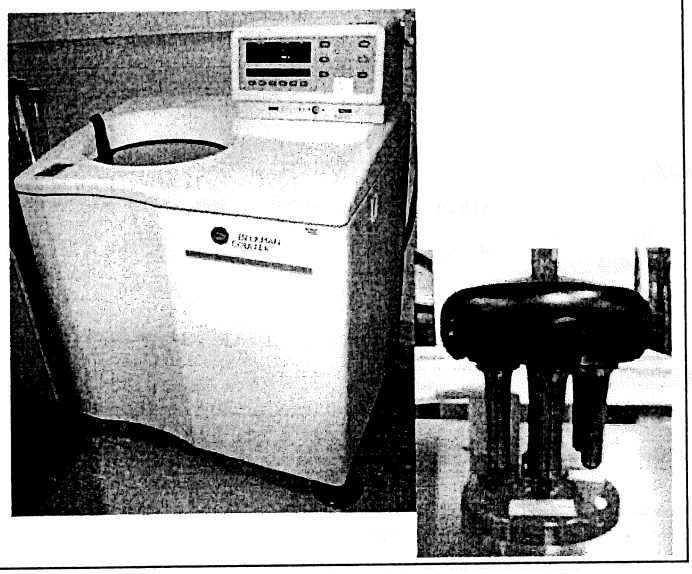
يملك السواد الأعظم من mRNA لحقيقيات النوى ذيلاً مؤلفاً من تسلسل طويل من عديد الأدنيل الذي يمكن أن يتجاوز طوله ٢٠٠ نكليوتيد أحياناً. يمكن الاستفادة من هذه الخاصية لتنقية الرسيل بوساطة أطقم Kits جاهزة للاستعمال تحوي على كرات مكروية معدنية ممغنطة مغطاة بتسلسلات من قليل التيميدين Oligo-dT تستخدم لعزل الرسيل. حيث تخلط بالمحلول الحاوي على RNA الكلي فيرتبط mRNA بقليلات التيميدين، يجمع بعدها الرسيل بسهولة باستخدام مغناطيس يوضع على حافة الأنبوب فترتبط الكرات الممغنطة بحافة الأنبوب الملاصق للمغناطيس رابطةً معها الرسيل، يتم عندها التخلص من السائل المحيط بالكرات الحاوي على باقي أنواع RNA.

تنقية الحموض النووية باستعمال التثفيل الفائق على مدروج كثافة مستمر من محلول لكلور السيزيوم

- تعرف هذه الطريقة بتسدم التوازن equilibrium sedimentation حيث يستعمل فيها محلول عالي التركيز من كلور السيزيوم (6M) الذي يتمتع بخاصية فيزيائية نوعية تتمثل بقدرته على تشكيل مدروج كثافة مستر **continuous density gradient** عند تثفيله بسرعات فائقة ٤٠٠٠٠٠g.
- تمزج العينة مع محلول كلور السيزيوم في الأنبوب وتثفل بسرعة معينة، يتشكل أثناء عملية التثفيل مدروج الكثافة وتنفصل مكونات العينة بتحركها أعلى وأسفل حتى الوصول إلى المكان المناسب من المدروج الذي يصبح فيه كثافة العينة تساوي كثافة المدروج حيث تعرف هذه الكثافة بكثافة الطفو Buoyant density، ولا يمكن لها أن تتحرك بعد ذلك مهما طال زمن التثفيل.

Preparative density-gradient ultracentrifugation of DNA

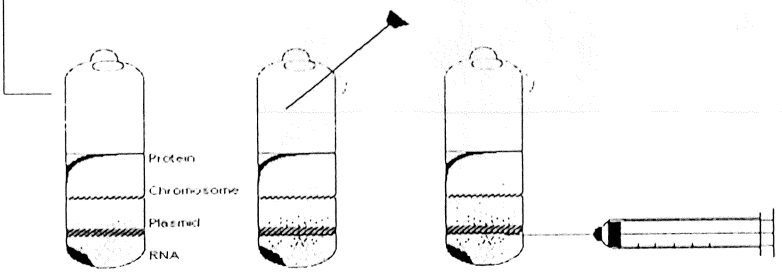




تعد هذه الطريقة حساسة للغاية يمكن باستعمالها الفصل بين DAN وRNA والبروتينات.

كما يمكن فصل DNA النووي عن DNA الميتوكوندري أو البلاسميدي.

كما يمكن بوساطتها فصل بين جزئيين من DNA متماثلين أحدهما يحوي النظير الثقيل heavy isotope والأخر النظير الخفيف مثل 15N و 14N.

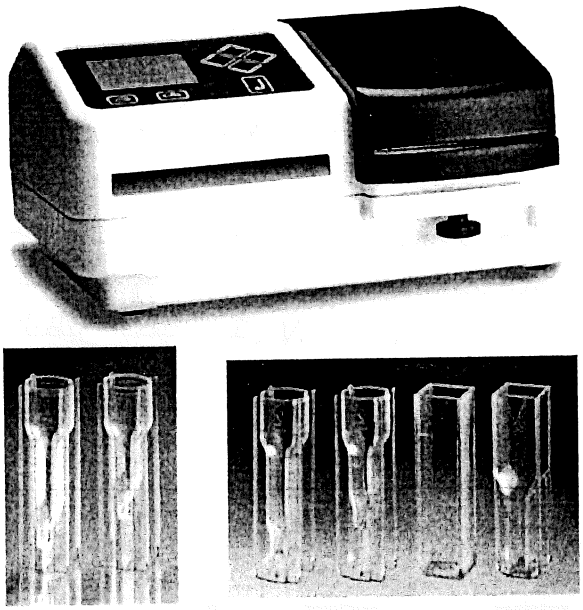


2- معايرة الحموض النووية باستعمال جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer

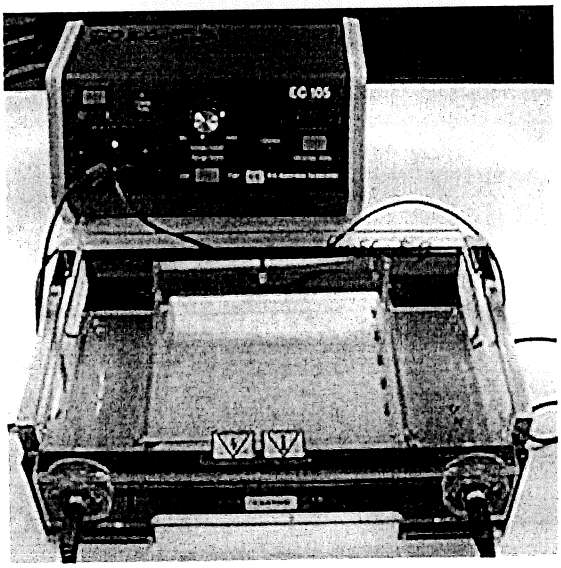
تجرى معايرة محاليل الحموض النووية كأي مادة كيميائية أخرى ماصة للضوء باستخدام جهاز المطياف الضوئي، حيث يمكننا الكشف عن الحموض النووية المنحلة في مُحلٍّ ما وذلك بقياس درجة امتصاص المحلول للأشعة فوق البنفسجية بطول موجة قدرها 260nm، وهو طول الموجة الذي تمتص عنده الحموض النووية الضوء.

تقاس شدة امتصاص محلول ما للضوء بوحدة الكثافة الضوئية Optic Density. ولحساب تركيز محلول ما من الحموض النووية نستخدم العلاقة التالية:

_ شدة امتصاص قدرها وحدة كثافة ضوئية واحدة على طول موجة 260nm تعادل تقريباً محلول تركيزه 50µg/ml من DNA ثنائي السلسلة و40µg/ml من RNA أو DNA أحادي السلسلة.



٣- الرحلان الكهربائي Elecrophoresis



٣- الرحلان الكهربائي Elecrophoresis

- تعتبر الحموض النووية واحدة من الجزيئات الكبرية (الضخمة) Macromolecules المشحونة سلباً في الأوساط المعتدلة أو الأسسة (القلوية) وهذا يجعل من الممكن ترحيلها ضمن حقل كهربائي من القطب السالب إلى القطب الموجب.
- ولكن نسبة الشحنة إلى طول جزيء ما من DNA نسبة ثابتة مهما اختلف طول الجزيء
- فلتحديد طول شدفة ما من DNA و لفصل مجموعة من الشدف المختلفة الطول يجب استخدام هلامة مسامية لإجراء الرحلان الكهربائي.
- حيث أن فصل الشدف حسب طولها يعود إلى القدرة الترشيحية للهلامة (خاصية الفلترة) الناتجة عن المسامية.

بشكل عام تتعلق حركية جزيء ما ضمن هلامة في حقل كهربائي بالكتلة الجزيئية للجزيء المرحل وحجم مسام الهلامة.

يمكن باختيار نوع المادة التي تصنع منها الهلامة وبتغير تركيز هذه المادة التحكم بحجم مسامها.

وتعد أكثر الهلامات استخداماً في الرحلان الكهربائي وفقاً لنوع المادة التي تصنع منها:

الهلامة المحضرة من عديد الأكريلاميد Polyacrylamide،

والهلامة المحضرة من الأغاروز Agarose .

تكون عادة المسافة التي تقطعها شدفة ما من DNA أثناء الرحلان الكهربائي على علاقة عكسية مع اللوغاريتم العشري لعدد أشفاع الأسس المكونة لها.

الهلامة المحضرة من عديد الأكريلاميد Polyacrylamide Gel

تتمتع هذه الهلامة بقوة فصل كبيرة بفضل المسام الصغيرة الناتجة عن بلمرة عديد الأكريلاميد.

يستعمل هذا النوع من الهلامات بشكل عام لفصل شدف صغيرة من الحموض النووية أقل من 500 أساس (في حال RNA) أو شفع من الأسس (في حال DNA).

كما يستعمل هذا النمط من الهلامات لفصل شدفتين من الحموض النووية لا يزيد طول احدهما عن الأخرى إلا بأساس واحد.

الهلامة المحضرة من الأغاروز Agarose Gel

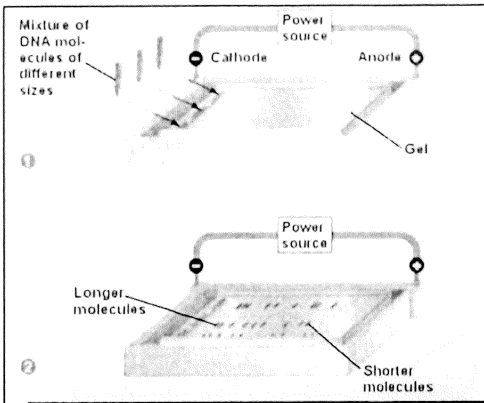
تعتبر هلامة الأغاروز الأكثر استخداماً في فصل الشدف المختلفة الطول من الحموض النووية، تتراوح الأطوال التي يمكن فصلها بسهولة بين 0.5 و20 كيلو أساس وذلك **لأن المسام التي تحويها هذه الهلامة أكبر من مسام هلامة عديد الأكريلاميد.**

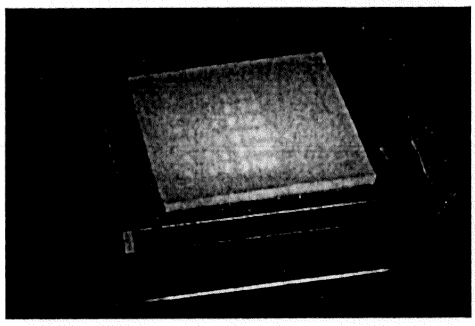
كما أنه يمكن **التحكم بحجم هذه المسام بتغير تركيز الأغاروز** المستخدم لتحضيرها.

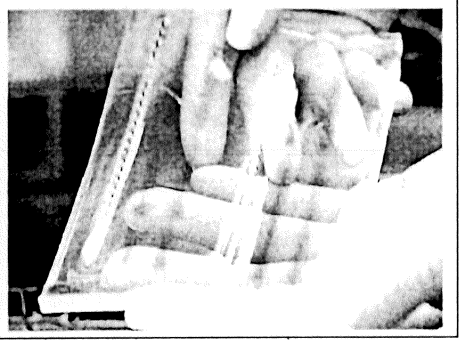
وبحسب حجم الشدفة المراد فصلها نستخدم تراكيز مختلفة من الأغاروز وهذه التراكيز تتراوح عادة بين 0.5% و2%.

إذ تستخدم التراكيز العالية لفصل الشدف الصغيرة (500شفع من الأسس) والتراكيز المنخفضة لفصل الشدف الكبيرة حتى 20kb.

في حين لا يمكن فصل الشدف الكبيرة جداً والتي يتجاوز طولها عشرين كيلو أساس بتقانة الرحلان الكهربائي التقليدي على هلامة الأغاروز مهما خفضنا من تركيز الهلامة.





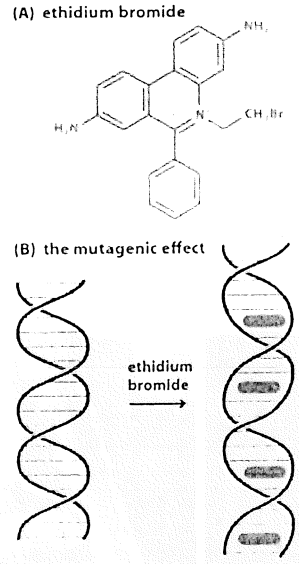


٣- الرحلان الكهربائي Elecrophoresis

إظهار وقراءة هلامة الأغاروز بعد عملية الرحلان الكهربائي:

تستخدم لتظهير شدف DNA المرحّلة على هلامة الأغاروز عدة أصبغة ملونة للـDNA، والأكثر شيوعاً واستخداماً هو **الأثيديوم بروماید Ethidium Bromide**. وهو عبارة عن مادة كيميائية غير متألقة في الحالة العادية وله القدرة على التداخل Intercalate بين شريطتي الحلزون المزدوج لـDNA في هذه الوضعية ضمن الحلزون المزدوج يتألق بلون برتقالي إذا ما تمت إضاءته بالأشعة فوق البنفسجية قصيرة الموجة.

تضاء الهلامة بالأشعة فوق البنفسجية على طول موجة تتراوح بين 250nm و300nm عندها يظهر DNA بشكل عصائب ملونة باللون البرتقالي كما هو موضح في الشكل السابق.

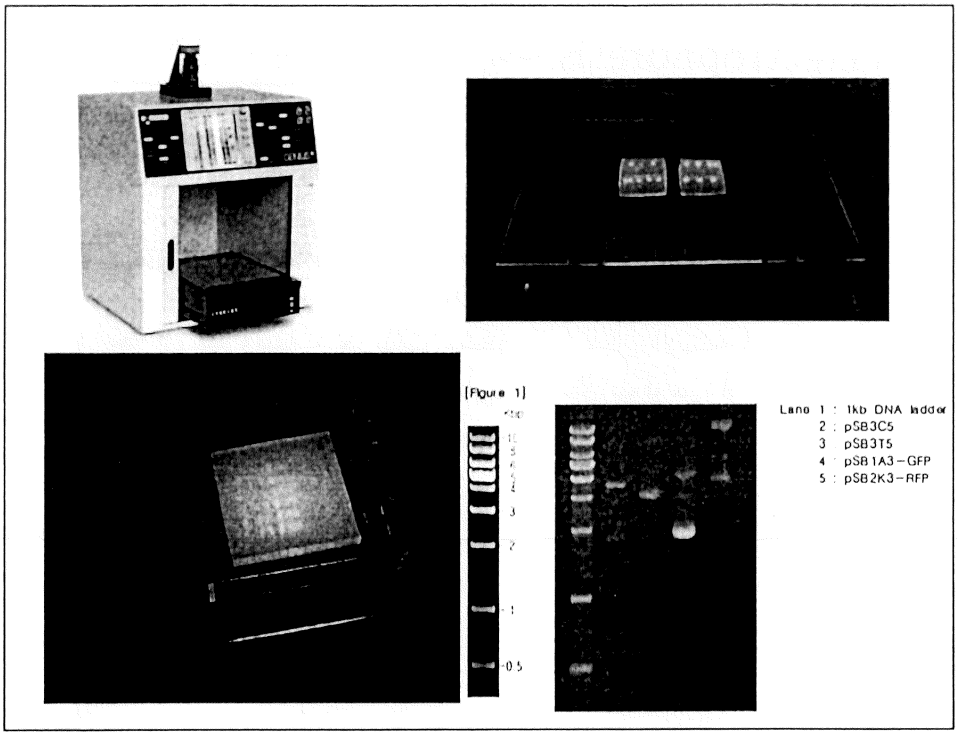


Intercalation

٣- الرحلان الكهربائي Elecrophoresis

ولتوثيق نتائج الرحلان يمكن تصوير الهلامة باستخدام آلة تصوير حساسة للأشعة فوق البنفسجية UV أو آلة تصوير رقمية مزودة بمرشحة (فلتر) UV.

ويجب في كل مرة نجري فيها الرحلان الكهربائي وضع في أحد آبار الهلامة، وبجوار آبار العينات، كمية معينة من واسمات أطوال معيارية (عصائب معيارية) أو DNA معياري DNA sizes standards أو ما يعرف أيضاً بسلم DNA Ladder DNA بحيث يصبح من السهولة التعرف على طول الشدف المرحّلة بمقارنتها بالعصائب الواسمة المعيارية.



استعمالات الرحلان الكهربائي

As **an analytical technique** to estimate the size, (the quantity) of nucleic acid molecules by comparison with the migration of molecules of known length (known concentration)

Check an enzymatic reaction : digestion restriction, PCR.....

رحلان كهربائي تحليلي: يهدف إلى تقدير طول الشدف المختلفة من DNA وتحديد كمياتها وذلك بالمقارنة مع أطوال واسمات معيارية (سلم DNA) كما يهدف إلى تحليل نتائج تفاعلات كيميائية تجري على DNA، نواتج تقطيع DNA أو نواتج تفاعلات PCR.

Electrophoresis is used

As **a preparative technique** to separate one DNA fragment

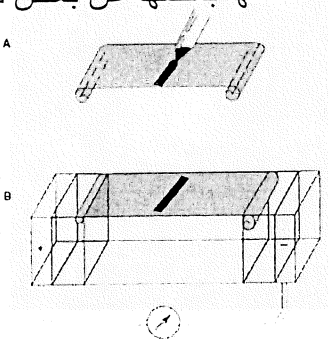
رحلان كهربائي تحضيري: يهدف إلى فصل شدف DNA عن بعضها ومن ثم تنقية الشدف من الهلام، عن طريق قطع الهلام حول الشدفة بالطول المطلوب ومن ثم تنقية DNA.

الرحلان الكهربائي للبروتينات Protein electrophoresis

هي طريقة تحليلية لدراسة البروتينات سواءً كانت منقاة أو بشكل خلاصة بروتينية.

Since proteins exist as charged particles, this method is widely used for the separation of proteins in biological fluids.

بما أن البروتينات جزيئات مشحونة ، يمكن الاستعمال الرحلان الكهربائي لفصلها بعضها عن بعض في أي سائل بيولوجي أو في أي خلاصة خلوية



The technique was first used by Tiselius in 1937; named frontal electrophoresis.

(Nobel Prize in 1948)

أنماط الرحلان الكهربائي للبروتينات

الرحلان الأفقي

الرحلان العمودي

Support Medium for Electrophoresis

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

Filter Paper أوراق ترشيح

Cellulose Acetate sheet أوراق خلات السللوز

Agar or Agarose