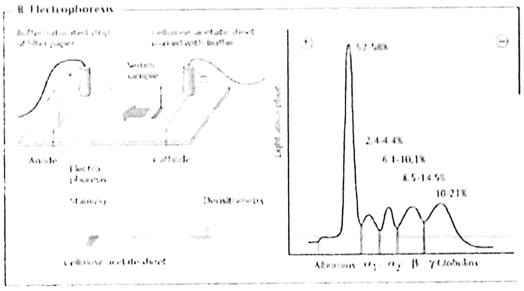
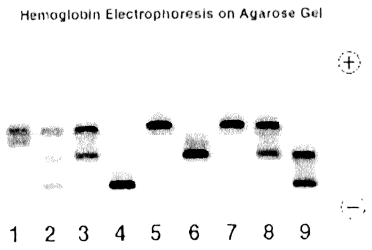
يمكن استعمال الرحلان الكهربائي لأهداف طبية تشخيصية أو لأهداف بحثية.

رحلان بروتينات مصل الدم: لتحديد كمية الأنماط المختلفة من البروتينات في مصل الدم؛ ألبومينات، وغلوبينات ألفا وبيتا وغاما، يمكن بوساطته كشف بعض أبيضاضات الدم مثل النقيوم المتعدد...
رحلان الخضاب: يكشف بواسطته الهيموغلوبينات غير الطبيعية؛ فقر دم منجلي، وتلسيميا...





Polyacrylamide-gel Electrophoresis
PAGE
أنماط الرحلان على هلامة من عديد الأكريلاميد:

•Native PAGE

يستعمل في هذا النمط من الرحلان الهلامات غير الممسخة non-denaturing gels

يستعمل لتحليل البروتينات في حالتها المطوية folded state وتعتمد حركية الرحلان على نسبة الشحنة إلى الكتلة charge-to-mass ratio (الشحنة تعتمد على محتوى البروتين من الحموض الأمينية وعلى pH دارئة الرحلان والتي غالباً ما تكون قريبة من المعتدل لتفادي التمسخ الحمضي أو القلوي) وعلى الشكل الفراغي للبروتين (حجم البروتين).

higher mobility for more compact conformations, lower for larger structures like oligomers

تتصف بدقة الفصل المنخفضة low resolution
لها استعمالات خاصة تتطلب المحافظة على شاكلة البروتين (البنية ثلاثية البعاد).
مثلاً: الكشف عن الفعالية الأنزيمية.

SDS polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE)

يعتمد على فصل البروتينات حسب كتلتها الجزيئية النسبية .Mr

isoelectric focusing أو (IEF)

يعتمد على فصل البروتينات حسب شحنتها.

الرحلان ثنائي البعد

Two-dimensional -Gel Electrophoresis

يعتمد على فصل البروتينات حسب شحنتها في المرحلة الأولى ثم حسب كتلتها في المرحلة الثانية (الرحلان ثنائي البعد).

SDS-PAGE

تستخدم لفصل مكونات مزيج من البروتينات ولتعيين كتلتها الجزيئية النسبية Mr لبروتين ما.

تعالج العينة البروتينة المراد ترحيلها بدارئة تحوي :

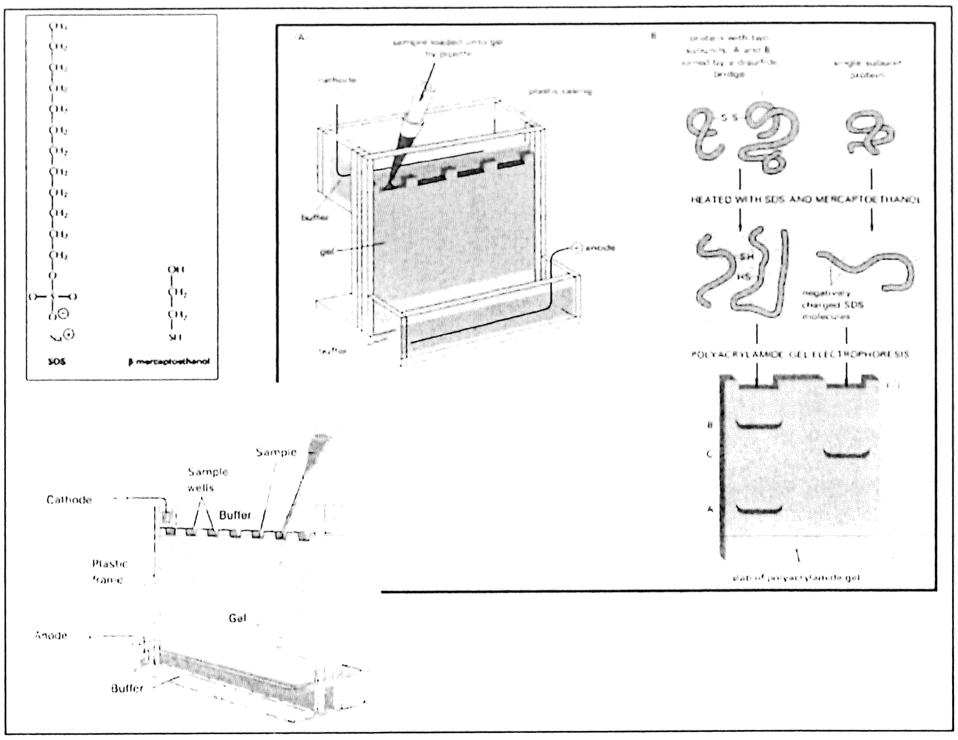
منظف مشحون بشحنة سلبية عالية negatively charged detergent:

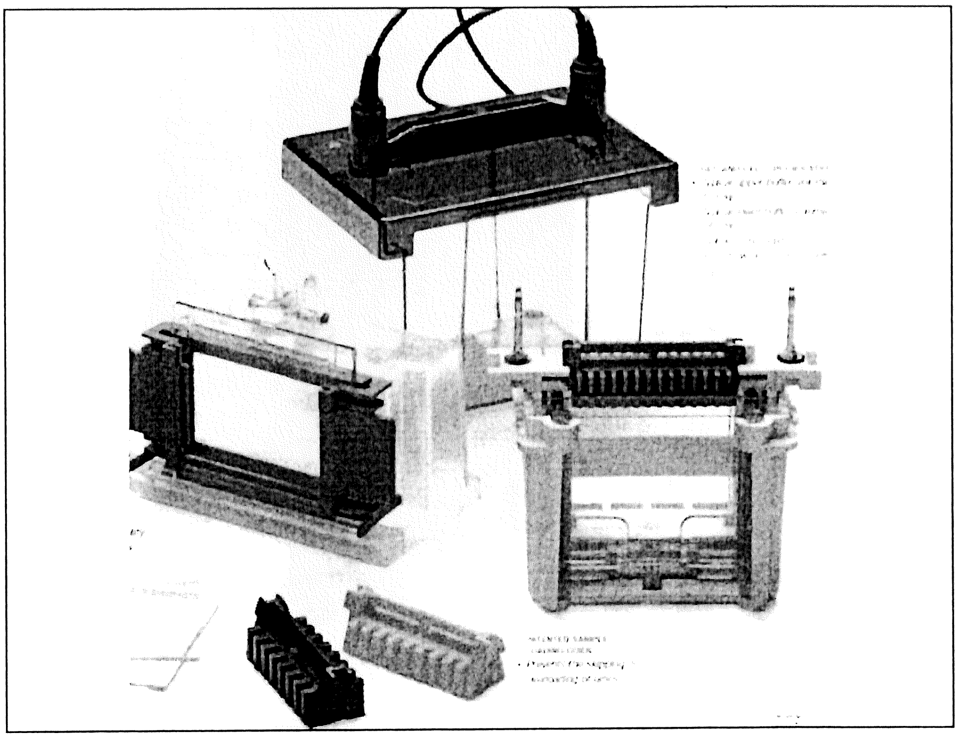
سلفات دوديسيل الصوديوم SDS.

- يفرد السلاسل عديدة الببتيد إلى سلاسل خطية.
- يحرر البروتينات من ما هو مرتبط بها من بروتينات أخرى ولبيدات.
- يشحن السلاسل الببتيدية بشحنة سالبة قوية (يلغي الشحنة الأساسية للبروتين).

مرجع قوي reducing agent: βميركابتو الايتانول β-mercapto-ethanol

- يحطم الروابط (الجسور) الكبريتية ضمن البروتين مما يؤدي إلى فصل السلاسل العديدة الببتيد المكونة للبروتين الوظيفي الواحد عن بعضها البعض.


SDS
β mercaptoethanol
HEATED WITH SDS AND MERCAPTOETHANOL
negatively charged SDS molecules
POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS
Sample
Sample wells
Cathode
Buffer
Plastic frame
Gel
Anode
Buffer



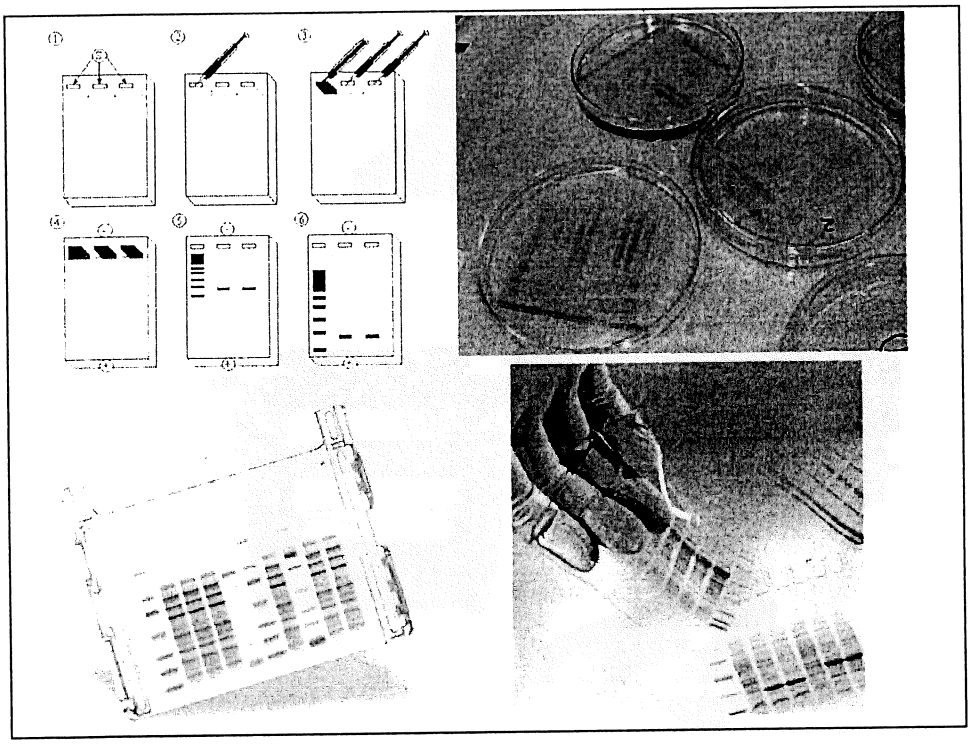
مبدأ طريقة SDS-PAGE:

- يمرر التيار الكهربائي فتهاجر العينات من القطب السالب نحو القطب الموجب.
- بعد انتهاء عملية الترحيل تلون الهلامة لإظهار العصائب المختلفة المميزة للبروتينات.

أهم الملونات: - ازرق الكومازي 100ng من البروتين

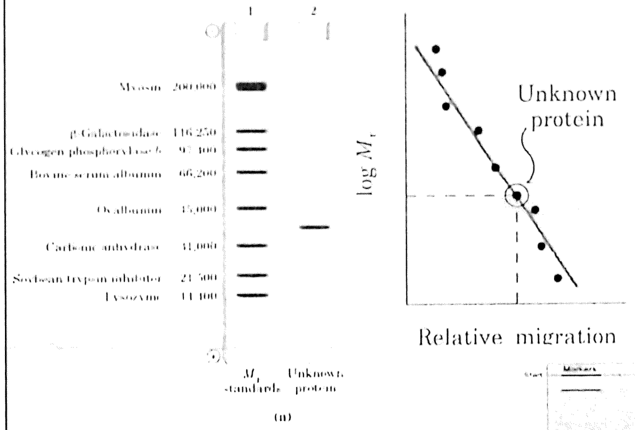
- نترات الفضة 0.1ng من البروتين
- مواد مفلورة اليفة للبروتينات Sypro orange, red

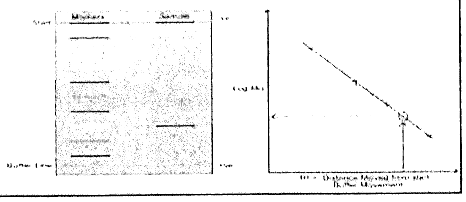
- بفضل ترحيل في احد الآبار بروتينات معيارية (واسمات كتل جزيئية معيارية) يمكن تحديد الكتلة الجزيئية النسبية لبروتين مجهول.



تعين الكتلة الجزيئية النسبية لبروتين مجهول بطريقة الرحلان الكهربائي

حركية عديد بيبتيد على هلامة الرحلان الكهربائي على علاقة عكسية مع لوغرتم كتلته النسبية



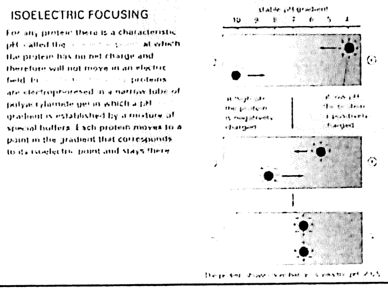


الرحلان الكهربائي الذي يعتمد على فصل البروتينات حسب شحنتها يستخدم تقنية تعرف بـ isoelectric focusing أو (IEF)

تعتمد هذه الطريقة على:

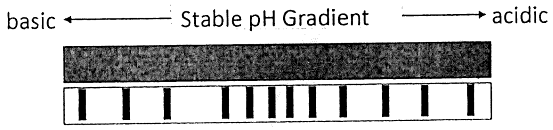
نقطة التساوي الكهربائية للبروتين isoelectric point (pI)

وهي بالتعريف قيمة pH الوسط التي تصبح عندها مجموع شحنات البروتين تساوي الصفر (تتساوى الشحنات السالبة والموجبة) وبالتالي لا يعود يمكنه الهجرة ضمن حقل كهربائي فيتوقف في نقطة تعرف بنقطة التساوي الكهربائي.



<u>مبدأ الطريقة :</u>

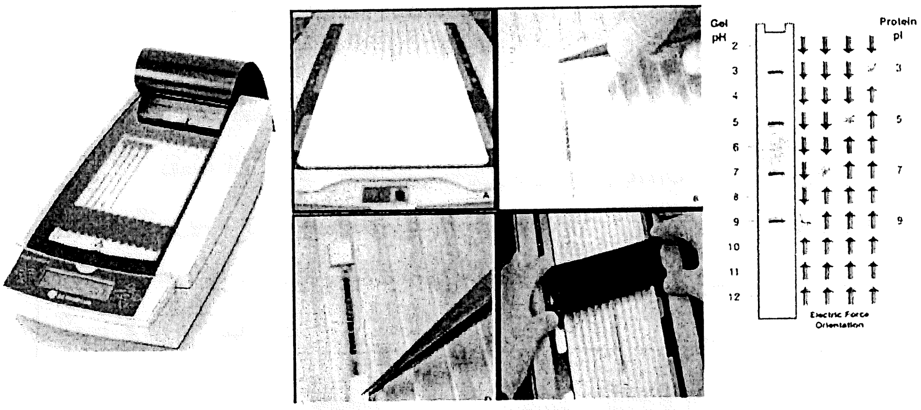
تحضر هلامة فصل خاصة من عديد الأكرلاميد تعرف بـ immobilized pH gradient gel أو (IPG gel) تحوي ضمن مادتها تدرج ثابت لـpH من pH المنخفض إلى pH المرتفع.



تعالج العينة بدارئة تحوي:

- منظف غير مشحون و/أو مرجع قوي ← حل البروتينات وتمسيخها و فصلها إلى سلاسل بيبتيدية منفصلة دون تغير شحنتها.

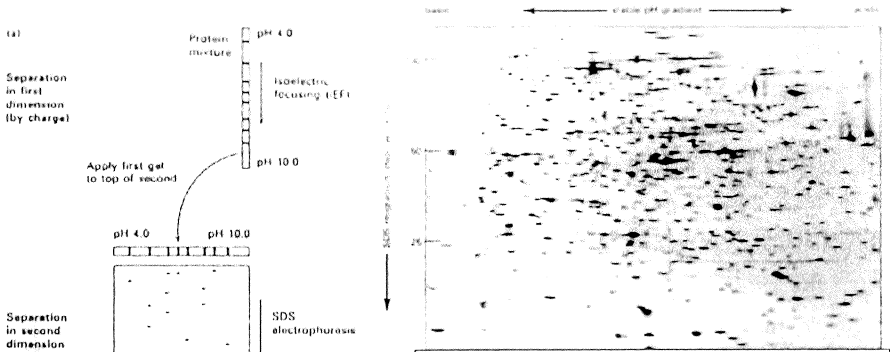
- توضع العينة على الهلامة ويطبق فرق كمون عالي فتهاجر البروتينات حسب pI



Separation of SERVA IEF Marker Liquid Mix (pI 3.5 – 10.5) on SERVA IPG *Blue*Strips pH 3 – 10 (*Cat. No. 43012.01*, length: 18 cm)

Two-dimensional -Gel Electrophoresis الرحلان الكهربائي ثنائي البعد

يعتمد على فصل البروتينات حسب شحنتها في المرحلة الأولى ثم حسب كتلتها في المرحلة الثانية.



two-dimensional الخريطة البروتينية ثنائية البعد لأحد أنماط الجراثيم protein map

The technique has such great resolving power that it can distinguish between two proteins that differ in only a <u>single charged amino acid</u>.

تتمتع هذه الطريقة بدقة فصل عالية حيث يمكن بوساطتها الفصل بين بروتينين يختلفان عن بعضهما بحمض أميني واحد مشحون.

Immuno-blotting, Western blotting
التبصيم المناعي

تقانة تكشف بروتين معين بعد أن يتم تجزئة fractionation خلاصة بروتينية بالرحلان أحادي أو ثنائي البعد
بالاعتماد على مبدأ تآثر ضد-مستضد.

مراحل العمل:

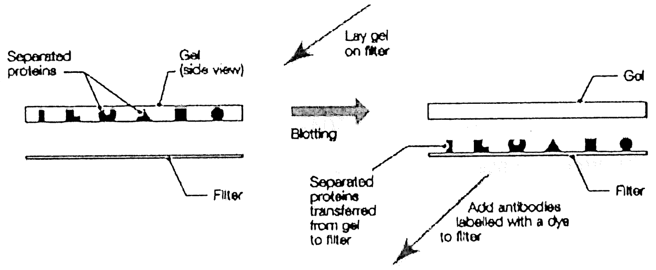
- فصل بروتينات مزيج ما (خلاصة خلوية) باستخدام الرحلان الكهربائي.
- صنع بصمة للهلامة بنقل البروتينات منها إلى حامل يمكن معالجته بالضد النوعي الكاشف (لاستحالة معالجة الهلامة).
-الكشف عن البروتين المدروس على الحامل باستخدام أضداد موسومة نوعية تجاه هذا البروتين.

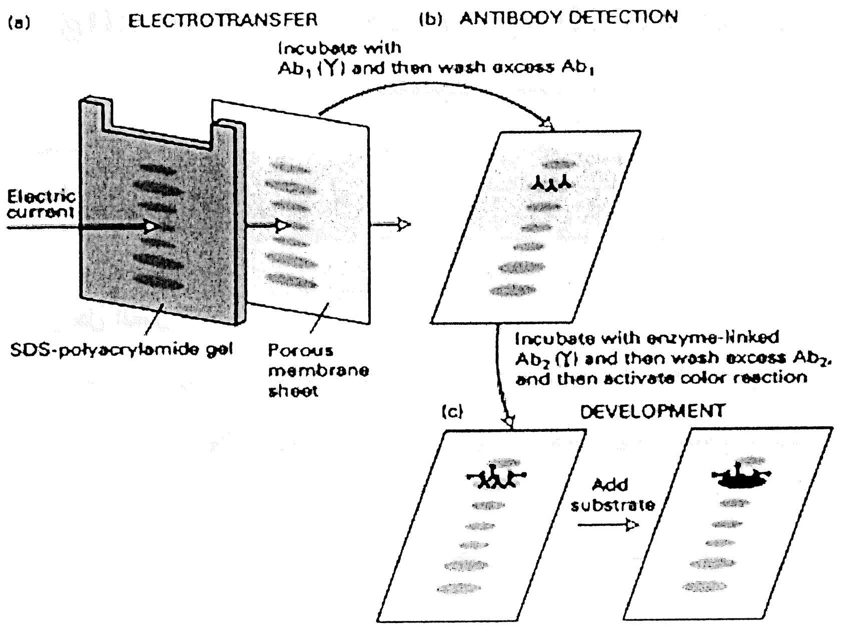
النقل Transfer أو Blotting:

حتى نستطيع الكشف عن البروتينات الهدف باستخدام الأضداد النوعية فإنه لابد من نقلها بعد عملية الرحلان من الهلام إلى حامل قابل للمعالجة وهو غالباً غشاء من مادة النتروسيللوز.

تتم عملية النقل باستخدام التيار كهربائي حيث تهاجر البروتينات المشحونة سلباً ضمن حقل كهربائي من الهلام عند القطب السالب إلى الغشاء المقابل للقطب الموجب متخذةً نفس وضعها في الهلام، لذلك يعتبر الغشاء بصمة لهلامة الرحلان.

– يمكن التأكد من جودة النقل بتلوين الهلامة بأزرق الكومازي.





الكشف Detecting:

يتم الكشف على مرحلتين:

- يتم في المرحلة الأولى إضافة **الضد الأولي** (نوعي تجاه البروتين الهدف المطلوب الكشف عنه) إلى الغشاء حيث سيرتبط بالبروتينات الهدف.

تتم في المرحلة الثانية إضافة **الأضداد الثانوية** للغشاء وهي أضداد نوعية موجهة ضد الأضداد الأولية.

تكون الأضداد الثانوية موسومة بمادة تسمح بالكشف عنها: مادة مشعة أو مفلورة أو أنزيم.

- إذا كان الضد الثانوي موسوم بأنزيم يتم إضافة الركيزة المولدة للون التي تعطي رسابة ملونة.