

كلية الصيدلة

Faculty of Pharmacy

السنة الثالثة

مقرر الهندسة الوراثية (الجينية)

المحاضرة الرابعة

2019-2020

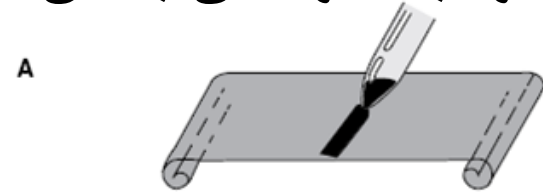
د. شادي سكرية

الرحلان الكهربائي للبروتينات Protein electrophoresis

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

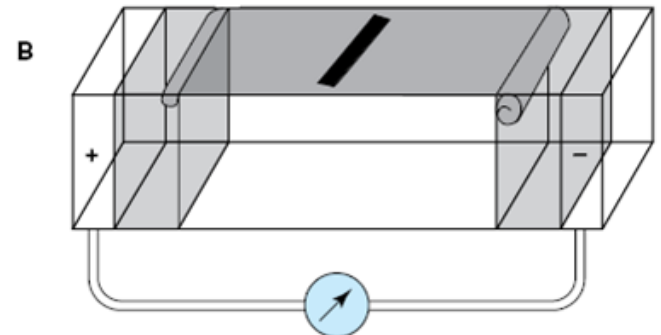
Since proteins exist as charged particles, this method is widely used for the separation of proteins in biological fluids.

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 العمودي

الرحلان الأفقي

Support Medium for Electrophoresis

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

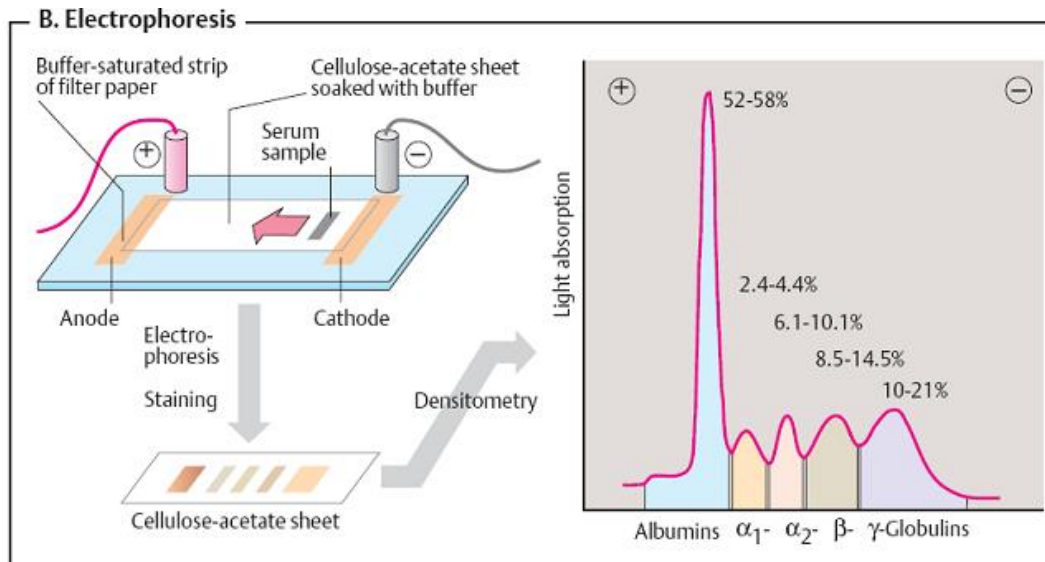
Filter Paper أوراق ترشيح

Cellulose Acetate sheet أوراق خلاص السللوز

Agar or Agarose

يمكن استعمال الرحلان الكهربائي لأهداف طبية تشخيصية
أو لأهداف بحثية.

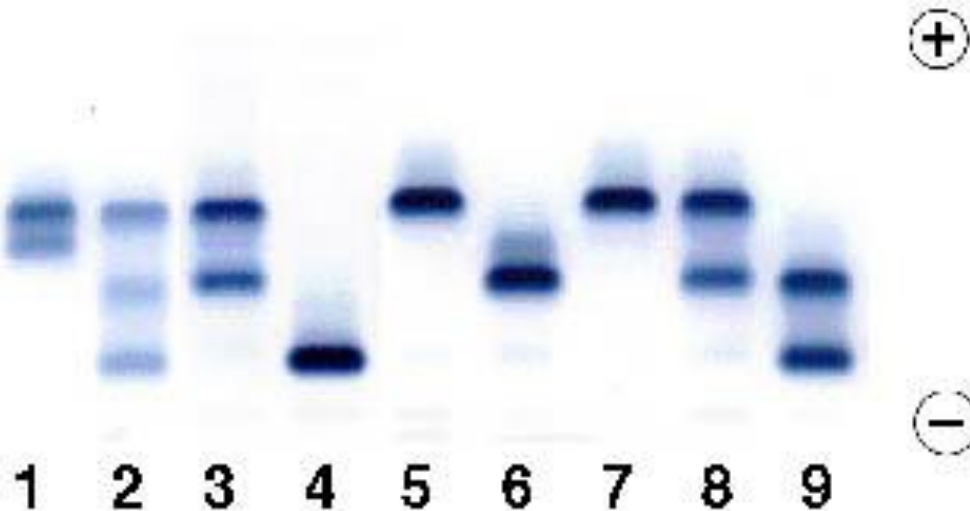
رحلان بروتينات مصل الدم: لتحديد كمية الأنماط المختلفة
من البروتينات في مصل الدم؛ ألبومينات، وغلوبيينات ألفا
وبيتا و غاما، يمكن بوساطته كشف بعض أبيضاضات الدم
مثل النقيوم المتعدد...



يمكن استعمال الرحلان الكهربائي لأهداف طبية تشخيصية
أو لأهداف بحثية.

رحلان الخضاب: يكشف بواسطة الهيموغلوبينات غير
الطبيعية؛ فقر دم منجلي، وتلسميا...

Hemoglobin Electrophoresis on Agarose Gel



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 دائرة الرحلان والتي غالباً ما تكون قريبة من المعتدل لتفادي التمسح 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 M_r لبروتين ما.

تعالج العينة البروتينية المراد ترحيلها بدارئة تحوي :

منظف مشحون بشحنة سالبة عالية negatively charged detergent :

سلفات دوديسيل الصوديوم SDS.

- يفرّد السلاسل عديدة البيبتيد إلى سلاسل خطية.

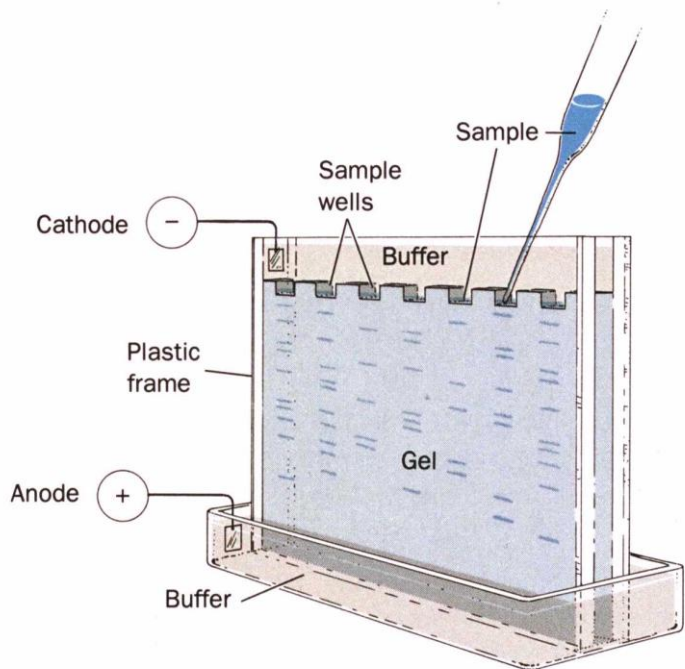
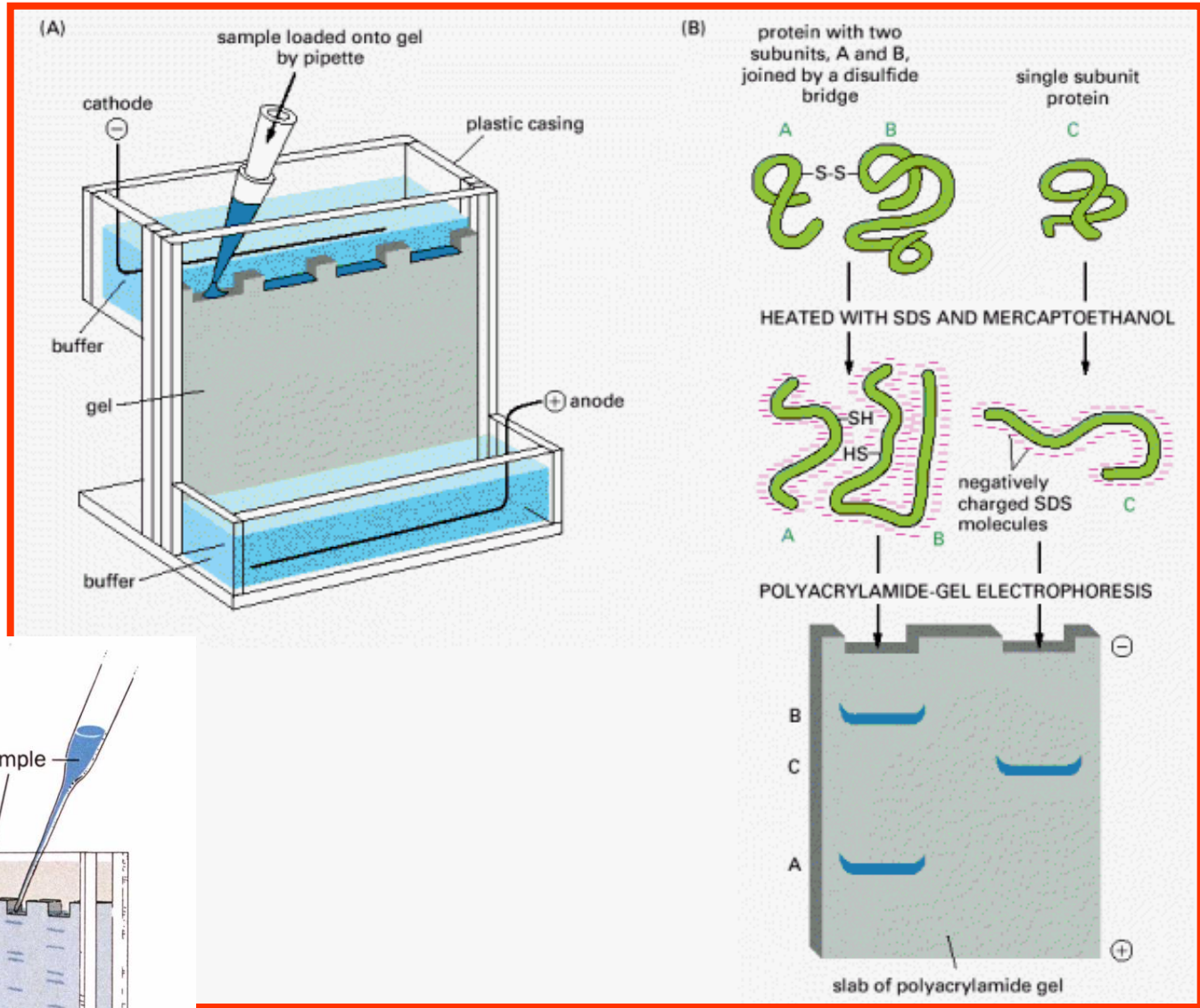
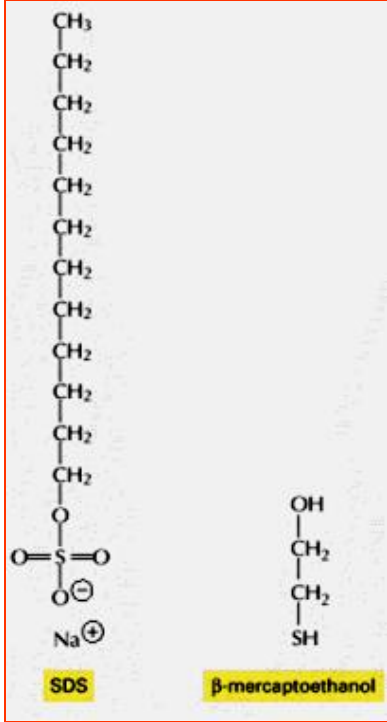
- يحرر البروتينات من ما هو مرتبط بها من بروتينات أخرى ولبيدات.

- يشحن السلاسل البيبتيدية بشحنة سالبة قوية (يلغي الشحنة الأساسية للبروتين).

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

- يحطم الروابط (الجسور) الكبريتية ضمن البروتين مما يؤدي إلى فصل السلاسل العديدة

البيبتيد المكونة للبروتين الوظيفي الواحد عن بعضها البعض.





GEL AND CELL SPECIFICATI

- Typical upper buffer volum
120 ml
- Typical lower buffer volum
180 ml
- Cell accommodates
8.3 cm (w) x 7.3 cm (l) gel

**PATENTED SAMPLE
LOADING GUIDE***

- Prevents the skipping or
overloading of lanes

*US Patent No. 5,656.
**US Patent No. 5,632.

مبدأ طريقة SDS-PAGE:

- يمرر التيار الكهربائي فتهاجر العينات من القطب السالب نحو القطب الموجب.

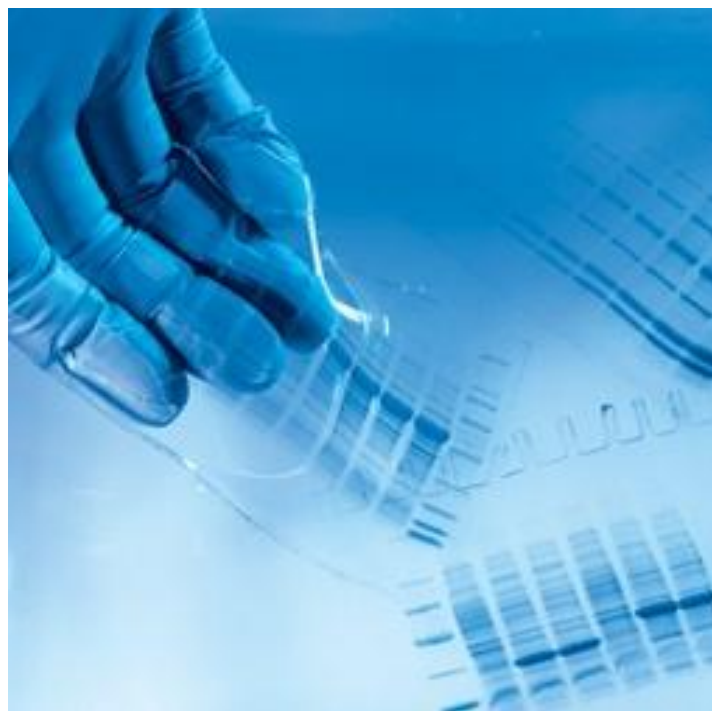
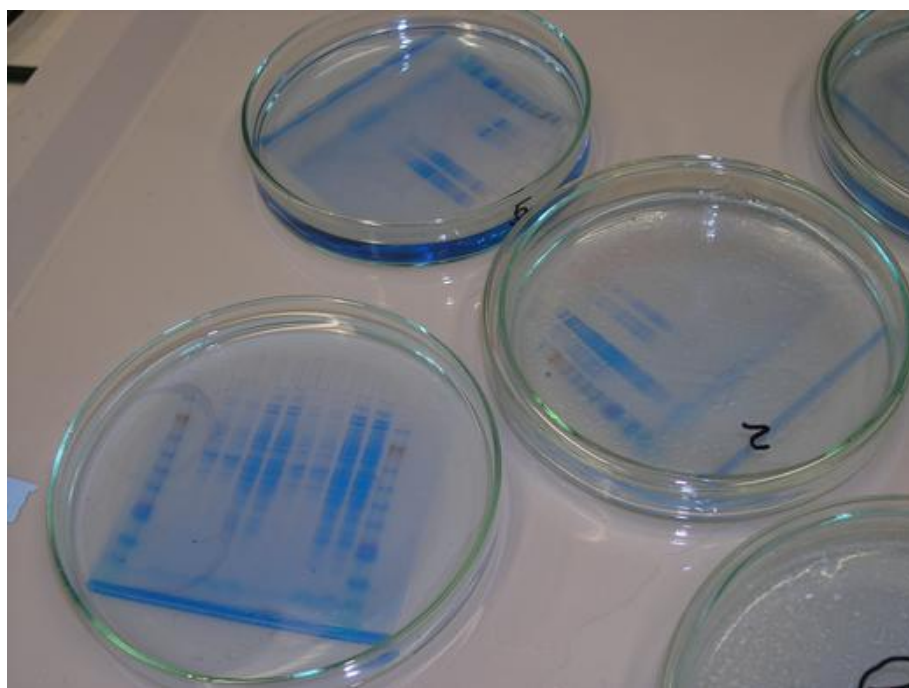
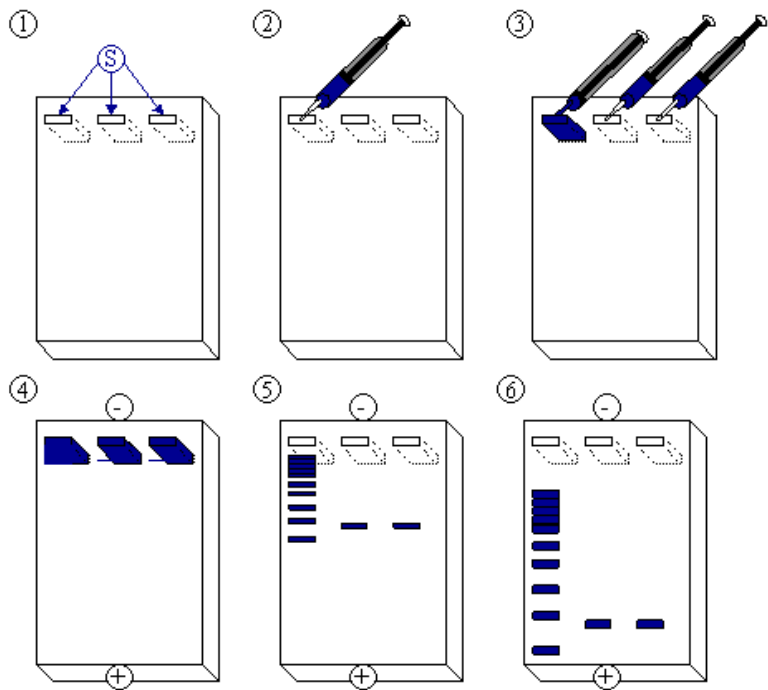
- بعد انتهاء عملية الترحيل تلون الهلامة لإظهار العصابات المختلفة المميزة للبروتينات.

أهم الملونات: - أزرق الكومازي 100ng من البروتين

- نترات الفضة 0.1ng من البروتين

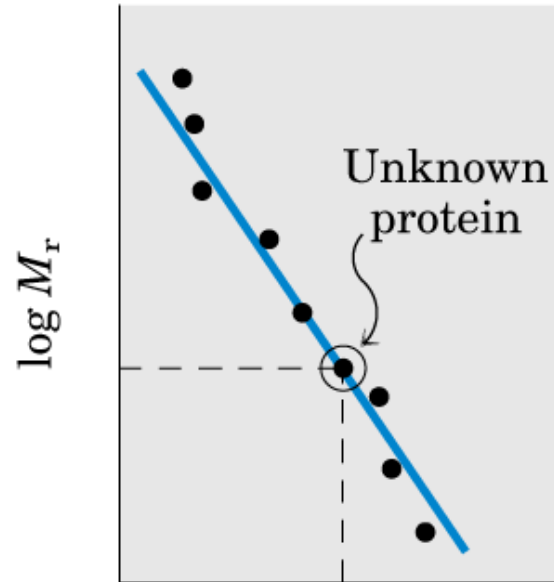
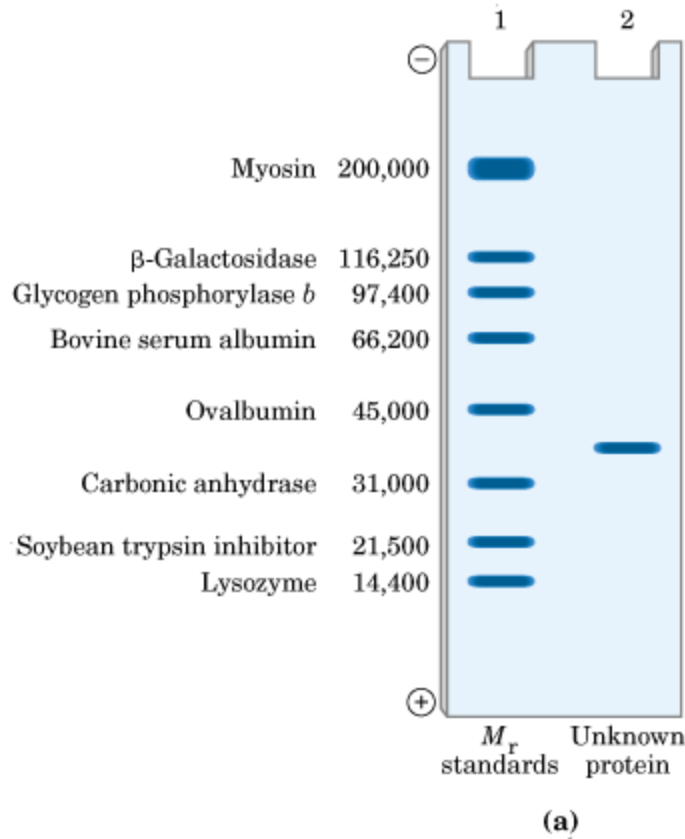
- مواد مفلورة اليفة للبروتينات Sypro orange, red

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

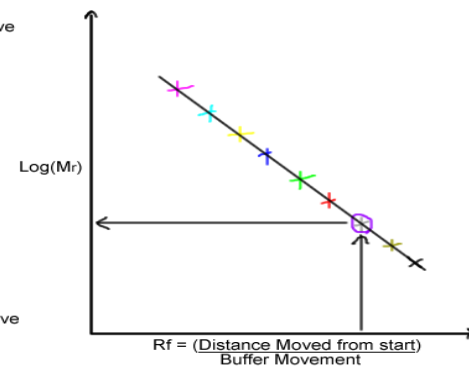
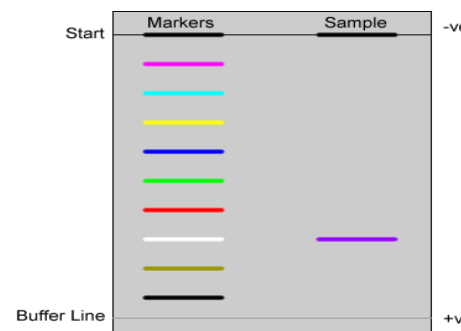


تعيين الكتلة الجزيئية النسبية لبروتين مجهول بطريقة الرحلان الكهربائي

حركية عديد بيبتيد على هلام الرحلان الكهربائي على علاقة عكسية مع لوغرم كتلته النسبية



Relative migration



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

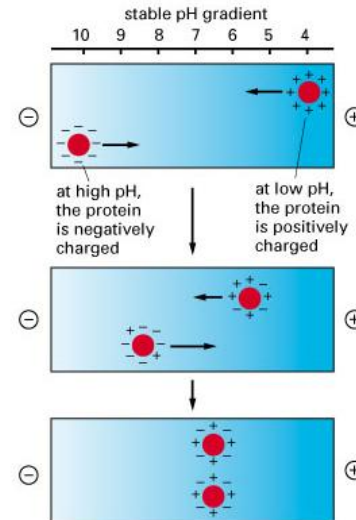
تعتمد هذه الطريقة على:

نقطة التساوي الكهربائي للبروتين (pI) isoelectric point

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.

ISOELECTRIC FOCUSING

For any protein there is a characteristic pH, called the **isoelectric point**, at which the protein has no net charge and therefore will not move in an electric field. In **isoelectric focusing**, proteins are electrophoresed in a narrow tube of polyacrylamide gel in which a pH gradient is established by a mixture of special buffers. Each protein moves to a point in the gradient that corresponds to its isoelectric point and stays there.



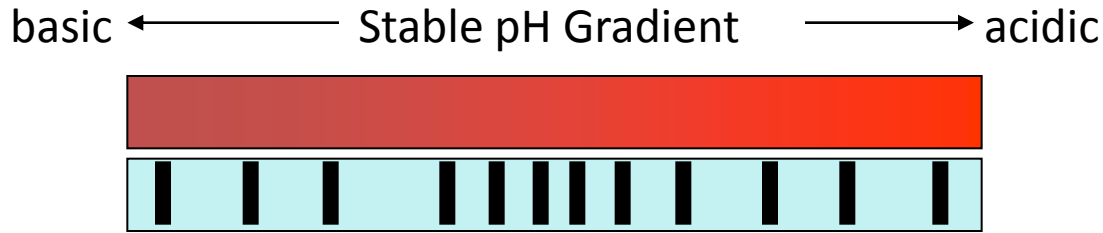
The protein shown here has an isoelectric pH of 6.5.

مبدأ الطريقة :

تحضر هلامة فصل خاصة من عديد الأكرلاميد تعرف بـ

immobilized pH gradient gel أو **(IPG gel)**

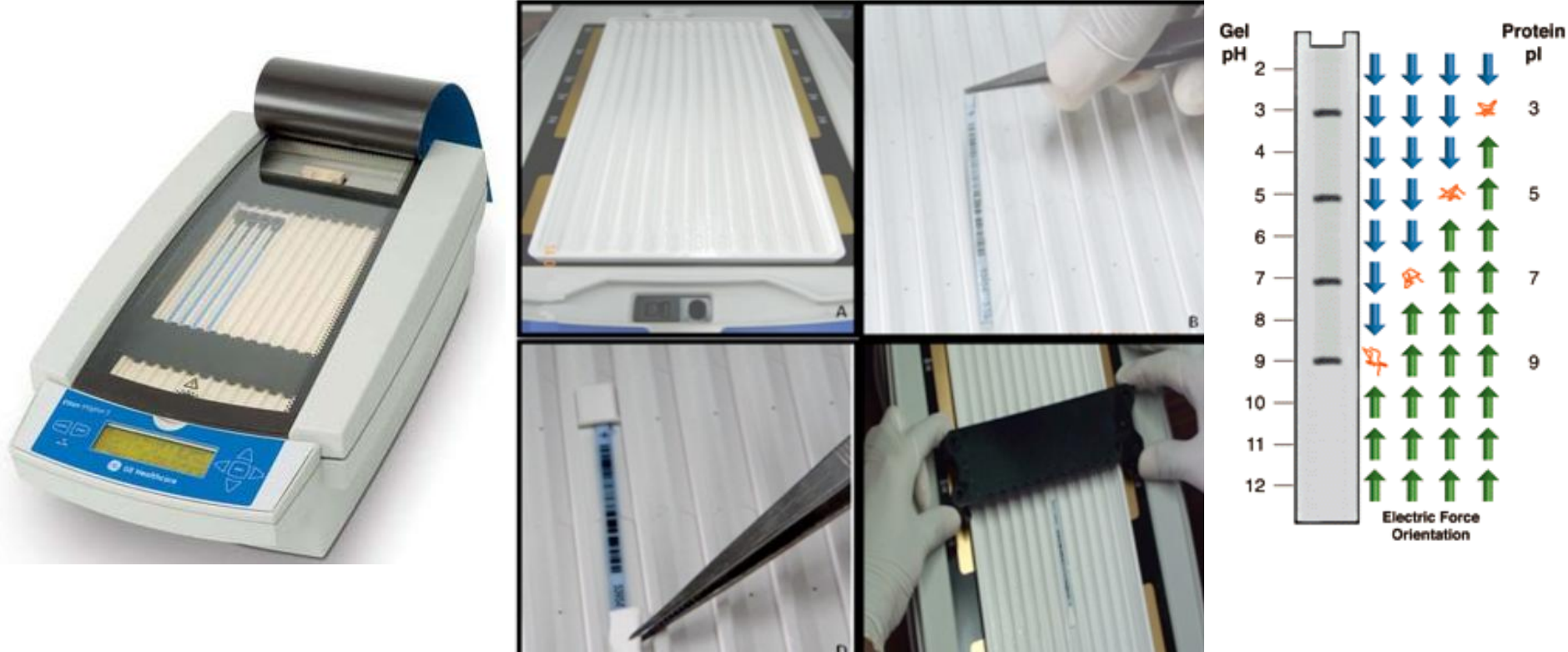
تحتوي ضمن مادتها تدرج ثابت لـ pH من pH المنخفض إلى pH المرتفع.



تعالج العينة بدائرة تحوي:

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

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



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