الترحيل الكهربائي في هلام الأجاروز Agarose gel electrophoresis

ملاحظة: إن صبغة بروميد الاثيديوم هي مادة مطفرة معروفة, ويجب أن تعامل كمادة كيمياوية خطرة – لذا يجب لبس القفازات عند التعامل مع هذه المادة.

جهاز الـ transluminator, والذي يعرف أيضاً جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV lightbox, يتيح الجهاز رؤية قطع الـ DNA المصبوغة بصبغة بروميد الاثيديوم في الجل.

ملاحظة: يجب استعمال واقيات للعين عند مشاهدة جزيئات الـ DNA بهذا الجهاز, وذلك لحماية العينين من الأشعة فوق البنفسجية

الأدوات:

فلاسكة 500 مل –مخبار مدرج- Micropipette ماصات دقيقة (كلبسات لكل ماصة)

اجاروز- محلول الترحيل الترحيل 0.5x TBA- ماء مقطر- منظم التحميل Loading buffer bromophenol blue dye (بروموفينول بلو + سكروز)- **بروميد الإثيديوم** 2.5 µl ethidium bromide- عينات الـDNA المستخلصة

الاجهزة:

ميزان – ميكرويف - جهاز gel electrophoresis - جهاز الطاقة

طريقة العمل

- تلبس القفازات
- يوزن 2جرام من الاجاروز وتوضع في الفلاسكه ويضاف إليها المنظم 0.5x TBA 100مل ثم تمزج وتدخل الميكرويف إلى درجة الغليان (1.5-2 دقيقة) حتى يصبح لونها شفاف.
- نبرد المحلول إلى درجة حرارة تقريبا - 60°C-ً, تضاف صبغة **بروميد الإثيديوم 2.5 µl** ethidium bromide **, وتمزج** **(المادة خطرة ومسرطنة ويجب استخدام كبينة سحب الهواء عند إضافتها- والحوامل تبتعد عنها بسبب انه مادة مطفره)** تم ننتظر حتى تقل درجة حرارتها إلى حوالي 45مْ
- يجهز وعاء صب الجل gel casting tray, والذي يتوفر باحجام متعددة, ويوضع المشط في مكانه(بحيث لا يكون قريب من السطح السفلي حتى لا يحدث تمزق عند نزعة وتتسرب العينة أسفل الجل بارتفاع 0.5 – 1.0 mm) ويثبت على الحامل البلاستيكي . و الجل سائل(ساخن قليلاً) يصب بهدوء حتى لا تتكون فقاعات(حتى لا تعيق مرور قطع DNA). يكون سمك الجل ما بين 3 mm إلى 5 mm.
- يترك حتى يتماسك تماما, بعدها تزال الأمشاط و الحامل تم ينقل على حوض الرحلان بحيث تكون جهة الحفر إلى القطب السالب .
- يعبئ الحوض بالمحلول المنظم 0.5x TBA حتى يغطي الحفر تماما 1mm .

- تجهز عينة الDNA بإضافة DNA 7µL + 3 µL من (Loading buffer) bromophenol blue dye وتمزج جيدا .
- تحمل العينة باستخدام الماصة الدقيقة في الحفر المخصصة .
- تكون أول حفرة
- يوضع الغطاء ويوصل جهاز الطاقة على فولت 80 لمدة 45 دقيقة.لبدا عملية الترحيل الكهربائي(يجب مشاهدة الفقاعات الصغير من الأقطاب التي تدل على عمل جهاز الطاقة)
- بعد انتهاء الترحيل الكهربائي, يغلق جهاز الطاقة وتنزع الأقطاب , يرفع الغطاء . يحمل وعاء صب الجل ويوضع في وعاء التصبيغ ببروميد الاثيديوم.باستخدام جهاز UV transluminator , يتم مشاهدة عينات الـ DNA وهي مصبوغة بصبغة بروميد الاثيديوم, باستخدام طول موجي 300-360 nm. (مراعاة استخدام القفازات في كل الخطوات).

هناك العديد من الطرق المستعملة لقياس نقاوة DNA في العينة منها:

جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer

تقاس نقاوة الأحماض النووية عند طول موجي 260 و280

= 260 مقسمة على 280 وتسجل القراءة

طريقة العمل:

1) يصفر الجهاز بواسطة المحلول المنظم المستخدم في حفظ محلول الاحماض النووية المرسب بوضع 1 مل منه لوحده في cuvette.

2) تغسل الكيوفيت بالماء المقطر وتوضع 1مل من محلول الاحماض النووية المراد قياسه وتقاس الامتصاصية على 280 ثم تقاس على .260

3) لمعرفة تقدير نقاوة الـDNA في المحلول تطبق المعادلة :

تقدير نقاوة الـDNA

$$\text{Purity of DNA} = \frac{\text{O.D}_{260}}{\text{O.D}_{280}} \geq 1.8$$

أي تحسب امتصاصية عينة الـDNA عند الطول الموجي 260 نانوميتر ثم تحسب الامتصاصية للعينة نفسها عند الطول الموجي 280 نانوميتر وبعد قسمة الامتصاصية الاولى على الثانية يجب ان يكون الناتج اكبر من او يساوي 1.8 واذا كان اقل فهذا يعني ان العينة غير نقية وتحتاج تنقية او اعادة استخلاص.