

تقنية الكهترهجير Electrophorèse

مقتطف من كتاب علوم الحياة-بيوكيمياء، م. بعزيز، 2012

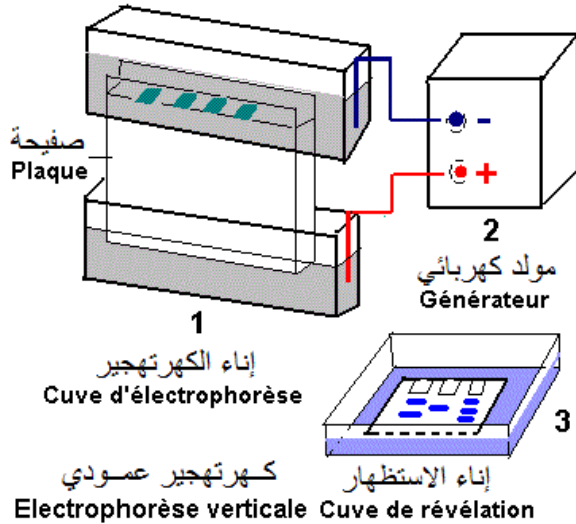
Extrait du livre Sciences de la vie. Biochimie, M. Baaziz, 2012

<http://www.takween.com/transition-secondaire-superieur/sciences-vie-biochimie-sommaire.html>

تقنية التهجير الكهربائي (كهترهجير، Electrophorèse)

ترتكز تقنية التهجير الكهربائي (كهترهجير، Electrophorèse) على استغلال خاصية التأين (Ionicité) التي تعطي شحنة كهربائية معينة للجزيئات في وسط ذو رقم هيدروجيني (pH) معين. بإمكان الكهترهجير أن تعطي معلومات عن وزن الجزيئات في حالة تساوي الشحنات الكهربائية للمواد الخاضعة للعزل. في حالة اعتماد خاصيتين في الكهترهجير، يمكن التدخل لاعطاء الأولوية لخاصية معينة على حساب الأخرى. يتم ذلك بمعالجة مسبقة للمستخلصات، مثل ربط كل البروتينات بالمنظف SDS سالب الشحنة الكهربائية (-) الذي يكسبهم نفس الشحنة ليتم فرزهم من خلال حجمهم، فقط. تتطلب تقنية الكهترهجير ثلاثة مستلزمات مهمة:

- وسط للهجرة (Support de migration) توضع فوقه المستخلصات و يعبأ داخل إناء الكهترهجير (Cuve d'électrophorèse). يتكون هذا الوسط من مواد مختلفة، مثل الورق و الأغاروز (Agarose) و النشا (Amidon) و عديد الأكريلاميد (Polyacrylamide).
- مولد كهربائي (Générateur de courant électrique) يزود وسط العزل بالتيار الكهربائي في صيغة فولت (Volt) أو ميليأمبير (Milliampere).
- إناء للاستظهار (Cuve de révélation) يستعمل في نهاية العزل حيث يوضع فيه وسط العزل لاستظهار المواد المفززة بالتلوين أو التفاعل مع مواد أخرى.

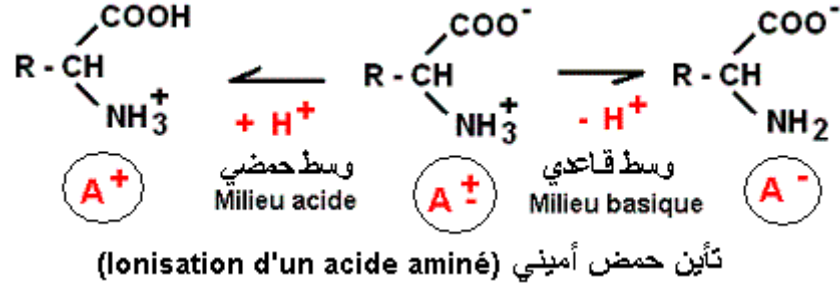


اعتمادا على الوضعية العمودية أو الأفقية لوسط العزل، يقسم الكهترهجير إلى كهترهجير عمودي (Electrophorèse verticale) أو كهترهجير أفقي (Electrophorèse horizontale)، بالتالي. يوضح الرسم الموالي المزيد من المعلومات عن الكهترهجير العمودي. بالإمكان تقسيم تجارب الكهترهجير إلى ثلاثة مراحل من بينها مرحلة استخلاص الجزيئات المراد عزلها و تحليلها من مصادر بيولوجية متنوعة و مرحلة تهيئ مسط العزل ثم انطلاق الكهترهجير و المرحلة الثالثة التي تخص الاستظهار أو التلوين (Révélation, coloration) قصد المعاينة النظرية لنواتج العزل.

كهترهجير البروتينات

في حالة كهترهجير البروتينات، يلعب الرقم الهيدروجيني (pH) للمحاليل دورا هاما في الكهترهجير لكون البروتينات مكونة من أحماض أمينية تحتوي بدورها على مجموعتي الأمين والكاربوكسيل (ثنائية القطب). و عليه فإن الأحماض الأمينية تعمل كحامض أو كقاعدة وتسمى أمفوتيرية (Amphotères)

أي تفقد وتكتسب بروتونا (أنظر الرسم التالي).



لهذا فإنها إذا وضعت في محاليل حامضية قوية، تتقبل بروتونا وتتشحن + (A⁺) وإذا وضعت في محاليل قاعدية قوية تفقد بروتونا وتتشحن سالبة - (A⁻)، أما في نقطة التعادل الكهربائي (Point isoélectrique, PI) أي pH الذي تتساوى فيه عدد (+) مع (-)، فمحصلة الشحنة الكهربائية تساوي صفر (وضعية A[±]). لكل بروتين نقطة PI معينة. إذا وضع البروتين في وسط ذو pH أصغر من PI الذي يميزه، فسيشحن (+) ويهاجر نحو المهبط (- Cathode, pôle). أما إذا وضع في محلول ذو pH أكبر من PI، فسيشحن (-) و يندفع إتجاه المصعد (+ Anode, pôle).

كهترتهجير الأحماض النووية

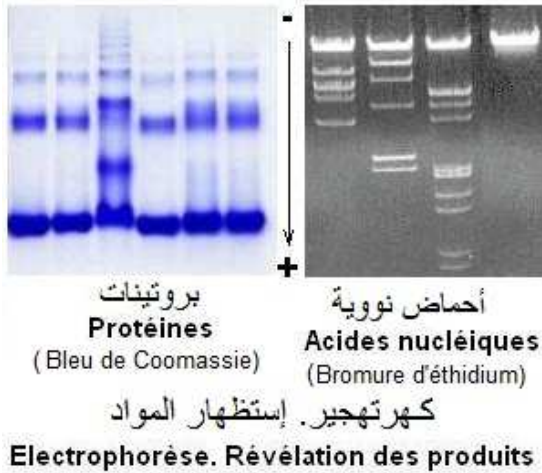
إذا كانت جزيئات الفرز بالكهترتهجير من نوع الأحماض النووية، ستتجه كلها نحو المصعد (+) لكون شحنتها سالبة (-) نظرا لوجود الفوسفات في بنيتها. وعليه، يكون عزل الأحماض النووية وفق وزنها فقط، إلا أن هناك بعض الحالات يلعب فيها شكل الأحماض النووية، خاصة في البلاسميد، دورا لا يستهان به في عملية الفرز، حيث يتميز البلاسميد 'مرتخي' الشكل (Plasmide sous forme relâchée) بهجرة بطيئة مقارنة بهجرة البلاسميد 'عالي الالتفاف' (Plasmide superenroulé).

وسط العزل (Support de migration).

يختلف وسط العزل (Support de migration) حسب نوعية الجزيئات المراد فرزها بالكهترتهجير. عند ظهور التقنية، كان وسط العزل في شكل سائل أو ورق، ثم تطور بعدها إلى شكل هلام (Gel) من نشا (Amidon)، مستخلص من البطاطس، و أغاروز (Agarose) مستخلص من الطحالب، و عديد الأكريلاميد (Polyacrylamide)، مزيج من مواد كيميائية تتحول من سائل إلى صلب. يمتاز كل وسط عن الآخر بدرجة الدقة في الفرز و سهولة الاستعمال. غالبا ما تستعمل مادة الأكاروز (تركيزات من 0,8% حتى 1,5%، تقريبا) في تركيبة وسط عزل الأحماض النووية، زيادة عن مادة البولي أكريلاميد الذي يستعمل بكثرة في حالة فرز البروتينات. عند ظهور تقنية عزل الأشباه الأنزيمية (isoenzymes, isozymes) بالكهترتهجير في 1960، اعتمد بالخصوص على النشا كوسط للعزل.

مرحلة الإستظهار (Révélation) في الكهترتهجير.

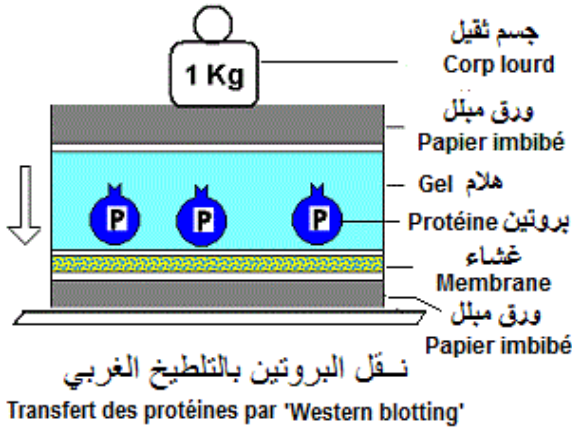
تختلف طرق استظهار (Révélation) مواد الفرز فوق وسط العزل حسب أنواع الجزيئات التي خضعت للكهترتهجير. فيما يخص البروتينات، فإنها غالبا تلون بالملون أزرق كوماسي (Bleu de coomassie) الذي يرتبط خصيصا بكل ما هو بروتين. إذا كان البروتين يتميز بنشاط أنزيمي معين، يصبح ممكنا استظهاره بإضافة مواد الأساس (Substrats) فوق وسط العزل، حتى تعطي نواتج واضحة للعين.



تدخل هذه الطريقة للاستظهار في ميدان الكشف عن الأشباه الأنزيمية (Révélation des isoenzymes).

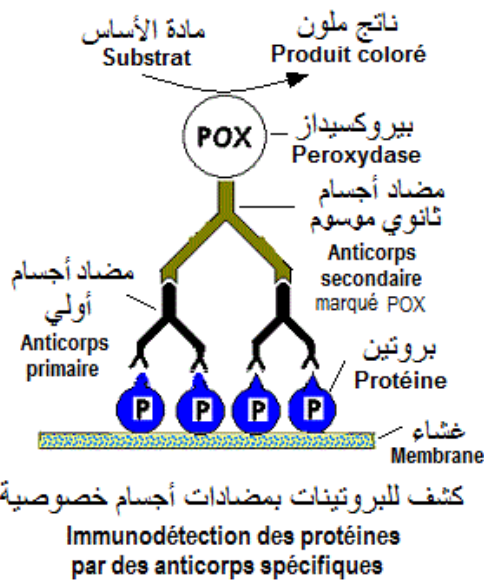
تستظهر الأحماض النووية فوق وسط العزل بإضافة المادة الكيميائية بروميد الإيتيديوم (Bromure d'éthidium) التي ترتبط معها ويكتشف المعقد عند تسليط أشعة بنفسجية (UV) على وسط العزل. تظهر للعين في الظلام أطراف الحمض النووي. تعطي الصور التالية توضيحات إضافية في استظهار البروتينات والأحماض النووية بعد نهاية عزلهم بتقنية الكهرتهجير.

تجدر الإشارة إلى أن هناك طرق أخرى لاستظهار مواد العزل في كهرتهجير البروتينات كما الأحماض النووية. في هذه الحالات، يصبح إلزاميا نقل محتويات وسط العزل (بروتينات أو أحماض نووية) إلى وسط من نوع آخر للتمكن من اكتشافهم. مثلا، من أجل اكتشاف البروتينات بالأجسام المضادة (Anticorps)، يتم نقلهم من الهلام (Gel) إلى غشاء مصنوع من النيتروسيلوز (Nitrocellulose).



يتم وضع هذا الغشاء فوق الهلام، ووضع مجموعة من طبقات أوراق الترشيح فوق ذلك (أنظر الرسم). ثم يتم وضع الطبقات كلها في محلول يقوم بالتنقل إلى الأعلى عبر الأوراق، جالبا البروتينات معه إلى الغشاء. تسمى هذه الطريقة في الاستظهار بـ 'التلطيح الغربي' (بالإنجليزية: Western blotting).

نقل البروتين بالتلطيح الغربي
Transfert des protéines par 'Western blotting'



كشف للبروتينات بمضادات أجسام خصوصية
Immunodétection des protéines par des anticorps spécifiques

يتم الكشف عن البروتينات بواسطة مضاد للأجسام مرتبط بمضاد أجسام ثانوي موسوم بأنزيم معين كالبيروكسيداز (Peroxydase, POX) الذي يفرز ناتج ملون يشير إلى موقع هجرة البروتين.

عندما يتعلق الأمر بنقل الأحماض النووية من الهلام إلى غشاء النيتروسيلوز (Nitrocellulose)، تسمى العملية بـ 'التلطيح الجنوبي' (Southern blotting). تستعمل هذه التقنية لاستظهار أطراف الأحماض النووية بمجسات (Sondes) معينة موسومة.