

MIRACLE Academy

قال تعالى (يَزَّعِجُ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أَوْتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ)

تفريغ البيوتكنو
زميلتكم حلا عبد الجابر



لجان الدُّفَعَات

Transformation and gel electrophoresis

تعني كيف ندخل الـ DNA لداخل الخلايا



Transformation

DNA transformation

- DNA can be exchanged among bacteria by three methods:
- **Transformation**: the most popular techniques of molecular genetics that first discovered in bacteria. Transformation works best when the donor and recipient cells are very closely related.
- **Transfection** is process by which foreign DNA is introduced into a cell by a virus or viral vector and is used mainly for mammalian cells
- **Conjugation**: introduction of gene strand through pilus



في عنا عدة طرق لإدخال الـ DNA لداخل الخلية :

الـ 1 Transformation : و هي أكثر طريقة مستخدمة لإدخال البلازميد بالبكتيريا ، ومثل ما قلنا ممكن ندخله للبكتيريا أو نعمل Lysis و Purification للخلية ونحصل الـ DNA تبعنا.

الـ 2 Transinfection : هو عن طريق استخدام Viral vector ، مثل ما حكينا سابقاً عن الـ Vector ، و هي الـ Bacteriophages .Mamalian cells

الـ 3 Introducing of gene strand : هي عن طريق الـ Pilus بنعمل

Transformation

- Chemical transformation, cell are made competent (able to take up exogenous DNA) by treatment with divalent cations such as calcium chloride, which make the bacterial cell wall more permeable to DNA.
- Heat shock is used to temporarily form pores in the cell membrane, allowing transfer of the exogenous DNA into the cell.
- Electroporation, a short electrical pulse is used to make the bacterial cell temporarily permeable.
- Particle bombardment, is typically used for the transformation of plant cells. Gold or tungsten particles are coated with the DNA construct and physically forced into the cell by gene gun.



عشان نبدأ بعملية ال Transformation ، لازم يكون أول شي ال Cell wall تاع الخلية ضعيف عشان يقدر ياخذ ال DNA.

فعشان يكون ضعيف بنروح بنحضر شي اسمه ال Competent cells ، وهي عبارة عن خلايا معالجة بـ Calcium chloride مثل Divalent cations.

أول طريقة لعملية ال Transformation هي ال Heat shock ، فممكنا الواحد ياخذ الخلايا خلينا الها Cell wall ضعيف و نحطها مع ال DNA و بنحطهم بالـ Ice لمدة 20 دقيقة ثم بنحطهم على 42 درجة لمدة دقيقة و نرجعها عالـ Ice مرة ثانية ، فهي الدقيقة اللي عرضنا الخلية و الـ DNA فيها لـ Heat shock بتخلّي الـ Pores تفتح و الـ DNA يدخل لجوا الخلية.

ثاني طريقة هي ال Electroporation ← ، عبارة عن إسقاطات كهربائية صغيرة (Short electrical pulse) بتخلّي الـ Pores تفتح و تصير Permeable أكثر و يدخل الـ DNA.

آخر طريقة هي بـ يستخدموها للـ Plant cells اللي هي Particle bombardment ← و تكون في Gene gun بـ تكون في Gold or tungsten particle بـ DNA اللي بـ دننا ندخله للخلية و بـ عدين بـ عملوا Shooting of DNA+gold particle to the cell

Competent cells

موضحة بالسلайд الجاي

- Prepare a small, overnight culture of the bacteria in LB broth. Grow at 37°C without shaking.
- Use 1.0 mL of the overnight culture to inoculate 100 mL of fresh LB broth. This culture is grown with rapid shaking at 37°C until it reaches an OD600 of 0.3-0.4. Transfer the culture to sterile plastic centrifuge tubes. Cool on ice for 10 min.
- Centrifuge at 5000 g for 10 min at 4°C using a refrigerated centrifuge.
- Pour off the supernatant and resuspend cells in 50 mL of cold 0.1M CaCl₂. Leave on ice for at least 20 min.
- Centrifuge again as before and resuspend the cells in 20 mL of cold 0.1M CaCl₂. Transfer the suspensions to sterile Eppendorf tubes as 0.1ml aliquots and store at -80 degrees C.



مثلاً ما قلنا إنه ال **Competent cells** هي خلايا ال **Cell wall** تاعها ضعيف، فما بنخليلها تعيش بال  تبعها وبالتالي بنروح بنعمل التالي:

بناخد LB broth من البكتيريا بتكون بال Small overnight culture 1

ثم بنعمل الها 2 Growing at 37°C بدون Shaking وهي تعتبر Culture صغيرة يعني يا دوب 5ml، فبنروح بنأخذ منها 1ml لكل 100ml of fresh LB broth.

3 ال LB broth اللي اخذناها هي بنروح بنعمللها **Overnight Culture** من ال **inculation** و بنحطها بهاد ال الجديد وعلى 37 درجة بس هسا مع **Shaking** عشان نكثّرها و بدننا يوصل ال **Absorption** تبعها بين 0.3 و 0.4 على **OD600** .

4 رح يصير في Growth للبكتيريا، وبنقلهم على 2Centrifuge tube وبنعمللهم Cooling in ice لمدة دققيتين ثم Centrifugation على 5000g لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 4 مئوية وبهـي المرحلة رح يكون كلشي عنا مبرد، يعني زي ما شفتوـا يا بالـ ice يا بالـCentrifugation المركـزي على درجة حرارة 4 مئوية.

بنترکه بال Ice لمدة 20 دقيقة، ثم بنرجع مرة ثانية نعمل **Centrifugation** و كمان مرة بـ 20ml **CaCl₂** هالمرة كمية أقل (يعني زي كإنه عملنا **washing** و تخلصنا من أي عالقة من قبل).

7 نقلهم ل Eppendorf tubes معقمة و كلهم بال Ice، و بنحط $100\mu\text{L}$ 0.1ml يعني من الـ Bacterial aliquots والـ CaCl_2 و بنخزنهم على - 80 درجة مئوية وأي شيء باخذه من الفريزر بزبطش ارجعه.

DNA transformation protocol

موضح بالسلайд الجاي

- Thaw all reagents completely on ice.
- Add 1 μ L of ligation reaction to thawed competent cells.
- Gently mix by tapping tube of competent cells.
- Incubate reaction on ice for 30 minutes.
- Heat shock the competent cell mixture by incubation for 30 to 60 seconds in a 42°C heating block.
- Incubate tubes on ice for another 10 minutes.
- Add 500 μ L of LB media and incubate at 37°C with shaking at 250 rpm.
- Warm selection plates to 37°C and spread 50 μ L of transformed cells on selection plates.
- Incubate plates at 30°C overnight



الـ Ligation reaction على درجة حرارة 8°- على جاهزين حضّرناهم فوق Competent cells تكون عنا جاهزين و كذلك الـ Competent cells.

1 بنأخذ $1\mu\text{L}$ من الـ Competent cells ونضيفه على الـ Ligation reaction ونخبط بالأصبع على Tube tap.

2 بنعمللهم Incubation بالـ Ice لمدة نص ساعة.

3 هسا مرحلة Heat shock، بنعّرضهم لحرارة 42 درجة مئوية لمدة دقيقة كاملة بعدين بنرجعّهم على الـ Ice لمدة 10 دقائق.

4 بنضيف $500\mu\text{L}$ من LB medium ثم بنعمللهم Shaker على الـ Shaking لمدة ساعة بدرجة حرارة 37 مئوية على 250rpm.

5 بنأخذ عينة وبنحطها على الـ Plate أو ممكّن نحضرّ هي الـ Culture من أجل Overnight على درجة حرارة 30° لطول الليل، المهم انه هاد الـ Incubation culturing Plate.

وهيك بنكون حضّرنا الـ Clones اللي بدنّا ياهم

Trouble shooting in transformation

① • Few or no colony transformants

Cause	Solution
<u>Wrong antibiotic was used or antibiotic concentration was too high</u>	Ensure the correct antibiotic was applied to plates. • Use only concentration recommended by competent cell or antibiotic manufacturer. •
<u>Competent cell viability is low</u>	Thaw competent cells on ice and use immediately. • صلاحيتها شهرين لـ 3 شهور مش أكثر → طالما طلعت من الفريزر بترجعشن عليه Check expiration date of cells. • → ما بنخلط بقوة و إنما بس بنضرب Do not re-freeze cells. • → بأصابعنا على الـ Vial من برا Do not vortex cells - gently tap to mix. • →
<u>DNA insert encodes protein that is toxic to cells</u>	Use a lower incubation temperature (25–30°C). • Use a cell strain and vector designed for tightly controlled transcription. → نستخدم خلايا الـ الها ضعيف أو قليل Translation of protein
<u>Heat-shock incubation too long</u>	Reduce incubation time from 45 to 25 seconds. •
<u>Construct is too big</u>	Use electroporation for vectors over 10 kb. •
<u>Too much ligation mixture was used for the transformation</u>	Ligation reaction components can inhibit transformation. Dilute ligation reaction with TE buffer (up to 5 times). 

الـ **Aliquot** معناها إنه كل 2ml بنحطهم بـ **Vial** و نحطهم بالفريزر فكل مرة بس بطلع الكمية الفعلية اللي بحتاجها و فش داعي اطلع كل الكمية و اذوبها ع نتفة 2ml بدي ياهم

Trouble shooting in transformation

②

No Plasmid in colony transformants •

Antibiotic concentration too low

Use antibiotic concentration recommended by manufacturer. عشان نخلص من الخلايا اللي ما أخذت البلازميد تاعنا →

Antibiotic is degraded

• **Aliquot** working volumes of antibiotic and avoid freeze-thaw cycles. لما نطلع من الفريزر ونعمل **Thawing** يعني بذوب و نرجعه عالفريزر و تضل تتكرر هالحركة

بنكون حطينا الـ **Antibiotic** قبل ليبرد الـ **Agar** فبيخرب من الحرارة أو خضع لـ **Freezing cycle** كثيرة

• Add antibiotic to liquid plate media after sufficient cooling.

③

No insert in colony transformants plasmids •

Vector re-ligation

• Vector insert ratio not optimal. Use a vector:insert molar ratio from 1:1 to 1:10. Use a DNA concentration of 1-10 **µg/ml**.
• Dephosphorylate DNA with phosphatase to prevent re-ligation



Trouble shooting in transformation

- **Sequencing of transformants plasmid reveals wrong plasmid sequence**

<u>DNA insert encodes protein that is toxic to cells</u>	<ul style="list-style-type: none">• Use a lower incubation temperature (25–30°C).• Use a cell strain and vector designed for tightly controlled transcription.
<u>Mutations introduced by initial PCR</u>	<ul style="list-style-type: none">• Use a high-fidelity polymerase.
<u>Inconclusive sequencing artifacts</u>	<p>Repeat sequencing reaction. ↴</p> <p>يابنعيد الـ Sequencing أو نعيد قراءته من الكمبيوتر بطريقة صحيحة</p>



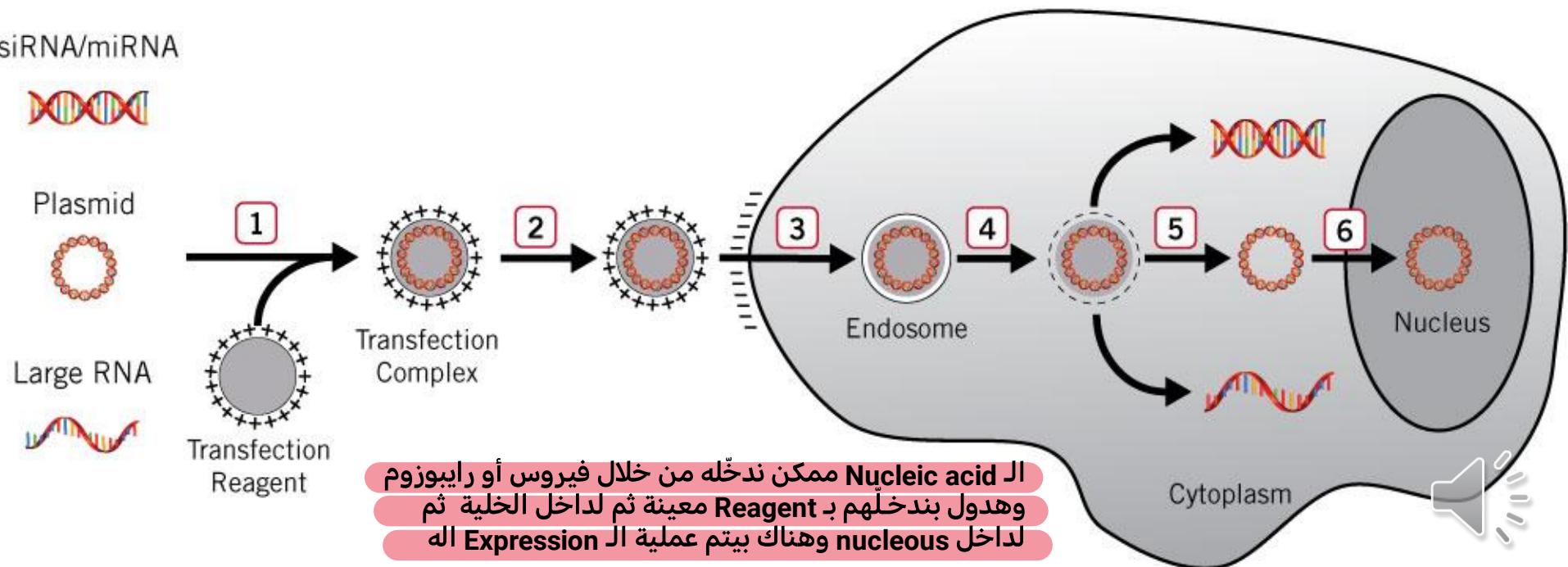
Electroporation

- An instrument called an electroporator produces a brief electrical shock that introduces DNA into the cells without killing them
- Advantages
 - Rapid
 - Requires fewer cells
 - Can be used to introduce DNA into other cell types
 - More efficient process (More efficient than heat shock)



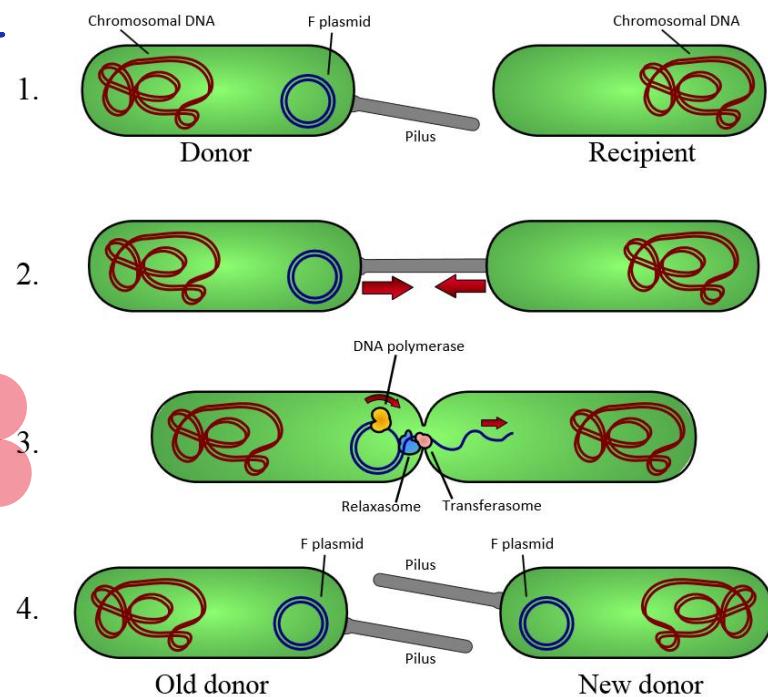
Transfection

- **Transfection** is the way to deliver exogenous nucleic acids such as DNA, RNA or oligonucleotides into cells.
- These nucleic acids can be transported by polymeric or lipidic **transfection** reagents that facilitate their cellular uptake



Conjugation

- Donor cell produces pilus.
- Pilus attaches to recipient cell and brings the two cells together.
- The mobile plasmid is nicked and a single strand of DNA is then transferred to the recipient cell.
- Both cells synthesize a complementary strand to produce a double stranded circular plasmid and also reproduce pili; both cells are now viable donor for the F-factor



هون بكون الـ **Doner cell** ينتج Pilus ، البلازميد المسؤول عن Formation of pilus . إنه ينقل المادة الوراثية لخلية ثانية غير قادرة على إنتاج الـ Pilus .

بروح الـ Pilus بيرتبط مع الخلية الثانية، والبلازميد الموجود بينفصل الـ DNA تبعه لـ 2 Strands و وحدة منهم بتروح من خلال الـ pilus تنتقل للخلية الثانية

الخلية اللي اجتها هي الـ Strand بتروح بتنسخ عنها النسخة الثانية من البلازميد أي بتنسخ Complementary strand و بصير عندها الـ DNA اللي بيعمل Expression of pilus . Pilus بيصير عندها قدرة تنتج .

Gel electrophoresis

- Electrophoresis a standard method used to separate, identify and purify nucleic acids
- Agarose or polyacrylamide gels can be used as both gels are porous in nature

SDS Page

يفصلوا القطع حسب الحجم



① Agarose gel electrophoresis (AGE)

Polysaccharide

- Agarose is a natural linear polymer extracted from seaweed that forms a gel matrix by hydrogen-bonding when heated in a buffer and allowed to cool.
الطحالب البحرية
- For most applications, only a single-component agarose is needed and no polymerization catalysts are required.
- Agarose gels are simple and rapid to prepare. They are the most popular medium for the separation of moderate and large-sized nucleic acids and have a wide range of separation but a relatively **low resolving power**, since the bands formed in the gels tend to be fuzzy and spread apart. This is a result of pore size and cannot be largely controlled.



بنحط الـ Agar و Buffer و بنسخنه و نغليه و بعدها بنعمله Cooling و بنصبه.

عملية تحضيره  one components و بنسخدم بس Very simple & rapid، لا بنحتاج
نستخدم Initiater أو Accelerator.

 هو الأفضل لعمليات فصل الـ DNA اللي تكونوا Large size و moderate size.

 مع الـ Small DNA بتكون الـ Resolving power مشكلة حيث الفصل تكون مشكلاً كثيفاً
منيحة الـ Band واسعة شوي بنسميها Fuzzy band فعملية فصل الـ DNA تكون فيها صعوبة

Fuzzy



Advantages and disadvantages

- **Advantages**
- Nontoxic gel medium
- Gels are quick and easy to cast → سهل يتحضر و سهل ينصب
- Good for separating large DNA molecules
- Can recover samples by melting the gel, digesting with enzyme agarose or treating with chaotropic salts

Disadvantages

- High cost of agarose
- Fuzzy bands
- Poor separation of low molecular weight samples



Agarose concentration (Agarose Conc.)

أي تركيز بالضبط نستخدم يعتمد على الـ DNA اللي بدهنا نفسه

- Agarose gels are normally in the range of 0.2% to 3%.
- If the aim is to separate large DNA fragments, a low concentration of agarose should be used, and if the aim is to separate small DNA fragments, a high concentration of agarose is recommended

Concentration of agarose (%)	DNA size range (bp)
0.2	5000-40000
0.4	5000-30000
0.6	3000-10000
0.8	1000-7000
1	500-5000
1.5	300-3000
2	200-1500
3	100-1000

كلما قل حجم الـ DNA كلما
كان Conc of agarose أكبر

لذلك التركيز العالي مع القطع الصغيرة، لـ انه
لو استخدمناه مع القطع الكبيرة رح يعيق
حركتها



② Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

- Polyacrylamide gels are chemically cross-linked gels formed by the polymerization of acrylamide with a cross-linking agent, usually N,N'-methylenbisacrylamide.
- The reaction is a free radical polymerization, usually carried out with ammonium persulfate as the initiator and N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) as the catalyst.

ال SDS page و Native page في منه Polyacrylamide 

ال SDS page هي المستخدمة أكثر 

يتم خلط مادتين هي Acrylamid و Bisaclyramide و وحدة بتعمل Polymerization و وحدة بتعمل Cross linking 

المادة هي Very toxic لأنها مبدأها قائم على ال Free radicals و نحتاج لإضافة ال Initiator ك Ammonium persulfate و Catalyst of Polymerization process هاد ك TEMED ، ونضيف Polyacrylamide لل 

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

- Although the gels are more difficult to prepare and handle, involving a longer time for preparation than agarose gels, they have major advantages over agarose gels. They have **a greater**
resolving power, **can accommodate larger quantities of DNA** without significant loss in resolution and the DNA recovered from polyacrylamide gels is extremely **pure**
- The **pore size** of the polyacrylamide gels can be altered in an easy and controllable fashion by **changing the concentrations** of the two monomers.
- Polyacrylamide is a **neurotoxin** (when unpolymerized), but with proper laboratory care it is no more dangerous than various commonly used chemicals



ال Polyacrylamide اصعب أكثر بالتحضير من Agarose gel بس فوائده أكثر من Agarose gel ناحية Greater resolving power فعملية الفصل أوضح و أحسن و كمان بنقدر نستخدم كميات أكبر من ال DNA و كمان ال DNA اللي بنفصله بستخدامه تكون Extremly pure DNA.

نستطيع التحكم بال Pore size عن طريق إنه نغير ال Conc of acrylamid & Conc of Bisaclyramide ←

المشكلة اللي فيه هو إنه وهو على شكل Monomer تكون Neurotoxic و هي مشكلة مش بسيطة ل إنه تكون سام للأعصاب فلازم الواحد يكون لابس Gloves وهو بشتغل.

Advantages and disadvantages

- **Advantages**

- Chemically stable cross-linked gel

- Sharp bands  ال تكون واضحة Bands

- Good for separation of low molecular weight fragments

- **Disadvantages**

- Toxic monomers

- Gels are tedious to prepare and often leak

- Need new gel for each experiment

يتم تحضيره لمرة واحدة بس، مش زي Agarose نحضره و نضل ناخذ من الكمية اللي بذنا ياخها اكثرا من مرة

خلال عملية التحضير يكون
بطيء جداً تحضيره يعني لدرجة
أكثر من ساعة و أكثر من طبقة



Polyacrylamide concentration

- With increasing the concentration of monomer in the gel, the pore size decreases in a nearly linear relationship.
- Researchers have settled on Concentration values of 5% (19:1 acrylamide/bisacrylamide) for most forms of denaturing DNA and RNA electrophoresis, and 3.3% (29:1) for most proteins, native DNA and RNA gels.

Acrylamide/Bis Ratio	Gel %	Native DNA/RNA (bp)	Denatured DNA/RNA (bp)
19:1	4	100-1500	70-500
	6	60-600	40-400
	8	40-500	20-200
	10	30-300	15-150
	12	20-150	10-100
	20	<40	<40
29:1	5	200-2000	70-800
	6	80-800	50-500
	8	60-400	30-300
	10	50-300	20-200
	12	40-200	15-150



لما نكون بدننا نفصل Denatured RNA أو Denatured DNA معناها نستخدم نسبة 19:1 اللي ←
هي يعني تركيز 5%.

لو بدننا نفصل Native RNA أو Native DNA، أو Native or Denatured Protein يعني ←
مش معمول الله Denaturation، معناها نستخدم نسبة 3.3% يعني نسبة 1:29.

Electrophoretic buffer systems

- Effective separation of nucleic acids by agarose or polyacrylamide depends upon the **effective maintenance of pH within the matrix**. Therefore, buffers are an integral part of any electrophoresis technique.
- The electrophoretic mobility of DNA is affected by the **composition** and **ionic strength** (salt content) of the buffer. Without salt, electrical conductance is minimal and DNA barely moves. In a buffer of high ionic strength, electrical conductance is very efficient and a significant amount of heat is generated.
- Different categories of buffer systems for electrophoresis:
 - dissociating and non-dissociating
 - continuous and discontinuous.



لو فشن Salt content أبدا معناها توصيل الكهرباء رح يكون ضعيف فانتقال الـ DNA و
مشيته عالجل رح تكون ضعيفة كثير.

High electrical conductance ← بينما لو Salt content كبير معناها توصيل عالي أي فوقتها ممکن يوّلد حرارة ممکن تعمل .Melting of the gel

Dissociating and non-dissociating buffer systems

- Separation on the basis of molecular weight requires the inclusion of denaturing agents, which unfold the DNA or RNA strands and remove the influence of shape on their mobility.
- The most commonly *dissociating buffer systems* used include **urea and formamide** as DNA denaturants.
- Denatured DNA migrates through these gels at a rate that is almost completely dependent on its base composition and sequence.
- Denaturing or dissociating buffer systems for proteins include the use of **sodium dodecyl sulfate (SDS)**. In the SDS-PAGE system, proteins are heat- denatured with SDS before electrophoresis so that the charge-density of all proteins is made roughly equal with net negative charge



ال Buffer بس نظيفه إما إنه بعمل Denaturation أو بعملش Denaturation .



ال Dissociating buffer مثل ال Urea و Formamide .



بنستخدمه لل RNA أو DNA بهدف ال Denaturation وينفصل حسب ال Mwt وبالتالي بمشي عالجل حسب Mwt .

لما ال Dissociating buffer يكون Sodium dodecyl sulfate هاد بنضاف لعينة ال Proteins ثم بنعمل Heat Denaturation بنسخن على حرارة 95 لمندة 5 دقايق بعدين بنمشيه على Gel electrophoresis .



ال SDS بعمل Denaturation و بيلف البروتين بـ negative charge اللي هو نفسه SDS . وبالتالي ينفصل حسب ال Mwt مش حسب Size or Shape .



Dissociating and non-dissociating buffer systems

- When samples are electrophoresed, proteins separate according to mass alone, with very little effect from compositional differences.

نضيف SDS على DNA فقط بهدف Enhance resolution power of band

- DNA molecules are negatively charged; therefore the addition of SDS in the gel preparations is only with the aim of enhancing the resolution power of the bands

بالتالي بضل شكل الـ DNA كـ Rodlike

- In the absence of denaturants, double stranded DNA (dsDNA), like a PCR product, retains its double helical structure, which gives it a rodlike form as it migrates through a gel.
- During the electrophoresis of native molecules in a *non-dissociating buffer system*, separation takes place at a rate approximately inversely proportion to the \log_{10} of their size

هي لما يكون بدي يضل بدي ال Native Molecule تضل وما يصير لها Denaturation، وما بتكون المسافة بين القطع المفصولة متساوية



Continuous and discontinuous buffer systems

الفائدة إنه بنقدر كمية أكبر من
الـ Sample و نفصلها بهالطريقة

- In the **continuous buffer systems** the identity and concentration of the buffer components are the same in both the gel and the tank. Although continuous buffer systems are easy to prepare and give adequate resolution for some applications, bands tend to be broader and resolution consequently poorer in these gels.
- These buffer systems are used for most forms of DNA-AGE, which commonly contain EDTA (pH 8.0) and Tris-acetate (TAE) or Tris-borate (TBE) at a concentration of 50mM (pH 7.5-7.8).
- TAE is less expensive, but not as stable as TBE. In addition, TAE gives better resolution of DNA bands in short electrophoretic separations and is often used when subsequent DNA isolation is desired. TBE is used for PAGE of smaller molecular weight DNA (MW<2000) and AGE of longer DNA where high resolution is not essential.

Continuous and discontinuous buffer systems

- *Discontinuous (multiphasic) systems* employ different buffers for tank and gel, and often two different buffers within the gel.
- Discontinuous systems concentrate or “stack” the samples into a very narrow zone prior to separation, which results in improved band sharpness and resolution. The gel is divided into an upper “stacking” gel of low percentage of acrylamide and low pH (6.8) and a separating gel with a pH of 8.8 and much smaller pores (higher percentage of acrylamide).
- The stacking gel prevents any high-molecular-weight DNA present in the sample from clogging the pores at the top of the running gel before low molecular-weight DNA has entered. Both, the stacking and the separating gels, contain only chloride as the mobile anion, while the tank buffer contains glycine as its anion, at a pH of 8.8. The major advantage of the discontinuous buffer system over continuous buffer system is that this gel system can tolerate larger sample volumes

الـ **Continues buffer system** هو نفس الـ Buffer بكون موجود بالجل و بالタンك وهو الأكثر إستخداما حالـة الـ **Agarose** عـشـان نـفـصل و بـيعـطـي **Resolution** كـافـي.

لـازـم يـكون حـجم الـ **Band** كـبـير عـشـان يـعـطـي **Resolutions** منـيـح ،بيـنـما لو حـجمـهم صـغـير مـمـكـن يـكونـوا الـ **Resolution** مشـ كـثـير وـاضـح .

الـ **1** **Resolution** عـلـى pH تـساـوي 8، أـرـخـص بـس مشـ **Stable** وـ إـلـه **Tris borate** مثلـ **EDTA** أـفـضلـ، وـ تـسـتـخـدـم لـ **High Mwt** وـلـما نـكـون رـحـ نـسـتـخـدـم الـ **Agarose** لـ **لفـصل** **DNA**

أـو الـ **2** **Tris borate** وـ الـ **EDTA** وـ الـ **pH** بـيـن 7.5 & 7.8، وـ تـسـتـخـدـم لـ **Low Mwt** وـ تـسـتـخـدـم لـما نـكـون رـحـ نـسـتـخـدـم الـ **Polyacrylamide** لـ **لفـصل** الـ **DNA**

الـ **Discontinuous system** هذا المستخدم أكثر بالـ **Buffer** وـ الـ **Polyacrylamide gel** المستخدم بالـ **جل** مشـ نفسه بالـ **タンك**، وـ حقـ بالـ **جل** بـنـلـاـقـي فـيـه **2buffers**.

هـذا الـ **System** مـكـونـ منـ : الـ **1** الـ **Stacking gel** بـيـكونـ منـ فـوقـ وـهـادـ بـيـرـتـبـ العـيـنةـ يـعـنـيـ بـيـعـمـلـ فـصـلـ مـبـدـأـيـ حـسـبـ الـ **حجمـ عـشـانـ** ما تـرـوـحـ القطـعـ الـ **الـكـبـيرـةـ** تـعـلـقـ وـ تـحـجـزـ فـوـقـهـاـ الصـغـيرـةـ، بـيـكـونـ فـيـهـ **Low conc of acrylamid** وـ بـتـكـونـ **pH=6.8**.

الـ **2** الـ **Separating gel** بـيـكونـ منـ تـحـتـ وـهـوـ الـ **الـلـيـ** بـيـفـصـلـ الـ **بـرـوـتـيـنـاتـ** وـ الـ **DNA** ، بـتـكـونـ الـ **Conc of Polyacrylamide** وـ الـ **pH=8.8** وـ الـ **Pore size** أـعـلـىـ فـيـ الـ **فـيـالـ** بـيـكـونـواـ أـصـغـرـ

الـ **Buffers** كلـهم **Tris** سـوـاءـ الـ **لـيـ** بالـ **تانـكـ** أـوـ الـ **جلـ** ، الـ **لـيـ** بالـ **جلـ** بـتـكـونـ الـ **pH of Tris buffer** مـعـدـلـةـ لـ 6.8 عنـ طـرـيقـ استـخـدـامـ **HCL** لـكـنـ بالـ **تانـكـ** بـنـلـاـقـيـ فـيـ **Glycine** فـآلـ **pH** تـساـويـ 8.8.

هذا الـ Buffer ما يستخدمه
مع الجل مثل اللي قبل و إنما
مع الـ Sample

Loading buffer

Higher
Viscosity

- This is the buffer to be added to the DNA fragment that will be electrophoresed. This buffer contains glycerol or sucrose to increase the density of the DNA solutions; otherwise, the samples would dissolve in running buffer tank and not sink into the gel pocket.

العينة تتضمن بالـ Electrophoresis buffer تاعت الـ Whells فما بصير لها

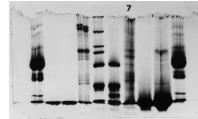
- The gel loading buffer also contains dyes that facilitate observation of the sample during gel loading and electrophoresis, such as bromophenol blue or xylene cyanol.

Because these molecules are small, they migrate quickly through the gel during electrophoresis.

الصيغتين ما بتفاعلاوا لا مع Protein ولا مع DNA ولا بتصبغهم وإنما الـ Mwt قليل فبيكون ترکض قدام البروتينات و DNA و تبيتلنا وقع شيء من الجل أو لاً فيس نشوفها وصلت للأخر بنروح بنوقف الكهربا

- The components and concentrations of the 6X loading dye usually used are: 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 30% glycerol; or 0.25% bromophenol blue, 50 mM EDTA, 0.4% sucrose.

Voltage/current applied



- The higher the voltage/current, the faster the DNA migrates. If the voltage is too high, band streaking, especially for DNA \geq 12-15kb, may result. Moreover, high voltage causes a tremendously **increase** in buffer **temperature and current** in very short time. This lead to gel melting
- The high amount of the heat and current built up in the process leads to the melting of the gel, DNA bands **smiling**, **decrease of DNA bands resolution** and **fuse blowout**. it is highly recommended not exceed 5-8 V/cm and 75 mA for standard size gels or 100 mA for minigels.
- When the voltage is too low, the **mobility of small (\leq 1kb)** DNA is reduced and **band broadening** will occur due to dispersion and diffusion.



Visualizing the DNA

- After the electrophoresis has been completed there are different methods that may be used to make the separated DNA species in the gel visible to the human eye.

1. Ethidium bromide staining (EBS)

- The localization of DNA within the agarose gel can be determined directly by staining with low concentrations of intercalating fluorescent ethidium bromide dye under UV light. The dye can be included in both, the running buffer tank and the gel, the gel alone, or the gel can be stained after DNA separation.
- For a permanent record, mostly instant photos are taken from the gels in a dark room.
- Note that ethidium bromide is a potent mutagen and moderately toxic after an acute exposure. Therefore, handle it with caution.

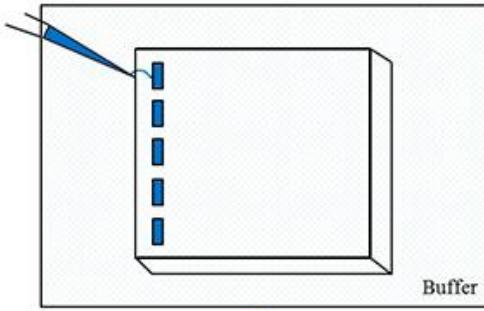
Colorless

إضافة EPS إما مباشرة عالجل أو Buffer tank أو بنضيفها على مي و نحط نص الجل فيها و نرجع نطلع الجل و بنمشي عليه ا JL DNA



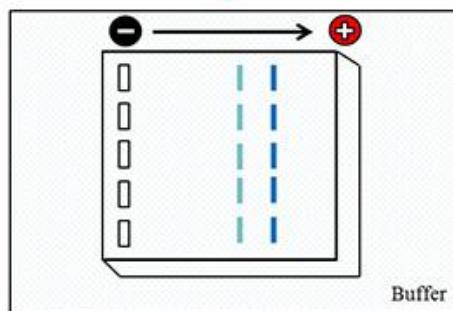
Ethidium bromide staining

هي الصبغة بترتبط مع الـ DNA و بتعطيه fluorescent ethidium bromide dye فلما نحط على UV light بتضوّي و بعدها بنصّورها بالكاميرا



DNA/RNA samples and marker loaded in the horizontal gel electrophoresis system

حطوا العينات عالجل



Direction of migration of DNA/RNA samples in horizontal gel electrophoresis system

بلش يعمللهم Run و هي الصبغة الزرقاء ماشية قدم
القطع لنشوف الـ Run وين وصلت



Agarose gel after ethidium bromide staining

عالـ Agarose ما بنشوف الصبغة ولا أي Band بتكون
بالأصل مو واضحة ولكن تحت UV بتكون الـ Bands ضاوية



Under UV



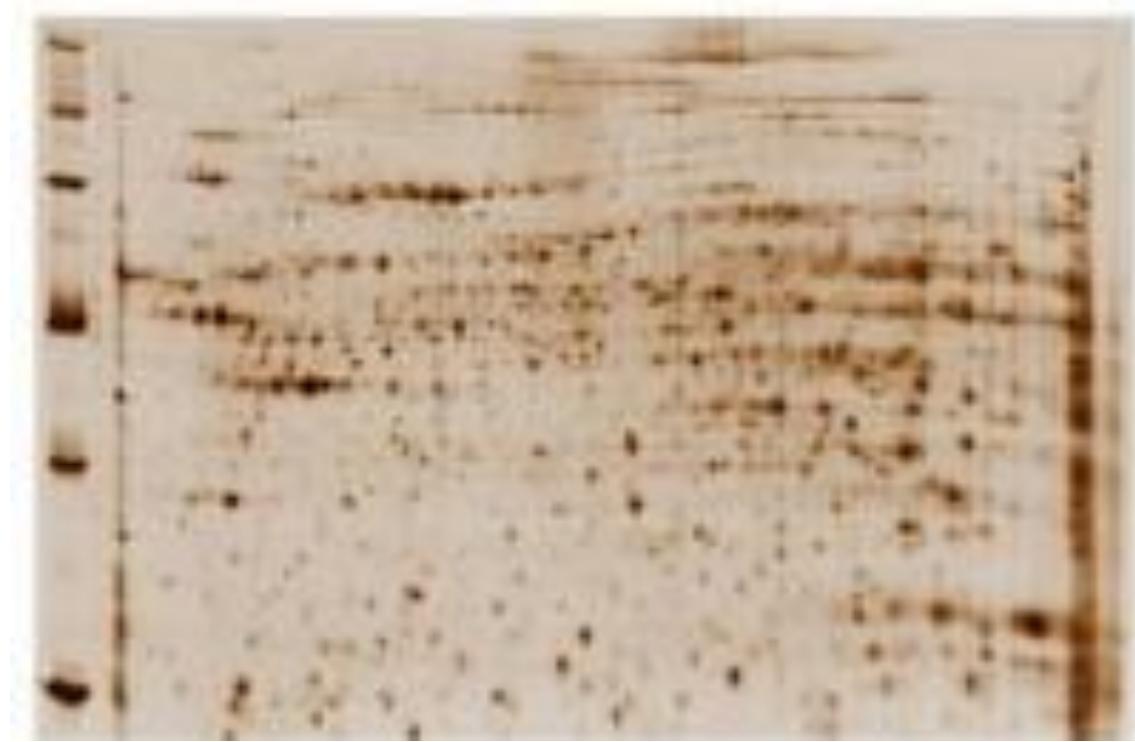
Silver staining (SS)

- Silver staining is a highly sensitive method for the visualization of nucleic acid and protein bands after electrophoretic separation on polyacrylamide gels,
- Nucleic acids and proteins bind silver ions, which can be reduced to insoluble silver metal granules. Sufficient silver deposition is visible as a dark brown band on the gel. Silver staining protocols include many steps:
 - i) fixation to get rid of interfering compounds,
 - ii) silver impregnation with either a silver nitrate solution or a silver-ammonia complex solution,
 - iii) rinses and development to build up the silver metal image, and
 - iv) stop and rinse to end development prior to excessive background formation and to remove excess silver ion

Silver staining



For DNA



For protein



هي فقط للبروتينات

Coomassie staining

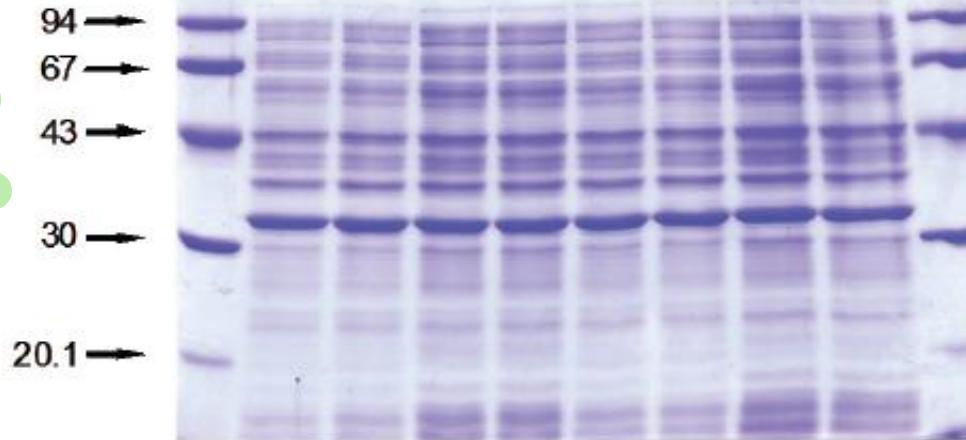
This dye used for detecting & quantitative measurements نزر

- The Coomassie blue staining allows detecting up to 0.2 to 0.6 μg of protein, and is quantitative (linear) up to 15 to 20 μg .
- It is often used in methanol-acetic acid solutions and is discolored in isopropanol-acetic acid solutions



بنروح بنأخذ الجل بعد ما تنفصل القطع عليه و بنحطه بد Comassie blue و هي الصبغة اصلا بتكون مع Acetic acid و Methanol Discoloration ، ثم نترك الجل لحد ما يتلون باللون الأزرق ، و ال Bands ما بتكون مبينة و واضحة فبنررح بنعمل

لإزالة اللون نستخدم إما
Acetic acid مع ethanol
Acetic acid مع Isopropanol

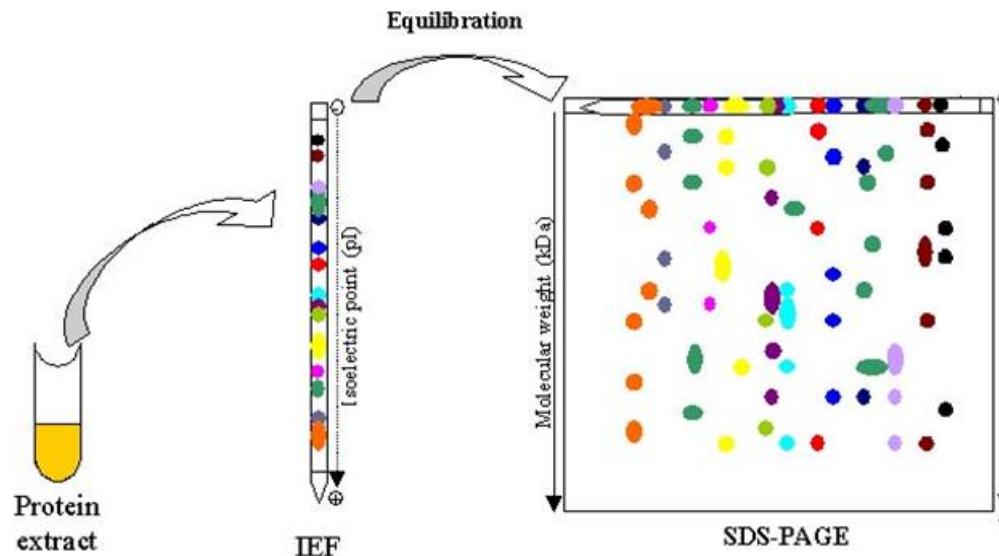


1. SDS-PAGE.

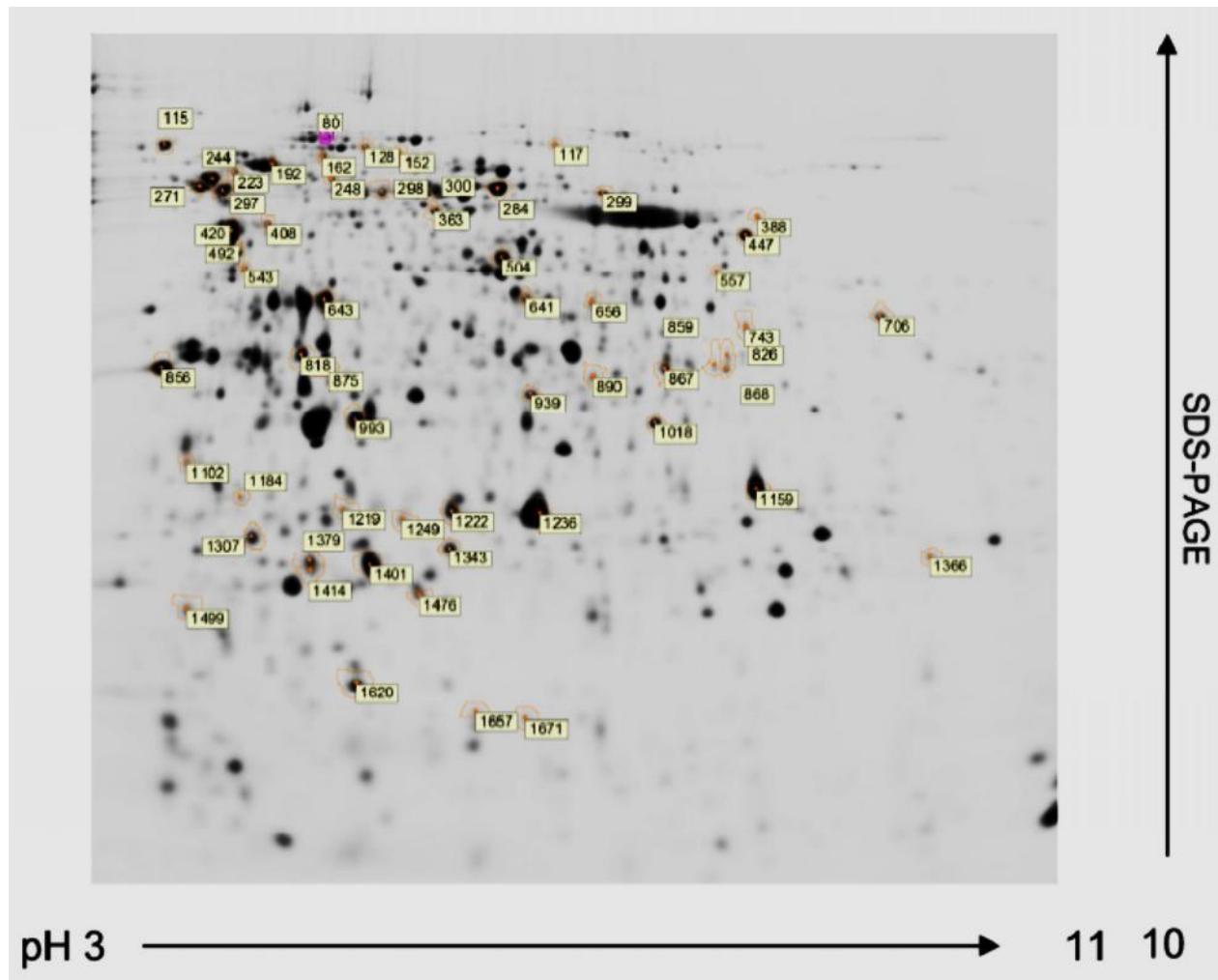


Two-dimensional gel electrophoresis

- Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) is based on separating a mixture of proteins according to two molecular properties, one in each dimension.
- The most used is based on a first dimension separation by isoelectric focusing and second dimension according to molecular weight by SDS-PAGE.



Two-dimensional gel electrophoresis organism protein fingerprinting



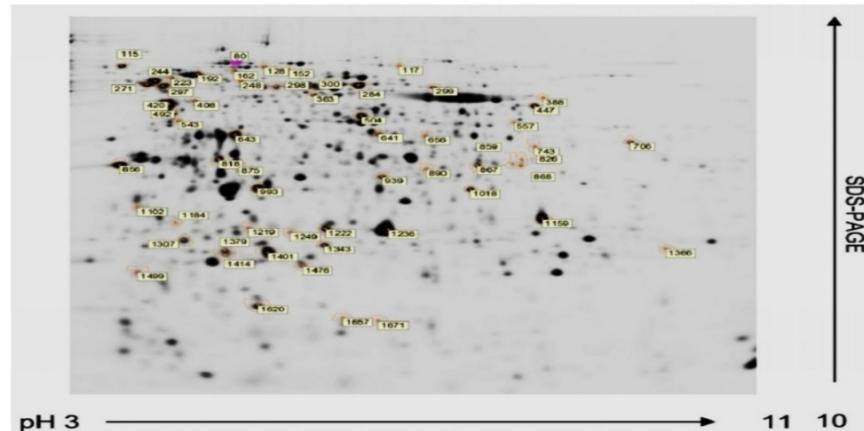
سابقاً كنا نحكي عن الـ One dimension اللي بنفصله حسب الـ Size. ←

لكن هون أول شي بنفصل على SDS page حسب Mwt ثم نفصل مرة أخرى حسب Isoelectric point من خلال تغيير الـ pH فكل بروتين يقف عند الـ Isoelectric point تاعتة. ←

استفينا إنه هيك بنكون فصلنا البروتينات اللي الها نفس الحجم و كمان حسب Isoelectric point. ●

الصورة الموجودة هي مثال على Organism أخذنا منه كل بروتينات الخلية و مشيناهم على SDS page فانفصلوا حسب الـ Size ثم حسب الـ Isoelectric point فمثل ما شايفين الـ pH من 3 إلى 11.

كل (microorganism) mo خاصه فيه فممكنا نعمل identification of mo Fingerprint بروتيناته فبنعمل lysis of cells و نعمل الـ 2dimentsios method فبنحط كل النتائج اللي حلناها لعدة mo على كمبيوتر وهو بصير يقارنلك و بحكيلك شو الـ mo اللي عندك. ●



Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2-D DIGE)

- A method that labels protein samples prior to 2-DE, enabling accurate analysis of differences in protein abundance between samples.
- The technology is based on the specific properties of fluorescent cyanine dyes that are spectrally resolvable and size- and charge-matched
- Identical proteins labeled with each of the three dyes (Cy2, Cy3 and Cy5) will migrate to the same position on a 2-DE gel. This ability to separate more than one sample on a single gel permits the inclusion of up to two samples and an internal standard (internal reference) in every gel.
- The internal standard is prepared by mixing together equal amounts of each sample in the experiment and including this mixture on each gel



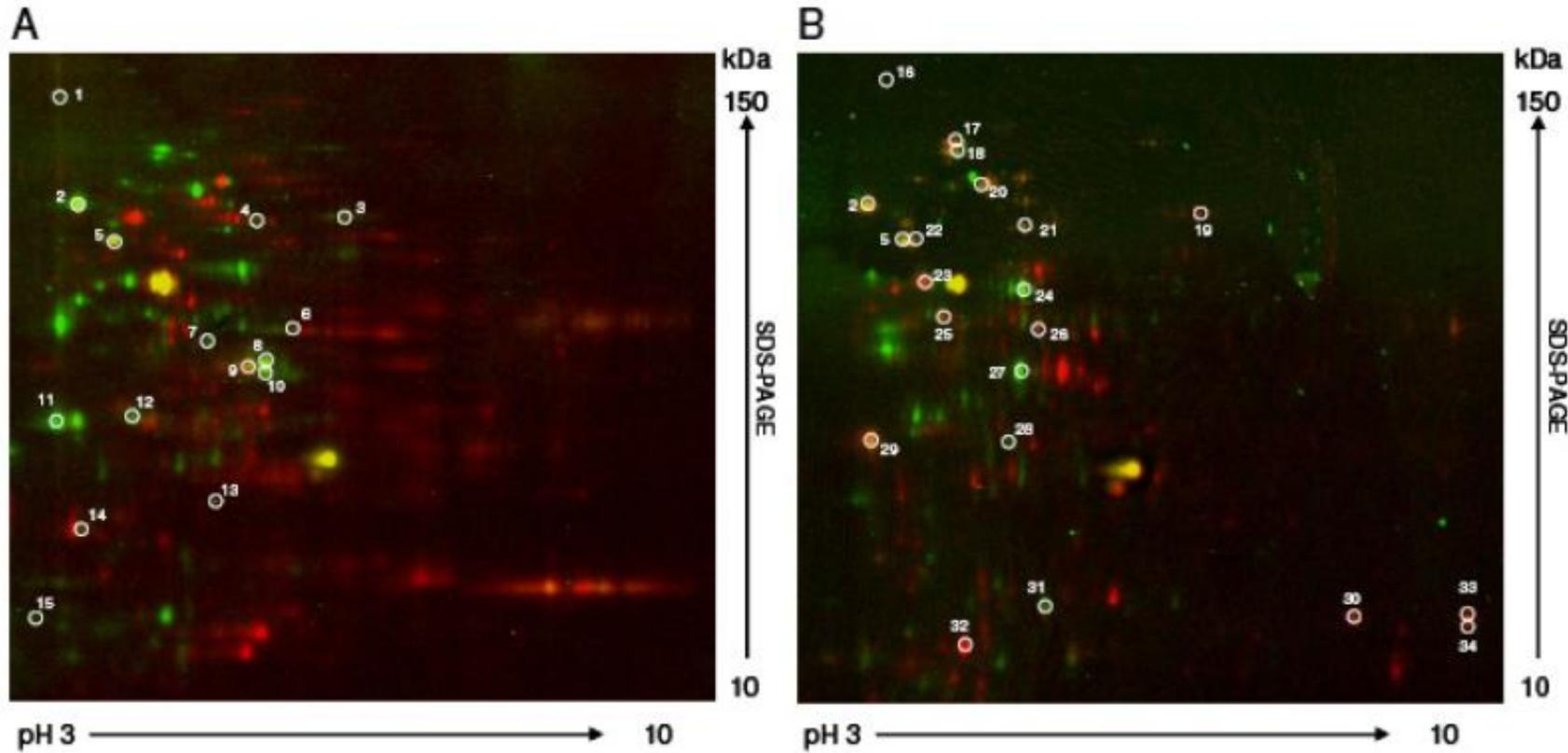
عملوا modification على 2dimensions method فطلع معهم .D DIGE_2 ←

بنضيف Specific protein على الـ Sample فترتبط مع Fluorescent Cyanine dye موجود بالـ .Size& charge و بنفصلوا حسب الـ Resolvable gel ثم نمشيهم على الـ Sample ←

بنقدر نستخدم أكثر من Sample بإستخدام هي الطريقة. ●

هون بنستخدم كمان internal standard كـ Reference برجعله، اللي هو عبارة عن خلط كميات متساوية من العينات بعديها بنحط على كل واحد من الجل لنتأكد إنه الـ internal standard عم يعطيي الإشي الصح و ما عم تتدخل العينات ببعض. ●

Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2-D DIGE)



كل وحدة لها لون ، فكل وحدة منهم مرتبطة مع بروتين معين و عم تعطي موقعه
إذا كان صحيح بالضبط أو لا بالنسبة لل MO هاد فهي عم تعطينا Identification of MO



Protein identification by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry

- Mass spectrometry is a technique to analyze with high accuracy the composition of different chemical elements and atomic isotopes splitting their atomic nuclei according to their mass-charge ratio (m/z). ①
- It can be used to identify different chemical elements that form a compound or to determine the isotopic content of different elements in the same compound ②

