إستخلاص الحمض النووي الريبي منزوع الأوكسجين
DNA Extraction From Plant

الهدف العام .
أن يتعرف الطالب على الحمض النووي الريبي DNA خارج الخلية.

هدف الدرس:

أن يستخرج الطالب الحمض النووي DNA من الخلايا النباتية ويفهم الاساس العلمي لخطوات الإستخلاص.

عناصر الموضوع:

- أهمية إستخلاص DNA .
- الأساس العلمي لعملية الإستخلاص.
- خطوات الإستخلاص.

أولا : أهمية إستخلاص DNA:

إستخلاص DNA هو الخطوة الاولى فى عديد من تجارب البيولوجيا الجزيئية ويستخدم في:

1. دراسة الجينوم الكامل للكائن.
2. دراسة جزء معين من DNA.
3. عمل عزل و إكثار Cloning لقطعة أو جين معين .
4. دراسات الاختلافات والتشابهات بين الكائنات الحية.
5. كشف الامراض الوراثية.
6. تحليل الادلة الجنائية.

ثانيا: الأساس العلمى لعملية الإستخلاص:

إستخلاص DNA يعتمد على ثلاث خطوات أساسية تحقق هدف خروج الحمض النووي وخطوتين لإستكمال هذا الخروج بصورة افضل لابد منها مهما تعددت و اختلفت الطرق المستخدمة للإستخلاص.

Privacy

تحليل الخلايا Cell lysis

يعتمد إستخلاص DNA على تحطيم أو تفكيك أو تحليل الخلايا سواء ميكانيكيا او كيميائيا; فالجدار الخلوى (إن وجد) و الغشاء الخلوى و الغلاف النووى لابد من تمزيقه لإخراج DNA. فعلي سبيل المثال في الخلايا النباتية تتكون الأغشية الخلوية من دهون وبروتينات و التى يمكن إذابتها بالمنظفات Detergent المستخدمة خلال الإستخلاص. الخلايا النباتية، الخميرة والخلايا البكتيرية تكون محاطة بجدار خلوى والذى يجب تمزيقه أو تحطيمه بوسائل اما **ميكانيكية** (مثل الطحن أو الخلط) او وسائل **كيميائيه** (مثل استخدام محلول الاستخلاص) او وسائل **انزيميه** (مثل الهضم الإنزيمى بإستخدام احد الانزيمات اثناء الاستخلاص مثل proteinase K).واشهر انواع الكيماويات المستخدمة فى هذه الخطوة باختلاف الطريقة المستخدمة للإستخلاص:

قم بالبحث عن وظيفة كل مادة:

المادة	فائدتها
SDS	.....
Triton X100	.....
CTAB	.....

تنقية Purification

بمجرد تحطيم (تكسير) الخلايا فإن مكونات المحتوى الخلوى بأكملها تختلط ببعضها البعض ; و معظم التجارب الخاصة بـ DNA تتطلب ان يكون هذا DNA خالى من البروتينات و RNA .لذلك فإن الباحث يأخذ فى اعتباره عند الإستخلاص تثبيط فعل الإنزيمات الخلوية التى تقوم بتكسير DNA عن طريق إستخدام:

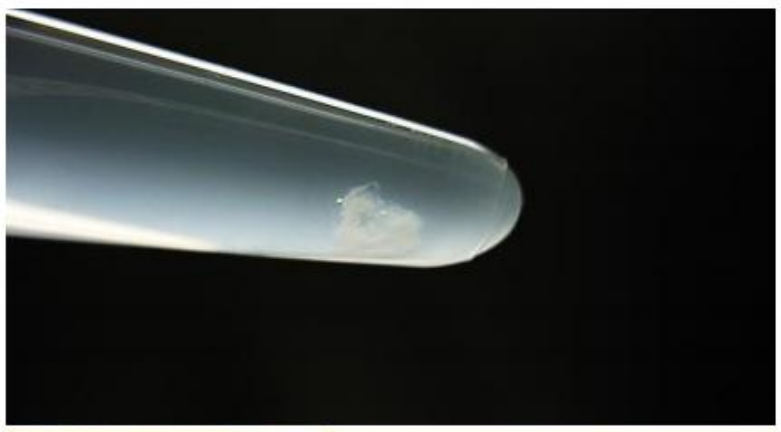
- الحرارة Heat
- مواد كيميائية معينة Certain chemicals
- مذيبات عضوية مثل الفينول (وذلك لتثبيط الإنزيمات وإزالة البروتينات من الأحماض النووية).

قم بالبحث عن وظيفة كل مادة:

المادة	فائدتها
كلوروفورم Chloroform	.....
Isoamyl	.....
Phenol	.....

Privacy

ترسيب و تركيز Precipitation and Concentration



من خواص DNA أنه يذوب فى الماء ولا يذوب فى الكحول; لذلك فإنه للحصول على DNA يتم إضافة إيثانول إلى مستخلص الخلايا Cell lysate و الذي يعمل على تكوين كتلة قوية من DNA فى السطح البينى لطبقة الكحول و الطبقة المائية.

و فى حالة الشغل البحثى فإن الباحث يجمع هذه الكتلة من DNA عن طريق الطرد المركزى و يمكنه بعد ترسيب DNA إعادة ذوبانه re-suspend فى محلول جديد لإستخدامه فى تجارب أخرى .

قم بالبحث عن وظيفة كل مادة:

المادة	فائدتها
Ethanol %70	.....
Ethanol %90	.....
Isopropanol	.....
Na acetate	.....
TE buffer	.....

ثالثا : خطوات الإستخلاص .

سوف يتم عرض خطوات الاستخلاص بإختصار:

- ❖ طحن العينة بالنيتروجين السائل.
- ❖ تفكيك الغشاء البلازمي والغلاف النووي بمادة SDS (الموجودة فى محلول الإستخلاص) والحرارة على 65°م.
- ❖ تنقية DNA من البروتينات بمادة خلات الصوديوم مع الحرارة -20°م.
- ❖ ترسيب DNA بكحول الإيثانول 95% أو الأيزوبروبانول.
- ❖ غسيل DNA من الأملاح باستخدام الإيثانول 70%
- ❖ إذابة DNA بالماء النقي.

سؤال؟
ما فائدة خلات الصوديوم في إستخلاص الحمض النووي

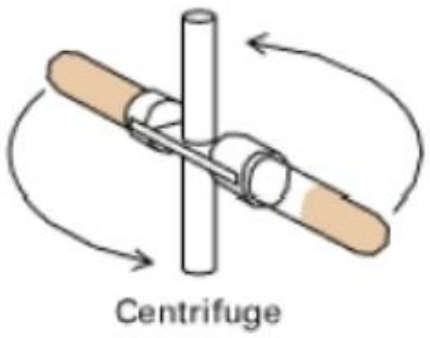
Privacy

اذكر خطوات الاستخلاص لاحدي الطرق الموجوده علي الانترنت؟

- ❖ .....
- ❖ .....
- ❖ .....
- ❖ .....
- ❖ .....
- ❖ .....
- ❖ .....

الاجهزة التي تم استخدامها في هذه التقنية:

جهاز الطرد المركزي Centrifuge

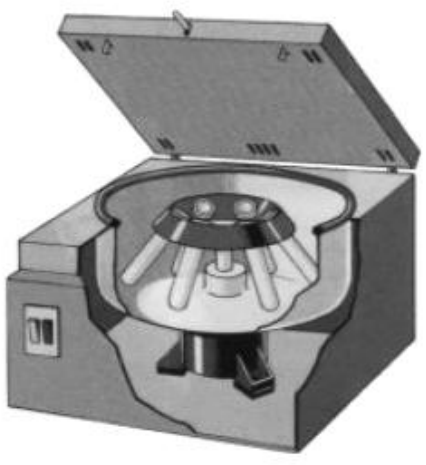

Centrifuge

تعتمد فكرة الجهاز:

يقوم هذا الجهاز بإجراء عملية الطرد المركزي من خلال لف الأنابيب المعملية الموجودة بداخله حول المركز لعدد من اللفات عند سرعة معينة لوقت محدد)وفي بعض الحالات عند درجة حرارة معينة)، بغرض فصل المكونات الكيميائية ذات الطبيعة المختلفة الموجودة داخل كل أنبوبة معملية موجودة بداخل الجهاز، تمهيداً لتفريق هذه المكونات المختلفة عن بعضها البعض لاستخدامها من خلال طرق معملية مختلفة في أغراض مختلفة أو استخدام أحدها والتخلص من الآخر.

العوامل التي يتوقف عليها الفصل من خلال الطرد المركزي :

1. تفصل العينات على اساس الحجم
2. الشكل والكثافة واللزوجة للمحلول
3. سرعة الروت Rotor



اذكر ماهي الاحتياطات الواجب مراعاتها عند استخدام هذا الجهاز فى المعمل:

1. .....
2. .....
3. .....
4. .....

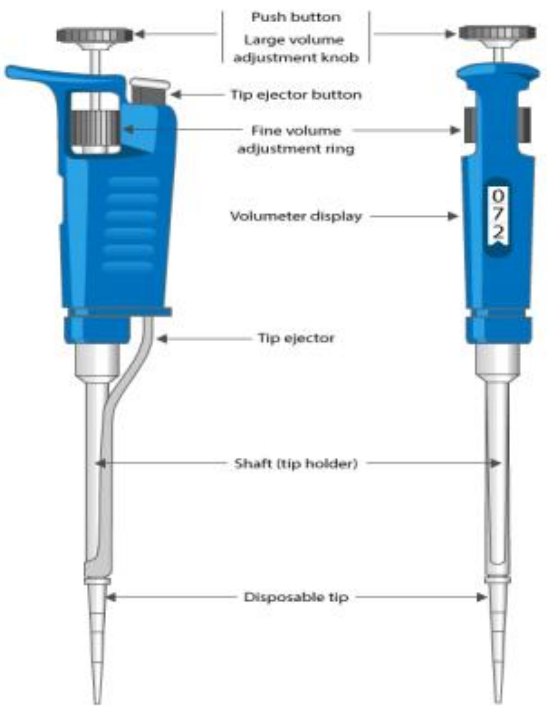
Privacy

الادوات التي تم استخدامها في هذه التقنية ومراعاة التعامل معاها:

أداة الماصة الدقيقة Micropipett

تعتمد فكرة الاداة:

هي أداة مخبرية يتم اســـتخدامها في نقل أو قياس حجم ســـائل ما. تستخدم هذه الأداة غالباً في الكيمياء وعلم الأحياء العضوية إضافة إلى الصناعات الدوائية والطب. تتوفر هذه الأداة بعدة قياسات كما يمكن أن تصنع من عدة مواد كما تختلف في مدى دقتها في القياس. قد تكون شفافة أو غير شفافة. يعتمد مبدأ الماصة على تشكيل فراغ (عملية تفريغ) فوق الحجرة الحاوية على الســـائل، ومن ثم تحرير هذا الفراغ بشكل انتقائي لسحب السائل ونقله.

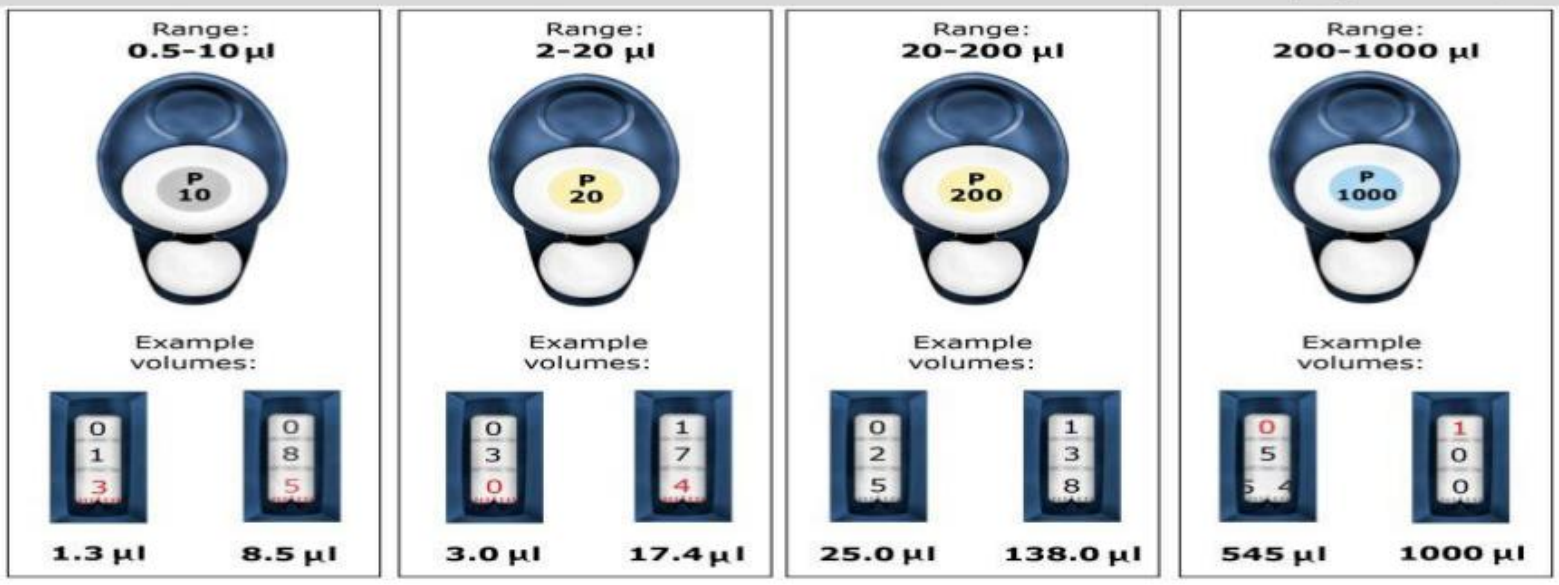


اذكر ماهي الاحتياطات الواجب مراعاتها عند استخدام الماصة الدقيقة فى المعمل:

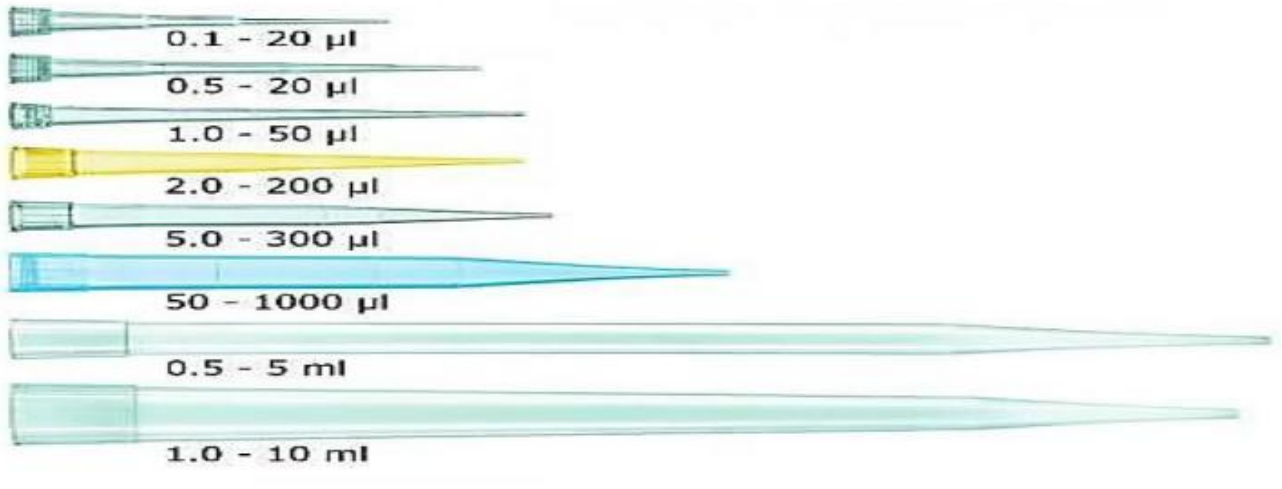
1. قم بضبط الحجم المراد نقله من السائل من خلال لف قبضة ضبط الحجم حتى يُشير العداد الرقمي إلى الحجم المطلوب. (التعامل برفق اثناء الضبط)
2. قم بتركيب القمع البلاستيكي (Tips) الذي يتناسب حجمه مع حجم الماصة المُستخدمة إلى الطرف المطلِق بإحكام، حيث لا يُسمح بتسريب الهواء.

قم بضغط الدافع ببطء بواسطة إصبع الإبهام حتى يصل إلى الوقفة الأولى، عندئذٍ يكون قد تم ضغط عمود الهواء بمقدار الحجم المضبوط والمرئي على العداد الرقمي .

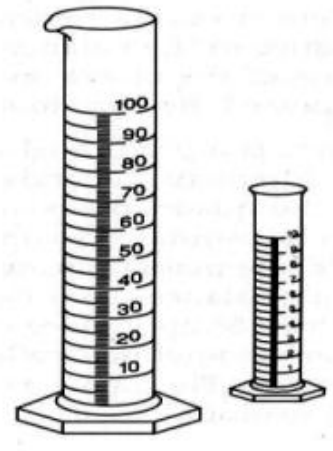
كيفية ضبط وقراءة مؤشر الحجم الرقمي Digital Volume Indicator في الماصة الدقيقة Micropiptte:



امثلة لبعض انواع واحجام التبس Tips المســـتخدمة في المعايرة باســـتخدام الماصـــة الدقيقة Micropiptte



بعض الادوات الاخري التي تم استخدامها في هذه التقنية:



المراجع

http://www.whatisthebiotechnology.com/pages/genetic_enginerring.html
http://en.wikipedia.org/wiki/Central_dogma_of_molecular_biology
https://sites.google.com/a/lariverschool.org/lars-biology/assignments/115dnaextractionlab/dna-extraction-lab
http://www.clipartbest.com/clipart-pT5e99nqc
http://www.dreamstime.com/illustration/mortar.html
http://biology.phillipmartin.info/biology_dna.html
http://edusanjalbiochemist.blogspot.com.eg/2012/11/principle-of-centrifugation.html
http://www.chromacademy.com/lms/sco679/07-Use-of-Micropipettes.html?fChannel=22&fCourse=97&fSco=679&fPath=sco679/07-Use-of-Micropipettes.html

Privacy

تمارين الدرس العملي

1. في التجارب المعملية لإستخلاص الاحماض النووية من الخلايا النباتيه او الحيوانيه يتم استخدام بعض المواد الكيماوية. اذكر فائدة المواد التاليه فى عملية الإستخلاص؟

مادة تعمل على غسيل الاحماض النووية من اى بقايا من البروتينات او الاملاح وبقايا المواد الكيماويه المستخدمة فى الاستخلاص. .....
.....
.....

EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid)

.....
.....

مادة تعمل على ترسيب الإحماض النووية عن طريق تحويلها من الصورة الذائبة الى الصورة الملحية .....
.....

SDS (Sodium dodecyl sulfate)

.....
.....

3M sodium acetate

.....
.....

2. في تجربة معملية للإستخلاص الحمض النووي DNA من خلايا الدم وتم رؤيته عن طريق تقنية التفريد الكهربي. اذكر الفروق بين الخلايا النباتية والحيوانية فى عملية الاستخلاص من حيث تركيب الخليه؟ وماهي المواد الكيماويه المختلفه بين هذه الخلايا ؟

.....
.....
.....
.....

Privacy

إستخلاص الحمض النووي الريبي من النبات
RNA Extraction From Plant

الهدف العام:

أن يتعرف الطالب على الحمض النووي الريبي RNA خارج الخلية.

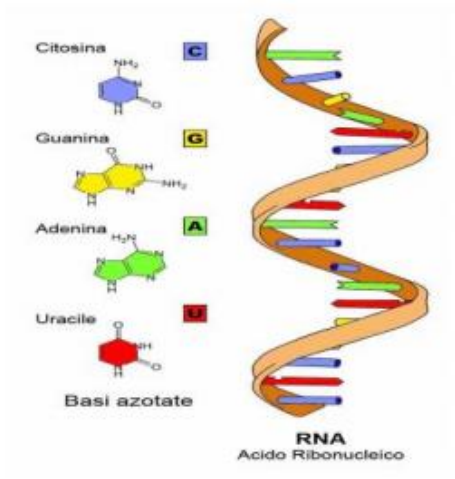
هدف الدرس:

أن يتعلم الطالب الفرق بين إستخلاص كلا من الحمضين النووي DNA & RNA والفروق بين التفريد الكهربي لكلاهما.

عناصر الموضوع

- تعريف RNA واهميته
- الاساس العلمى لإستخلاص
- خطوات الإستخلاص
- التفريد الكهربي RNA

أولا : تعريف RNA:



ســـكر ريبوز Ribose nucleic acid RNA يعنى توجد مجموعة هيدروكسيل على الذرة رقم 2. يتكون من 4 قواعد هما 2 بيورينية (A-G) مكونه من حلقتين 2 بيريميدينية (U-C) مكونه من حلقة ســـداســـية حيث يستبدل الثايمين باليوراسيل.

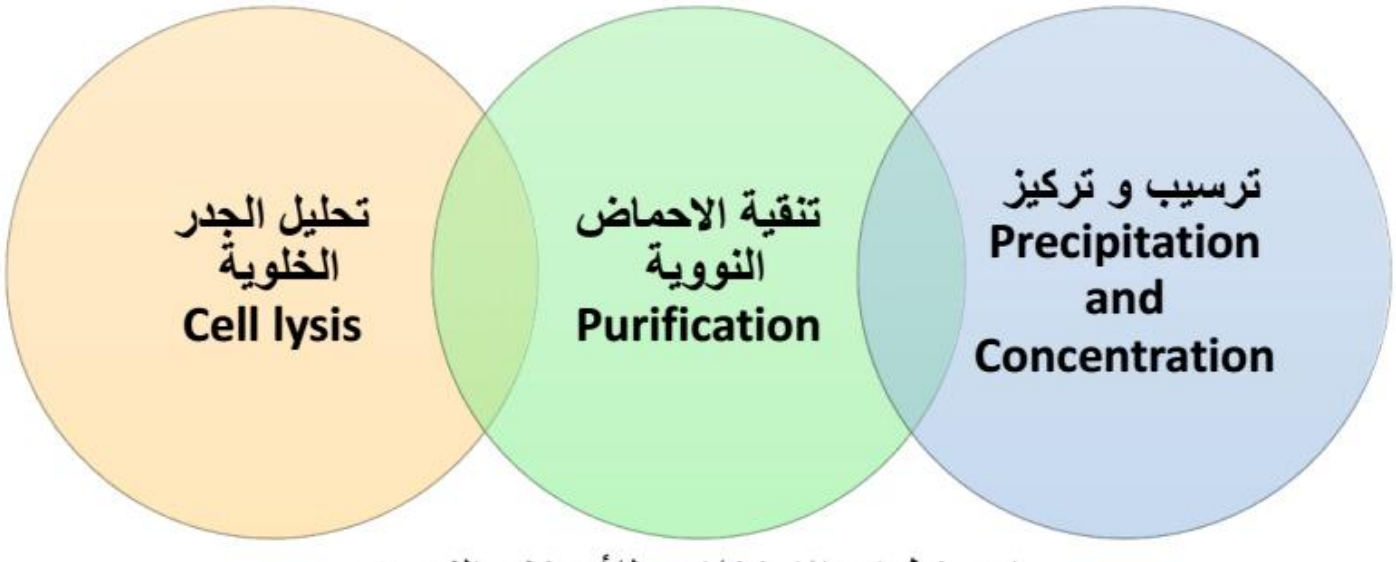
ثانياً: أهمية إستخلاص RNA:

إستخلاص RNA هو خطوة فى العديد من التجارب البيولوجيا الجزيئية حيث يكون الاهتمام بدراسة التعبير الجينى لجين ومعين وما مدي تاثير الظروف المحيطة بالكائن بالتاثير على هذا الجين وتعبيره.

ثالثاً: الأساس العلمى لعملية الإستخلاص .

إستخلاص كلا من RNA او DNA لا يختلف عن بعضها حيث تعتمد علمية الإستخلاص على ثلاث خطوات أساسية لابد منها مهما تعددت وأختلفت الطرق المستخدمة للإستخلاص.

Privacy



اهم خطوات الإستخلاص للأحماض النوويه

رابعاً: خطوات الإستخلاص .

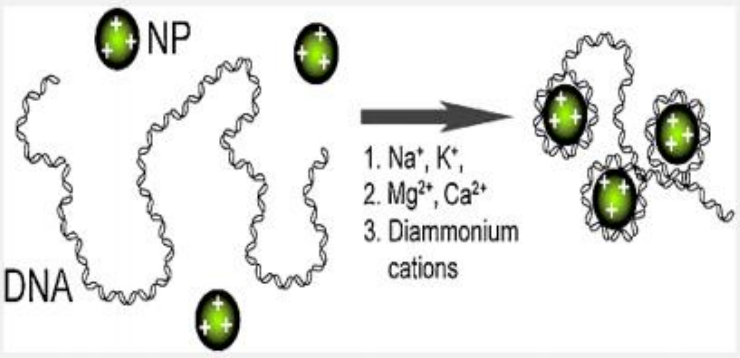
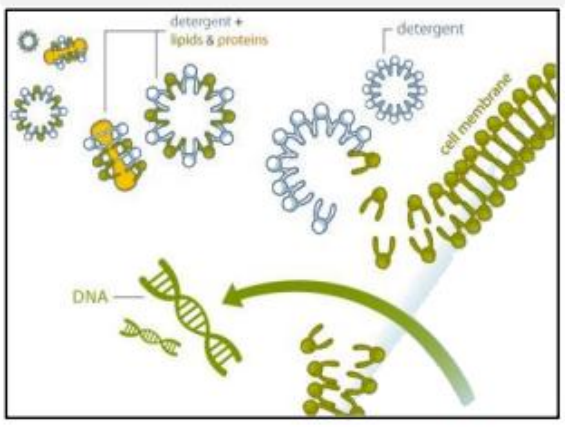
وهناك العديد من الطرق لإستخلاص RNA علي سبيل المثال منها ما يستخدم المحاليل الجاهزة وهي طريقة قياسية يتبعها الباحث فى المعمل ولكنها قد تكون مكلفه. ومنها ما يستخدم محاليل يتم تحضيرها داخل المعمل وهي غير مكلفه ولكنها تحتاج الكثير من الوقت والجهد للحصول علي النتيجة المثاليه.

علي سبيل المثال استخدام طريقة **Trizol** يتم استخدام محاليل محضرة من قبل شركات وهي في حد ذاتها "Kit" وهناك طرق اخري منها مثل **TENS** وهي طريقة يدوية "يعني يتم تحضير محاليلها كها فى المعمل". وسوف يتم دراسة بعض المحاليل المستخدمة والمشتركة فى إستخلاص DNA & RNA. وهذه هي المحاليل المستخدمة فى طريقة **TENS**

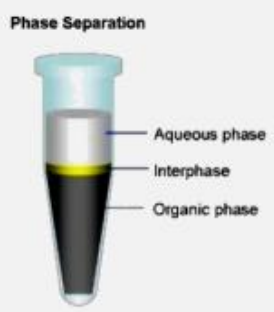
TENS buffer	**PCI buffer**	**LiCl buffer**	**Na acetate**
Tris-Hcl EDTA NaCl SDS	Phenol chloroform isoamyl	LiCl	Na acetate

Privacy

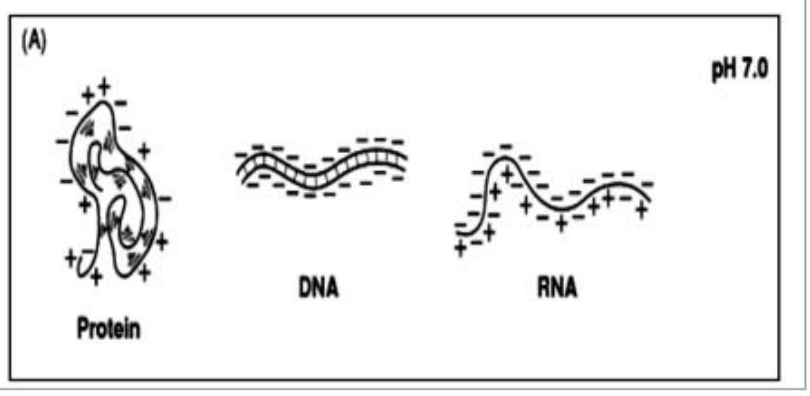
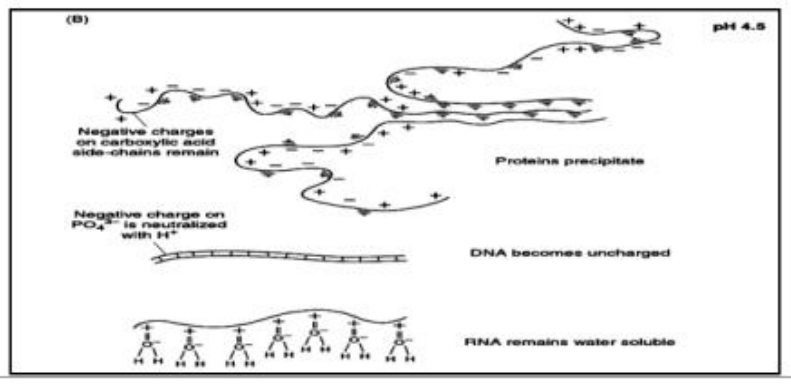
مكونات محلول التينس TENS Buffer components:

Tris-HCL	تتفاعل مع جزيئات (Lypopolysaccharides) الموجودة علي الجدار الخارجي للخليه مما يجعلها تتميز بخاصـية النفاذية، وتزيد هذه الخاصـية من معدل دخول(EDTA) إلي داخل الخلية.
EDTA	ترتبط مع الأيونات الموجبة ثنائية الشـحنه مثل (Cd^{+2}, Mg^{+2}, Mn^{+2}) التي قد تكون أملاح مع مجموعات الفوسفات الأيونية في الحمض النووي DNA. 2- تثبيط الإنزيم المحلـل للحمض النووي deoxyribonuclease لأنـه يحتاج إلى أيونات المغنيسـيوم Mg^{+2} أو المنجنيز Mn^{+2} لكي يقوم بوظيفته في تحليل الحمض النووي DNA. • الوسـط القلوي (p^H=8) يقلل التفاعلات الإلكتروليتيه بين الحمض النووي DNA والهيستونات القلوية والأمينات عديدة التكافؤ. • القلوية العالية (درجة p^H العالية) تقلل من نشـاط انزيم nuclease وتغير طبيعة البروتين denature. • كما تساعد على فصل البروتينات المرتبطة بالحمض النووي DNA بزيدة القلوية والشحنة الموجبة للبروتينات الهيستونيه.
NaCl	• حـفـظ الضـغـط الاسـموزي لسـوائل الجسم. • معادله الشـحنة على الحمض النووى لحماية شكل الحمض النووى.  • التراكيز العالية من الأملاح (مثل NaCl وغيره) تضاف للتأكد من الفصل التام للبروتينات المرتبطة بالحمض النووي DNA او RNA عنه وتزيل الرابطة مع الأمينات موجبة الشحنة.
SDS	 هي مادة قلوية مع الحرارة العالية 55-60 ˚م تؤدي إلى إذابة الفسفوليبد في الجدار الخلوي وتحرر الحمض النووي. تعمل جزيئاته علي تحلل جدر الخلايا، فصل بروتينات الهستون (proteins Histone) عن جزيئات الحمض النووي المصاحبة لها في التكوين الكروموسومي، ثم إبدال طبيعة بروتينات الهستون مما يقلل

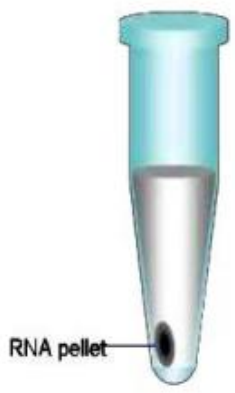
Privacy

	(Denaturation) وتحطيم المكونات الثانوية للبروتينات مما يقلل مقدرتها علي الذوبان والبقاء في الوسط المائي.
كلوروفورم/ ايزواميل **Chloroform/** **Isoamyl**	يعمل على فصـــل البروتينات و المكونات العضـــوية بعيـدا عن الحمض النووى فى طبقـة مختلفـة عن الحمض النووى. يسبب الكلوروفورم تشويه سطحي للبروتين. ويعمـل الكحول isoamyl alcohol يســـاعد على ثبات الطبقة الفاصـــلة المحتوية على البروتين ويمنع تكوين الطبقة الرغوية. 

اولاً: تاثير الفينول Phenol:

حيث ان الاس الهيدروجيني p^H لـه يؤثر في استخلاص كلا من الاحماض النووية DNA & RNA والبروتينات. فنجد انه عندما يكون p^H= 7.0 تكون كل الجزيئات مشحونة.	**كلما انخفض p^H للفينول نجد انه يكون مناسب لفصل RNA عن باقي المكونات. بينما اذا كان p^H 6.0, 7.0 = يكون مناسب لفصل DNA و RNA معاً.**
	

ثانياً: تاثير الليثيوم كلوريد LiCl



- يكثر اســـتخدامه لترســـيب الحمض النووي RNA، على الرغم من ان خطوة الترســـيب تتم بالكحول مع إضـــافة كاتيون أحادي التكافؤ مثل الصـــوديوم أو أيون الأمونيوم الذي يســـتخدموا على نطاق أوســـع علي مستوي الحمض النووي DNA.
- LiCl الترسيب بواسطته يقدم مزايا كبيرة حيث يتم التخلص من الكتير من NTP والانزيمات وبعض انواع RNA التي يكون طولها اقل من 300 bp او التي يكون تركيزها اقل من 0.1 mg /ml لايمكن ترسيبها.

Privacy

ماهي الاحتياطات الواجب اثناء الإستخلاص لـ RNA:

العوامل المؤثرة	كيفية الاحتياط لها
نوع الكائن:	اذا كان نبات او حيوان او فطر او بكتيريا.
مكان الاستخلاص والادوات:	لابد من تعقيم المكان جيدا عن طريق التعقيم الكحولي وتعقيم الادوات من مره الي مرتين او ثلاث في الاتوكيلاف.
RNase:	لابد من مراعاة التخلص من هذا الانزيم حتي لا يعمل علي تكسير RNA. ويتم التخلص من هذا الانزيم بالعديد من الوسائل **اولاً:** الاحتياطات الواجب مراعتها من الباحث نفسه عن طريق ارتداء القفازات وتغييرها بين كل مرحلة والاخري وارتداء الكمامة علي الفم. **وثانياً:** استخدام المواد التي تساعد علي التخلص منه وضبط الاس الهيدروجيني p^H
اذابة الراسب في نهاية الإستخلاص:	يفضل في تعليق الراسب RNA في نهاية الإستخلاص بماء محضرة بمادة DEPC واذا لم يوجد يحل الراسب او يعاد تعليقه فى $d.d\ H_2O$ او في ماء الحقن من الصيدلية.

Privacy

تمارين الدرس العملي

1. اذكر الفروق بين إستخلاص كلا من DNA & RNA من حيث المحاليل المستخدمة وفائدتها فى كل طريقة؟

.....

.....

.....

.....

.....

2. اذكر فروق التفريد الكهربي بين كلاهما DNA & RNA ؟

.....

.....

.....

.....

.....

Privacy

تقنية التفريد الكهربي
Gel Electrophoresis

الهدف العام

هو ان يتمكن الطالب من رؤية جزئ DNA خارج الخلية.

هدف الدرس:

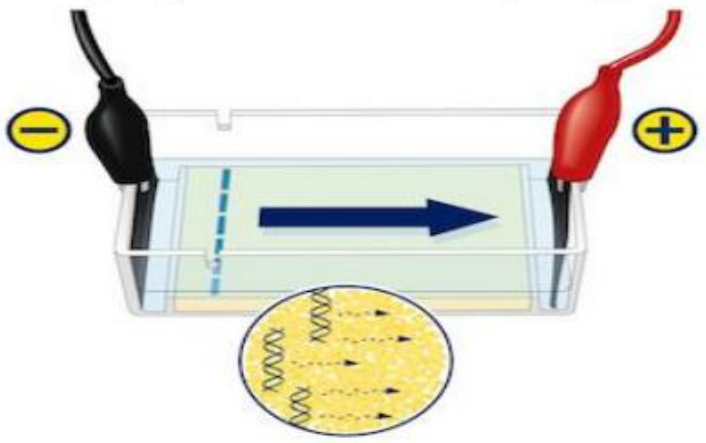
أن يتعلم الطالب احدي التقنيات الوراثية الجزيئية التي تعمل رؤية الاحماض النووية خارج الخلية من خلال وسط تدعيمي تمكنه من دراسة المادة الوراثية وتحليلها.

عناصر الموضوع

- تعريف التفريد الكهربى.
- الاساس العلمى ..
- أهميته أو إستخداماته.
- مفردات (مكونات) التفريد الكهربى
  - البيئة تدعيمية(تكوينها, تصميمها). Supporting media
  - الصبغات. Staining
  - المحاليل (تركيب الجل, أثناء التفريد) Buffers

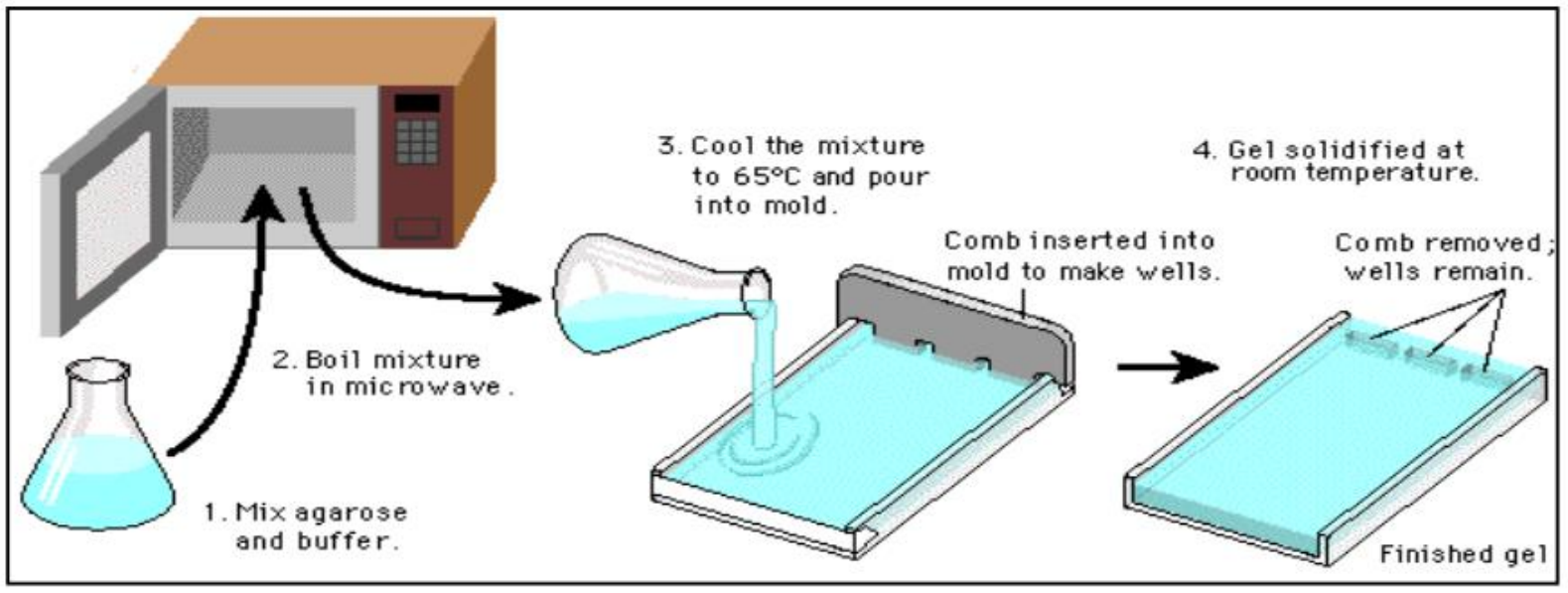
ما هي تقنية التفريد الكهربي؟ Electrophoresis

هي تقنية يتم فيها فصل الجزئيات (البروتينات أو الأحماض النووية سواء DNA or RNA) على أساس الوزن هذه الجزيئات molecular weight (Mw) وسرعة حركتها خلال الجل تحت تأثير مجال كهربائى .حيث تعتمد علي ان شحنة الحمض النووي DNA سالبة وبالتالى عند وضعه فى مجال كهربائى فإنه يهاجر من القطب السالب (cathode) إلى القطب الموجب (anode). ويستخدم جل الأجاروز في فصل DNA طبقاً لوزنه الجزيئي: الأخف وزنا هو الأسرع في الحركة عند الفصل.



Privacy

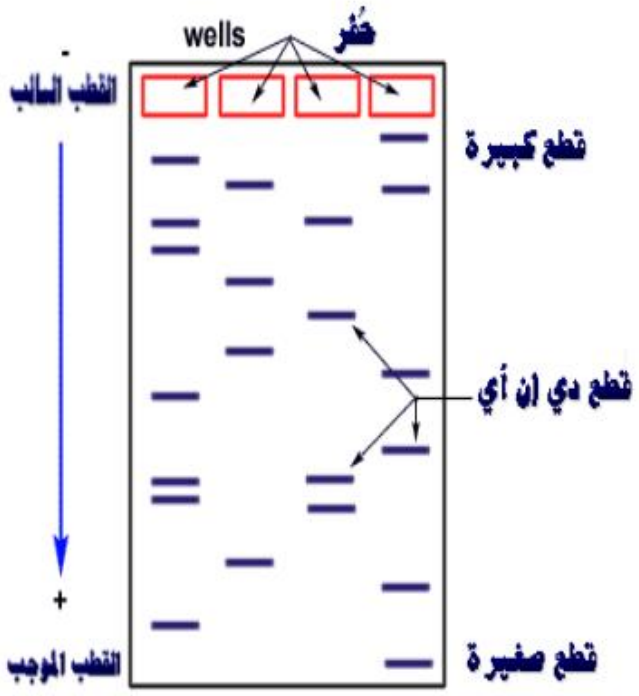
خطوات عمل جل الإجاروز:



العوامل التي يتوقف عليها هجرة الجزئيات :

1. قوة المجال وتأثيرها على شبكة الشحنات
2. حجم وشكل الجزئيات
3. قوة الايونيات
4. اللزوجة ودرجة حرارة البيئة التي يتحرك فيها الجزئيات

التفريد الكهربي يختلف على حسب العينة اذا كانت بروتين او حمض نووي:



وهناك نوعان أساسيان من الجل. الأول يسمى بجل الاجاروز (Agarose gel) و الثاني بجل البولي اكريليميد (Polyacrylamide gel). ونظرا لصغر الفراغات التي بين البولي اكريليميد فانه يستخدم لفصل القطع الصغيرة الحجم من DNA و في العادة التي تكون اصغر من 500جزيء من الحمض النووي و التي تتفاوت بين بعضها البعض بجزيء أو جزيئين. بينما يستخدم الاجاروز للأحجام الأكبر من DNA. و التي يتراوح حجمها بين 300 إلى 10000 جزيء من DNA

Privacy

الصبغات المستخدمة لصبغ الحامض النووي:

صبغة لسريان الإحماض النووية علي الجل	صبغة لرؤية الإحماض النووية بواسطة U.V
Bromo phenol Blue BpB تعتبر هذة الصبغة loading لـــ DNA وذلك لكى تعطى DNA لون لانه شـــفاف وتعطى له ثقل لكى يسقط فى Well وذلك لاحتواءه على Glycerol	**Ethidium bromide** هي صبغة فلورنسية تعطى وميض لـــ DNA وهو على الجل عندما تتعرض لـ UV light

انواع buffer المستخدمة لعمل الجل

هناك نوعين من انواع buffer المستخدمة لوضعها على Powder لعمل جل التفريد:

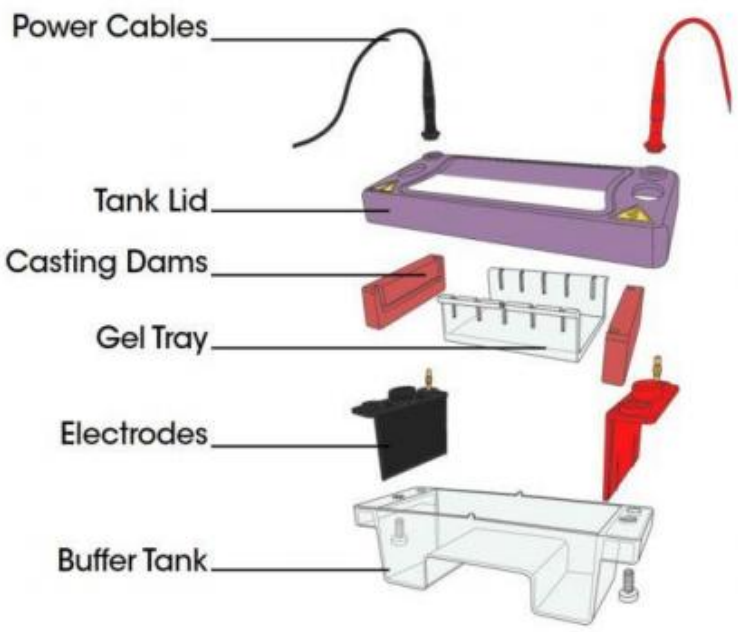
والاكثر شيوعا هو النوع الثانى (TBE)

1. TAE = Tris Acetic EDTA buffer
2. TBE = Tris Boric EDTA buffer

الاجاروز agarose	البولي اكريليميد polyacrylamide
مادة سكرية مستخرجة من الطحالب و عند تحضيرها فإنها تشبه في قوامها الجيلاتين الذي نأكله و لكنها أقوى في قوامها بعض الشيء و لكنها قابلة للتهتك أو الانقطاع عند نقلها بغير حرص. وبذلك يكون التفاعل فيها تفاعل فيزيقي يعنى تغير الخواص الفزيقيه للمادة بتغير الظروف ويكون جل الاجاوز افقي	هي مادة كيميائية لابد لها من التفاعل مع مادة اخري وهي مادة bis-acrylamide حيث يحدث بينهم تفاعل كيميائي للحصول على الجل وتستخدم صبغة الخماسي بلو Coomassie brilliant blue
تفريده افقي Horizontal	**تفريده راسي Vertical**

الجهاز المستخدم في هذه التقنية:

جهاز تفريد كهربى Electrophoresis



جهاز يســـتخدم في تقنية التفريد الكهربائي وهي الطريقة التحليلية التي يكثر اســـتخدامها في معامل البيولوجيا الجزيئية والطب. يتم تطبيقه لفصـــل وتوصـــيف البروتينـات والأحمـاض النوويـة والجزيئات الخلويه الصغيرة الحجم مثل الفيروسات والعضـــيات الصـــغيرة. حيث يعتمد علي أن الجســيمات المشــحونة في العينة تهاجر في مجال كهربائي داخل وسط داعم (بيئة تدعيميه علي سبيل المثال الاجاروز).

التفريد الكهربي للإحماض النووي
"DNA & RNA" Electrophoresis

الشروط الواجب مراعاتها اثناء العمل علي هذا الجهاز:

(اولاً: تحضير الجل):

1. لابد من التاكد من الوزنه الصحيحه المطلوبه من الاجاروز وكمية المحلول المنظم المناسبه.
2. لابد من هضمها جيداً داخل الميكرويف او علي السخان الحراري.
3. ترك الجل حتي تصـل درجة حرارته لدرجة مناسـبة ولتكن 60م يتسـني معاها وضـع صـبغة EtBr.
4. لابد من التاكد من مكان صـب الجل انه محكم الغلق حتي لا يتسـرب الجل وذلك بوضـع شـريط لاصـــق علي الاطراف "مع مراعاة ازالته عند بلمرة الجل حتي لا يعيق عملية ســـريان التيار الكهربائي".
5. عدم نسـيان وضـع الامشـاط في اماكنها الصـحيحه قبل بلمرة الجل حتي يتسـني عمل مجري "walls" التي سوف تجري فيها العينة.
6. عدم نسيان صبغ العينة بوضع صبغة BpB قبل الحقن.

Privacy

(ثانياً: تحضير الجهاز للعمل):

1. بعد التاكد من بلمرة الجل ونزع الشريط اللاصق يتم نقل وحده الصب الي وحده خزان المحلول المنظم "Tank buffer" ووضع الجل في الاتجاه الصحيح للحقن (يعني توضع مجري العينة walls في اتجاة القطب السالب).
2. لابد من مراعاة عدم تحريك الجهاز بمجرد البدء في عملية حقن العينات (حتي لا يحدث خروج للعينة من مكانها وبالتالي تلوث بين العينات وبعضها).
3. عند وضع غلاف الجهاز الموصل بالاسلاك الكهربائية لابد من مراعاة الاقطاب حتي لا تخرج العينة من الاتجاة المخالف (بمعني ان مجري العينة يوضع عند القطب السالب ولابد من توصيل الكبل السالب في هذا الاتجاة حتي يحدث تنافر للعينة مما يؤدي الي سريانها داخل الجل).
4. تشـــغيل الكهرباء بفولت يترواح من 100-130 فولت وفي حالات تجرية الاحماض النووية يفضل 100 فولت.

Privacy

ماهي المحاليل المنظمه للتفريد الكهربي لـ RNA؟

DEPC water	**اولاً: إعداد ماء خلي من RNase لكل مراحل الإستخلاص والتفريد:** • إذابة مادة (DEPC) **D**iethyl**P**yro**C**arbonate في ماء مقطر معقم بحيث يكون تركيز المادة 0.1% • يترك هذا المحلول 12ساعة في درجة حرارة الغرفة ثم ندخله الأوتوكلاف لتفكيك **DEPC** ويتم تخزينه علي درجة حرارة الغرفة.
10 X Running Buffer	
10x MOPS	وهي مادة تسمي (3-N-**mo**rpholino **p**ropane**s**ulfonic acid) يتكون من الاتي: g/ 500 ml 200 mM MOPS pH 7.0 — 20.4 10 mM EDTA — 1.9 50 mM Na Acetate — 3.4
Sample Buffer	
	1 ml 10 X Running Buffer — 100 ul formamide (deionized) — 500 ul formaldehyde — 178 ul RNA sample — 15 ul H_2O — 222 ul
Agarose Gel Mix	
	100 ml agarose — 1 g 10 X Running Buffer — 10 ml H_2O — 72 ml ثم هضم الاجاروز في المايكروويف وتركه يبرد ثم يضاف الاتي: Formaldehyde — 18 ml ثم ملء وحدة التجربة 1 X Running Buffer وليكن الحجم 700 ml

Privacy

ماهي فائدة مادة MOPS في محلول التجرية الخاص بالحمض النووي RNA؟

.....

.....

.....

.....

.....

ماهي الصبغات المستخدمة لصبغ الحمض النووي RNA ؟

.....

.....

ماهي تطبيقات إستخلاص الحمض النووي RNA ؟

- دراســـة التعبير الجيني للكائنات وقياس كمية التعبير المختلفه بين الكائنات في حالة تعرضـــهم لظرف معين.

الشروط الواجب مراعاتها اثناء العمل علي هذا الجهاز:

(اولاً: تحضير الجل):

1. لابد من تعقيم جاف للإدوات (من مخبار ودورق وزجاجة المحلول المنظم في الفرن قبل الاستخدام) وتعقيم التبس Tips في الاوتوكيلاف مرتين علي الاقل.
2. لابد من تحضير المحلول المنظم بماء مقطر معقم مرتين علي الاقل ويفضل استخدام ماء DEPC
3. لابد من التاكد من الوزنه الصحيحه المطلوبه من الاجاروز وكمية المحلول المنظم المناسبه.
4. لابد من هضمها جيداً داخل الميكرويف او علي السخان الحراري.
5. ترك الجل حتي تصل درجة حرارته لدرجة مناسبة ولتكن 60م يتسني معاها وضع صبغة EtBr.
6. لابد من التاكد من مكان صـــب الجل انه محكم الغلق حتي لا يتســرب الجل وذلك بوضــع شــريط لاصـــق علي الاطراف "مع مراعاة ازالته عند بلمرة الجل حتي لا يعيق عملية ســـريان التيار الكهربائي".
7. عدم نسيان وضع الامشاط في اماكنها الصحيحه قبل بلمرة الجل حتي يتسني عمل مجري "walls" التي سوف تجري فيها العينة.

Privacy

8. عدم نسيان صبغ العينة "بوضع صبغة BpB قبل الحقن" (مع مراعاة ان تكون الصبغة مخصصه للـ RNA فقط حتي لا يحدث تكسير للحمض بسبب تلوث الصبغة بإنزيم RNase).

(ثانياً: تحضير الجهاز للعمل:)

1. لابد من غسيل الوحده بمحلول NaoH 1عياري لمدة 10-15 دقيقة ثم غسيل الوحده بماء مقطره 5-6 مرات قبل الاستخدام.
2. بعد التاكد من بلمرة الجل ونزع الشريط اللاصق يتم نقل وحده الصب الي وحده خزان المحلول المنظم "Tank buffer" ووضع الجل في الاتجاه الصحيح للحقن (يعني توضع مجري العينة walls في اتجاة القطب السالب).
3. لابد من مراعاة عدم تحريك الجهاز بمجرد البدء في عملية حقن العينات (حتي لا يحدث خروج للعينة من مكانها وبالتالي تلوث بين العينات وبعضها).
4. عند وضع غلاف الجهاز الموصل بالاسلاك الكهربائية لابد من مراعاة الاقطاب حتي لا تخرج العينة من الاتجاة المخالف (بمعني ان مجري العينة يوضع عند القطب السالب ولابد من توصيل الكبل السالب في هذا الاتجاة حتي يحدث تنافر للعينة مما يؤدي الي سريانها داخل الجل).
5. تشغيل الكهرباء بفولت يترواح من 100-130 فولت وفي حالات تجربة الاحماض النووية يفضل 100 فولت.

المراجع:

http://www.taylorscientific.com/taylorscientific/MortarsPestles-C1195.aspx
http://www.google.com.eg/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=1&ved=0CDwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.agron.iastate.edu%2Fptf%2Fservice%2FCallus%2520RNA%2520extraction.pdf&ei=zrFAUuD5K4GVhQfxwoHYCw&usg=AFQjCNEiAvxblaPvbliLcM1-SmAlxO3__A&bvm=bv.52434380,d.ZG4
http://www.slideshare.net/sureshloyola7/nancy-rna
https://www.mcdb.ucla.edu/Research/Goldberg/HC70AL_S11/pdf/HC70AL-S11-03-29-11-GelElec.pdf
http://www.werathah.com/learning/gel.htm
http://www.whatisthebiotechnology.com/pages/biotech_training_project_tools_and_techniques.html
https://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html
http://www.clker.com/clipart-eppendorf-tube-with-open-cap.html
http://www.genome.gov/Glossary/resources/polymerase_chain_reaction.pdf
https://www.neb.com/protocols/1/01/01/taq-dna-polymerase-with-standard-taq-buffer-m0273
http://www.babec.org/files/PCR_2012/PCR_Optimization_Student_Guide_2012.pdf

Privacy

تمارين الدرس العملي

في احدي التجارب المعمليه قام الباحث بضـــبط البرنامج الخاص بتقنية PCR علي 35 دورة لقالب من DNA لاحد النباتات :

1. كم عدد النسخ المتوقع الحصول عليها فى نهاية البرنامج؟

2. بعد تفريد العينات علي جل الاجاروز لم يتمكن من رؤية الناتج النهائي بصورة واضحه فما هو تعليقك علي ذلك؟

Privacy

1. **في التجارب المعملية لإستخلاص الاحماض النووية هناك بعض المصطلحات لابد من معرفتها. اذكر فائدة كل مادة فيما يلي:**

Agarose	Ethidium bromide	"PCR" Polymerase Chain Reaction

2. **العوامل التي يتوقف عليها هجرة الجزئيات (من الأحماض النووية) :**
   - .....
   - .....
3. **لماذا يكون جل DNA افقي وجل البروتين راسي؟ استعن بالبحث عن طريق الانترنت؟**
   - .....
   - .....
   - .....

Privacy

تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل
Polymerase Chain Reaction" PCR"

الهدف العام:
أن يتعرف الطالب علي احد المعلمات الوراثية.

هدف الدرس:

أن يتعلم الطالب تقنية تُمكنه من عزل جين او جزء من جين داخل المعمل.

عناصر الموضوع :

- تعريف تقنية البلمرة المتسلسل PCR
- خطوات ومكونات التقنية
- بعض مشاكل هذه التقنية
- تطبيقات هذه التقنية فى المجال البحثي والمجال الجنائي

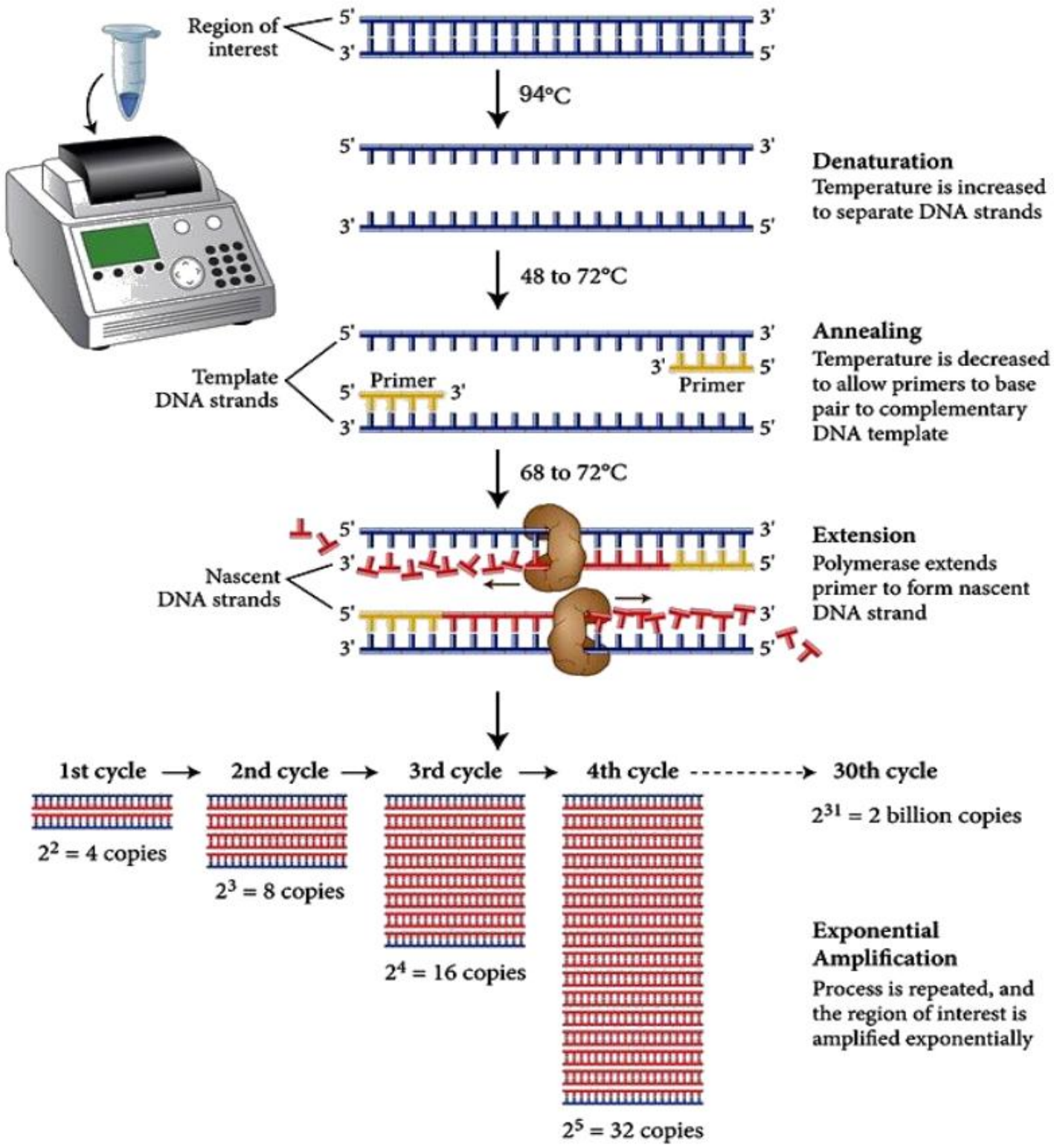
اولا: تعريف تقنية البلمرة المتسلسل PCR

- وصف التفاعل التضاعفي لسلسلة DNA (PCR) لأول مرة من قبل الباحث Kary Mullis في عام 1985على أساس مضاعفة قطعة معينة من DNA المنتجة من الجين الكلي أنزيمياً وخارج الجسم الحي *in vitro* بوجود البادئات Primers والتي تربط بالتتابع المكمل لها على شريط DNA القالب Template DNA.
- وتعد هذه العملية محاكاة لما يحدث في الطبيعة في جميع الكائنات الحية والتي تتضاعف مادتها الوراثية أثناء الانقسام.
- ومنها تقسم الي قسمين علي اساس نوع التقنية المستخدمة:

1. **بادئات عشوائية:**
وهذه تشـمل بدورها معلمات التفاعل العشـوائي متعددة الاشـكال لسـلسـلة DNA (RAPD–PCR)
2. **بادئات متخصصة:**
كمواقع محددة متوزعة داخل الجين كـــــ Alu – PCR ومعلمات التتابعات القصـــيرة المتكررة SSR.

Privacy

مراحل التقنية PCR في دورة واحدة:



مراحل تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR:

1. مرحلة التفكيك Denature
2. مرحلة الالتصاق Anneal
3. مرحلة الامتداد Extend

Privacy

1- مرحلة التفكيك Denature (Template denaturation):

شـــريطي الحمض النووى يتم فصـــلهم من خلال ارتفاع درجة الحرارة التى تكون عادة ما بين 93-96 °م , وتلك المرحلة تنتهى عندما تكون كل شريط مزدوج من الحمض النووى يصبح شريط واحد. درجة الحرارة التى تكون الســبب فى فصـــل الشـــريطى تســـمى بدرجة الانصـــهار (melting temperature= Tm).

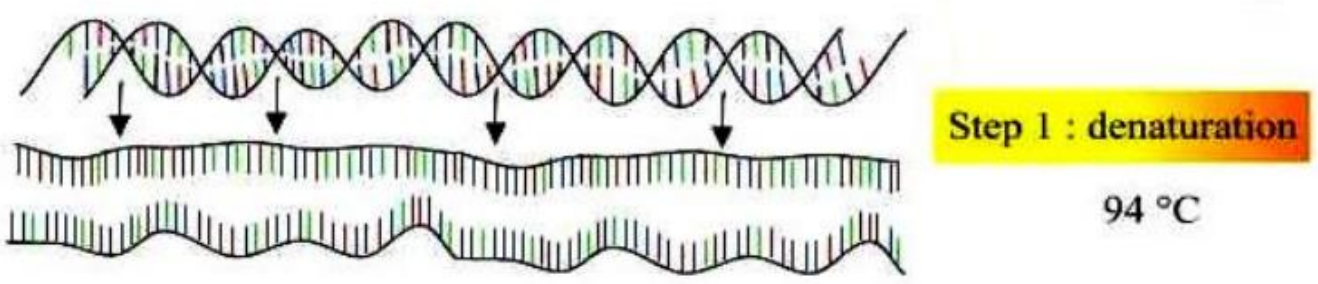
و توجد عوامل تاثر على عملية الفصل (او درجة الانصهار) الا و هى:

- نوع مذيب
- تركيز الاملاح
- درجة pH

على ســبيل المثال: فى وجود تركيز منخفض من الاملاح و درجة pH عالية و فى وجود مذيب عضـــوى (مثل formaldehyde) تكون درجة الانصهار منخفضة.

وايضـــا من العوامل المؤثرة على درجة الانصـــهار هى تركيز G/C و T/A فى تركيب الحمض النووى.

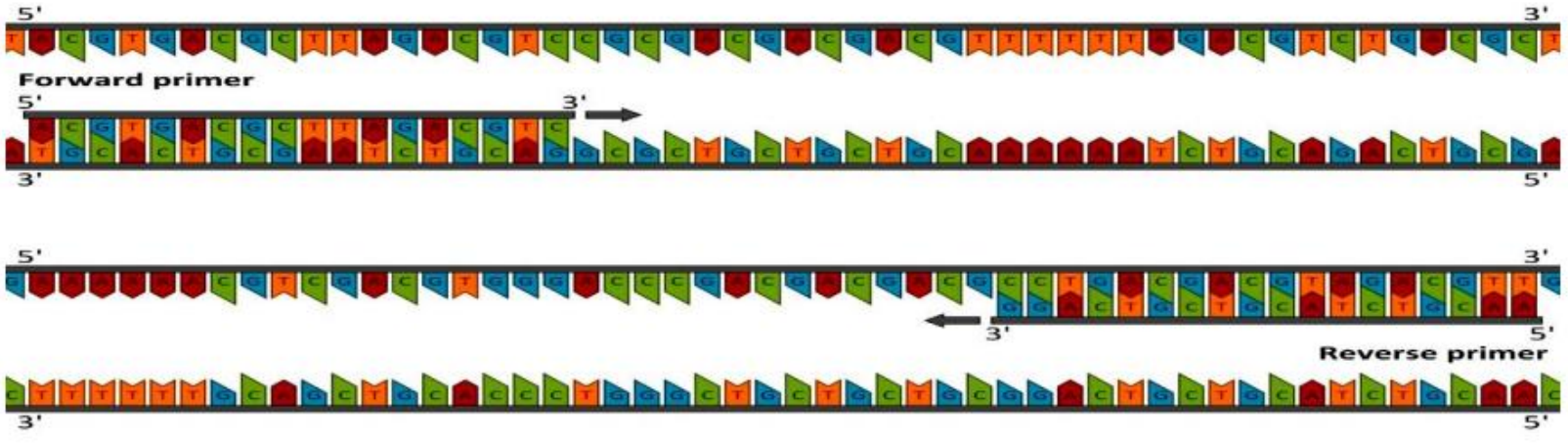
على ســـبيل المثال: فى *Serratia marecescens* تحتوى خلاياها على 60% تقريبا من G/C ممل يجعل درجة الانصـــهار تصـــل الى 94°م, بينما فى Pneumococcus تحتوى خلياها على 40% من G/C فتصبح درجة الانصهار 85°م.



2- ثانياً: مرحلة الالتصاق Anneal (Primer annealing):

انخفاض فى درجة الحرارة إلى ما بين 55-60 ْم ليقوم البادىء بالألتصـــاق فيزيائياً بواســـطة الروابط الهيدروجينية مع الحمض النووي (DNA) الأصـــل. وهى تأتي بعد مرحلة التفكيك مباشـــرة إذ يتم فيها ارتباط البادئات مع التتابعات من القواعد النتروجينية المكملة لها في الشـــريط المفرد من DNA القالب وذلك ببناء الروابط الهيدروجينية بينهما.

Privacy



العوامل التي تؤثر علي درجة الحرارة وطول الفترة الزمنية في مرحلة Annealing :

- تركيز
- طول البادئ
- نسبة احتوائه على قواعد G+C

ويتم حساب درجة الحرارة اللازمة للارتباط البادئ مع التتابع المكمل له على القالب:

هى التصاق البادئ وهى درجة تعتمد على طول البادئ و تركيب البادئ من قواعد نيتروجينية, و فى الغالب يكون درجة الالتصاق اقل بخمس درجات من درجة انصهار البادئ المستخدم

درجة انصهار البادئ (Tm of primer):

عند حساب درجة انصهار البادىء يجب ان نضع فى الاعتبار اننا نستخدم اثنين من البادئات فى التفاعل و انهما يجب ان يصممان ليكون درجة انصهارهما متشابها.

كيفية حساب درجة الانصهار القالب (T_m):

يمكن حساب درجة الانصهار من خلال القانون الاتى: $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$

على سبيل المثال:

- قم بحساب درجة الانصهار (T_m) لتتابع الاتى:

TGCTAATGCGTCA
ACGATTACGCAGT

الحـــــــــــــل:

$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$

= 2 (3+4) + 4 (3+2)
= 2 (7) + 4 (5)
= 14°C + 20 °C = 34°C

Privacy

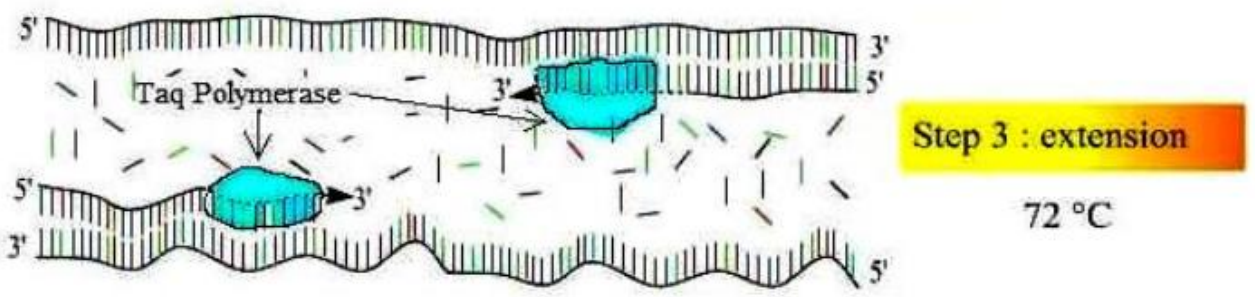
و الجدول التالى يوضح تطبيق القانون:

example primer	Primer Length	T_m	T_a
AGAGTGCAGAGTCCAGAGAGAGAG	**24**	$T_m = 2(9+2) + 4(10+3) = 74$	69
TTGTTAAATGCCCAGAAG	**18**	$T_m = 2(5+6) + 4(4+3) = 50$	45
TGATCCACATCTGCTGGAAG	**20**	$T_m = 2(10) + 4(10) = 60$	55

3- مرحلة الامتداد Extend (Primer extension):

يقوم برفع درجـة الحرارة إلى 72م ليقوم إنزيم DNA polymerase بعملـه في بنـاء الحمض النووي (DNA) الجديد .

فى تلك المرحلة يتم بدا بناء شـــريط جديد (لتتابع المطلوب) من البادئ من خلال انزيم بلمرة ثابت حراريا (Taq DNA polymerase) عنـد درجـة حرارة المنـاســبـة 72°م فى وجود قواعـد نيتروجينيـة (dNTPs). قواعد النيتروجينية (المكملة للقالب) ترتبط مع البادئ فى اتجاه 3', حيث ان اتجاه البناء شريط جديد يكون 5' الى 3'. و الوقت الذى يتم اخذه فى تلك المرحلة يمكن ان تكون طويلة تبعا لزيادة طول التتابع المراد اســتطالته (اذا زيادة الفترة الاســتطالة تعتمد على طول التتابع محل الدراســة), و لكن عادة ما تكون دقيقة واحدة يمكن ان تكون كافية لاتمام الاستطالة.



وهذه المراحل الثلاث تعتبر دورة كاملة وفيها يصبح الحمض النووي (DNA) الأصل قد تضاعف، وتعتمد كمية ناتج الحمض النووي (DNA) على عدد الدورات.

عدد جزيئات DNA الناتجة =
عدد قوالب DNA المستخدمة $\times 2^{\text{عدد الدورات المستخدمة}}$

وعلى هذا بفرض أننا بدأنا التفاعل باستخدام 5 قوالب من DNA.

(5 جزيئات مزدوجة الخيوط من 5 خلايا مثلا) وكررنا التفاعل 30 دورة فإننا نحصـــل على عدد من جزيئات DNA الناتجة يساوي 5×2^{30} أي أكثر من خمسة مليارات نسخة.

Privacy

ثانيا: مكونات تقنية البلمرة المتسلسل PCR وفائدة كل مادة:

البادىء The Primer

يعرف البادئ بكونه قطعة قصيرة من DNA و عادة ما يكون طوله ما بين 16- 30 قاعدة و ترتبط بقالب شريط DNA المفرد المكمل له عند النهاية '3 المحتوي على مجموعة الهيدروكسيل (OH) الحرة الضرورية لبدأ عمل إنزيم DNA polymerase عند درجة حرارة مناسبة (annealing-temperature).

**وهناك عدة أنوع من البادئات تختلف في طبيعتها باختلاف نوع التقنيات, فقد تكون ذات تتابعات عامة Universal ويمكن استخدامها مع جينات لكل تتابعات الكائنات، وقد تكون تلك البادئات مصممة بشكل خاص ليتعرف على موقع متخصص داخل الجين.

جزئ DNA الأصلي (الجينوم الكامل)

والذي يستخدم كقالب Template لبناء خيوط من DNA باستخدام تفاعل PCR , و الذى يتم استخلاصه من الخلايا بطريقه سليمة حتى يتم الحصول على جينوم ذو جودة عاليه (نقى وسليم) ويتم التحقق من ذلك بالتفريد الكهربى.

إنزيم البناء DNA polymerase

ويستخدم في تفاعل PCR أنواع معينة من إنزيمات بناء DNA تتميز بثباتها الحراري Thermo-stable enzymes حيث يمكنها احتمال الحرارة العالية (94°م) وأداء الدور المطلوب منها ومن أكثر هذه الأنواع استخداما إنزيم Taq polymerase والمعزول من بكتريا *Thermus aquaticus* (كلمة **Taq** جاءت من حرف **T** من اسم الجنس وحرفي **aq** من اسم النوع) وتعيش هذه البكتريا في الينابيع الحارة ولذلك تمتلك الإنزيمات المعزولة منها قدرة عالية نسبيا على العمل في ظروف الحرارة العالية.

القواعد النيتروجينية (النيوكليوتيدات) Nucleotides

والتي تعتبر بمثابة أحجار البناء عند بناء DNA حيث بارتباطها بالنهاية '3 للبادئ تكوِن شريط DNA الجديد، وتضاف النيوكليوتيدات في تفاعل PCR على هيئة نيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) تحتوي على سكر دي أوكسي ريبوز deoxyribose (من هنا جاء حرف d الصغير قبل اسم النيوكليوتيدة بينما ترمز TP إلى كونها ثلاثية الفوسفات Tri-phosphate).

Privacy

أيونات المغنسيوم الثنائية Mg^{+2}

والتي تعمل كمرافق إنزيمي لإنزيم البناء وتضاف على هيئة كلوريد مغنسيوم $MgCl_2$.

محلول منظِم Buffer

يضبط درجة الحموضة p^H عند المستوى المناسب لتفاعل بناء DNA ويحتوي على بعض المواد التي تحسن من أداء إنزيم البناء.

الماء النقي المعقم :

وهو الوسط المناسب لحدوث التفاعلات الحيوية ويضاف في تجربة PCR لضبط الحجم النهائي لمخلوط التفاعل تبعا للكميات المستخدمة من كل مكون من المكونات الستة السابقة والتي قد تختلف من تجربة لأخرى تبعا لاستخدام مصادر مختلفة للكيماويات قد تختلف في تركيزاتها من شركة لأخرى.

ثالثاَ: بعض مشاكل التى يواجهه الباحث اثناء التفاعل PCR:

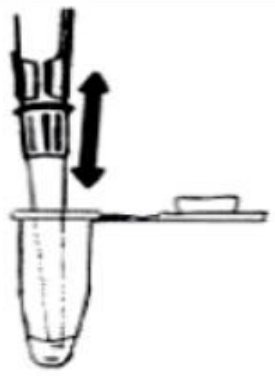
اولاً: مشاكل خاصه بالمنتج النهائي:

1. اذا كان الناتج PCR ضعيف ماذا يمكن ان تفعل لزيادة المحصول او الناتج ؟؟

- خفض درجة حرارة Annealing تدريجيا لاقل درجة ممكنة
- زيادة كمية Primer – or Template – or Taq
- تغيير تركيز محلول Kcl (اعلى لو كان المنتج اقل من 1000 bp واقل لو كان المنتج اكبر من 1000 bp)
- فحص تتابع Primer وذلك لانه ممكن ان يكون به خطأ و / او زيادة فى الطول عن طريق زيادة 5 نيوكليوتيدات.

رابعا: مشاكل او احتياطات واجب عملها اثناء العمل:

1. **عمل مزج جيد للعينة برفق وعدم تكرارها اكثر من مره او اتنين بالكثير.**



2. **التخلص من التبس بين كل عينة والاخري.**

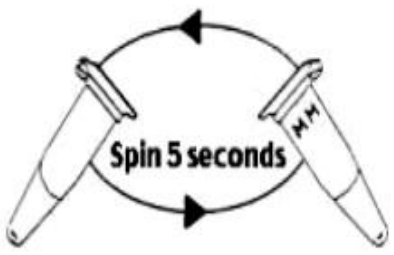
Privacy

3. حافظ علي وضع كل مكونات التقنية داخل عبوة فيها ثلج

4. في اثناء العمل لابد من عمل علامة علي كل مكون تم اضافته او كل خطوة تم إنجازها

5. عمل مزج جيد "لـ Master Mix او خليط مكونات التقنية" قبل الاستخدام

6. عمل طرد مركزي قصير جدا للعينة قبل وضعها في الجهاز



الجهاز المستخدم في هذه التقنية:

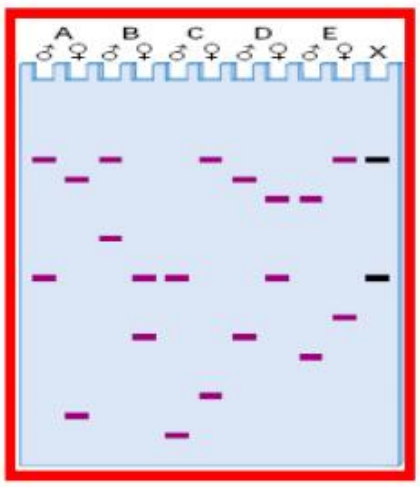
الشروط الواجب مراعاتها اثناء العمل:

1. لابد من إدخال درجات الحرارة الخاصة بالبرنامج المستخدم قبل تشغيل الجهاز والتاكد من صحتها.
2. مراعاة غلق الجهاز جيداً .
3. مراعاة غلق الانابيب جيدا حتي لا يحدث تبخر للعينة وتعطي نتيجة خاطئة.

Privacy

سادساً: تطبيقات هذه التقنية PCR:

- تشـخيص الأمراض التي تتسـبب عن العدوى بمسـبب مرضـي حى (بكتريا أو فيرس مثلا) كالإلتهاب الكبدي الوبائي والإيدز.
- تشخيص الأمراض الوراثية (تنتج عن وراثة الفرد لجين ممرض من أحد أو كلا الوالـدين) حتى إن كـان الفرد لا يظهر عليـه المرض (يحمـل الجين الممرض بحالة خليطة) مثل أنيميا الخلايا المنجلية.



- تطبيقات الطب الشرعي المختلفة مثل تحديد الجناة في الجرائم ونفي البنوة.
- عمل البصمة الوراثية للأصناف النباتية والعشائر الحيوانية المختلفة.
- دراسة العلاقات التطورية .

Privacy

التقدير الوصفى و الكمى للبروتين
The Descriptive Method and Quantitative Estimation of Protein

الهدف العام

هو ان يتمكن الطالب من قياس تركيز البروتين في العينة.

هدف الدرس:

أن يتعلم الطالب احدي التقنيات الوراثية الجزيئية التي تعمل علي قياس وتقدير تركيز البروتين في العينة عن طريق القياس اللوني والطيفي.

عناصر الموضوع

- جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer
- تقدير البروتينات
  - الطريقة الطيفية
  - الطريقة اللونية
    1. طريقة بايوريت Biuret method
    2. طريقة برادفورد Bradford method
- المنحني القياسي Standard curve

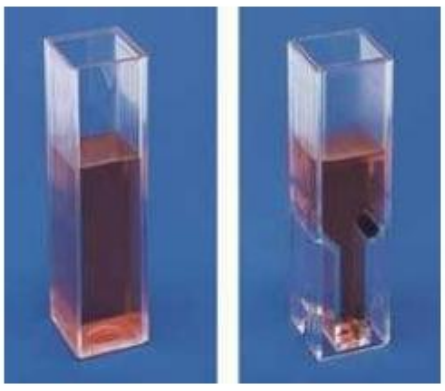
تركيب جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer

- **مصدر ضوئي: Light Source**

لمبة من مادة " التنجستن" تصدر اشعة لها طول موجي مداه من 340 إلى 900 نانوميتر، كما في معظم الأجهزة. لمبة من مادة "الديتيريوم" تصدر اشعة لها طول موجي مداه من 200 إلى 400 نانوميتر، كما في الأجهزة المتقدمة.

- **محدد الطول الموجي: Wave Length Selector**

يستخدم المنشور الزجاجي لتحليل الضوء إلى اطوال موجية مختلفة، تم يمرر عبر حاجز به شق طولي لتحديد مسار الضوء الساقط.



- **أنبوبة العينة: Cuvette**

تستخدم أنبوبة على شكل متوازي مستطيلات لها ابعاد ثابتة (1سم x1سم x4سم) تملأ بالمحلول المراد معرفة تركيزه و بذلك تكون المسافة التي يقطعها الضوء فى المحلول تحت الفحص هي نفس المسافة التي يقطعها الضوء في محلول المقارنة (المحلول الخاوي "Blank") ؛ و تصنع أنبوبة العينة من الكوارتز أو الزجاج أو البلاستيك الشفاف عالي النقاوة.

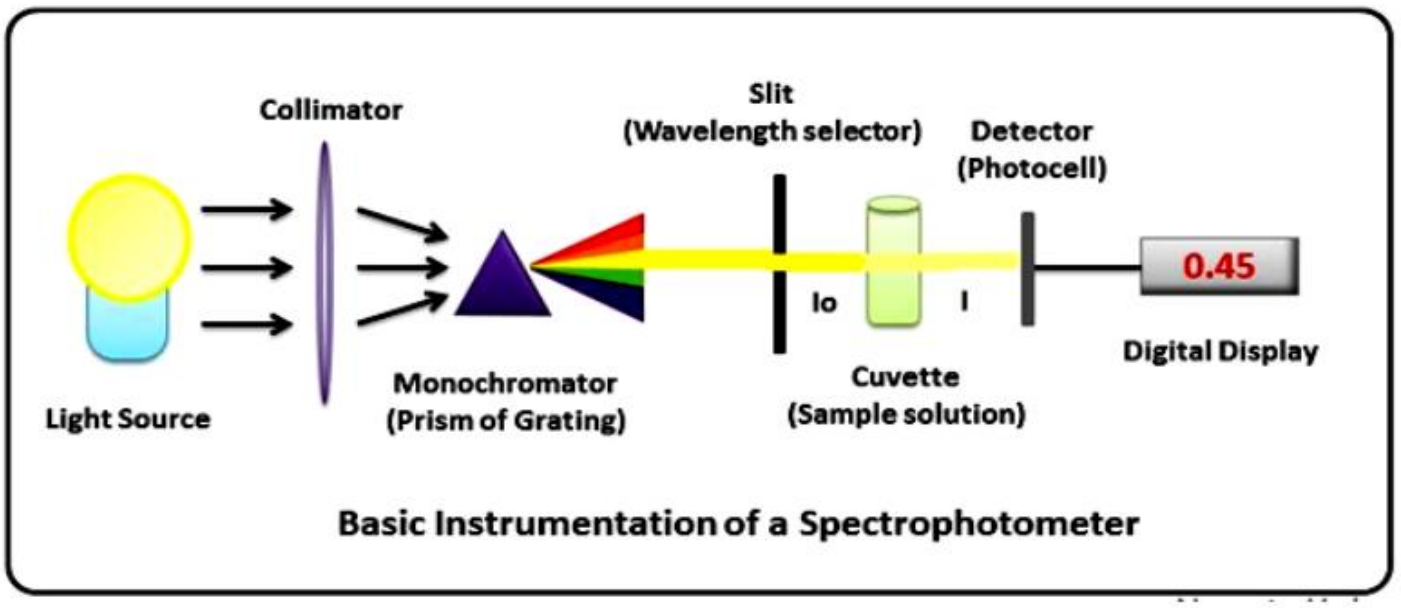
Privacy

- **وحدة التعرف على الضوء النافذ: Detector**

عبارة عن خلية كهروضوئية تقوم بتحويل فوتونات الأشعة التي نفذت إلى طاقة كهربائية، حتى يمكن تقدير كمية الضوء النافذ.

- **وحدة التسجيل: Recorder**

تحتوي على راسم يمكنه رسم منحنى الإمتصاص على ورق تسجيل أو يمكن إظهارها على شاشة "Monitor".



Basic Instrumentation of a Spectrophotometer

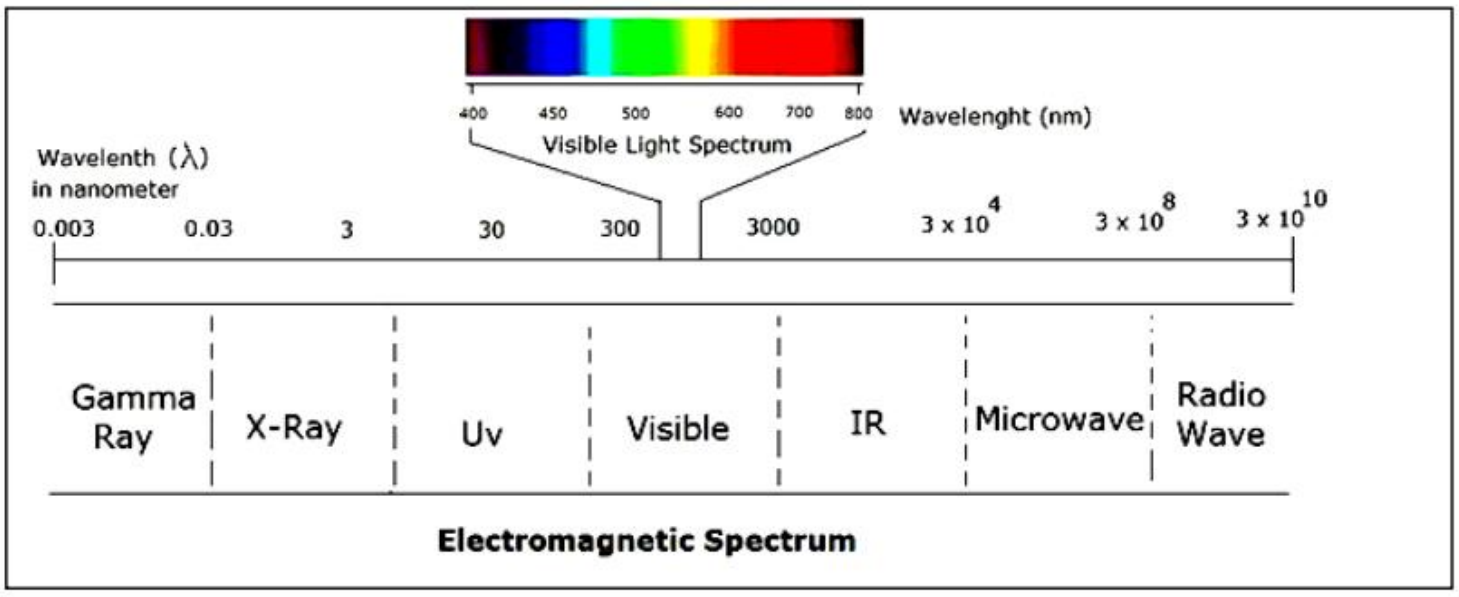
لذا فهو جهاز يقيس الاشعة المنعكسة اثناء مرورها على المحلول (محل الدراس) , بمعنى اخر يقيس الاشعة التى تم عبورها من خلال المحلول و يتم مقارنتها بكمية الاشعة التى تم اصدرها بالفعل و من خلال ذلك يتم معرفة الاشعة التى تم امتصاصها بواسط جزيئات المحلول. و قد يكون طريقة الامتصاص للاشعة متساوية و لكن الاختلاف يرجع الى الاطوال الموجية التى يتم الامتصاص عندها حيث ان كمية الامتصاص تختلف من طول موجى الى طول موجى اخر لان كل مادة لها طول موجى محدد التى يتم عندها امتصاص الاشعة.

- **ما هو الضوء؟**

الضوء في حقيقته : (هو نوع من الطاقة الإشعاعية "Radiant Energy" ذات أطوال موجية مختلفة "حيث ان الضوء الأبيض يتكون من كل ألوان الطيف المرئي التي تشاهد في قوس قزح") يمكن فصل الضوء الأبيض و ذلك بتمرير شعاع من الضوء الأبيض خلال منشور زجاجي فتنفصل الألوان تبعاً لطول موجاتها إلي " أشعة بنفسجية – أشعة زرقاء داكنة "نيلية" – أشعة زرقاء – أشعة خضراء – اشعة صفراء – اشعة برتقالية – أشعة حمراء ".

إذا مر الضوء خلال محلول ملون فإن هذا المحلول يقوم بإمتصاص اختياري " Selective Absorption" لأطوال موجية محددة و يسمح بنفاذية "Transmission" بقية الأطوال الموجية، و هذا ما يسبب ظهور المحلول بلونه المميز.

Privacy



استخدامات جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer

1. في قياس تركيز الإحماض النوويه:

ومن خلال ما سبق ولان الاحماض النووية (DNA و RNA) مثل كل المواد الاخرى لديها خاصية امتصاص الضوء عند طول موجي محدد (لذا يرجع كمية الضوء الممتصة الى الطول الموجى التى يقاس عندها الحمض النووى) (طول الموجى المناسب لقياس تركيز ما من الحمض النووى هو عند 260nm).

2. في قياس تركيز البروتينات :

تقدر كميات البروتينات بعد استخلاصها وتجزئتها من مصادرها. عن طريق الامتصاص الطيفي مثل تقدير الاحماض الامينية التايروسين والتربتوفان عند طول موجي 275-280 نانوميتر او قياس امتصاص البروتين للضوء اثناء صبغه بالكوماسي بلو عند طول موجي 595.

بعض العوامل المؤثره فى درجة حساسية القراءه على الجهاز:

1. Cuvettes :

يمكن ان تكون مصنوعة من بلاستك او زجاج او الكريستال أو الكوارتز. و Cuvettes التى يتم اختيارها تعتمد على الطول الموجى التى يتم قياس درجة/معدل الامتصاص عندها. حيث ان Cuvettes المصنوعة من البلاستك او الزجاج تستخدم فى قياس درجة الامتصاص عند طول موجى 340 نانومتر و Cuvettes المصنوعة من الكوارتز عند استخدام الاشعة الفوق بنفسيجية لكن Cuvettes المصنوعة من البلاستك و زجاج تمتص الاشعة الفوق بنفسيجية.

2. المحلول المقاس:

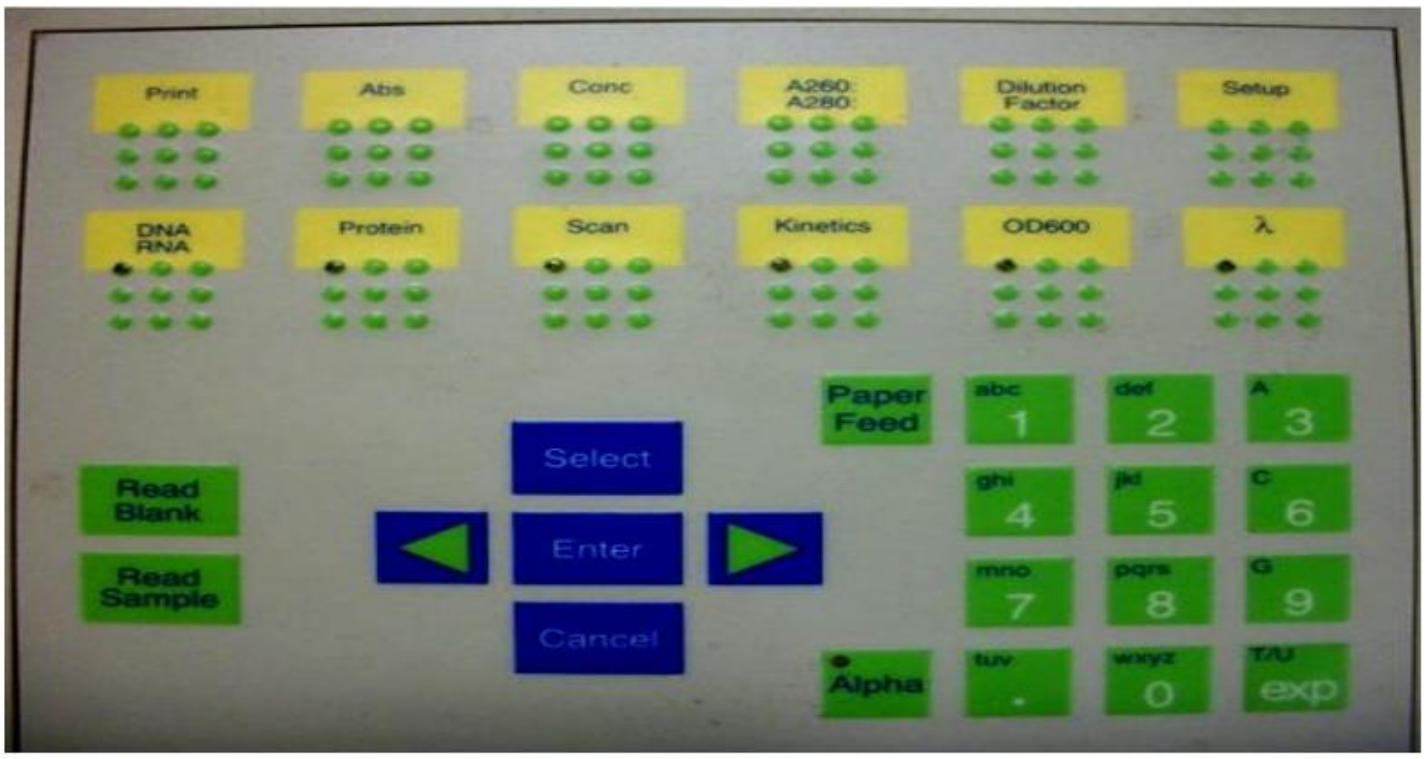
من حيث درجة النقاوة والتركيز والطول الموجي للمحلول.

Privacy

خطوات العمل على الجهاز:

1- توصـــيل التيار الكهربى لجهاز. اســـم الجهاز Bio Rad Smart Spec Plus Spectrophotometer

2- الضـغط على الزر الخاص بالمادة المراد قياسـها على سـبيل المثال: قياس الاحماض النووي (DNA, RNA)



3. لابد من تصفير الجهاز قبل البدء في قياس العينات عن طريق الضغط علي Read Blank.
4. ثم عمل سلسلة من التخفيفات المطلوبه لقياس البروتين ثم الضعط علي Read sample.

Privacy

Privacy