

بسم الله الرحمن الرحيم

251 حذق

الأحياء الجزيئية

حساب تركيز الحمض النووي DNA

المعمل الرابع

1. التحقق من وجود الحمض النووي DNA في العينة.
2. قياس تركيز ونقاء الحمض النووي.
3. الفصل الكهربائي لعينة الحمض النووي DNA GEL ELECTROPHORESIS.

قياس تركيز ونقاء الحمض النووي DNA

- عند عزل الحمض النووي , نلاحظ أنه قد يحتوي على العديد من الملوثات ، مثل احتوائه على كميات كبيرة من البروتينات أو الحمض النووي RNA .
- هناك إجراءات متعددة يمكن استخدامها لإزالة هذه الملوثات وترك الحمض النووي بشكل نقي .

• من طرق تنقية الحمض النووي DNA:

1. التخلص من البروتينات : عن طريق اضافة خليط من
(الفينول: الكلوروفورم: كحول أيزوأميل)

2. ويمكننا التخلص من RNA عن طريق اضافة انزيم الريبونوكليز RNase.

حساب تركيز الحمض النووي DNA باستخدام جهاز تحليل الطيف الضوئي SPECTROPHOTOMETER



- جهاز تحليل الطيف الضوئي هو جهاز لقياس كثافة الضوء الممتص (أو النافذ) بواسطة المادة المستخدمة عن طريق تحديد الطول الموجي الذي يوجهه الجهاز إلى العينة (المحلول).

حساب تركيز الحمض النووي DNA باستخدام جهاز الطيف الضوئي SPECTROPHOTOMETER

1- يحسب درجة الامتصاص عند الطول الموجي 260 (نانومتر nm) ثم نعوض في القانون التالي:

$$\text{Concentration of DNA} = \frac{\text{O.D} \times 260 \times 50 \times \text{dilution factor}}{1000}$$



2- تكون النتيجة بوحدة نانوجرام لكل ميكرو لتر ng/ul.

حساب تركيز الحمض النووي DNA باستخدام جهاز الطيف الضوئي SPECTROPHOTOMETER

التأكد من نقاء الحمض النووي :

- قياس الامتصاص عن الطول الموجي 260 و 280 nm

$$\frac{\text{O.D. 260}}{\text{O.D.280}} -$$

- وتكون قيمة الناتج 1.7-1.8

- أما إذا كان تركيز DNA خارج هذا المدى لا تكون العينة صالحة ، وهذا يعني عدم ذوبان الحمض النووي أو وجود شوائب مثل البروتينات .



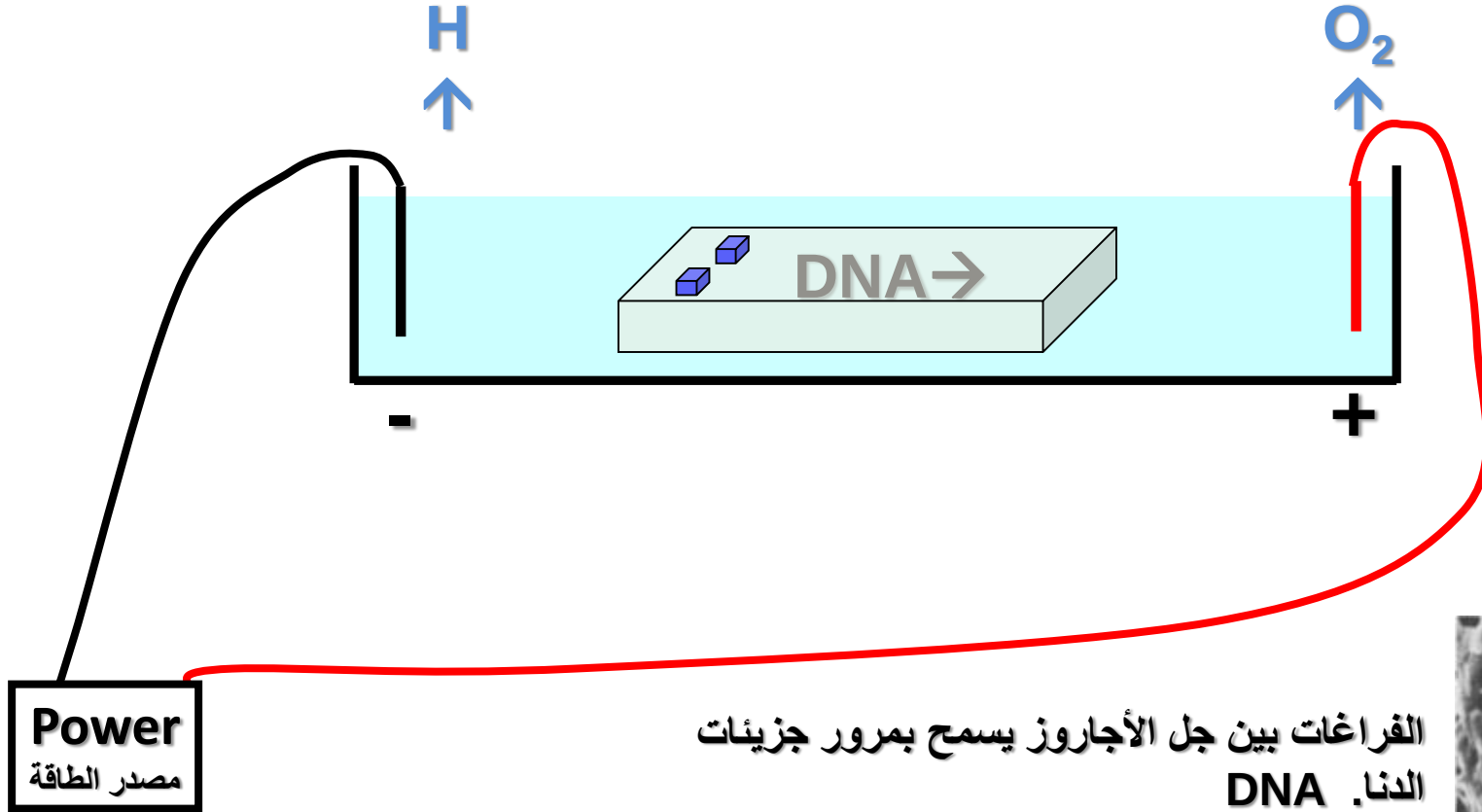
الفصل الكهربائي لعينة DNA بواسطة Gel Electrophoresis

- ♣ الفصل الكهربائي بواسطة الجل من أكثر التقنيات استعمالاً لتحليل الأحماض النووية والبروتين.
- ♣ جل الأجاروز يستعمل غالباً لتحضير وتحليل الحمض النووي DNA.
- ♣ الفصل الكهربائي بواسطة الجل يعمل على فصل الجزيئات على الحركة داخل الجل تحت تأثير المجال الكهربائي.
- ♣ نستعمل الفصل الكهربائي بواسطة الجل لتحديد النواتج بعد عملية تضخيم الدنا بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي.

- الحمض النووي الدنا يحمل شحنة سالبة.

- عندما نضع الحمض النووي الدنا في مجال كهربائي فإنه سوف يهاجر أو (يرحل) للقطب الموجب "المصعد".

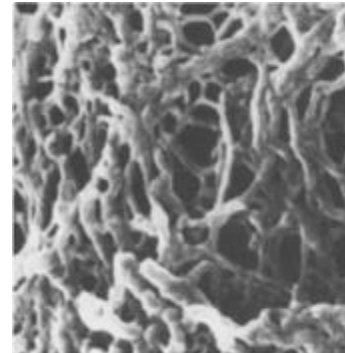
- جل الأجاروز يستعمل لفصل وتحرك جزيئات الدنا اعتماداً على حجم الحمض النووي الدنا . DNA



الفراغات بين جل الأجاروز يسمح بمرور جزيئات
الدنا . DNA

صورة من المجهر الإلكتروني الماسح لجل

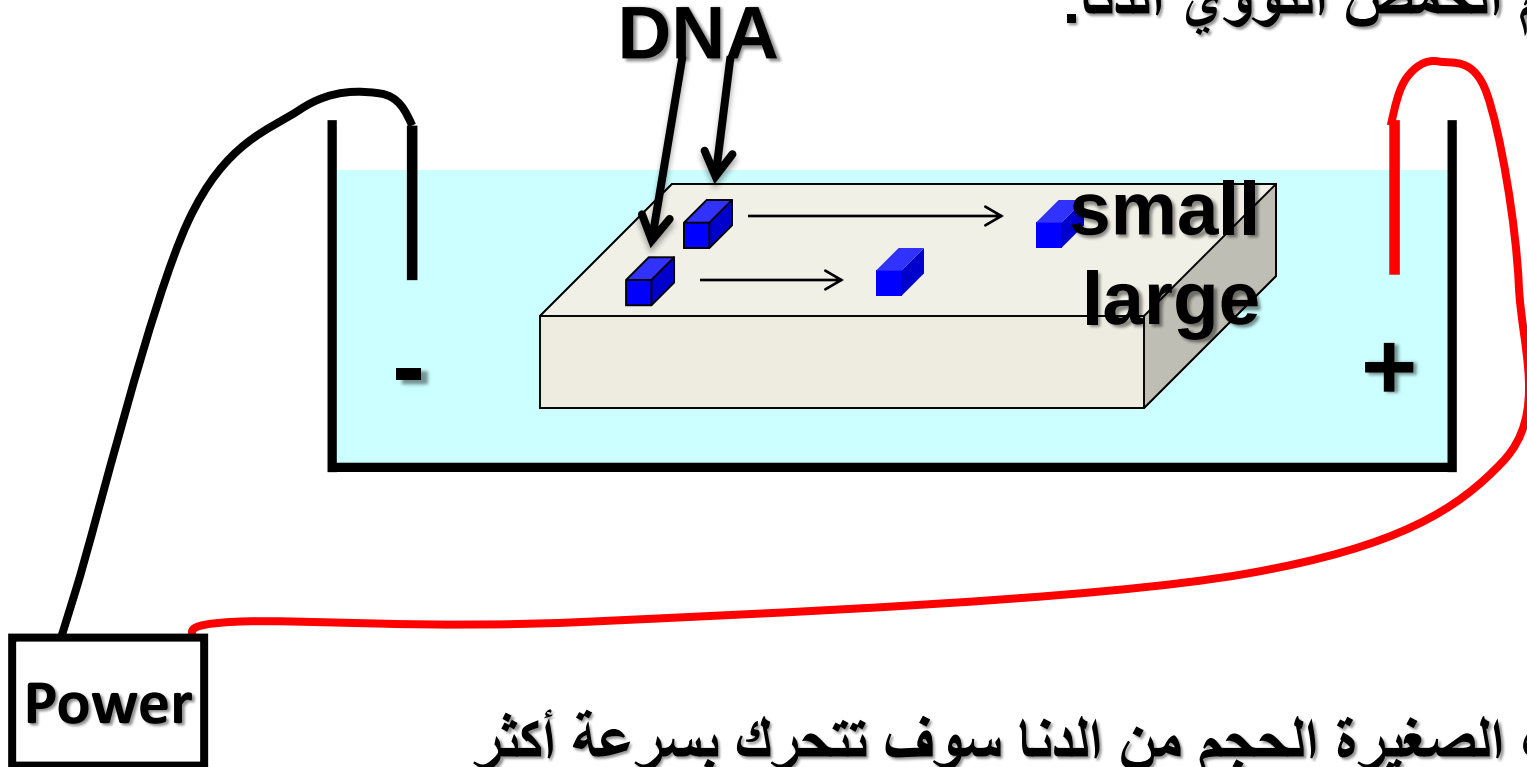
الأجاروز (1x1 μm) Amal Alghamdi-MIC251-2014



س: كيف سيرحل الدنا بسرعة ???

اعتماداً على:-

- 1- قوة المجال الكهربائي.
- 2- المحلول الدائري.
- 3- كثافة جل الأجاروز.
- 4- حجم الحمض النووي الدنا.



-الجزيئات الصغيرة الحجم من الدنا سوف تتحرك بسرعة أكثر
من الجزيئات الكبيرة 11

DNA Sample

• عينة بها بعض الخلايا المكتسبة

• غمر الخلايا في محلول مغذي
على الطبق ، وتترك لتنمو
وتتضاعف .

• الخلايا المتجمعة تجمد للاستعمال
المستقبلي .

• الـ DNA يكون مكتسب من هذه
الخلايا .



Restriction Enzyme



• نستعمل

Restriction enzyme
لتقطيع الـ DNA إلى أجزاء .

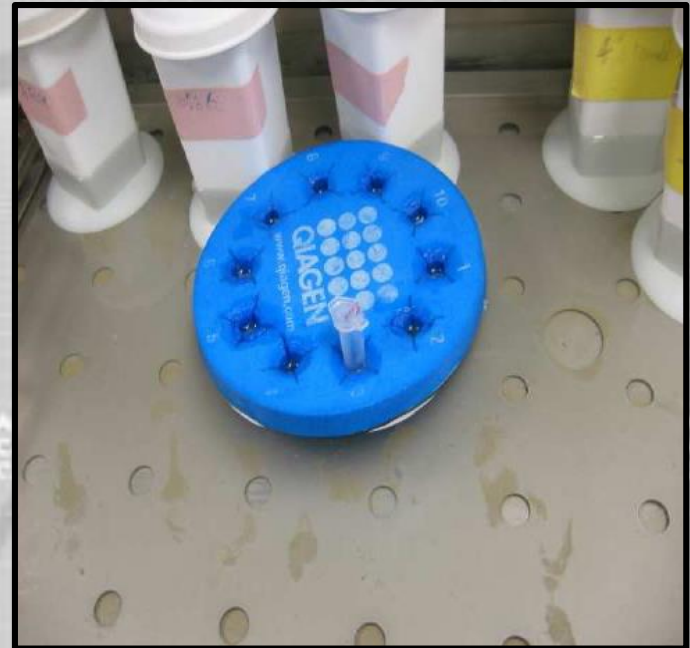
Apply Enzyme



• توضع عينة الـ DNA
وانزيم القطع في الأنبوب .

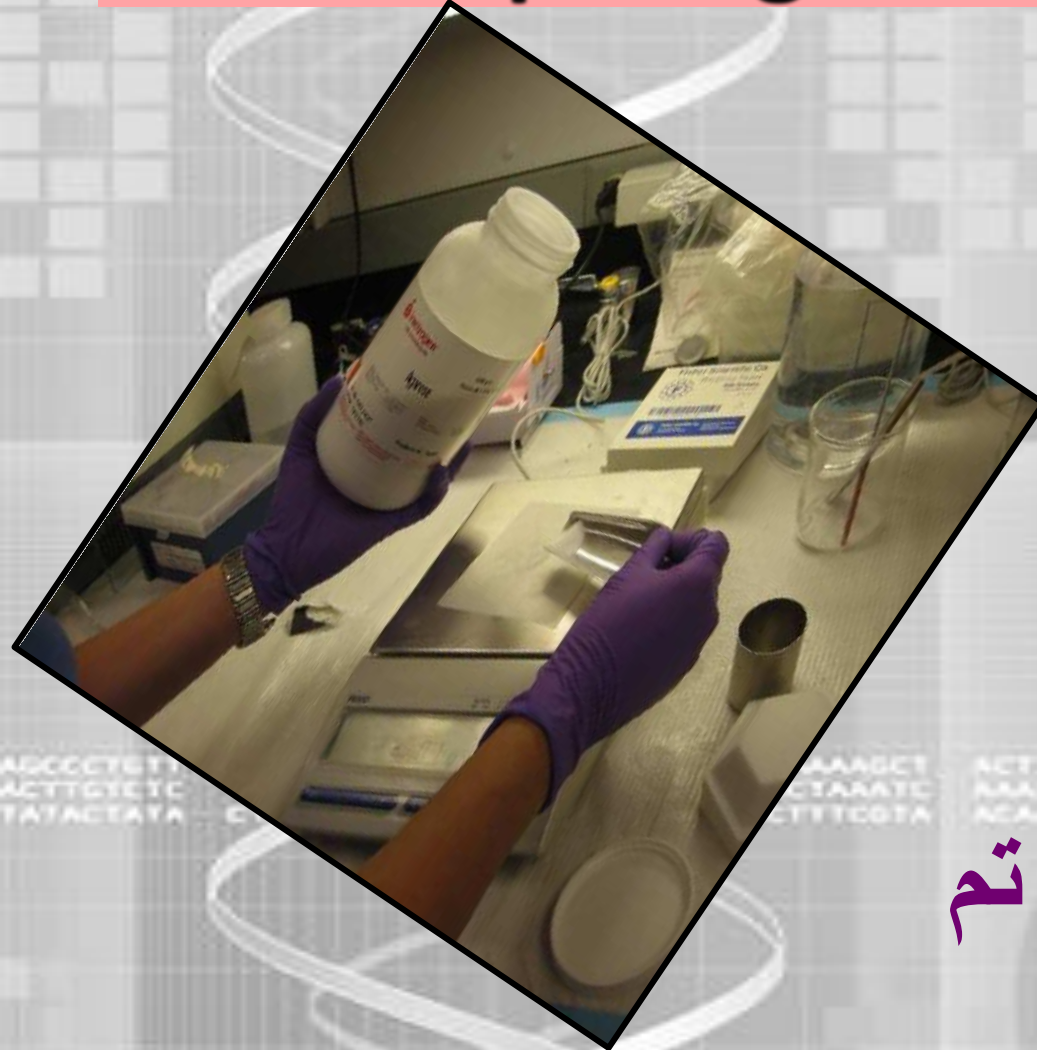
• تعرض الأنبوبة للهز
والدوران حتى يختلط
الـ DNA مع الأنزيم.

Water Bath

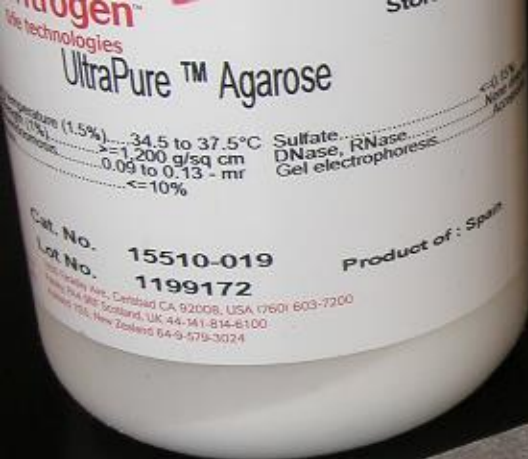


تحضير جل الأجاروز

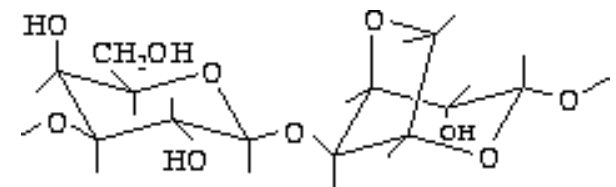
Preparing the Agarose Gel



• في هذه الأثناء يحضر
الجل بتركيز 1% ،
باستخدام مسحوق الـ
Agarose وإذابته في
TBE 1X buffer ، كما تم
شرحه سابقاً.



الصيغة البنائية لجأجاروز



جالاكتوز مترووح الماء جالاكتوز

• الأجاروز عبارة عن متبلر خطي يستخرج من الطحالب البحرية.

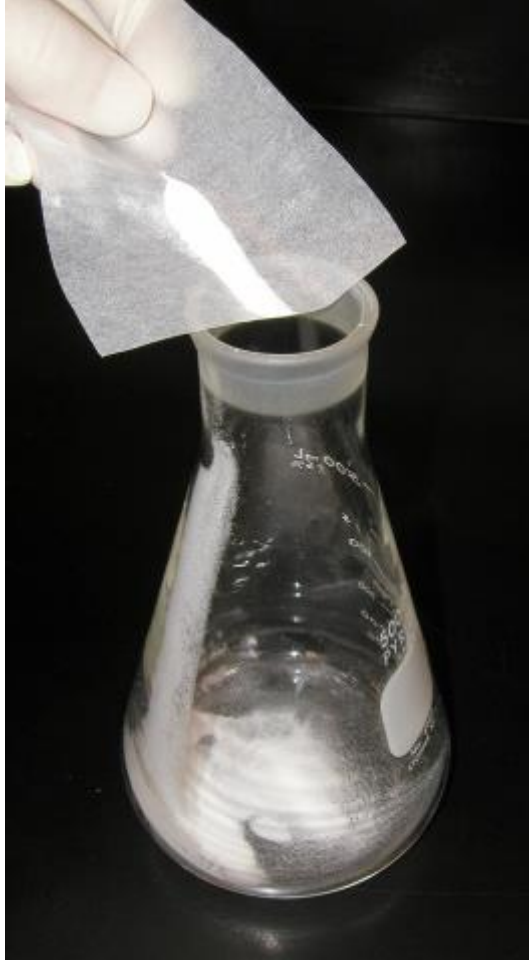
• يحضر جل الأجاروز بواسطة مزج
بودرة الأجاروز مع المحلول الدارئ.

Flask for boiling ▲
دورق للغليان



• خلط المسحوق مع المحلول المنظم في دورق .





بودرة الأجاروز



المحلول (المنظم) الدارئ

تمزج بودرة الأجاروز مع المحلول الدارئ باستخدام الدورق مع مراعاة أن يكون الدورق أكبر من الحجم المذاب.

Preparing the Gel



• يسخن الدورق في
المايكرويف عند الحاجة
حتى يذوب المسحوق
بالكامل في الماء .

• يصبح المحلول صافي.

غليان الأجاروز



محلول الأجاروز غير ذائب في
درجة حرارة الغرفة.



محلول الأجاروز يصبح صافي
بعد غليانه.

ملاحظة:-

نحرص وننتبه عند عملية الغليان فمحلول الأجاروز سيصبح ساخناً جداً , والزيادة في التسخين ممكن أن يبيخر محلول الأجاروز.



Power supply→
مصدر الطاقة

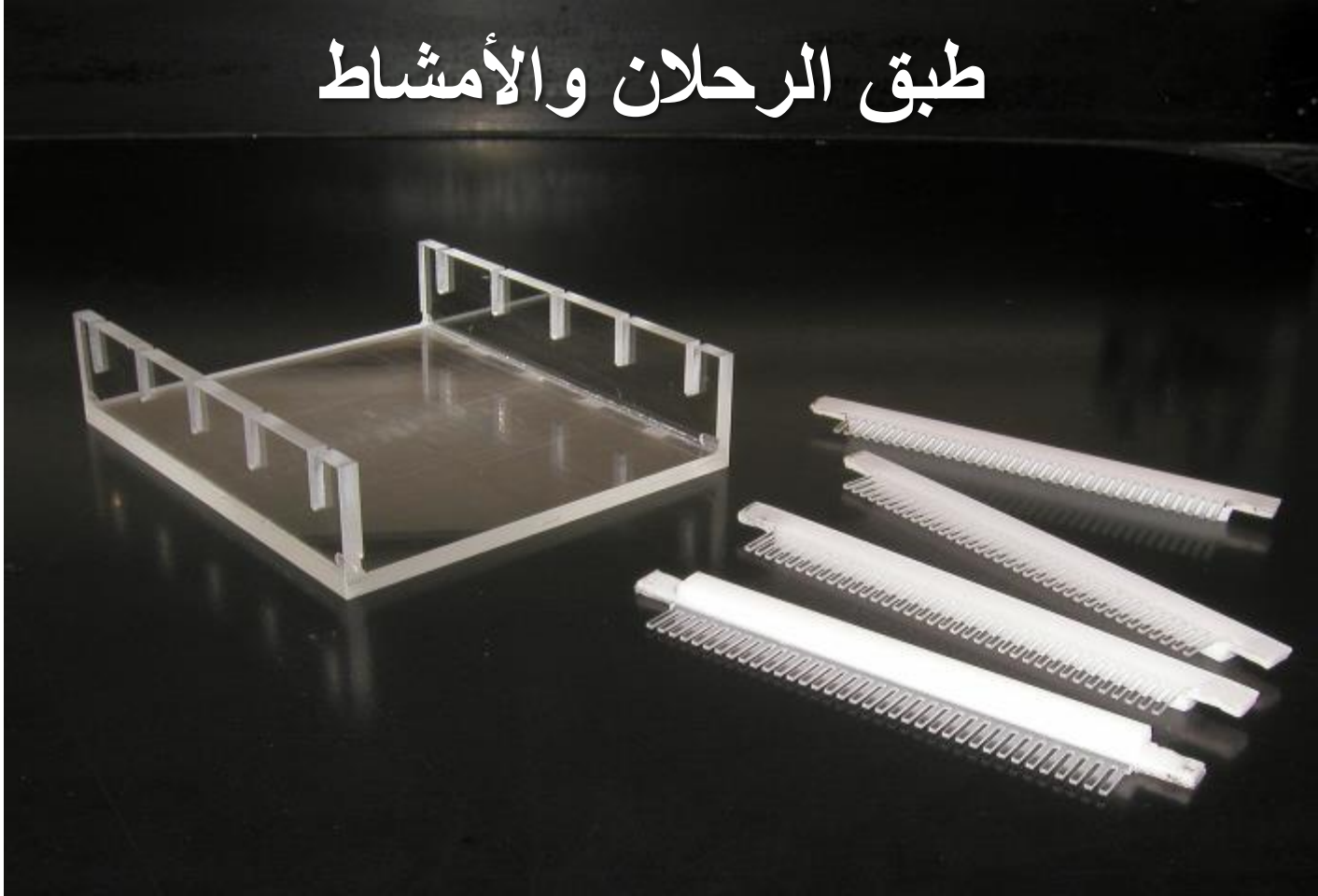
↙Cover
الغطاء

Gel tank→
حوض
الرحلان

Electrical leads
↓
الوصلات الكهربائية

Casting tray↗
طبق الرحلان

طبق الرحلان والأمشاط



Preparing the Gel

- صب الجل السائل في الصندوق الداخلي .

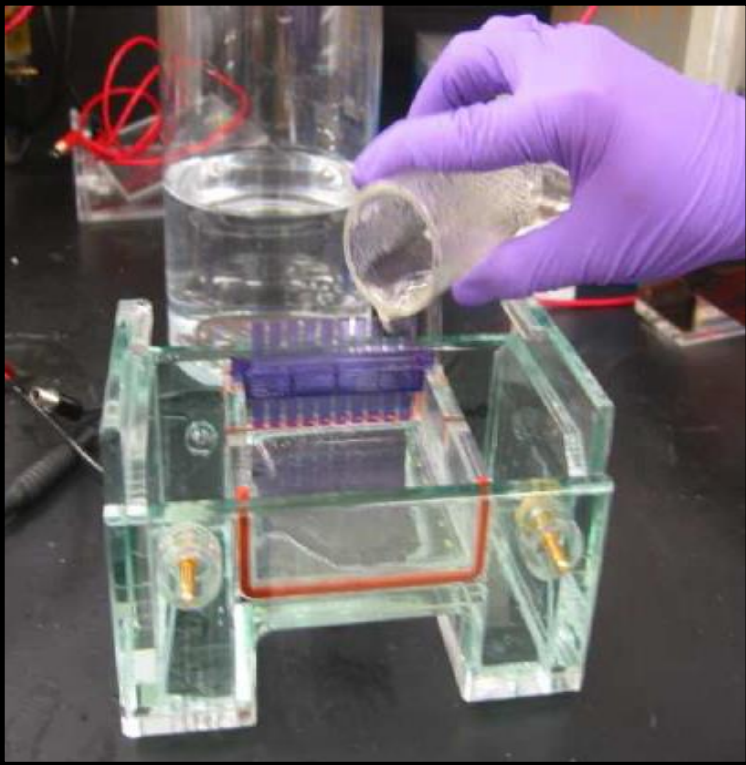
- توضع قطعة مثل المشط في الصندوق الداخلي .

- يترك الهلام السائل حتى يبرد ويتصلب

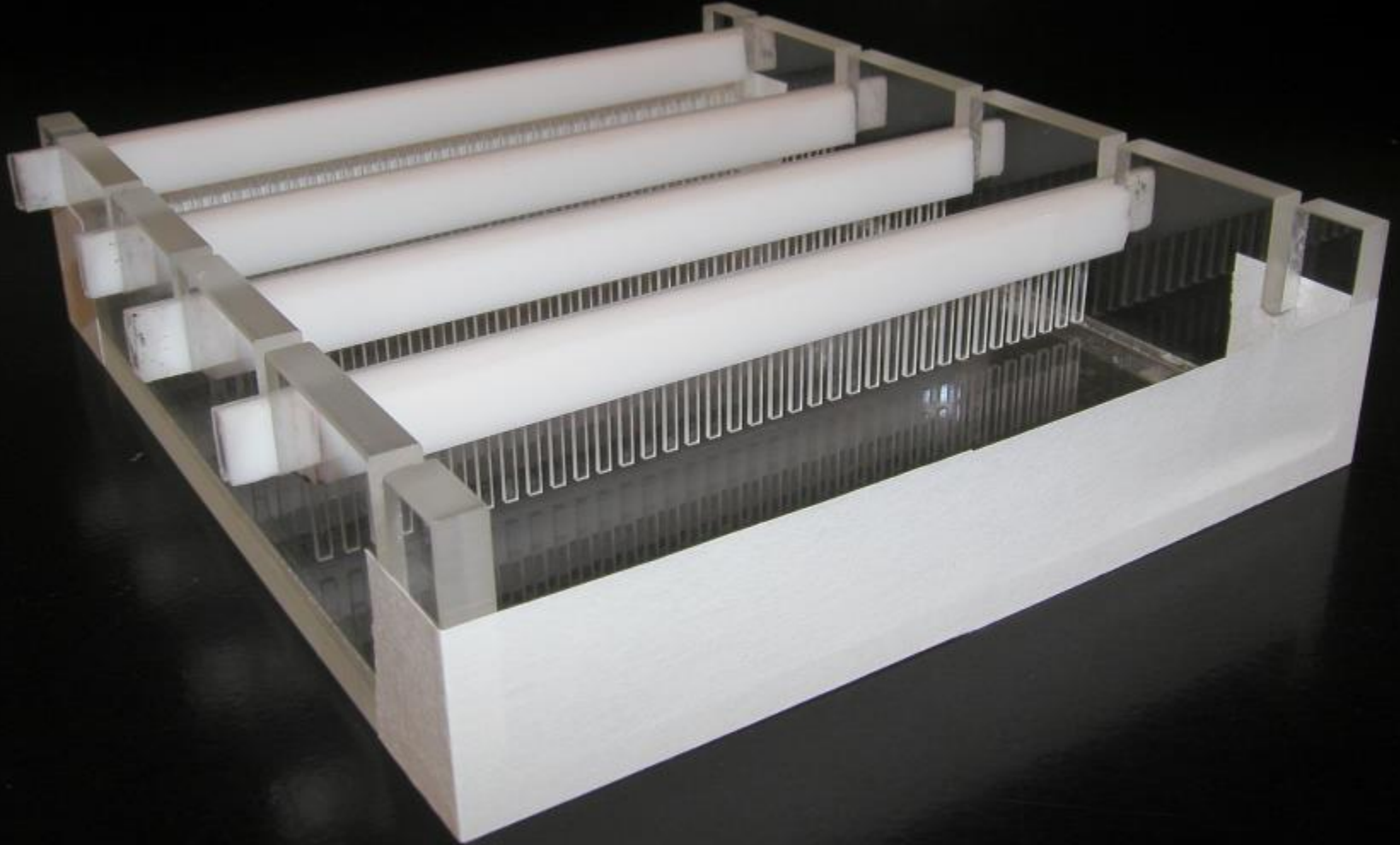
- (ويمكن استخدام الثلاجة) .

- عندما يتصلب الجل، هذا المشط يصنع الآبار التي يوضع فيها DNA

.

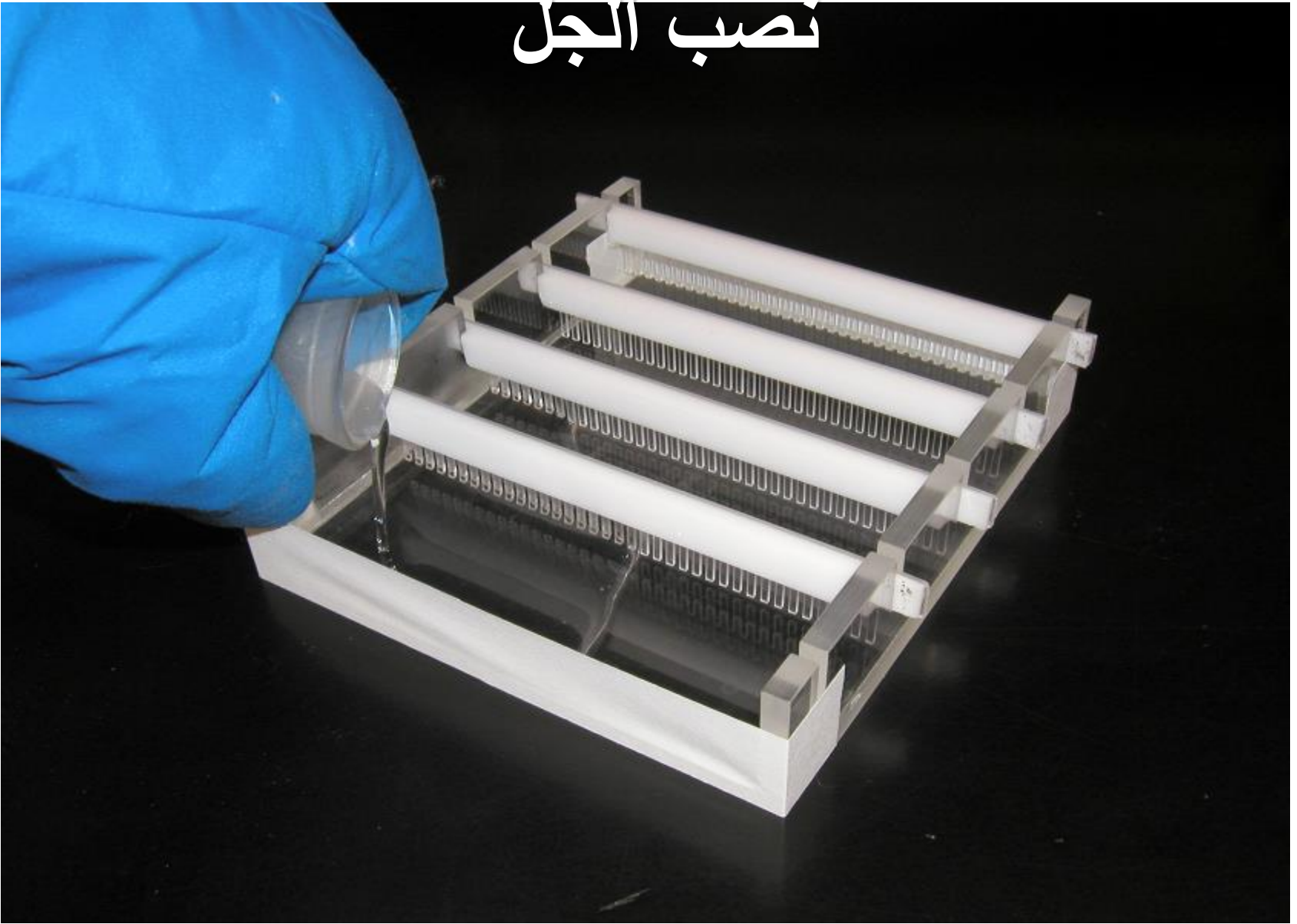


نحضر طبق الرحلان

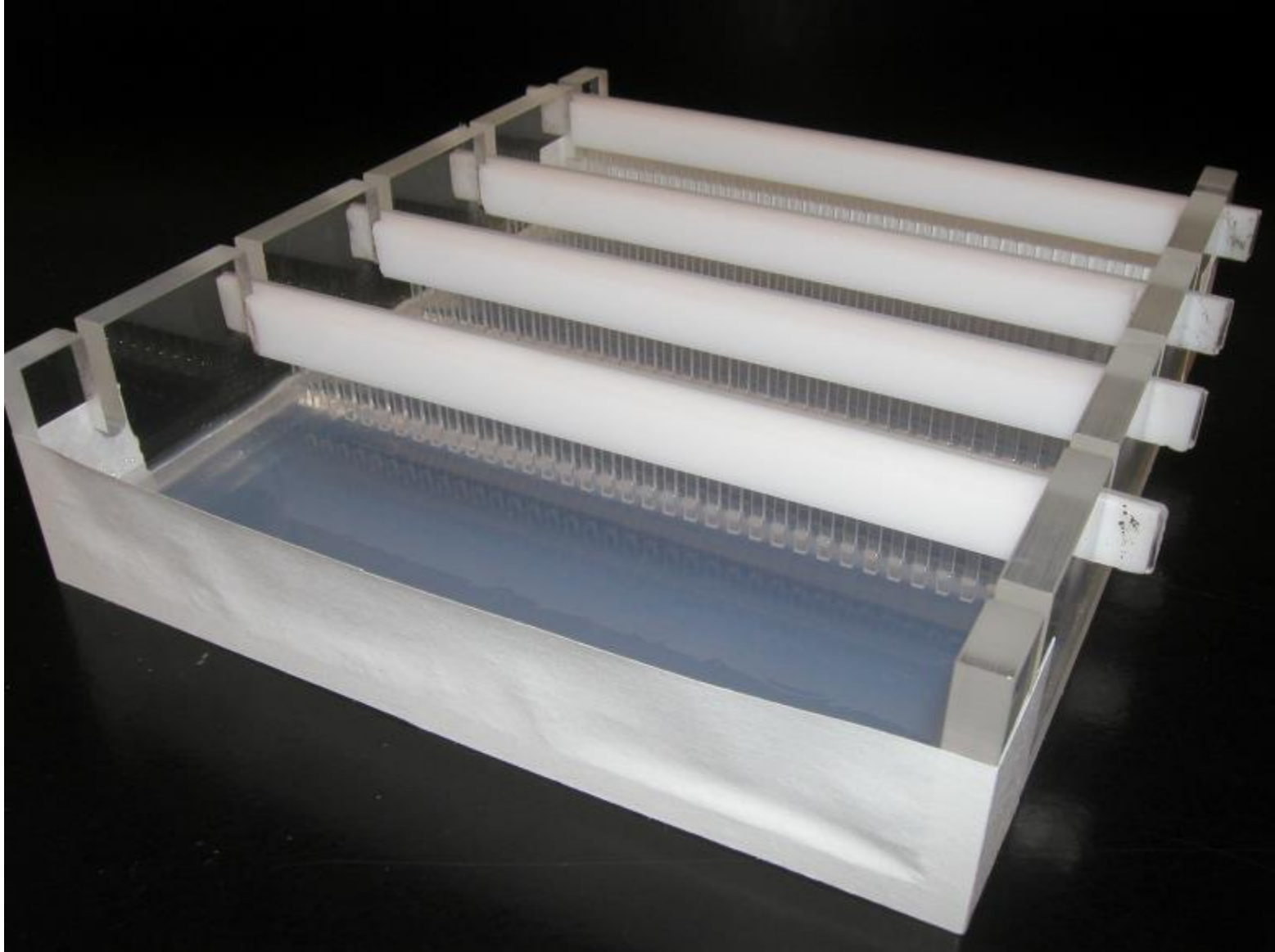


- نلف حواف الطبق بلصق ثم نضع الأمشاط.
- نضع الطبق على سطح مستوي . مع ملاحظة عدم لمس الأمشاط لسطح طبق الرحلان.

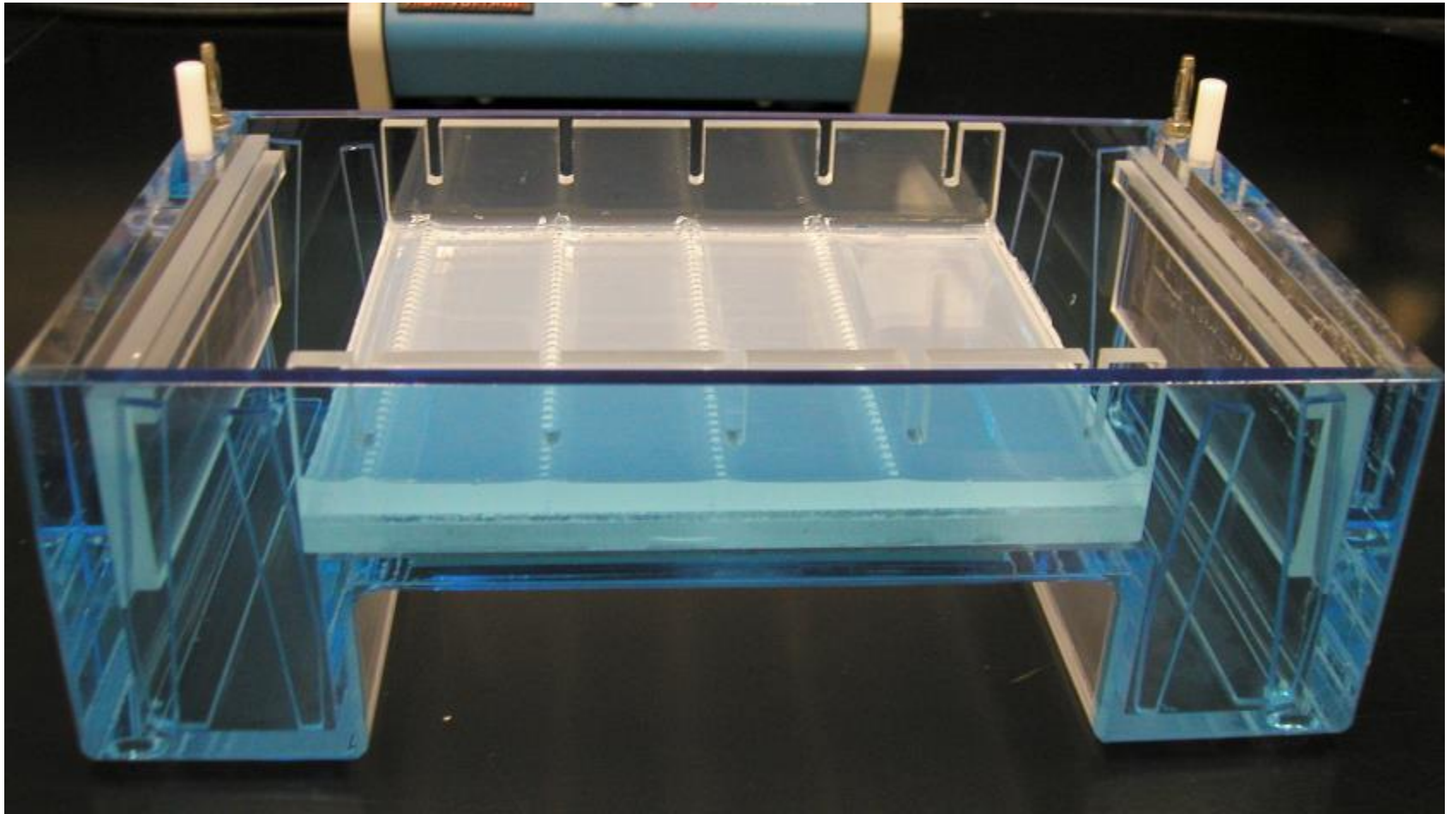
نصب الجل



- محلول الأجاروز يجب أن يغمر الأمشاط ولكن ليس كلياً.
- الحرص على إزالة الفقاعات الهوائية الناتجة عن عملية التسخين.

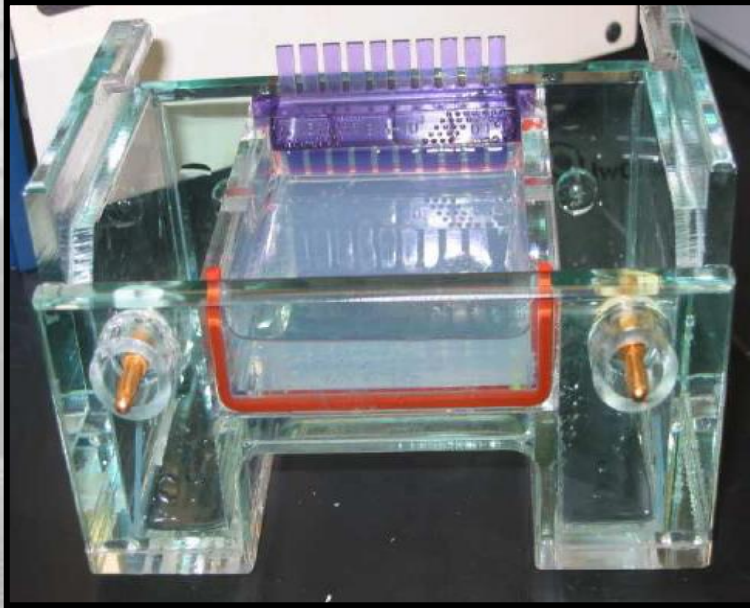


-عندما يبرد الأجاروز فإنه سوف يكون جل مرن, وشبه شفاف مقارنةً مع شكله قبل التبريد



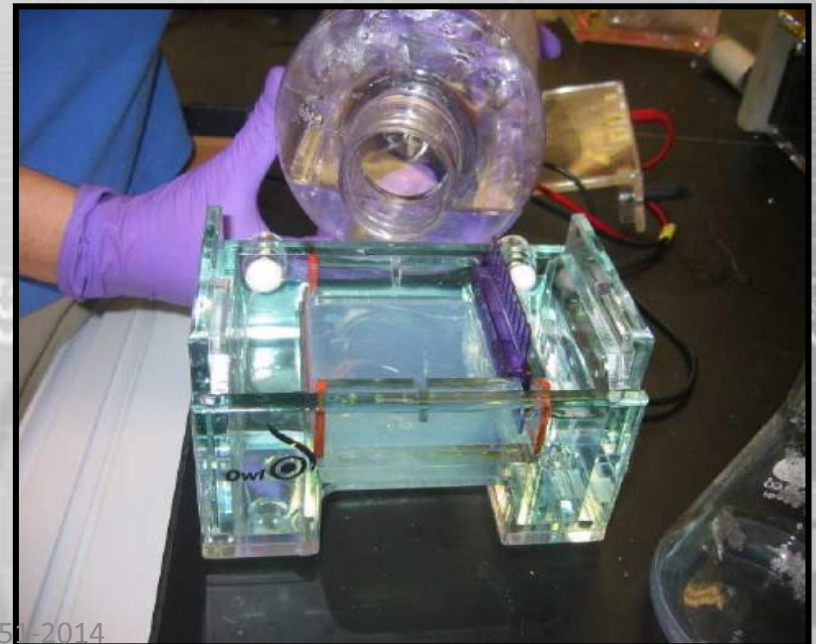
نضع الجل مع الطبق داخل حوض الرحلان الكهربائي.

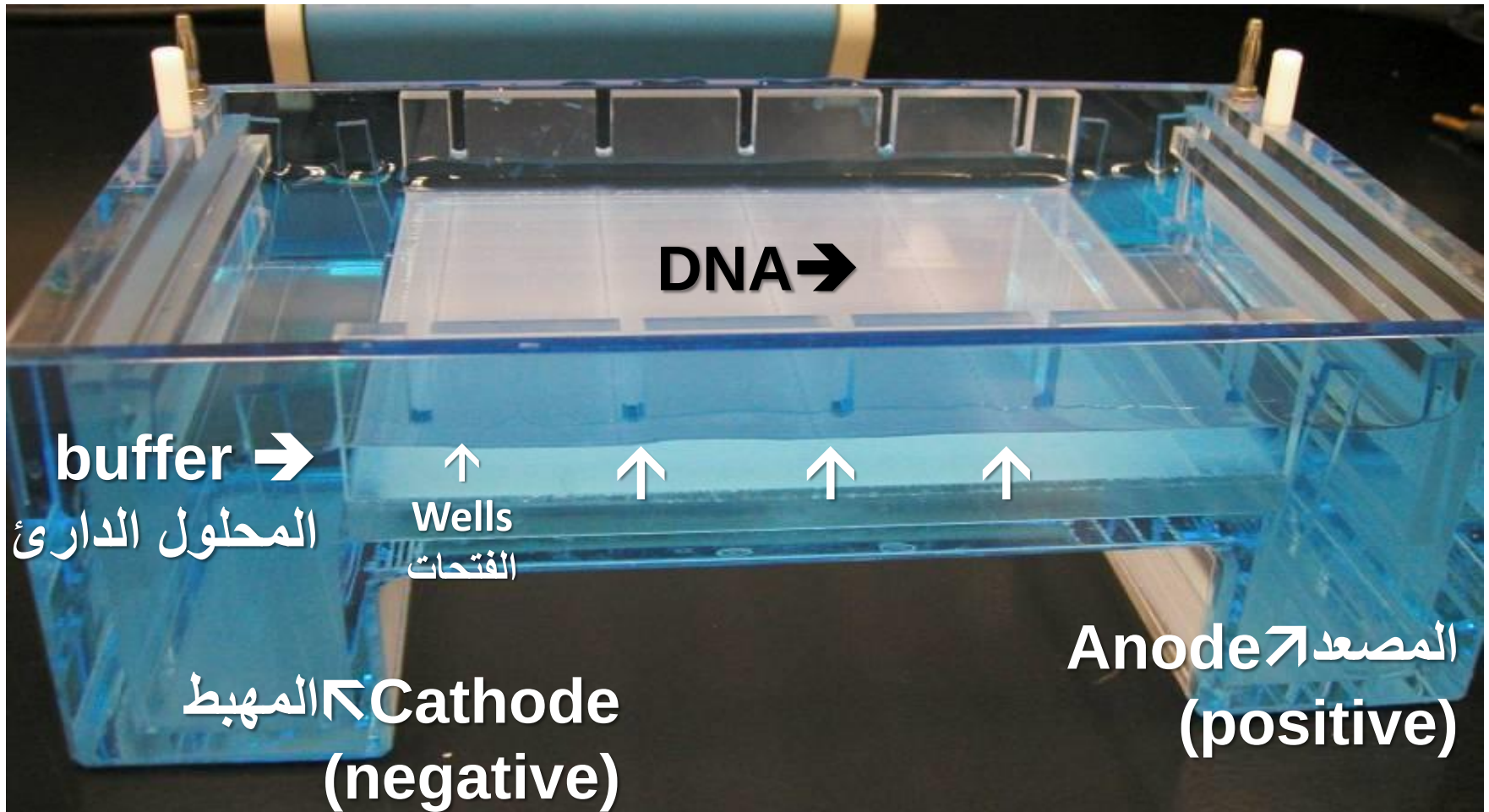
Gel Ready



• الجل أصبح جاهز.

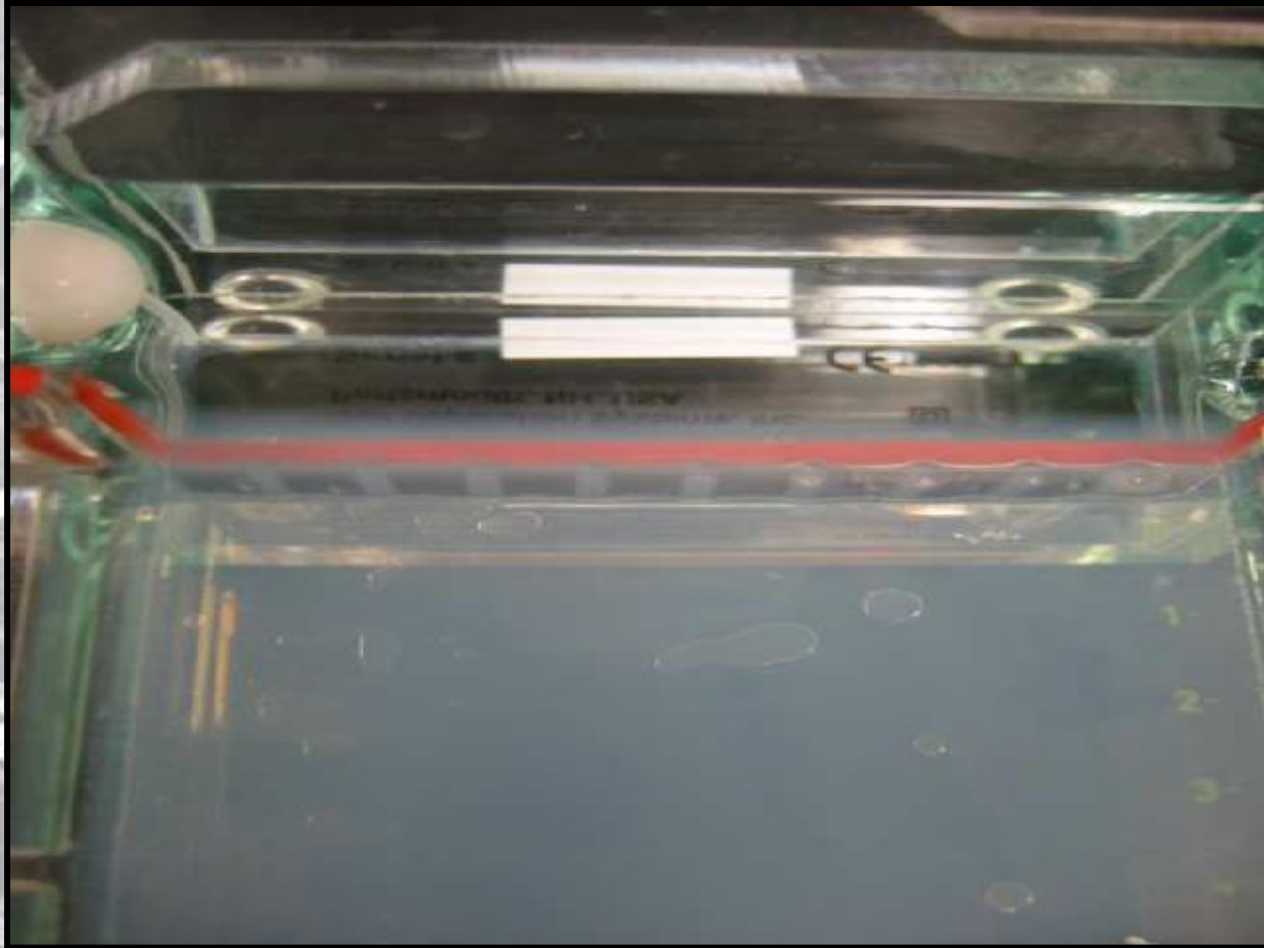
• يصب الماء في الحاوية.



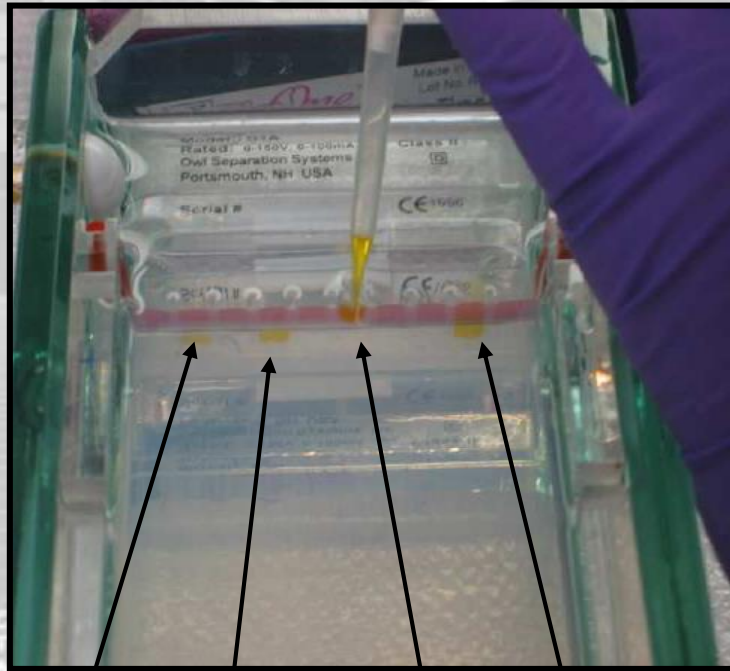


نصب المحلول الدارئ في حوض الرحلان الكهربائي حتى نغطي سطح الجل, نتأكد أن المحلول تظل داخل جميع الفتحات.

• يزال المشط.



Putting DNA on the Gel



• يخلط الـ DNA مع محلول ملون (مشع) حتى يرى تحت الـ U.V .

• تدخل عينات الـ DNA إلى الآبار .

• وضع محلول يحتوي على قطع من الـ DNA

(called ladder) تستعمل للمقارنة .

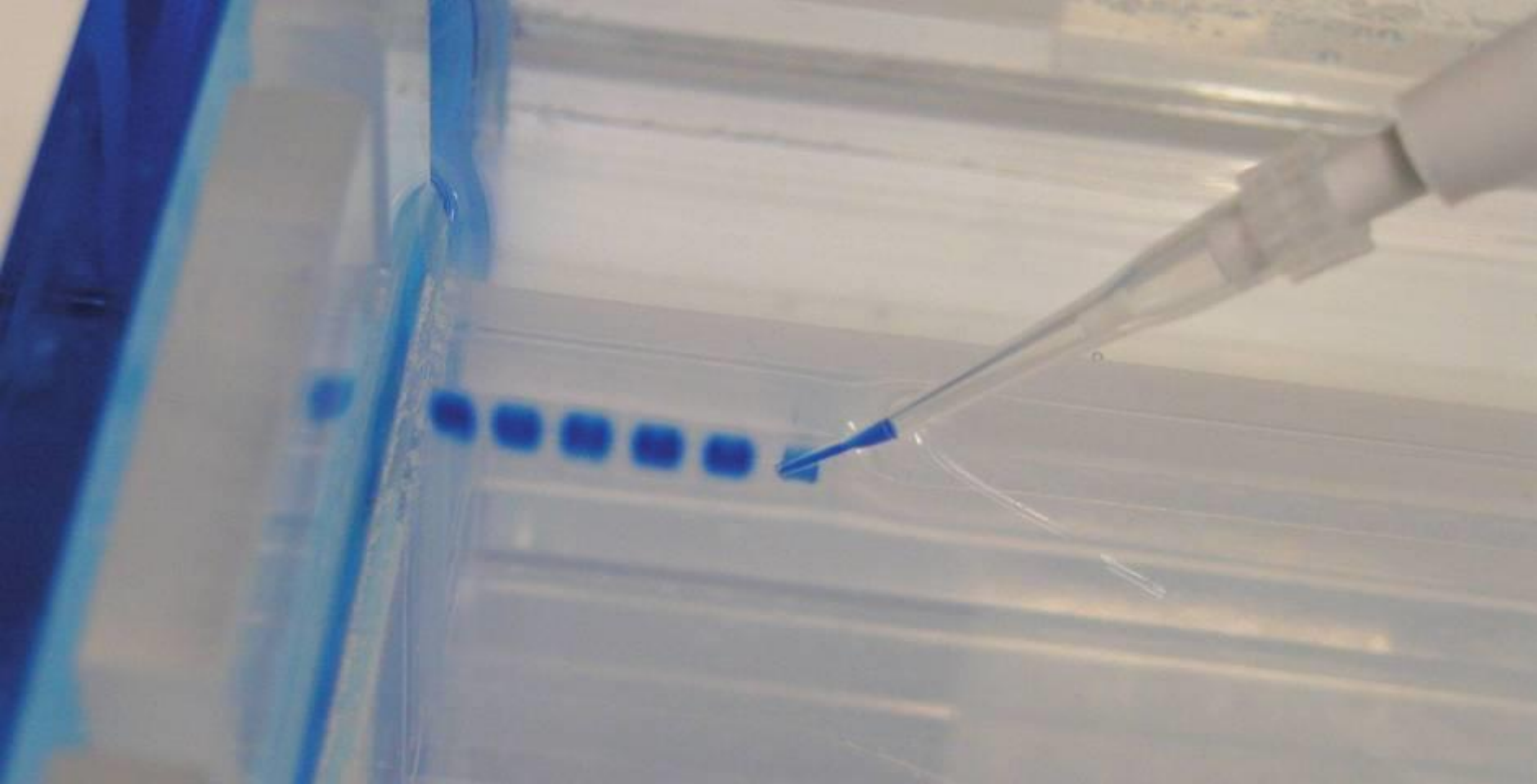
ladder 1

ladder 2

DNA cut by
Hind III

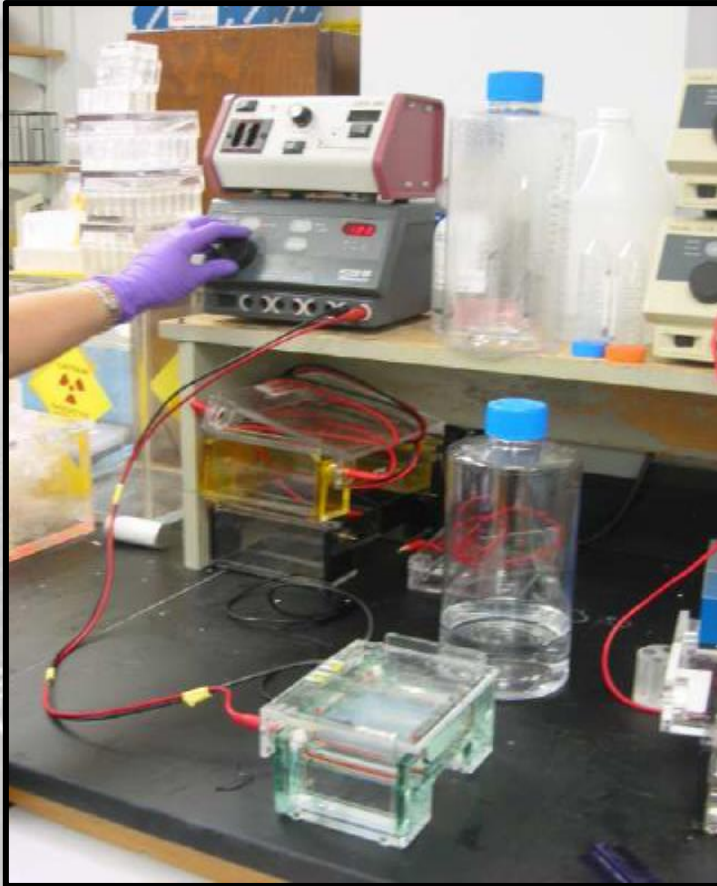
original
uncut DNA

تحميل الجل



- عينة الدنا في الغالب تكون شفافة, لذلك نمزج معها صبغة (3مايكروليتر + 5 مايكروليتر من العينة).
- بحرص شديد أنزل العينة بالماصة الإلكترونية داخل فتحات الجل.

Run the Gel

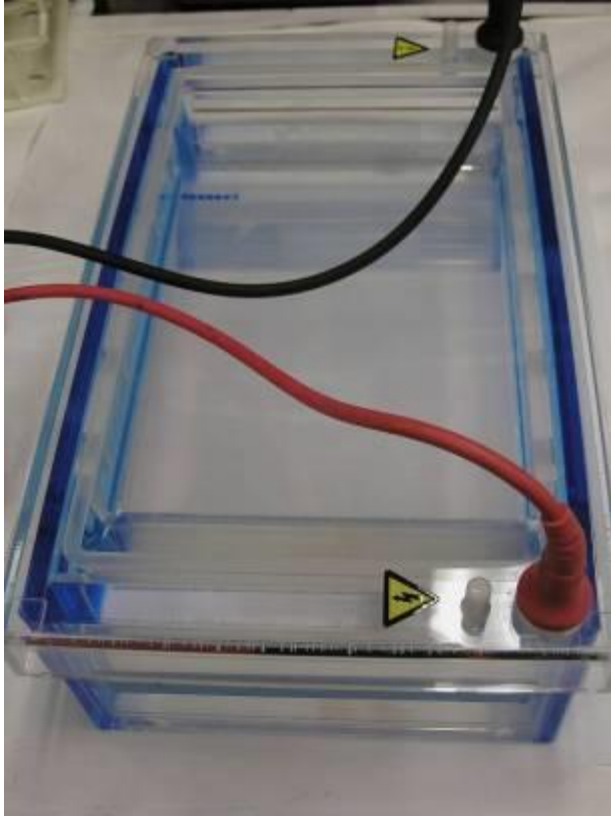


• وصل التيار الكهربائي .

• بما أن الـ DNA ذو شحنة سالبة فهو يتحرك إلى القطب الموجب من الحاوية .

• والأجزاء الصغيرة تتحرك أسرع .

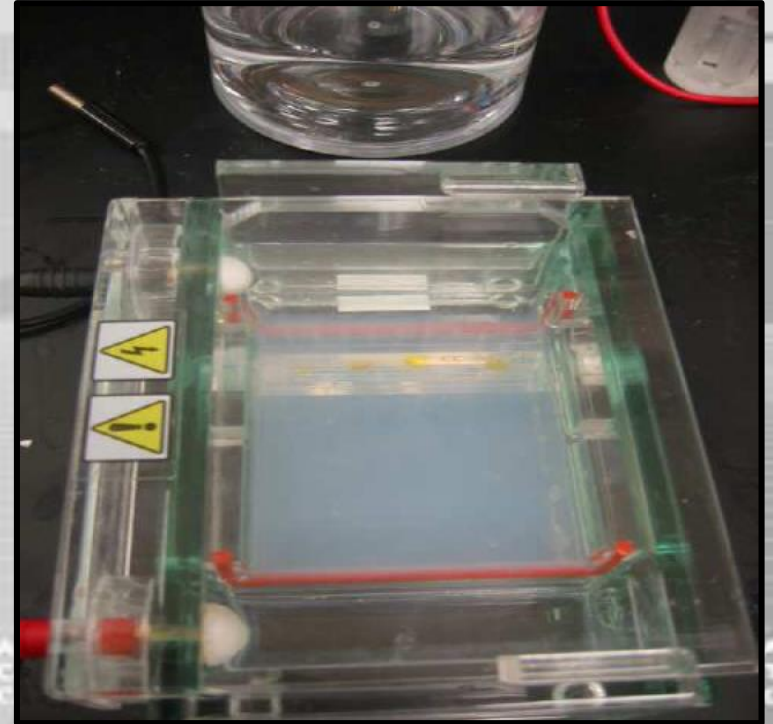
سريان الجل



- أغطي حوض الرحلان بالغطاء الخاص بالجهاز مع مراعاة أن يكون كل قطب في محله .
- نوصله مصدر الطاقة .
- الدنا سوف يرحل أو يهاجر للقطب الموجب (المصعد) . السلك الأحمر

DNA Fragments Move

• يوضح لنا المحلول
الملون تحرك الـ DNA
في الجل .



Cathode

المهبط

(-)

DNA

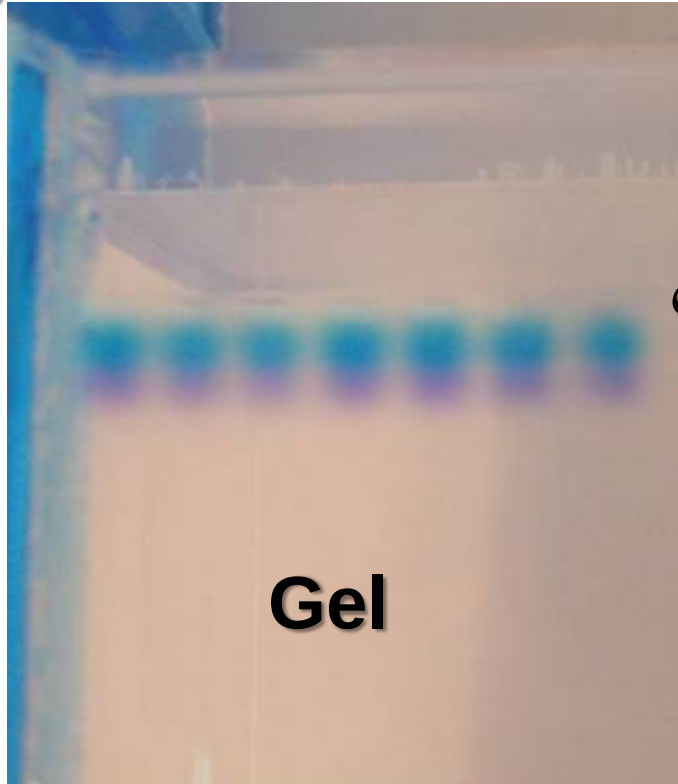
(-)



Anode

المصعد

(+)



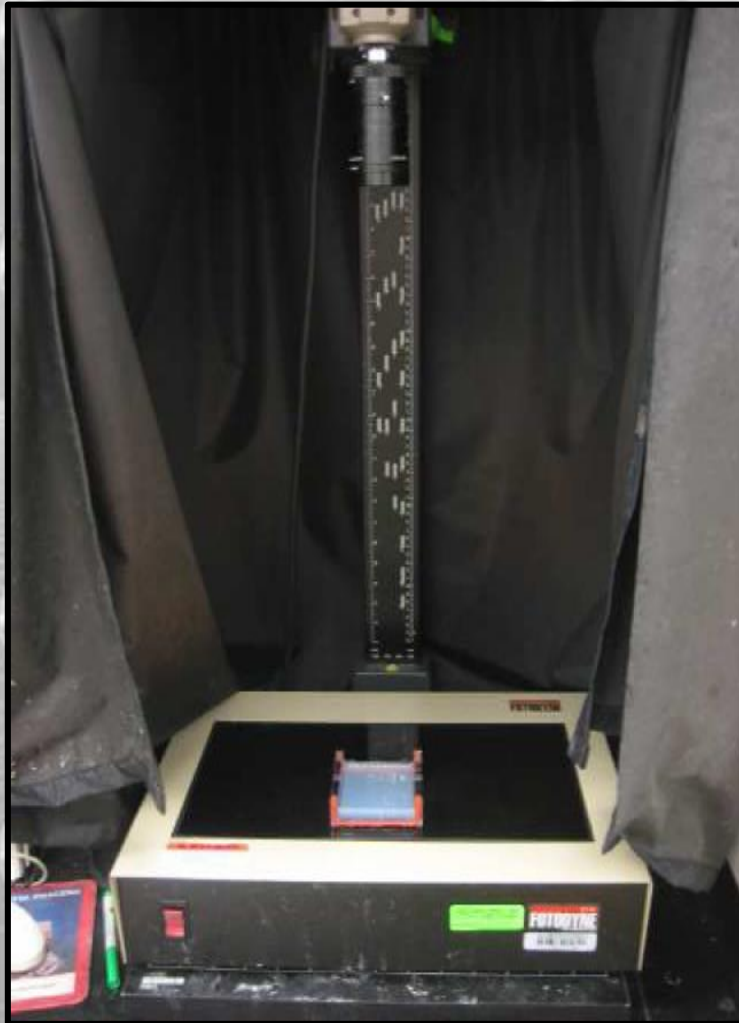
← **Wells** الفتحات

Bromophenol ←
Blue

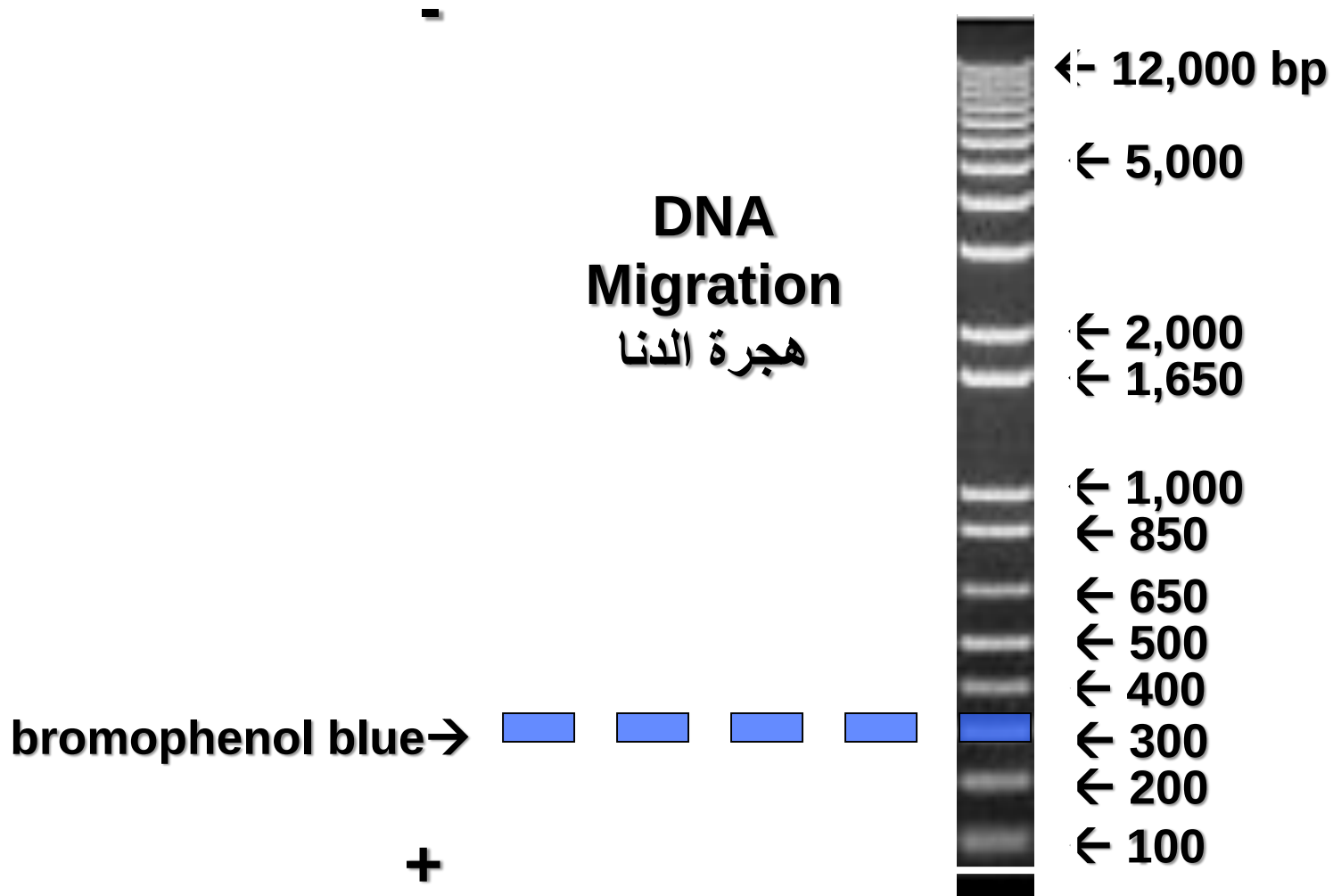
الصبغة الزرقاء

Viewing

• مشاهدة الجل تحت الـ U.V .

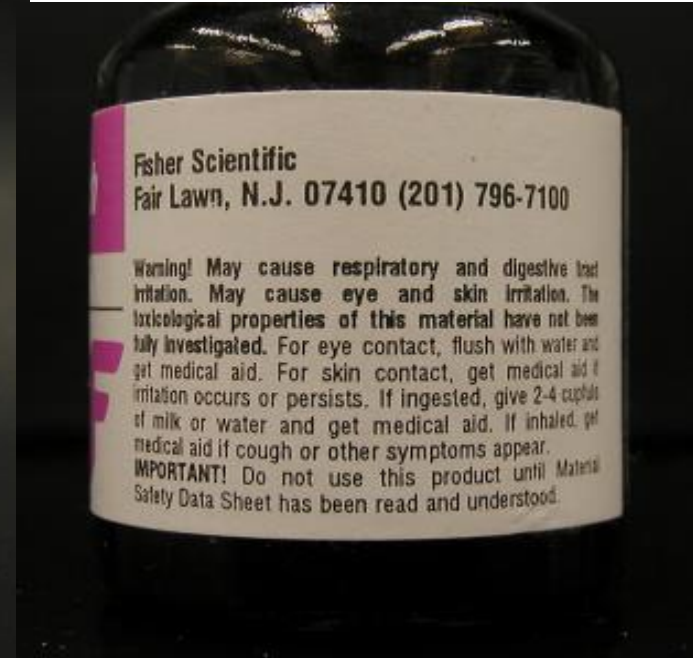
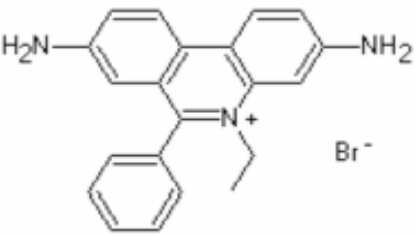


DNA معيار مدرج



الإبقاء على الجل

- بروميد الإيثيديوم يعمل على الارتباط مع الدنا ليساعد على عملية الإشعاع تحت الأشعة فوق بنفسجية.

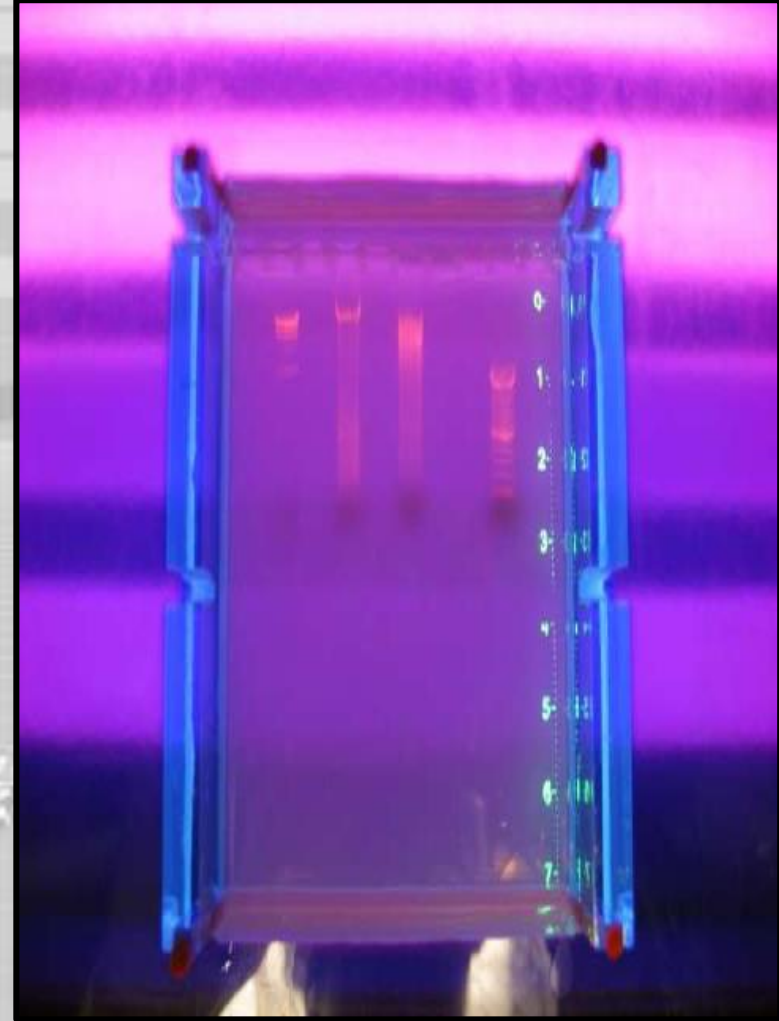


ملااa

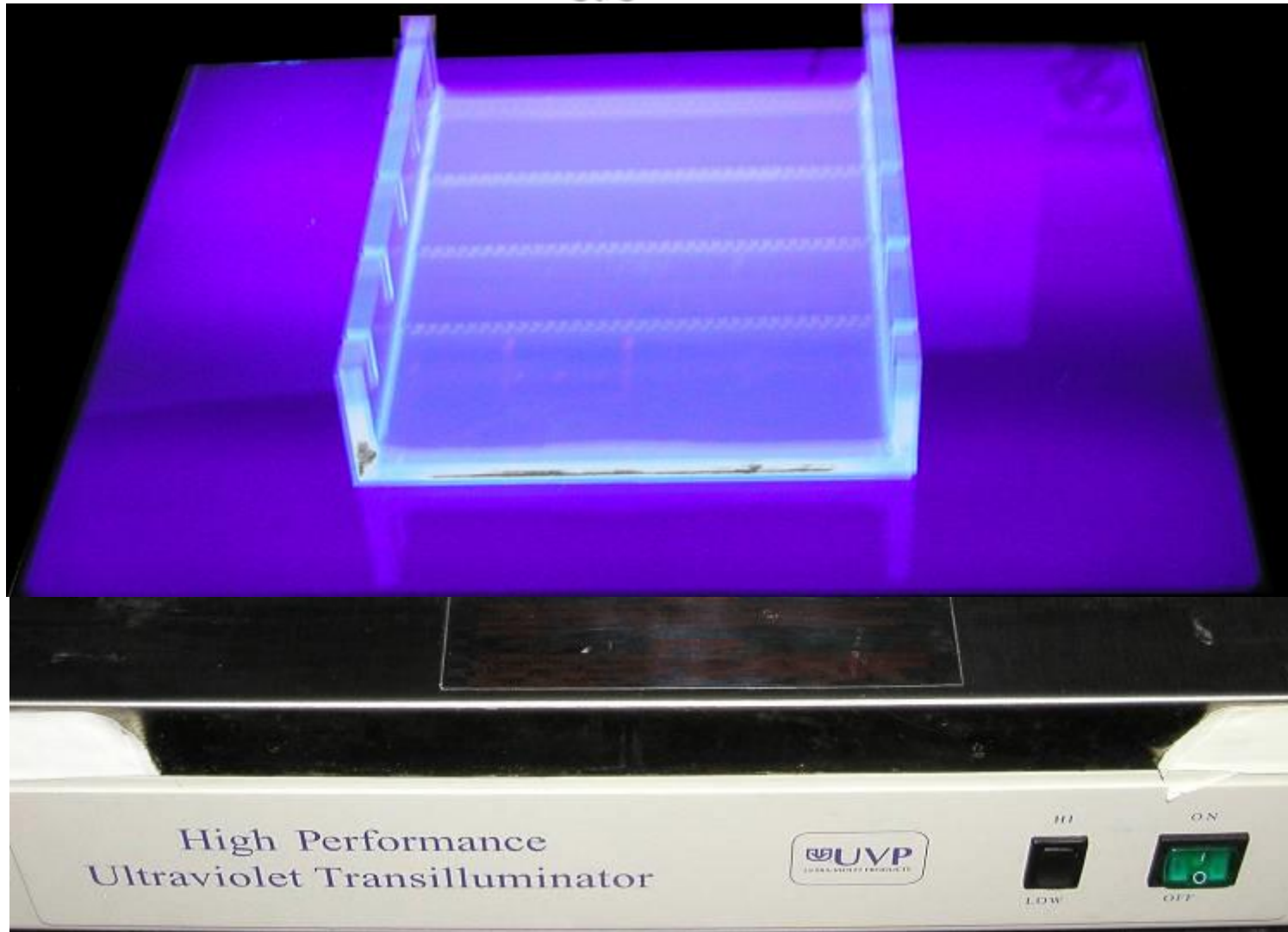
مادة بروميد الإيثيديوم مادة مسرطنة يجب لبس القفازين والحذر في التعامل معها.

Viewing

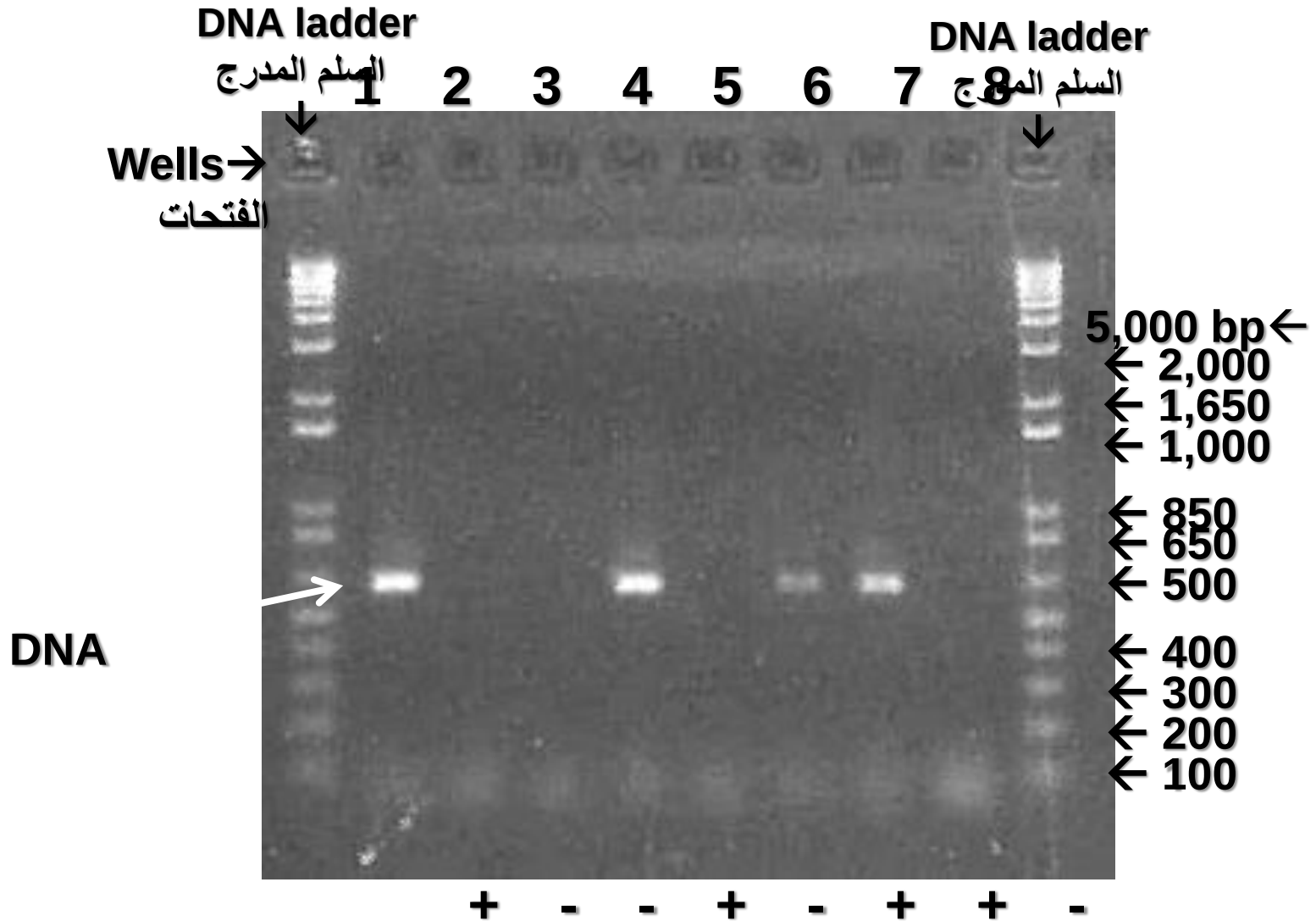
- عينة الـ DNA الأصلي غير المقطع
كونت قطعة كبيرة في البداية
(one big fragment).
- عينات الـ DNA مع انزيم القطع
كونت العديد من الأجزاء ، أي أن
القطع ذات أحجام مختلفة .
- استخدام السلالم للمقارنة لأنها
تحتوي على الأجزاء المعينة المطلوبة
تترك عملية التحرك في الجل لوقت
طويل حتى نضمن تفرق الـ DNA .



مادة الإيثيديوم تتطلب أشعة فوق بنفسجية حتى يضح الدنا أثناء عملية التصوير.



الجل بعد عملية التصوير



العينات رقم: 1, 4, 6 و 7 تظهر بها الحمض النووي الدنا



Good Luck
أ. أمل الغامدي
أ. شروق الشهراني
أ. رنا التركي