## التجارب التالية الهامة في وراثة الأحياء الدقيقة

1. يمكن دراسة تأثير بعض العوامل الفيزيائية أو الكيميائية على معدل النمو للكائن الحي وكمثال سوف ندرس تأثير هذه العوامل داخل المعمل على الكائن الدقيق، البكتيريا. مثل الأشعة فوق البنفسجية، المواد الكيميائية كالمنظفات والمطهرات، المضادات الحيوية. وهي ايضا ذات فائدة في تحديد الوسط الغذائي الأنسب للكائن الدقيق.
2. بعد ذلك يتم استخلاص الحمض النووي ونختبر التغير في الحمض النووي بعد نمو الكائن الدقيق وتكاثره في وجو هذه العوامل؟
3. يمكن استخدام اطوال موجية مختلفة من الأشعة فوق البنفسجية وأوقات مختلفة للتعرض لها وايضا يمكن استخدام مواد مطهره مختلفة وبتركيزات مختلفة وكذلك يمكن اختبار تغير الحمض النووي بعد النمو في وجود مضادات حيوية

الواجب: صممي تجربة لتوضيح تأثير الأشعة فوق البنفسجية على معدل نمو بكتيريا القولون؟؟؟

## 5 التدريب على استخدام الماصة الدقيقة MICROPIPETTE CALIBRATION

1. لمعايرة الماصات الدقيقه التاليه P20 ، P200 ، P1000 ، ترقم 6 أنابيب دقيقه microfuge (6 - 1) ثم توزن باستخدام الميزان الالكتروني وتسجل النتائج في الجدول.
2. مستعينه بالجدول التالي، تستخدم المتصه المحدده لنقل الحجم المحدد من الماء المقطر إلى الانابيب المرقمه معلومة الأوزان ثم توزن الانابيب مرة أخرى وتسجل النتائج في الجدول.
3. يحسب وزن الماء بالجرام بطرح الوزن الجاف للأنابيب من وزنها بعد ملئها بالماء، حيث 1000 ميكرولتر من الماء يجب أن يقابلها تماماً وزن 1 جم في درجة حرارة الغرفه.
4. يجب أن يساوي وزن الماء في كل أنبوبه 1 جم، وفي حالة الزياده او النقص يجب إعادة الخطوات في تلك الأنابيب.
5. يجب التأكد من جوده تقنيه إستخدام الماصه حيث يجب تجنب حملها في اليد لوقت طويل. والسحب بزاويه 45 درجه على بعد ملائم من سطح السائل المسحوب وقاع الأنبوبة.

Amal Alghamdi

**التجارب التالية الهامة في وراثة الأحياء الدقيقة**

1. يمكن دراسة تأثير بعض العوامل الفيزيائية أو الكيميائية على معدل النمو للكائن الحي وكمثال سوف

ندرس تأثير هذه العوامل داخل المعمل على الكائن الدقيق، البكتيريا. مثل الأشعة فوق البنفسجية، المواد الكيميائية كالمنظفات والمطهرات، المضادات الحيوية. وهي ايضا ذات فائدة في تحديد

الوسط الغذائي الأنسب للكائن الدقيق

. 2. بعد ذلك يتم استخلاص الحمض النووي ونختبر التغير في الحمض النووي بعد نمو الكائن الدقيق

وتكاثره في وجو هذه العوامل؟

3. يمكن استخدام اطوال موجية مختلفة من الأشعة فوق البنفسجية وأوقات مختلفة للتعرض لها وايضا

يمكن استخدام مواد مطهره مختلفة وبتركيزات مختلفة وكذلك يمكن اختبار تغير الحمض النووي

بعد النمو في وجود مضادات حيوية الواجب: صممي تجربة لتوضيح تأثير الأشعة فوق البنفسجية على معدل نمو بكتيريا القولون؟؟؟

**5 التدريب على استخدام الماصة الدقيقة MICROPIPETTE CALIBRATION**

1. لمعايرة الماصات الدقيقة التاليه

P20 ،P200 ،P1000

.1- ترقم 6 أنابيب دقيقه microfuge (6 - 1) ثم توزن باستخدام الميزان الالكتروني وتسجل النتائج في الجدول.

2. مستعينه بالجدول التالي، تستخدم المتصه المحدده لنقل الحجم المحدد من الماء المقطر إلى الأنابيب

المرقمه معلومة الأوزان ثم توزن الانابيب مرة أخرى وتسجل النتائج في الجدول

3. يحسب وزن الماء بالجرام بطرح الوزن الجاف للأنابيب من وزنها بعد ملئها بالماء، حيث 1000

ميكرولتر من الماء يجب أن يقابلها تماما وزن 1 جم في درجة حرارة الغرفه

4. يجب أن يساوي وزن الماء في كل أنبوبه 1 جم، وفي حالة الزياده او النقص يجب إعادة الخطوات

في تلك الأنابيب

5. يجب التأكد من جوده تقنيه إستخدام الماصة حيث يجب تجنب حملها في اليد لوقت طويل. والسحب

بزاويه 45 درجه على بعد ملائم من سطح السائل المسحوب وقاع الأنبوبة.

| رقم الأنبوبه | الوزن الابتدائي | الحجم بالميكرولتر باستخدام ماصه p20 | الحجم بالميكرولتر باستخدام ماصه p100 | الحجم بالميكرولتر باستخدام ماصه p1000 | حجم الماء بالجرام |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | 10 | 0 | 990 | |
| 2 | | 0 | 100 | 900 | |
| 3 | | 20 | 175 | 805 | |
| 4 | | 2 | 88 | 910 | |
| 5 | | 0 | 1000 | 0 | |
| 6 | | 100 | 0 | 900 | |

**المستخدمة: ثانيا: المصطلحات الهامة في البيولوجيا الجزيئية:**

**الحساب الوزن الجزيئي نحتاج: الجدول الدوري للعناصر الكيميائية آله حاسبه**

**1- الحصول على الجدول الدوري للعناصر الكيميائيه.**

**2- التعرف**على العناصر المكونة للمركب. مثل حمض الكبريتيك sulfuric acid صيغته البنائيه $H_2SO_4$ توضح عدد ونوع الذرات في المركب، وفيه 2 ذرة هيدروجين وذرة كبريت و4 ذرات أكسجين.

3-تحديد وتسجيل الوزن الذري لكل ذرة، الوزن الذري للهيدروجين =1.0079 ولذرة الكبريت=32.6ولذرة الأكسجين = 15.9994

4- يحسب الوزن الجزيئي لحمض الكبريتيك بضرب عدد ذرات الجزيء في الوزن الذري لكل ذره. 2*( 1.0079)+1*(32.06)+4*( 15.9994)= 49.8 Atomic mass unit ( amu ) **وحدة كتلة ذريه تختلف القيمه لكل مركب.**

**المول (mol): وزن المادة المذابة بالجرام (weight in grams) «مقسوم على الوزن الجزيئي (MW) للمادة**

***Mol =Weight in grams /Molecular Weight (MW)***

**إذن : الوزن بالجرام = عدد المولات x الوزن الجزيئي**

**مثال 2: الصيغة البنائية او الكيميائية Formula weight لكلوريد البوتاسيوم هي**

**الوزن الجزيئي ل KCl = 39.1 + 35.45 = 74.55 (amu)**

. هو خليط متجانس من المركبات حيث تظهر كل الجسيمات كجزيئات أو أيونات مفرده (مذيب+مذاب)

**. يمكن التعبير عن تركيز المحلول بعدة طرق،** مثل:

. 1- المولاريةMolarity **(M)**

**. 2- المولالية Molality (m)**

**. 3- العيارية Normality ( N )**

**. عللي:**

يستخدم الماء المقطر Distilled water عادة في تحضير المحاليل؟ يجب استخدام المحاليل المنظمة Buffers في جميع اختبارات الأحياء الجزيئية؟

المولارية هي عدد مولات المذاب في لتر من المحلول. المولار= عدد المولات/حجم المحلول بالتر

الوحدة = مولار (M) = مول / لتر

***No. of Moles (mol)* = Molar(mol/L) / Liters (L)**

**مثال**: المحلول ذو المولارية 1 مولار يحتوي على 1 مول من المادة المذابة في الحجم النهائي للمحلول.

لتحضير محلول 1 مولار من كلوريد البوتاسيوم Kcl يوزن**74.55 جم ويذاب في 1 لتر من الماء المقطرDDW.**

**أي 74.55جم من الملح في لتر من المحلول النهائي.**

**أي أن الوزن المحسوب يذاب في حجم صغير من الماء ثم يكمل الحجم الكلي للمحلول إلى 1 لتر. وهذا يختلف عن إضافة 74.55 جم إلى لتر من الماء.**

**أمثلة على المولارية:**

**1- ماهي مولارية**0.75مول من المذاب في2.5 لتر من المذيب؟

Molarity= 0.75 mol / 2.5=0.3M

2- ماهي المولاريه ل 40جم من هيدروكسيد الصوديوم NaOH المذابه في 2لتر من المذيب؟ المعلوم: الوزن بالجرام و حجم المحلول النهائي

1- نحول الجرامات إلى مولات. يحسب الوزن الجزيئي للمركب أولا ثم نحسب المول . الوزن الجزيئي للماده = 40جم /مول إذن المول (mol) = عدد الجرامات / الوزن الجزيئي = 40جم / 40جم/مول = 1مول

2- - نقسم عدد المولات / عدد اللترات. المولارية = * مول / لتر =**0.5 مولار.**

**. 2- المولالية Molality (m)**

**هي عدد المولات من المذاب في الكيلوجرام الواحد من المذيب.**

**المولالية = عدد مولات المادة المذابة/ كتلة المذيب بالكيلوجرام. الوحده=مول/ كجم**

**مثال: 1 مولال (m1) من محلول كلوريد الصوديوم NaCl يحتوي 1 مول من NaCl في الكيلوجرام الواحد من الماء.**

**أي الوزن بالجرام = المول × الوزن الجزيئي= 58.44 X 1 = 58.44 m**

**جم يضاف إلى 1000 مل من الماء المقطر DDW**

**. أهم الطرق للتعبير عن تركيز المحلول**

**، وتستخدم عادة للأحماض Acids والقواعد Bases**

**النورمالية N= عدد المكافآت الجرامية n/ حجم المحلول باللتر.**

**فالمحلول الذي يبلغ تركيزه 1 عياري يعني أن كل واحد لتر من المحلول يحوي مكافيء جرامي واحد من المذاب**

**حيث n= للأحماض = عدد أيونات الهيدروجين +H في الصيغة البنائية للحمض أما للقواعد n= عدد أيونات الهيدروكسيل OH في الصيغة البنائية للقاعدة.**

**<u>للربط بين كمية المذاب وحجم المحلول باللتر</u>**

هناك علاقة بين النورمالية (المعيارية والمولالية والمولارية النورمالية)= المولارية nx مثال: 3 مولار من H2SO4 هو نفسه محلول 6معياري من الحمض نفسه. مثال: محلول 1 مولار من 2(**Ca(OH**

هو نفسه 2 معياري من القاعدة نفسها. . أمثلة الجرام المكافيء (e.q) أو n:

. مثال على العيارية: التحضير محلول 1 عياري من هيدروكسيد الكالسيوم $Ca(OH)_2$.

المعلوم: الوزن الجزيئي =74.09 وقيمة العيارية = 1 عياري

بالتعويض في : المعيارية = المولارية x n

المولارية= المعيارية/ n= مول التر

الوزن بالجرام = المول × الوزن الجزيئي

= 1/2 X 74.09 =37.05جم/لتر

هكذا يضاف لا مول الى لتر المذيب للحصول على 1 عياري من هيدروكسيد الكالسيوم $Ca(OH)_2$ يحضر المحلول الأساسي عادة ويجب تخفيفه للحصول على التركيز النهائي المطلوب للعمل. تعريف: هو المحلول المركز (له تركيز عالي) الذي يتم تخفيفه عادة إلى تركيزات أقل للحصول على محلول العمل الذي يتم استخدامه في الاختبارات.

. يرمز لها عادة ب nX و1،2،3=n

مثل: X5 يماثل خمس مرات من قوة تركيز محلول العمل؛ ويخفف بنقل 1 جزء من المحلول المخزن إلى 5 أجزاء من المحلول النهائي. .

مثال: يخلط 100 مل من محلول مخزن X5 و 400مل من ماء مزدوج التقطير (Double (DDW Distilled Water).

يعطي محلول X1. ماهو محلول X solution10؟

هو محلول مخزن بتركيز 10 مرات أعلى من محلول العمل. العمل محلول X1 من محلول مخزن X10، يتم التخفيف لعشر مرات 10-fold dilution

. مثال: محلول 18 (Ethylene-diamine tetra-acetic acid) Tris-EDTA (TE) من محلول مخزن X TE10 يساوي 100مل من الأخير يخفف في حجم نهائي الترمن الماء

**تصف المعادلة التالية المحددات المختلفة**

**C1*V1 = C2*V2**

**حيث: c1: تركيز المحلول الأساسي (قبل التخفيف) مولار V1: حجم المحلول الأساسي بالملل C2: تركيز المحلول النهائي بعد التخفيف) مولار v2: حجم المحلول النهائي بالملل عادة يكون حجم المحلول الأساسي v1 (المطلوب للوصول إلى تركيز نهائي محدد بإضافة الماء DDW) هو المجهول لذلك نعوض بالمعادلة التالية:**

**C2 * V2= V1 *C1**

**V1 = C2*V2 / C2**

**(الكتلة- الوزن بالجرام ) = الحجم * التركيز=V1*C1**

**تحضير التخفيفات من المحلول الأساسMaking Dilutions from Stock solution:**

إذا كان لديك محلول سكروز، وكان المذيب هو الماء . بحجم V1 وتركيز C1 فإن كمية السكروز

مثلا: الحجم 0.2 لتر والتركيز (50%)50 جم /لتر V1*C1

=

0.2 لتر * 50جم/لتر = 10جم من السكروز.

إذا أردنا تخفيف هذا المحلول إلى تركيز أقل بإضافة 2لتر من الماء،وبالتالي الوصول إلى حجم أكبر من المحلول V2، فما هي كمية السكروز الموجودة في المحلول؟

C2*V1=C1*V2 C1*V2/V1 =C2

10/2 = 5(جم/لتر)

كمية السكروز في المحلول بعد التخفيف =

5 X20=100جم/لتر

عند تحضير المحاليل لا بد من توحيد الوحدة المستخدمه لكل من : الحجم والوزن والتركيز في نفس المعادلة.

. مثال: من الخطأ كتابة المعادلة في الصورة التاليه:

V1(160ملل)* C1(160ملجم/لتر) = V1(المجهول) *C2(المطلوب 3جم/لتر)) الصورة الصحيحة: V1(160 ملل) * C1(160 ملجم/ملل V1 = (1000 (المجهول) *c2 (المطلوب 3جم 1000/لتره 1000))

**. المحاليل والتخفيفاتSolutions and Dilutions**

. ماهو الفرق بين المحلولين كل منهما 1% (حجم حجم) (٧/٧) و (وزن حجم) (w/٧)؟

• المحلول الأول (حجم حجم) 1% : أي أن نسبة المادة الكيميائية السائلة هي 1% من حجم المحلول الكلي.

**نسبة المحلول Percent solution:** قد يتكون المحلول من نسبة (وزن اوزن) أو نسبة (وزن حجم). المحلول النسبي إما أن يتكون من «x» عدد الجرامات من المركب في 100 جرام من المذاب solute؛

أو «x» عدد جرامات المركب في 100 مل من المذاب، على التوالي.

Specific Gravity = wt/vol

**. مثال**: محلول الجليسرول 1% سيحتوي 1 مل من الجليسرول في حجم نهائي 100مل.

• المحلول الثاني (وزن حجم) 1%: أي أن المادة الكيميائية تكون في صورة صلبة حيث يعني محلول 1%منها إضافة اجم من المادة في 100مل. .

مثال:محلول Sodium Dodecyl Sulphate(SDS)1% **سيتكون من 1 جم من SDS في حجم نهائي 100 مل.**

• ماهو الميكرولتر Microliter؟ يرمز له (ul) ويماثل 1000000/1 لتر أو 1000/1 مل. الديك اب 200 من محلول عينة الحمض النووي DNA ومحلول 3 مولار من محلول أسيتات الصوديوم NaOAc وترغبين في تحضير محلول من الحمض النووي DNA إلى0.3 مولار من NaOAc لكن بإضافة العينة إلى الأخير سيتأثر الحجم الكلي للمحلول.

**X** هو كمية المحلول المركز التي سيتم إضافتها - **d** عامل التخفيف **V** = الحجم

**d[X] =V**

= عامل التخفيف d (مثلا التحويل من 3 مولار إلى 0.3 مولار فالتخفيف هو1/10).

.

.

• **«أسئلة»**

.

1- **محلول مائي من كرومات البوتاسيوم K2Cr207تركيزه0.25 مولار. . احسب الحجم اللازم أخذه من المحلول المركز للحصول على 250 ملل من المحلول ذو تركيز 0.01**مولار ؟؟ .

.2. احسبي كمية [ Tris [Tris(Hydroxymethyl)Aminomethaneالمطلوبة لتحضير 500مل من امولار من المحلول المخزن. علما بأن الوزن الجزيئي =121.14 (amu)

-3.احسبي كمية (Ethylene-diamine tetra-acetic acid) EDTA المطلوبة لتحضير 500مل من محلول مخزن 0.5مولار. وزن الصيغة البنائية F.wt=372.2

ملاحظة: عادة تضاف ال EDTA إلى الماء مزدوج التقطير ويضبط ال pH عند 8 عادة باستخدام هيدروكسيد الصوديوم 10NaOH جم ثم ترشح وتعقم بالأوتوكلاف.

-4. احسبي كميةb-mercaptophenol المطلوبة في 15مل من محلول الاستخلاص للحصول على تركيز 10mM. تتوفر هذا الماده في صورة صلبة بتركيز 98% (وزن اوزن).(Formula weight) **F.wt= 78.13**

.

-5. احسبي الحجم الكلي للمحلول المطلوب للوصول إلى محلول بتركيز 80% من 100مل من تركيز 95% من الإيثانول .

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | (M.W= 374.24g/mol) | | | |
| | NaCl (M.W= 58.44277 g/mol) | 5 M | ..... | 28 ml |
| | PVP | - | 1 gm | - |
| | HCl | pH=5 | - | - |
| | Make up to 100 ml using DDW | | | |
| | | | | |
| TBE Buffer 5X | Tris Base (M.W= 121.14 g/mol) | | 54 gm | - |
| | Boric acid (M.W= 61.83302 g/mol) | | 27.5 gm | - |
| | EDTA (M.W= 374.24g/mol) | 0.5 M | ..... | 20 ml |
| | Make up to 1 L DDW | | | |
| | | | | |
| Agarose gel | Agarose | - | 1 gm | |
| | TBE | 1X | - | 100 ml |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | (M.W= 374.24g/mol) | | | |
| | NaCl (M.W= 58.44277 g/mol) | 5 M | ..... | 28 ml |
| | PVP | - | 1 gm | - |
| | HCl | pH=5 | - | - |
| | Make up to 100 ml using DDW | | | |
| | | | | |
| TBE Buffer 5X | Tris Base (M.W= 121.14 g/mol) | | 54 gm | - |
| | Boric acid (M.W= 61.83302 g/mol) | | 27.5 gm | - |
| | EDTA (M.W= 374.24g/mol) | 0.5 M | ..... | 20 ml |
| | Make up to 1 L DDW | | | |
| | | | | |
| Agarose gel | Agarose | - | 1 gm | |
| | TBE | 1X | - | 100 ml |

Amal Alghamdi

Amal Alghamdi

Amal Alghamdi

- لديك 300ul من الحمض النووي DNA في محلول منظم TE Buffer. ترغبين في إضافة ملح إليه ليترسب وينفصل عن الشوائب ولديك محلول 3مولار من أسيتات الصوديوم. عليك أن تحصلي على محلول 0.3مولار من الأسيتات مع الحمض النووي.

## 7 معمل تحضير المحاليل BUFFERS PREPARATION

| Buffersالمحلول المنظم | المواد المكونه | التركيز | الوزن (جم) | الحجم (مل) |
|---|---|---|---|---|
| ALS-I | Glucose | 0.05 M | 0.9 gm | - |
| | TrisHCl (M.W.=121.14 g/mol ) | 1 M | ..... | 2.5 ml |
| | EDTA (M.W.= 374.24g/mol) | 0.5 M | ..... | 2 ml |
| | Add to 100 ml using DDW | | | |
| | | | | |
| ALS-II | NaOH (M.W= 39.99711 g/mol) | 0.2 M | 0.8 gm | - |
| | SDS (M.W= 288.372 g/mol) | 1% | ..... | |
| | Add to 100 ml using DDW | | | |
| | | | | |
| ALS-III | Potassium acetate (M.W= 98.14232 g/mol.) | 3 M | 29.5 gm | - |
| | Glacial acetic acid | 11.5% | ..... | 11.5 ml |
| | Add to 100 ml using DDW | | | |
| | | | | |
| TER | TrisHCl (M.W= 121.14 g/mol) | 1 M | ..... | 10 ul |
| | EDTA (M.W= 374.24g/mol) | 0.5 M | ..... | 2 ul |
| | RNase A (M.W= ) | 0.2lml | ..... | 2 ul |
| | To 1 ml using DDW | | | |
| | | | | |
| CTAB Buffer | CTAB (M.W= 364.46 g/mol) | | 2 gm | - |
| | Tris (M.W= 121.14 g/mol) | 1 M | ..... | 10 ml |
| | EDTA | 0.5 M | ..... | 4 ml |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | (M.W= 374.24g/mol) | | | |
| | NaCl (M.W= 58.44277 g/mol) | 5 M | ..... | 28 ml |
| | PVP | - | 1 gm | - |
| | HCl | pH=5 | - | - |
| | Make up to 100 ml using DDW | | | |
| | | | | |
| TBE Buffer 5X | Tris Base (M.W= 121.14 g/mol) | | 54 gm | - |
| | Boric acid (M.W= 61.83302 g/mol) | | 27.5 gm | - |
| | EDTA (M.W= 374.24g/mol) | 0.5 M | ..... | 20 ml |
| | Make up to 1 L DDW | | | |
| | | | | |
| Agarose gel | Agarose | - | 1 gm | |
| | TBE | 1X | - | 100 ml |