بسم الله الرحمن الرحيم

٢٥١حدق

الأحياء الجزيئية

حساب تركيز الحمض النووي DNA

المعمل الرابع

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

قياس تركيز ونقاء الحمض النووي

- عند عزل الحمض النووي , نلاحظ أنه قد يحتوي عل 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 :

1. التخلص من البروتينات : عن طريق اضافة خليط من

(الفينول: الكلوروفورم: كحول أيزوأميل)

2. ويمكننا التخلص من RNA عن طريق اضافة انزيم الريبونيوكليز .

حساب تركيز الحمض النووي DNA
باستخدام جهاز الطيف الضوئي SPECTROPHOTOMETER

- **السبكتروفوتومتر** هو جهاز لقياس كمية الضوء للمادة المستعملة عن طريق طول الموجة التي توجه للجهاز.

حساب تركيز الحمض النووي DNA
باستخدام جهاز الطيف الضوئي SPECTROPHOTOMETER

١- يحسب درجة الامتصاص عند كل من الأطوال الموجية (نانومتر nm)

230-240-250-260-270-280-290-300

٢- نسجل نسبة الأشعة الممتصة والصادرة عن المحلول.

٣- يتم عمل منحنى من العلاقة بين محورين السيني يمثل الأطول الموجية والصادي مقدار الأشعة الممتصة.

حساب تركيز الحمض النووي DNA
باستخدام جهاز الطيف الضوئي SPECTROPHOTOMETER

التأكد من نقاء الحمض النووي :

- قياس الامتصاص عن الطول الموجي ٢٦٠ و ٢٨٠ nm

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

- وتكون قيمة الناتج ١,٧- ١,٨
- أما إذا كان تركيز DNA خارج هذا المدى لا تكون العينة صالحة ، وهذا يعني عدم ذوبان الحمض النووي أو وجود شوائب مثل البروتينات .

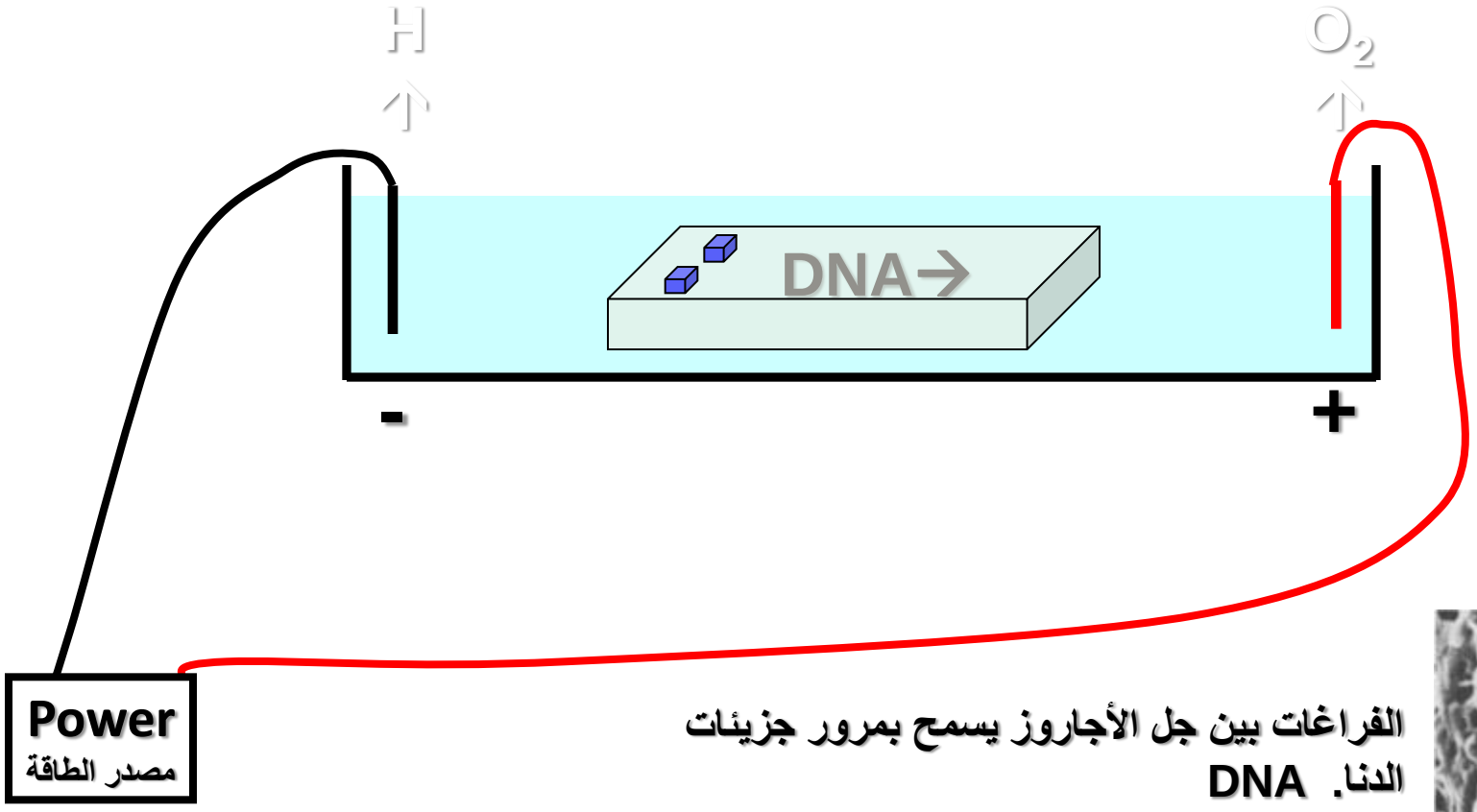
الفصل الكهربائي لعينة DNA بواسطة Gel Electrophoresis

- ♣ 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.

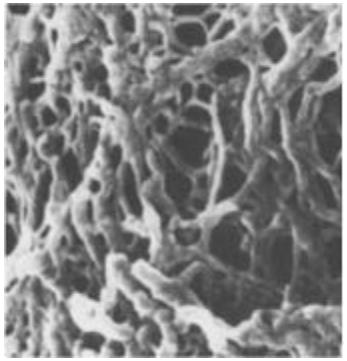
-عندما نضع الحمض النووي الدنا في مجال كهربي فإنه سوف يهاجر أو(يرحل) للقطب الموجب"المصعد".

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



الفراغات بين جل الأجاروز يسمح بمرور جزيئات الدنا. DNA

→ صورة من المجهر الإلكتروني الماسح لجل الأجاروز (1×1 µm)



س: كيف سيرحل الدنا بسرعة ؟؟؟

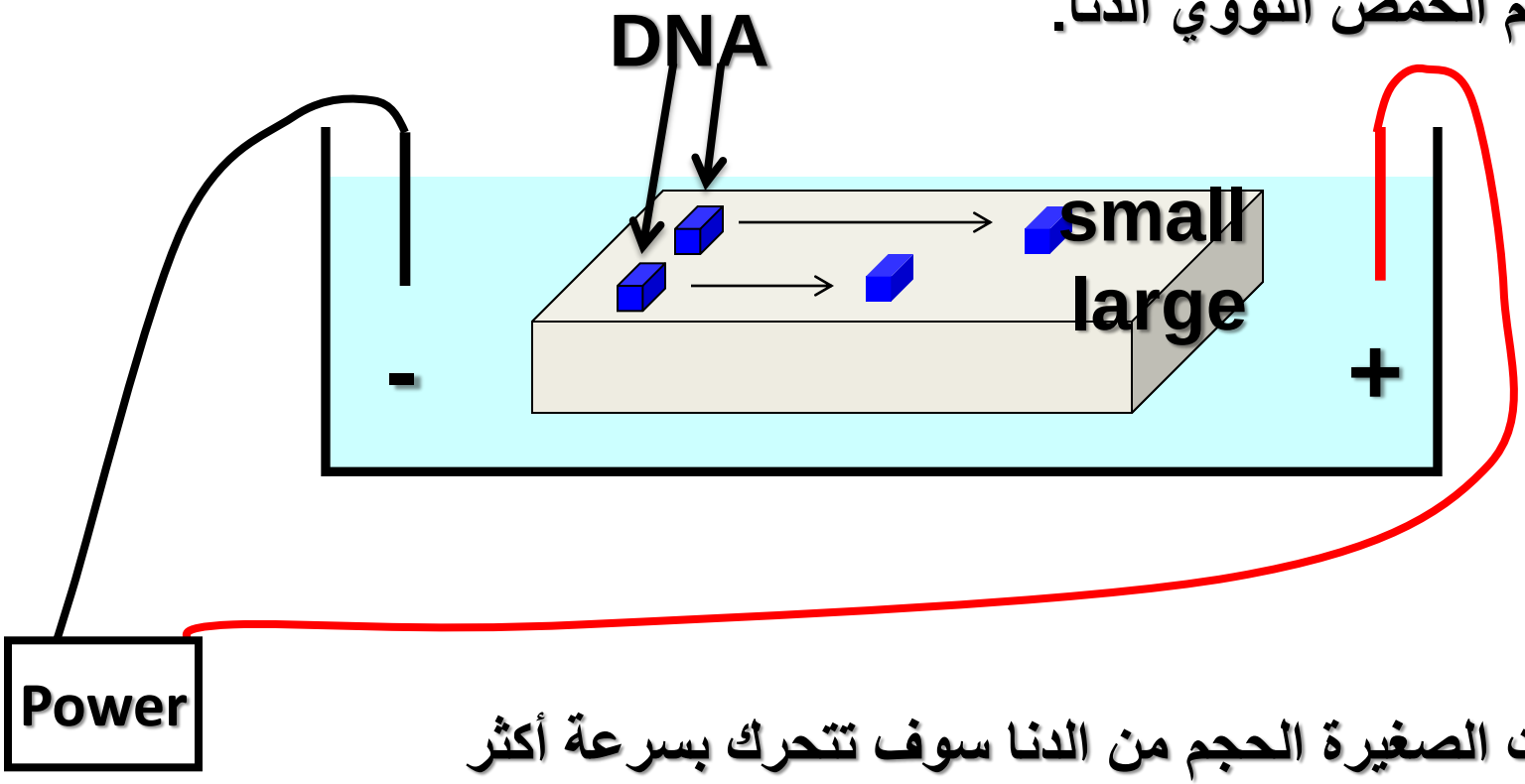
اعتماداً على:-

١- قوة المجال الكهربي.

٢- المحلول الدارئ.

٣- كثافة جل الأجاروز.

٤- حجم الحمض النووي الدنا.



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

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

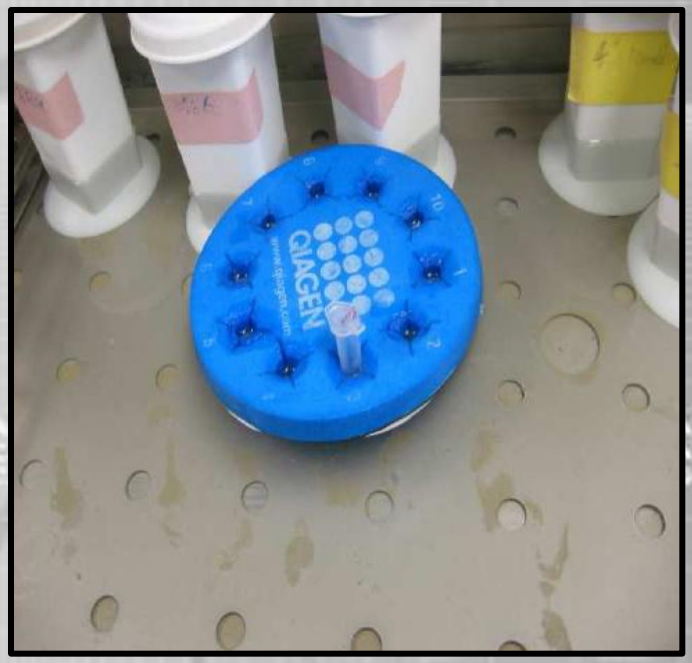
- نستعمل
restriction enzyme
لتقطيع الـ DNA إلى أجزاء .

Apply Enzyme

- عينة الـ DNA وانزيم القطع توضع في الأنبوب .

- تعريض الأنبوبة للهز والدوران حتى يخلط الـ DNA الأنزيم.

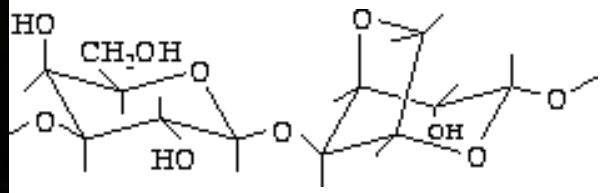
Water Bath



Preparing the Gel

- في هذه الأثناء يحضر الجل ، وذلك باستخدام مسحوق الـ Agarose.

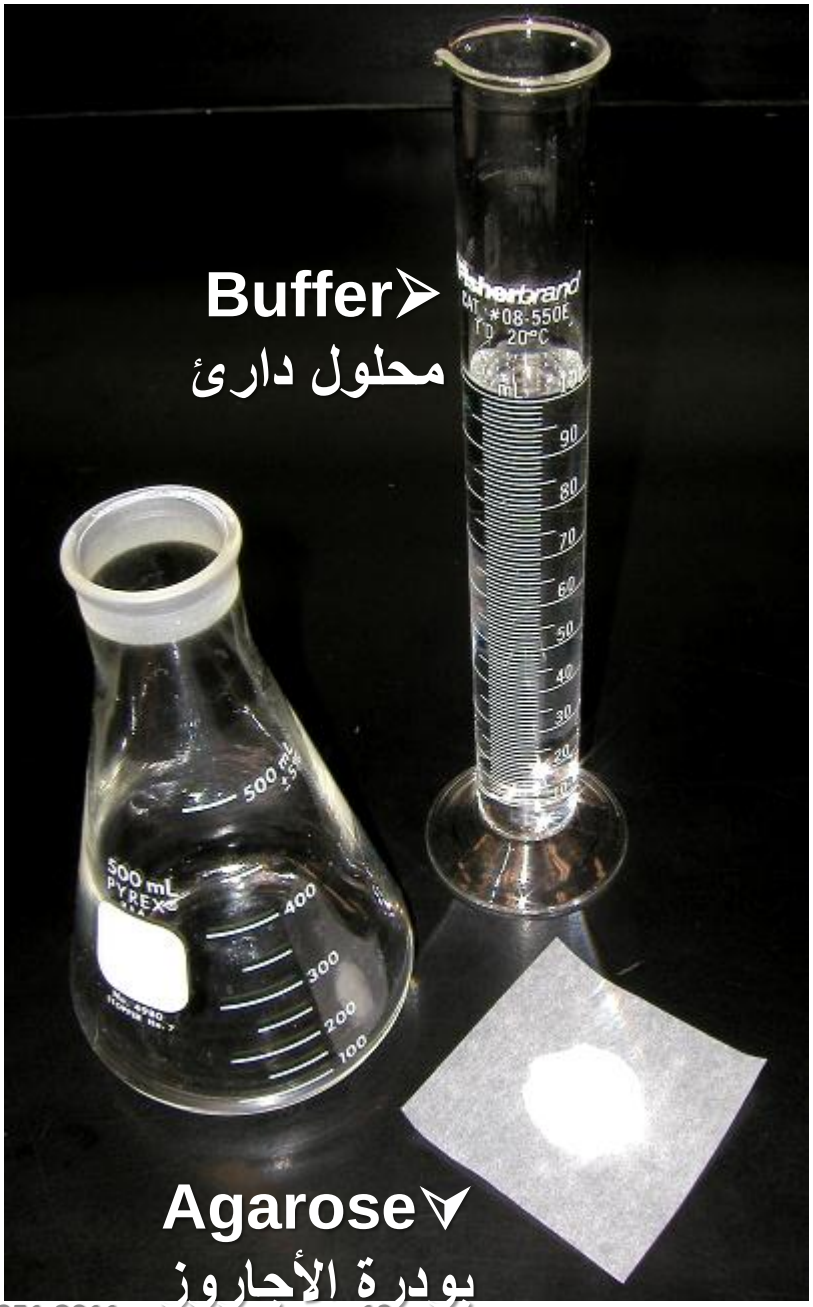
الصيغة البنائية لجا الأجاروز



جالاكتوز منزوع الماء **جالاكتوز**

- الأجاروز عبارة عن متبلمر خطي يستخرج من الطحالب البحرية.

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



- خلط المسحوق مع الماء في دورق .

المحلول الدارئ

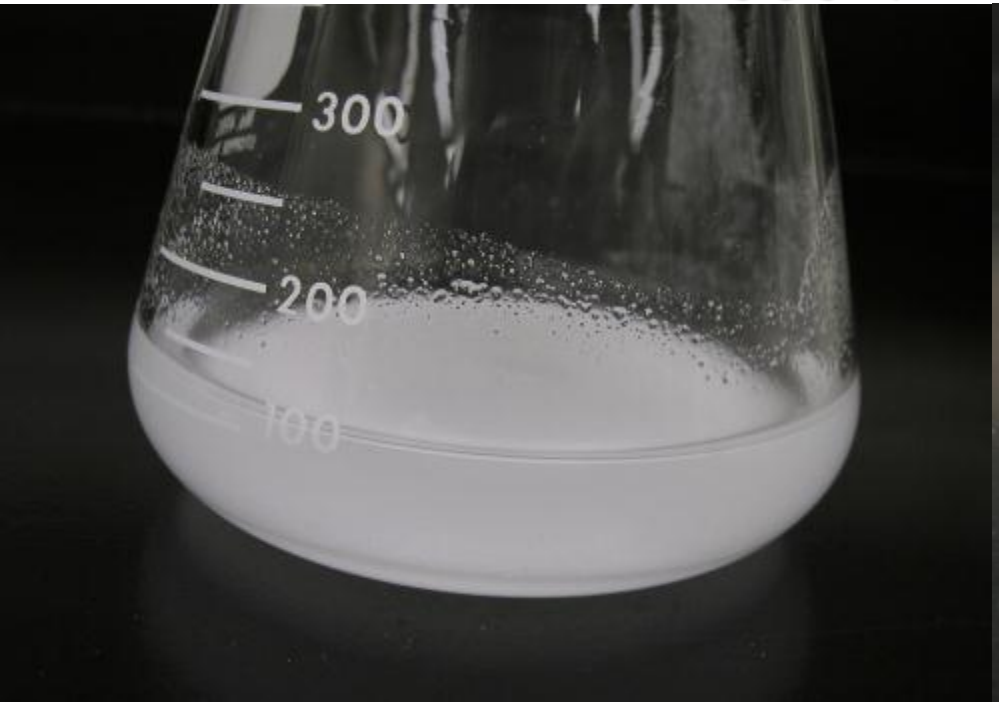
بودرة الأجاروز

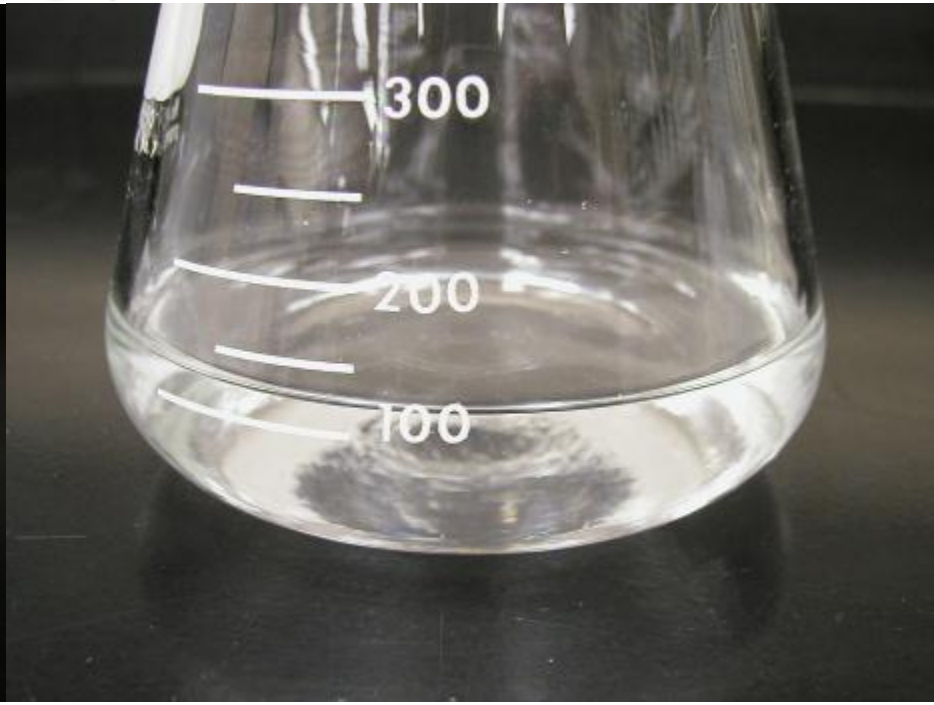
-نمزج بودرة الأجاروز مع المحلول الدارئ باستخدام الدورق مع مراعاة أن يكون الدورق أكبر من الحجم المذاب.

Preparing the Gel

- يسخن الدورق في المايكرويف عند الحاجة حتى يذوب المسحوق بالكامل في الماء .
- يصبح المحلول صافي .

غليان الأجاروز





محلول الأجاروز يصبح صافي بعد غليانه.

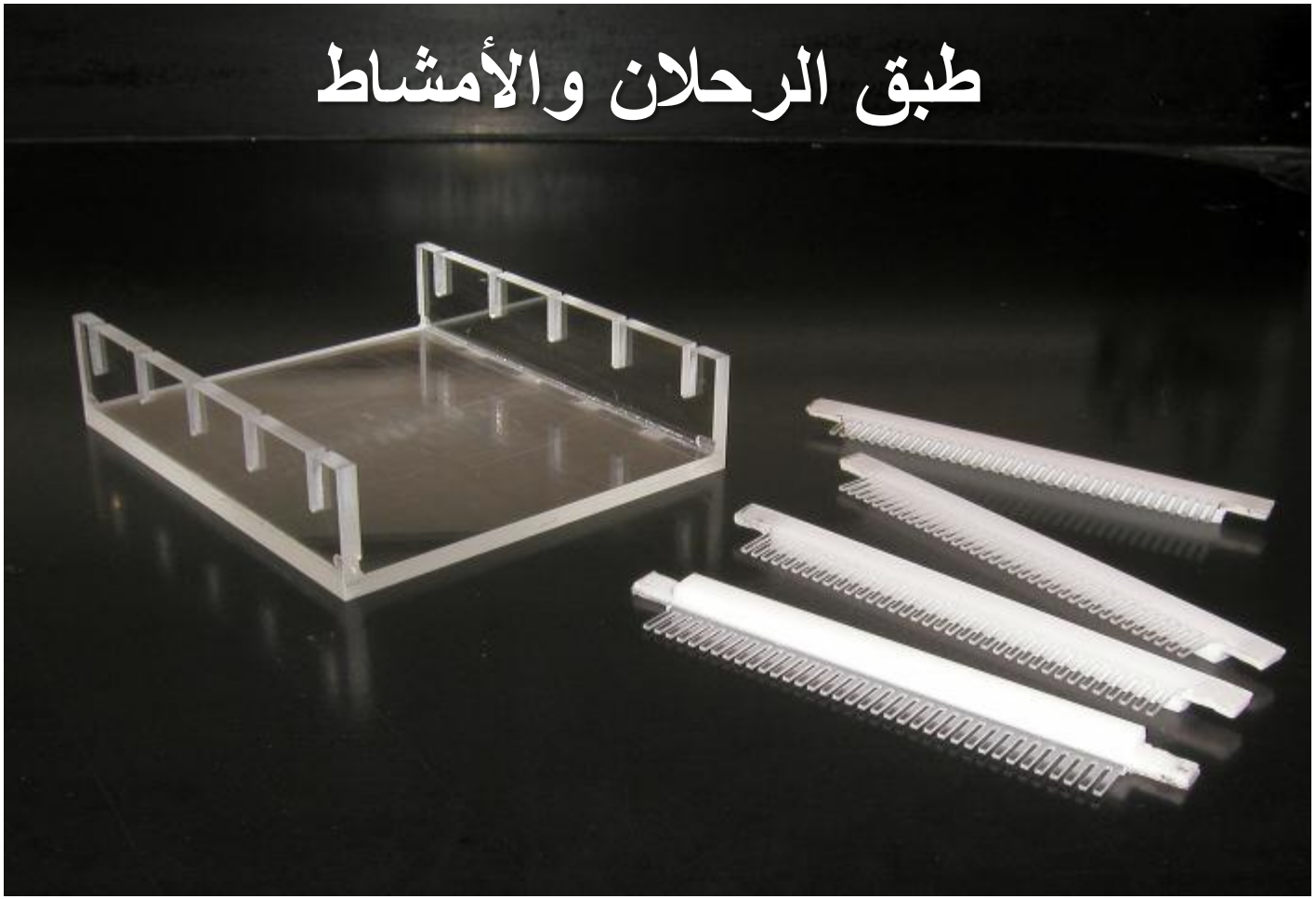
محلول الأجاروز غير ذائب في درجة حرارة الغرفة.

ملاحظة:-

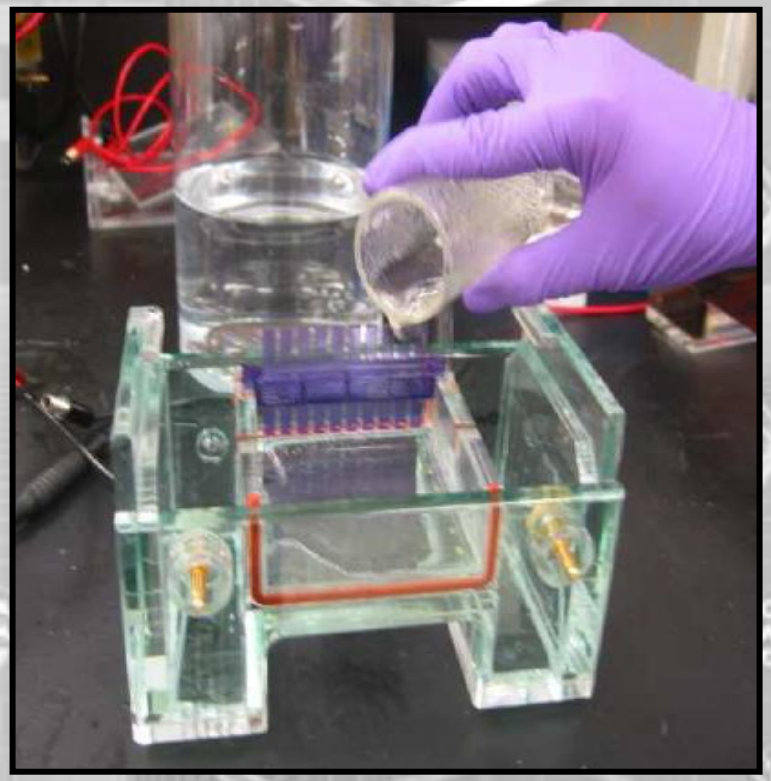
نحرص وننتبه عند عملية الغليان فمحلول الأجاروز سيصبح ساخناً جداً , والزيادة في التسخين ممكن أن يبخر محلول الأجاروز.

Power supply→
مصدر الطاقة
Gel tank→
حوض الرحلان
↙Cover
الغطاء
Electrical leads
↓ الوصلات الكهربائية
Casting tray↗
طابق الرحلان

طبق الرحلان والأمشاط

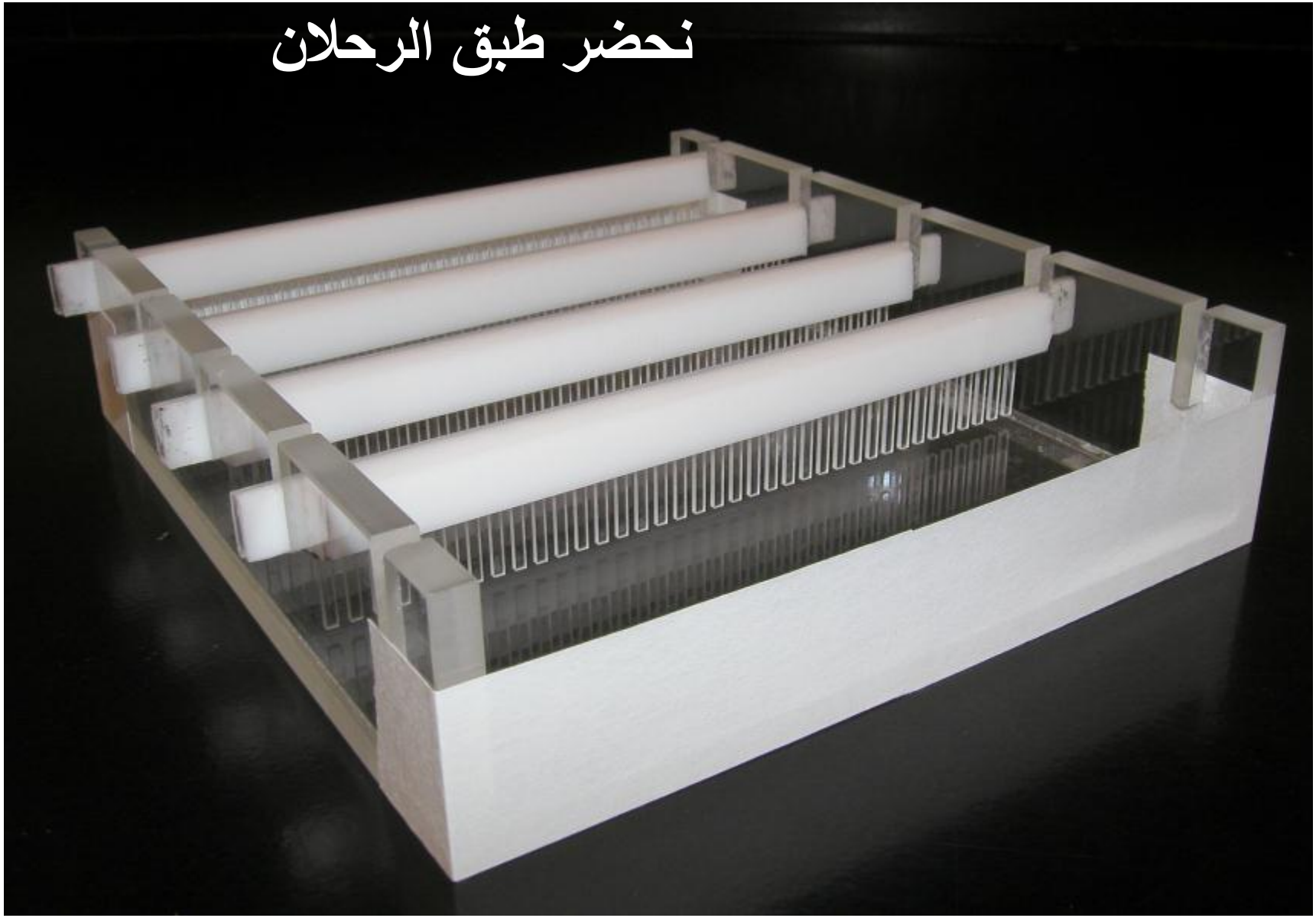


Preparing the Gel



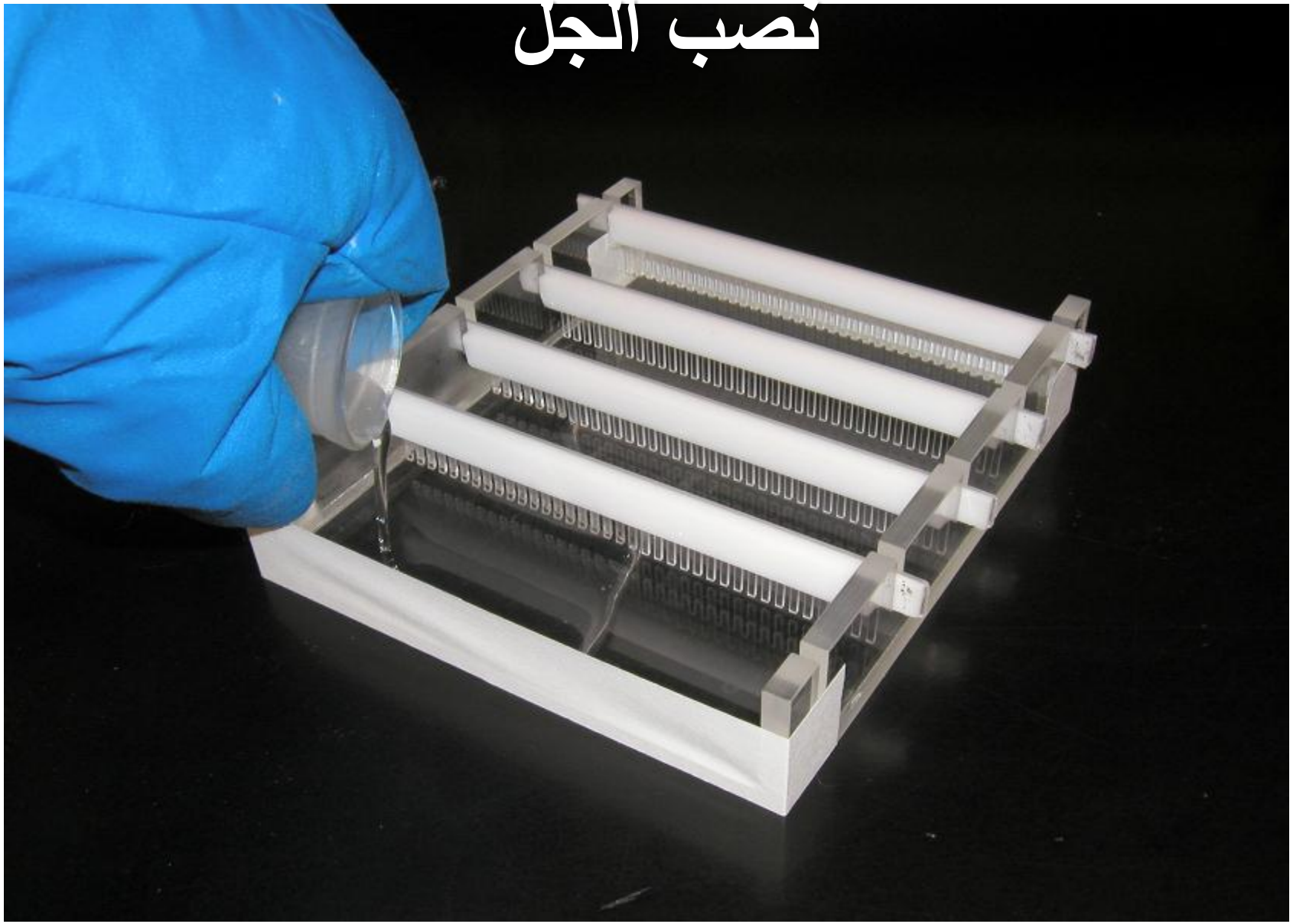
- صب الجل السائل في الصندوق الداخلي .
- توضع قطعة مثل المشط في الصندوق الداخلي .
- يترك الهلام السائل حتى يبرد ويتصلب
(ويمكن استخدام الثلاجة) .
- عندما يتصلب الجل، هذا المشط يصنع الآبار التي يوضع فيها DNA .

نحضر طبق الرحلان



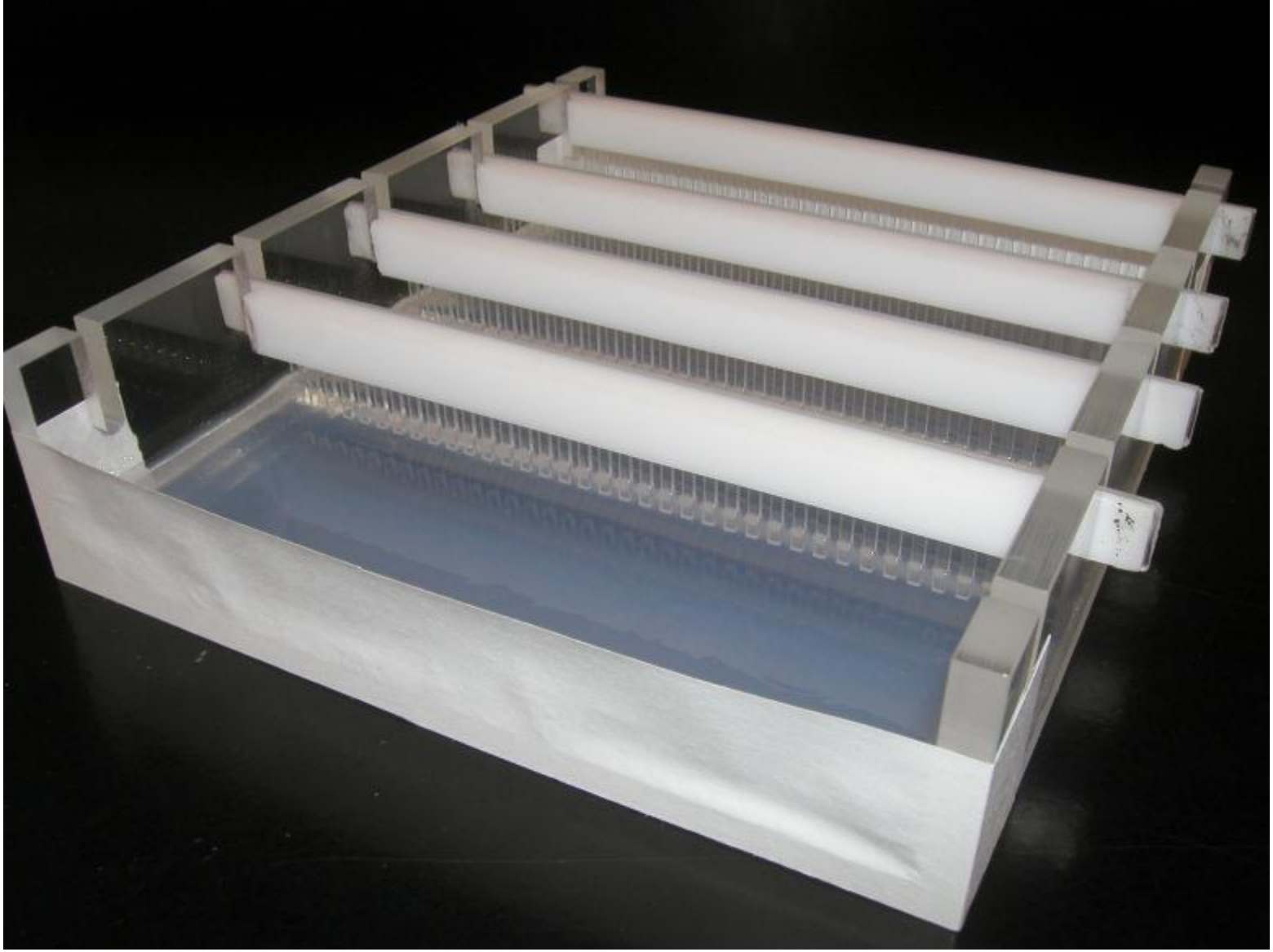
- نلف حواف الطبق بلصق ثم نضع الأمشاط.
- نضع الطبق على سطح مستوي , مع ملاحظة عدم لمس الأمشاط لسطح طبق الرحلان.

نصب الجل

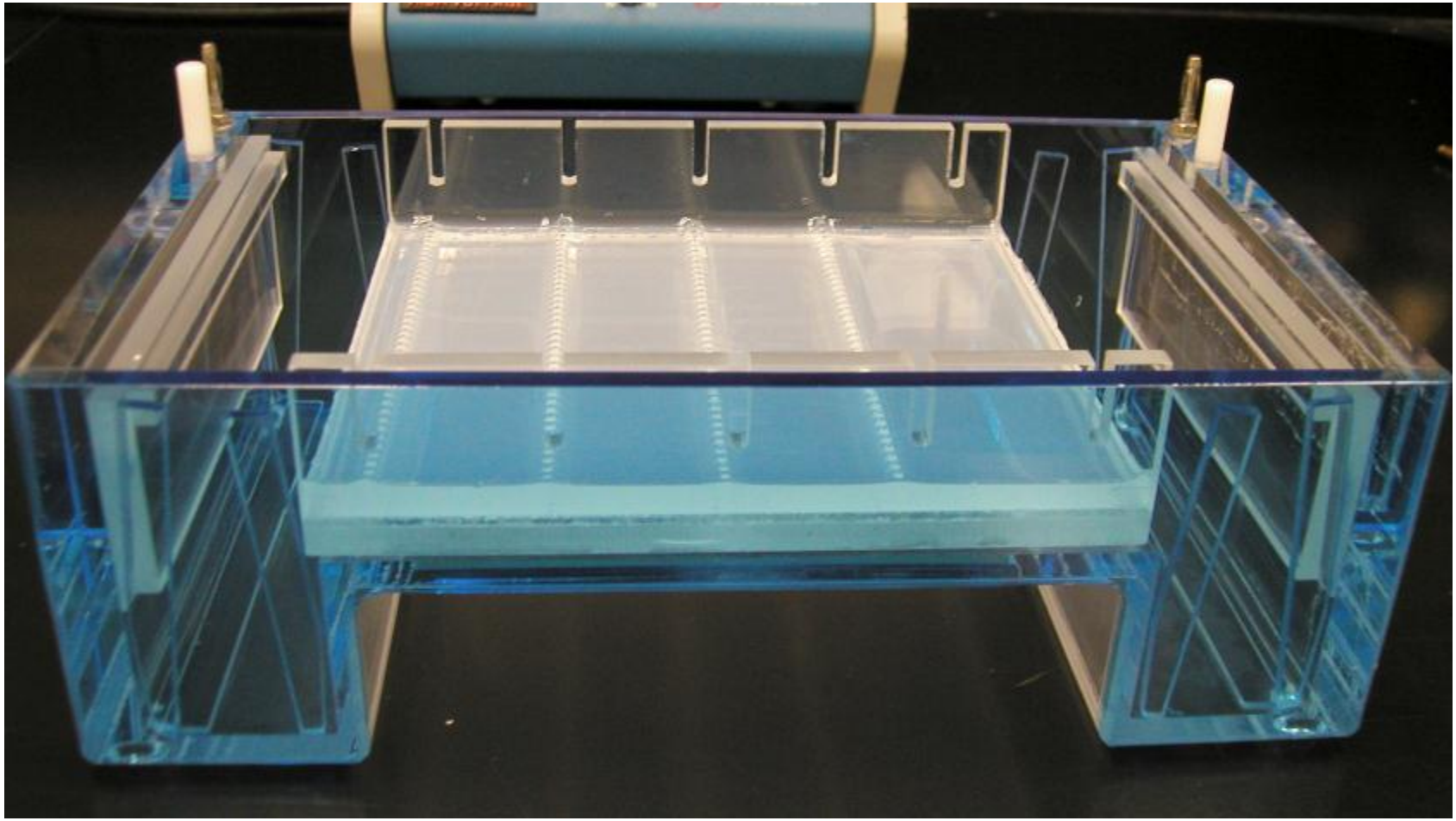


- محلول الأجاروز يجب أن يغمر الأمشاط ولكن ليس كلياً.
- الحرص على إزالة الفقاعات الهوائية الناتجة عن عملية التسخين.

Amal Alghamdi MLS 2012

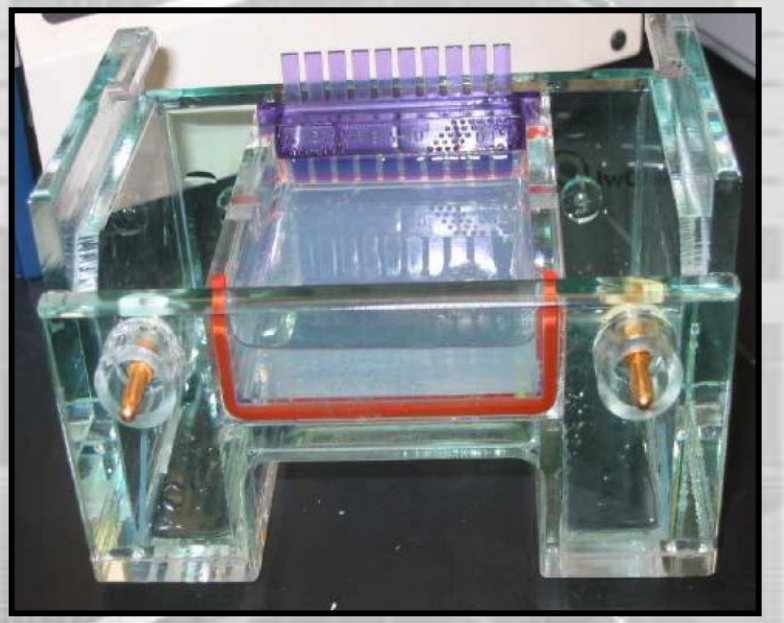


- عندما يبرد الأجاروز فإنه سوف يكون جل مرن, وشبه شفاف مقارنةً مع شكله قبل التبريد
- أنزع الأمشاط واللصق.

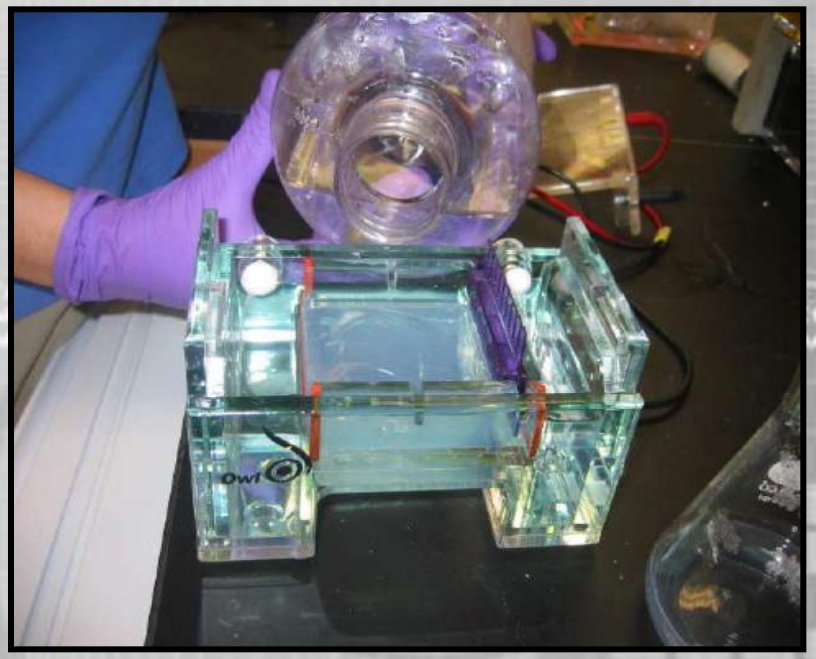


نضع الجل مع الطبق داخل حوض الرحلان الكهربائي.

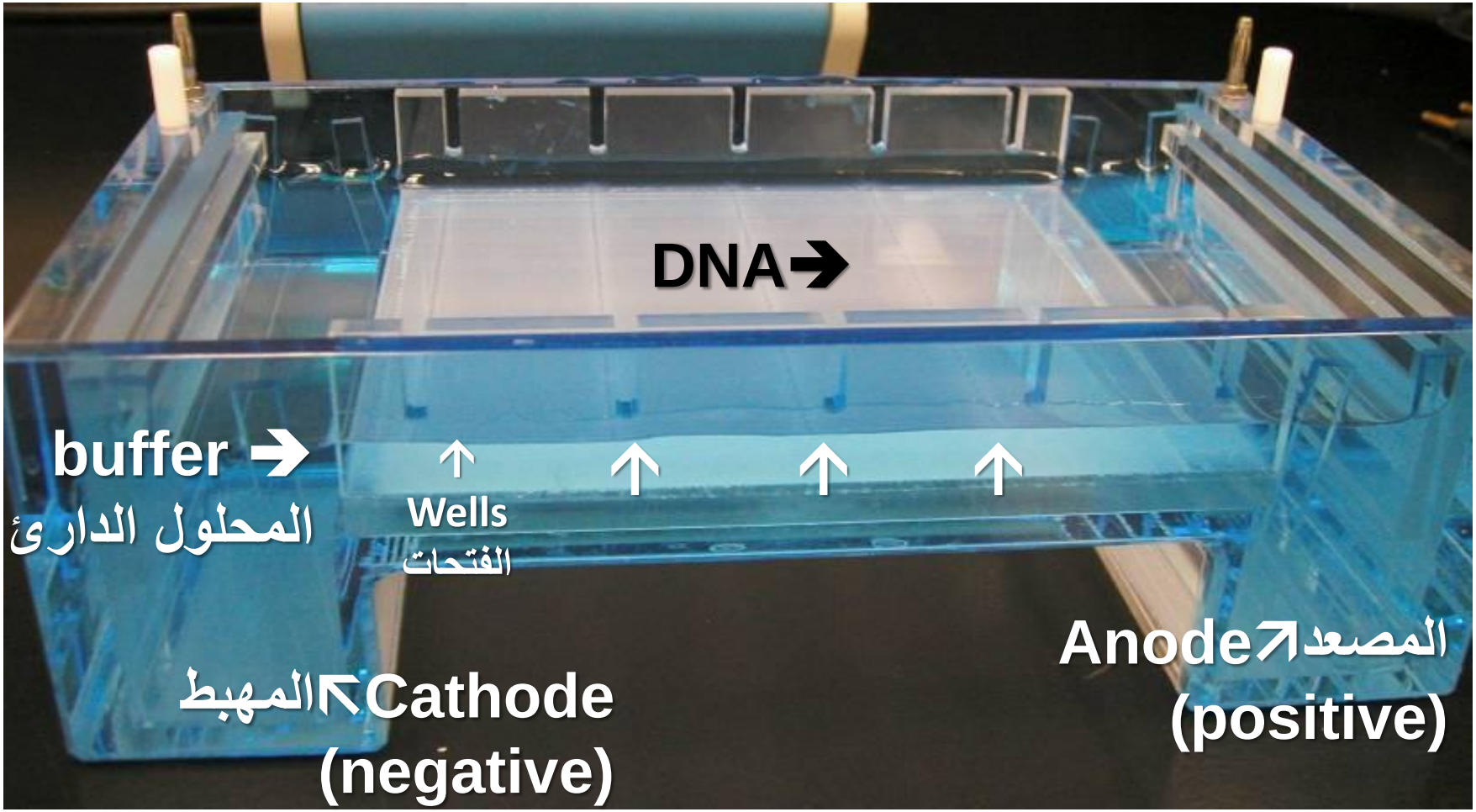
Gel Ready



- الجل أصبح جاهز.

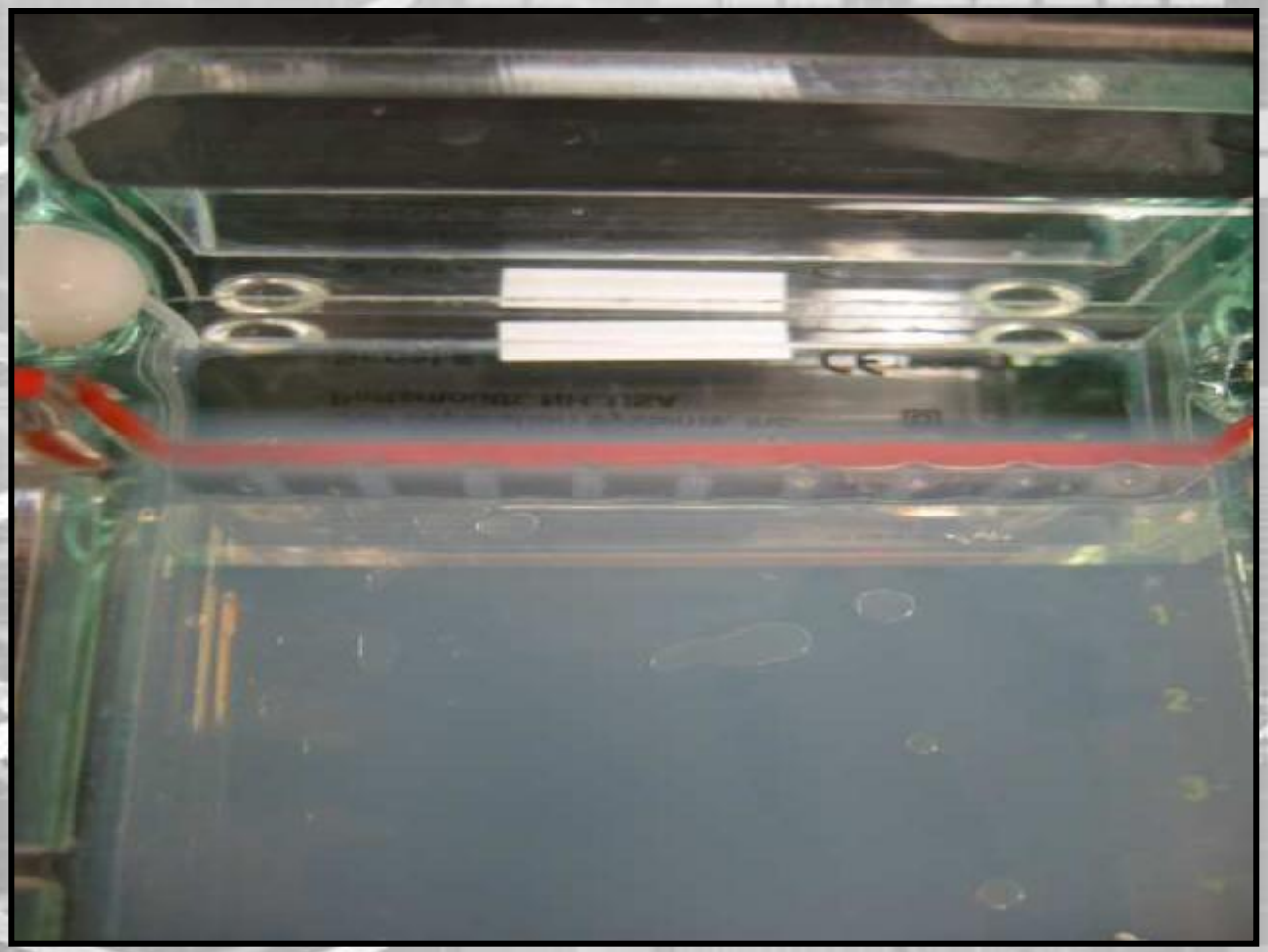


- يصب الماء في الحاوية.

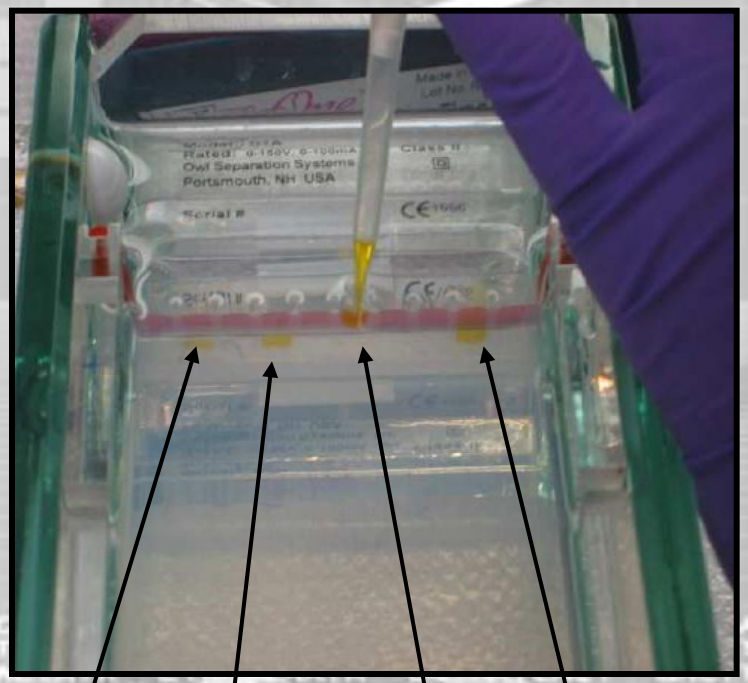


نصب المحلول الدرئ في حوض الرحلان الكهربائي حتى نغطي سطح الجل, نتأكد أن المحلول تخلل داخل جميع الفتحات.

- يزال المشط.

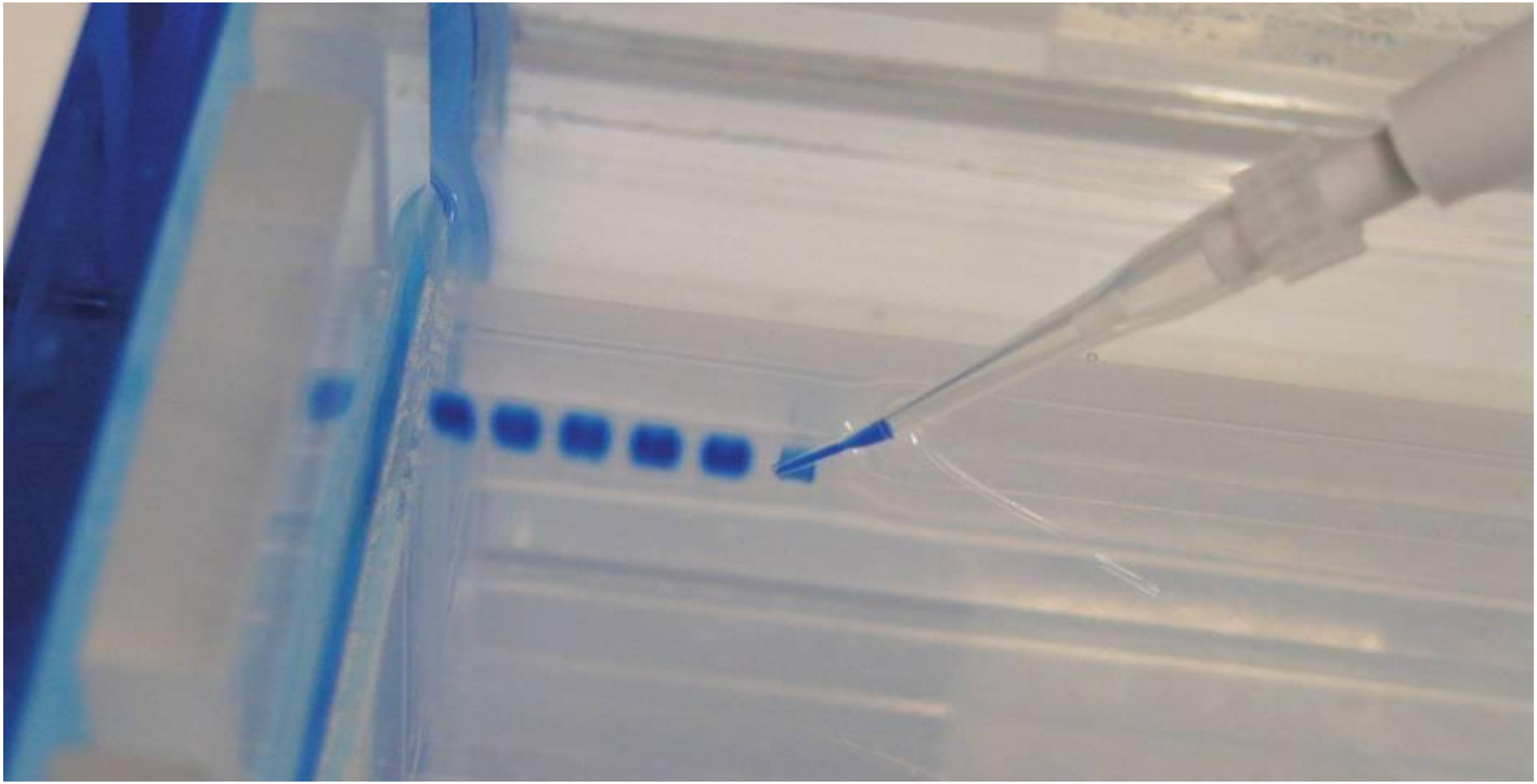


Putting DNA on the Gel



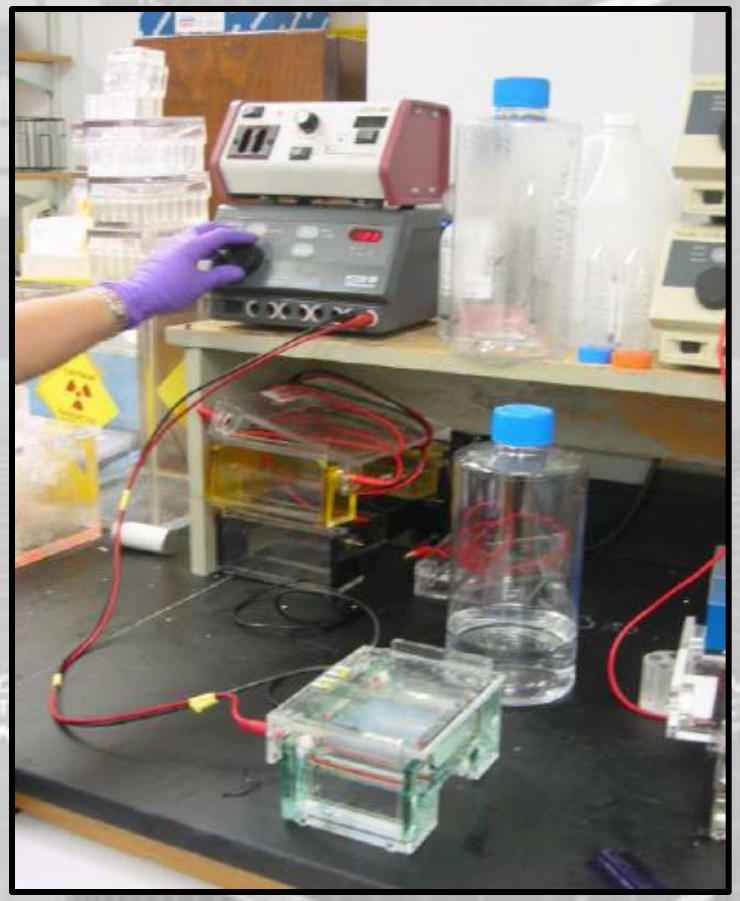
- يخلط الـ DNA مع محلول ملون (مشع) حتى يرى تحت الـ U.V .
- تدخل عينات الـ DNA إلى الآبار .
- وضع محلول يحتوي على قطع من الـ DNA تستعمل(called ladder) للمقارنة .

تحميل الجل



- عينة الدنا في الغالب تكون شفافة, لذلك نمزج معها صبغة (٣مايكروليتر + ٥ مايكروليتر من العينة).
- بحرص شديد أنزل العينة بالماصة الإلكترونية داخل فتحات الجل.

Run the Gel



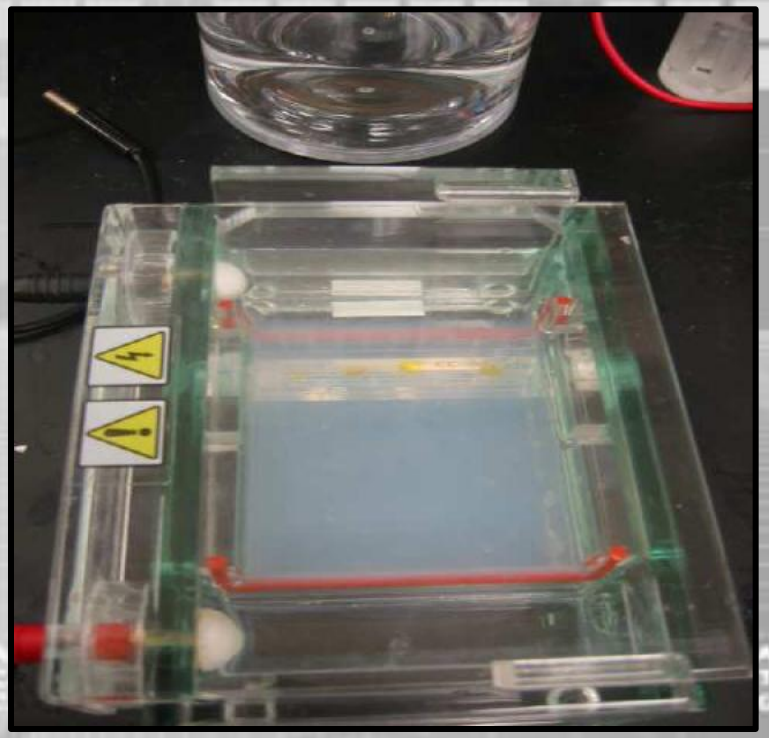
- وصل التيار الكهربائي .
- بما أن الـ DNAذو شحنة سالبة فهو يتحرك إلى القطب الموجب من الحاوية .
- والأجزاء الصغيرة تتحرك أسرع .

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

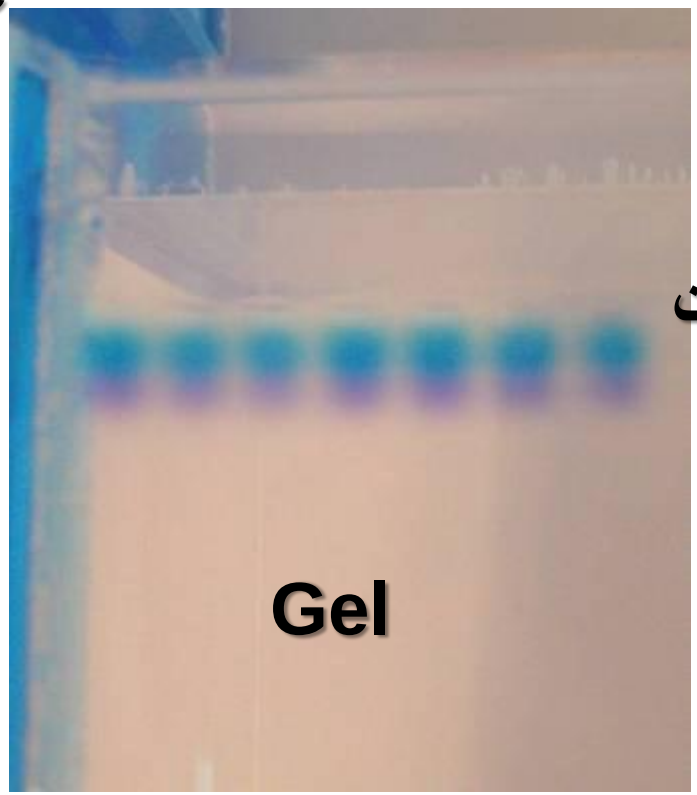
- يوضح لنا المحلول الملون تحرك الـDNA في الجل .



Cathode
المهبط
(-)

DNA
(-)
↓

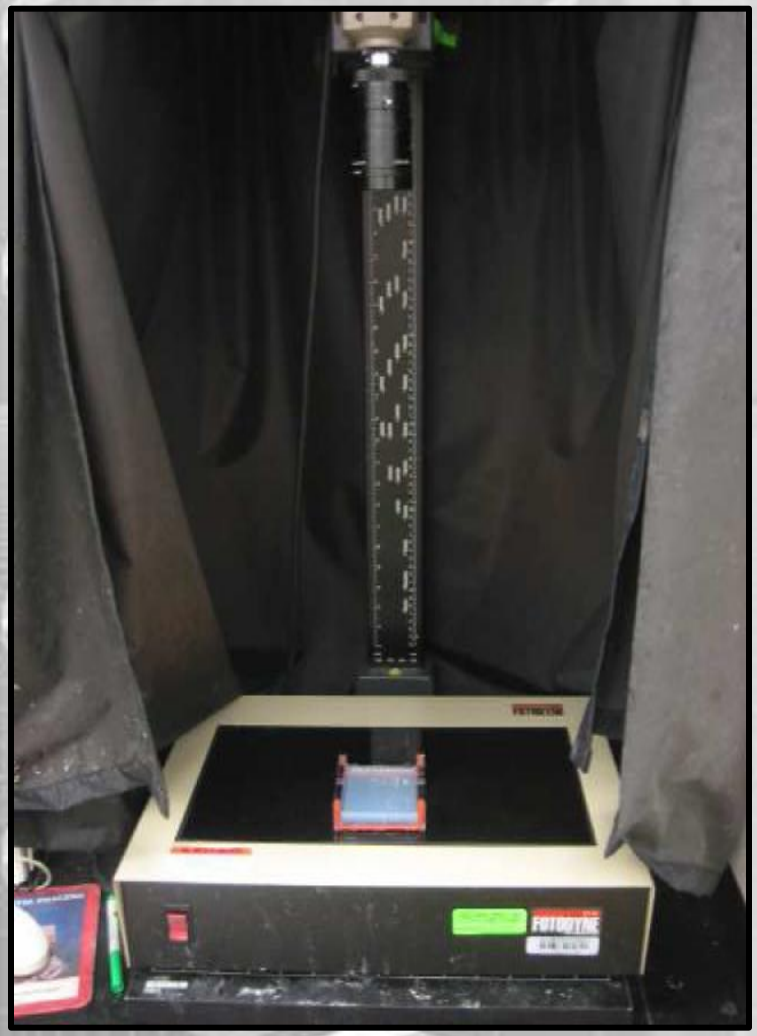
Anode
المصعد
(+)



Wells ← الفتحات

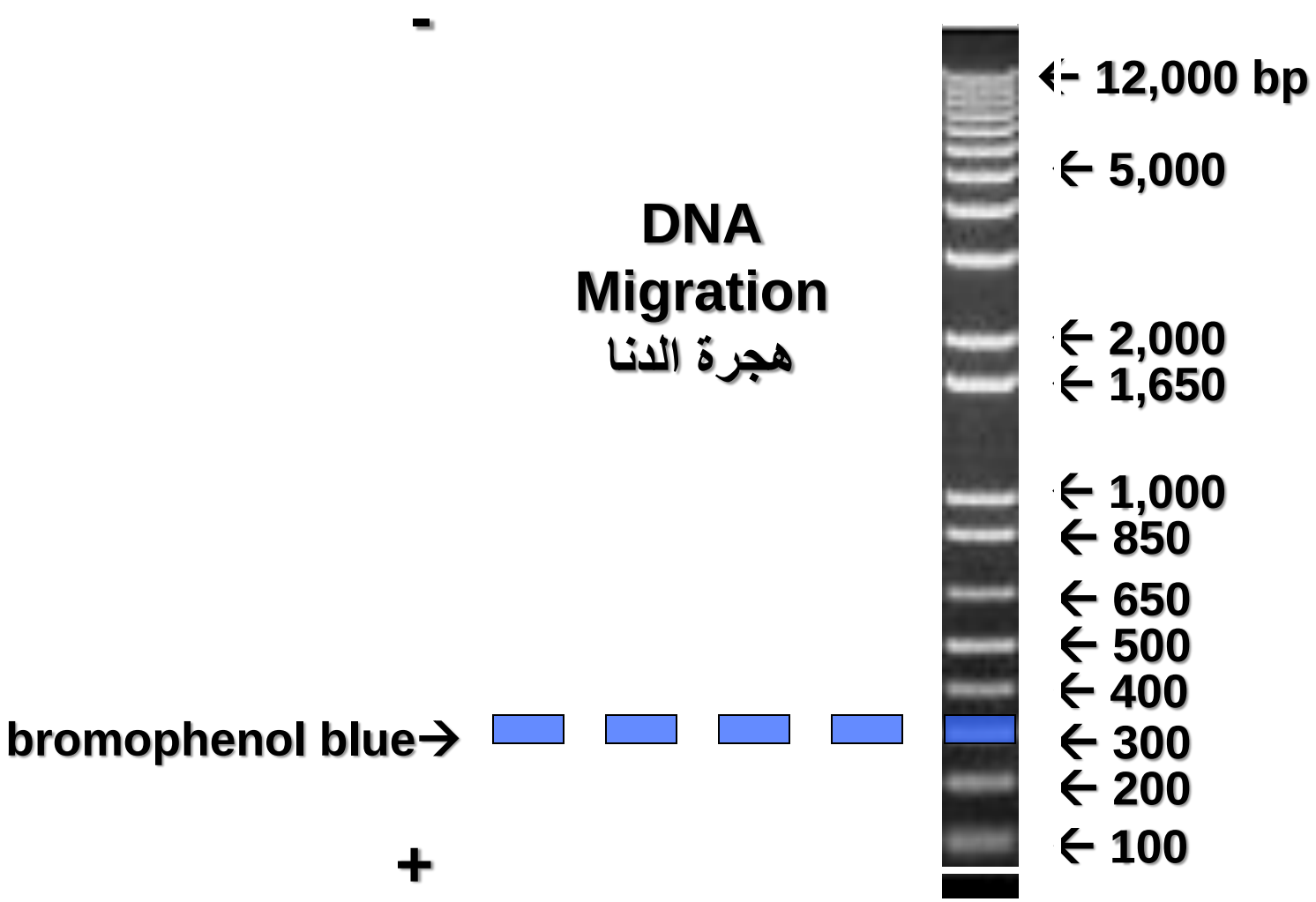
Bromophenol ← Blue
الصبغة الزرقاء

Viewing



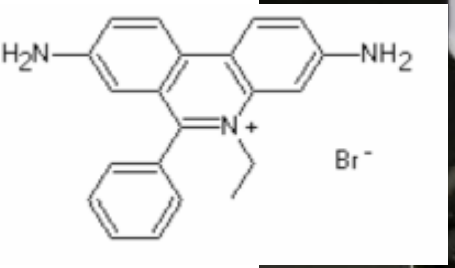
- مشاهدة الجل تحت الـ U.V .

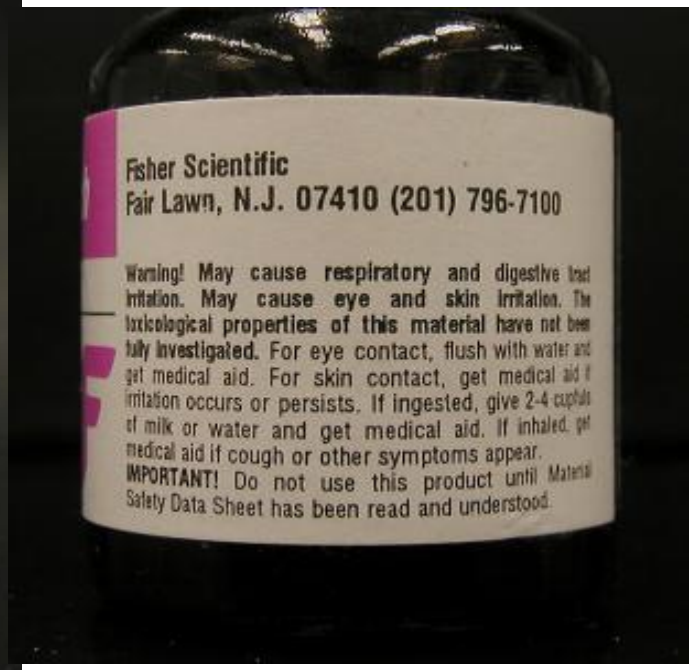
معيار مدرجDNA



الإبقاء على الجل

- بروميد الإيثيديوم يعمل على الأرتباط مع الدنا ليساعد على عملية الإشعاع تحت الأشعة الفوق بنفسجية.



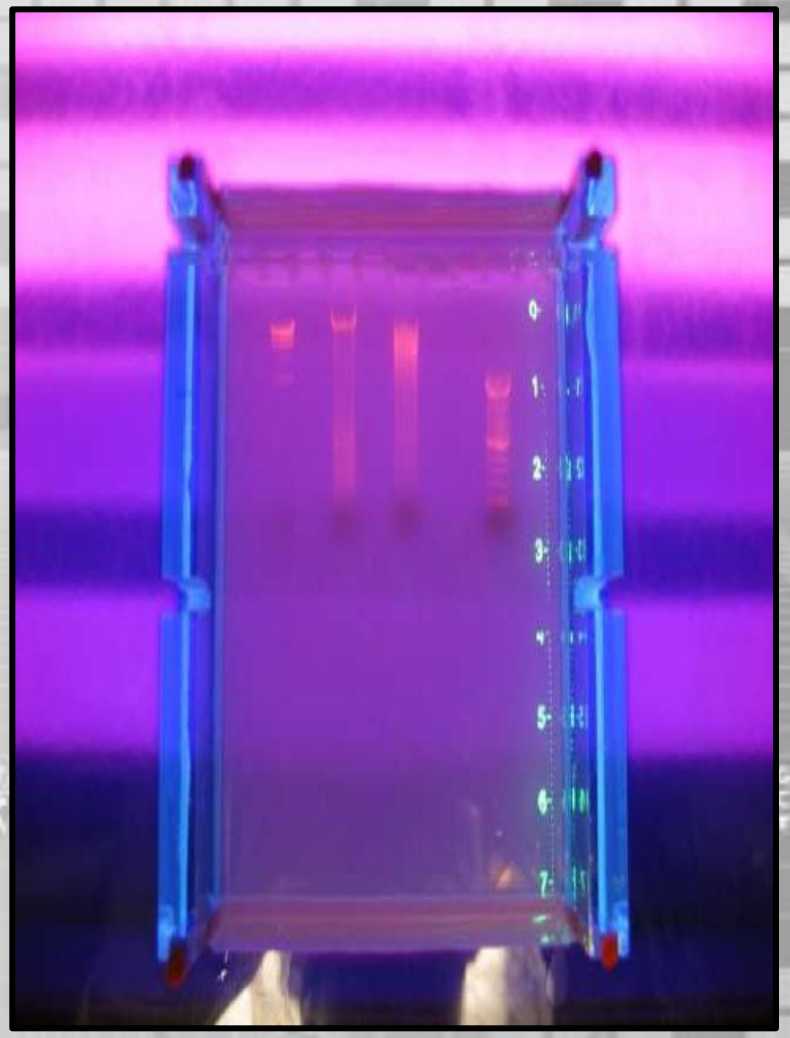


ملاااااااااحظة:-

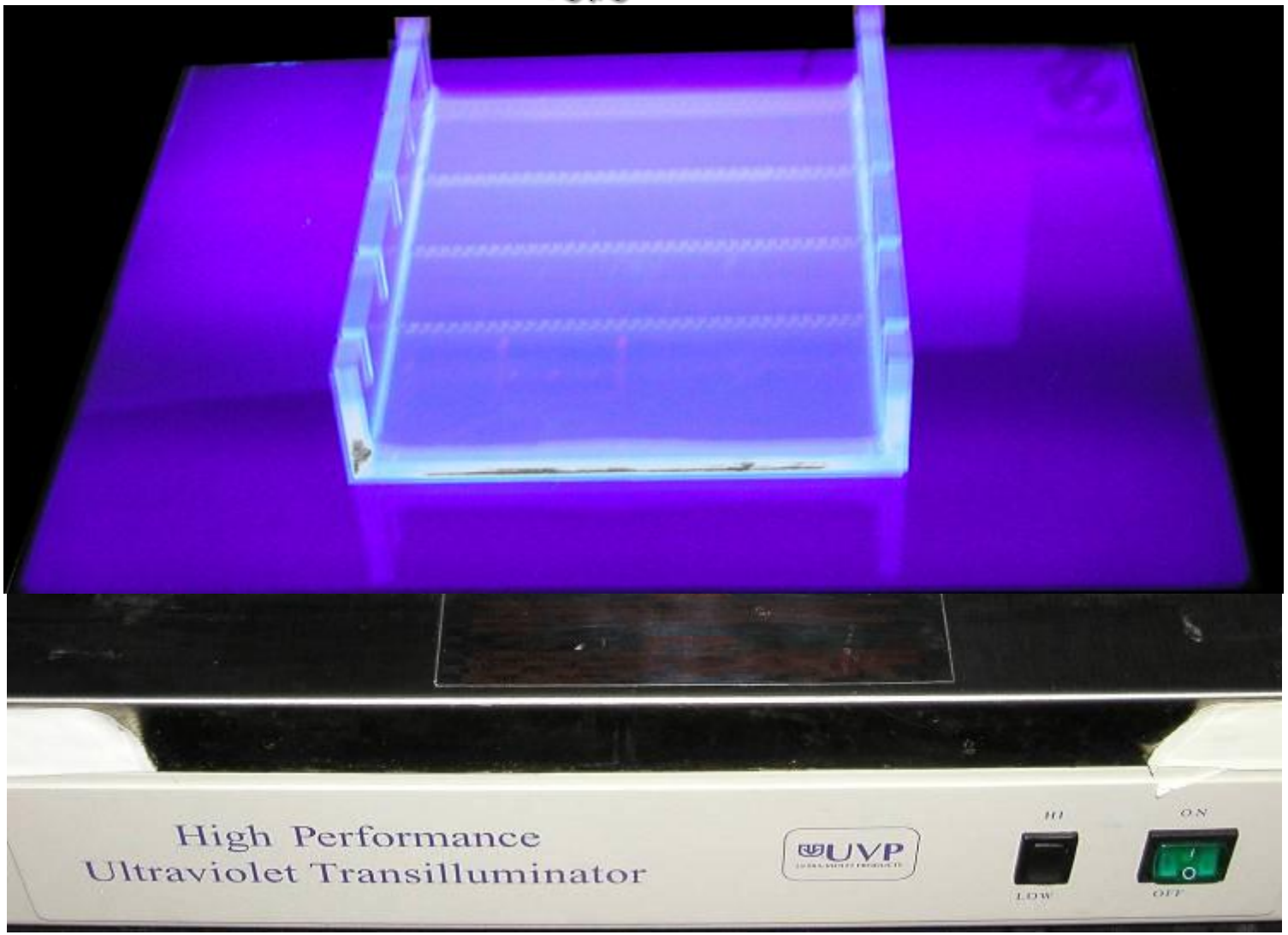
مادة بروميد الإيثيديوم مادة مسرطنة يجب لبس القفازين والحذر في التعامل معها.

Viewing

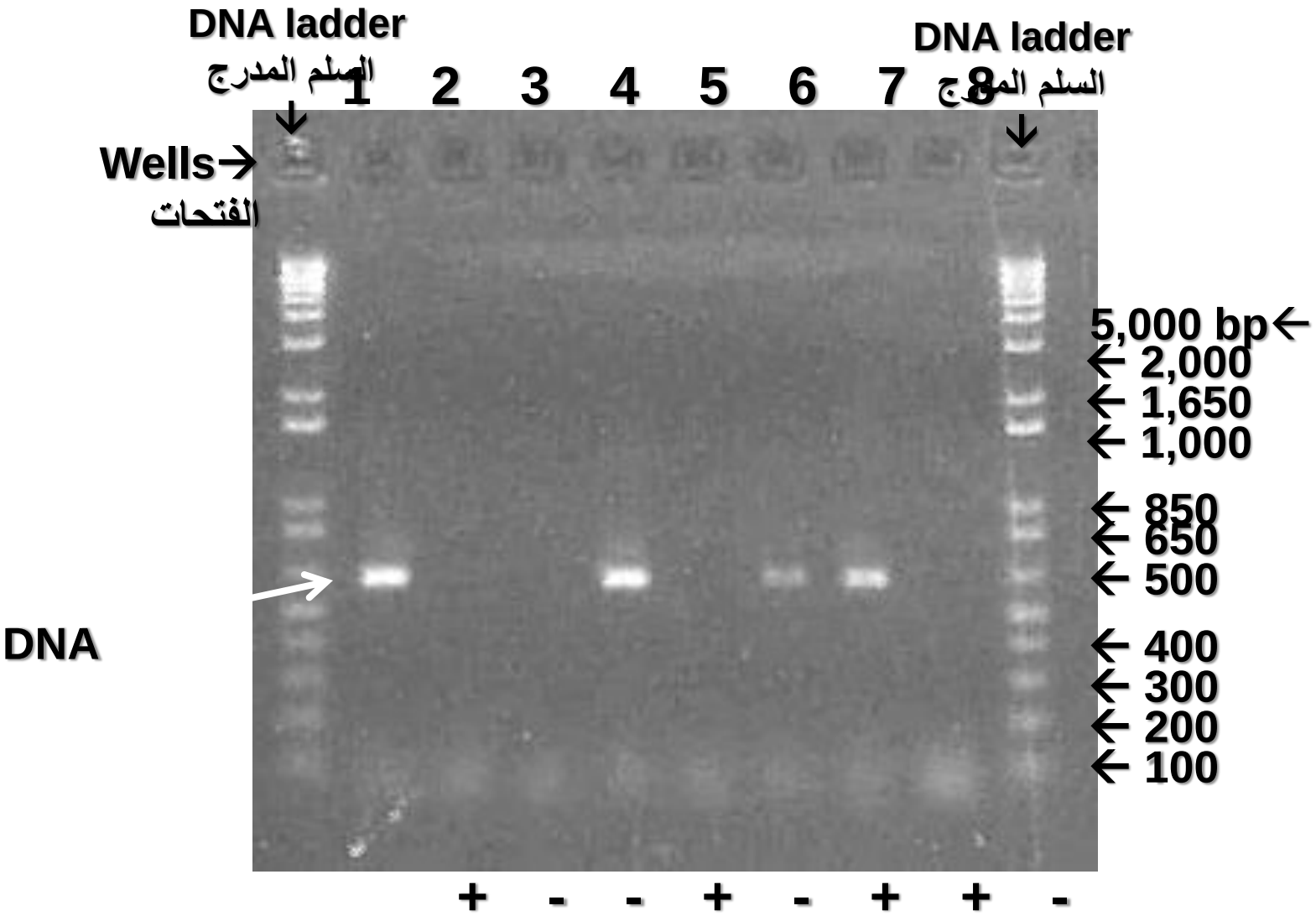
- عينة الـ DNA الأصلي غير المقطع كونت قطعة كبيرة في البداية (one big fragment) .
- عينات الـ DNA مع انزيم القطع كونت العديد من الأجزاء ، أي أن القطع ذات أحجام مختلفة .
- استخدام السلالم للمقارنة لأنها تحتوي على الأجزاء المعينة المطلوبة تترك عملية التحرك في الجل لوقت طويل حتى نضمن تفرق الـ DNA .



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



الجل بعد عملية التصوير



العينات رقم: ١ ـ ٤ ـ ٦و ٧ تظهر بها الحمض النووي الدنا

Good Luck

أ. أمل الغامدي

أ.شروق الشهراني

أ.رنا التركي