King Saud University
Department of Botany &
Microbiology

بسم الله الرحمن الرحيم

251حدق

الأحياء الجزيئية

حساب تركيز الحمض النووي
DNA

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

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

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

2- نسجل نسبة الأشعة الممتصة والصادرة عن المحلول.

3- 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 النووى :

- قياس الامتصاص عن الطول الموجي 260 و 280 nm

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

- 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 بواسطةGel Electrophoresis

الفصل الكهربائي لعينة الحمض النووي DNA

- ♣ 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.

DIGESTION OF DNA WITH RESTRICTION ENDONUCLEASES

Digestion of DNA with restriction endonucleases is the first step in many gene manipulation projects.

These enzymes are part of the system that carries out restriction and modification.

It appears that their main role is to protect cells from invasion by foreign DNA's, especially bacteriophage DNA.

Restriction endonucleases recognize specific 4-base (tetramer), 5-base (pentamer), or 6-base (hexamer) sites located on the incoming DNA, and make double-stranded cuts.

The sites are short enough that they can be found randomly in the DNA of any organism, including the organism that produces the restriction endonuclease.

NAMING ENZYMES

There is a uniform system for naming restriction endonucleases and their corresponding *methyl trahsferases*, based on the genus and species of the source organism, the particular strain or serotype, and the order of discovery.

By convention, the first letter of the genus name and the first two letters of the species name are used to derive the basic enzyme name. Thus *Escherichia coli* yields *Eco* (because genus and species names are italicized, it was originally the custom to italicize the enzyme name [*Eco*] but recent nomenclature recommendations have dispensed with this convention). Then comes a designation, if any, of the particular strain or serotype (sometimes an enzyme is encoded by a plasmid and the plasmid designation is used).

A common REase from *E. coli* comes from an R factor.

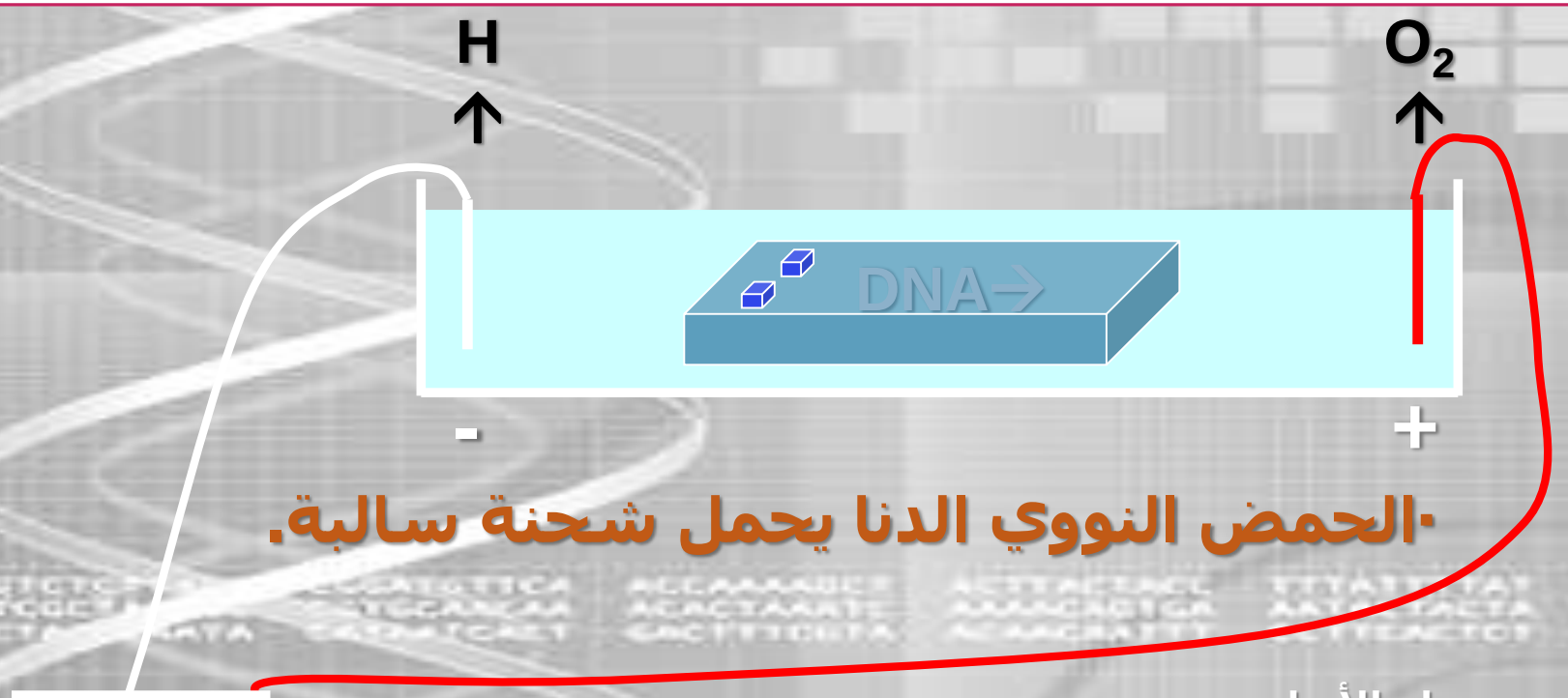
NAMING ENZYMES

Finally, a Roman numeral is applied to indicate the order of discovery. Thus the first restriction enzyme from E. coli carrying an R factor is Eco R I. Some others are:

- **HindIII** the third enzyme from *Haemophilus influenzae* strain d
- **SmaI** the first enzyme *Serratia marcesens*
- **BamHI** the first enzyme from *Bacillus amyloliquifaciens* strain H
- **KpnI** the first enzyme from *Klebsiella pneumonia*

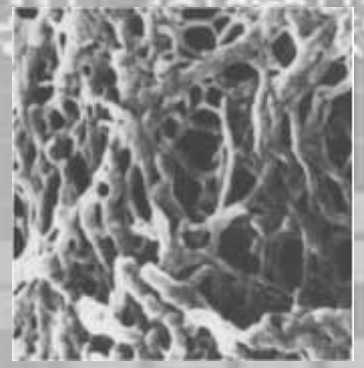
• عندما نضع الحمض النووي الدنا في مجال كهربي فإنه سوف يهاجر أو(يرحل) للقطب الموجب"المصعد".

• جل الأجاروز يستعمل لفصل وتحرك جزيئات الدنا إعتماداً علىDNA حجم الحمض النووي الدنا .



• الحمض النووي الدنا يحمل شحنة سالبة.

الفراغات بين جل الأجاروز يسمح بمرورDNA جزيئات الدنا.



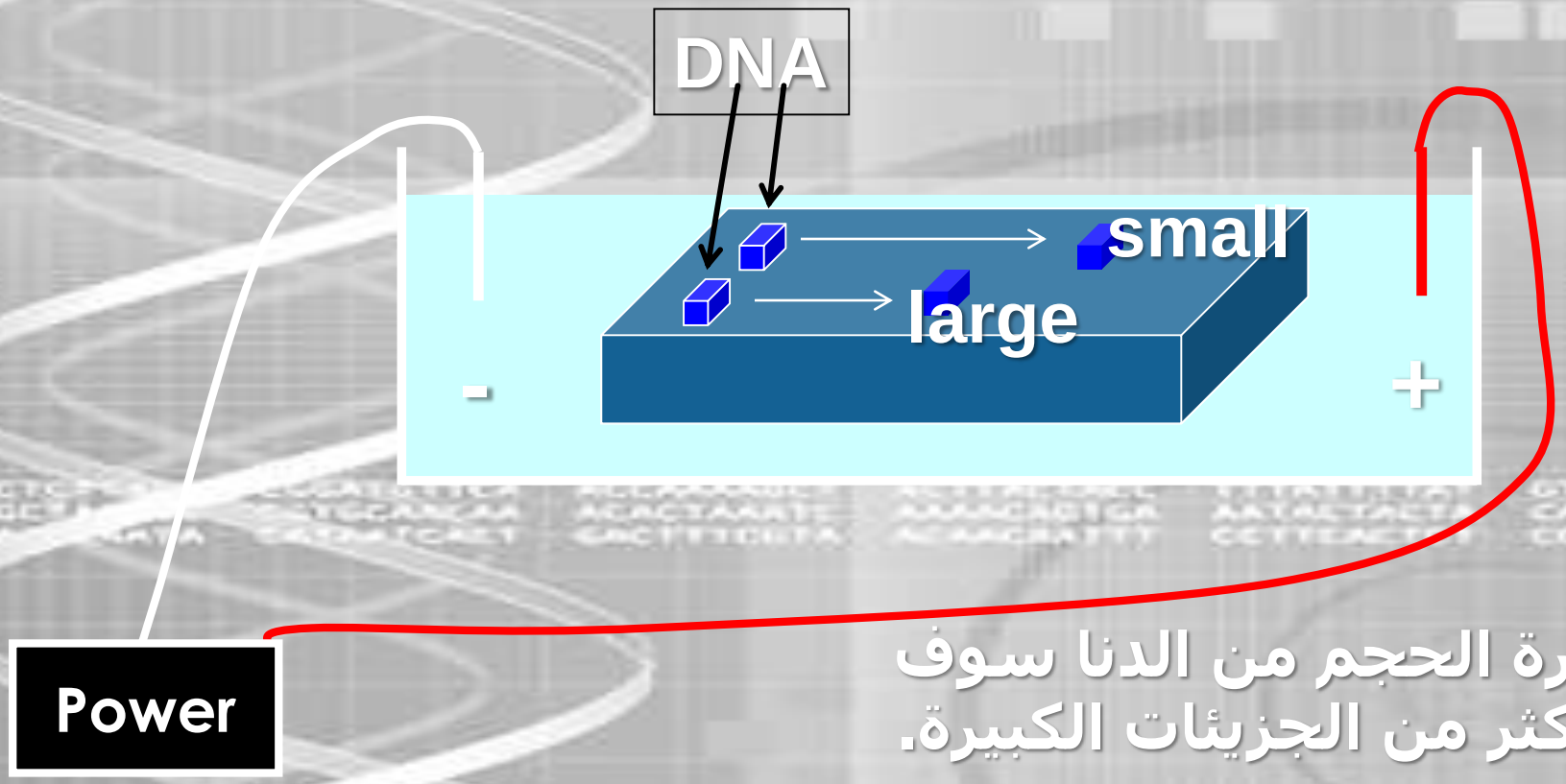
صورة من المجهر الإلكتروني الماسح لجل الأجاروز (1×1 μm) →

Amal Alghamdi-MIC251-2011

س: كيف سيرحل الدنا بسرعة ؟؟؟

اعتماداً على:-

1- قوة المجال الكهربي.
2- المحلول الدارئ.
3- كثافة جل الأجاروز.
4- 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 .

إنزيمات القطع RESTRICTION ENZYME

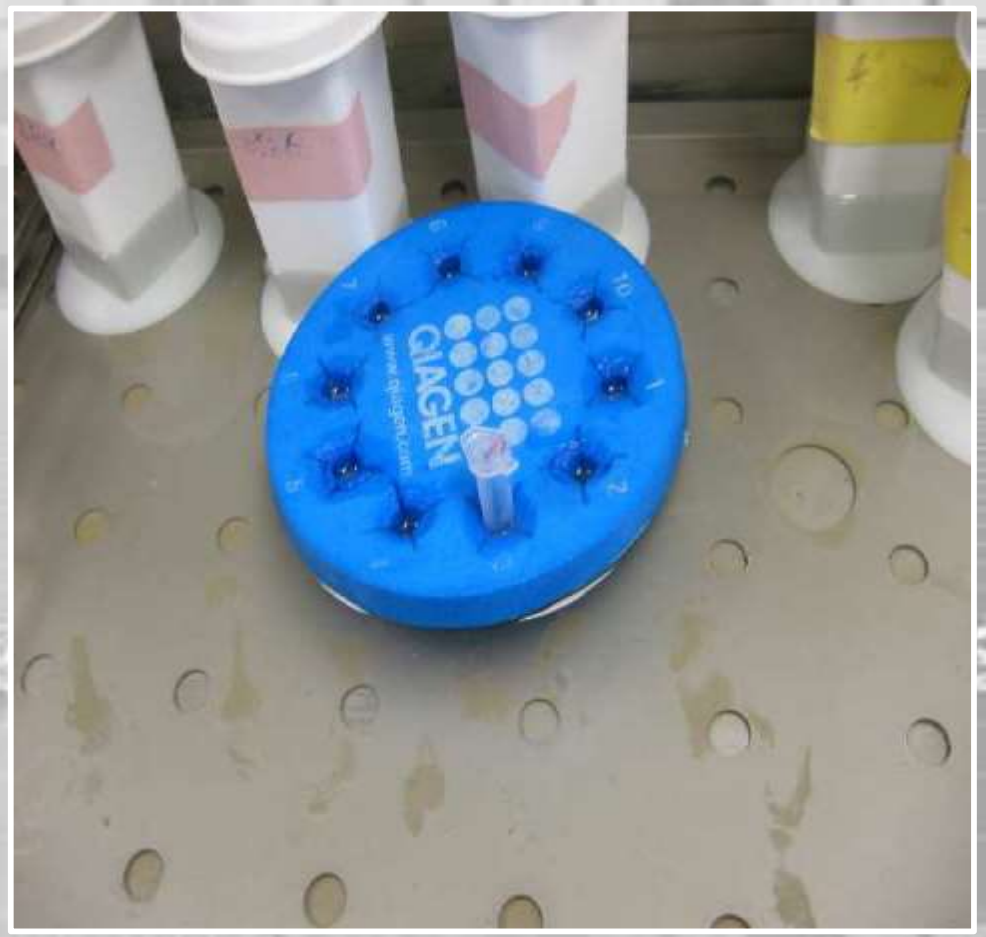
- نستعمل restriction enzyme لتقطيع الحمض النووي DNA إلى أجزاء .

الهضم باستخدام إنزيمات القطع APPLY ENZYME

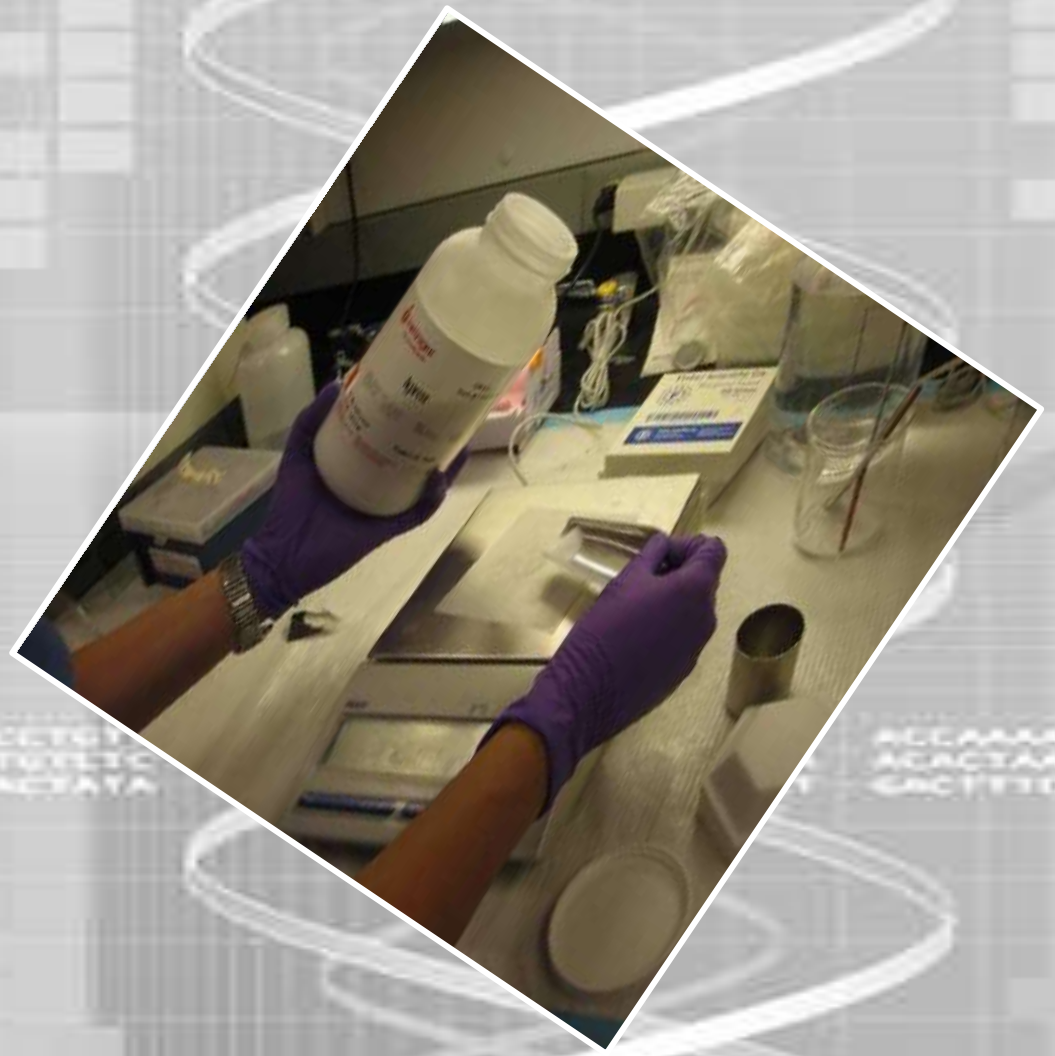
- عينة الحمض النووي DNA وإنزيم القطع توضع في الأنبوب .

- تعريض الأنبوبة للهز والدوران حتى يخلط الحمض النووي DNA الأنزيم.

التحضين في الحمام المائيWATER BATH



PREPARING THE GEL تحضير جل الأجاروز



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

الصيغة البنائية لجل الأجاروز

جالاكتوز

جالاكتوز منزوع الماء

- الأجاروز عبارة عن متبلمر خطي يستخرج من الطحالب البحرية.

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

Buffer ➤
محلول دارئ

Flask for boiling ➤
دورق للغليان

Agarose ➤
بودرة الأجاروز

- خلط المسحوق مع الماء في دورق .

المحلول الدارئ

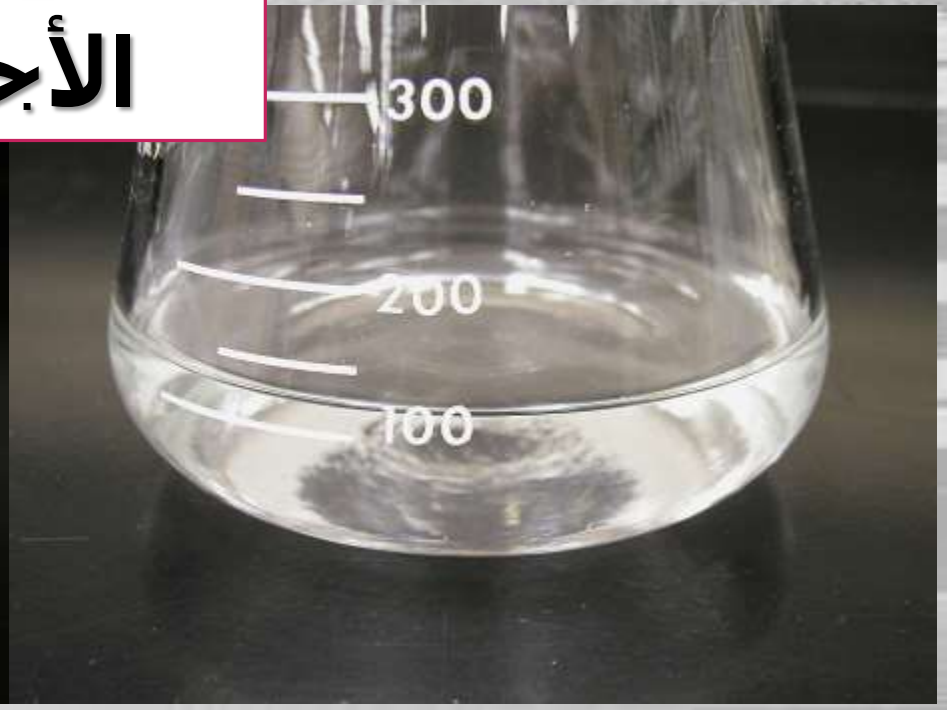
بودرة الأجاروز

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

PREPARING THE GEL تحضير جل الأجاروز

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

غليان الأجاروز



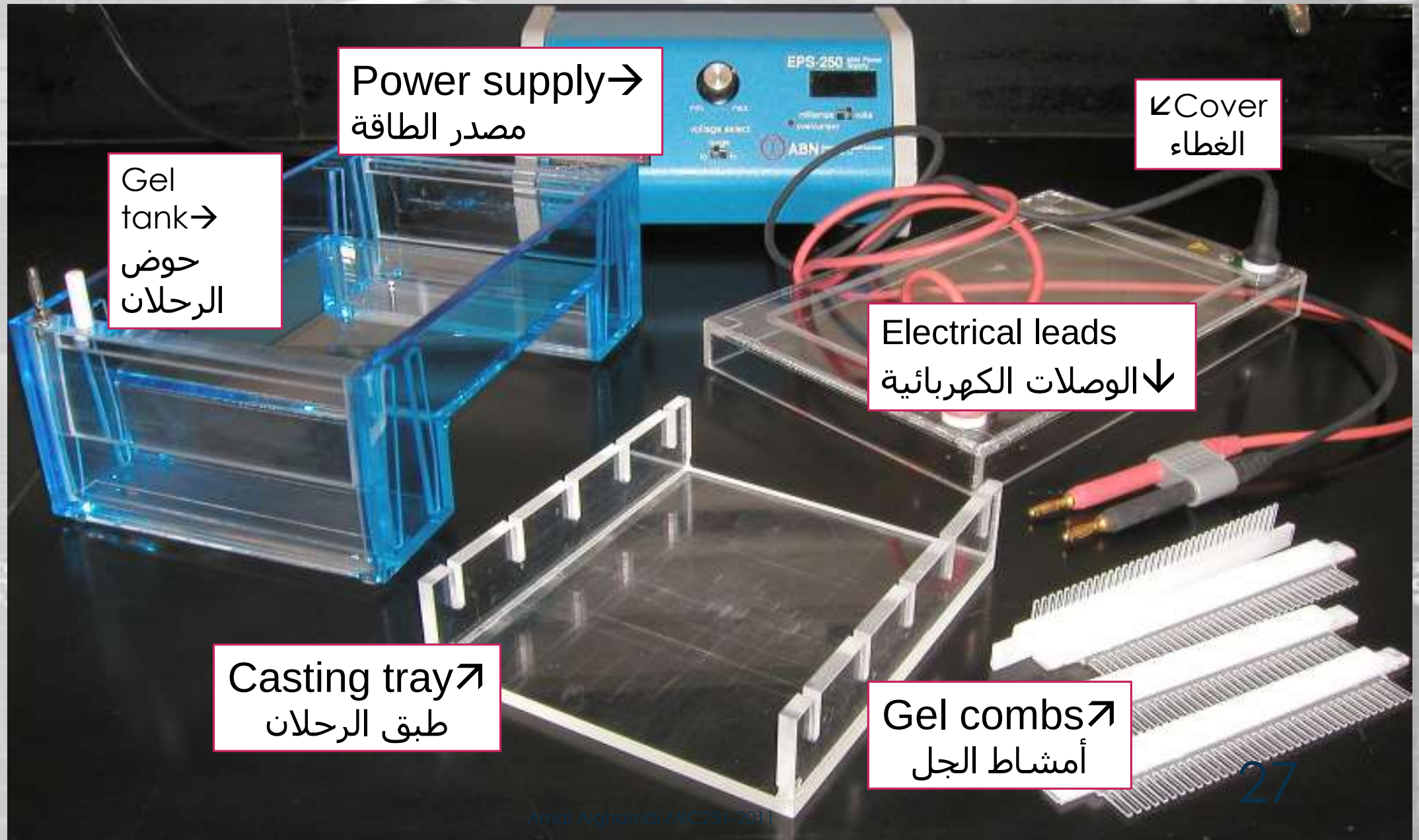
محلول الأجاروز غير ذائب في درجة حرارة الغرفة.

محلول الأجاروز يصبح صافي بعد غليانه.

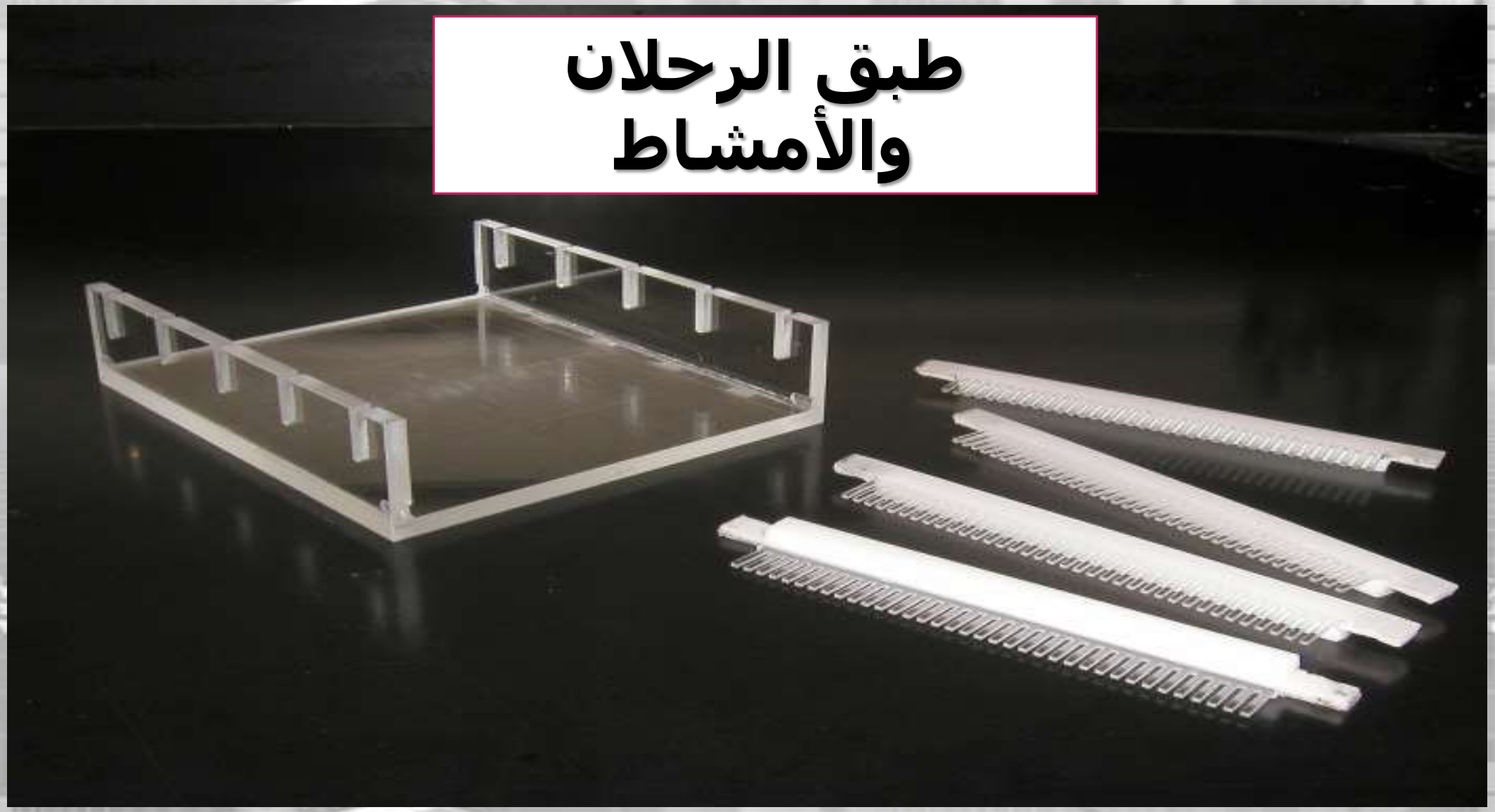
ملاحظة:-

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

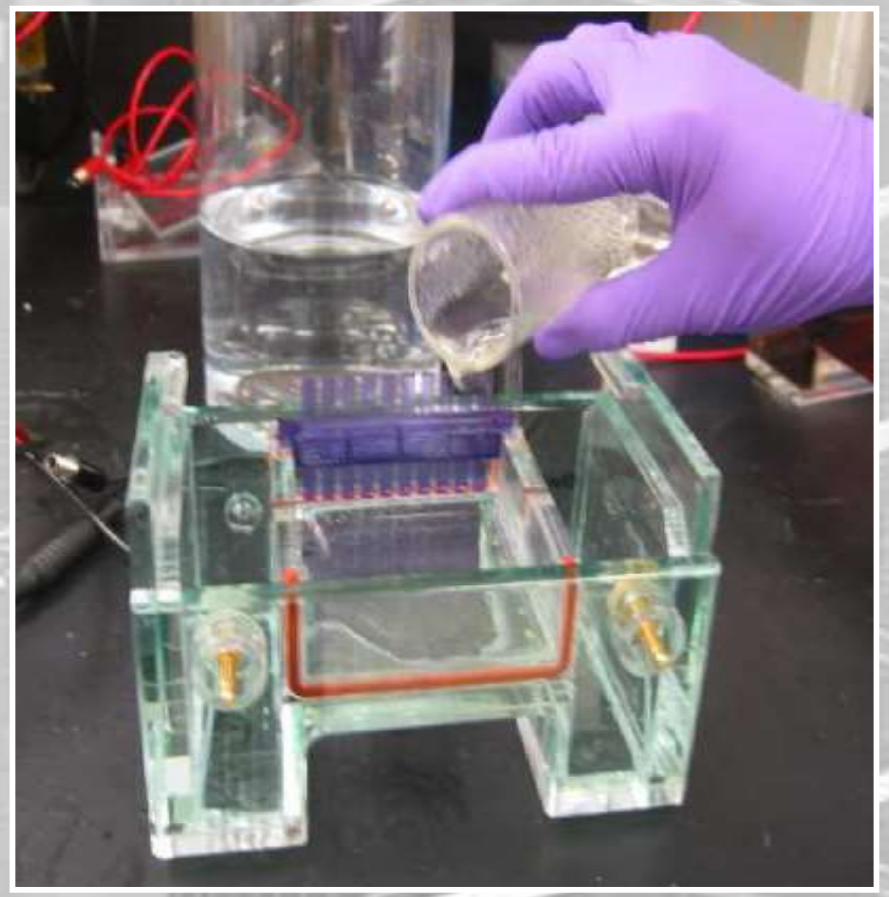
أجزاء جهاز الفصل(الرحلان)الكهربائي



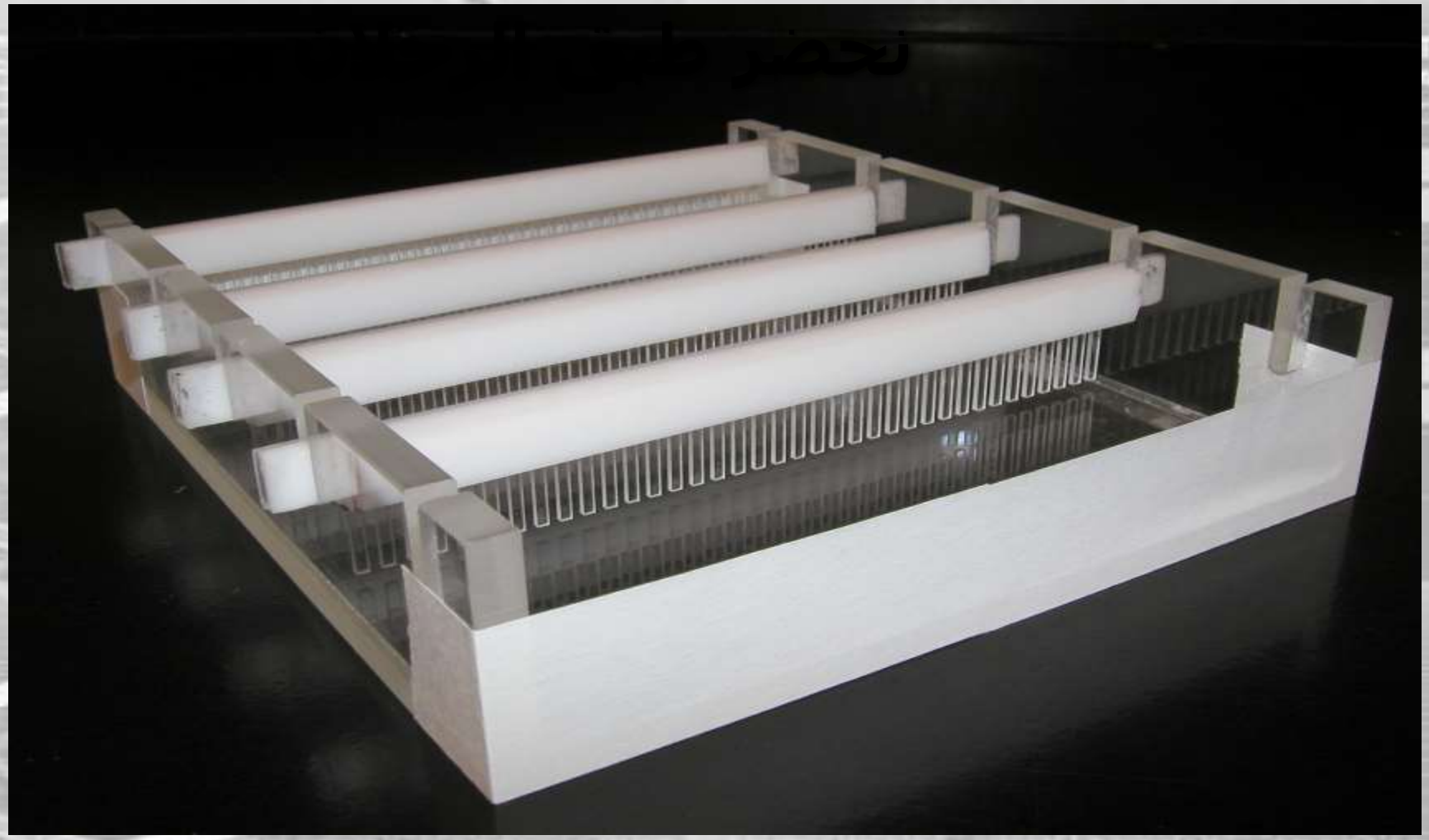
طبق الرحلان والأمشاط



PREPARING THE GEL تحضير جل الأجاروز

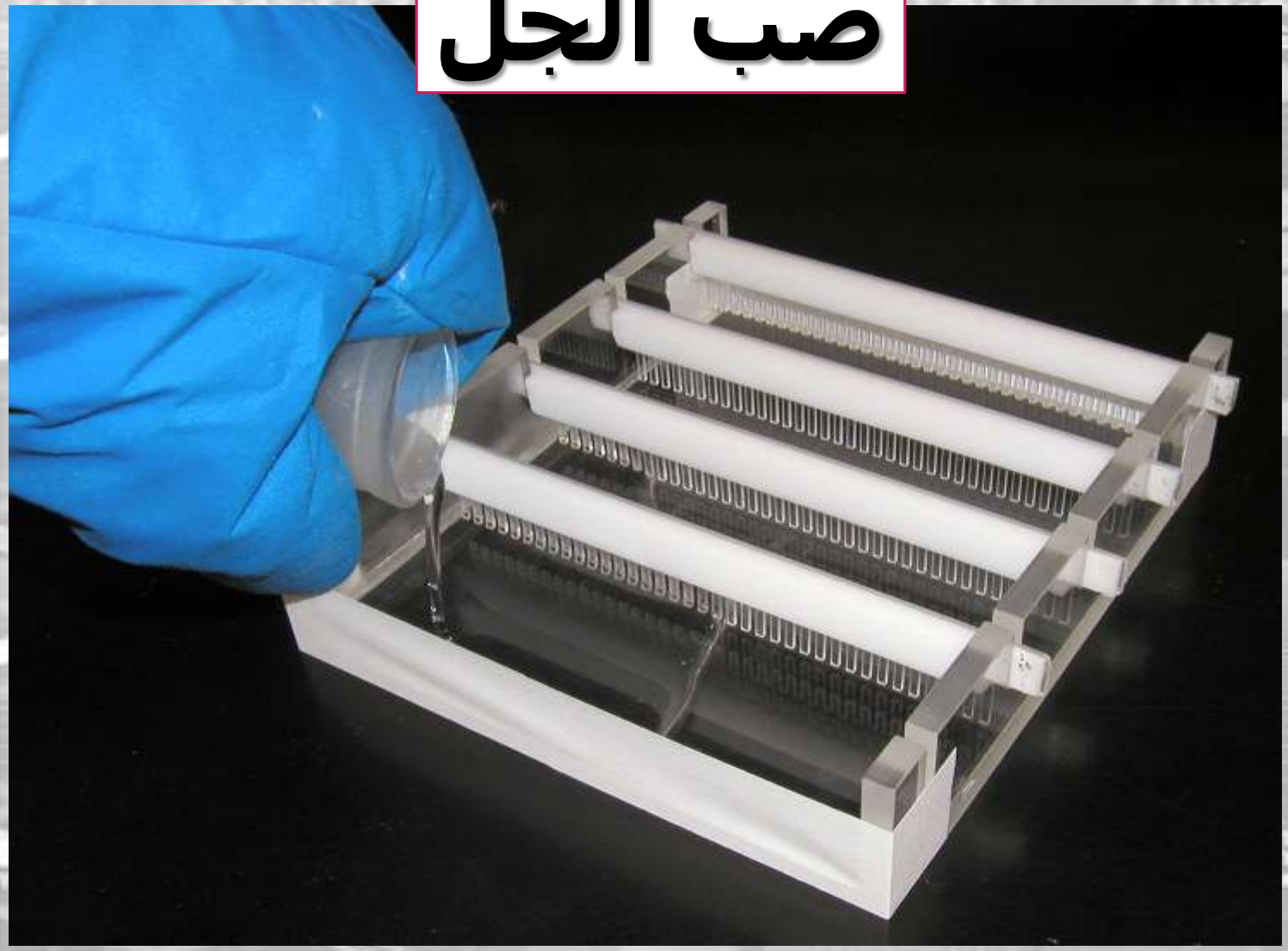


- صب الجل السائل في الصندوق الداخلي .
- توضع قطعة مثل المشط في الصندوق الداخلي .
- يترك الهلام السائل حتى يبرد ويتصلب (ويمكن استخدام الثلاجة) .
- عندما يتصلب الجل، هذا المشط يصنع الآبار التي يوضع فيهاDNA .

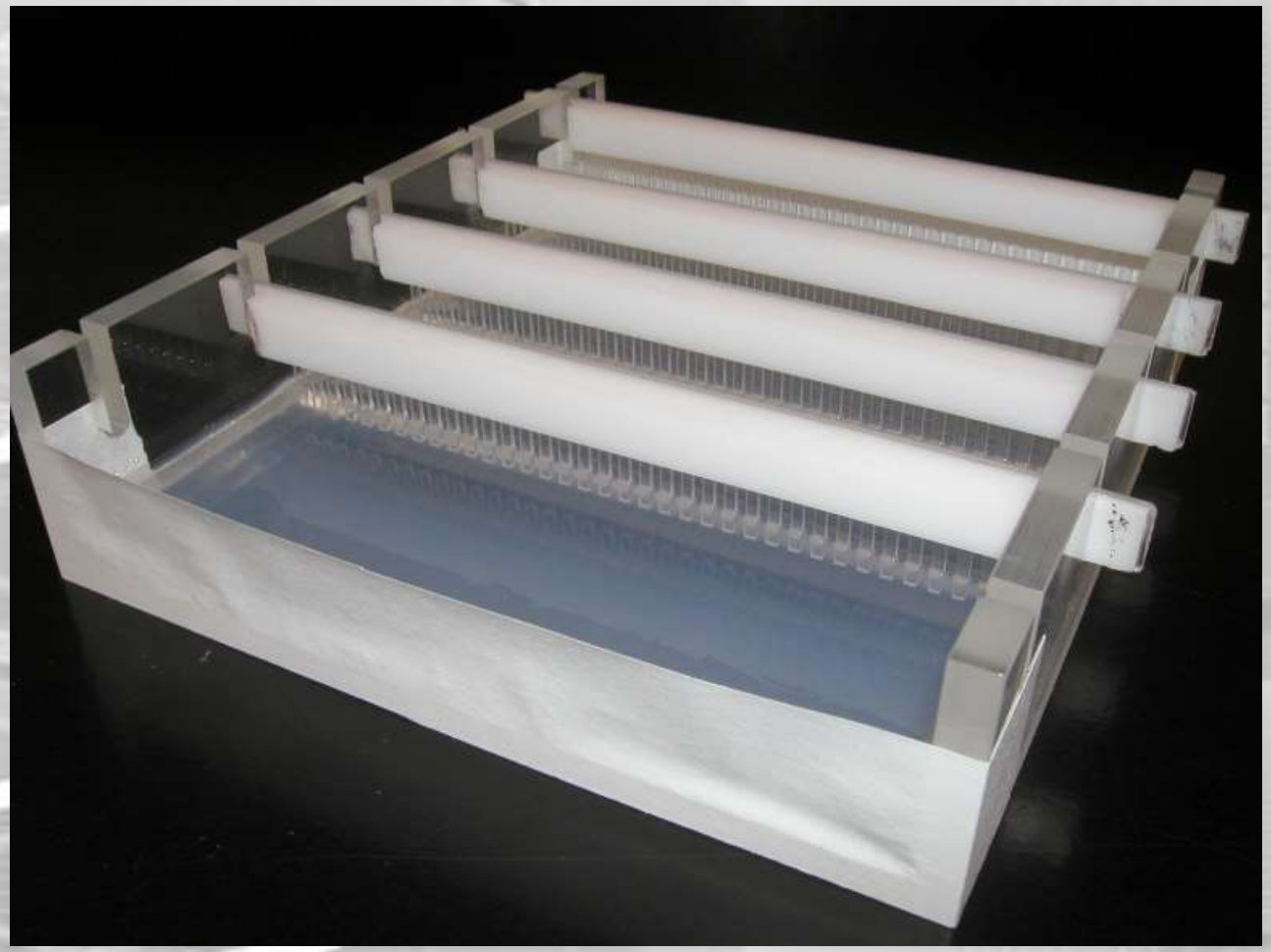


- نلف حواف الطبق بلصق ثم نضع الأمشاط.
- نضع الطبق على سطح مستوي , مع ملاحظة عدم لمس الأمشاط لسطح طبق الرحلان.

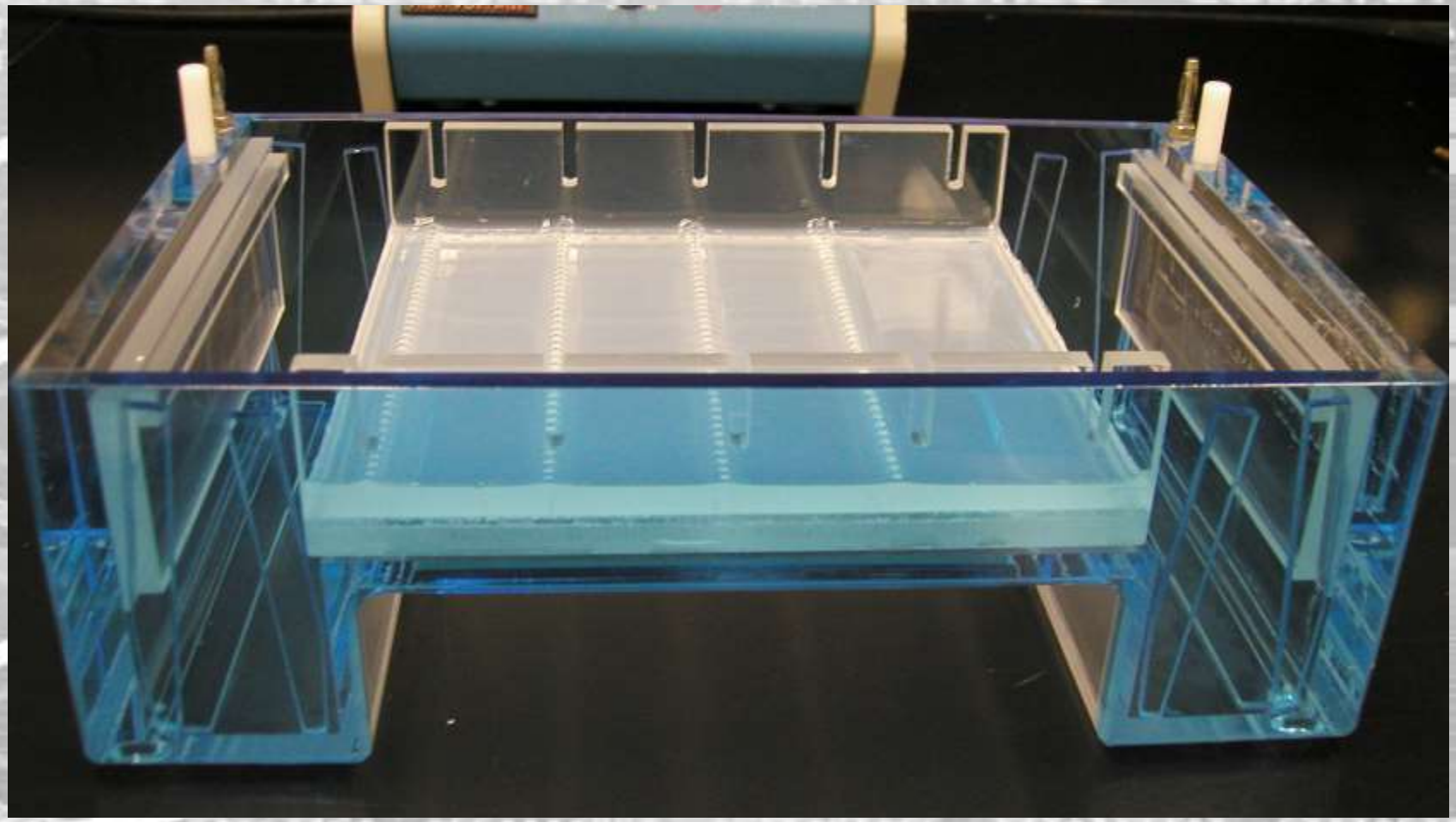
صب الجل



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

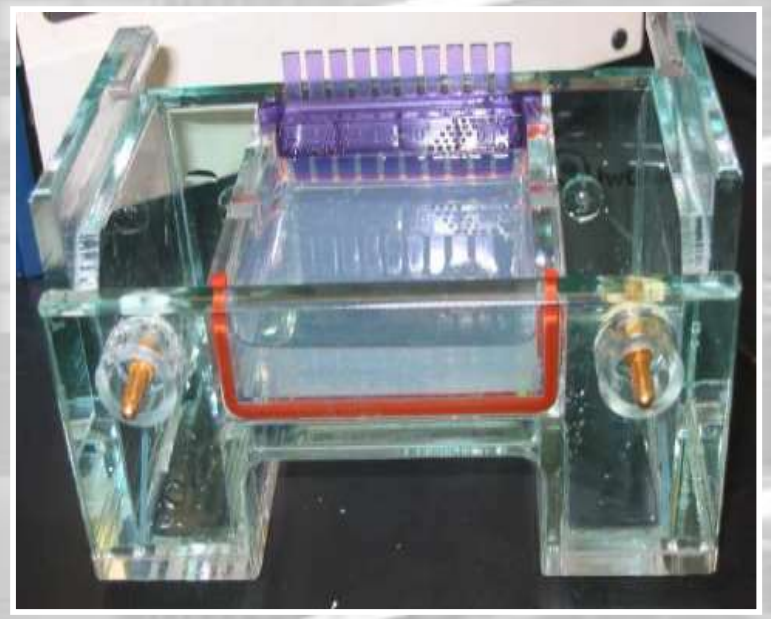


عندما يبرد الأجاروز فإنه سوف يكون جل مرن, وشبه شفاف مقارنةً مع شكله قبل التبريد
أنزع الأمشاط واللصق.



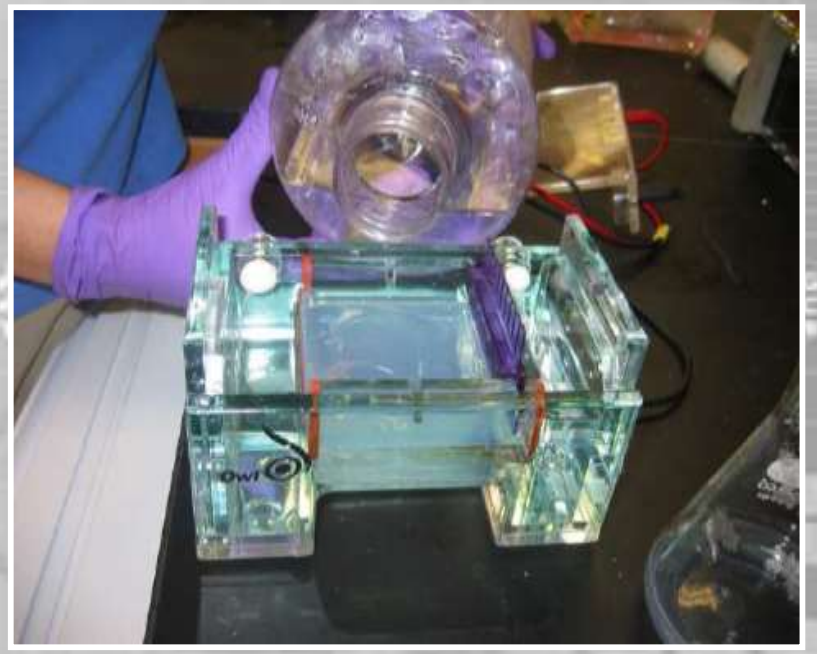
نضع الجل مع الطبق داخل حوض الرحلان الكهربائي.

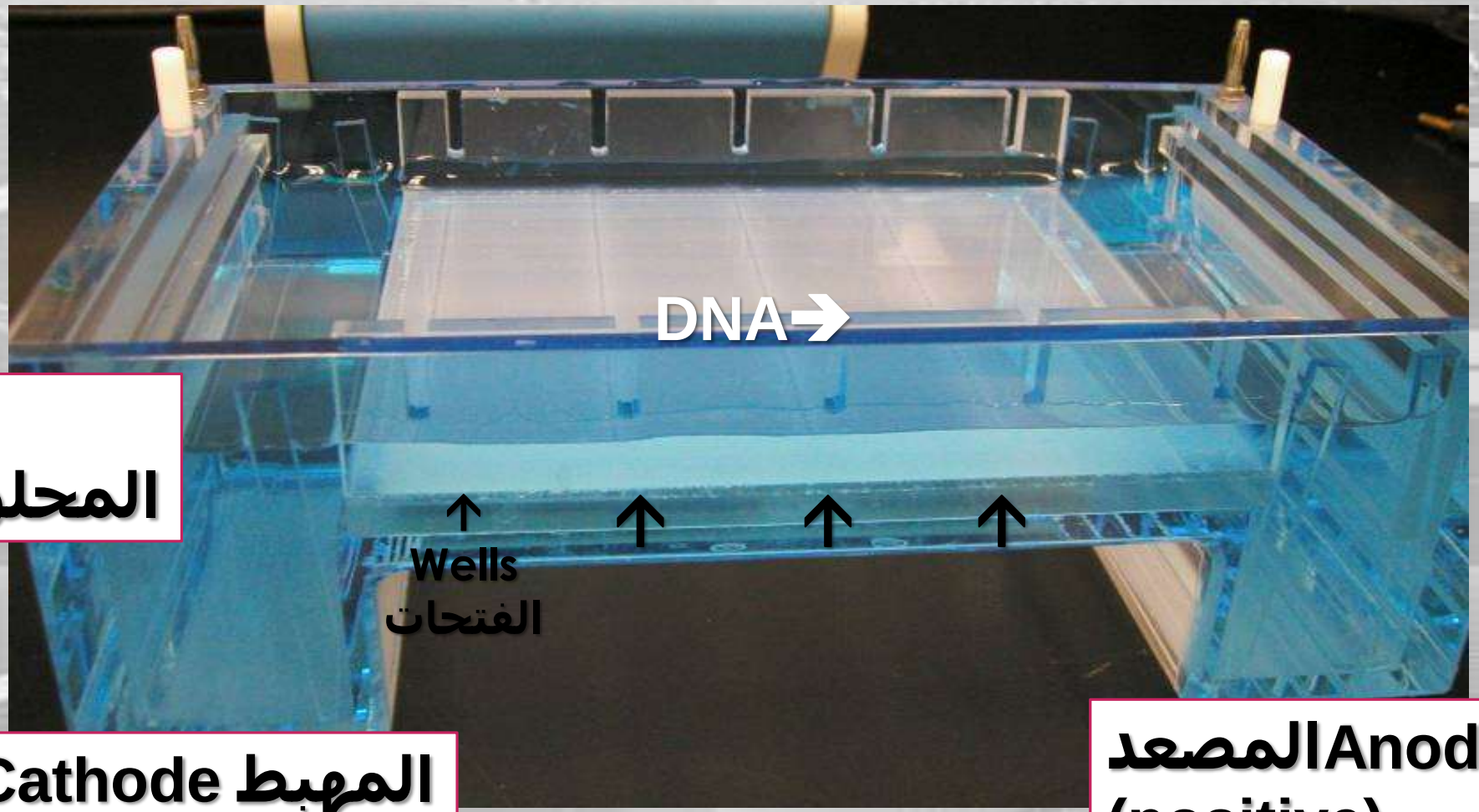
الجل جاهز للإستخدام



- الجل أصبح جاهز.

- يصب الماء في الحاوية .



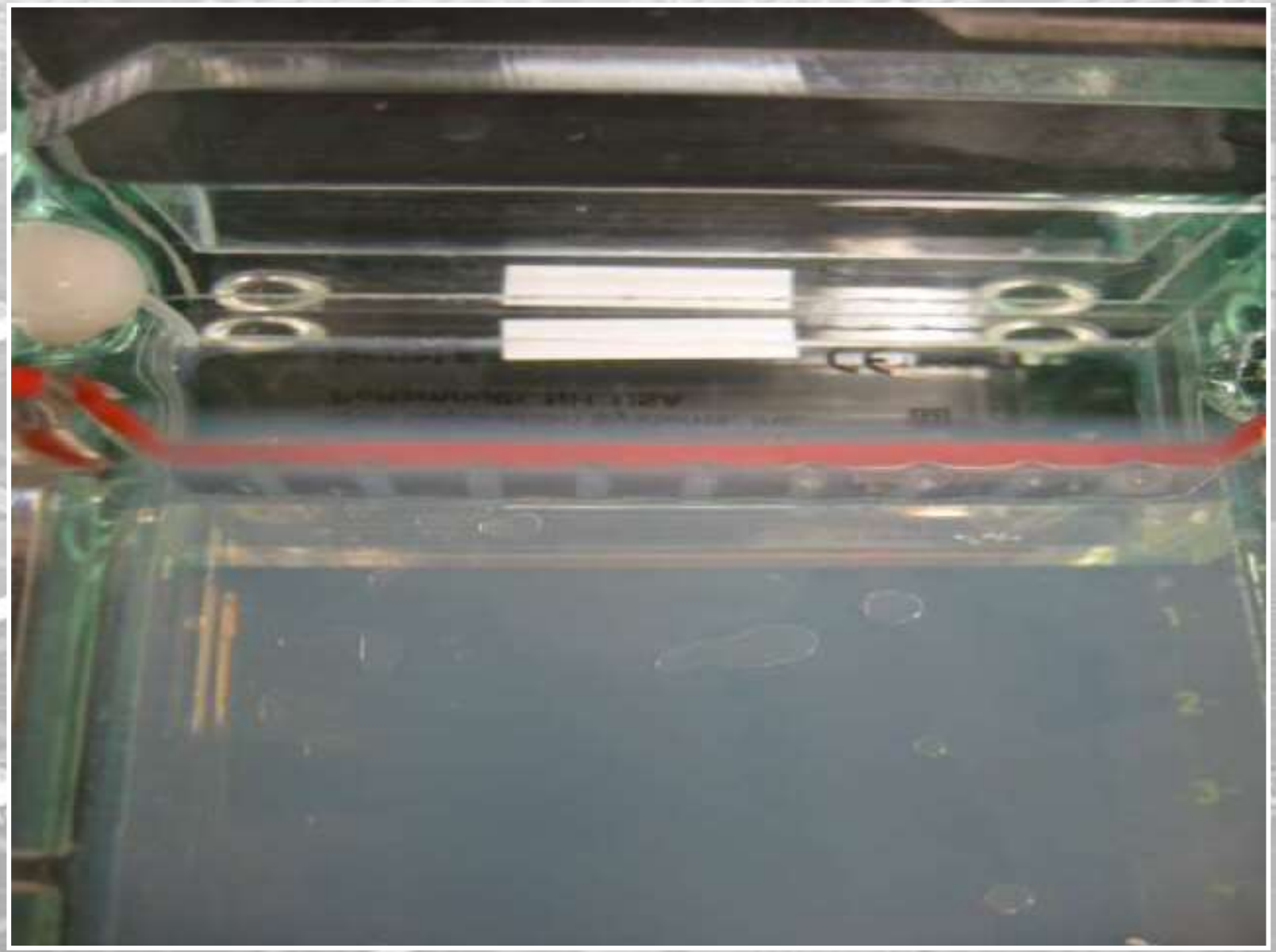


buffer ←
المحلول الدارئ

↖Cathode المهبط
(negative)

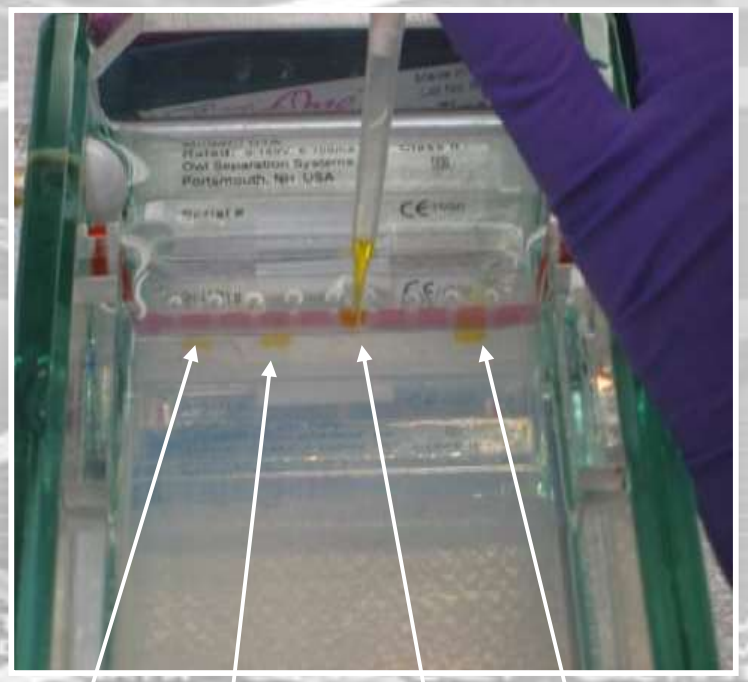
Anode↗المصعد
(positive)

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



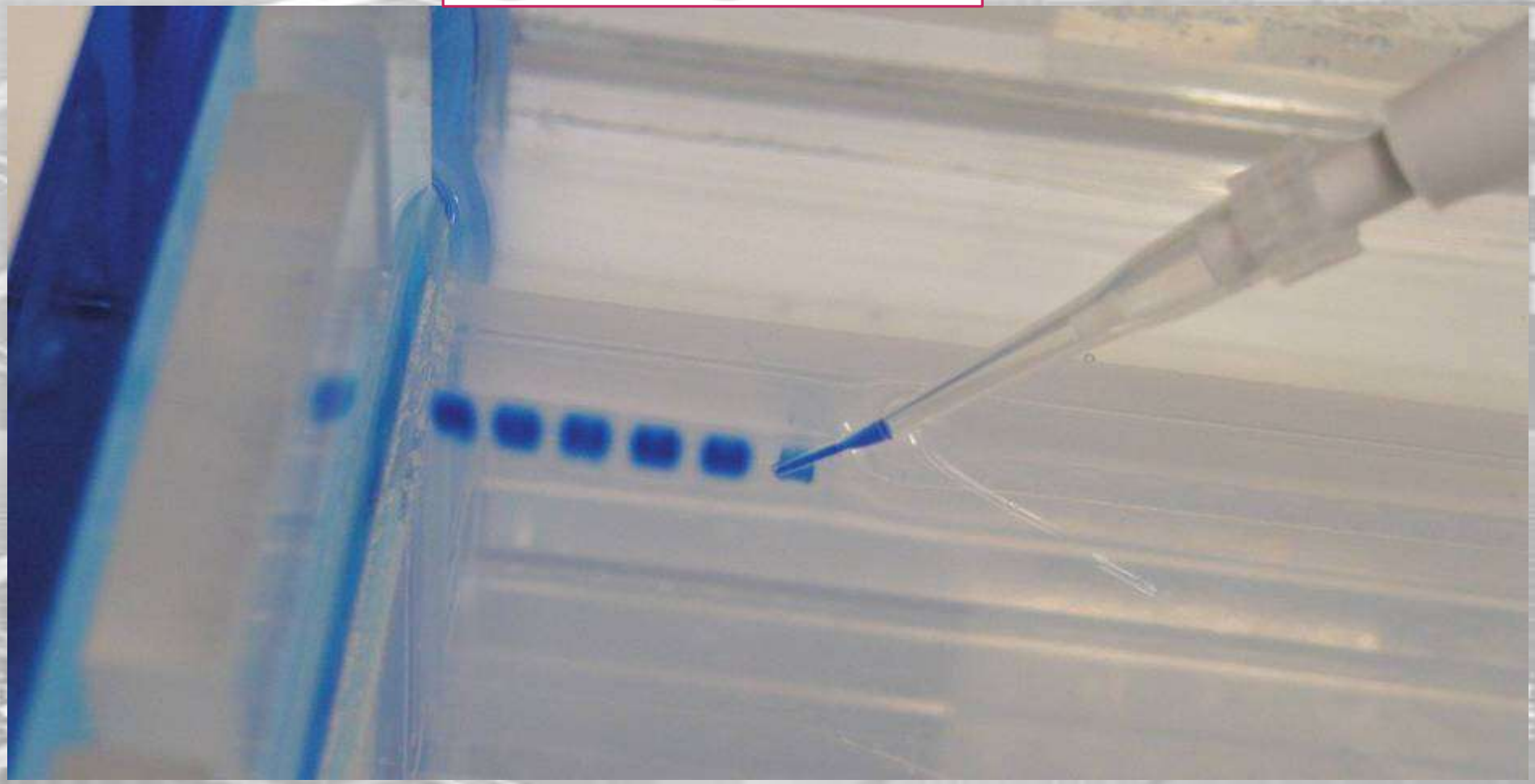
- يـزال الـمـشـط .

تحميل الحمض النووي على الجل
PUTTING DNA ON THE GEL



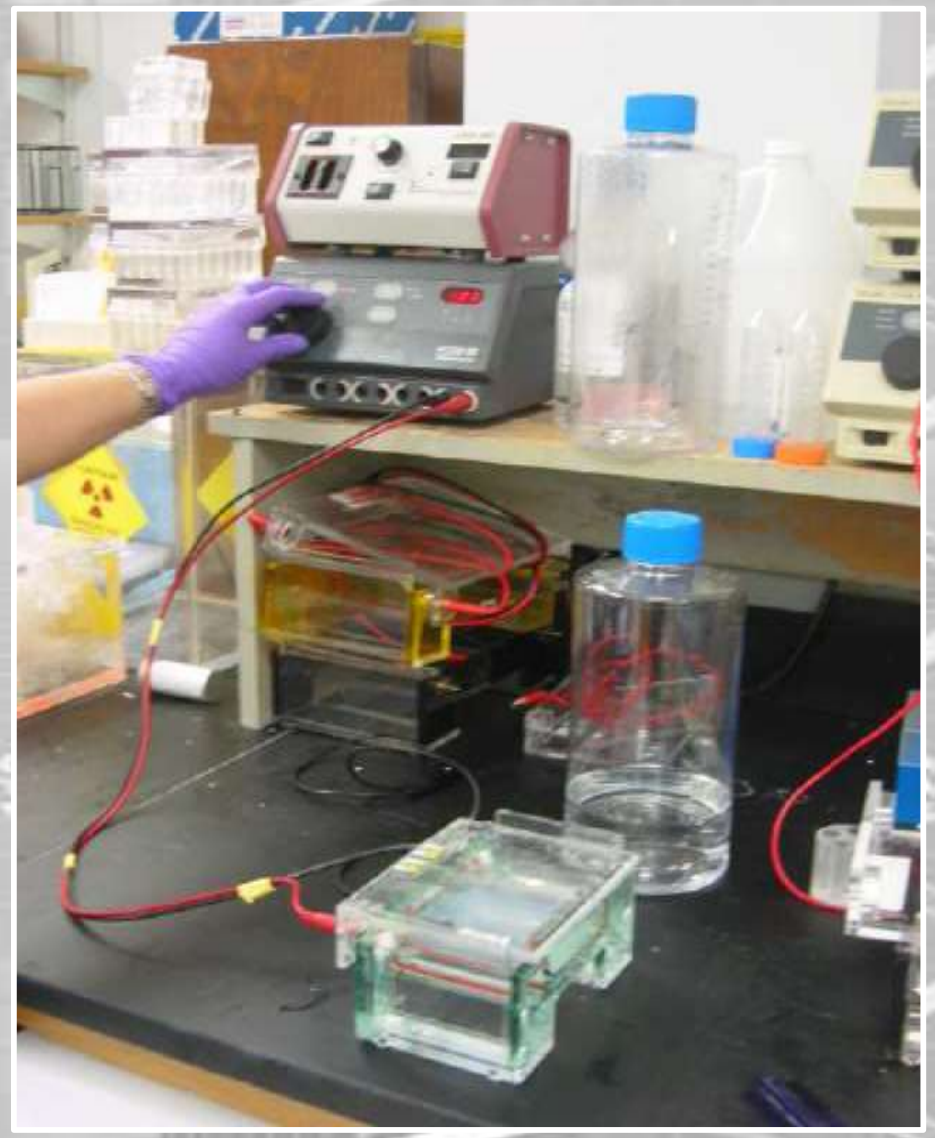
- يخلط الـ DNA مع محلول ملون (مشع) حتى يرى تحت الـ U.V .
- تدخل عينات الـ DNA إلى الآبار .
- وضع محلول يحتوي على قطع من الـ DNA
- تستعمل(called ladder) للمقارنة .

تحميل الجل



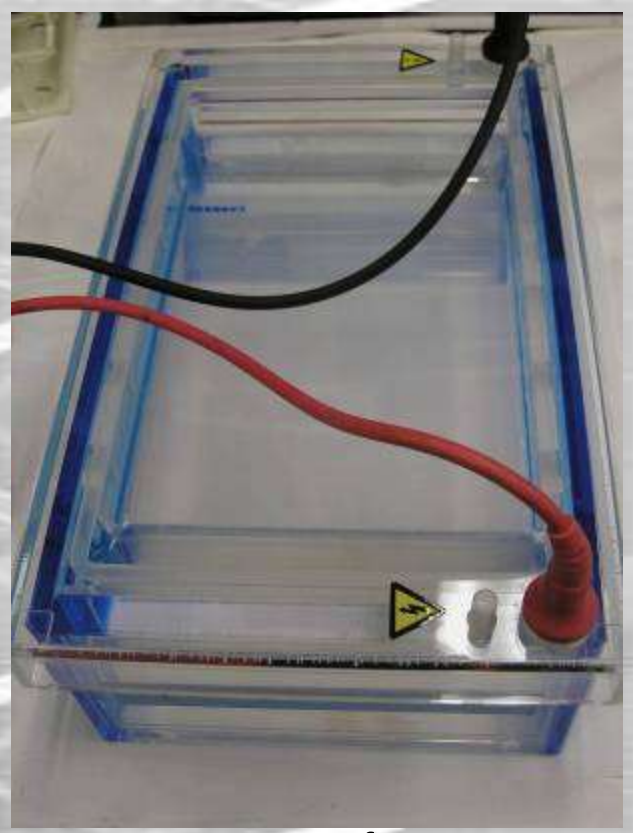
- عينة الدنا في الغالب تكون شفافة, لذلك نمزج معها صبغة (3مايكروليتر + 5 مايكروليتر من العينة).
- بحرص شديد أنزل العينة بالماصة الإلكترونية داخل فتحات الجل.

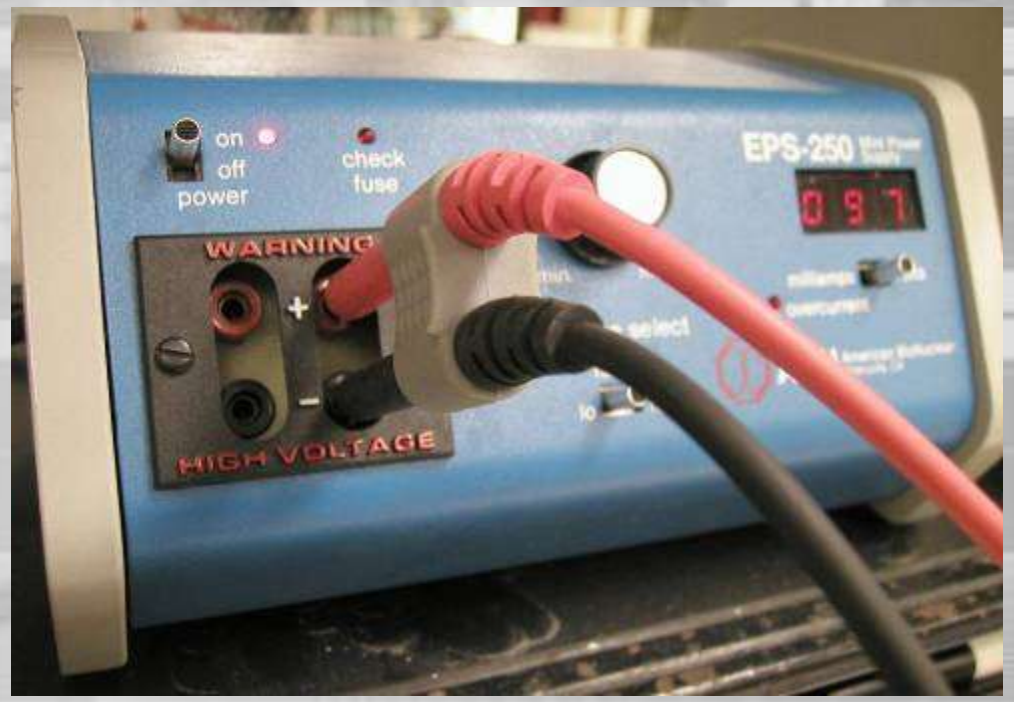
سريان الحمض النووي الجل RUN THE GEL



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

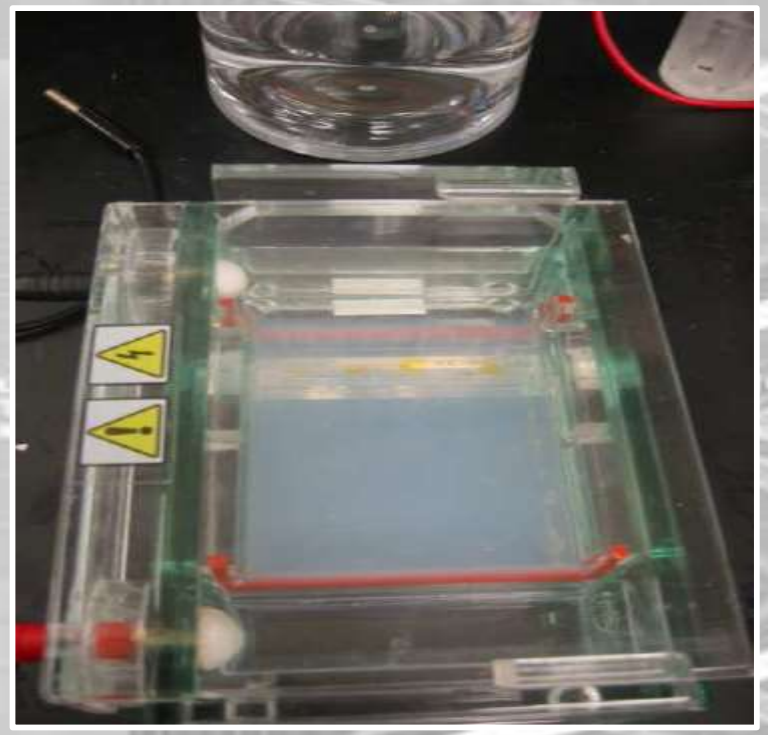
سريان الجل





- 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

حركة الحمض النووي DNA FRAGMENTS MOVE

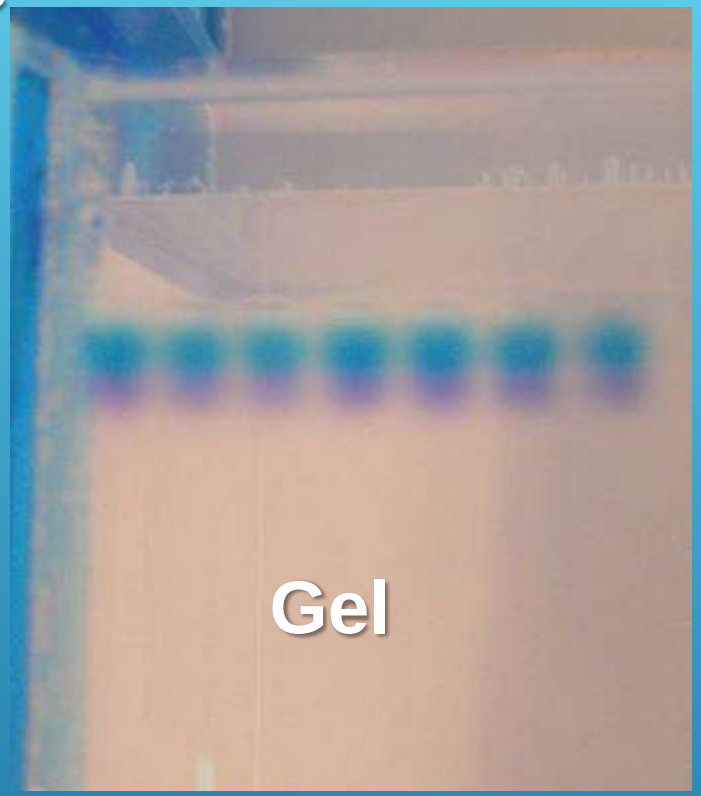


- يوضح لنا المحلول الملون تحرك الـDNA في الجل .

Cathode
المهبط
(-)

DNA
(-)
↓

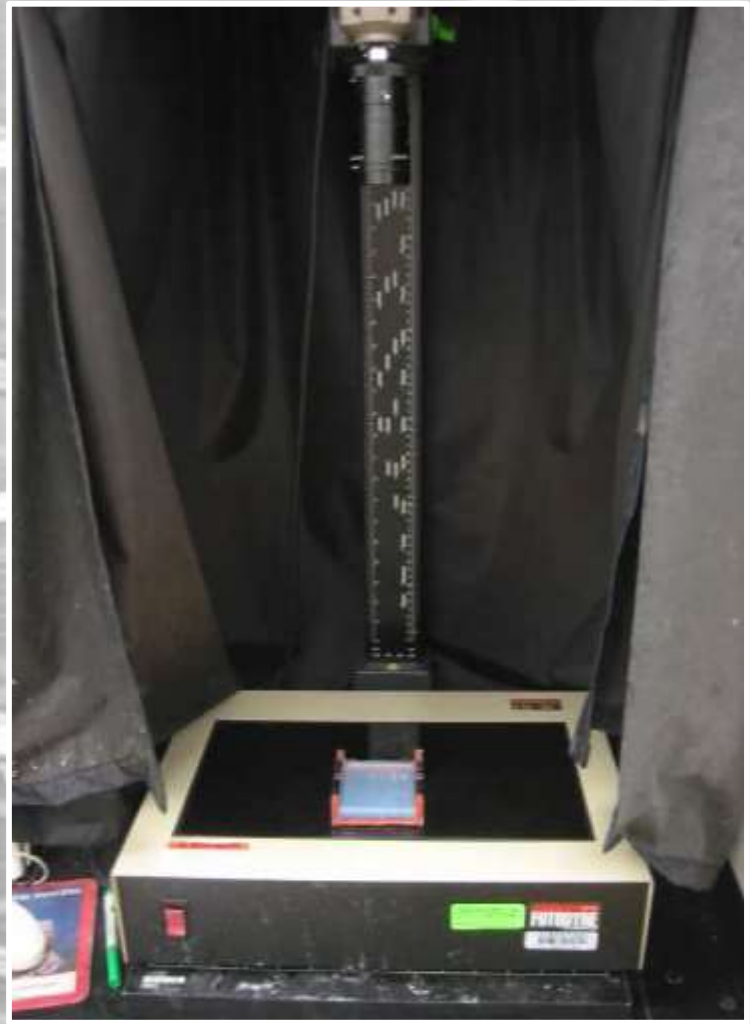
Anode
المصعد
(+)



← Wells الفتحات

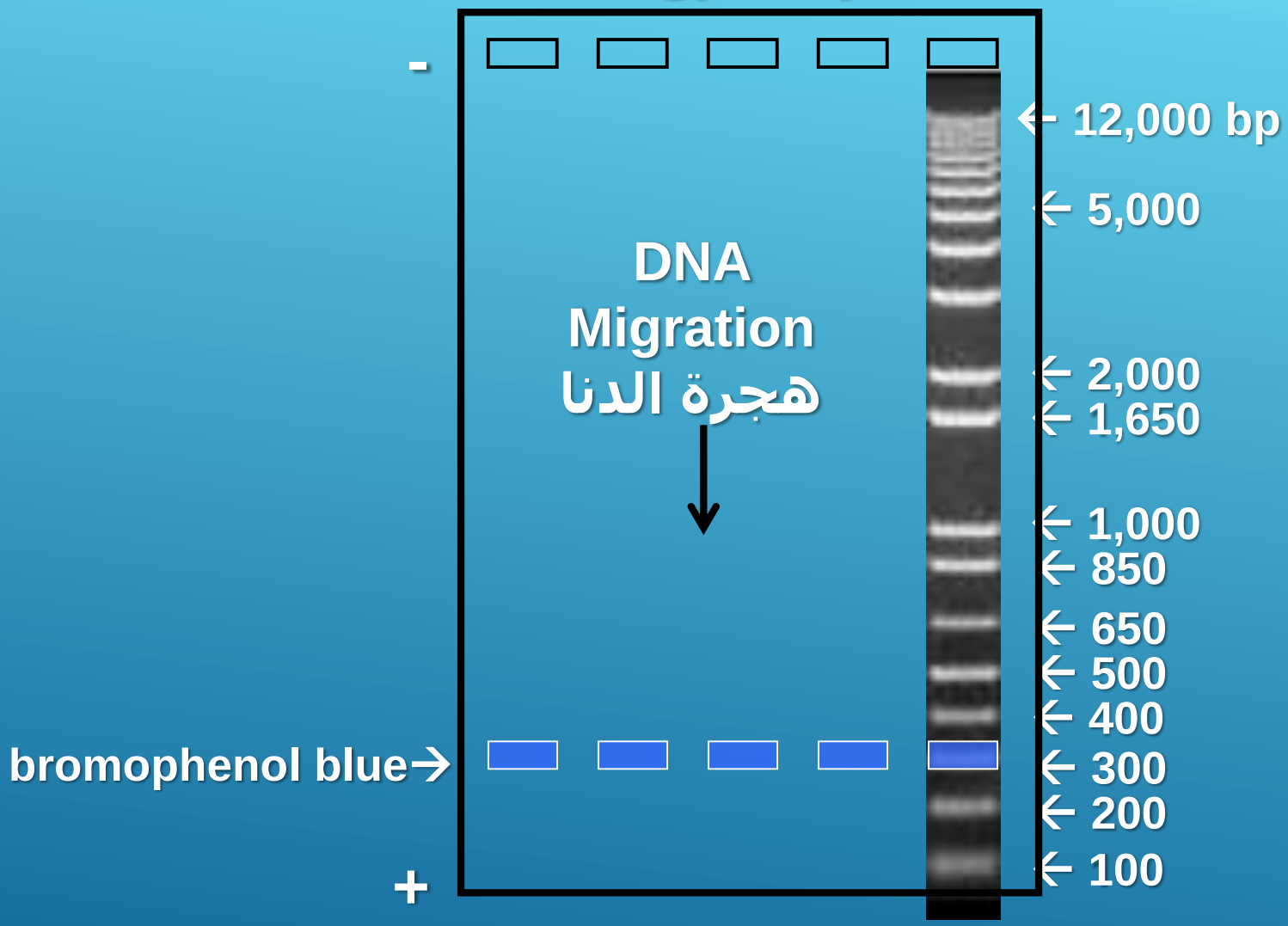
←Bromophenol Blue
الصبغة الزرقاء

المشاهدة VIEWING



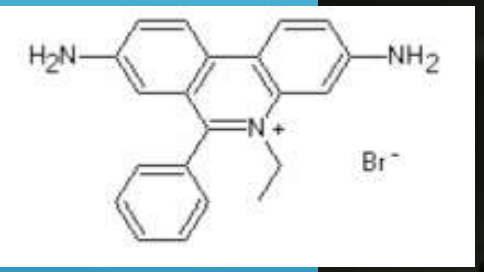
- مشاهدة الجل تحت الـ U.V .

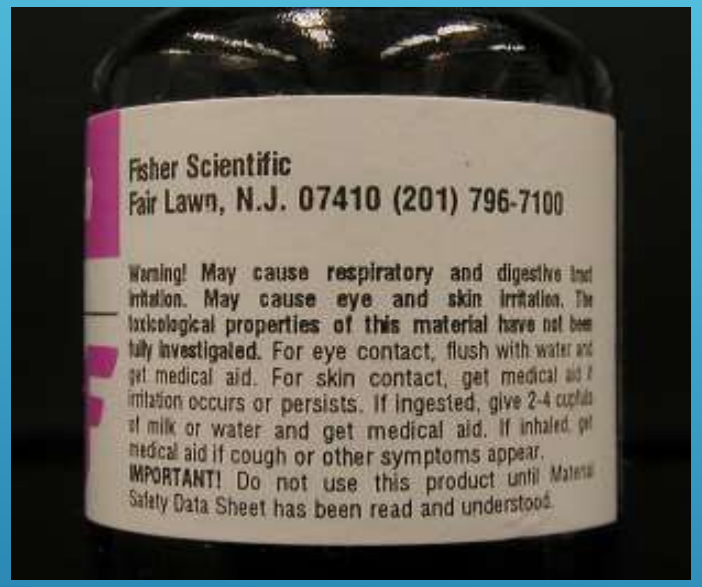
معيار مدرج DNA



الإبقاء على الجل

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





ملاااااااااحظة:-

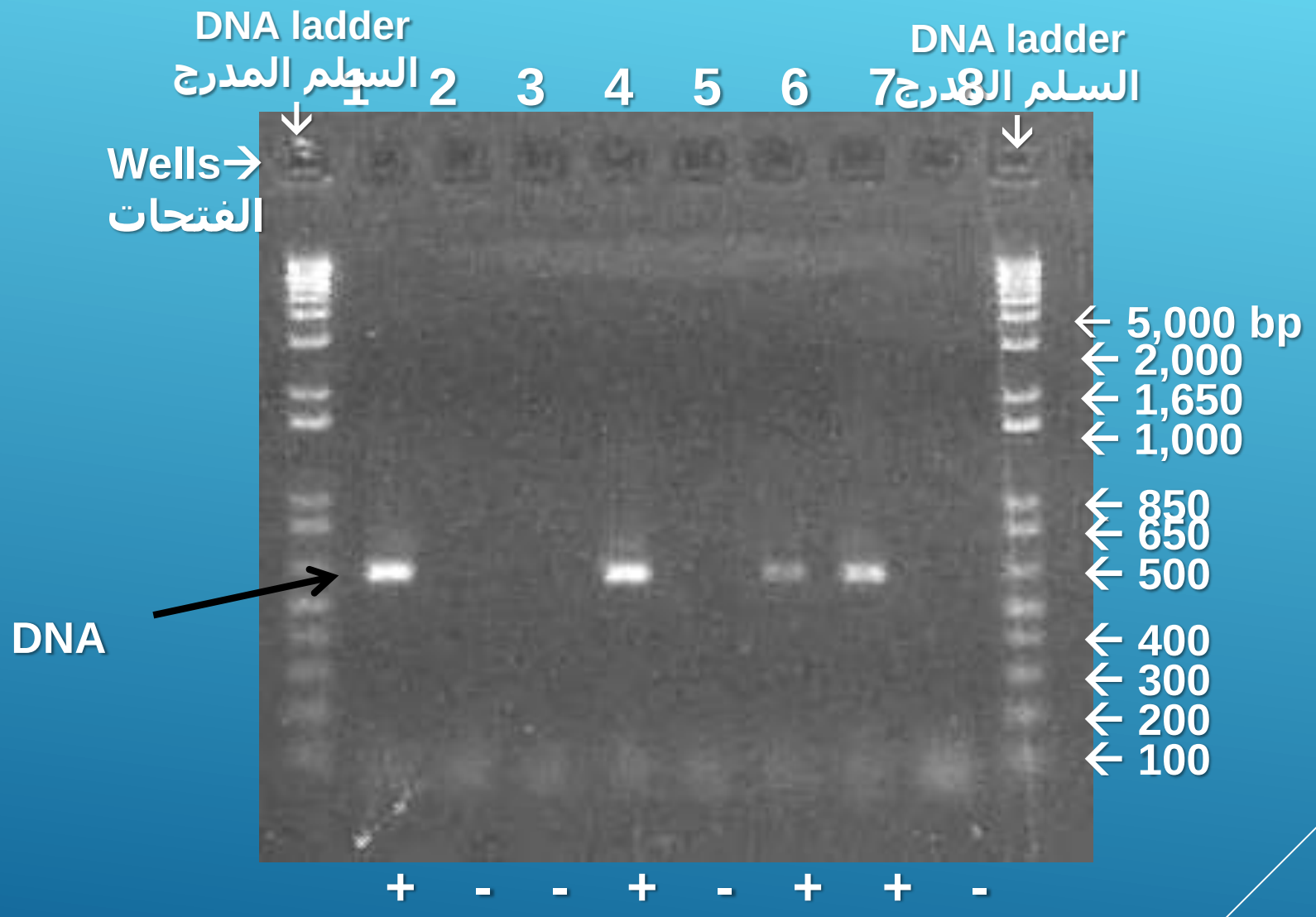
مادة بروميد الإيثيديوم مادة مسرطنة يجب لبس القفازين والحذر في التعامل معها.

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: 1, 4 , 6و7 تظهر بها الحمض النووي الدنا

King Saud University
Department of Botany & Microbiology

GOOD LUCK

أ. أمل الغامدي

أ.شروق الشهراني

أ.رنا التركي