

قياس الأحماض النووية

Nucleic Acids Quantification

الجزء العملي

المحاضرة الخامسة

د. اسامة انور سعيد

قسم الانتاج الحيواني - جامعة الانبار

- الهدف من المحاضرة
- في نهاية المحاضرة سوف يتعلم الطالب
- معرفة اليات تنقية وقياس تركيز الحمض النووي.
- مجالات استخدامها.
- الاليات المتبعة في تحليل DNA.

تقدير تركيز ونقاوة DNA او RNA

- تقدر الأحماض النووية Nucleic acids للتحقق من تركيز ونقاء الحمض النووي DNA او RNA الموجود في العينة.
- من المهم معرفة تركيز ونقاوة الحمض النووي ليسهل استخدامه في تطبيقات أخرى مثل PCR، Restriction digestion.
- التحليل باستخدام المطياف الضوئي Spectrophotometer هو من أكثر الطرق شيوعًا لقياس DNA.
- يمكن استخدام Agarose Gel Electrophoresis لتحليل عينة DNA من أجل النقاء

١. طريقة المطياف الضوئي Spectrophotometric Method

- لقياس DNA او RNA (٢٦٠ نانومتر) اما في حالة قياس تركيز البروتين (٢٨٠ نانومتر) وتكون نسبة النقاوة (٢٨٠/٢٦٠).
- نسبة (٢٨٠/٢٦٠) تعطي مؤشر على نقاوة العينة بالتالي فان المحاليل النقية DNA او RNA بقيمة الكثافة الضوئية للطولين الموجيين ٢٦٠ مقسوم على ٢٨٠ وهي ١.٨ DNA و ٢ RNA وتقل القيمة في حالة وجود ملوثات لعينة الحامض النووي كالبروتينات وغيرها عن تلك القيم.

٢. طريقة NanoDrop

- احدث نسخ موجودة لهذا الجهاز NanoDrop 8000, NanoDrop Lite NanoDrop 2000/2000c بمعدل تركيز (2 ng/μL – 15,000 ng/μL dsDNA) بدون تخفيف للعينة.

٣. طريقة Agarose Gel Electrophoresis

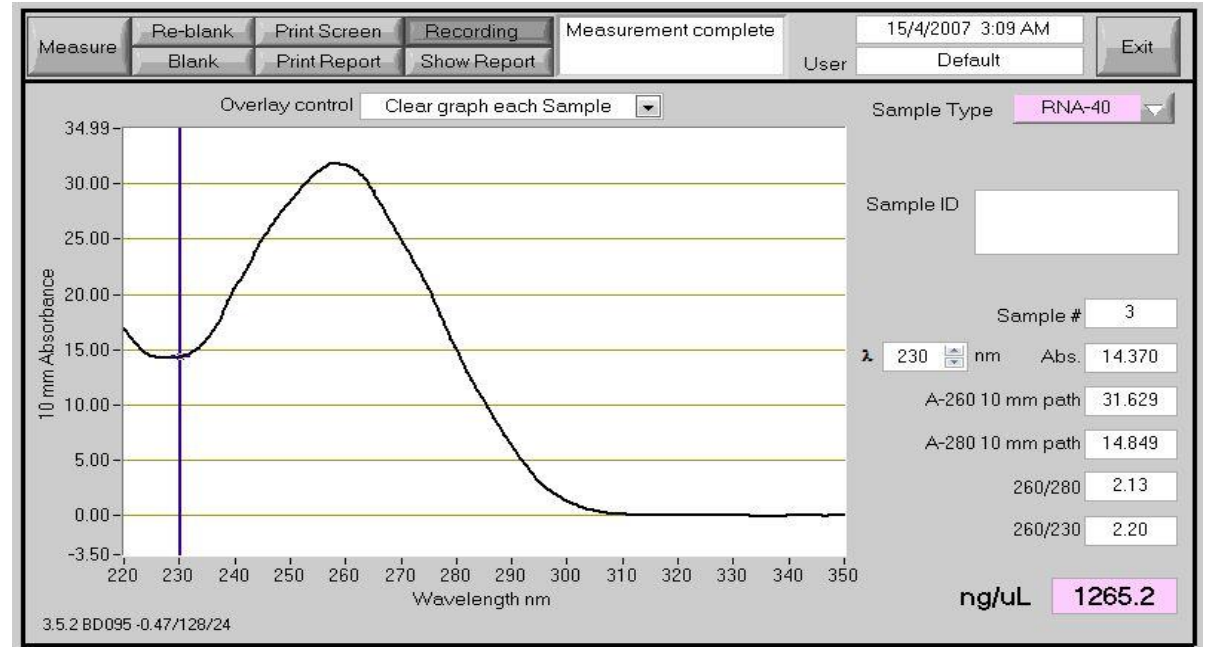
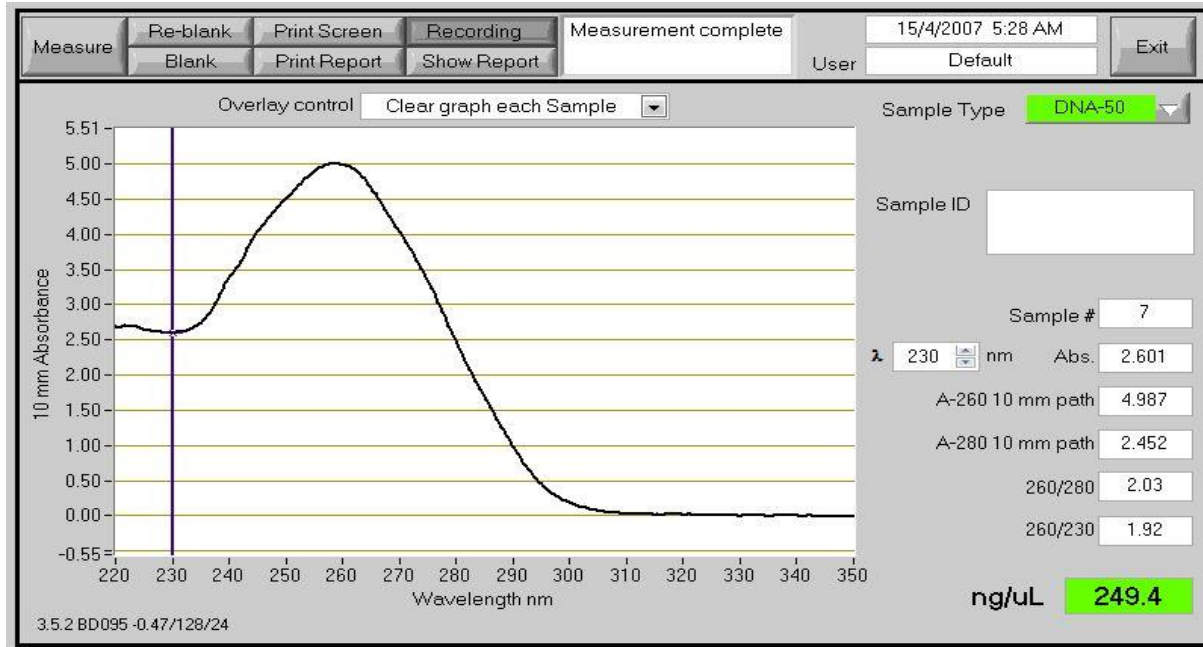
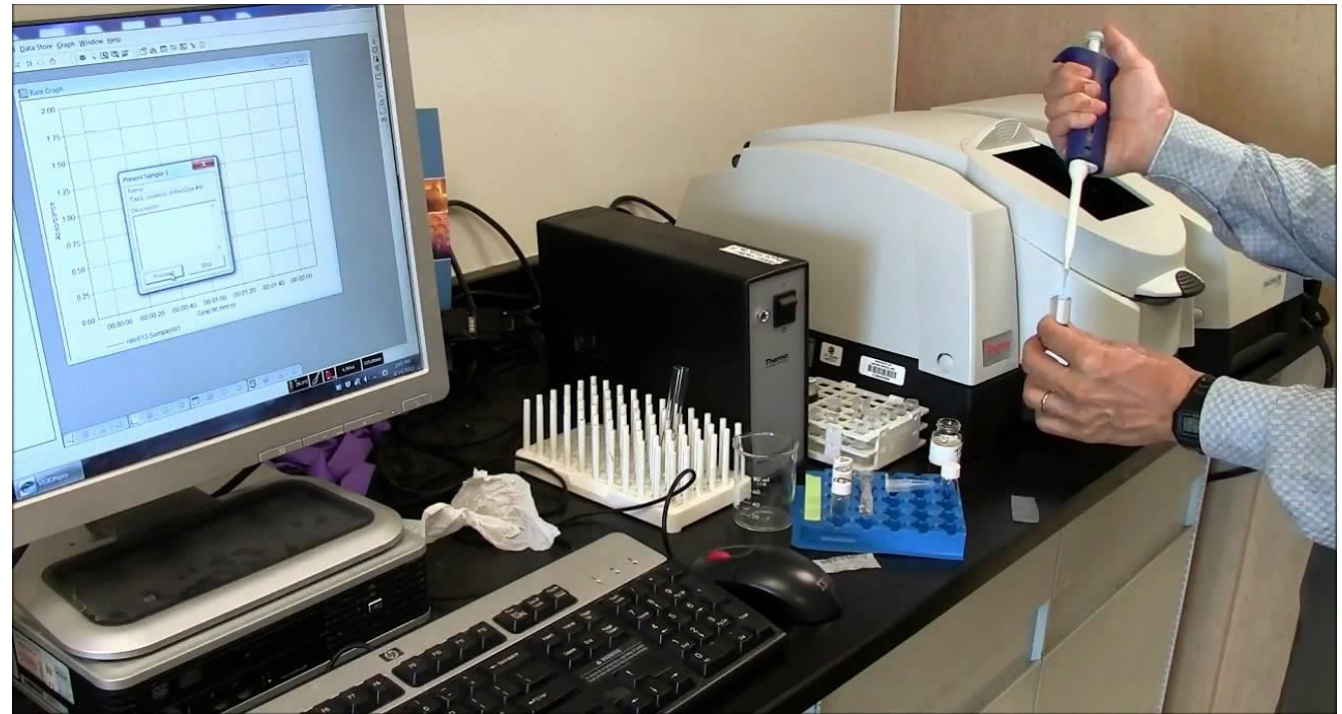
وهي طريقة تستخدم لفصل الأحماض النووية بناءً على حجمها تحت تأثير التيار الكهربائي وبما أن الأحماض النووية تحمل مشحنة سالبة عند تطبيق المجال الكهربائي تنتقل من الكاثود Cathode إلى الأنود Anode اعتمادًا على حجم جزيئة الحمض النووي المطلوب تحليله الذي يمكن تحضير تركيز جل مناسب يعمل كمنخل sieve لفصل الأحماض النووية بناءً على حجمها.

٤. طريقة القياس باستخدام Agarose Gel

يمكن تحليل نقاء العينة باستخدام هذه الطريقة حيث يمكن إزالة الملوثات من DNA / RNA في بعض الاحيان.



NanoDrop 2000/2000c



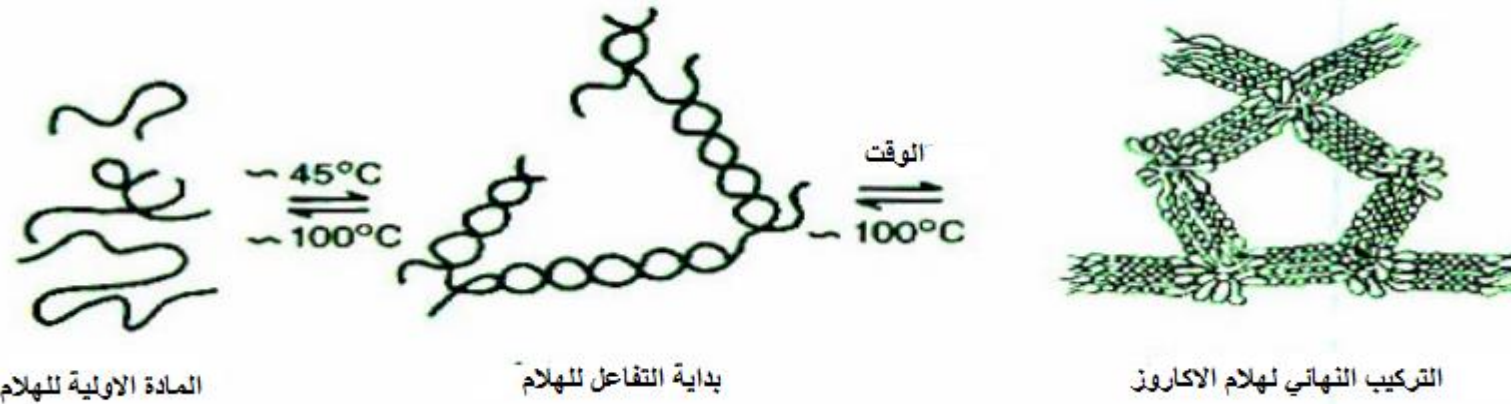
Required Instruments الأجهزة المطلوبة

- Laboratory drying oven
- Autoclave
- Micro-centrifuge
- Safety cabinet class II
- PCR Thermo-cycler
- Electrophoresis set
- UV documentation system
- Bacterial growth incubator
- Shaker
- UV/VIS Spectrophotometer
- Refrigerator (-20c and 4c)
- Compound light microscopes
- Microscope station

- Vortex mixers
- Hotplate and magnetic stirrers
- Micropipettes and tips
- Balances (Analytical and Digital)
- Incubator Shaker
- Ice Maker Machine
- Water Distiller
- pH Meter

أنواع الهلام المستخدم في الترحيل الكهربائي Agarose Gel

هلام الأكاروز Agarose Gel يستخدم بشكل واسع في هذه التقنية عبارة عن سلسلة متشابكة من السكريات المتعددة المكونة من الكالكروز ومشتقاته والمرتبطة مع بعضها بأواصر هيدروجينية لتكوين شبكة معقدة Complex Net تعتمد فتحاتها Pores على تركيز الأكاروز فكلما كان التركيز عاليا كلما كانت الفتحات اصغر والعكس صحيح، يتضح من ذلك ان قابلية الهلام على فصل القطع تعتمد على تركيزه فكلما زاد التركيز كلما زادت قابلية الفصل. إن تركيز هلام الأكاروز يتراوح بين ٠.٥ - ٢ % وبطول ١٢ سم ، والأكثر استخداما" هو ٠.٧ - ١ % والذي يستخدم لفصل قطع DNA كبيرة الوزن الجزيئي 20Kbp-200bp



تشغيل الجهاز الترحيل Electrophoresis

- يوضع غطاء الخزان بالشكل الصحيح لضمان الترحيل من القطب السالب الى القطب الموجب ويتم تشغيل جهاز القدرة Power Supply على فولتية 45 V وامبيرية 180 Mili-amber ولمدة 15 دقيقة كمرحلة اولى.
- بعد انتهاء ال 15 دقيقة نسمع صوت المنبه من جهاز القدرة، نعدل الفولتية الى 80 V وامبيرية 180 Mili-amber ولمدة ساعة.
- يتم مراقبة سير الترحيل من خلال حركة صبغة ال Bromophenol blue كمؤشر



تحضير قاعدة الكاسيت والمشط



سكب محلول الهلام في الكاسيت



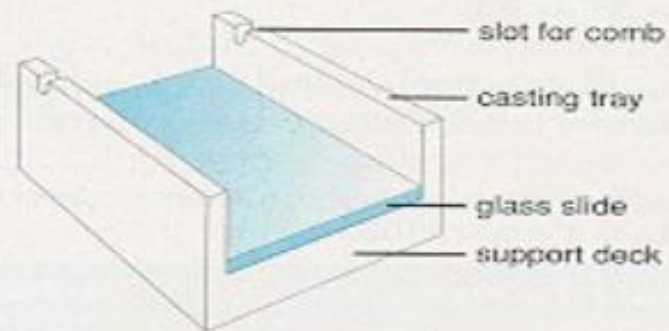
وضع Mastermix داخل الثقوب بعد رفع المشط بشكل عمودي



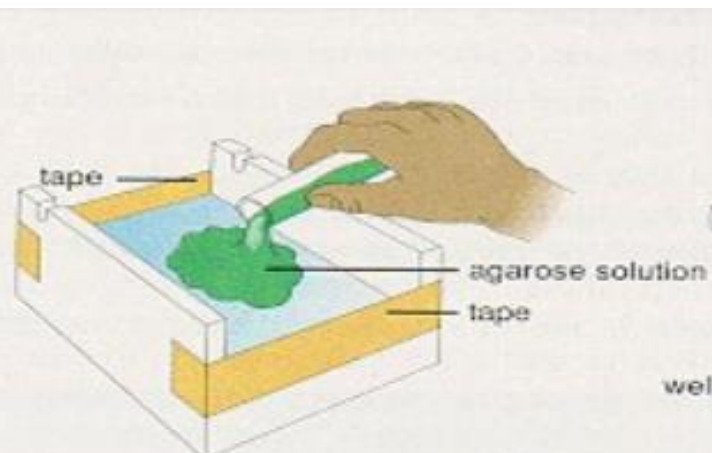
تشغيل جهاز الترحيل الكهربائي



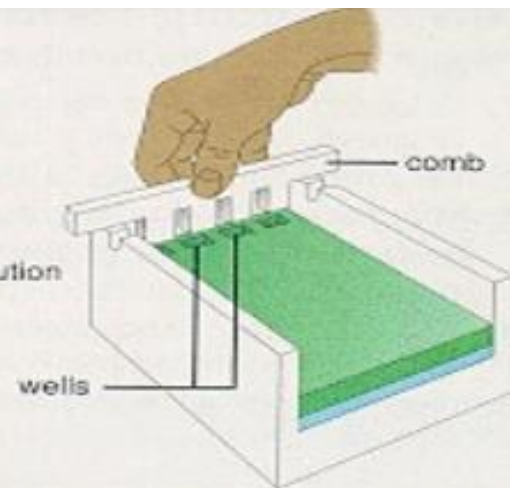
بعد انتهاء وقت التصبيغ ينقل الهلام برفق من حوض التصبيغ إلى Stage جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV Transiluminator ويوضع غطاء الجهاز ثم يشغل.



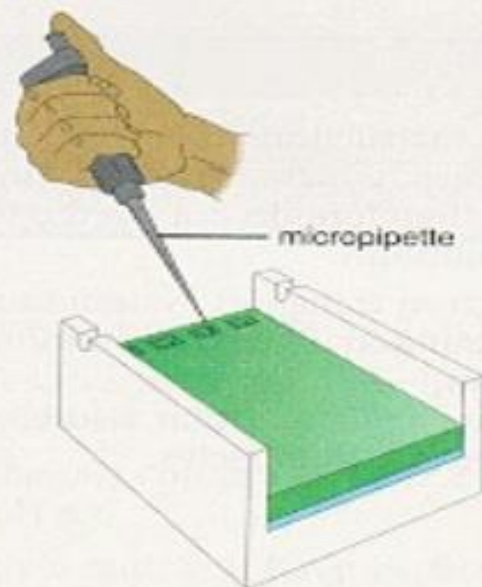
a. Casting tray for making gel slab



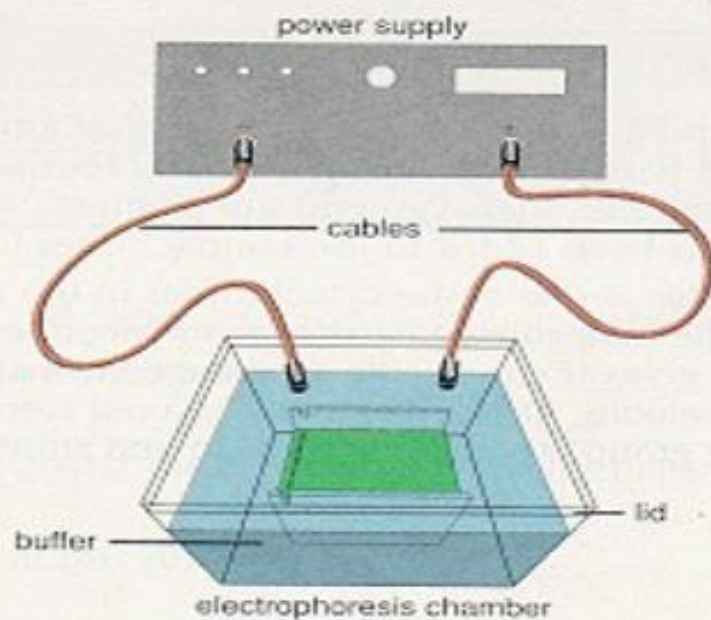
b. Agarose solution poured into casting tray



c. Comb that forms wells for samples

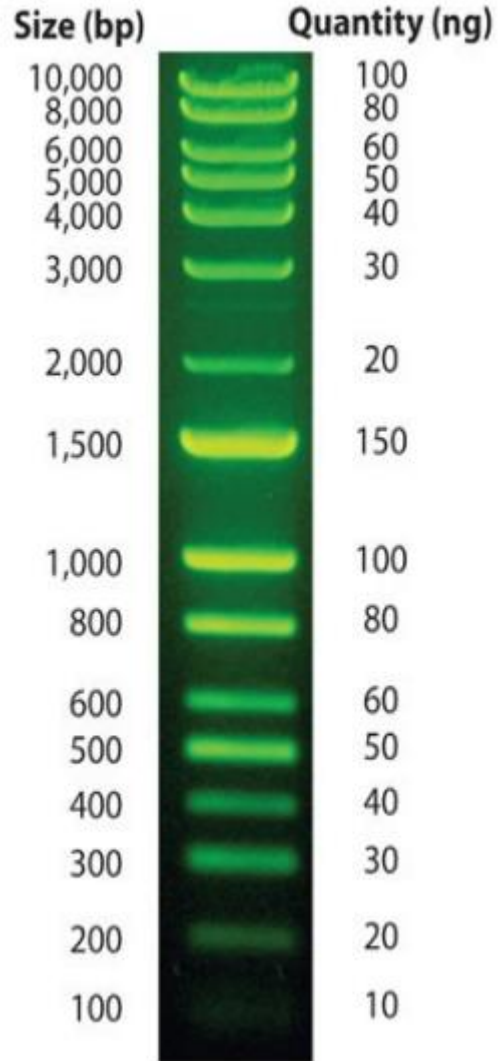


d. Wells that can be loaded with samples

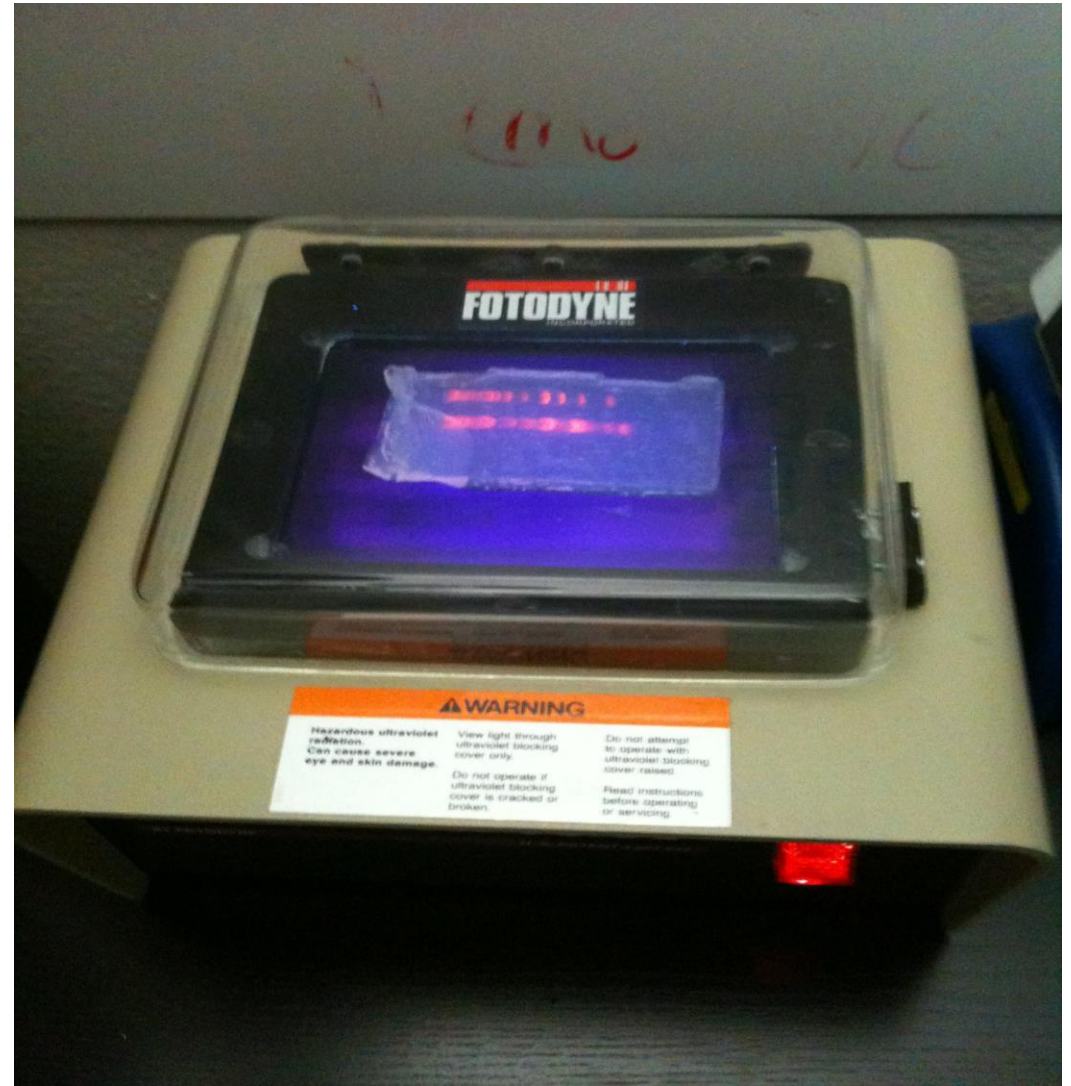
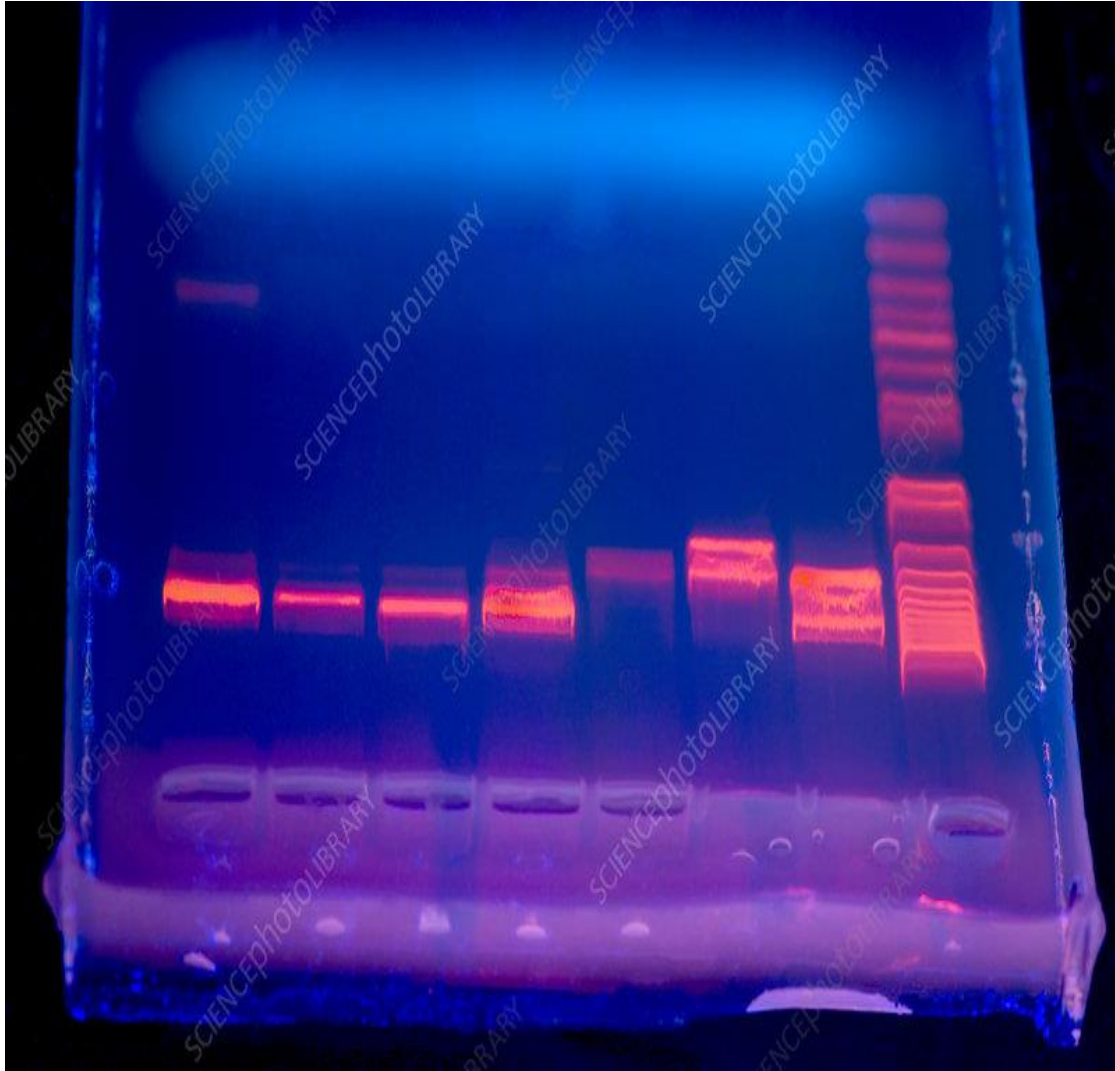


e. Electrophoresis chamber and power supply

DNA ladder



- عبارة معيار لقياس أطوال مختلفة لجزيئات DNA
- يتألف DNA Ladder من أحجام (size) DNA معروفة تُستخدم لتحديد حجم عينة DNA المراد دراستها.
- عادة ما يحتوي سلم الحمض النووي على عينات ذات حجم متباعد بانتظام والتي عند تشغيلها على هلام الاكاروز والتي تبدو مثل السلم



Agarose gel with DNA ladders on a UV transilluminator

Get the reagents



Prepare the mix



Set up conditions



Analyze the gel



Negative result



Cry



- عدد الطرق المستخدمة في تقدير تركيز الاحماض النووية؟
- ماهو هلام الاكاروز؟

المصادر

- Payne, D. A. (2016). Basics of Molecular Biology. In *Molecular Pathology in Clinical Practice* (pp. 1-17). Springer, Cham.
- قازانجي، محمد عمر؛ جبر، حميد عبود. (٢٠١٧). علم الحياة الجزيئي. الطبعة الاولى. جامعة بغداد، كلية الزراعة. الدار الجامعية للطباعة والنشر والترجمة.
- مصطفى، نشأت غالب. (٢٠١٨). البيولوجي الجزيئي. الطبعة الاولى. دار الكتاب الجامعي.

Thank You