الجزيئي الحياة علم
عملي الثالثة المحاضرة

الرابعة المرحلة

رجب هيثم .د العملي المادة مدرس
م.د عزيز حسن صالح

النووية الاحماض ونقاوة تركيز قياس

المستخلص DNA لل- والنوعي الكمي التقدير الى نحتاج لماذا / س

هو DNA الـ استخلاص عملية بعد بها القيام الواجب العمليات اهم من والتي اولاً الاستخلاص عملية كفاءة لتقييم وذلك والنقاوة التركيز قياس الـ استخلصنا اجلها من التي اللاحقة بالعمليات نستمر أساسها على من وغيرها PCR , Fingerprinting , Sequencing مثل DNA DNA الـ كون حالة في الاستخلاص عملية إعادة يتم قد او العمليات المطلوب بالمستوى ليست ونقاوتة تركيزه

والنقاوة التركيز لقياس المستخدمة الطرق

1. بواسطة : الامتصاصية الطريقة او الضوئية الطيفية الطريقة Nano drop و Spectrophotometer

2. Agarose gel : الاكاروز هلام في الكهربائي الترحيل طريقة Electrophoresis

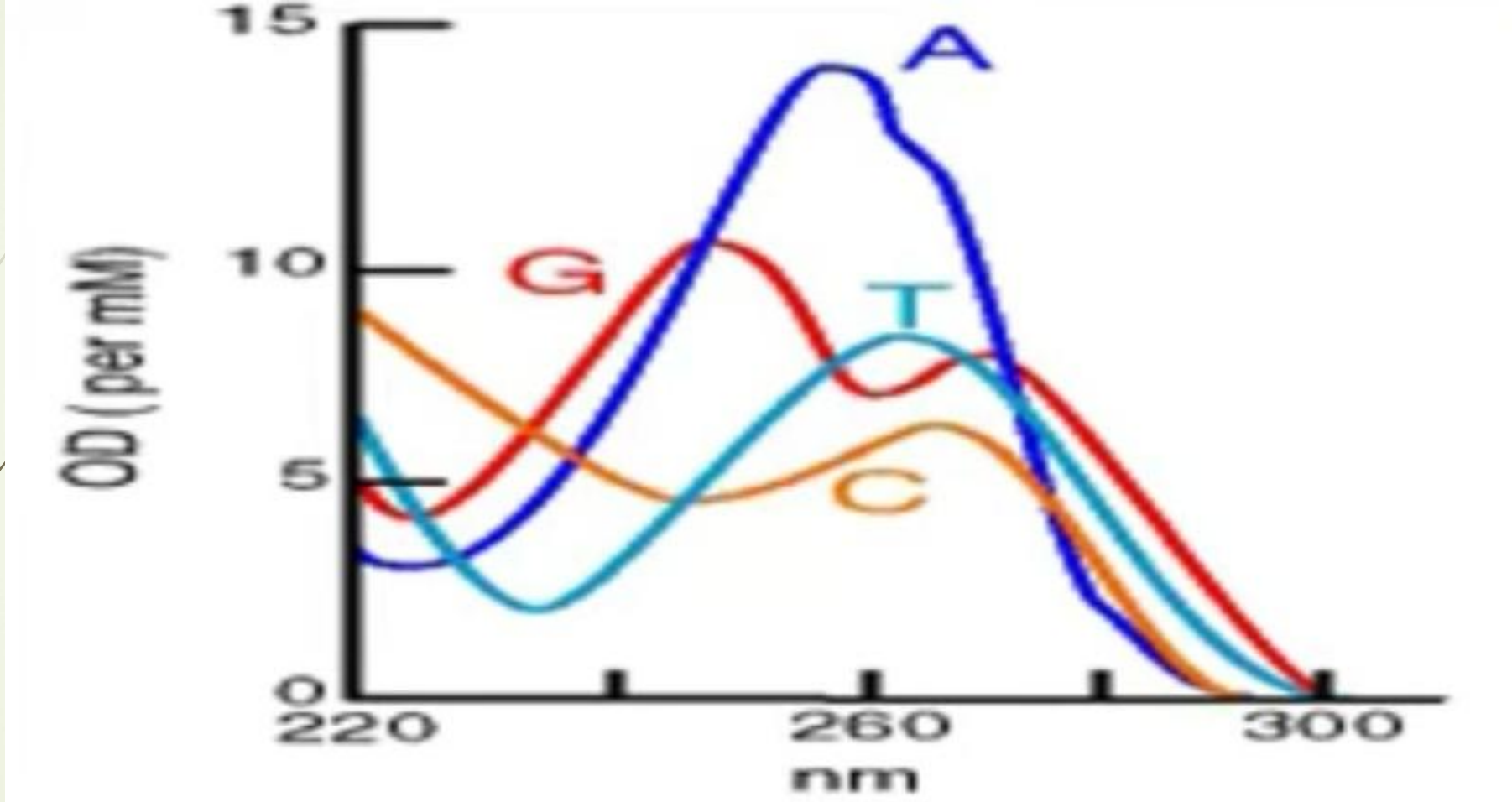
1. بواسطة : الامتصاصية الطريقة او الضوئية الطيفية الطريقة Nano drop و Spectrophotometer

المطياف جهاز يستعمل اذ السهلة الطرق من وهي Nano drop النانودروب جهاز او Spectrophotometer كمية قياس هو عملها أساس لان بينها فيما تختلف لا الأجهزة هذه ان فوق للاشعة امتصاصة طريق عن الموجودة النووي الحامض نانوميتر 280 و 260 طولها بموجات البنفسجية

امتصاص على النووية الاحماض قدرة على الطريقة هذه تعتمد أي موجي طول عند RNA و DNA لل- امتصاصية افضل لوحظ اذ الضوء نانوميتر 260

النووية الاحماض ونقاوة تركيز حساب يتم الخاصية هذه خلال من

الـ لتركيب المكونة النتروجينية القواعد ان التجارب خلال من لوحظ على القدرة لها النتروجينية القواعد هذه A,G,C,T/U وهي DNA القدرة لهما ليس والسكر الفوسفات مجموعة حين في الضوء امتصاص بينها فيما تختلف الأربعة النتروجينية القواعد وان الضوء امتصاص على طول بمعدل الضوء امتصاص على القدرة لها جميعها وان بسيطاً اختلافاً نانوميتر 260 موجي


15
10
5
0
OD (per mM)
A
G
T
C
220
260
300
nm

* امتصاص على المحلول هذا قدرة زادت المحلول تركيز زاد كلما خلاله من المار الضوء

* الاتية المعادلة من DNA الـ تركيز يحسب سهولة بكل :

Unknown (µg/ml) = OD260 unit x dilution factor x 50 µg/ml

OD260 = Optical density

يختلف ولكن RNA الـ تركيز لقياس السابقة المعادلة نفس وتستخدم 40 يكون حيث الثابت

تركيز بحساب نانوميتر 260 موجي طول على الامتصاص قراءة تقابل (OD) الضوئية الكثافة من واحد كل بان العينة في النووي الحامض 40 وحوالي المضاعفة DNA لسلاسل مل / مايكروغرام 50 حوالي المفردة RNA لسلاسل مل / مايكروغرام

1. طريقة العمل لجهاز Spectrophotometer

1. عينة تخفيف الـ DNA محلول باستخدام Nuclease free water
يتم حيث مرات 10 DNA الـ عينة تخفيف اردنا اذا مثال اخر محلول أي او المحلول من مايكروليتر 900 الى ويضاف DNA الـ من 100 µL اخذ التخفيف عامل ان أي مرات 10 مخففة عينة على تحصل سوف وبالتالي 10 يساوي (dilution factor)

2. استخدام محلول التخفيفNuclease free water لتصفير كبلانك
لتصفير المحلول ان أساسي شرط وهذا Spectrophotometer جهاز قياسه المراد DNA الـ على الحاوي المحلول نفس هو الجهاز

3. ثم ومن نانوميتر 260 موجي طول على للعينة الامتصاصية قياس القراءة نسجل

4. ثم ومن نانوميتر 280 موجي طول على للعينة الامتصاصية قياس القراءة نسجل

5. ثم نستخدم المعادلة التالية لمعرفة تركيز الـ DNA بالمايكروغرام/مل

Unknown (µg/ml) = OD260 unit x dilution factor x 50 µg/ml

(OD280/OD260) نانوميتر 260 الموجة طول قراءة بين النسبة ان بين النسبة هذه تتراوح ان ويجب النووي الحامض نقاوة تقييم في تساعد التوالي على RNA و DNA من لكل 2.0 – 1.7

الفينول او البروتين الى إضافة النووي الحامض تحوي العينة كانت فاذا الطبيعي الحد من اقل النسبة فستكون

نانوميتر 260 الموجي الطول عند DNA الـ عينة امتصاصية تحسب اذ نانوميتر 280 الموجي الطول عند نفسها للعينة الامتصاصية تحسب ثم او اكبر الناتج يكون ان يجب الثانية على الأولى الامتصاصية قسمة وبعد او تنقية وتحتاج نقية غير العينة ان يعني فهذا اقل كان واذا 1.7 يساوي استخلاص إعادة

$$\text{Purity of DNA} = \frac{\text{O.D 260}}{\text{O.D 280}} \geq 1.7$$

يساوي او من اكبر الناتج يكون ان يجب ولكن RNA الـ نقاوة لتقدير نفسها المعادلة وتستخدم

2

$$\text{Purity of RNA} = \frac{\text{O.D 260}}{\text{O.D 280}} \geq 2$$

260:280 ratio has high sensitivity for nucleic acid contamination in protein:

% protein	% nucleic acid	260:280 ratio
100	0	0.57
95	5	1.06
90	10	1.32
70	30	1.73

Spectrophotometer جهاز طريقة مساوئ

عن خاطئة نتائج تعطي اذ الفينولات وخصوصاً للملوثات حساسيتها الطريقة هذه استخدام عند الملوثات وجود

مثال: لدينا المعلومات التالية

1. خففت عينة الـDNA (100 مرة) أي ان عامل التخفيف dilution factor هو 100

2. القراءة عند الطول الموجي 260 نانوميتر هي 0.4

3. القراءة عند الطول الموجي 280 نانوميتر هي 0.32

المطلوب حساب تركيز ونقاوة عينة الـ DNA

التالية المعادلة نستخدم DNA الـ تركيز لقياس : الحل

Unknown (µg/ml) = OD260 unit x dilution factor x 50 µg/ml

Unknown (µg/ml) = 0.4x 100x 50 µg/ml 2000 = µg/ml

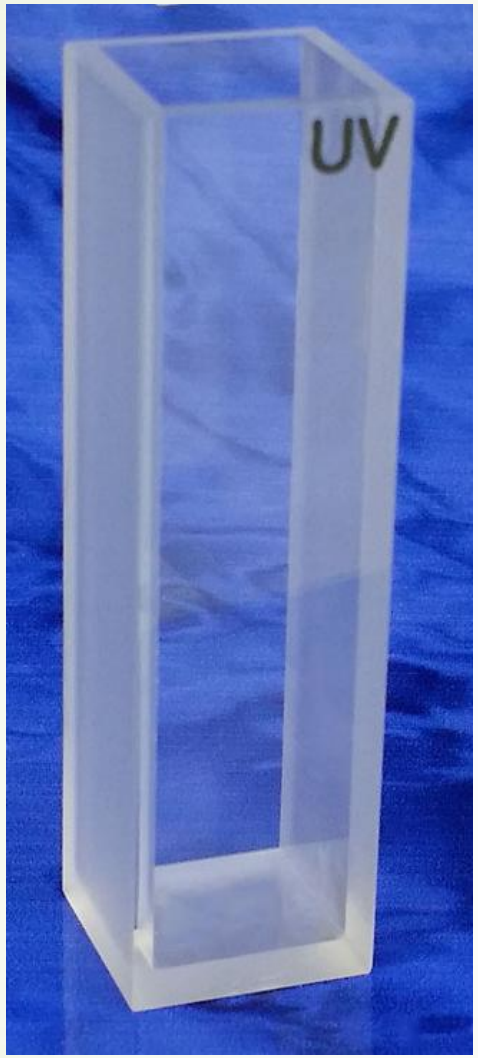
التالية المعادلة نستخدم DNA الـ نقاوة لقياس : الحل

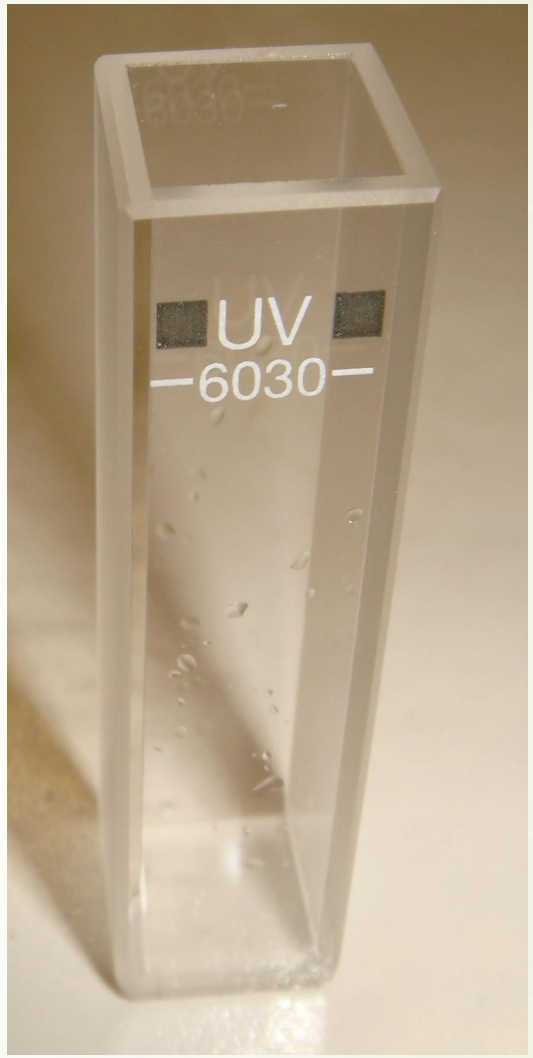
$$\text{Purity of DNA} = \frac{\text{O.D 260}}{\text{O.D 280}}$$

$$\text{Purity of DNA} = 1.25 = \frac{0.4}{0.32}$$

Spectrophotometer

Spectrophotometer





Cuvette

2. جهاز Nano drop

عملية الجهاز هذا في RNA او DNA النووي الحامض قياس يعتبر المحتمل الخطأ نسبة عن لنا تكشف انها الى إضافة وسريعة سهلة هي النووي للحامض القياسية القراءات ان حيث العينة في وجودها كالاتي :

DNA = 1.7

RNA = 2.0

في تلوث وجود على دلالة فهي النسب هذه عن تختلف التي القراءات اما الأخرى المواد بعض او البروتين على حاوية زالت لا العينة ان أي العينة 260 – 280 nm موجي طول عند القراءة وتتم

Thermo
SCIENTIFIC
NANODROP 2000
Spectrophotometer

2. طريقة عمل جهاز Nano drop

1. اختر الايقونة الخاصة بالجهاز (Nano drop) الموجودة على سطح المكتب

2. اختر Nucleic acid من القائمة

3. اختر نوع الحامض النووي DNA او RNA

4. اختر الوحدة القياسية الخاصة بالحامض النووي وهي ng/µL

الطول ان فحصة المراد للمحلول الملائم الموجي الطول اختر .5
النووي الحامض وتقدير لقياس الملائم هو 260 – 280 الموجي

القياسات جميع لاضافة (Add to the report) الايقونة اختر .6
الحاجة عند اليها الرجوع لحين وحفظها عيناتك بجميع الخاصة

(النووي للحامض المذيب المحلول Blank) بواسطة الجهاز صفر .7
الـ ان الى إضافة النووي للحامض جيد مذيب المحلول هذا يكون ان يجب
PH درجة بنفس يكون ان يجب الجهاز لتصفير المستعمل Blank
النووي للحامض للمذيب المستعمل للمحلول الايونية الدرجة ونفس

DNA

8. ضع 1 - 2 µL من محلول البلانك على العدسة ثم انزل ذراع الجهاز (Blank) كلمة على اضغط ثم الجهاز

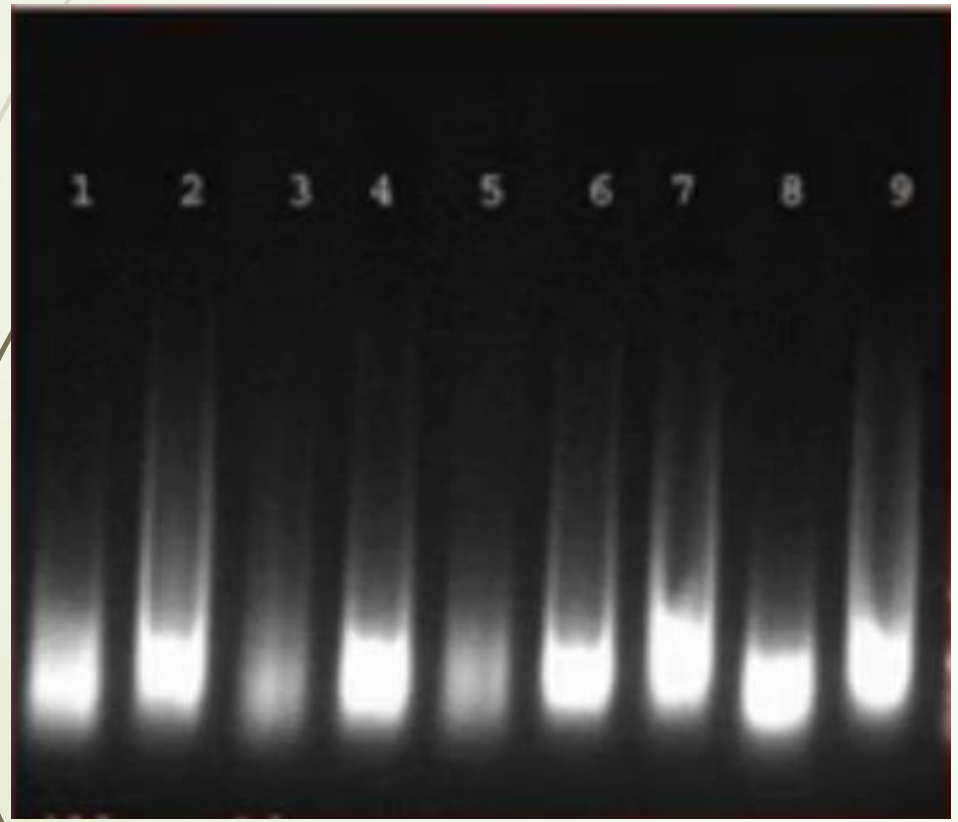
9. نظف العدسة بورق التنظيف الخاص ثم ضع العينة حوالي 2 µL بالقياس الجهاز ليبدء (Measure) كلمة على واضغط

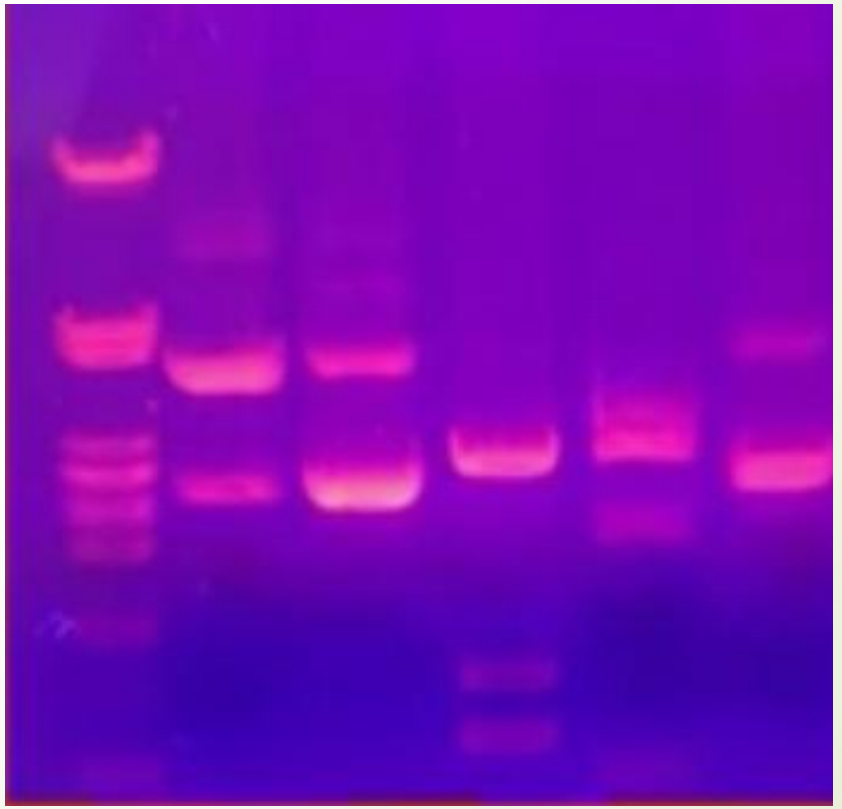
2. الاكاروز هلام على الكهربائي الترحيل طريقة : Agarose gel Electrophoresis

الـ نقاوة تقدير وكذلك DNA الـ لتراكيز الكمي للتقدير الطريقة هذه تستخدم و Nano drop في هو كما دقيقة ارقام لاتعطي الطريقة وهذه DNA الجهازين توفر عدم حالة في الطريقة هذه نستخدم Spectrophotometer السابقين

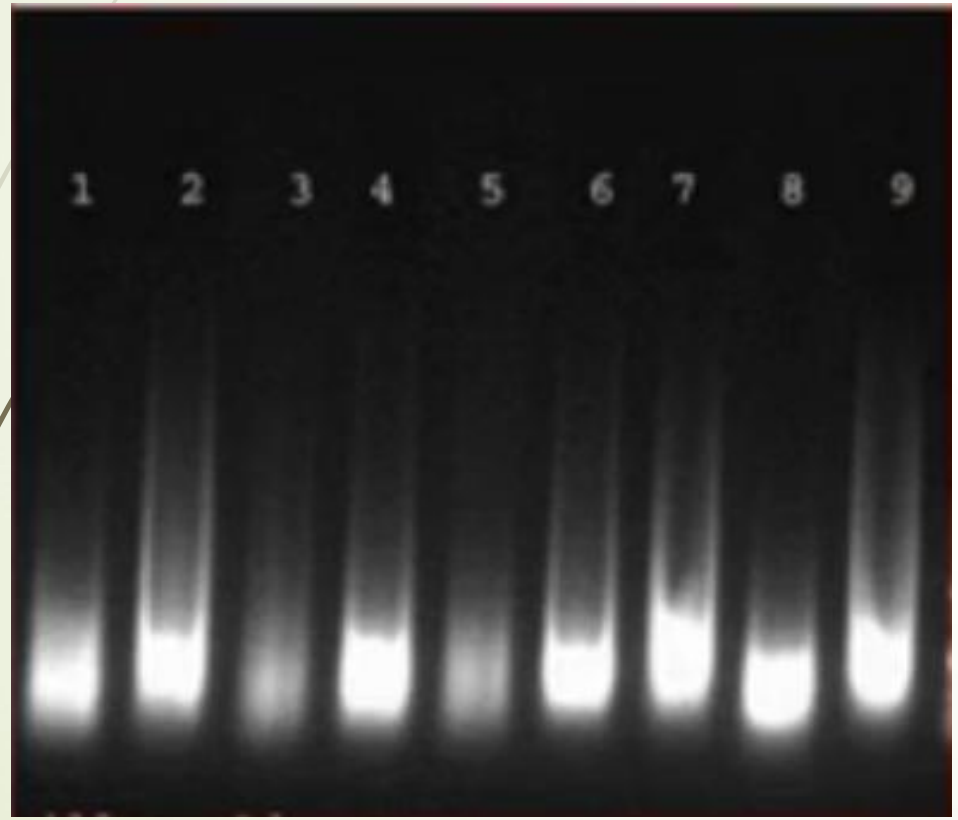
اعتماداً RNA و DNA الـ النووية الاحماض لفصل تستخدم الطريقة وهذه الكهربائي التيار تاثير تحت الجزيئية الاوزان على

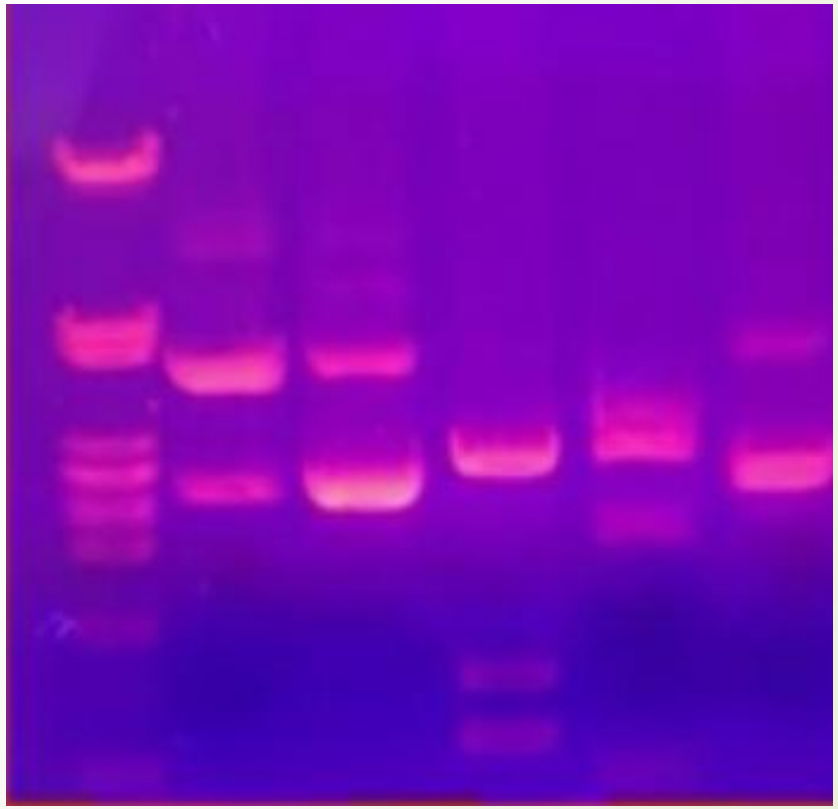
خلال من يمكن ونقاوتها DNA الـ تراكيز تقدير في استخدامها الى بالنسبة تركيز نحدد ان يمكن الترحيل عملية انتهاء بعد عليها نحصل التي النتائج الـ تركيز ان على دل سمكاً اكثر العينة كانت كلما انه نلاحظ اذا ونقاوتها العينة قليل DNA الـ تركيز فيها يكون الرقيقة والعينة عالي DNA

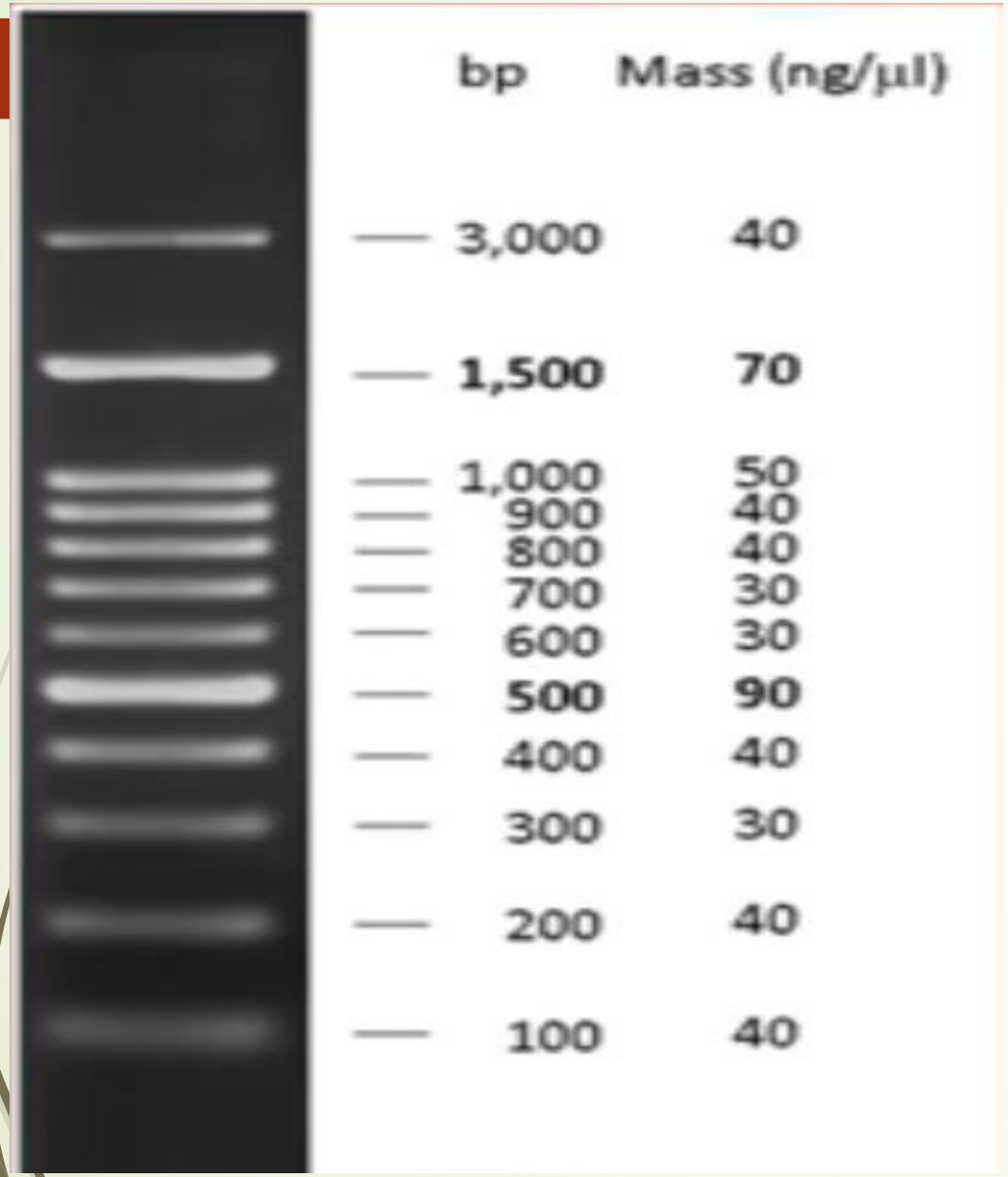




من العينة نقاوة ان على ذلك دل مضيئة كانت اذا العينة نقاوة الى بالنسبة اما ان على ذلك دل مطفية أي باهتة كانت اذ اما عالية نقاوة ذات وهي الملوثات قليلة نقاوة







Ladder صناعة تم موخراً للـ تراكيز لمعرفة خاصة ومعلمات ان معروف ماهو مثل DNA الترحيل في المستخدم Ladder لقراءة مخصصة وهي الكهربائي DNA الـ لعينة الجزيئية الاوزان