قياس تركيز ونقاوة الحمض النووي (DNA)

اعداد / م.د عزيز حسن صالح

- 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 (DNA)

1. التخلص من البروتينات : عن طريق اضافة خليط من

(الفينول: الكلوروفورم: كحول أيزوأميل)

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

المرحلة الأخيرة في اي عملية استخلاص للاحماض النووية (DNA, RNA) هي تقييم النتيجة، بالنسبة للدنا يتضمن ذلك تقدير نقاوة الدنا وتركيزه. يتم تقدير تركيز ونقاوة الاحماض النووية باستخدام التقدير الطيفي باستخدام

حساب تركيز الحمض النووي (DNA) باستخدام جهاز الطيف الضوئي Spectrophotometer

جهاز الطيف الضوئي : هو جهاز لقياس كمية الضوء للمادة المستعملة عن طريق طول الموجة التي توجه للجهاز

جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer System ،تستعمل طريقة الامتصاص عند الطول الموجي ٢٦٠nm لقياس كمية الدنا او الرنا او كليهما في محاليلها وهي طريقة سريعة وسهلة ودقيقة لقياس كمية الأحماض النووية.

تستعمل كمية الامتصاص (الكثافة الضوئية Optical Density) عند الطول الموجي ٢٦٠ nm لقياس كمية الدنا لان الحامض النووي الدنا يملك اعلى امتصاص للكثافة الضوئية عند هذا الطول الموجي واقل امتصاص عند الطول الموجي ٢٣٠nm . اما كمية الامتصاص عند الطول الموجي ٢٨٠ nm فتستخدم لتقدير كمية البروتينات الموجودة ضمن محلول الدنا.ان كثافة ضوئية قدرها ١ تقابل ٥٠ مايكروغرام من الدنا لكل ١ مل (50µg/ml) بينما تقابل (40µg/ml) للحامض النووي الرنا.

تتصف المحاليل النقية للدنا او للرنا بقيمة الكثافة الضوئية للطولين الموجيين ٢٦٠ مقسومة على ٢٨٠ وهي ١,٨ للدنا و٢ للرنا وتقل القيمة في حالة وجود ملوثات لنموذج الحامض النووي كالبروتينات وغيرها.

أن جهاز الامتصاص الضوئي يعتمد على تسليط حزمة مركزة من أشعاع ضوئي على العينة المراد تحليلها ، ثم قياس شدة الشعاع الضوئي الممتص في العينة وبالتالي تقدير تركيز مادة الاختبار.

تبنى على هذه الظاهرة العديد من التطبيقات لقياس تراكيز المواد وتحديد هويتها. في المطياف الضوئي هناك مادة يراد تحديد تركيزها تكون ملونة او تتفاعل مع مركب لتنتج مركب ملون ثم تسلط حزمة ضوئية لها طول موجي محدد (اي الطول الموجي للضوء الذي يحدث عنده اعلى امتصاص للطاقة) حتى تكون حساسية الاختبار دقيقة وبالتالي تقدير التراكيز المنخفضة للمادة

أساس الفكرة قانون lambert والذي يحدد العلاقة بين شدة الشعاع الممتص وتركيز المادة ، وهناك علاقتين هما النفاذية والامتصاصية فالنفاذية تعني قدرة الشعاع الضوئي على النفاذ خلال العينة ، وفية تقاس نسبة الشعاع الساقط على العينة على الشعاع النافذ وهي عبارة عن علاقة لوغارتيمية، أما الامتصاصية فهي تحويل العلاقة اللوغارتيمية الى علاقة خطية ويتم فيها قياس علاقة شدة الشعاع الممتص بالنسبة لتركيز المادة . قبل التعامل مع عينات الأحماض النووية في التجارب المهمة لابد من الإشارة إلى معادلتين مهمتين

الأولى : تتعلق بحساب التركيز DNA وهي :

Unknown(µg/ml) = O.D $_{260}$ x dilution factor x 50 µg/ml

١) يتم تصفير الجهاز من خلال قياس الطول الموجي للبفر لوحده (المستخدم لحفظ وتخفيف الـــDNA) حيــث تملــيء أنبوبــة زجاجيــة كــوارتز(Cuvette) خاصــة بجهــاز قيــاس الامتصاصية(مطياف U.V الضوئي) بالبفر وبما انها لا تحوي على عينة DNA فتعتبر القراءة صفر وحتى لو لم تقرا صفر يتم تصفيره.

٢) توضع عينة الـDNA داخل الكيوفيت ويثبت الطول الموجي عند ٢٦٠ نانوميتر وتتم ملاحظة قراءة الجهاز وتسجل الامتصاصية (O.D) وتستعمل المعادلة ويستخرج التركيز.

٣) بما انه عينة الـ DNA- المستخدمة للقياس كبيرة تقدر ب 1 -٢ مل ولا يمكن اعادتها للمحلول الاساسي لعدم تعقيم ظروف القياس والكيوفيت. لذلك يفضل اخذ كمية صغيرة تقدر بالمايكروليتر وتخفيفها وحساب ذلك في المعادلة من خلال معامل التخفيف.

كما يمكن تقدير تركيز الDNA من خلال شدة صبغة بروميد الاثيديوم (Ethedium bromide) التي تندغم بين قواعد ال DNA وتعكس ضوءاً برتقالياً عند مرور الاشعة فوق البنفسجية (UV) ، وبقياس وميض العينة ومعايرتها مع العينة القياسية يمكن اكتشاف كمية الدنا الموجودة حتى لو كانت ضئيلة.

الثانية: تتعلق بحساب تركيز RNA وهي نفس المعادلة السابقة ولكن يختلف الثابت حيث يكون ٤٠

Unknown (µg/ml) = O.D $_{260}$ x dilution factor x 40 µg/ml

تقدير نقاوة الاحماض النووية

أي تحسب امتصاصية عينة الDNA عند الطول الموجي 260 نانوميتر ثم تحسب الامتصاصية للعينة نفسها عند الطول الموجي 280 نانوميتر وبعد قسمة الامتصاصية الاولى على الثانية يجب ان يكون الناتج اكبر من او يساوي 1.8 واذا كان اقل فهذا يعني ان العينة غير نقية وتحتاج تنقية او اعادة استخلاص.

$$\text{Purity of DNA} = \frac{O.D_{260}}{O.D_{280}} \geq 1.8$$

وتستخدم المعادلة نفسها لتقدير نقاوة الRNA ولكن يجب ان يكون الناتج اكبر او يساوي 2 وكالاتي:

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