كلية الزراعة **علم الحياة الجزيئي**

قسم علوم الاغذية **مدرس المادة: م.م. ضحى صلاح**

المرحلة الثالثة **المختبر الاول**

مـقـدمـــة

علم الحياة البايولوجي الجزيئي هو مزيج من علوم الحياة وعلوم الكيمياء الذي يهتم بدراسة تكوين وتركيب ووظيفة الجزيئات الخلوية الكبيرة Macromolecules كالاحماض النووية والبروتينات ودورها في الفعاليات البايولوجية المهمة كالتضاعف الخلوي وتناقل المعلومات الوراثية.

على الرغم من مكانته البارزة بين العلوم الحيوية الا ان علم البايوجي الجزيئي هو علم حديث النشأة حيث ان بداية نشوئه كانت في ثلاثينيات القرن التاسع عشر لكنه دخل حيز التطبيق في خمسينيات وستينيات القرن التاسع عشر. ان نشوء هذا العلم نتج من تقارب وتداخل واندماج علم الوراثة والفيزياء والكيمياء التركيبية .

الاجهزة المستخدمة في مختبر البايولوجي الجزيئي

اولا: جهاز النبذ المركزي Centrifuge Apparatus

في هذا الجهاز يدار الجسم بحركة دورانية بسرع مختلفة واثناء الحركة الدورانية تتولد قوة تسمى بالقوة المركزية Central Force والتي تحرك الجسم بعيدا عن مركز الدوران .

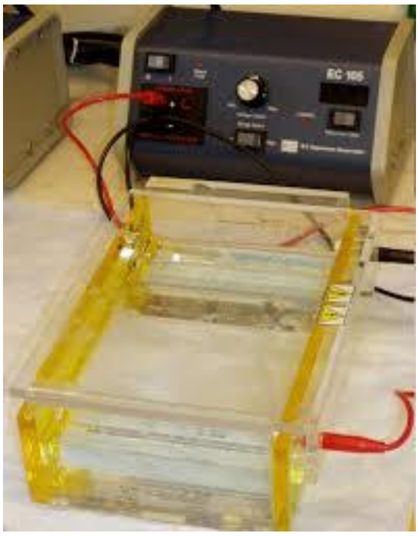
تكون الفائدة من ذلك فصل مكونات العينة السائلة بمعدل يعتمد على حجم وشكل وكثافة مكونات العينة ,حيث تضغط الجزيئات الاكبر بالوزن باتجاه الاسفل(القعر) ليتكون الراسب Deposit اما السوائل فتبقى بالاعلى .

يجب موازنة جميع انابيب النبذ المركزي المتقابلة وكلما زادت سرعة الجهاز كان لابد من الموازنة الدقيقة بحيث لا يتجاوز فرق الوزن في الجهاز 0.0001غم والا فهناك احتمال ان يترك الراسب موقعه ليتكون الرائق supernatant كذلك يجب ان يوضع انبوب مقابل الانبوب الاخر كما يجب الموازنة بالحجم و يجب ان يوضع الجهاز على سطح مستوي وان يكون بعيدا عن حافة السطح .

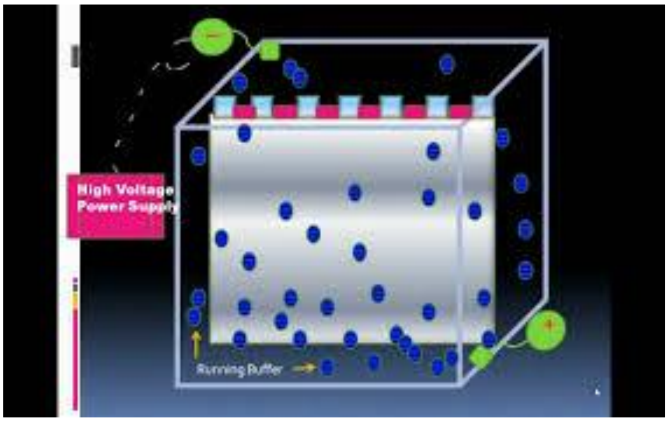
يمكن تقسيم اجهزة النبذ المركزي الى :

1. **جهاز النبذ الركزي العادي المبرد Cooling Centrifuge**

يستخدم في فصل الخلايا المايكروبية حيث تفصل المواد استنادا الى كثافتها ووزنها وتتراوح سرعتها 0-6000 rpm/min وبدرجة حرارة تتراوح بين 30-0مْ , علما ان درجة الحرارة المستخدمة لفصل الخلايا هنا هي 4مْ اما سعة الانابيب المستخدمة فتتراوح بين 5-100 ml.



جهاز الترحيل الكهربائي الافقي



جهاز الترحيل الكهربائي العمودي

جهاز النبذ المركزي

جهاز المزج

كلية الزراعة **علم الحياة الجزيئي**

قسم علوم الاغذية **مدرس المادة: م.م. ضحى صلاح**

المرحلة الثالثة **المختبر الرابع**

الترحيل الكهربائي للدنا في هلام الاكاروز Agarose Gel Electrophoresis of DNA

الترحيل الكهربائي هي طريقة قياسية سريعة وبسيطة لفصل وتشخيص وتنقية قطع الدنا خلال مرورها ضمن الهلام وتستخدم لفصل مزيج من قطع الدنا والرنا و البروتين اضافة الى حساب الوزن الجزيئي للجزيئات المفصولة من الهلام مقارنة مع مؤشر Marker ذو وزن جزيئي معلوم . يمثل الفصل باستعمال الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز احد اكثر التقنيات البسيطة والمهمة في فصل وتنقية وتعريف الدنا و الرنا .

الاكاروز هو عبارة عن جزيئات كبيرة جدا متشابكة من سكر الكلوكوز وهو يشبه الاكار المستخدم في تحضير الاوساط الزرعية البكتيرية . يستعمل الاكاروز المذاب بدرجة حرارة 100 مْ والمبرد الى 45-50 مْ كهلام ناقل لجزيئات الدنا (DNA) المتحركة في مجال كهربائي .

تعتمد طريقة فصل الدنا او قطعة منه على ترحيله (DNA) في مجال كهربائي خلال الهلام و توضح جزيئاته بعد اصطباغها بصبغة الايثيديوم برومايد Ethydium Bromide . ويتم القصي و التعرف على الحزم المصبوغة للدنا بعد بعد كشفها تحت الاشعة فوق البنفسجية (U.V.).

يعتمد جريان الدنا عبر الاكاروز في مجال كهربائي من القطب السالب الى القطب الموجب على عوامل كثيرة منها :

1. **الوزن الجزيئي للدنا**
يعتمد جريان جزيئات الدنا على اوزانها الجزيئية ,فجزيئات الدنا قد تكون خطية مستقيمة مفردة او انها بشكل شريط مزدوج الا انها تبدو مفردة او قد تكون بشكل حلزون مزدوج وهي بذلك تختلف في اوزانها الجزيئية وبنيتها , تهاجر جزيئات الدنا بسرعة تتناسب عكسيا مع لوغارتيم وزنها الجزيئي .
2. **تركيز الاكاروز**
تختلف سرعة هجرة الجزيئات المتشابهة بتغير تركيز الاكاروز المستعمل لعملية الفصل ولهذا فإن استعمال هلام الاكاروز يكون بتراكيز مختلفة .
3. **الشكل البنائي للدنا (DNA)**
تختلف اشكال لدنا في سرعة جريانها في هلام الاكاروز , فالشكل الدائري المغلق (Closed circular) والشكل المستقيم (Linear) ذوات الاوزان الجزيئية المتشابهة تهاجر في تركيز معين من هلام الاكاروز بسرع مختلفة .
4. **كمية التيار الكهربائي**
تتناسب سرعة جريان جزيئات الدنا الخطية مع كمية الفولتية المستعملة للترحيل , ومع زيادة كمية الفولتية الى درجة معينة فإن جريان الجزيئات ذوات الاوزان الكبيرة سيزداد .
5. **المحتوى النوعي للقواعد في الدنا ودرجة الحرارة**
لا يتأثر الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز بما يحتويه الدنا من قواعد نتروجينية كما يحدث لو استعمل هلام الاكرمايد (وهو هلام يستعمل لفصل القطع الصغيرة من الدنا) ,كما ان تغير درجة الحرارة لا يؤثر في سرعة الترحيل , يستعمل الترحيل بوضع افقي عادة لفصل جزيئات الدنا او قطع منه بواسطة هلام الاكاروز .

تعتمد عملية الترحيل بأستعمال الاكاروز على تحضير نسبة الاكاروز المطلوب في محلول منظم معين ,اما المنظمات (Buffers) المستعملة فهي :

1. Tris –Acetate-EDTA-(TAE) : ph =8.0
2. Tris-Phosphate-EDTA-(TPE):ph=8.0
3. Tris –Borate-EDTA-(TBE):pH=8.0

طريقة العمل :

اولا :المواد المستعملة :

1. اكاروز نقي واطئ الايونات .
2. محلول منظم بفر .
3. حمم مائي بدرجة حرارة 100 مْ .
4. صبغة الايثيديوم بروومايد Ethydium Bromide (تحضر بتركيز10 ملغم /مل في الماء المقطر)
5. شريط لاصق كهربائي Electrical tape
6. ماصة (مايكروبابيت).
7. وحدة ترحيل ذو اتجاه افقي
8. صفائح زجاجية لوضع الاكاروز .
9. مشط (comb) اتعيين مواضع الدنا في الاكاروز .

ثانيا : الطريقة :

1. يحضر تركيزالاكاروز المطلوب مذابا في محلول منظم بفر .
2. يسخن الاكاروز الى درجة حرارة 100مْ حتى الذوبان ثم يبرد في حمام مائي الى درجة 50 مْ .
3. تحضر صفيحة اسناد محلول الاكاروز وتجاط حافات الصفيحة الزجاجية بالشريط الكهربائي اللاصق .
4. البدء باضافة الاكاروز الى الصفيحة المحددة بالشريط
5. نبدأ بغمر مشط تكوين الحفر في احدى نهايتي الصفيحة
6. ترك وقت للاكاروز كي يتصلب بوضع افقي (حوالي 30 دقيقة).
7. يرفع مشط تكوين الحفر من الاكاروز المتصلب ويرفع الشريط المحدد .
8. تثبت الصفيحة على مساندها في وحدة الترحيل الافقية .
9. يغطى الاكاروز بعلو 1 ملم من المحلول المنظم .
10. نبدأ بإضافة محلول الدنا و كالاتي :
    اولا : يمزج محلول لدنا بمنظم المحلول المتكون والذي يتألف من
    10% كليسيرول
    7% سكروز
    0.025 صبغة البروموفينول الزرقاء (Bromophenol blue)
    ثانيا: يضاف محلول الدنا بحقنه بالحفر بواسطة المايكروبابيت .
11. يعمل الترحيل بتيار كهربائي 7.0 فولت/سم^2 ,حتى وصول الصبغة الدالة قرب نهاية الهلام .

ثالثا: تصبيغ الهلام:

1. يحضر محلول منظم Tris بتركيز 0.5 µg/ml للصبغة المذابة في الماء المقطر.
2. يرفع الهلام مع مسنده .
3. يغمر الهلام لمدة 45 دقيقة في محلول الصبغة .
4. يمكن ازالة الصبغة من المناطق غير الحاوية على الدنا بغمر الهلام المصبوغ لمدة ساعة في محلول 1mM كبريتات المغنيسيوم في الماء المقطر .
5. يفحص تحت الاشعة فوق البنفسجية لرؤية حزم الدنا او قطعه وعلى طول موجي 260 نانوميتر .

استعمالات الترحيل الكهربائي للدنا في هلام الاكاروز :

يستعمل الترحيل الكهربائي في الاكاروز في تطبيقات كثيرة ومتنوعة ومنها :

1. تعيين عدد اماكن قطع الانزيمات القاطعة ,فالدنا المعامل بانزيم قاطع معين والمكون من اربع قطع دنوية بعد الفصل بالترحيل الكهربائي في الاكاروز يحتوي على ثلاثة اماكن قطع الانزيم القاطع تحت التجربة .
2. يمكن تحري وجود انزيم قاطع او انزيمات قاطعة في اي نموذج خلوي وذلك بإضافة النموذج تحت الفحص ثم تحري قطع الدنا .
3. يمكن دراسة علاقة تسلسلات الدنا البشري بتعيين قطع الدنا (DNA restriction fragment (finger print
4. تستعمل الطريقة في تتبع بنية الدنا بعد هندسته وراثيا فيمكن تمييز الدنا الخطي عن الدنا الدائري بعد ربط نهايتيه .
5. تقدير الاوزان الجزيئية لقطع الدنا وايجاد ترتيبها في الجزيئة الاصل .

كلية الزراعة **علم الحياة الجزيئي**

قسم علوم الاغذية **مدرس المادة: م.م. ضحى صلاح**

المرحلة الثالثة **المختبر الخامس**

استخلاص البروتينات Protein Extraction

البروتينات

مركبات عضوية معقدة التركيب ذات وزن جزيئي عالٍ تتركب من الاحماض الامينية تتواجد في تركيب كل المخلوقات الحية والفايروسات وهي الحجر الأساس في بناء الخلية وإدامة هيكلها , بالإضافة الى كونها واسطات وظائف الخلية فالعديد من البروتينات تشكل الإنزيمات أو قد تدخل وحدات بروتينية في تركيب بعض الإنزيمات وتضم الخلية ألافا من جزيئات البروتينات المختلفة في خواصها الحياتية و الكيميائية و الفيزيائية.

يتم استخلاص البروتينات من مصادرها ايا كانت لإغراض شتى مثل:-

1- تنقيتها وفصلها كل على انفراد لغرض تشخيصها وتقدير كميتها.

2- دراسة الخواص البايلوجية والكيميائية والفيزيائية للبروتينات لغرض استنباط علاقة التركيب بالوظيفة

3-مقارنة البروتينات المستخلصة من نماذج مختلفة لغرض استنتاج علاقات مفيدة في الاغراض الدراسية المقارنة.

4- استخلاصها للإغراض التجارية حيث تدخل في العديد من الصناعات الدوائية والغذائية.

ان طرق استخلاص البروتينات تعتمد على أسس كثيرة ومتنوعة ,فهنالك البروتينات غشائية الموقع, وهناك البروتينات سايتوبلازمية الموقع وكذلك توجد بروتينات عائدة لعضيات الخلية المختلفة كالمايتوكوندريا وجهاز كولجي والشبكة الاندوبلازمية بالإضافة الى ذلك فان مصدر البروتينات يمكن ان يكون غير خلوي وعليه فلابد من التأكيد على مصدر الاستخلاص عند القيام باستخلاص بروتينات معينة تنتمي الى عضية ما .

في التجربة الحالية سيتم استخلاص البروتينات من أغشية الخلايا وبالذات بروتينات غشاء كريات الدم الحمراء وتنقسم هذه البروتينات الى مجموعتين:

الاولى: مجموعة البروتينات التي يمكن عزلها بسهولة وذلك بتغيير في القوة الايونية للمذيب او بتغيير في درجة الاس الهيروجيني للمذيب وتمثل هذه مجموعة البروتينات الخارجية غير المندمجة في طبقة الدهن Extrinsic or non integral protein

الثانية: مجموعة البروتينات المندمجة (Integral proteins)التي تجوب طبقتي الدهن للغشاء وتكون أواصر مع الدهون او ترتبط بعوامل أخرى كالفلزات عن طريق أواصر كيميائية .إن استخلاص هذه المجموعة ياتي عن طريق تخريب التأصر بين

الدهون والبروتينات والفلزات المتحدة معها ,وغالبا ما تستعمل المنظفات (Detergent) وهي مواد كيميائية اليفاتية في معظم تركيبها وتوفر عنصرا مفككا للتأصر وهي بذلك تفصل البروتينات عما يؤاصرها ويثبتها في مكانها.

تعمل المنظفات أيضا على التقليل من التأصر غير المحب للماء في البروتين وبين الدهون وهي بذلك تعمل على الاقلال من دور هذا التأصر القوي .

تقسم المنظفات الى :

أ- **منظفات ايونية Ionic detergent :** تمتلك شحنة (اما موجبة او سالبة) وهي قوية في تاثيرها وباستطاعتها كسر كثير من الروابط غير المحبة للماء ومن امثلتها Sodium doedecyle sulfat (SDS) وهي تستعمل للتحطيم الكلي لمحتويات وتراكيب الخلية وكذلك لمسخ البروتينات Denaturation لاجل فصلها اثناء الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis.

ب- **المنظفات اللاايونية Non ionic detergent:** لاتمتلك شحنة في تركيبها الكيميائي وهي مفيدة ايضا في كسر التاصر غير المحب للماء ومن امثلتها Triton-X-100 تستعمل لعزل البروتينات الفعالة إحيائيا من أغشية الخلايا وتسمى أيضا بالمنظفات غير الماسخة Non-denaturing detergent.

استخلاص بروتينات كرية الدم الحمراء غير المندمجة :-

المواد

انابيب حاوية على مادة مانعة للتخثر, انابيب عادية , محلول فسلجي (سلاين) ويمكن تحضيره باذابة 0.85 غم من NaCl في 100 مل ماء مقطر, جهاز طرد مركزي, ماء مقطر حاوي على 0.1 ملي مولاري من EDTA وPH له =7.5 (المحلول المحلل للخلايا).

طريقة العمل

1- يؤخذ 2 مل من الدم ويوضع في انابيب النبذ وتفصل البلازما عن كريات الدم بالنبذ بقوة 4000 دورة /دقيقة لمدة 10 قائق.

2- يتم التخلص من البلازما وتعلق الخلايا في 10 مل من محلول الملح الفسلجي ويتم غسل الخلايا ثلاث مرات باستعمال النبذ وتجمع الكريات في كل مرة .

3- تتم عملية تحليل كريات الدم بتعليقها بواسطة الماء المقطر الحاوي على 0.1 ملي مولاري EDTA

يتم الحصول على اغشية كريات الدم الحمراء المندمجة بالنبذ بقوة 10000 دورة /دقيقة لمدة نصف ساعة

4- يتم غسل الاغشية بتعليقها بنفس المحلول السابق وتكرر الخطوة السابقة

5- للحصول على بروتينات الاغشية السطحية ترج الاغشية المعلقة في حجم معين من (محلل الخلايا) رجا قوياً لاتاحة الفرصة للبروتينات الغشائية بالانفصال ويترك المحلول لفترة كي تترسب الاغشية ويجمع الرائق باستعمال ماصة بعد ترك المحلول لفترة ويحفظ الرائق بدرجة - 4م- او يجمد بدرجة 20 م تحت الصفر.

<u>لاستخلاص بروتينات كرية الدم الحمراء المندمجة :-</u>

1- تستعمل نفس المواد السابقة
2- يضاف محلول استخلاص حاوي على Triton-X-100 (0.1 مل) لكل 10 مل من المحلول المحلل ويستعمل .
3- يتم جمع الرائق المحتوي على البروتينات السطحية والمندمجة ويحفظ بنفس الطريقة ثم يتم فصل البروتينات السطحية عن المندمجة.

كلية الزراعة　　　　　　　　　　علم الحياة الجزيئي

قسم علوم الاغذية　　　　　　　　مدرس المادة: م.م. ضحى صلاح

المرحلة الثالثة　　　　　　　　　المختبر السادس

ترسيب البروتينات

ترسب البروتينات بعد استخلاصها لتخليصها من مختلف المواد غير البروتينية كما تستعمل طريقة الترسيب لتركيز محاليل البروتينات بالإضافة الى فصل البروتينات المختلفة عن بعضها (تنقيتها).

تترسب البروتينات عن محاليلها بازالة الماء (المذيب)منها - تصبح غير ذائبة- وتستعمل انواع مختلفة من الاملاح في عملية الترسيب منها كبريتات الامونيوم ويمكن ترسيب البروتينات ايضا باضافة المواد الساحبة للماء كمادة **poly ethylene glycol (PEG)** وفي كل الاحوال تحضر محاليل مرسبات البروتين في الماء بتراكيز مشبعة بالنسبة للاملاح اوتراكيز معينة بالنسبة لمادة(**PEG**) وفي عملية الترسيب يضاف المرسب الى الرائق البروتيني للحصول على تركيز معين.

المواد:-

*انابيب *محلول مشبع من كبريتات الامونيوم ويحضر باذابة الملح الى درجة الاشباع (حسب الجداول العالمية)في الماء المقطر وغالبا ما نحصل على درجة الاشباع باذابة 90 غم ملح الى 100مل ماء مقطر ويحفظ المحلول بحرارة الغرفة ويعدل PH الى 7عند الاستعمال .*مصدر بروتيني-رائق التجربة السابقة كمصدر للبروتينات الغشائية-او مصل الدم كمصدر للبروتينات المناعية.

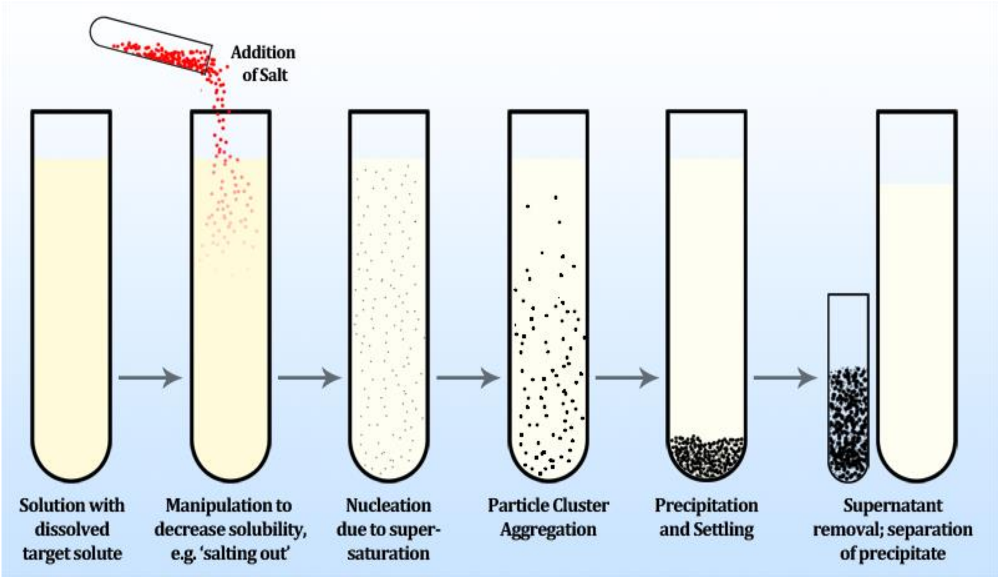
الطريقة:-

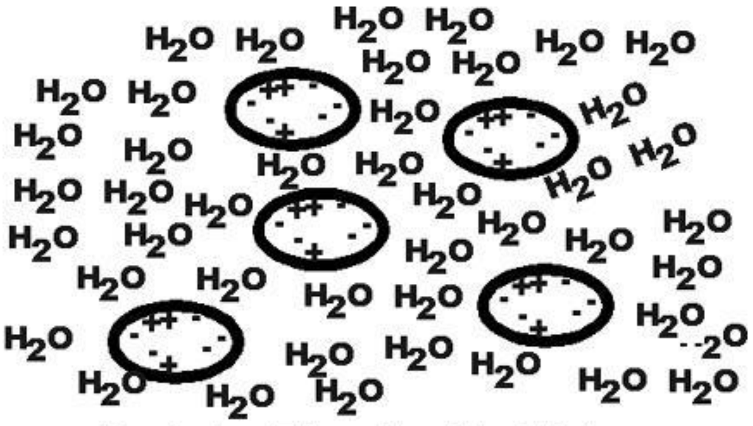
1- يؤخذ حجم معين من رائق الاستخلاص ويضاف اليه محلول كبريتات الامونيوم المشبع تدريجيا مع الرج المستمر ويفضل باستخدام المازج المغناطيسي.

2- تبدا عملية الترسيب عند ظهور عكرة للبروتين المرسب وتحسب كمية الملح المضافة (أي في أي كمية من الملح بدأ ظهور التعكر)

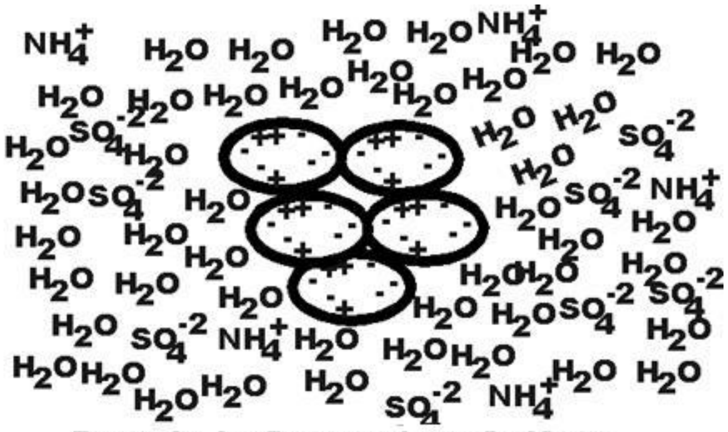
3- يعزل البروتين بوساطة النبذ (5000دورة /دقيقة)لمدة 5 دقائق ويحفظ الراسب اما الرائق فيمكن ترسيب بروتينات اضافية بزيادة الاملاح.

ملاحظة:-هذه الطريقة وسيلة لترسيب وتجزئة وتركيز البروتينات غير المعرفة. توجد طرق ترسيب اخرى ,ويمكن استخدام الايثانول او الاسيتون لترسيب الكميات القليلة المتواجدة في المستخلصات البروتينية الصغيرة الحجم.





Protein Dissolved in Water



Protein in Ammonium Sulfate

كلية الزراعة — علم الحياة الجزيئي

قسم علوم الاغذية — مدرس المادة: م.م. ضحى صلاح

المرحلة الثالثة — المختبر السابع

الديـلزة Dialysis وتقدير البروتينات Protein estimation

الديـلزة Dialysis

الديلزة عملية تتضمن ازالة الأملاح عموما عن محاليلها وغالبا ما تستعمل الديلزة لإزالة الأملاح عن البروتينـات بعـد عملية الترسيب بهذه الأملاح حيث تستعمل أنابيب خاصة لهذا الغرض تسمى (Dialysis tubes) وهي انابيب رقيقة تشبه أوراق السلفين مصممة لتحتوي على ثقوب أقطارها تقاس بالانكسترومات.

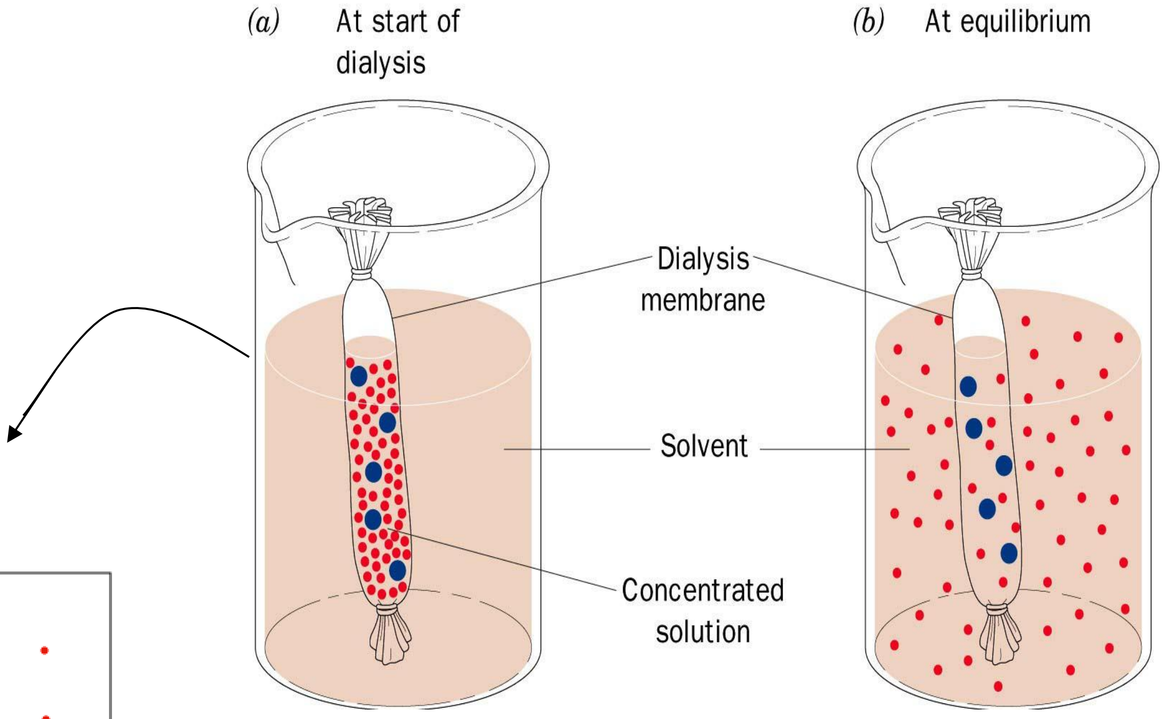
تختلف أقطار الثقوب في انابيب الديلزة وهذا يؤهلها لتستعمل في حجز البروتينات اعتمادا علـى أوزانهـا الجزيئيـة (اقطارها) كما تسمح تلك الاكياس بمرور جزيئات الامـلاح مـن محلـول (البـروتين- الملـح) إلـى الخـارج وباسـتبدال المحلول- ماء مقطر او منظم - باستمرار يتم إزالة جزيئات الاملاح نهائيا من البروتين

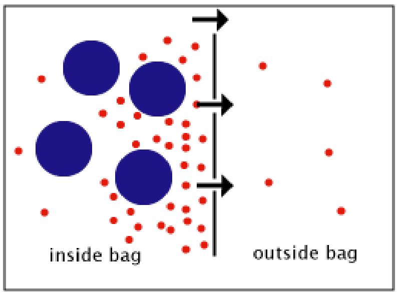
المواد

انابيـــب ديلـــزة معقمـــة, مـــاء مقطـــرمعقم, محلـــول البـــروتين المرســـب بـــالاملاح, كلوريـــد البـــاريوم

الطريقة

1- تغلق إلنهاية السفلى للانبوبة.
2- يسكب محلول الملح-البروتين (بعد إذابته بقليل من الماء المقطر) في انبوب الديلزة وتغلق النهاية العليا.
3- تعلق انبوبة الديلزة في سائل الديلزة لغمرها كليا .
4- يمكن تدوير سائل الديلزة الخارجي باستعمال محرك مغناطيسي للاسراع في عملية تنافذ الايونات.
5- يبدل محلول الديلزة بين حين وآخر- كل 24 ساعة- لعدة مرات.
6- يمكن التاكد من انتهاء وجود الأملاح في محلول الديلزة بإضـافة عـدة قطـرات مـن كلوريـد البـاريوم الـى محلـول الديلزة حيث تكون راسب دلالة على وجود كبريتات الامونيوم.
7- يفصل محلول البروتين الخالي من الأملاح ويحفظ بدرجة 20 م.





<u>تقدير البروتينات Protein estimation</u>

تقدر كميات البروتينات بعد كثير من الخطوات المتعلقة باستخلاصها وتجزئتها من مصادرها.هنالك الكثير من الطرق التقديرية لكمية البروتينات مثل:

1) الطريقة الطيفية Spectrophotometer (المباشرة)

تحتوي اغلب البروتينات على الحمضين الامينين التايروسين والتربتوفان ويتصف هذان الحمضان في امتصاصهما بطول موجي قدره 275 و280 نانومتر على التوالي, وبما ان مستوى هذين الحامضين يكون ثابتا في كثير من البروتينات فان كمية الامتصاص (الكثافة الضوئية) تتناسب طرديا مع كمية هذين الحامضين ومن خلال استخدام معادلة خاصة يتم التعرف على تركيز البروتين وغالبا تستخدم هذه الطريقة لتقدير كمية بروتين منقى معروف النوع .

2) **الطرق اللونية**

<u>أ-</u> طريقة بايوريت Biuret method

تتم هذه الطريقة من خلال استعمال تركيبة بايرويت ويعتمد أساس هذا التفاعل على تكوين لون ارجواني في المحلول الحاوي على البروتينات بسبب تكوين معقد بين ذرة النحاس في البايوريت مع النايتروجين في السلاسل

الببتيدية وتستخدم هذه الطريقة لتقدير كميات االبروتينات التي يكون تركيزها اعلى من 1 ملغم/سم في المحلول ولا تتحسس للتراكيز الاقل.

ب- طريقة برادفورد Bradford method

تعتمد هذه الطريقة على حقيقة أن صبغة الكوماسي بريلينت بلو Comassie Brilliant Blue 250 توجد بلون أحمر ولكن عند ارتباطها بجزيء البروتين تتحول إلى اللون الأزرق وتمتاز هذه الطريقة بحساسيتها للتراكيز المنخفضة من البروتين.

تجربة//حساب تركيز البروتين بصورة عامة في المحلول (محورة عن الطريقة المباشرة) .

المواد: جهاز المطياف ,محلول البروتين المرسب في التجارب السابقة ,Phosphate buffer

طريقة العمل:

1) يصفر الجهاز بواسطة البفر المستخدم في حفظ محلول البروتين المرسب بوضع 1 مل من البفر لوحده في cuvette.

2) تغسل الكيوفيت بالماء المقطر وتوضع 1مل من محلول البروتين المراد قياسه وتقاس الامتصاصية على 280 ثم تقاس على 235.

3) لمعرفة تركيز البروتين في المحلول تطبق المعادلة :

$$\text{تركيز البروتين}(\text{mg/ml}) : \frac{\mathbf{235}\,\text{O.D} - \mathbf{280}\ \text{O.D}}{2.51}$$

فوائد المواد المضافة

(Ethylene Diamine Acetic Acid) EDTA

يعمل على تحليل جدار الخلية وذلك لانه يقوم بسحب الايونات الموجبة (Mg^{+}) والتي تحافظ على استقرار اغشية وجدران الخلايا .

(Sodium Dodecyl Sulphate) SDS

منظف ايوني يعمل على إكمال تحلل الخلايا البكتيرية عن طريق ترسيب البروتينات ,كما تقوم بتفكيك الاواصر التي تربط البروتينات والشحوم في الغشاء البلازمي مما يجعلها تترسب (يحطم جدار الخلية وغشائها) ويمكن اضافة سترات الصوديوم (sodium citrate) التي هي عامل تكليب لغرض سحب عنصر الكاليسيوم من الغشاء البلازمي مما يؤدي الى تفكيك الغشاء البلازمي.

التكليب Chelation

يحصل التكليب من خلال اتصال الفلز بذرتين من ذرات العناصر الكالبة او اكثر,بحيث تتكون حلقة حول لفلز.تستعمل المكلبات لتحويل الماء العسر الى ماء يسر من خلال ازالة عنصري الكاليسيوم و المغنيسيوم منه كما تستعمل المكلبات لمنع التسمم من خلال احاطتها بالمواد السامه مثل الزرنيخ والزئبق داخل الجسم.

NaCl

يتأين الى Na^{+} و Cl^{-} ويرتبط مع البروتينات ويقوم بترسيبها,كما انه يحمي النهايات الفوسفاتية السالبة الطليقة في اللولب الحلزوني مما يسمح لشريطي اللولب بالتقارب وزيادة الالتفاف مما يفصله عن محتويات الخلية الاخرى ويجعله يترسب بسهولة.

ايثانول 100%

يقوم بترسيب DNA حيث يقوم بسحب جزيئات الماء وبالتالي تحويل DNA من الشكل الذائب الى الشكل غير الذائب وبالتالي ترسيبه.

TE

(يتكون من 50mM Tris-HCl مع20Mm EDTA) ويستخدم لاذابة DNA.

الكلوروفورم

مذيب عضوي له صفة قطبية (صفة القطبية للمذيب: وهو المذيب الذي يعمل على توزيع المحتويات الخلوية بين طورين مائي وعضوي) مثل الدهون والبروتينات وبقية المحتويات الخلوية في طور بيني اما الاحماض النووية فانها تكون موجودة بالطبقة المائية لقابليتها بالذوبان بالماء ,اما الطور السفلي يحتله الكلوروفورم لعدم قدرته على الامتزاج بالماء .

كلية الزراعة　　　　　　علم الحياة الجزيئي

قسم الانتاج الحيواني　　　　　　مدرس المادة: م.م. ضحى صلاح

المرحلة الرابعة　　　　　　المختبر الأول

الاجهزة والادوات المستخدمة في مختبر البيولوجي الجزيئي

هناك العديد من الاجهزة المتخصصة في مختبر البيولوجي الجزيئي فضلا عن الاجهزة التقليدية في المختبرات علوم الحياة الاخرى ومنها:

أولا : جهاز النبذ المركزي Centrifuge Apparatus في

هذا الجهاز يدار الجسم بحركة دورانية بسرع مختلفة واثناء الحركة الدورانية تتولد قوة تسمى بالقوة المركزية Central Force والتي تحرك الجسم بعيدا عن مركز الدوران.

تكون الفائدة من ذلك فصل مكونات العينة السائلة بمعدل يعتمد على حجم وشكل وكثافة مكونات العينة , حيث تضغط الجزيئات الاكبر بالوزن باتجاه الاسفل (القعر) ليتكون الراسب Deposit ام السوائل فتبقى بالاعلى .

يجب موازنة جميع انابيب النبذ المركزي المتقابلة وكلما زادت سرعة الجهاز كان لابد من الموازنة الدقيقة بحيث لا يتجاوز فرق الوزن في اجهزة النبذ المركزي عالية السرعة 0.0001 g وإلا فهناك احتمال ان يترك الراسب موقعه يتكون الرائق Supernatant. في البدء يجب ان يوضع الجهاز على سطح مستوي وان يكون بعيدا عن حافة السطح وبصورة عامة لابد من موازنة انابيب النبذ المركزي باستمرار مهما كانت السرعة المستخدمة لان هناك احتمال كبير في تحطيم الانابيب الزجاجية المحتوية على المحلول في حالة عدم الموازنة حيث يجب ان يوضع الانبوب مقابل الانبوب الاخر كما ويجب الموازنة بالحجم.

يمكن تقسيم اجهزة النبذ المركزي الى :

1- جهاز النبذ المركزي العادي المبرد　　　　Cooling Centrifuge

تستخدم في فصل الخلايا الميكروبية حيث تفصل المواد استنادا الى كثافها ووزنها وتتراوح سرعتها 0-6000 rpm/min وبدرجة حرارة تتراوح بينن 30-0مْ,علما ان درجة الحرارة المستخدمة لفصل الخلايا هنا هي 4مْ, اما الانابيب المستخدمة فيتراوح بين 5-100 ml .