

كلية الصيدلة

Faculty of Pharmacy

السنة الثالثة

مقرر الهندسة الوراثية (الجينية)

المحاضرة الثالثة

2019-2020

د. شادي سكرية

2- معايرة الحموض النووية باستعمال جهاز المطياف الضوئي

Spectrophotometer

تجرى معايرة محاليل الحموض النووية كأى مادة كيميائية أخرى ماصة للضوء باستخدام جهاز المطياف الضوئي، حيث يمكننا الكشف عن الحموض النووية المنحلة في محل ما وذلك بقياس درجة امتصاص المحلول للأشعة فوق البنفسجية بطول موجة قدرها 260nm، وهو طول الموجة الذي تمتص عنده الحموض النووية الضوء.

تقاس شدة امتصاص محلول ما للضوء بوحدة الكثافة الضوئية **Optic Density**. ولحساب تركيز محلول ما من الحموض النووية نستخدم العلاقة التالية:

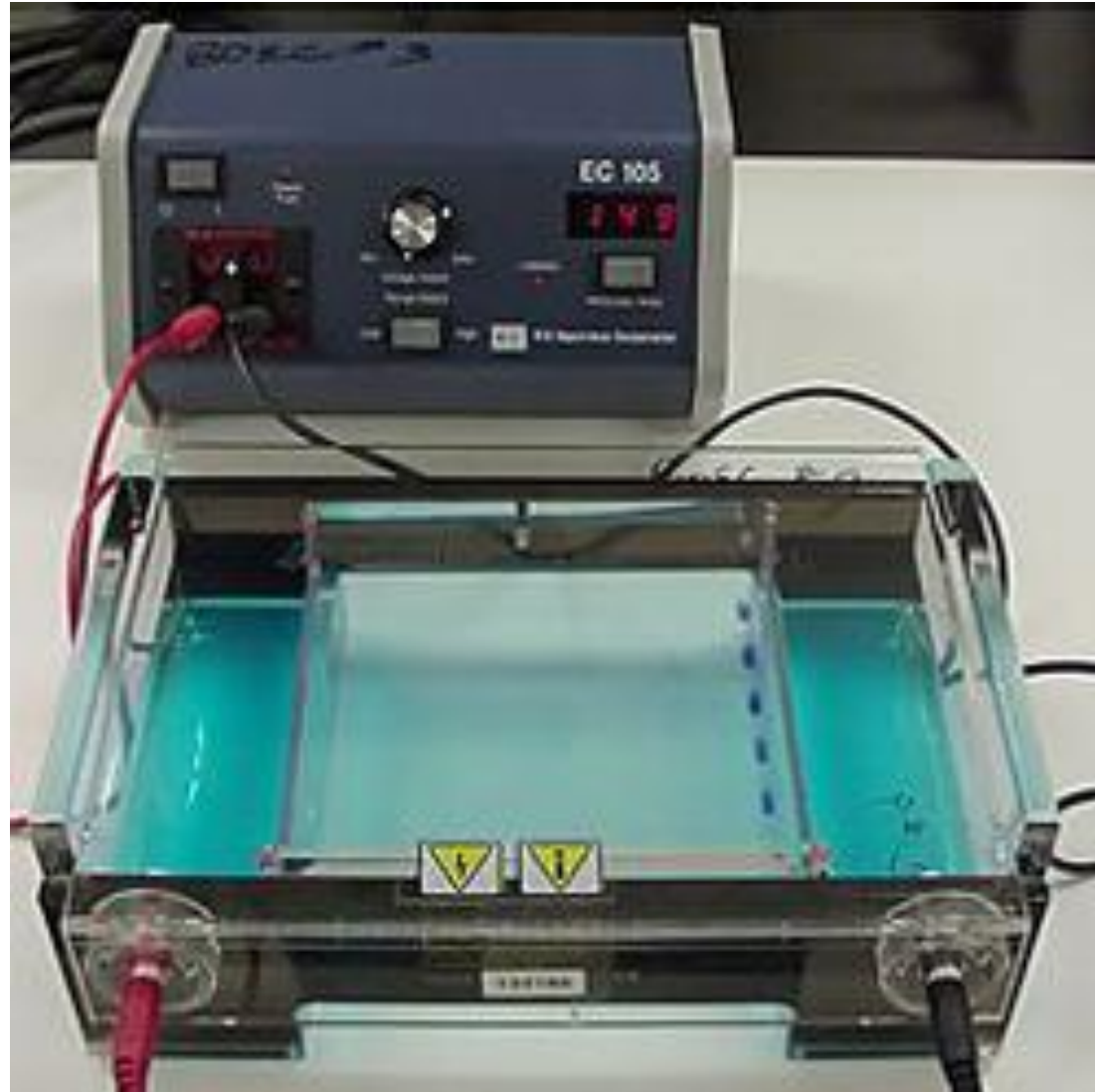
_ شدة امتصاص قدرها وحدة كثافة ضوئية واحدة على طول موجة 260nm تعادل تقريباً محلول تركيزه 50µg/ml من DNA ثنائي السلسلة و 40µg/ml من RNA أو DNA أحادي السلسلة.



تمرين

- قمت بتحضير محلول من DNA الجينومي وتريد معرفة تركيزه.
- أخذت 2µl منه ووضعتة في عبوة القياس (كوفيت) تحوي على 98µl من الماء المقطر، ومن ثم قرأت الامتصاصية على مقياس الطيف الضوئي فبلغت 0.2.
- احسب تركيز محلول DNA المحضر.

٣- الرحلان الكهربائي Electrophoresis



٣- الرحلان الكهربائي Electrophoresis

- تعتبر الحموض النووية واحدة من الجزيئات الكبيرة (الضخمة) Macromolecules المشحونة سلباً في الأوساط المعتدلة أو الأسسة (القلوية) وهذا يجعل من الممكن ترحيلها ضمن حقل كهربائي من القطب السالب إلى القطب الموجب.
- ولكن نسبة الشحنة إلى طول جزيء ما من DNA نسبة ثابتة مهما اختلف طول الجزيء
- فلتحديد طول شدة ما من DNA و لفصل مجموعة من الشداف المختلفة الطول يجب استخدام هلامة مسامية لإجراء الرحلان الكهربائي.
- حيث أن فصل الشداف حسب طولها يعود إلى القدرة الترشيحية للهلامة (خاصية الفلترية) الناتجة عن المسامية.

بشكل عام تتعلق حركية جزيء ما ضمن هلامة في حقل كهربائي بالكتلة الجزيئية للجزيء المرحل وحجم مسام الهلامة.

يمكن باختيار نوع المادة التي تصنع منها الهلامة وبتغير تركيز هذه المادة التحكم بحجم مسامها.

وتعد أكثر الهلامات استخداماً في الرحلان الكهربائي وفقاً لنوع المادة التي تصنع منها:

الهلامة المحضرة من عديد الأكريلاميد Polyacrylamide،

والهلامة المحضرة من الأغاروز Agarose .

تكون عادة المسافة التي تقطعها شذفة ما من DNA أثناء الرحلان الكهربائي على علاقة عكسية مع اللوغاريتم العشري لعدد أشفاح الأسس المكونة لها.

الهلامية المحضرة من عديد الأكريلاميد Polyacrylamide Gel

تتمتع هذه الهلامية بقوة فصل كبيرة بفضل المسام الصغيرة الناتجة عن بلمرة عديد الأكريلاميد.

يستعمل هذا النوع من الهلاميات بشكل عام لفصل شدة صغيرة من الحموض النووية أقل من 500 أساس (في حال RNA) أو شفع من الأسس (في حال DNA).

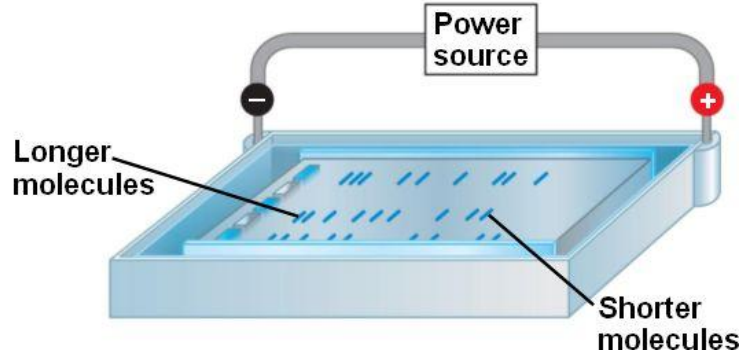
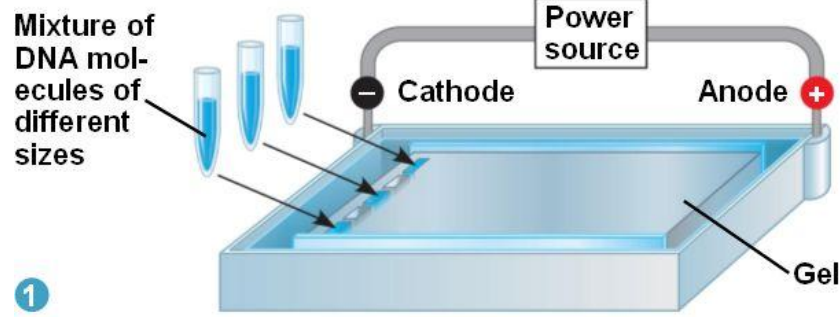
كما يستعمل هذا النمط من الهلاميات لفصل شدفتين من الحموض النووية لا يزيد طول احدهما عن الأخرى إلا بأساس واحد.

الهلامية المحضرة من الأغاروز Agarose Gel

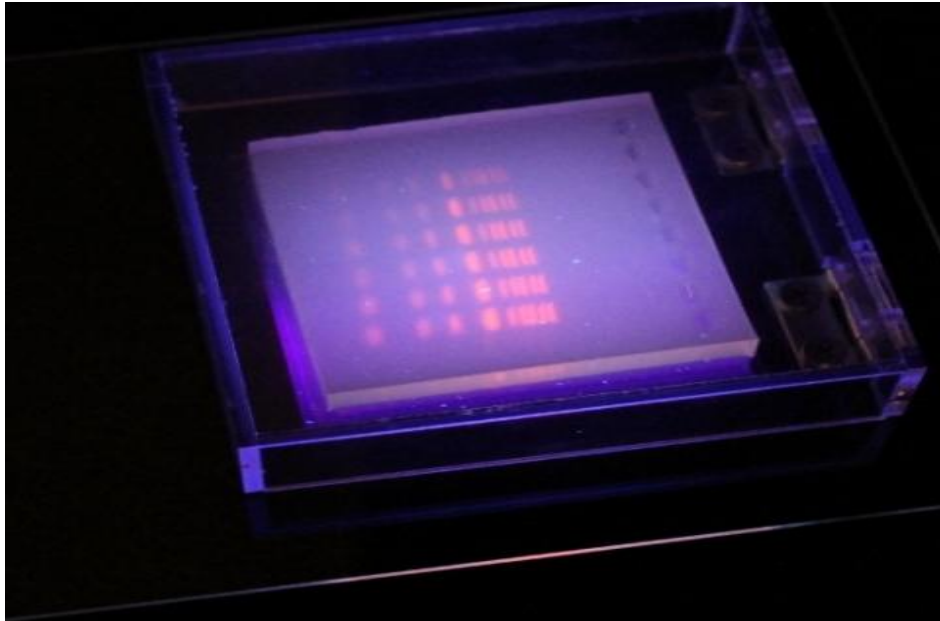
تعتبر هلامية الأغاروز الأكثر استخداماً في فصل الشداف المختلفة الطول من الحموض النووية، تتراوح الأطوال التي يمكن فصلها بسهولة بين 0.5 و 20 كيلو أساس وذلك **لأن المسام التي تحويها هذه الهلامية أكبر من مسام هلامية عديد الأكريلاميد.**

كما أنه يمكن التحكم بحجم هذه المسام بتغير تركيز الأغاروز المستخدم لتحضيرها.

وبحسب حجم الشدفة المراد فصلها نستخدم تراكيز مختلفة من الأغاروز وهذه التراكيز تتراوح عادة بين 0.5% و 2%.
إذ تستخدم التراكيز العالية لفصل الشداف الصغيرة (500 شفع من الأسس) والتراكيز المنخفضة لفصل الشداف الكبيرة حتى 20kb.



في حين لا يمكن فصل الشدفة الكبيرة جداً والتي يتجاوز طولها عشرين كيلو أساس بتقانة الرحلان الكهربائي التقليدي على هلامه الأغاروز مهما خفضنا من تركيز الهلامه.



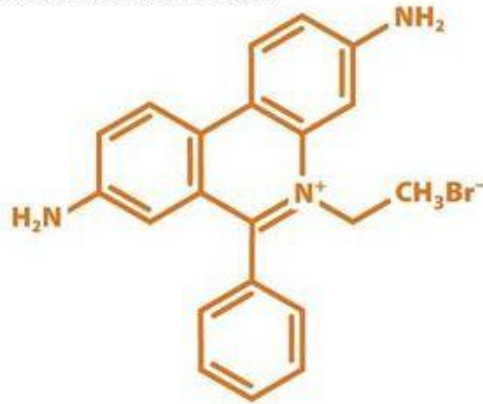
٣- الرحلان الكهربائي Electrophoresis

إظهار وقراءة هلامة الأغاروز بعد عملية الرحلان الكهربائي:

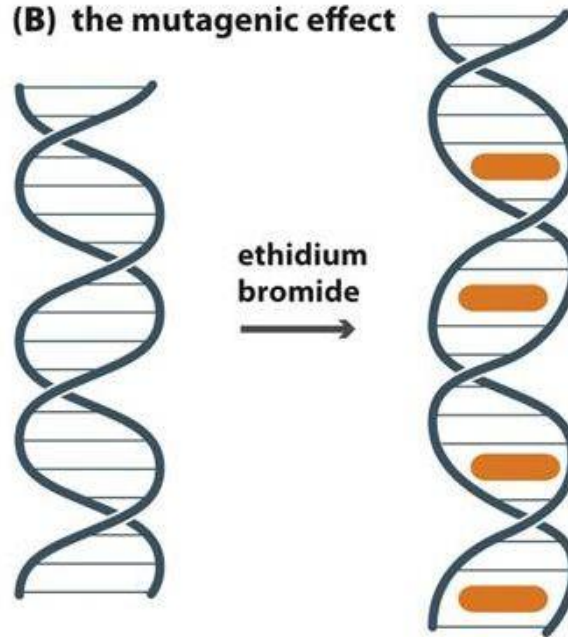
تستخدم لتظهير شدة DNA المرحلة على هلامة الأغاروز عدة أصبغة ملونة للـDNA، والأكثر شيوعاً واستخداماً هو **الأثيديوم برومايد Ethidium Bromide**. وهو عبارة عن مادة كيميائية غير متألقة في الحالة العادية وله القدرة على التداخل Intercalate بين شريطي الحلزون المزدوج لـDNA في هذه الوضعية ضمن الحلزون المزدوج يتألق بلون برتقالي إذا ما تمت إضاءته بالأشعة فوق البنفسجية قصيرة الموجة.

تضاء الهلامة بالأشعة فوق البنفسجية على طول موجة تتراوح بين 250nm و300nm عندها يظهر DNA بشكل عصائب ملونة باللون البرتقالي كما هو موضح في الشكل السابق.

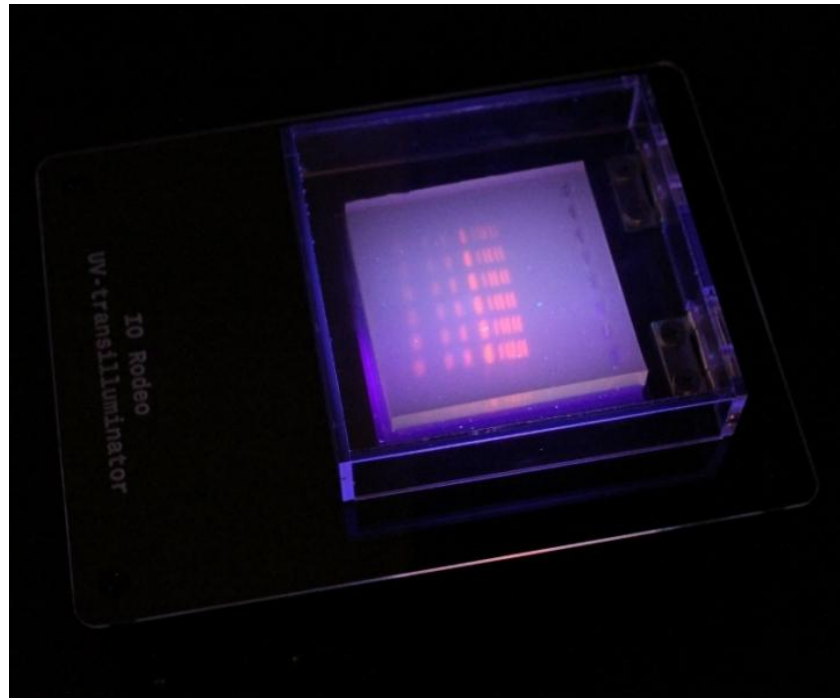
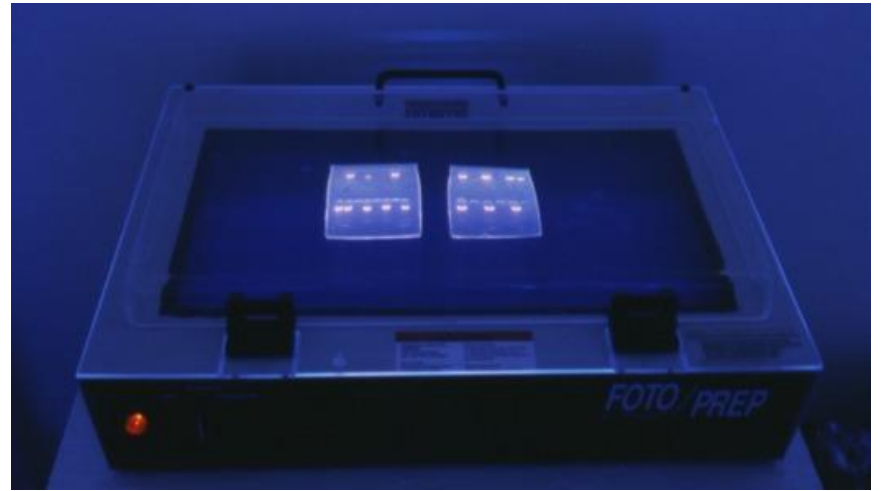
(A) ethidium bromide



(B) the mutagenic effect



Intercalation



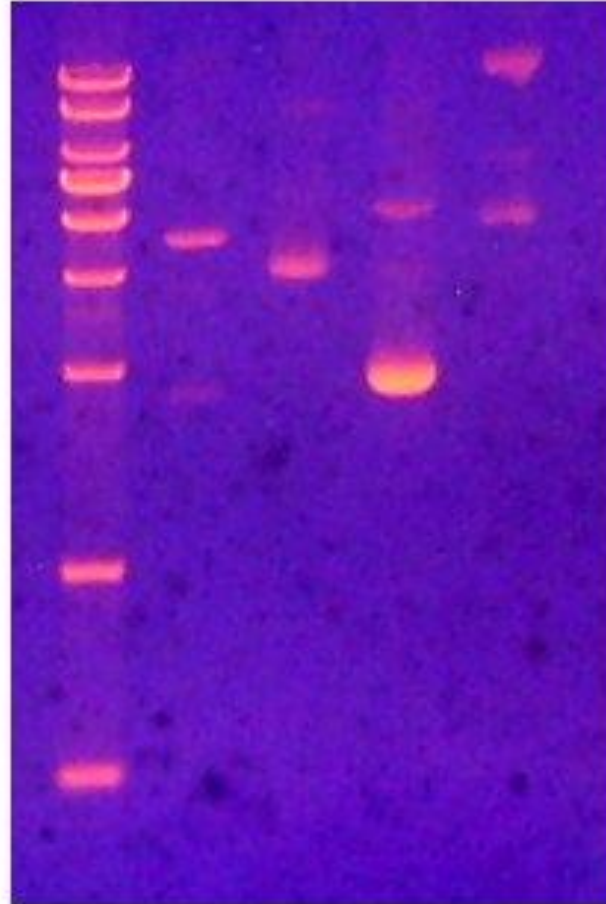
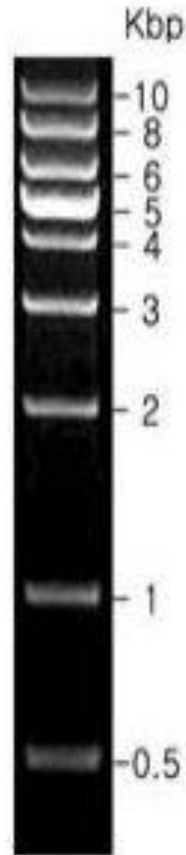
٣- الرحلان الكهربائي Electrophoresis

ولتوثيق نتائج الرحلان يمكن تصوير الهلامة باستخدام آلة تصوير حساسة للأشعة فوق البنفسجية UV أو آلة تصوير رقمية مزودة بمرشحة (فلتر) UV.

ويجب في كل مرة تجري فيها الرحلان الكهربائي وضع في أحد آبار الهلامة، وبجوار آبار العينات، كمية معينة من واسمات أطوال معيارية (عصائب معيارية) أو DNA معياري DNA sizes standards أو ما يعرف أيضاً بسلم DNA Ladder بحيث يصبح من السهولة التعرف على طول الشداف المرحلة بمقارنتها بالعصائب الواسمة المعيارية.

كمية معينة من واسمات أطوال معيارية (عصائب معيارية) أو DNA معياري DNA sizes standards أو ما يعرف أيضاً بسلم DNA Ladder بحيث يصبح من السهولة التعرف على طول الشداف المرحلة بمقارنتها بالعصائب الواسمة المعيارية.

[Figure 1]



Lane 1 : 1kb DNA ladder
2 : pSB3C5
3 : pSB3T5
4 : pSB1A3-GFP
5 : pSB2K3-RFP

استعمالات الرحلان الكهربائي

As **an analytical technique** to estimate the size, (the quantity) of nucleic acid molecules by comparison with the migration of molecules of known length (known concentration)

Check an enzymatic reaction : digestion restriction, PCR.....

رحلان كهربائي تحليلي: يهدف إلى تقدير طول الشداف المختلفة من DNA وتحديد كمياتها وذلك بالمقارنة مع أطوال واسمات معيارية (سلم DNA) كما يهدف إلى تحليل نتائج تفاعلات كيميائية تجري على DNA، نواتج تقطيع DNA أو نواتج تفاعلات PCR.

Electrophoresis is used

As **a preparative technique** to separate one DNA fragment

رحلان كهربائي تحضيري: يهدف إلى فصل شداف DNA عن بعضها ومن ثم تنقية الشداف من الهلام، عن طريق قطع الهلام حول الشدفة بالطول المطلوب ومن ثم تنقية DNA.