

الانبار	الجامعة
التربية للبنات	الكلية
علوم الحياة	القسم
الرابعة	المرحلة
البايولوجي الجزيئي	اسم المادة باللغة العربية
Molecular biology	اسم المادة باللغة الانكليزية
م.م. نبأ قيس جميل	اسم التدريسي
تقدير تركيز و نقاوة DNA	عنوان المحاضرة باللغة العربية
Estimation of DNA concentration and purity	عنوان المحاضرة باللغة الإنكليزية
7	رقم المحاضرة
Bergtrom,Gerald.Basic Cell and Molecular Microbiology and Molecular Biology Reviews	المصادر او المراجع

### تقدير تركيز ونقاوة ال DNA

تقدير تركيز ال DNA المستخلص ونقاوته:

بعد عملية استخلاص الدنا من اهم العمليات الواجب اجراءها لتقييم كفاءة عملية الاستخلاص هو تقدير تركيز الدنا ونقاوته والتي على اساسها نستمر بالعمليات اللاحقة التي من اجلها استخلص الدنا او يتم اعادة عملية الاستخلاص.

يتم تقدير تركيز الدنا من خلال تسجيل الامتصاصية للعينة على طول موجي (nm) nanometers (260 or الا ) من خلال معلومة ثابتته هي اذا كانت 0 )

هو من 50 ug/ml pure dsDNA (اي ان تركيز الدنا مزدوج الشريط هو 50 مايكرو غرام في كل مل من المحلول الذي تم قياسه) وبالتالي يمكن استخراج تركيز الدنا من خلال المعادلة التالية:

$$\text{Concentration (ug/ml)} = A_{260} \text{ reading} \times \text{dilution factor} \times 50\text{ug/ml}$$

\*عند 260 nm A يعطي الدنا افضل امتصاصية في حين تعطي البروتينات والمركبات الاروماتية افضل امتصاصية عند 280 nm A في حين تعطي الاملاح والفينولات افضل امتصاصية عند 230 nm A ومن خلال هذه المعلومات بالتالي يمكننا معرفة مايلي:

نقاوة الدنا وكمية الملوثات من خلال :  $A_{260}/A_{280}$  كلما كانت هذه النسبة تتراوح بين 1.7 الى 2 كلما كان فضل اما اذا قلت النسبة عن المدى اعلاه فيدل ذلك على التلوث بالبروتينات واذا زادت يدل

على التلوث بال RNA .

نقاوة الدنا وكمية الاملاح من خلال : A260/A230 كلما كانت هذه النسبة اكبر او تساوي 1.5 كلما كان افضل ويعني ان كمية الاملاح في عينة الدنا قليلة.  
يمكن اجراء هذه القياسات بواسطة جهاز النانو دروب لكن لكفته المادية لايتوفر في كل المختبرات.

جدول يوضح نقاوة الدنا حسب قراءة الامتصاصية على 280/260

260 / 280 OD ratio	Quality
1.2_1.4	Bad
1.4_1.6	Poor
1.6_1.8	Good
1.8_2	Very good

.وبما ان القراءات اعلاه تعتمد على قراءة الامتصاصية للبروتينات والدنا فان القراءة التي تتراوح بين 1.2\_1.4 تدل على ان نسبة البروتينات اعلى من الدنا في المحلول اما القراءة 1.8\_2 تدل على ان نسبة الدنا عالية جدا قياسا بالبروتينات التي تكون جدا قليلة وتكاد تكون معدومة في المحلول.  
على ان نسبة البروتينات اعلى من الدنا في المحلول اما القراءة 1.8\_2 تدل على ان نسبة الدنا عالية جدا قياسا بالبروتينات التي تكون جدا قليلة وتكاد تكون معدومة في المحلول.  
طريقة العمل:

1. شغل الجهاز وانتظر حتى يمر الجهاز بإجراءات بدء التشغيل.
2. افتح الغطاء الموجود أعلى الجهاز. اختر حامل الكوفيت الصغير وضعه في الحامل أمام مصدر

الضوء.

3. انقر فوق مفتاح ضوء الأشعة فوق البنفسجية لتشغيل الأشعة فوق البنفسجية. يستغرق تسخين مصباح الأشعة فوق البنفسجية حوالي دقيقة. عندما تظهر قائمة تحليل الأحماض النووية ، تأكد من أن قيم الامتصاص المقاسة هي 260 و280.

4. استخدم ورق العدسة لتنظيف أسطح الكوفيت. اغسل حجرة الكوفيت كحول الايثانول 70 % . تأكد من إزالة كل الكحول بعد الغسل بالماء المقطر. ضع 1000 ميكرو لتر من عينة فارغة (ماء مقطراو ، TE ، مهما كانت عينة الخاصة بك المذابة) في حجرة الكوفيت. ضع الكوفيت في الحامل وضع الغطاء على الحات AAS

5. أغلق غطاء الجهاز

6. انقر فوق قراءة فارغة (990 ميكرو لتر من الماء المقطر + 10 ميكرو لتر من TE) اما اذا كانت النماذج مذابة بالماء

المقتر يضاف 1 مل من الماء المقطر فقط ، احينا نضاعف الكمية في حال كون حجم الكوفيت كبير (1980 بيكرو لتر من الماء المقطر + 20 ميكرو لتر من TE) او 2 مل من الماء المقطر .

7. قم بإعداد تخفيف 100 : 1 للعينة التي تريد قراءتها. إضافة 990 ميكرو لتر من محلول الاذابة (الماء المقطر او ) + 10 ميكرو لتر عينة او إضافة 1980 ميكرو لتر من محلول الاذابة (الماء المقطر او ) (0 ميكرو لتر عينة DNA).

8. بعد ان يقرأ الجهاز العينة البلائك (السيطرة) ، اخرج الكوفيت الخاص بالبلائك من الجهاز .

9. انقر فوق "قراءة العينات" في الجزء العلوي الأيسر من الشاشة.

10. بعد أن يقوم الجهاز بقراءة العينة الخاصة بك ، ستظهر البيانات على الشاشة. اذا تسجل البيانات ع الطول لموجي OD2800 / D260 لكل عينة.

11. بين العينات قم بتنظيف الكوفيت وعند الانتهاء من قراءة العينات ، قم بإزالة وتنظيف الكوفيت وضعه بعيداً.

12. احسب تركيز عينة DNA و OD2800 / D260 حسب المعادلة ادناه

$$\text{Concentration (ug/ml)} = \text{A260 reading} \times \text{dilution factor} \times 50\text{ug/ml}$$

أما النقاوة فيتم تقديرها من حاصل قسمة قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي (260) نانوميتر على

قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي (280) نانوميتر . (Maniatis وآخرون، 2001).  
تمرين: اذا خففت عينة ال DNA 100 مرة وكانت قراءة جهاز المطياف الضوئي 0.32 على A260

، بتطبيق المعادلة يمكن معرفة تركيز ال DNA :

$$\text{Concentration (ug/ml)} = \text{A260 reading} \times \text{dilution factor} \times 50\text{ug/ml}$$

$$\text{Concentration (ug/ml)} = 0.32 \times 100 \times 50\text{ug/ml} = 1600 \text{ ug/ml}$$

النتيجة اعلاه تمثل كمية الدنا في كل واحد مل وبالتقسيم على 1000 يمكن معرفة كمية ال DNA في

كل مايكروليتر من العينة والتي تعادل 16 ng/ul



