

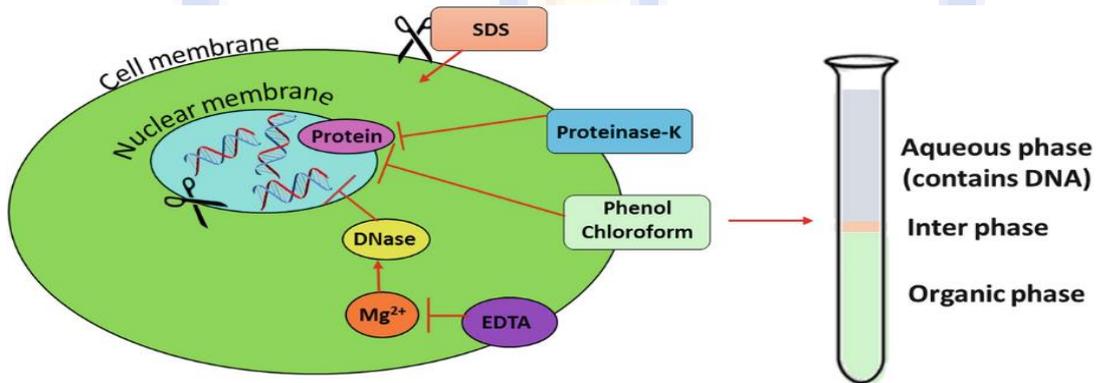
التربية للعلوم الصرفة	الكلية
علوم حياة	القسم
Practical Molecular Biology	المادة باللغة الانجليزية
البايولوجي الجزيئي العملي	المادة باللغة العربية
الرابعة	المرحلة الدراسية
م.م. حسين رياض عبدالكريم	اسم التدريسي
Estimation of DNA concentration and purity	عنوان المحاضرة باللغة الانجليزية
تقدير تركيز ونقاوة الـDNA	عنوان المحاضرة باللغة العربية
5	رقم المحاضرة
Watson, J.D.; Baker, T.A.; Bell, S.P.; Gann, A. (2004). Molecular Biology of the Gene. 5th Ed. Pearson edution	المصادر والمراجع
Clark, D. (2006). Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution. Elsevier Inc.	
Santos, D.M. (2011). Genetic Engineering, Recent Developments in application. Apple Academic press.	
عماش، هدى صالح مهدي.(١٩٩٤). مبادئ علم الحياة الجزيئي. كلية العلوم . جامعة بغداد.	
البكري ، غالب حمزة.(١٩٩٠). مبادئ الهندسة الوراثية. جامعة البصرة.	

محتوى المحاضرة



البايولوجي الجزيئي العملي

لطلاب كلية التربية للعلوم الصرفة | قسم علوم الحياة | المرحلة الرابعة



المختبر الخامس : تقدير تركيز ونقاوة الـ DNA

تقدير تركيز الـ 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 260 nanometers (nm) or A260 (A=Absorbance) من خلال معلومة ثابتة هي اذا كانت $O.D.A_{260}=1$ فهذا يدل الى ان تركيز الدنا هو من 50 $\mu\text{g/ml}$ 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:

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

* عند 260 nm يعطي الدنا افضل امتصاصية في حين تعطي البروتينات والمركبات الاروماتية افضل امتصاصية عند 280 nm في حين تعطي الاملاح والفينولات افضل امتصاصية عند 230 nm 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 افضل اما اذا قلت النسبة عن المدى اعلاه فيدل ذلك على التلوث بالبروتينات واذا زادت يدل على التلوث بالـ RNA .
نقاوة الدنا وكمية الاملاح من خلال : A_{260}/A_{230} 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 260/280

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 فأن القراءة التي تتراوح بين 1.4_1.2 تدل على ان نسبة البروتينات اعلى من الدنا في المحلول اما القراءة 2_1.8 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 و 280.
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 DNA أو RNA الخاصة بك المذابة) في حجرت الكوفيت. ضع الكوفيت في الحامل وضع الغطاء على الحامل.
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 المقطر يضاف 1 مل من الماء المقطر فقط , احينا نضاعف الكمية في حال كون حجم الكوفيت كبير (1980 ميكرو لتر من الماء المقطر + 20 ميكرو لتر من TE) او 2 مل من الماء المقطر.
7. قم بإعداد تخفيف 1: 100 للعينة التي تريد قراءتها. إضافة 990 ميكرو لتر من محلول الاذابة (الماء المقطر او TE) + 10 ميكرو لتر عينة DNA او إضافة 1980 ميكرو لتر من محلول الاذابة (الماء المقطر او TE) + 02 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 الموجي OD260 / OD280 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 OD260 / OD280 حسب المعادلة ادناه

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

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).

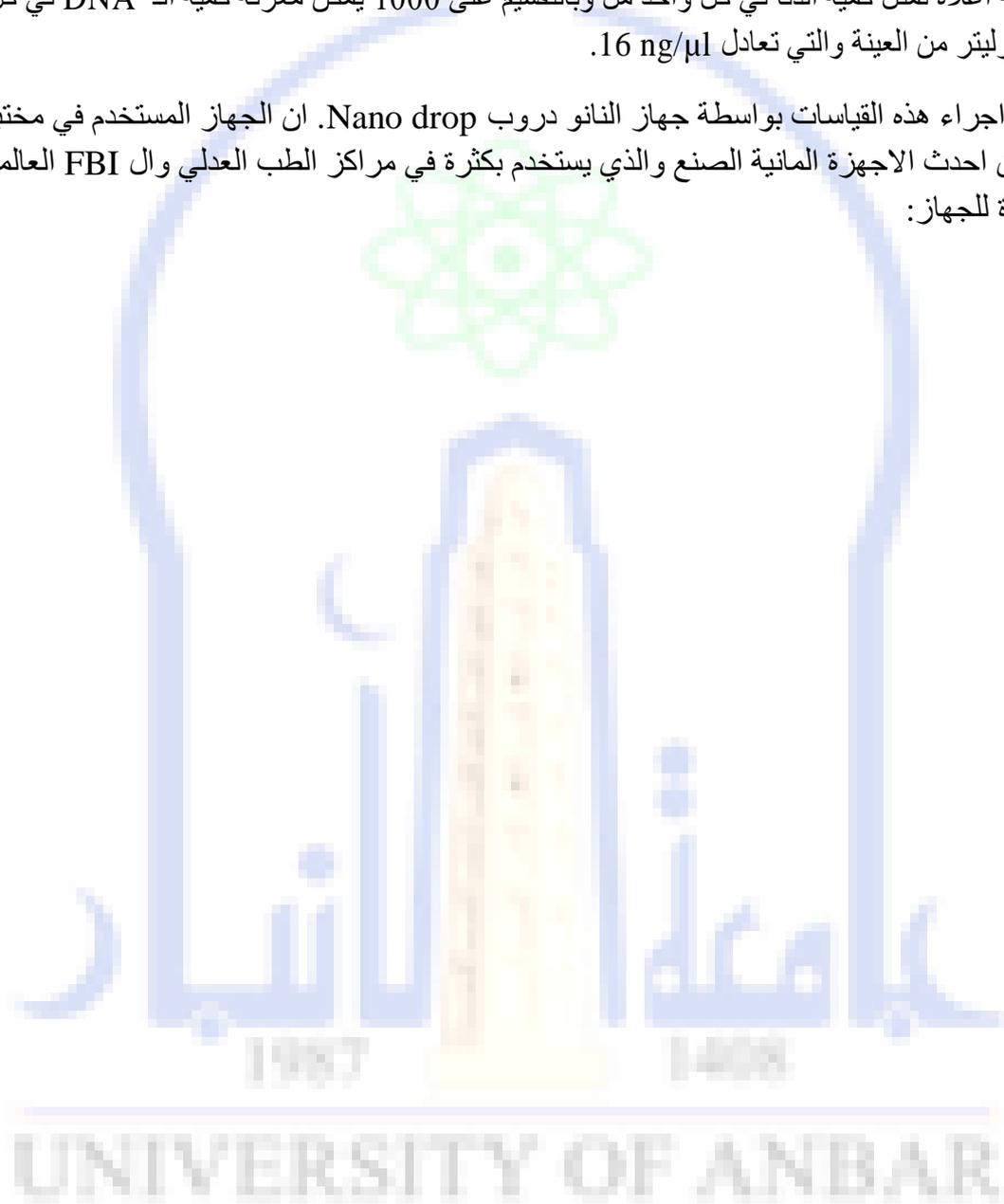
تمرين: اذا خففت عينة الـ DNA 100 مرة وكانت قراءة جهاز المطياف الضوئي 0.32 على A260 , بتطبيق المعادة يمكن معرفة تركيز الـ DNA:

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

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

النتيجة اعلاه تمثل كمية الدنا في كل واحد مل وبالتقسيم على 1000 يمكن معرفة كمية الـ DNA في كل مايكروليتر من العينة والتي تعادل 16 ng/μl.

يمكن اجراء هذه القياسات بواسطة جهاز النانو دروب Nano drop. ان الجهاز المستخدم في مختبراتنا هو من احدث الاجهزة المانية الصنع والذي يستخدم بكثرة في مراكز الطب العدلي وال FBI العالمية. ادناه صورة للجهاز:



7" Color Touch Screen

Illuminated Sample Window

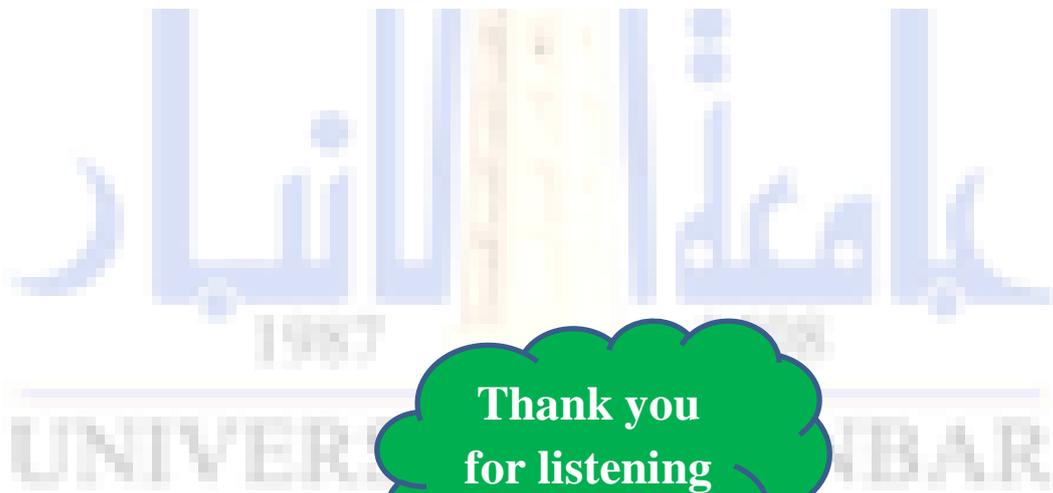


Temperature Controlled Cuvette Holder

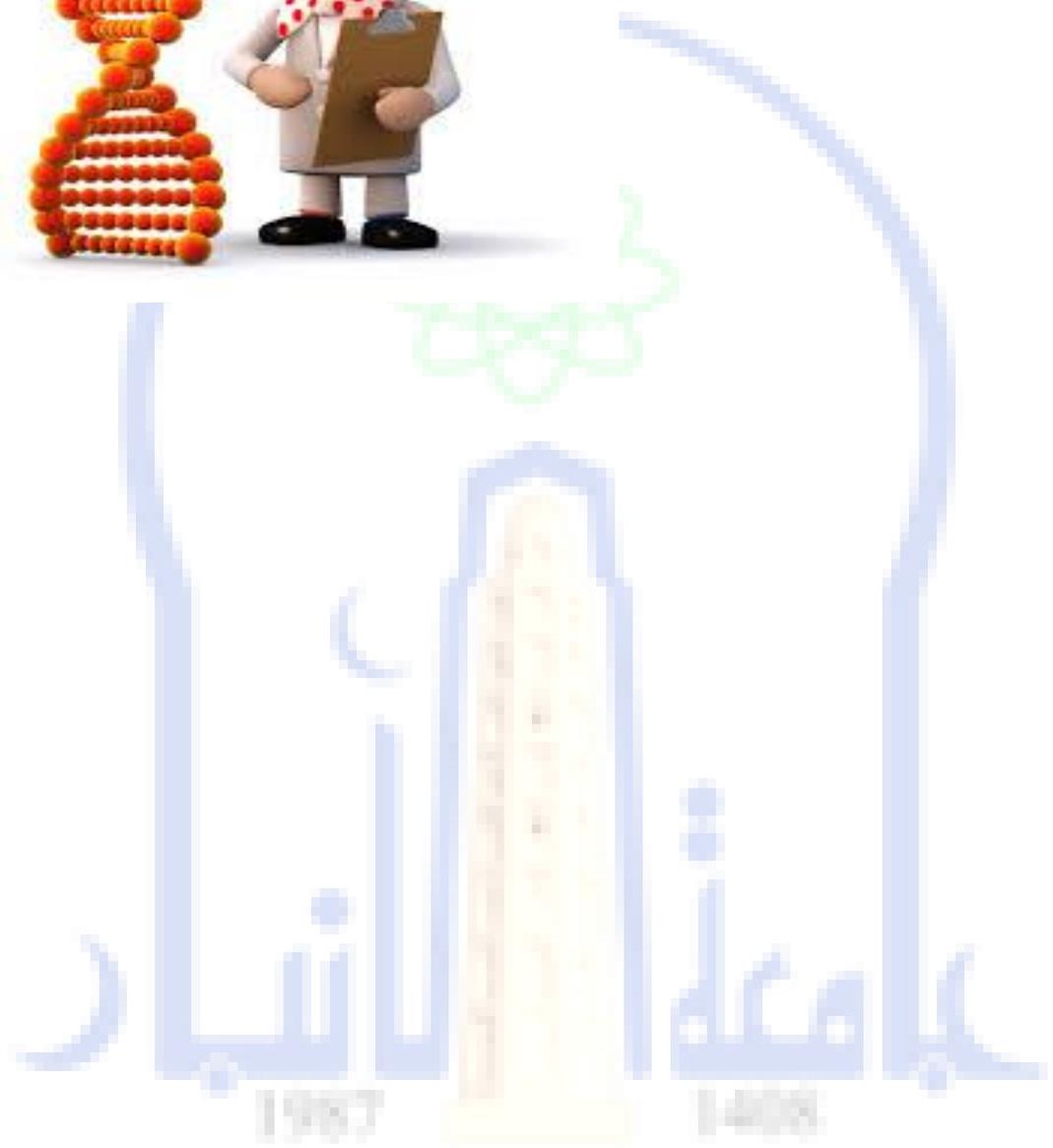
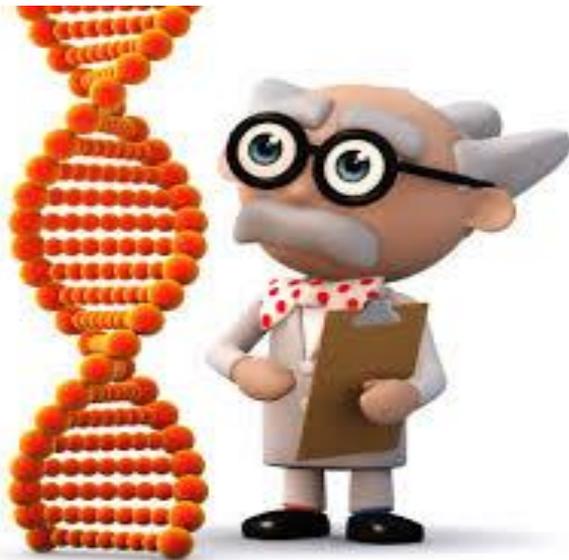
Power Indicator

Low Vibration Vortexer

Front USB Port



Thank you
for listening



UNIVERSITY OF ANBAR