مختبر ٩

تقدير كمية ونوعية الأحماض النووية (DNA & RNA)

Estimation of quantity & quality of nucleic acid (DNA & RNA)

تستخدم عدة طرق في تقدير كمية ونوعية الأحماض النووية منها:

١- South membrane blot
٢- North membrane blot
٣- Nucleic acid sequencer
٤- Spectrophotometer
٥- Electrophoresis

وسوف نتطرق في هذا المختبر إلى الطريقتين الأكثر شيوعا :

الترحيل الكهربائي Electrophoresis:

يعرف بأنه فصل الجزيئات (الأحماض النووية، البروتينات) في حقل كهربائي اعتمادا على حجمها خلال Agarose gel أو Polyacrylamide gel .

حيث إن الجزيئات المشحونة (DNA مشحونة بالشحنة السالبة لامتلاكها مجموعة الفوسفات) تهاجر باتجاه القطب المغاير (القطب الموجب anode).

العوامل المؤثر على تقنية الترحيل الكهربائي هي:

١- **التيار الكهربائي:** محلول المنظم (TBE,TAE) Buffer هو عبارة عن مجموعة من الأملاح وهو المسوؤل عن توصيل التيار الكهربائي في حقل الترحيل.
٢- **شحنة الجزيئات:** حيث تتحرك الجزيئات بالاتجاه المعاكس لشحنتها .
٣- **حجم وشكل الجزيئات:** يتغير تركيز الجيل بالاعتماد على حجم الجزيئات (DNA أو البروتين) حيث تمر هذه الجزيئات من خلال فتحات داخل الجيل فكلما كان حجم القطعة المرحلة صغير زاد تركيز الجيل والعكس صحيح، عندما يزداد تركيز الجيل تصغر الفتحات فتكون مناسبة للقطع الصغيرة وهكذا. وعلية نستنتج أن في حالة ترحيل Total DNA يكون تركيز الجيل اقل من ترحيل جين (قطعة من الـ DNA).
شكل الجزيئة ان كانت خطية او دائريه او خيط مزدوج يؤثر على سرعة الترحيل.

٤- **درجة الحرارة:** تؤثر درجات الحرارة العالية على البروتينات وتسبب في تلفها لذلك يجب ان نحافظ على الترحيل بدرجات حرارة معتدلة. بينما لاتتأثر الـ DNA بدرجات الحرارة العالية لذلك يبقى محفوظ بالمومياء لعدة سنوات دون تلف.

٥- نوع المادة الأساس الداخلة في الترحيل من مميزاتها مادة قابلة للتعديل على الرغم من ان حجم الثقوب منتظم وخاملة كيميائيا. إما اختيار المادة الأساس فيعتمد بصورة مبدئية على حجم الجزيئات المراد فصلها وهناك مادتين أكثر انتشارا واستخداما في هذه العملية هما:

أ- **Agarose gels:** سلسله متشابكة من السكريات المتعددة المكونة من الجالكتوز ومشتقاته والمرتبطة مع بعضها بأواصر هيدروجينية لتكوين شبكة معقدة.

ب- **Polyacrylamide:** هي ارتباط مادة الاكريلامايد المتبلورة مع مادة بز- اكريلامايد -bis acryamide لتكوين شبكة معقده ذات ثقوب اصغر قطرا من تلك الموجودة في هلام الاجاروز. لذلك يكون أكثر ملائمة لفصل الجزيئات الصغيرة.

هناك اختلاف بين المادتين فتتميز مادة Polyacrylamide gel عن Agarose gel:

١- يمتلك درجة انصهار واطئة جدا.
٢- ترحيل الجزيئات الصغيره بكميات كبيره بدون أي خساره للمادة.
٣- في عملية تنقية الـ DNA من Polyacrylamide تكون القطعه اكثر نقاوة.

صبغات الترحيل الكهربائي Electrophoresis dyes:

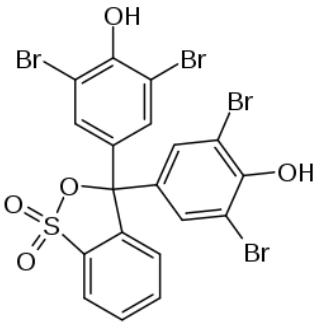
١- Bromophenol blue:

تركيبها (3,3,5,5- tetrabromophenolsulfonphthalein) لها عدة استخدامات منها تستخدم كمؤشر حامضي- قاعدي حيث تكون ذات لون اصفر عند PH=3 وبلون ارجواني عند PH=4.6 . ويكون التفاعل عكسي وتعود هذه الظاهرة لوجود phenolphthalein في تركيبة الصبغة.

كما انها تستخدم كصبغة حيث بالوسط المتعادل حامضيا تمتص الضوء الاحمر بقوة وترسل لون ازرق . بالوسط الحامضي الصبغة تمتص الضوء البنفسجي والأزرق فتظهر كصبغة صفراء اللون . عند االدالة الحامضية 3.6 يكون لون الصبغه احمر الى اخضر. فتسمى هذه الظاهرة بـ dichromatic colour. تغير اللون يكون حسب زيادة او نقصان التركيز فتسمى بالقيم المرتفعه بـ Kreft's dichromaticity index.

كما تستخدم هذه الصبغه كدلائل لونية في عملية الترحيل الكهربائي حيث انه يحمل شحنة سالبة عند الدالة الحامضية المتوسطة لذلك يهاجر مع جزيئات المرحلة . يختلف معدل الهجرة حسب تركيز الجيل وتركيب المحلول ففي ظروف الترحيل المذكورة بالتجربة يتحرك الجيل 500bp مع الـ DNA . وهناك صبغات اخرى تستخدم كدلائل لونية مثل Xylene cyanol and Orange G.

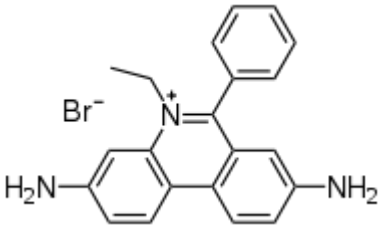
كما يدخل في تركيب هذه الصبغة مادة السكروز والكليسيرول حيث تعمل على تثقيل الـ DNA واستقراره بحفر الجيل.



Bromophenol blue (للاطلاع فقط)

٢- Ethidium bromide:

مادة مشعة تركيبها (3,8-diamino-6-ethyl-5-phenyl-phenanthridium bromide) وتعتبر من العوامل المتداخلة intercalating agent ومختصرها الشائع EtBr لها أضرار صحية حيث تكون من المركبات المسرطنة بسبب احتواءها على مجموعة ثنائية مستوية تتداخل بين القواعد النايتروجينية وتعمل على إزاحتها مما يسبب حدوث طفرات يظهر تأثيرها خلال فترات زمنية طويلة. يزداد اللون البرتقالي المشع للصبغة عند ارتباطها بالـ DNA وبذلك يمكن من خلالها تحديد مواقع الحزم وتقدير كمية الجزيئات في كل حزمة حيث تتناسب شدة تألق الحزم تحت ظروف التصبيغ الصحيحة طرديا مع كمية الحامض النووي في الحزمة.



Ethidium bromide (للاطلاع فقط)

المحاليل المنظمة (buffers) في الترحيل الكهربائي:

تستخدم في الترحيل الكهربائي نوعين من المحاليل المنظمة TAE,TBE الفرق بينهم هو:

١- سعة التنظيم الدالة الحامضية تكون واطئة في محلول الـ TAE مما قد يؤدي إلى استهلاك المحلول أثناء استمرار الترحيل.
٢- يعتبر TAE محلول أكثر ملائمة لترحيل الجزيئات ذات الأحجام الكبيرة.
٣- تتميز عينة الـ DNA المرحلة باستخدام محلول الـ TBE بامكانية الحفاظ على سلامة القطعة بحيث تكون أكثر ملائمة للتنقية واستخدامها في باقي التجارب.

٤- تتحرك جريئة الـ DNA في محلول TAE أسرع بحوالي ١٠% من الـ TBE .
ان التركيز العالي للأملاح في كلتا المحلولين مثلا تركيز ملح كلوريد الصوديوم يعيق حركة الجزيئات المرحلة.

فوائد الترحيل الكهربائي:

١- تعين حجوم الجزيئات اعتمادا على المسافة التي تقطعها هذه الجزيئات في الجيل حيث تتناسب المسافة المقطوعة عكسيا مع وزنها الجزيئي.

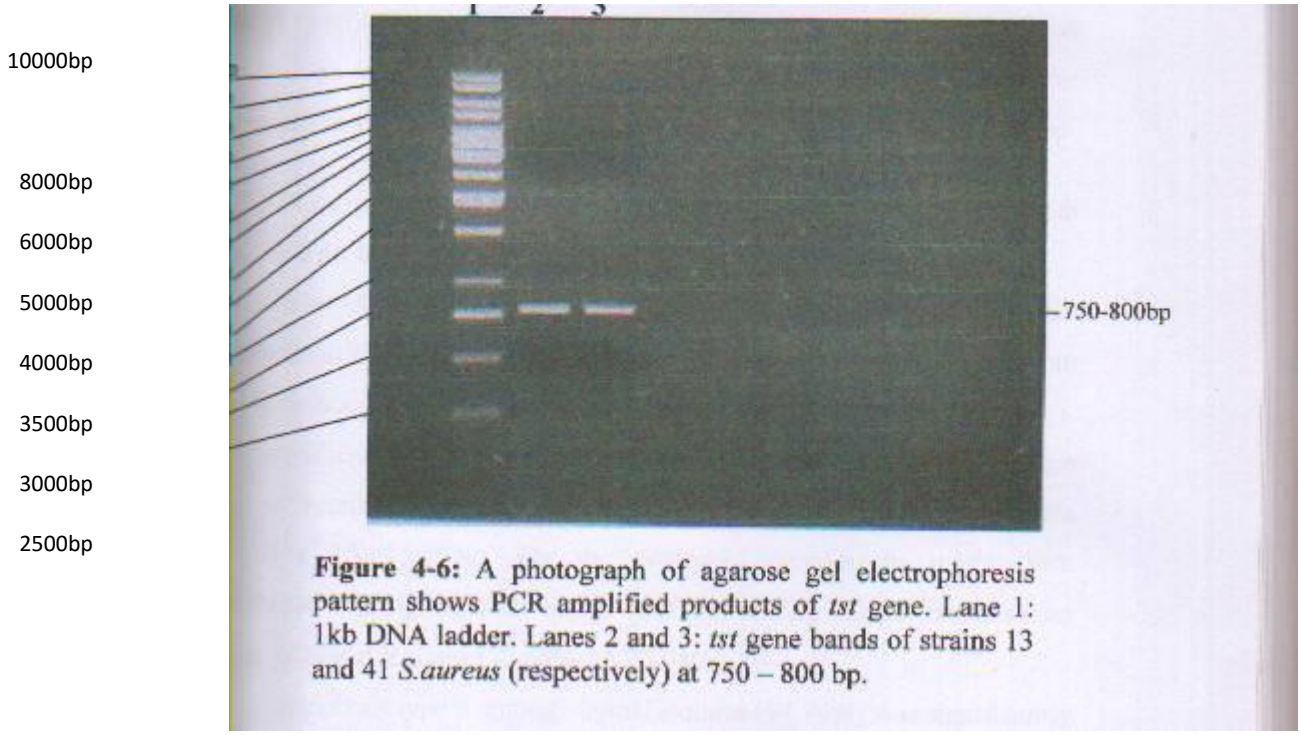
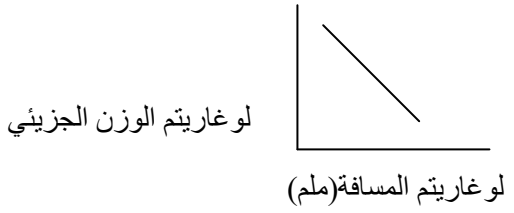


Figure 4-6: A photograph of agarose gel electrophoresis pattern shows PCR amplified products of *tst* gene. Lane 1: 1kb DNA ladder. Lanes 2 and 3: *tst* gene bands of strains 13 and 41 *S.aureus* (respectively) at 750 – 800 bp.

يمكن رسم العلاقة البيانية بين لوغاريتم المسافة التي تقطعها مجموعة من الجزيئات ولوغاريتم أوزانها الجزيئية خطا مستقيم.



٢- استخراج الأوزان الجزيئية للقطع المرحلة كهربائيا باستخدام منحنى الدلائل الحجمية.
٣- تنقية جزيئه الـ DNA من بين خليط من القطع المختلفة.
٤- تحديد خرائط التقيد وذلك بمعاملة جزيئة الـ DNA بعدد من انزيمات التقيد بصورة منفردة وتعين اعداد وأحجام القطع الناتجة في كل معاملة بوجود الدلائل الحجمية Ladder .
٥- فصل الأشكال الفيزيائية المختلفة لجزيئة الـ DNA مثلا بلازميد pBR322 يمكن ان يكون على ثلاث اشكال فقد يكون على شكل دائرة مغلقة تساهميا او دائرة مفتوحة او جزيئة خطية. وعلى الرغم من تماثل الوزن الجزيئي لهذه الاشكال الا ان معدل هجرتها على الجيل يكون مختلفا بحيث يكون لكل شكل منها حزمة في موقع معين في الهلام حيث ان الطبيعة الفيزيائية للاشكال الثلاثة هي التي تسبب اختلاف بمعدل الهجرة حيث أن الشكل الدائري المفتوح أبطأ من غيره حيث لايمتلك الشكل المضغوط الذي تتميز به الجزيئة الدائرية المغلقة تساهميا والذي يساعدها على المرور بسرعة خلال ثقوب الهلام كما لايمكنها العبور بسهولة خلال الثقوب كما في الجزيئة الخطية (الدائرة المغلقه اسرع ثم الخطية وبعدها الدائرية المفتوحة).

Materials and Method

Chemicals and Instruments الأجهزة والمواد الكيميائية

Instruments

Metter balance

Hotplate

PH-Meter

Autoclave

Micropipettes

Tibs

Parafilme

Electrophoresis

Power supplier

UV light transillminator

Chemicals

Agarose

0.5X-TBE buffer

Bromophenol blue

مختبر وراثة أحياء مجهرية
Ethidium bromide

<u>Working Solution</u>

0.5X TBE Electrophoresis Buffer

-100 mL 5X TBE.

- 900 mL Distilled water (D.W).

100 ml of 5X TBE were mixed well with 900ml of D.W.

طريقة العمل Protocol:

تتضمن طريقة العمل ثلاث مراحل هي:

أ- **تحضير الجيل Preparation of gel:**

١- ضع ٢٥ مل من TBE buffer0.5X في بيكر.
٢- نزن 0.2gm من Agarose واضيفه الى البفر.
٣- اضيف 0.5µl من صبغة Ethidium bromide بتركيز (10mg/ml) الى البفر.
٤- وضع المزيج على hot plate الى حد الغليان الى أن تذوب كل المكونات.
٥- يترك الجل يبرد في درجة حرارة الغرفة.

ب- **تحضير قالب الجيل Preparation Casting gel:**

١- وضع المشط في إحدى النهايتين لقالب جيل الأگاروز.
٢- صب الجيل بعد سد نهايتي القالب لكي لايترسب الأگاروز من الجوانب وتركه ليبرد بدرجة حرارة الغرفة.
٣- وضع القالب في تجويف الترحيل الكهربائي بعد رفع المشط بدقة عالية.
٤- ملا تجويف الترحيل الكهربائي بمحلول 0.5X TBE buffer بحيث يغطي الجيل بصورة كاملة.

جـ- إضافة العينة:

١- امزج 9µl من العينة المراد ترحيلها مع 3µl من Bromophenol blue على ورقة parafilme ثم توضع في حفر الجيل.
٢- ربط الأقطاب بصورة مناسبة بحيث يربط القطب الموجب بالموجب الموجود بمجهز الطاقة لجهاز الترحيل الكهربائي والقطب السالب بالسالب.
٣- شغل جهاز الترحيل الكهربائي بفولتية 80v و 10A ويترك لحين سريان صبغة Bromophenol blue عن الحفر إلى الجانب الأخر.

٤- وضع الجيل على جهاز UV light transillminator وفحصه تحت الاشعة فوق البنفسجية لملاحظة الـ DNA band بشكل حزم برتقالية اللون.