مختبر ١٠

المطياف الضوئي باستخدام الأشعة فوق البنفسجية

UV-spectrophotometer

المبدأ الأساسي للجهاز هو مرور الضوء خلال المحلول المراد قياسه حيث يكون هذا الجهاز مزود بأداة لقياس امتصاص الأشعة فوق البنفسجية من قبل المحلول بمدى أقل من 320nm . فالأحماض النووية اعتمادا على تركيب القواعد النايتروجينية تمتص 260nm كحد أعلى، بينما البروتينات تمتص كحد أعلى 280nm و 230nm .

مماسبق نستنتج ان مبدأ عمل الجهاز يعتمد على مايسمى بـ Biophotonics هو دراسة التفاعل الذي يحدث بين المادة البيولوجية مع الضوء و الإشكال الأخرى من الأشعة (هي طاقة تأتي من مصدر معين وتنتقل خلال مادة أو فضاء).

Uv-spectrophotometer حاوي على مصدر للضوء يتولد بطول موجي معين. هذا الضوء يمر خلال cuvette ويمتص من قبل المادة الموجودة فيه ويكون الجهاز مزود بمستكشف يقرأ الطول الموجي الممتص من قبل المادة. كمية الضوء الممتص إلى سمك العينة تدعى الكثافة المرئية Optical Density (OD).

طريقة العمل Protocol :

المحاليل المستخدمة Reagent

TE buffer (PH 7.5)

لتحديد تركيز concentration ونقاوة purity الأحماض النووية نتبع مايلي:

١- نضع 10µl من الـ DNA الى 990 µl من محلول TE buffer الى 1mlمن quartz cuvette.
٢- تمزج العينة بشكل جيد وتقرأ الامتصاصية بطول موجي 260nm ولتحديد تركيز الـ DNA نتبع المعادلة التالية:

Concentration = A260 * Conversion Factor * Dilution Factor

Conversion Factor معامل التحويل (القراءة التي نحصل عليها بطول موجي 260 nm)

Dilution Factor معامل التخفيف (مقلوب التخفيف)= 0.001

قيم معامل التحويل للأحماض النووية في المطياف الضوئي	
1.0 A260 Unit of double-stranded DNA	50 µg/ml
1.0 A260 Unit of single-stranded DNA	37 µg/ml
1.0 A260 Unit of RNA	40 µg/ml

٣- ولقياس نقاوة العينة من البروتينات نقيس بطول موجي 280 nm ونتبع المعادلة التالية:

Concentration1 = A260 * Conversion Factor * Dilution Factor

Concentration2 = A280 * Conversion Factor * Dilution Factor

Sample Purity= Concentration1+ Concentration2/2

ملاحظة-

١- نسبة القراءة بالامتصاصية عند 260 nm و280 nm حيث اذا كانت النسبة مساوية إلى 1.8 عند قياس الـ DNA يعتبر نقي من الشوائب (مثل البروتينات) حيث ان DNA يمتص الطول الموجي 260nm بينما البروتينات والشوائب الاخرى مثل الفينول يمتص طول موجي حوالي 280 nm .

بينما في حالة قياس RNA تكون النسبة 2 هي دليل على نقاوة العينة.

٢- يجب مسح quartz cuvette بشكل جيد حيث أن وجود قطرة ماء على quartz cuvette أو بصمات الأصابع تؤثر على الامتصاصية وبالتالي لانحصل على القراءة الصحيحة .

س- في حالة قياس العينة ووجود تلوث بروتيني كيف نعالج هذه الحالة ؟

ج- يتم العلاج باعادة عملية الاستخلاص من خطوات تنقية البروتين باستخدام phenol:chloroform:isoamyl ثم نكمل باقي الخطوات التي تليها بالاستخلاص كما مر في الدروس السابقة (راجع طرق الاستخلاص).

مختبر وراثة أحياء مجهرية