Purity and concentration of nucleic acid

- عند عزل الحمض النووي ، نلاحظ أنه قد يحتوي عل العديد من الملوثات ، مثل احتوائه على كميات كبيرة من البروتينات أو الحمض النووي RNA .

- هناك إجراءات متعددة يمكن استخدامها لإزالة هذه الملوثات وترك الحمض النووي بشكل نقي .

• من طرق تنقية الحمض النووي :

١. التخلص من البروتينات : عن طريق اضافة خليط من

(الفينول: الكلوروفورم: كحول أيزوأميل)

٢. ويمكننا التخلص من RNA عن طريق اضافة انزيم الريبونيوكليز .

حساب تركيز الحمض النووي DNA
باستخدام جهاز الطيف الضوئي Spectrophotometer

١- يحسب درجة الامتصاص عند كل من الأطوال الموجية (نانومتر nm)

230-240-250-260-270-280-290-300

٢- نسجل نسبة الأشعة الممتصة والصادرة عن المحلول.

٣- يتم عمل منحنى من العلاقة بين محورين السيني يمثل الأطول الموجية والصادي مقدار الأشعة الممتصة.

Nucleic acid quantitation تقدير الاحماض النووية

تعد تقدير الحامض النووي في العينة عملية مهمة لتحديد مقدار تركيز الـ DNA و RNA في العينة ودرجة نقاوته حيث تعتمد على هذه العملية الكثير من الفحوصات والتفاعلات الخاصة بالـ DNA مثل جهاز PCR واجهزة وراثية اخرى .

هناك العديد من الطرق المستعملة لقياس DNA في العينة منها:

- جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer
- جهاز Nanodrop

جهاز Nanodrop

- يعتبر قياس الحامض النووي (DNAاو RNA) في هذا الجهاز عملية سهلة وسريعة اضافة الى انها تكشف لنا عن نسبة الخطأ المحتمل وجودها في العينة حيث ان القراءات القياسية للحامض النووي هي كالاتي:
- DNA= 1.8 ~
- RNA= 2.0 ~
- اما القراءات التي تختلف عن هذه النسب فهي دلالة على وجود تلوث في العينة، اي ان العينة لازالت حاوية على البروتين او بعض المواد الاخرى .تتم القراءة عند طول موجي 280- 260 nm .

طريقة عمل الجهاز

- اختر الايقونة الخاصة بالجهاز(Nanodrope) الموجودة على سطح المكتب.
- اختر Nucleic acidمن القائمة .
- اختر نوع الحامض النووي DNA،
- اختر الوحدة القياسية الخاصة بالحامض النووي وهي ng/µL
- اختر الطول الموجي الملائم للمحلول المراد فحصه،ان الطول الموجي 280-260 هو الملائم لقياس وتقدير الحامض النووي.
- اختر الايكونه (add to the report) لاضافة جميع القياسات الخاصة بجميع عيناتك وحفظها لحين الرجوع اليها عند الحاجة.
- صفر الجهاز بواسطة (Blank المحلول المذيب للحامض النووي).يجب ان يكون هذا المحلول مذيب جيد للحامض النووي اضافة الى ان الـ Blankالمستعمل لتصفير الجهاز يجب ان يكون بنفس درجة pH ونفس الدرجة الايونية للمحلول المستعمل للمذيب للحامض النووي (DNA).
- ضع 1-2µl من محلول البلانك على عدسة الجهاز ثم انزل ذراع الجهاز.ثم اضغط على كلمة(blank)
- نظف العدسة بورق التنظيف الخاص ثم ضع العينة واضغط على كلمة (Measure) ليبدء الجهاز بالقياس.

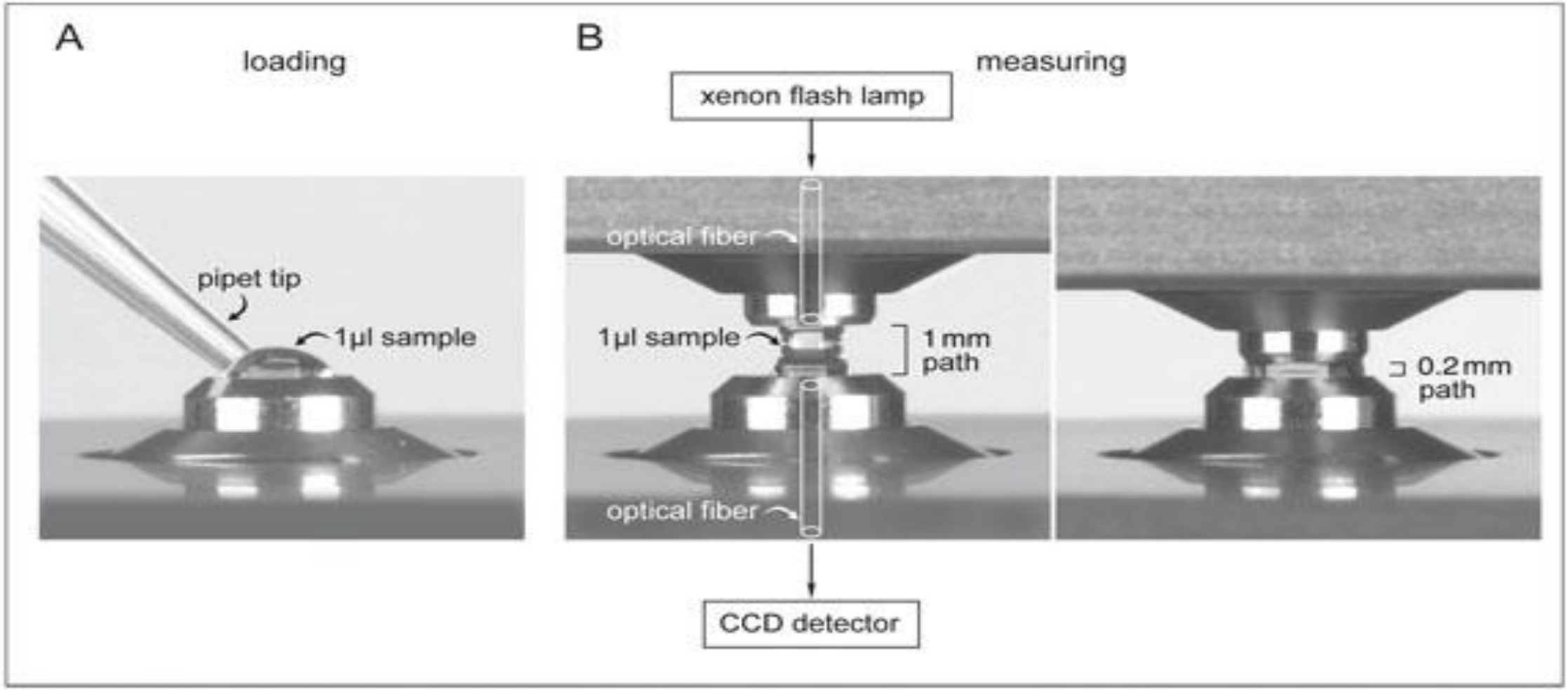
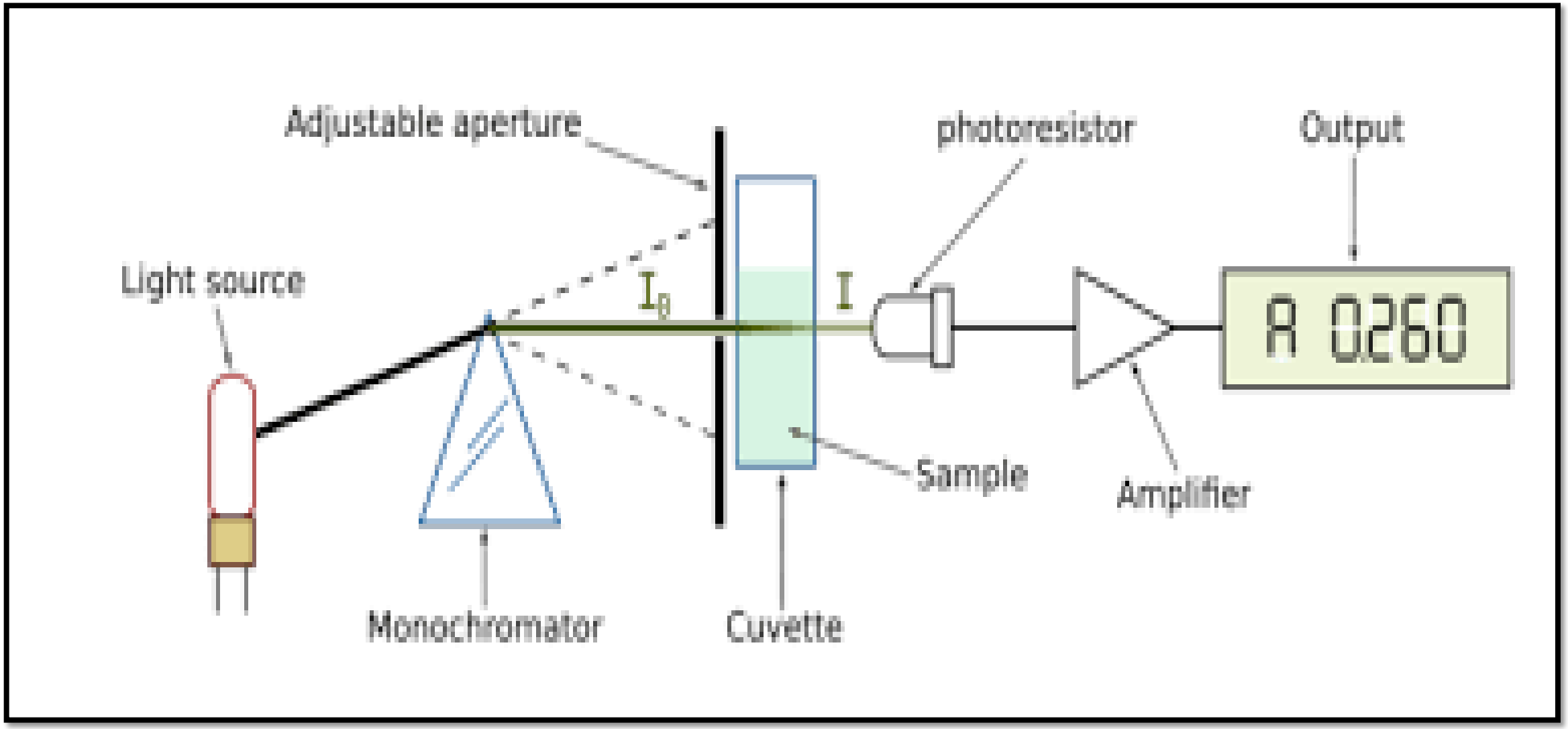
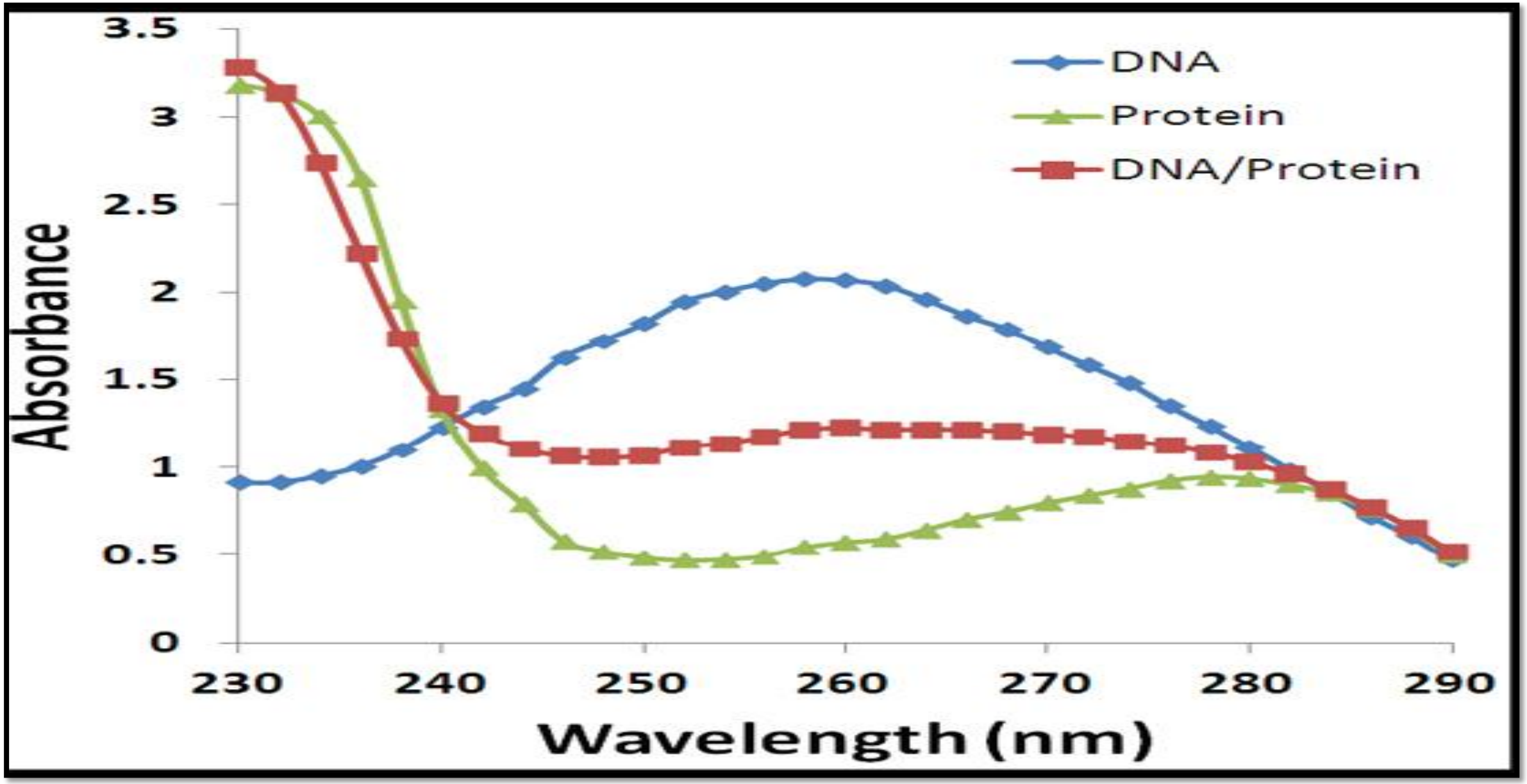


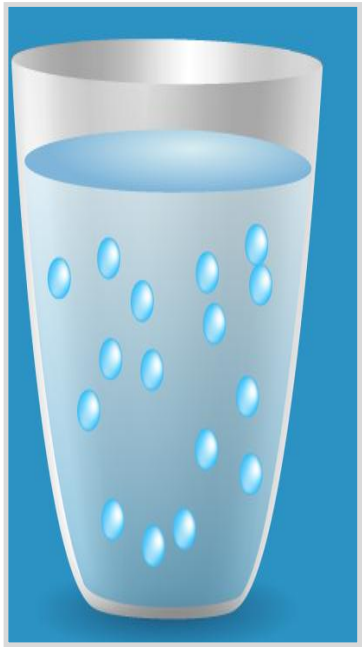
Figure A.3D.2 The NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer microvolume sample retention system. (**A**) A sample volume of 1 µl is dispensed onto the lower optical surface. (**B**) Once the instrument lever arm is lowered, the upper optical surface engages with the sample, forming a liquid column with the path length defined by the gap between the two optical surfaces. During each measurement, the sample is assessed at both a 1-mm and 0.2-mm path, providing a large dynamic range of nucleic acid detection.

Spectrophotometer work



DNA concentration curve





المحلول هو خليط في الحالة السائلة. يحوي مادة أو مواد مذابة في مذيب سائلي.

تركيز المحلول يعبر عن النسبة بين كمية المذاب وحجم المحلول.

$$\text{تركيز} = \frac{\text{كمية المذاب}}{\text{حجم المحلول}}$$

جسيمات المذاب منتشرة بين جسيمات المذيب انتشارا متجانسا. التركيز يعبر عن كثافة جسيمات المذاب داخل المحلول. في الرسم نرى فقط جسيمات المذاب (الجسيمات الزرقاء) وليس جسيمات المذيب.

لكي نفهم جيدا مصطلح التركيز والعلاقة بين **كمية المذاب وحجم المحلول**، نتعقب العوامل التي تؤثر على قيمة التركيز. سنفسر تأثير العوامل المختلفة على تركيز بمستوى الماكرو وبمستوى الجسيمات.

- تركيز المحلول يعبر عن النسبة بين كمية المذاب وحجم المحلول.
- يتناسب تركيز المحلول تناسبا طرديا مع كمية المذاب وعكسيا مع حجم المحلول.
- عندما نأخذ عينة من محلول، التركيز لا يتغير.
- بمستوى الجسيمات: تركيز المحلول يعبر عن "كثافة" الجسيمات في حجم المحلول.

Methods Expressing Concentration طرق التعبير عن التركيز

- التعبير عن التركيز بـ g/L ويمثل بالعلاقة الآتية:

$$\text{Conc.} = \frac{\text{wt.(g)}}{V_L} \qquad (1)$$

- التعبير عن التركيز بـ mg/mL ويمثل بالعلاقة الآتية:

$$\text{Conc.} = \frac{\text{wt.(mg)}}{V_{mL}} \qquad (2)$$

$$\text{Conc.(g/L)} = \frac{\text{wt.(g)}}{V_L}$$

$= 1\ g/L$

$=1000\ mg/L$

$=10^{6}\mu g\ /L$

$10^{9}\ pg\ /L$

$10^{12} ng/L$

تراكيز محاليل فيها مذاب جزيئي

سؤال 2:

أ. أذابوا 10 مول جلوكوز في الماء وأكملوا المحلول إلى حجم نهائي قدره ٥ لتر. ما هو تركيز المحلول الذي نتج؟

ب. كم مول جلوكوز يوجد في ١٠٠ مللتر محلول تركيزه 0.01M؟

ج. يريدون الحصول على ٣ مول جلوكوز من محلول تركيزه 0.3M. ما هو حجم المحلول اللازم لذلك؟

الجواب:

أ. تركيز المحلول:

$$\frac{n}{V} = C \longrightarrow 10/5 = 2M$$

ب. مولات الجلوكوز:

n = V x C → n = 0.1 x 0.01= 0.001mol

ج. حجم المحلول:

$$\frac{n}{C} = V \longrightarrow \frac{3}{0.3} = 10 \longrightarrow V = 10 \text{ liter}$$

انتبهوا: يجب استعاضة الحجم في المعادلة بوحدة اللتر!

التركيز بالمولارية

- أنا متأكد بأنك قد تعاملت مع مفهوم تركيز المحلول في حياتك اليومية. فهل اضطررت يوما ما أن تشرب مشروبا صنع من خليط بودرة مثل النسكافيه أو القهوة. فمن المألوف لديك وصفها بالثقيلة و الخفيفة أو المرة والحلوة. والمولارية ببساطة هي مقياس لقوة المحلول.
والمحلول الذي ستصفه بأنه ثقيل تكون لديه المولارية عالية أما الذي توصفه بالخفيف هو المحلول الذي مولاريته قليلة .
- ، المحاليل تتكون من جزئين المذاب والمذيب تخلط معا، كما نذيب السكر في القهوة.
فلنفترض أننا وضعنا ٤ ملاعق صغيرة لمقدار فنجانين من القهوة فيكون لدينا
قوة السكر في القهوة = ٤ ملاعق / ٢ فنجان من القهوة
فإذا أردنا مضاعفة الكمية .. وأردنا تحضير ٤ فناجين قهوة بنفس قوة السكر فيه .. يكون ذلك :
قوة السكر في القهوة = ٤ ملاعق / ٢ فنجان من القهوة = ٨ ملاعق / ٤ فنجان من القهوة

- **المولارية .. هي مثل هذه القوة للمحلول ،إلا أننا نكون دقيقين أكثر في الحسابات والمقاييس. فالكمية من الملعقة أو الفنجان غير دقيقة وبخاصة إذا احتجنا لعمل أي تحليل كمي في المختبر فيجب أن تكون القياسات دقيقة لأبعد الحدود. لذا المعادلة الرياضية للمولارية أكثر دقة من معادلة قوة السكر في القهوة .. ويمكن التعبير عنها :**
- **المولارية = عدد المولات (المول) / حجم المحلول (باللتر(وحدة قياس المولارية .. M = وتعني (مول/لتر(**
- **حسابات على التركيز المولاري:**

حسابات التركيز المولاري متعددة ومتنوعة. لذا انتبه للصياغة المسألة، وركّز على ما هو متوفر من معلومات وما يطلب منك في المسألة، دائما أكتب المعادلة الرياضية لحساب المولارية وتهيئ لأن تقوم بإعادة تشكيله إذا ما احتاج الأمر. وسنقوم بعرض عدد من الأمثلة لتدريبك لاحقا على حل المسائل المختلفة من المولارية .

التركيز المولاري للمحلول

$$\text{تركيز مولاري} = \frac{\text{كمية المذاب بالمولات}}{\text{حجم المحلول باللترات}}$$

$$\frac{n}{V} = C$$

n عدد مولات المذاب

C تركيز المحلول

V حجم المحلول

وحدات التركيز - M: $\frac{\text{مول}}{\text{لتر}}$

تعبر الوحدات عن عدد مولات المذاب في لتر محلول.

يُرمز أيضا للتركيز بمساعدة علامات الحصر (قوسان حاصرتان) [ ].

مثال 1:

يذيبون 1 مول جلوكوز في الماء ويكملون حجم المحلول لحجم نهائي يساوي ١ لتر.

ما هو تركيز المحلول؟

$C_6H_{12}O_{6(s)} \xrightarrow{H_2O} C_6H_{12}O_{6(aq)}$

$$\frac{n}{V} = C \longrightarrow \frac{1}{1} = 1M$$

[جلوكوز]=1M

مثال 2:

يذيبون 0.5 مول HCl في الماء ويكملون حجم المحلول لحجم نهائي يساوي ١٠٠ مللتر.

ما هو تركيز المحلول؟

يجب أولا تحويل وحدات الحجم إلى لترات بواسطة قسمة العدد على ١٠٠٠:

100 مللتر هي 0.1 لتر.

$$\frac{n}{V} = C \longrightarrow \frac{0.5}{0.1} = 5M$$

Molarity (M) المولارية

تعرف بعدد المولات (عدد الجزيئات الجرامية) المذابة في لتر من المحلول

$$M = \frac{\text{no. of moles}}{V_L} \qquad (8)$$

$$M = \frac{\text{wt.(g)}}{\text{Mo.wt.}} \times \frac{1}{V_L} \qquad (9)$$

$$M = \frac{\text{wt.(g)}}{\text{Mo.wt}} \times \frac{1000}{V_{mL}} \qquad (10)$$

مثال: احسب التركيز المولاري لـ 4g من NaOH مذاب في 500mL من المحلول Mo.wt.= 40 g mole-1.

$$M = \frac{wt.(g)}{Mo.wt} \times \frac{1000}{V_{mL}}$$

$$M = \frac{4}{40} \times \frac{1000}{500}$$

$$= 0.2$$

EDTA; Ethylenediaminetetraacetic acid

Molecular Formula:	$C_{10}H_{16}N_2O_8$
Molecular Weight:	292.24264 g/mol

نسبة التخفيف dilution ratio

يمكن التعبير عن تركيز الحوامض والقواعد المخففة بواسطة نسبة تخفيف الحامض أو القاعدة المركزة بالماء

مثال:

HCl (1:1) يتم تحضيره بإضافة حجم من حامض HCl إلى حجم واحد من الماء

H_2SO_4 (4:1) يتم تحضيره بإضافة حجم واحد من H_2SO_4 إلى أربعة حجوم من الماء

H_3PO_4 (3:2) يتم تحضيره بإضافة حجمين من H_3PO_4 إلى ثلاثة حجوم من الماء

1- 4تخفيف المحاليل:

يمكن حساب كمية المادة المذابة في محلول ذي تركيز معين من العلاقة الآتية:
كمية المادة المذابة = الحجم × التركيز

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

مثال: محلول من مادة NaOH حجمه 5mL وتركيزه(1.5 g/mL)
احسب تركيز المحلول إذا خفف بالماء المقطر إلى 15 mL.

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$1.5 \times 5 = C2 \times 15$$

$$C2 = 0.5\ g/mL$$

تخفيف المحاليل Dilution of solutions

- التخفيف بالماء يطبق القانون التالى

حجم المحلول × تركيزه (قبل التخفيف) = حجم المحلول × تركيزه (بعد التخفيف)

- التخفيف بمحلول من نفس النوع يطبق القانون التالى

جم المحلول الاول × تركيزه ÷ حجم المحلول الثانى × تركيزه = حجم المحلول النهائى × تركيزه

- التخفيف بمحلول مختلف

لإيجاد التركيز للمحلول الاول فى المحلول الكلى يطبق القانون التالى

حجم المحلول × تركيزه (قبل) = حجم المحلول × تركيزه (بعد)

لإيجاد التركيز للمحلول الثانى فى المحلول الكلى يطبق القانون التالى

حجم المحلول × تركيزه (قبل) = حجم المحلول × تركيزه (بعد)

نستنتج مما سبق العلاقات الآتية

- عدد المولات = التركيز المولارى (M) × حجم المحلول باللتر
- عدد المليمولات = التركيز المولارى (M) × حجم المحلول بالملليلتر
- الوزن بالغرام= عدد المولات × الوزن الجزيئي
- الوزن بالغرام = التركيز المولارى (M) × حجم المحلول باللتر × الوزن الجزيئي
- الوزن بالمللغرام = عدد المليولات × الوزن الجزيئي
- الوزن بالمللغرام = التركيز المولارى (M) × حجم المحلول بالملليلتر × الوزن الجزيئي

توحيد تراكيز الحامض النووي

بعد عملية استخلاص الاحماض النووية من الخلايا المختلفة تكون تراكيزها مختلفة ما بين العينات، لذلك يجب توحيدها قبل عملية الترحيل الكهربائي بواسطة قانون معامل التخفيف باستعمال محلول متعادل خاص هو ال (DEPIC) .

- طريقة التخفيف:
- يتم قياس تركيز الحامض النووي المستخلص بواسطة جهاز المطياف الضوئي (spectrophotometer)، وعمل جدول خاص بارقام العينات وتراكيزها الاولية (C1)كما موضح ادناه.
- نفرض ان التركيز الثاني (C2) الذي يتم توحيد العينات على اساسه هو (100 ng/µl)، وان الحجم الثاني (V2)الكلي المطلوب هو (٥٠µl) .
- بعد تبويب النتائج في جدول اكسل نجري عملية الطرح مابين الحجم الاول الناتج (V1) والحجم الثاني (V2) المفترض والناتج يعتبر حجم المحلول الذي يجب اضافته الى كل عينة

مثال:احسب كمية ال(DEPIC) التي نضيفها الى كل عينة DNA بالاعتماد على التراكيز الاولية المبينه ادناه ؟

samples	C1	V1	C2	V2
A1	190.88 ng/µl	X	100 ng/µl	50 µl
A2	230.76 ng/µl	X	100 ng/µl	50 µl
A3	210.36 ng/µl	X	100 ng/µl	50 µl
A4	344.87 ng/µl	X	100 ng/µl	50 µl

الحل:

باستعمال قانون معامل التخفيف المشهور

C1*V1=C2*V2

لاستخراج حجم المحلول المضاف الى كل عينة يجب

اولا استخراج قيمة (V1) وهي.. V1= C2*V2/C1

26.2 µl, 21.66 µl, 23.76 µl, 14.5 µl

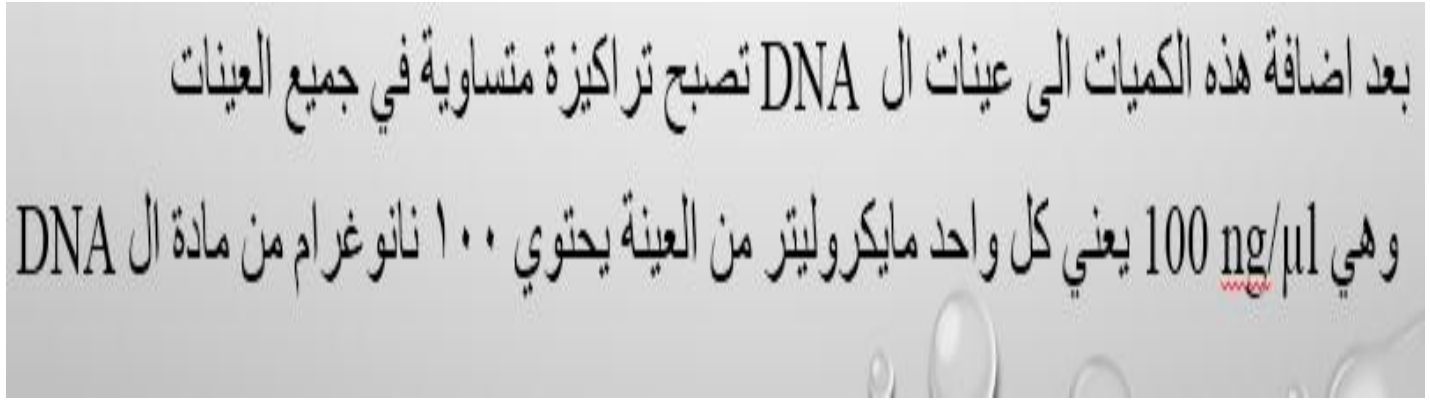
الخطوة التالية هي ايجاد الفرق مابين الحجوم لاستخراج كمية المحلول المضافه.

Sample A1----- V2-V1= 23.8 µl

Sample A2----- V2-V1=28.3 µl

Sample A3----- V2-V1=26.2 µl

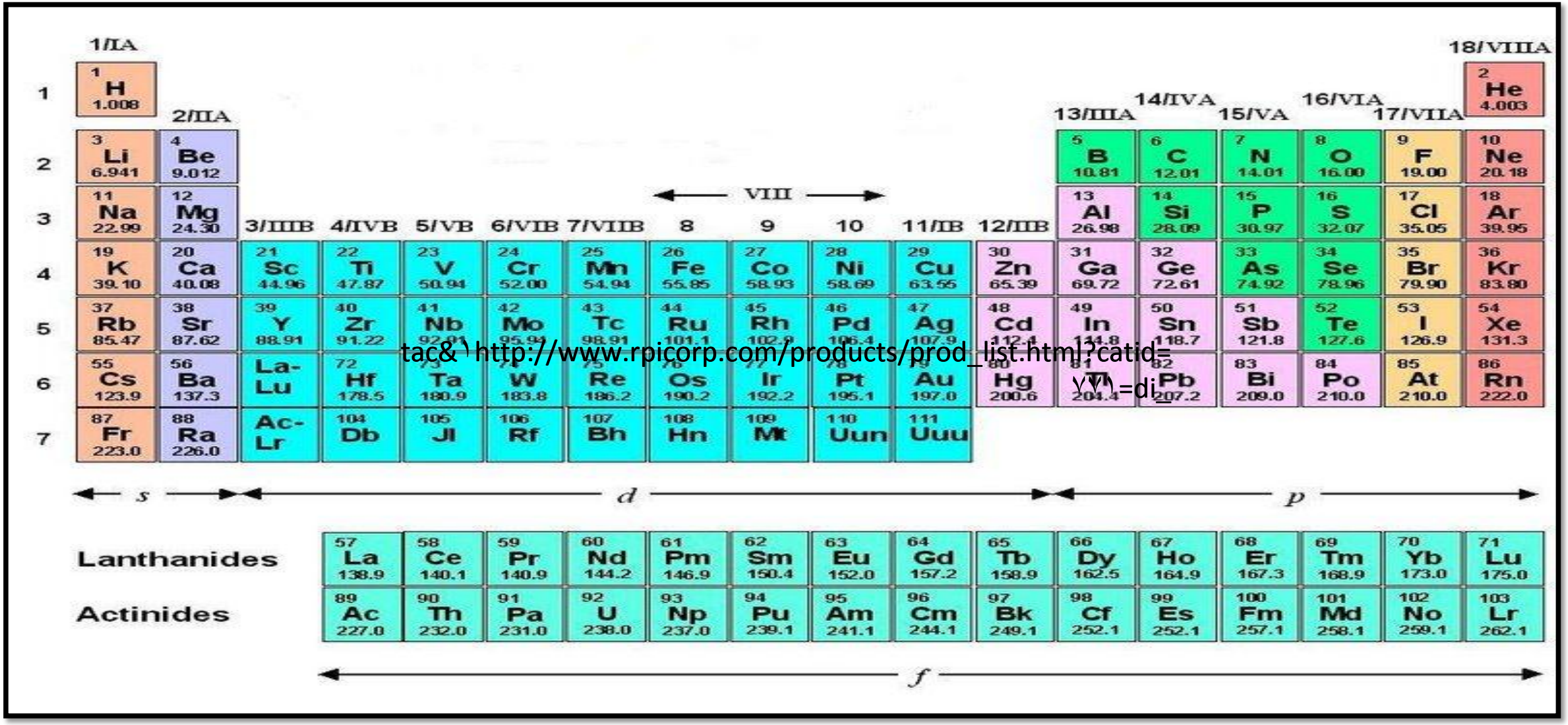
Sample A4----- V2-V1=35.5 µl



بعض الصيغ الكيمياوية المهمه

- EDTA Molecular formula = C10H16N2O8----Molecular weight = 292.24264 g/mol
- Tris-bis =C8H19NO5
- Tris-acid = C3H6O3
- Boric acid = H3BO3
- Lactic acid = C3H6O3
- Molecular Grade Water = H2O
- SDS =C12H25O4SNa

الجدول الدوري للعناصر



tac&١ http://www.rpicorp.com/products/prod_list.html?catid=
٧٧١=di_

http://www.rpicorp.com/products/prod_list.html?catid=1&cat_id=771