المحاضرة السابعة ....

تقدير تركيز الاحماض النووية

Nucleic acid quantitation

تُعد عملية 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 الـ DNA مثل جهاز PCR واجهزة وراثية اخرى.

هناك العديد من الطرق المستعملة لقياس DNA في العينة منها:

1. جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer
2. جهاز Nanodrop

1- الطريقة الطيفية الضوئية spectrophotometer method

وهي من الطرق السهلة اذ يستعمل جهاز المطياف spectrophotometer او جهاز النانودروب nanodrop (لايختلف الجهازين الا في حجم العينة المطلوبة للقياس) واساس عملها هو قياس كمية الحامض النووي الموجودة عن طريق امتصاصه للاشعة فوق البنفسجية بموجات طولها 260 و 280 نانوميتر .

الامتصاصية للمحلول على طول موجي 260 نانوميتر . وبكل سهولة يحسب تركيز الدنا من المعادلة الاتية :

$$\text{Unknown } (\mu g/ml) = OD_{260} \text{ unit x dilution factor x 50 } \mu g/ml$$

OD_{260} = Optical density

طريقة العمل :

1 – يتم تصفير الجهاز من خلال قياس الطول الموجي للبلانك (نفس المحلول المستخدم لحفظ وتخفيف DAN) حيث تملأ الانبوبة الزجاجية الكوارتز (cuvette) خاصة بجهاز المطياف الضوئي بالبفر او البلانك وبما انها لاتحتوي على عينة DNA فتعتبر القراءة صفر وحتى لو لم تقرأ صفر فيتم تصفيره .

2 – توضع عينة الـ DNA داخل الكوفيت ويثبت الطول الموجي عند 260 نانوميتر وتتم ملاحظة قراءة الجهاز وتسجيل الامتصاصية ($O.D_{260}$) وتستعمل المعاملة السابقة ويستخرج التركيز .

3 – بما ان عينة DNA المستخدمة للقياس كبيرة تقدر بـ 1-2 مل ولايمكن اعادتها للمحلول الاساسي لعدم تعقيم ظروف القياس والكوفيت ، لذلك يفضل اخذ كمية صغيرة تقدر بالمايكرولتر وتخفيفها وحساب ذلك في المعادلة من خلال معامل التخفيف (dilution factor) .

وتستعمل نفس المعادلة السابقة لقياس تركيز الـ RNA ولكن يختلف الثابت حيث يكون 40

$$\text{Unknown } (\mu g/ml) = OD_{260} \text{ unit x dilution factor x 40 } \mu g/ml$$

المحاضرة السابعة ....

Spectrophotometric determination of the amount and quality of DNA

لتحديد كمية ونقاوة الـ DNA في العينات باستعمال جهاز المطياف الضوئي والذي يعتمد في عمله على قياس كمية الحامض النووي الموجودة عن طريق امتصاصه للاشعة فوق البنفسجية بموجات طولها 260 و 280 نانوميتر .

تسمح قراءة الامتصاص على طول الموجة 260 نانوميتر بحساب تركيز الحامض النووي في العينة بان كل واحد من الكثافة الضوئية Optical density (O.D) تقابل حوالي 50 مايكروغرام /مل لسلاسل DNA المضاعفة. وحوالي 40 مايكروغرام /مل لسلاسل RNA المفردة . وحوالي 20 مايكروغرام /مل للسلاسل المفردة من قليلات النيوكلوتيدات Oligonucleotides .

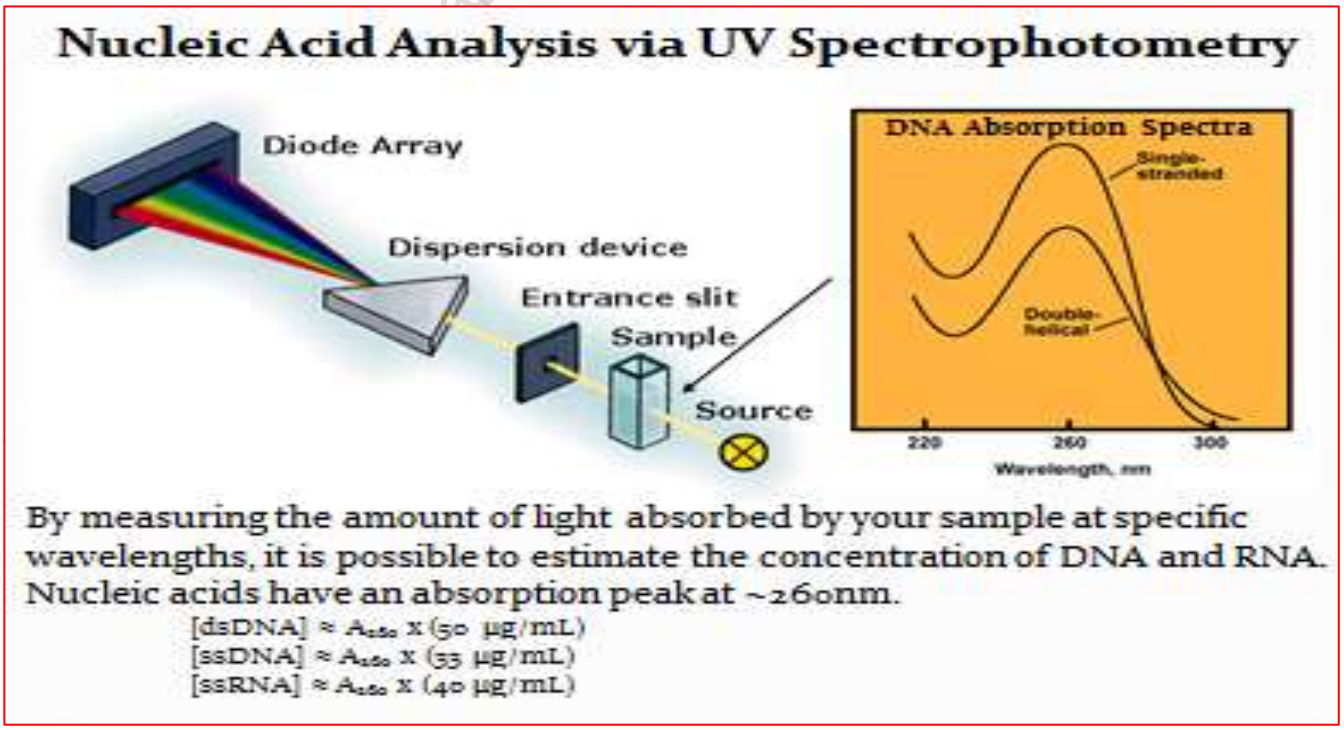
ان النسبة بين قراءة طول الموجة 260 نانوميتر الى 280 نانوميتر (OD_{260} /OD_{280}) تساعد في تقييم نقاوة الحامض النووي، ويجب ان تتراوح هذه النسبة بين 1.8 – 2.0 لكل من DNA و RNA على التوالي. فاذا كانت العينة تحوي الحامض النووي اضافة الى البروتين او الفينول فستكون النسبة اقل من الحد الطبيعي .

اذ تحسب امتصاصية عينة الـ DNA عند الطول الموجي 260 نانوميتر ثم تحسب الامتصاصية للعينة نفسها عند الطول الموجي 280 نانوميتر وبعد قسمة الامتصاصية الاولى على الثانية يجب ان يكون الناتج اكبر من او يساوي 1.8 واذا كان اقل فهذا يعني ان العينة غير نقية وتحتاج تنقية او اعادة استخلاص .

$$\text{Purity of DNA} = \frac{\text{O.D}_{260}}{\text{O.D}_{280}} \geq 1.8$$

وتستخدم المعادلة نفسها لتقدير نقاوة الـ**RNA** ولكن يجب ان يكون الناتج اكبر من او يساوي 2 وكالاتي :

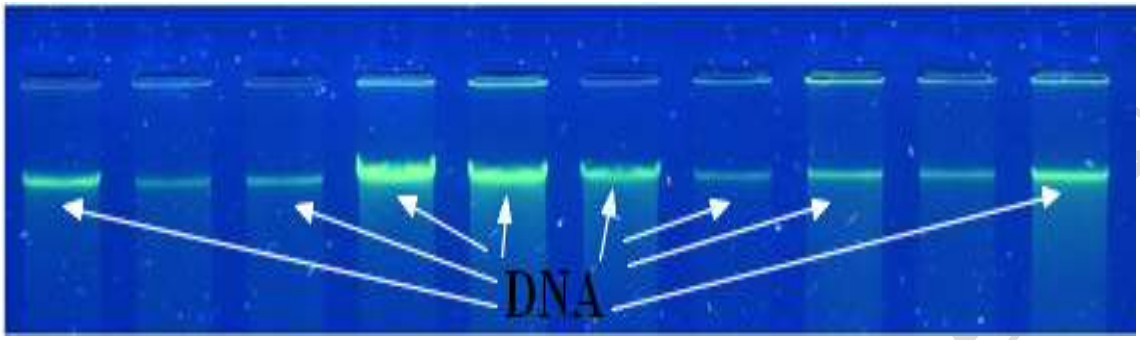
$$\text{Purity of RNA} = \frac{\text{O.D}_{260}}{\text{O.D}_{280}} \geq 2$$



المحاضرة السابعة ....

❖ تقدير كمية الـ DNA ونوعيته بواسطة الاشعة فوق البنفسجية :

تُحمل كمية قليلة من DNA في هلام من الاكاروز تركيزها 1% لتحديد نوعية DNA المستخلصة للتاكد من عدم تقطيعها، اذ يجب ان يظهر DNA على شكل حزم bands عالية الوزن الجزيئي على هلام الاكاروز .



2 – جهاز Nanodrop

يعتبر قياس الحامض النووي DNA او 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. 260 -280 nm .

د. احمد يوسف لفته - كلية الزراعة - جامعة البصرة

المحاضرة السابعة ....

طريقة عمل الجهاز:

1 - اختر الايقونة الخاصة بالجهاز (Nanodrope) الموجودة على سطح المكتب.

2 - اختر Nucleic acid من القائمة.

3 - اختر نوع الحامض النووي, DNA

4 - اختر الوحدة القياسية الخاصة بالحامض النووي وهي ng/µL.

5 - اختر الطول الموجي الملائم للمحلول المراد فحصه،ان الطول الموجي 260-280 هو الملائم لقياس وتقدير الحامض النووي.

6 - اختر الايقونه (add to the report) لاضافة جميع القياسات الخاصة بجميع عيناتك وحفظها لحين الرجوع اليها عند الحاجة.

7 - صفر الجهاز بواسطة (Blank المحلول المذيب للحامض النووي).يجب ان يكون هذا المحلول مذيب جيد للحامض النووي اضافة الى ان الـ Blank المستعمل لتصفير الجهاز يجب ان يكون بنفس درجة pH ونفس الدرجة الايونية للمحلول المستعمل للمذيب للحامض النووي.(DNA)

8 - ضع 1-2 µL من محلول البلانك على عدسة الجهاز ثم انزل ذراع الجهاز.ثم اضغط على كلمة (blank) .

9 - نظف العدسة بورق التنظيف الخاص ثم ضع العينة واضغط على كلمة (Measure) ليبدء الجهاز بالقياس.