المختبر التاسع :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 ثابته هي اذا كانت 1=260O.D.A فهذا يدل الى ان تركيز الدنا هو من50 µg/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:

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

*عند A260 nm يعطي الدنا افضل امتصاصية في حين تعطي البروتينات والمركبات الاروماتية افضل امتصاصية عند A280 nm في حين تعطي الاملاح والفينولات افضل امتصاصية عند A230 nm ومن خلال هذه المعلومات بالتالي يمكننا معرفة مايلي:

نقاوة الدنا وكمية الملوثات من خلال : 280A260/A 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 : 230A260/A 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 280/260

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 1.2_1.4 تدل على ان نسبة البروتينات اعلى من الدنا في المحلول اما القراءة 1.8_2تدل 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 ميكرولتر 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 ميكرولتر من الماء المقطر+ 10ميكرولتر 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 ميكرولتر من الماء المقطر+ 20ميكرولتر من TE) او 2 مل من الماء المقطر.

7. قم بإعداد تخفيف 1: 100 للعينة التي تريد قراءتها. إضافة 990 ميكرولتر من محلول الاذابة (الماء المقطر او TE) + 10 ميكرولتر عينة DNA او إضافة 1980 ميكرولتر من محلول الاذابة (الماء المقطر او TE) + 20 ميكرولتر عينة DNA.

8. بعد ان يقرأ الجهاز العينة البلانك (السيطرة) ، اخرج الكوفيت الخاص بالبلانك 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 280OD260 / OD لكل عينة.

11. بين العينات قم بتنظيف الكوفيت وعند الانتهاء من قراءة العينات ، قم بإزالة وتنظيف الكوفيت وضعه بعيدًا.

12. احسب تركيز عينة DNA و 280OD260 / OD حسب المعادلة ادناه

Concentration (µg/ml) = A260 reading × dilution factor × 50µg/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 260A ، بتطبيق المعادة يمكن معرفة تركيز الـ DNA:

Concentration (µg/ml) = A260 reading × dilution factor × 50µg/ml

Concentration (µg/ml) = 0.32 × 100 × 50µg/ml = 1600 µg/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.