## الاختبارات الكمية والنوعية للـ DNA

تجرى الاختبارات على ال DNA المستخلص والمذاب بالماء المقطر والمعقم.

**هناك نوعين من الاختبارات والتحاليل:**

1-اختبارات كمية

2- اختبارات نوعية وتتضمن:

a. اختبارات نقاوة

b . اختبارات سلامة الجزيئات المستخلصة( فيزيائية.)

**1-الاختبارات الكمية:**

وتهدف لمعرفة:

1- كمية ال DNA المستخلص من كمية معينة من المادة النباتية ويتم ذلك بطرق دقيقة باستخدام جهاز السبكتروفوتوميتر أو بطريقة تقريبية من خلال تمرير عينات ال DAN على هلامة الآغاروز (بعملية الرحلان الكهربائي ) وبوجود كميات معروفة من ال DNA بمحاذاة العينات المختبرة، تساعد مقارنتها بتقدير كمية الـ DNA بالعينة.

2- تركيز ال DNA في حجم معين، مل او مكل من الماء المستخدم بإذابة الـ DNA.

**1-تقدير كمية ال DNA في وحدة الحجم المستعمل باستخدام جهاز المطياف الضوئي(Spectrophotometer):**

لتقدير كمية ال DNA في وحدة الحجم المستعمل (التركيز) يجب أخذ القراءات لجهاز المطياف عند موجة بطول 260 نانومتراً (nm) وهذا يسمح بحساب تركيز الحمض النووي في العينة.

إن قيمة قراءة الكثافة النظرية المساوية (1) تعني وجود 50 ميكروغرام من ال DNA /1مل، أو 40 ميكروغرام من ال RNA أوال DNA المفرد السلسلة / 1مل.

لتقدير تركيز ال DNA في العينات المستخلصة يمكن القيام بالتالي:

بداية نقوم بتجهيز العينة للقياس:

نأخذ 20 ميكروليتراً من عينات ال DNA ونضيفها إلى 1980 ميكروليتر من الماء [ أي بنسبة تمديد (DNA) /99 مل ماء =عامل التمديد 100 مرة ] ثم مزجت بهدوء وأخذت قراءة قيم الامتصاص OD عند موجات بطول 260 و280 نانومتراً بعد وضع العينات في جهاز المطياف الضوئي( استخدم جهاز Spectrophotometer لتقدير تركيز ال DNA ).

**2- تقدير نقاوة ال DNA :**

تؤخذ أيضاً قراءات الامتصاص عند الموجة ذات الطول 280 نانومتراً وهو طول الموجة الذي يتم عندها امتصاص الاشعةUV من قبل البروتين، إذ تمكن معرفة النسبة بين القراءات عند 260 و 280نانومتر من تقدير نقاوة الحمض النووي.

تملك المحضرات النقية من ال DNA قيم نسب القراءات OD280/OD260 ما بين 1.8 إلى0.2 ، وإذا كان هناك تلوث بالبروتين فإن نسبة القراءات عند OD280/OD260 تختلف عن هذه القيم (تقل النسبة عن 1.8 كلما كان التلوث بالبروتين أكبر) ، وهو اختلاف ذو معنى إذ إنه يدل على تلوث عينات الأحماض النووية بالبروتينات وبالتالي عدم نقاوة ال DNA المستخلص.

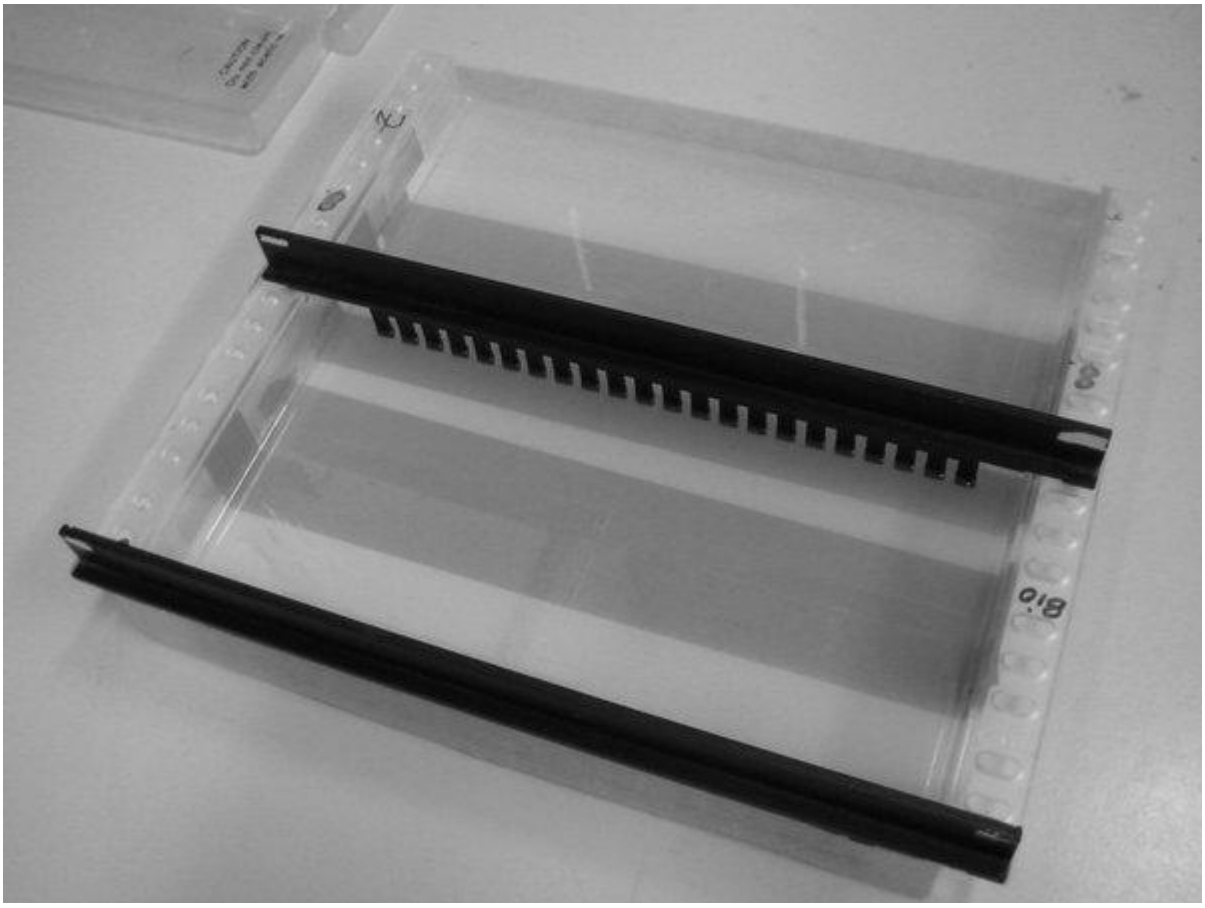
**3- اختبار جودة أو سلامة ال DNA المستخلص بوساطة عملية رحلان كهربائي أفقيElectrophoresis وضمن هلامة آغاروز Agarose Gel :**

يمكن تقدير سلامة جزيئات الحمض النووي (ال DNA) بواسطة جهاز الرحلان الكهربائي الأفقي باستخدام هلامة الآغاروزAgarose gel ، حيث إن الحموض النووية تظهر على هلامة الآغاروز كحزم (قطع) بأعلى الهلامة عندما تكون سليمة وذات وزن جزيئي كبير، في حين تظهر جزيئات ال DNA المحطمة ذات الأوزان الجزيئية الأصغر على الهلامة بشكل خلفية (Smear)، ويتم إظهار ذلك بواسطة الأشعة فوق البنفسجية UV وبمعاملة الهلامة ببروم الايثيديوم الذي يرتبط مع الDNA مشكلاً معقداً يتوهج إثر تعرضه للأشعة فوق البنفسجية، حيث تتناسب شدة التوهج مع كمية ال DNA المحمّلة على هلامة الآغاروز، وتكون عينات ال DNA ذات جودة مقبولة عند عدم وجود تقطعات Degradations فيها، كما يمكن تقدير كمية ال DNA بشكل تقريبي عن طريق مقارنة شدة التوهج المشاهدة في هذه العينات المراد تحليلها مع عينات قياسية معروفة الكمية توضع بمحاذاة العينات المدروسة ضمن الهلامة.

**- تحضير هلامة الآغاروز:**

1.تحضر هلامة ذات تركيز 1% آغاروز، وذلك بإضافة 2.6 غرام آغاروز Agarose إلى 60 مل محلول منظم( ) 1X TAE buffer (Tris-acetate-EDTA buffer (يعتمد حجم الهلامة المستخدمة وتركيزها على عدد عينات الأحماض النووية " DNA "المراد تحليلها ونوعها وحسب حجم جهاز الرحلان الكهربائي المستخدم)

2. يسخن المزيج السابق إلى درجة الغليان في الميكروويف لفترة(2-4) دقائق ثم يبرد إلى درجة ° 45 س

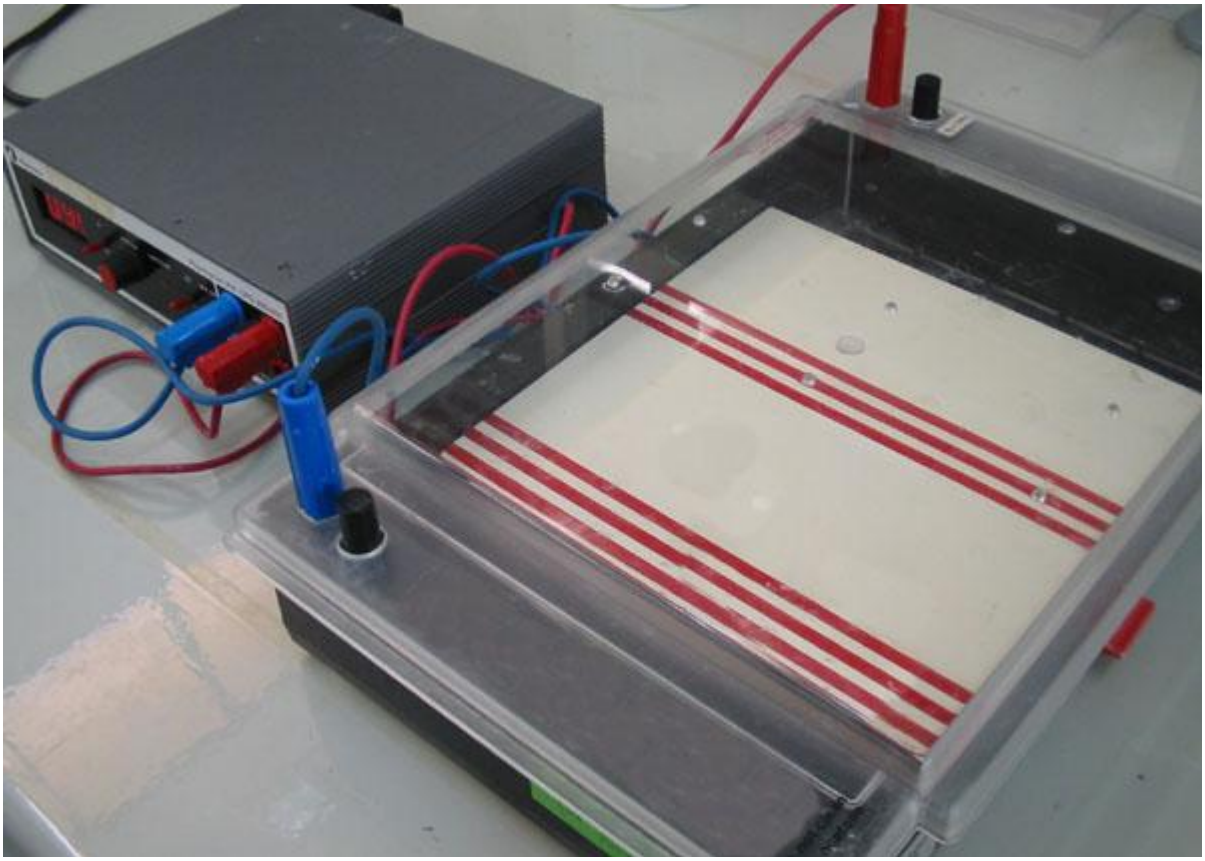


3. يحضر قالب (صينية) الآغاروز بإغلاقه من الجانبين بشريط ورقي لاصق وُيوضع مشط مناسب (حسب عدد العينات المراد دراستها) لتشكيل جيوب لوضع العينات المراد فصلها أو دراسة جودتها.

4. يصب المزيج السائل بهدوء في الصفيحة (القالب) المخصصة لتحضير الهلامة (يراعى عدم تشكل فقاعات هوائية أثناء عملية الصب، ويجب إبعادها فيما إذا حدث ذلك)

5. بعد تصلب المزيج يزال المشط أولاً ثم الشريط اللاصق وتوضع هلامة الآغاروز مع الصفيحة في جهاز الرحلا الكهربائي.

6. يُملئ حوض الرحلان الكهربائي بمحلول منظم 1X TAE وذلك حتى يغطى سطح هلامة الآغاروز وبشكل كامل وعلى ارتفاع حوالي 1-2 ميليمتر.



**تحميل عينات ال DNA على هلامة الآغاروز:**

يتم تحميل ما يعادل 1 ميكروغرام من ال DNA المذاب (اعتماداً على قراءات جهاز المطياف الضوئي تم تقدير كمية الDNA في وحدة الحجم المستعمل، وأخذ ما يعادل الكمية المذكورة) بعد أن أكمل الحجم إلى 9 مل من الماء المقطر والمعقم وأضيف لها 1 ميكروليتر من سائل التحميل.

إن لمحلول سائل التحميل Loading buffer فائدتان:

- بما أنه يحتوي على الغليسرول فهو يجعل العينات أكثر كثافة من محلول 1X TAE وبالتالي يساعد عينات الDNA على التوضع ضمن الجيب أثناء التحميل.
- يسمح اللون الأزرق لمركب أزرق البرموفينول Bromophenol Blue الموجود في محلول سائل التحميل بمتابعة حركة عينات ال DNA في هلامة الآغاروز.

نحمل عينات ال DNA بحذر بحيث تم تجنب سيلان العينات إلى الجيوب المجاورة، كما أضيف DNA مؤشر (Marker) ذو وزن جزيئي معروف( استخدم 250 و 500 نانوغرام من الDNA Marker )

يوضع الغطاء فوق جهاز الرحلان وتُوصل الالكترودات الكهربائية للجهاز ويشغل الجهاز عند تيار شدته (40-90واط) (تعتمد شدة التيار المستخدمة على طول هلامة الآغاروز المستخدمة وحجمها) توقف عملية الرحلان الكهربائي عندما تصل الصبغة الزرقاء على هلامة الآغاروز إلى قرب نهاية الهلامة.

**تلوين هلامة الآغاروز:**

تنقل هلامة الآغاروز وتغمر في سائل التلوين (محلول 1XTAE ) يحوي على مادة بروم الايثيديوم بتركيز 0.5 ميكروغرام/ مليلتر) لمدة3 0 دقيقة مع التحريك الهادئ على هزاز آلي .يستبعد سائل التلوين وتغسل الهلامة بالماء لمدة دقيقتين ومن ثم توضع على منضدة الأشعة فوق البنفسجية UV وتصور باستخدام جهاز تصوير هلامة الآغاروز.

ملاحظات:

- إن بروم الايثيديوم مادة مسرطنة لذا يجب ارتداء قفازات عند العمل بها، كما يجب عدم رميها مع مياه الصرف العادية.
- تسبب الأشعة فوق البنفسجية ضرراً للعين وللجلد المكشوف، لذا يجب استعمال واقيات عند التعامل مع هذه الأشعة، مثل نظارات خاصة أو قناع لكامل الوجه.

## التفاعل التسلسلي للبوليميراز

## Polymerase Chain Reaction (PCR)

**مبدأ تفاعل ال PCR :**

تقنية تهدف لمكاثرة قطعة معينة من ال DNA يتم التعرف عليها من خلال استخدام بادئات تتعرف على مقاطع مكملة لها على الجينوم (الجين) وتبدأ بعدها مكاثرة ال DNA وكل منها مكونة من 3 مراحل، يتم التفاعل من خلال تعريض العينات لعدد من الدورات يتراوح بين 35–50 وكل منها مكونة من 3 مراحل:

1–مرحلة التحطيم :لتحويل ال DNA إلى مفرد السلسلة

0–المرحلة الثانية :لارتباط البادئة بال DNA المكمل لها

3–مرحلة الاستطالة : لتصنيع جزيئة ال DNA الجديدة.

تتم كل مرحلة بدرجة حرارة معينة ولفترة زمنية محددة نحصل بالنهاية على بلايين النسخ من جزيئة ال DNA المختارة والمتماثلة.

**البادئات Primers :**

قطعة من ال DNA احادية السلسلة، مصنعة، يتراوح وزنها الجزيئي بين 10 –25 نيكوليوتيد، يختلف حسب نوع المؤشر المستخدم، تتعرف على مقطع نيوكليوتيدي مكمل لها على مجين الفرد، مما يسمح بمكاثرة ال DNA الموجود بين البادئتين والحصول على بلايين الجزيئات.

**النيوكليوتيدات:**

لإنجاز التفاعل لا بد من وجود النيوكليوتيدات التي هي احجار البناء التي تستخدم لتصنيع السلسلة الجديدة من ال DNA .

**أنزيم التكثيف DNA Taq polymerase :**

يستخلص من بكتريا *Thermophilus aquatica* تعيش في الينابيع الحارة، ويتحمل درجة الحرارة حتى 100 م، يقوم بتصنيع جزيئات جديدة من ال DNA عن طريق تكثيف النيوكليوتيدات بالاتجاه من ' 5 الى' 3 ، اعتماداً على جزيئة ال DNA القالب، يستخدم في التفاعل التسلسلي للبوليميراز.

**تقنية الDNA Random Amplified Polymerphic DNA : RAPD**

تقنية تعتمد على مكاثرة قطعة من ال DNA باستخدام بادئة واحدة مكونة من 10 نيوكليوتيدات، ترتبط على سلسلتي ال DNA ومن بعده تبدأ عملية تصنيع جزيئات الDNA الجديدة.

**خصائصها:**

1–تستخدم بادئات شمولية وغير متخصصة.

2–البادئات فيها مفردة، قصيرة مكونة من10 نيوكليوتيدات.

3–تعطي قطع من ال DNA ذات وزن جزيئي من 3000–300 bp

4–تتعرف على مناطق موزعة عشوائيا في الجين.

5-تستخدم في دراسات التوصيف الجزيئي وكذلك التنوع الوراثي.

**مميزات تقنية ال RAPD :**

1-سهلة الاستخدام وقليلة الكلفة.

2- لا تحتاج لمعلومات مسبقة عن الجين.

3-البادئات شمولية ويمكن تطبيقها على أي كائن حي.

4-لا تحتاج لخبرة كبيرة وتفصل القطع المكاثرة على هلامة الآغاروز وتلون ببروم الايثيديوم.

**عيوب تقنية ال RAPD :**

1 - نتائجها لا تتكرر 100%.

2-لا يمكن تبادل النتائج بين المخابر المختلفة.

3-لا يمكن معرفة مناطق الجين التي تتم مكاثرتها وبالتالي لا يمكن معرفة المناطق التي تقارن مع بعضها.

## مؤشرات المقاطع القصيرة المتكررة – التوابع الدقيقية (Simple Sequence Repeats) أو المايكرولساتولايت أول ال SSR :

تعتبر مؤشرات ال SSR مؤشرات نوعية متخصصة، حيث يتم استخلاصها من DNA الكائن مباشرة وتستخدم لدراسة نفس الموقع عند أفراد أخرى تابعة لنفس النوع.

يتميز ال DNA في الكائنات الراقية بأنه مكون من 3 أنواع من المقاطع:

1 - مقاطع وحيدة النسخة.

2- مقاطع متوسطة التكرار

3- مقاطع كثيرة التكرار ومنها مقاطع الوحدات القصيرة المتكررة (Microsatellites) .

يوجد في مناطق ال DNA المتكررة انواع مختلفة من الوحدات القصيرة المتكررة والتي يتراوح عدد النيوكليوتيدات المكون لكل منها من 1 -5 أزواج من النيوكليوتيدات وتتواجد على مناطق مختلفة ومتعددة من الجين .

(A)10 =AAAAAAAAAA

(AT)10 = ATATATATATATATATATAT

(ATT)10 = ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT

(GATA)7 = GATA GATA GATA GATA GATA GATA GATA

(GACTA)6 = GACTA GACTA GACTA GACTA GACTA GACTA

يحيط بهذه الوحدات مقاطع طويلة وحيدة النسخ تتواجد مرة واحدة على الجين.

GCTGACTACGTTAG ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT CGTACAT

TGGACGCAGTACG ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT GCTGATGA

CGTTAAGCAGAGCAGCTAGTGTACAC TACTGCATGACGTACTAGCA TGA CACT AGGACA

GATA GATA GATA GATA GATA GATA GATA GATAGA A G GCACGCG TAGCT

GGCCAGTATAGGACTGACGTAAC CGCTAGCACTGA.

يتم تصميم بادئات يتم اختيارها من المناطق الوحيدة المحيطة بالوحدات المتكررة.

**هناك شروط لاختيار وتصميم البادئات:**

- ان تتكون من 18 -25 نيوكليوتيد

- ان تكون متقاربة بالعدد والتركيب النيوكليوتيدي من حيث محتواها من الادنين والتيامين والسيتوزين والجوانين.

- ان لا يكون تركيبها النيوكليوتيدي مكمل لبعضها البعض.

- ان تكون أقرب ما يمكن لمقاطع المايكروساتولايت.

– ان تتراوح القطع المرغوب مكاثرتها بين 100- 300 bp .

**مواصفات ومميزات مؤشرات ال SSR :**

- مؤشرات نوعية متخصصة

- تحتاج لبادئتين لإجراء التفاعل وسهلة الاستخدام.

- مؤشرات معروفة الموقع على الصبغي

- مؤشرات مشتركة السيادة

- نتائجها دقيقة وتتكرر 100%

- امكانية تبادل نتائجها مع المخابر الاخرى

- تستخدم بدراسات التنوع الوراثي، الخرائط لوراثية، وكمؤشرات مساعدة بالانتخاب الخ....

**عيوب مؤشرات ال SSR :**

- الحصول على البادئات موضوع مكلف وبحاجة لفترة طويلة ولخبرة.

- تسمح المقارنة بكل تفاعل بدراسة موقع واحد فقط.

{ نهاية الجلسة }