Lab (2): طرق تحضير المحاليل وانواع المحليل المنظمة المستخدمة في تجارب البايولوجي الجزيئي

المحلول Solution: هو خليط متجانس من المذيب و المذاب . المذيب هو المكون الاكبر للمحلول بينما المذاب هو المكون الاصغر.

طرق التعبير عن تركيز المحاليل

هنالك طرق عديدة للتعبير عن تركيز المحاليل و هي

١- النسبة المئوية الوزنية　　٢- النسبة المئوية الحجمية　　٣- المولارية

٤- المولالية　　٥- العيارية　　٦- الجزء بالمليون

اولا/ النسبة المئوية االوزنيه :- هي عبارة عن كتلة المذاب (بالغرام) في ١٠٠ مللتر من المحلول.

Concentration solute(w/v%) = (mass of solute / volume of solution) x 100

فلو فرضنا ان محلول مائي لكلوريد الصوديوم يبلغ تركيزه (٥ % وزنا) فهذا يعني ان كل ١٠٠ مل من المحلول تحوي ٥ غرام من ملح كلوريد الصوديوم(المذاب).

مثال// تم اذابة 1.2 غرام من NaCl في كمية كافية من الماء بحيث اصبح حجم المحلول 160 مللتر، احسب النسبة المئوية الوزنية (تركيز المحلول % وزنا).

Nacl (w/v%) =(w (Nacl g) / v(solution ml)) x 100

= (1.2 g / 160 ml) x 100 = 0.75 % g/ml

ثانيا/ النسبة المئوية الحجمية:- هي عبارة عن حجم المذاب الموجود 100 مللتر من المحلول.

Concentration (v/v %)=(volume solute (ml) / total volume of solution (ml))X 100

فالمحلول البالغ تركيزه 2% حجما يعني كل 2 مللتر (وحدة حجمية) في المذاب موجودة في 100 مللتر (وحدة حجمية مثالية) من المحلول.

مثال// احسب تركيز محلول يتالف من 12 مللتر من الايثانول في 100 مللتر من المحلول؟

(12 ml ethanol / 100 ml) X 100 = 12 % v/v

ثالثا/ المولارية Molarity :- هي عدد مولات المذاب الموجودة في واحد لتر (1000 مللتر) من المحلول.

Molarity M = moles of solute / liter of solution

المولارية = عدد المولات / واحد لتر (1000 مل)

عدد المولات = الوزن Wt/ الوزن الجزيئي Mw

الوزن Wt = (المولارية المطلوبة X الوزن االجزيئي للمادة X الحجم المطلوب) /1000

الوزن الجزيئي Mw = مجموع الاوزان الذرية للمادة

مثال// تم اذابة 23 غرام من كلوريد الامونيوم (NH4Cl) في كمية كافية من الماء ليصبح حجم المحلول 145 مللتر . احسب مولارية المحلول؟ علما ان الوزن الجزيئي ل NH4Cl هو 53.5

١. نحسب عدد مولات كلوريد الامونيوم = ٢٣ / ٥٣.٥ = 0. 43 مول

٢. حجم المحلول = ١٥٤ مل / ١٠٠٠ = 0.145 لتر

٣. المولارية = o.43 مول / 0.145 لتر = 2.97M NH4Cl

رابعا / المولالية Molality:- هي عبارة عن عدد مولات المذاب المذابة في 1000 غم من المذيب. وهي طريقة غير شائعة كثيرا في التعبير عن تراكيز المحاليل في الوقت الحالي و لكنها مفيدة في موضوع تحديد الاوزان الجزيئية للمواد بالطرق العلمية التقليدية.

المولالية =عدد مولات المذاب / وزن المذيب بالكغم

او المولالية= (عدد مولات المذاب X1000) / وزن المذيب بالغرام

مثال // احسب مولالية محلول محضر من اذابة كلوريد الصوديوم في 500 غم من الماء؟

نوجد اولا عدد مولات الملح = الوزن بالغرام / الوزن الجزئيئ = 5.85 / 58.5 = 0.1 مول

المولالية = 0.1X1000 / 500= 0.2 مولال

خامسا / العيارية Normality:- هي عدد المكافئات الغرامية من المذاب الموجودة في واحد لتر من المحلول.

العيارية N = عدد المكافات الغرامية للمذاب / حجم المحلول باللتر

العيارية هي من الطرق للتعبير عن تراكيز المحاليل وهي تعتمد على ما يعرف ب المكافيء الغرامي.

المكافيء الغرامي:- كمية من المادة ذات العلاقة بالمول تم اصطلاحه بالاساس لغرض عمليات التعادل بين الاحماض و القواعد ثم شمل بعد ذلك غيره من التفاعلات .

المكافيء الغرامي = عدد المولات / درجة الحامض او القاعدة

مثال // احسب عيارية محلول محضر من اذابة 9.8 غم من حامض الكبريتيك في كمية من الماء بحيث اصبح حجم المحلول 800 مل ؟

عدد مولات الحامض = الوزن / الوزن الجزيئي = 9.8 / 98 = 0.1 مول

درجة الحامض H2So4 = 2

عدد مكافئات الحامض = 0.1 / 2 = 0.05 مكافيء غرامي

العيارية N = 0.05 / 0.8 = 0.0625 عياري

سادسا / الجزء بالمليون Part Per Million (ppm) او الجزء بالبليون Part Per Billion (ppb) :- هي طريقة من طرق التعبير عن تراكيز المحاليل المعتمدة على كتلة المادة و تستخدم لتقدير تراكيز الصغيرة جدا فعندما نقول محلول تركيزه واحد في المليون فهذا يعني ان كل مليون غرام من المحلول مثلا يحوي واحد غم من المذاب .

Concentration (ppm) = (mass of solute / mass solution) X 10^6

Concentration (ppb) = (mass of solute / mass solution) X 10^9

مثال // عينة لمحلول مائي تزن 155.3 غم وجد انها تحتوي 1.7×10^{-4}مغم من الفوسفات ما هو تركيز الفوسفات بالجزء بالمليون؟

تركيز الفوسفات = $(1.7 \times 10^{-4} / 1.553 \times 10^{2}) \times 10^6$ = 1.1ppm

قانون التخفيف :-

Percentage(%) you have **X** Unknown volume (ml) = Percentage(%) you want **X** Volume (ml) wanted

مثال // حضر محلول 1000 مل من ايثانول تركيزه 70% من محلول ايثانول تركيزه 95 % .

لتحضير المحلول يجب معرفة حجم المحلول بتركيز 95% من خلال تطبيق قانون التخفيف

$95 \times X = 70 \times 1000$

X = 70000 / 95= 736.8 ml of 95% ethanol

المحاليل الدارئة Buffers

Buffer:- هو عبارة عن محلول مكون حامض او قاعدة ضعيفة مع ملح ذلك الحامض او تلك القاعدة يكون له القابلية على مقاومة التغيير في قيمة ال pH عند اضافة كميات قليلة من حامض قوي او قاعدة قوية مثاله Phosphate buffer، Tris buffer .

خصائص المحلول الدارىء:-

١. ان تكون له قيمة pH معروفة.

٢. لاتتغير قيمة pH للمحلول الدارىء عند مرور فترة طويلة عليه او تخفيفه.

٣. تبقى قيمة pH للمحلول الدارىء ثابتة عند اضافة كميات قليلة من حامض قوي او قاعدة قوية اليه.

* بعض انواع المحاليل الدارئة المستخدمة في البايولوجي جزيئي:-

TBE buffer: مؤلف من Tris-borate + EDTA.

TSE buffer: مؤلف من Tris-sucrose + EDTA.

STET buffer: مؤلف من Tris-sucrose + EDTA + TritonX-100.

المحاليل الدارئة يستفاد منها في تجارب تنقية الدنا و البايولوجي جزيئي فمثلا تستخدم كمولدة للشحنات.

Tris-acid:- هي محاليل دارئة فعالة في توفير ضروف اساسية جيدة في المحافظة على جزيئة الدنا من التحطم و الذوبان في الماء.

EDTA :-هي مادة تعتبر عامل مخلبيchelator agent ثنائي التكافىء شبيه بايون المغنيسيوم Mg^{+2} يعمل كعامل مساعد في حماية جزيئة الدنا من الانزيمات المحطمة لها .

Triton X-100 : هو من المنظفات و هو منظف لا ايوني ولا يمتلك شحنة في تركيبه الكيميائي وهي مفيدة في كسر التاصر غير المحب للماء ويتميز بقدرته على اذابة الدهون و الاغشية السايتوبلازمية دون مسخ البروتين.

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) : هي من المنظفات الايونية التي تمتلك شحنة و هي قوية في تاثيرها حيث باستطاعتها كسر كثير من الاواصر غير المحبة للماء و يؤدي الى فتح انطواءات البروتينات الى تركيب شبيه بالقضيب.

***محلول Saline- EDTA ((0.15 M NaCl + 0.1 M EDTA (pH=8))**

يحضر باذابة 2.92 غرام من مادة EDTA و 0.86 غرام من NaCl في 90 مللتر من الماء المقطر ثم يعدل الرقم الهيدروجيني الى 8 و يكمل الحجم الى 100 مللتر بالماء المقطر.

*** محلول TE buffer pH= 8 (0.01 M Tris- HCl + 0.001M EDTA)**

يحضر باذابة 0.092 غرام من مادة EDTA و 0.15 غرام من Tris-HCl في 90 مللتر من الماء المقطر ثم يعدل الرقم الهيدروجيني الى 8 و يكمل الحجم الى 100 مللتر بالماء المقطر.

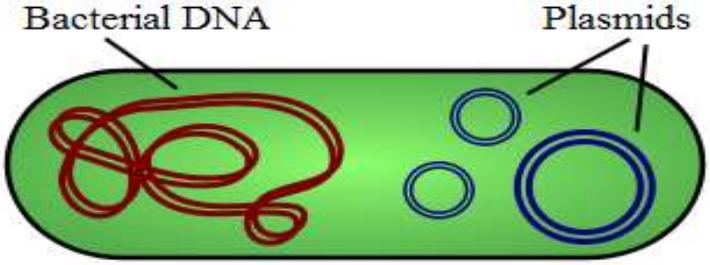
*** محلول SDS 25%**

يحضر باذابة 2.5 غرام من مادة SDS في كمية من الماء المقطر و يكمل الحجم الى 100 مللتر بالماء المقطر.

Lab (4): تحضير الدنا البلازميدي من خلايا البكتريا

Isolation of Plasmid DNA

البلازميد : هي عبارة عن دنا يقع خارج جزيئات الدنا الكروموسومية له القابلية على التضاعف بمعزل عن الدنا



الكروموسومي.

هنالك طرق عديدة لعزل الدنا البلازميدي وهي :

١- طريقة التحلل القاعدي Alkaline lysis method

٢- طريقة التحلل بالغليانBoiling lysis method

٣-Phenol method

٤-Ethidium bromide- Caesium chloride density gradient centrifugation method

تحضير الدنا البلازميدي بواسطة طريقة التحلل القاعدي:

١. لقح وسط مكون من (**500 مل من LB broth + 50mg/ml امبيسيلين**) ب مستعمرة مفردة من سلالة بكتريا ***E. coli*** حاوية على بلازميد PBR 322 ثم احضن في حاضنة هزازة على درجة **37 C** حتى تصل الكثافة الضوئية OD 600 للوسط الى 0.6 .

٢. اضف 1.2 ml10% (w/v) من chloramphenicol in ethanol الى الوسط ومن ثم احضن في حاضنة هزازة لمدة يوم كامل ليتحرر البلازميد في الخلية.

٣.احصد الخلايا بواسطة الطرد المركزي (سرعة 6000 دورة/ دقيقة لمدة 1 دقيقة على درجة حرارة ٤ مئوية) ومن ثم اعد تعليق الراسب في 5ml من محلول واحد (TEG buffer) .

محلول واحد مؤلف من (25 mM of Tris + 10 mM of EDTA + 50 mM of Glucose).

٤. حلل معلق الخلايا باضافة 10 ml من محلول اثنان و اخلطه بعناية.

محلول اثنان مؤلف من (0.2 M of NaOH + 1% OF SDS (Ph=12.5)) .

٥.اضف 5ml من المحلول الثالث المثلج و قلبه لخمس مرات و من ثم احفضه مثلج لمدة 15 دقيقة .

المحلول الثالث مؤلف من (3M of K-acetate (pH=4.8)).

٦. قم باجراء طرد مركزي للمعلق المستحلببسرعة 1000 دورة/ دقيقة لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة 4 مئوية.

٧. انقل الراشح الرائق المحتوي على البلازميد الى انبوبة جهاز الطرد المركزي اخرى ولاحظ الحجم.

٨. اضف 0.7 حجم من isopropanol المبرد الى الراشح و اخلطه بالتقليب ومن ثم قم باجراء طرد مركزي بسرعة 1000 دورة/ دقيقة لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة 4 مئوية.

٩.تخلص من الراشح و قم بغسل الراسب ب 70% ايثانول لكن لاتعلق الراسب.

١٠. اعد تعليق دنا البلاميد في 1ml من TE buffer و جمده.

Lab (5)

Lab (9): تحضير RNA من خلايا حقيقية النواة

Extraction of RNA

انواع RNA :

١. mRNA : يقوم بعملية نقل المعلومات الوراثية من الدنا الى مكان صناعة البروتين في السايتوبلازم و هو الرايبوسوم.

٢. tRNA : هذا النوع موجود في السايتوبلازم ، يحمل الاحماض الامينية لترتيبها على شريط mRNA ، يوجد 20 tRNA في الخلية الواحدة.

٣. rRNA :يسمى بالرنا الرايبوسومي لانه يدخل في تركيب الريبوسومات و له دور في عملية صناعة البروتين في السايتوبلازم.

لعزل جزيئات الرنا يجب ان تقوم بالخطوات التالية:

١- تحلل الخلية Lysis of the cell

- اخلط مع معلق خلايا ***E. coli***(0.5 O.D at 600 nm) حجم مساوي من Diethyl pyrocarbonate (DEPC) الذي يعمل كمثبط للانزيمات الهاضمة للرنا، جانس الخليط ومن ثم احضنه على درجة حرارة 4 مئوية.
- اضف 0.4 ml من 5% SDS الى معلق الخلايا (SDS يعمل على اذابة الغشاء الدهني في جدار الخلايا ليسمح لانزيمات المحللة Lysozyme من الوصول الى طبقة الببتيدوكلايكان لتحطم جار الخلية ، كذلك يعمل SDS كمثبط لنزيمات الهاضمة للرنا RNase.
- استخدم 2ml من بفر حاوي على انزيم Lysozome (400 µg/ml) لكل 10 ml من خليط خلايا***E. coli***، جانس الخليط و احضنه في درجة حرارة الغرفة لمدة 20-5 دقيقة.

٢- تنقية الرنا Purification of RNA

- قم باجراء الطرد المركزي لمعلق الخلايا المتحللة على سرعة 3000 دورة بالدقيقة و لمدة 10 دقائق.
- علق الراسب مع حجم مساوي من guanidinium thiocynate التي تعمل على تقوية مثبطات الانزيمات الهاضمة للرنا و كذلك يمسخ البروتين. يحب ان يكون pH غير قاعدي وهذا يعود الى تعليم الرنا.
- جزيئات الدنا يجب ان تزال باستخدام انزيم DNase 1 للتخلص من الحد الادنى للتلوث الدنا الجينومي.

- تزال البروتينات الملوثة باضافة خليط من (phenol: chloroform: isoamyl alcohol 25:24:1)) وتعاد هذه الخطوة مرات عديدة .
- انقل الطبقة العليا الى انبوبة اخرى واضف حجم واحد من isopropanol المطلق المثلج لغرض ترسيب الرنا.
- قم باجراء طرد مركزي على سرعة 1000 دورة بالدقيقة لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 4 مئوية.
- اهمل الراشح و اغسل الراسب ب 70% Ethanol.
- قم باجراء طرد مركزي على سرعة 1000 دورة بالدقيقة لمدة 5 دقيقة بدرجة حرارة 4 مئوية.
- اعد تعليق الرنا المعزول في 100µl من TE buffer و جمده.

حساب تركيز الرنا Calculate the concentration of RNA

Concentration of RNA (µg/ml) = O.D 260 nm x 40 x dilution factor

1 O.D 260nm = 40(µg/ml) of RNA

Purity of RNA

O.D 260 nm / O.D 280 nm = Should be 2