تقدير البروتين
Protein Determination

يحتل البروتين أهمية عالمية فى الوقت الحاضر مما له من علاقة وثيقة بزيادة عدد السكان وضرورة توفير الكميات الكافية منه للفرد الواحد يوميا وذلك لأهمية دوره الأساسى فى عمليات البناء الحيوية فى الجسم. وتختلف كمية البروتين بإختلاف مصدره نباتى كان أو حيوانى.

توجد طرق مختلفة لتجهيز العينة للتحليل منها عملية الهرس بالطواحين "الخلاط" أو أجهزة التجنيس أو باستعمال طرق أخرى فى تفكيك خلايا الأنسجة كالتجميد والإنصهار المتناوب أو باستعمال مصادر إهتزازية معينة "Ultrasonic Vibration".

أما الاستخلاص فيتم باستعمال المحاليل الملحية المخففة أو المحاليل العضوية بينما يتم التأكد من درجة نقاوة البروتين المستخلص باستعمال طرق التفريد الكهربى "Electrophoresis" بأنواعها المختلفة منها الورقى والنشوى والهلامى والبولى اكريلاميد. وهناك أيضا طرق أخرى تستعمل فى تجزئة البروتين المستخلص وتحويله إلى خليط من الأحماض الأمينية حيث يمكن تقدير هذه الأحماض بطرق التحليل الكروماتوجرافى ومنها الورقى وكروماتوجرافى الغاز/ السائل والتبادل الأيونى أو الطرق اللونية والميكروبيه.

طرق تقدير البروتين

طرق تعتمد على تقدير النيتروجين الكلى

أ- طريقة دوماس

ب- طريقة كلداهل

ج- طريقة التنشيط النيوترونى

طرق لا تعتمد على النيتروجين (طرق لونيه)

1- طريقة البيوريت

2- الطريقة اللونيه

3- طريقة المحلول الفينولى

4- الطرق التعكيرية أو الترسيب

5- طرق الارتباط بالأصباغ

الطرق التى تعتمد على تقدير النيتروجين Nitrogen determination:

تعتمد هذه الطرق على تقدير كمية النيتروجين فى العينة وهى تفترض أن كمية النيتروجين فى البروتينات متشابهه تقريبا وتبلغ حوالى 16%. أى أنه بعد معرفة كمية النيتروجين تضرب هذه النتيجة فى المعامل البروتينى العام و هو 6.25 (100÷16) لكى نحصل على كمية البروتين فى العينة غير أن هناك من يفضل فى الوقت الحاضر نشر النتيجة على أساس كمية النيتروجين فقط بدلا من تقديمها كنسبة بروتين فى العينة بدعوة وجود اختلافات فى طرق تقدير كمياتها وكذلك تؤثر هذه الكميات من النيتروجين بنيتروجين المركبات غير البروتينية مثل الأحماض النوويه وبعض السكريات والليبيدات النيتروجينية والموجوده بصفة خاصة فى المصادر البروتينية الحيوانية مثل اللحوم والبيض والسمك وكذلك الخمائر والحبوب والفاكهة والخضروات.

ولكن مقدار الخطأ المتأتى من النيتروجين غير البروتينى يعتبر قليل جدا ولا يؤثر على النتيجة المقدمة كنسبة بروتين بالغذاء.

الطرق الشائعة لتقدير النيتروجين:

1- طريقة دوماس Dumas Method:

تعتمد هذه الطريقة التى أوجدها دوماس فى فرنسا سنة 1831 على أساس تحطيم (هضم) العينة الممزوجة مع أكسيد النحاس Cupper Oxide على درجة حرارة من 700-750°م والحصول على كمية النيتروجين فى صورة غاز المتحرره مباشرة حيث يمكن قياس حجمه بواسطة جهاز نايتروميتر Nitrometer. ومنذ ذلك الحين فقد طرأت تطورات كثيرة على الطريقة الحرارية فى تحطيم العينة و كذلك طريقة تقدير كمية النيتروجين المتحرر حيث تستعمل فى الوقت الحاضر طريقة الكروماتوجرافى الغازى (GC) السريعة والتى يمكن لها أن تقدر كمية النيتروجين فيه خلال دقيقتين فقط.

2- طريقة كلداهل Kjeldahl Method:

تمكن الباحث جوهان كلداهل فى سنة 1883 من النجاح فى تقدير النيتروجين العضوى فى بروتين الحبوب ومنذ ذلك الحين مرت هذه الطريقة بعدة تحويرات إلى أن وصلت إلى شكلها الحاضر.

ففى البداية استعمل كلداهل برمنجنات البوتاسيوم $KMnO_4$ لعمليات الأكسدة أثناء الهضم بدلا من حامض الـ H_2SO_4 غير أن هذه المادة وجدت بعدئذ بأنها غير مرضية وأعطت نتائج متذبذبة. وفى سنة 1885 لاحظ ولفارث Wilfarth إن إضافة العامل المساعد (أكسيد الزئبق أو النحاس) إلى دورق الهضم مع حامض الكبريتيك أعطى نتائج باهره من حيث سرعة تحول النيتروجين العضوى إلى كبريتات الأمونيوم $(NH_4)_2SO_4$. وفى سنة 1889 وجد جننك Gunning أن إضافة كبريتات البوتاسيوم K_2SO_4 أعطت فائدة كبيرة برفعها درجة غليان مزيج حامض الكبريتيك وبالتالى أدت إلى تقصير المدة اللازمة لإنجاز التفاعلات الكيميائية الخاصة بتحويل النيتروجين العضوى إلى أمونيا ومنذ ذلك الحين يطلق على هذه الطريقة بالماكرو كلداهل ولفارث جننك وقد أصبحت الطريقة واسعة الإنتشار فى أماكن متعددة من العالم.

كما يوجد تحوير لطريقة كلداهل وتسمى هذه الطريقة بالمايكرو برجل بارناس واجنر (Micro Pergl Parnas Wagner Method) و هذا التحور عالج موضوع العينات الصغيرة المعدة للتحليل و هى تعتمد على نفس الأساس الموجود فى طريقة Macro Method من حيث إستعمال نفس الكيماويات وطريقة العمل واستعمال العامل المساعد ولكنها تختلف فى نوع الجهاز المستعمل وفى أوزان العينات المستعملة والزمن اللازم لإنجاز العمل.

كما يوجد تحوير آخر لطريقة كلداهل وفيه يستعمل حامض البوريك Boric acid بتركيز 4% وبمقدار حوالى 50ملل فى دورق إستقبال الأمونيا المقطرة حيث يتم تثبيت الأمونيا Ammoniem Borate ولكون هذه المادة متطايره إلى حد ما علية يجب المحافظة على دورق الإستقبال بحالة باردة. بعد ذلك تعاير محتويات دورق الإستقبال باستخدام حامض معلوم العيارية حتى نقطة التعادل النهائية علما بأن حمض البوريك المتحد مع الأمونيا هو حامض ضعيف ولذلك فهو لا يؤثر كثيرا على محتويات تركيز أيون الهيدروجين أثناء المعايرة مع الحامض العيارى. أما عن فائدة هذا التحوير هو أنها تستغرق وقتا أقل من الطريقة الإعتياديه وتحتاج إلى محلول عيارى واحد. تصلح طريقة كلداهل لتقدير النيتروجين العضوى فى كل من البروتين والأحماض الأمينية.

تتمثل خطوات العمل بهذه الطريقة فى ثلاث مراحل:

1- عملية الهضم.
2- عملية التقطير.
3- عملية المعايره والحساب.

وفيما يلى شرح تفصيلى لهذه المراحل الثلاثة:

أولا عملية الهضم:

الفكرة الأساسية فى هذه العملية تفاعل كمية من المواد المراد تقدير البروتين فيها بحامض الكبريتيك المركز الساخن فى دورق هضم كلداهل فيتحول كربون المادة الغذائية إلى ثانى أكسيد كربون وجزء من الأيدروجين الداخل فى تركيبها يتحول إلى ماء والجزء الأخر يتحد مع النيتروجين مكونا أمونيا والتى تتحد بحامض الكبريتيك المركز الزائد عن عملية الهضم مكونه كبريتات أمونيوم. كما يجب أن نلاحظ أيضا أن جزء من حامض الكبريتيك المركز يتحل إلى ثانى أكسيد كبريت.

$$H_2SO_4 \longrightarrow H_2O + SO_2 + O$$

تستمر فى عملية التسخين مع حامض الكبريتيك المركز حتى تصير محتويات الدورق عديمة اللون. وتضاف عادة لمحتويات دورق الهضم كبريتات بوتاسيوم صلب لرفع درجة غليان المحلول حتى تقل المدة اللازمة لإنهاء عملية الهضم كما تضاف أيضا كمية صغيرة جدا من معدن الزئبق أو أكسيد الزئبق أو كبريتات النحاس كعامل مساعد لإسراع عملسة الهضم.

ملاحظة: يستخدم الأن مادة واحدة تعمل على رفع الحرارة وكذلك كعامل مساعد و هى ثانى أكسيد السلينيوم. للتأكد من خلو جميع المواد الكيميائية المستعملة فى عملية الهضم من عنصر النيتروجين تجرى تجربة هضم باستخدام وزنة مماثلة للعينة من سكر القصب بدلا من عينة المادة البروتينية وتعامل نفس معاملة العينة الأصلية فإن وجد بها أى كمية من النيتروجين بعد التقدير تطرح هذه الكمية من كمية النيتروجين فى العينة.

- يمكن تمثيل ما يحدث فى دورق الهضم بالمعادلات الآتية:

$$\text{Protein} + H_2SO_4 \xrightarrow{370\text{-}410°C} SO_2 + NH_4^+ + CO_2 + H_2O$$

$$NH_4^+ + H_2SO_4 \longrightarrow (NH_4)_2SO_4$$

ثانيا عملية التقطير:

يمكن تمثيل ما يحدث فى عملية التقطير بالمعادلات الآتية:

$$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \longrightarrow 2NH_4OH + Na_2SO_4$$

$$NH_4OH \longrightarrow NH_3 + H_2O$$

ثالثا عملية المعايرة والحساب:

- إذا كان المحلول المستخدم فى استقبال الأمونيا هو حامض H_2SO_4 معلوم التركيز بالضبط يستخدم فى هذه الحالة محلول معلوم العيارية من NaOH فى تقدير الحامض الزيادة الذى لم يستهلك فى التفاعل وذلك فى وجود دليل M.O or M.R.
- إذا كان المحلول المستخدم فى استقبال الأمونيا هو حمض البوريك يستخدم فى هذه الحالة محلول حامض H_2SO_4 معلوم التركيز فى معايرة الأمونيا فى وجود دليل خاص هو Bromocresol green and Methyl Red.

طريقة الحساب:

أولا فى حالة استخدام حامض H_2SO_4 فى استقبال الأمونيا:

نفرض أن

حجم NaOH 0.01ع المستهلك فى معايرة الحمض الزيادة = 10مل

حجم H_2SO_4 الكلى = 25مل (0.01ع)

حجم ناتج الهضم 0.1جرام من العينة = 100مل

استخدم منها فى التقطير 10مل

عدد مكافئات H_2SO_4 الكلية = عدد مكافئات الأمونيا + عدد مكافئات H_2SO_4 الزيادة

عدد مكافئات H_2SO_4 الكلية = عدد مكافئات الأمونيا + عدد مكافئات NaOH

عدد مكافئات الأمونيا = مكافئات H_2SO_4 الكلية – مكافئات NaOH

= الحجم باللتر × العياريه للحمض – الحجم باللتر × العياريه للقلوى

$= 0.025 \times 0.01 - 0.01 \times 0.01$

$= 0.00025 - 0.0001$

= 0.00015مكافئ / 10مل ناتج هضم

عدد مكافئات الأمونيا / 100مل ناتج هضم = 0.00015 × 10 = 0.0015مكافئ

وزن النيتروجين فى ناتج الهضم = مكافئات الأمونيا × الوزن المكافئ للنيتروجين

$= 0.0015 \times 14$

= 0.021جرام

وزن البروتين فى العينة = وزن النيتروجين × 6.25 فى حالة البروتين الحيوانى

= وزن النيتروجين × 5.75 فى حالة البروتين النباتى

% للبروتين = (وزن البروتين/ وزن العينة) × 100

ثانيا فى حالة استخدام حامض البوريك فى استقبال الأمونيا:

نفرض أن

حجم حمض H_2SO_4 0.01ع المستخدم فى معايرة ناتج تقطير 10مل ناتج هضم = 5مل

كان ناتج هضم 0.1جرام = 100مل

عدد مكافئات الأمونيا = عدد مكافئات H_2SO_4

= 5 × 0.01

= 0.05مكافئ/ 10مل ناتج هضم

عدد مكافئات النيتروجين / 100مل ناتج هضم = 0.05 × 10 = 0.5مكافئ

وزن النيتروجين فى ناتج الهضم أو العينة = عدد مكافئات النيتروجين × الوزن المكافئ للنيتروجين

= 0.5 × 14 = 7ملجم

وزن البروتين فى العينة = 7 × 6.25 = 43.75 ملجم

%للبروتين = (وزن البروتين/ وزن العينة) × 100

= (43.75/ 100) × 100 = 43.75%

على الرغم من أن طريقة كلداهل تعتبر طريقة قياسية Standard ولكن لها بعض العيوب نذكر منها:

1- إن حساب البروتين على أنه (كمية النيتروجين × 6.25) فيه خطأ قد يكون كبيرا فى بعض الأحيان فالمواد الغذائية تحتوى على مواد نيتروجينية غير بروتينية مثل الأمونيا والأحماض الأمينية التى تحتوى على 80% نيتروجين وبهذا فقد يختل تقدير البروتين بطريقة كلداهل نتيجة إحتواء المواد الغذائية على مثل هذه المواد.

2- البروتينات لا تحتوى على 16% نيتروجين بل تختلف النسب إختلافا كبيرا فى أنواع البروتينات.

فالبروتينات الحيوانية تحتوى على حوالى 16.67%

والكازين فى حدود 15%

البروتينات النباتية تحتوى على 16.4- 18.7%

حتى فى البروتين الواحد تختلف نسبة النيتروجين ففى الكازين تختلف النسب من 14.7-16.04% على حسب تصحيح التقدير بالنسبة للرطوبة والرماد.

3- يعترى تقدير النيتروجين بطريقة كلداهل عدة صعوبات جوهرية أهمها اختيار أحسن العوامل المساعدة بأقل النسب وكذلك تحديد أنسب مده للهضم بحيث لا تؤدى إلى خطأ فى التقدير.

3- طريقة التنشيط النيترونى Neutron Activation:

تمتاز هذه الطريقة بأنها سريعة جدا فى تقدير النيتروجين فى العينة وقد تستغرق حوالى خمس دقائق لعمل ذلك وهى تعمل بالتنشيط النيترونى وتعتبر دقيقة جدا إلا أن الأجهزه المستعملة مكلفه جدا.

*** طرق تحليلية أخرى:**

هناك طرق أخرى تستعمل فى تقدير البروتينات و هى فى الأساس تعتمد على التغيرات التى تحدث لبعض الصفات الفزيائية للمحاليل عند ذوبان البروتين فيها ومن هذه الصفات.

1- الكثافة النوعية.
2- معامل الإنكسار.
3- اللزوجة.
4- الشد (التوتر) السطحى.
5- إمتصاص الإشعاع الذرى.
6- التوصيل الكهربى وبالتالى الإستقطاب Polarization.

الطرق الأساسية فى كيمياء الأحماض النووية

Basic Methods in Chemistry of Nucleic Acids

مقدمة:

أدى التقدم العلمى الكبير فى السنوات الأخيرة إلى ابتكار وتطوير كثير من الطرق المتعلقة بالجزيئات الحيوية الكبيرة مثل الأحماض النووية والبروتينات النووية والبروتينات بصفة عامة. كما تطلب ذلك أن تكون هناك معامل متخصصة فى الأبحاث المتعلقة بالجزيئات الحيوية ويستلزم الأمر وجود تجهيزات وأدوات وأجهزه خاصة بهذا النوع من البحث العلمى وفيما يلى سوف نوضح أهم هذه الأجهزة والأدوات التى يجب توفرها فى معمل الMolecular Biology، ويمكن تقسيم الأجهزة والأدوات إلى قسمين:

أولا: التجهيزات العامة

1- تجهيزات الأمان والحماية Safety:

لهذا الغرض يجب توفر ما يلى:

أ- التهوية الجيدة.

ب- حجرة غازات مزودة بشفاطات حيث أن كثير من المذيبات تعطى أبخرة سامة.

ج- عدد كبير من القفازات البلاستيك لحماية الأيدى عند تناول حيوانات التجارب أو الثلج الجاف أو الصوف الزجاجى...إلخ وأيضا عند التعامل مع الكيماويات والمذيبات والمواد المشعة وبشكل عام يجب أن تتناسب طريقة الوقاية مع درجة ونوع الخطر المتوقع.

د- أنابيب إطفاء الحرائق وأنابيب أكسجين وغيرها من التجهيزات الهامة الأخرى.

2- الماء Water:

من المهم جدا توفر الماء المقطر الخالى من الأيونات على درجة عالية من النقاوة لهذا النوع من البحث، ولا يجب التهاون فى تلك الجزئية حيث أن كثير من مشاكل البحث فى هذا المجال يكون مصدرها عدم نقاوة الماء.

3- الحضانات Incubators:

وظيفتها:

(أ) تحقيق بيئة مناسبة من حيث الحرارة والرطوبة.....إلخ.

(ب) تحفظ بها المواد أثناء التفاعل خاصة التفاعلات الإنزيمية لزمن محدد. وقد لا تتعدى أن تكون هذه الحضانات عبارة عن حمام مائى ساخن على درجة حرارة معينة أو أن تكون

عبارة عن حمام ثلج إذا كان التحضين المطلوب على درجات حرارة التبريد، وقد تطورت هذه الأجهزة لتصبح أفران جافة أو رطبة أو تحت تفريغ، كما أن بعض المعاهد العلمية بها حجرات خاصة هيئت بجميع الظروف الملائمة ويتم التحكم فيها بالكمبيوتر، كما تزود بعض هذه الحضانات بأجهزة رج إذا لزم الأمر.

4- تجهيزات إنماء الخلايا Cell growth equipments:

هى عبارة عن حضانات خاصة تضمن حماية الخلايا النامية أو التفاعلات الإنزيمية من التلوث أثناء التجربة، وقد يلزم أن تزود هذه الحضانات بجهاز رج دائرى لتحريك المزارع البكتيرية أثناء النمو.

5- التعقيم Sterilization:

ويستخدم لهذا الغرض بعض الأجهزة والأدوات منها:

أ- الأتوكلاف: لتطهير المحاليل والأدوات وغيرها قبل استخدامها فى طرق دراسة الجزيئات الحيوية.

ب- المرشحات لتنقية المحاليل.

ج- تجهيزات تستخدم فى عمليات التطهير والتعقيم (مصدر أشعة فوق بنفسجيةUV – كحول إيثانول 70% - لهب بوتاجاز).

6- أجهزة الطرد المركزى Centrifuges:

يوجد من هذه الأجهزة ما هو صغير وبسيط وما هو كبير ومعقد حسب الغرض من الدراسة ومنها:

أ- جهاز صغير محدود السرعة.

ب- جهاز صغير مزود بإمكانية التبريد واستخدام أنابيب أكبر حجما.

ج- جهاز مزود بنظام تبريد وإمكانية استخدام أنابيب مختلفة الأحجام.

د- جهاز Ultracentrifuge وهو يجمع بين مميزات عديدة منها:

- السرعات العالية جدا بحيث تصل إلى 80.000 لفة/دقيقة.
- إمكانية التبريد أثناء الفصل.
- الدوران تحت تفريغ.
- تستخدم أنابيب ذات أحجام مختلفة.
- يوجد لها Rotors ذات أحجام مختلفة وزوايا (ثابتة – مائلة – رأسية – متحركة).

7- التبريد Refrigeration:

- ويدخل تحت هذا البند من التجهيزات ما يلى:
- ثلاجة عادية (4°م).
- فريزر (-20°م) وهذا قد يكون جزء من الثلاجة العادية.
- فريزر (-70°م) أيضا مطلوب فى بعض الحالات.
- بعض معاهد البحوث تحتوى حجرة مبردة (4°م) لإتمام التفاعلات ولإجراء الطرد المركزى لمدة طويلة بداخلها.
- من المواد الأخرى اللازمة فى عمليات التبريد (النيتروجين السائل – الثلج الجاف – الثلج المجروش).

8- أوعية بلاستيك Plastic ware:

ومن أمثلة هذه المواد البلاستيكية:

- أنابيب صغيرة سعة 1.5ملل للعينات الدقيقة.
- أنابيب ذات أغطية وذات سعات مختلفة 10، 15، 25، 40ملل. (عادة ما تستخدم فى المزارع الخلوية).
- أنابيب مختلفة الأحجام تستخدم للطرد المركزى عالى السرعة.
- دوارق بأحجام مختلفة.
- أطباق للمزارع الخلوية.
- سحاحات وماصات بلاستيك.

9- أوعية زجاجية Glass ware:

ومن الأمثلة الشائعة لذلك ما يلى:

- دوارق كبيرة (1- 4لتر) للمزارع الخلوية.
- زجاجات ذات أحجام مختلفة للمحاليل.
- أنابيب زجاجية ذات جدار سميك (30ملل) تستخدم فى التفاعلات والطرد المركزى.
- الأدوات العادية الشائعة ف المعامل مثل (دوارق – كاسات – مخابير مدرجة – ماصات- سحاحات - ......إلخ).

يلاحظ أن جميع الزجاجيات التى تستعمل فى عينات DNA أو RNA يجب أن تغسل جيدا بالحامض المركز والماء وتعقم قبل الأستعمال.

10- أجهزة القياس الضوئى Light measurement:

أ- جهاز (UV – Visible spectrophotometer) يستخدم عادة فى كثير من الطرق والتفاعلات اللونية.

ب- مصدر ضوء UV وهو يستعمل فى رؤية نواتج التفاعلات على الجيل أو الورق وغيرها.

11- التجهيزات المعملية الشائعة الأخرى ومنها:

- pH meter: جهاز قياس حموضة المحاليل المنظمة.
- Hot plat: سخان مائى.
- Stirrer: جهاز تقليب أفقى مغناطيسى.
- Vortex mixer: جهاز تقليب أنابيب رأسى.
- Balances: موازين إلكترونية.
- Shaker: جهاز رج أفقى ودائرى.
- ساعات معملية – ماصات – مجففات – مضخة تفريغ.
- مصادر غازات (هواء – أكسجين – ثانى أكسيد الكربون – نيتروجين).

<u>ثانيا: التجهيزات الخاصة بدراسة الـ Molecular Biology</u>

1- التصوير Photography:

كثير من الدراسات يلزم لها عمليات تصوير لتسجيل النتائج، ولذلك يكون من المفيد توفير:

أ- كاميرا من نوع البولارويد لتصوير الجيل أثناء وجوده فى مجال إضاءة تحت تأثير أشعة UV.

ب- كاميرات أخرى عادية.

ج- أفلام شرائح موجبة وأخرى سالبة.

د- صندوق إضاءة لتصوير الجيل من فوقه.

2- نظام فصل كهربائى Electrophoresis system ويشمل:

- وحدات إمداد بالطاقة الكهربية مختلفة القوة.
- وحدات الفصل الكهربى ومنها نظام الأعمدة أو الSlabs والأخيرة قد تكون رأسية أو أفقية.
- حمام مائى مزود بثرموستات ومضخة لتبريد الجيل.
- أحواض بلاستيك وزجاج لصبغ وغسيل الجيل.
- أمشاط Combs لتحديد أماكن تحميل العينات على الجيل.
- Spacers مختلفة السمك، كلبسات ...... إلخ.

3- أطباق وأحواض Dishes and Pans:

أحجام مختلفة من الأطباق والأحواض والبلاستيك تستعمل في حفظ وتخزين وإجراء التفاعلات وصبغ وغسيل الجيل وغيرها.

4- تجهيزات خاصة Special equipments مثل:

- السرنجات ذات الأحجام المختلفة والإبر الخاصة بها.
- سرنجات ميكرومترية للاستخدام مع الأحجام الصغيرة.
- ماصات أوتوماتيكية لنقل الأحجام الصغيرة جدا من العينات وأيضا لنقل المواد المشعة.
- مجفف للجيل يستخدم لتجفيف العينات الحساسة للحرارة دون رفع الحرارة كثيرا.

5- تجهيزات محلية Homemade equipments:

قد يستلزم الأمر أن يقوم الباحث بتصميم وتنفيذ بعض التجهيزات والأدوات بنفسه عندما يراها ضرورية لعمله ولا تكون متوفرة تجاريا.

الطرد المركزى فائق السرعة

Ultra-Centrifugation

تميزت الفترة الأخيرة التى مر بها علم كيمياء الجزيئات الحيوية بالتقدم السريع فى طرق البحث ووسائله، ولكن قد يجد بعض الباحثين صعوبة ما فى استعمال الأجهزة العلمية ذات التكنولوجيا المتطورة. ومن أوضح الأمثلة على ذلك ما هو فى مجال فصل وتشخيص الجزيئات الحيوية الكبيرة (Biopolymers) بواسطة عمليات الطرد المركزى عالى السرعة (Ultracentrifugation).

وقد تقدمت هذه الأجهزة تقدما كبيرا فى السنوات الأخيرة حيث أصبحت أكثر تعقيدا، تتيح استخدام واسع من Rotors ذات الأحجام والأقطار المختلفة، كما زاد معدل السرعة القصوى Maximum rotation speed وزاد أيضا مستوى التحميل لكل من الRotors والأنابيب.

ومن المهم أن ندرك أن التعامل مع مثل هذه الأجهزة دون دراية كفاية يسبب أضرارا أقلها ضياع العينة أما أكبرها فقد يصل إلى تحطيم الجهاز نفسه و هو طبعا باهظ الثمن، وفى الماضى كانت المواد ذات الكثافة المختلفة التى يتم فصلها بالطرد المركزى محدودة وبسيطة، ولكن فى السنوات الأخيرة دخلت إلى هذا المجال مواد أخرى مثل جزيئات الأحماض النووية وأمكن الحصول على نتائج عالية الجودة فى فصل هذه المواد والتعرف عليها بناءا على اختلاف كثافتها أو عن طريق التحكم فى ظروف عملية الطرد المركزى نفسها.

جهاز الـ Ultracentrifuge

مميزات الأجهزة المتقدمة:

تتميز الأجهزة الحديثة من أجهزة الطرد المركزى عالى السرعة بعدد من المميزات أهمها:

1- يعطى سرعات دوران عالية جدا تصل إلى 70000 – 80000 لفة/دقيقة.
2- تعطى إمكانية إستعمال Rotors متعددة على نفس المحور تتسع لأعداد مختلفة من الأنابيب.
3- وجود Rotors تتيح تغيير زاوية وضع الأنابيب أثناء الدوران كأن يصبح وضعها أفقى تماما مما يعطى فصلا مستويا لمكونات المحلول.
4- إتاحة إمكانية التحكم فى درجات الحرارة أثناء الطرد المركزى نظرا لاحتوائها على نظام تبريد.
5- تحتوى على نظام لتفريغ الهواء أثناء الدوران داخل الكابينة.

النقاط الواجب اختبارها عند كل عملية طرد مركزى:

بشكل عام أن يكون لكل جهاز من الأجهزة الهامة غالية الثمن مثل الـ Ultracentrifuge دفتر خاص تسجل فيه حركة الجهاز ومواعيد ونوع العمليات ومدة الدوران وسرعته واسم القائم بالعملية فى كل مرة، حتى يمكن متابعة الجهاز وإجراء عمليات الصيانة الدورية اللازمة.

إضافة إلى ذلك فيجب قبل كل عملية أن يتم اختبار كل مما يأتى:

1- مستوى الزيت:

يوجد مستودعات للزيت ويوجد دليل خاص المستوى الذى يجب أن يكون عليه الزيت فى المستودعات فإن لوحظ نقص مستوى الزيت فيجب إضافة كمية من الزيت قبل بدأ التشغيل.

وعموما فى حالة الرغبة فى تشغيل الجهاز لمدة طويلة فيكون من الواجب ملئ المستودعات بالزيت بحيث تحتوى على رصيد كاف لتعويض ما يستهلك أثناء فترة التشغيل. وبعد إضافة الزيت يجب التأكد أن فوهة المستودع مغلقة بإحكام بواسطة الغطاء الخاص بها.

2- نظام الإمداد بالماء:

يجب اختبار توصيلة الماء إلى الجهاز والتأكد أن الماء يصل للجهاز، كما يجب أن يستخرج مرشح الماء الداخل للجهاز وتنظيفه كل فتره حتى لا يتأثر معدل سريان الماء بالجهاز مما يؤثر على كفائة تشغيله.

3- فحص كابينة الـ Rotor وصحة استقرار الـ Rotor على المحور فى المكان الصحيح وهنا يجب التأكد من الآتى:

أ- التأكد من سلامة ونظافة لمبة التحذير من السرعة الزائدة.

ب- إذا وجد ماء متكثف على جدار الكابينة يجب أن يجفف بفوطة نظيفة.

ج- يجب أن يكون سطح الـ Rotor جافا، وإذا لم يكن كذلك يجفف بفوطة نظيفة.

4- التأكد من مصدر التيار الكهربى.

إجراء عملية الطرد المركزى:

1- توضع العينات المراد إجراء الطرد المركزى لها فى الأنابيب الخاصة بالجهاز وهنا يراعى تساوى الحجوم المستعملة فى كل أنبوبة حتى تضمن التوازن فى جميع أجزاء الـ Rotor ثم تغطى الأنابيب بإحكام.

2- توزع الأنابيب على الأماكن المخصصة لذلك فى الـ Rotor وإذا كان عدد العينات أقل من الأماكن فيراعى توزيعها بحيث يتقابل كل زوج منها فى الوضع إذا كان عددها زوجى أما إذا كان عددها فرديا فتضاف أنبوبة تحتوى نفس الحجم من الماء لتحقيق التوازن فى الRotor أثناء الدوران.

3- يحكم غطاء الـ Rotor بعد وضع أنابيب العينات.

4- يغلق باب الكابينة ويتم التأكد أن نظام التفريغ يعمل بكفائة عن طريق اللمبة الدالة على ذلك حيث لا يجب أن يبقى الهواء الجوى داخل كابينة الجهاز أثناء الدوران.

5- يضبط منظم الحرارة على الدرجة المطلوبة والتأكد من أن الترمومتر يشير إلى تلك الدرجة وأن الثرموستات يعمل بشكل عادى.

6- يتم تحديد سرعة الدوران (عدد اللفات/دقيقة) عادة بناءا على حجم العينة المستعمل بالاستعانة بجداول وعلامات بيانية خاصة، حيث نلاحظ فى كثير من الطرق أنها تستخدم xg للتعبير عن السرعة فمثلا 1200xg لاتعنى 1200 لفة/دقيقة.

ولكنها تتغير حسب حجم العينة ويمكن تحويل xg إلى لفة/دقيقة من الجداول الخاصة بذلك.

7- تضبط ساعة الجهاز Timer على الزمن المطلوب لعملية الطرد المركزى.

8- يبدأ تشغيل الجهاز بعد ضبط معدل السرعة المطلوب وسوف يصل الجهاز تدريجيا إلى حد السرعة المطلوبة، ثم يثبت عليها أوتوماتيكيا ويجب باستمرار التأكد من أن اللمبة الدالة على أن السرعة عادية مضاءة.

9- عندما يشير عداد السرعة إلى عدد اللفات/دقيقة المطلوب يضغط زر تشغيل الساعة لبدء حساب الزمن المحدد من قبل ويلاحظ فى أجهزة الـ Ultracentrifuge ألا يقل الوقت عن 30دقيقة.

10- إنهاء العملية:

أ- يلاحظ أن الجهاز سوف يفصل أوتوماتيكيا بعد انتهاء الزمن المحدد، وهنا يجب الانتظار حتى يتوقف الـ Rotor تماما ويستدل عل ذلك بانطفاء اللمبة الدالة على (Speed normal).

ب- هنا يمكن ضغط الزر الخاص بكل من نظام التبريد ونظام التفريغ إلى الوضع off، فتمتلئ الكابينة مرة ثانية بالهواء.

ج- يفتح باب الكابينة وينزع الRotor من مكانه، ومن المستحسن إعادة غلق الباب مباشرة للمحافظة على درجة البرودة للعملية التالية، وأيضا لإعادة تنشيط مضخة التفريغ كما أن ذلك يساعد على منع تكثيف الماء على الجدار الداخلى للكابينة وعموما يجب عدم ترك باب الكابينة مفتوحا لمدة طويلة لحماية حلقة المطاط التى تحيط بالباب من الجفاف والتشقق مما يعيق كفائة الغلق ويعيق كفائة التفريغ ويجب تنظيف هذا المطاط من وقت لآخر بواسطة الكحول.

د- يفك غطاء الـ Rotor وتستخرج الأنابيب وتوضع على حامل رأسى وبذلك تنتهى عملية الطرد المركزى ويمكن البدء فى عملية جديدة.

الكثافة التعويمية للجزيئات Buoyant Density of particles

لكى نفهم المقصود بهذا التعبير يجب أن نعرف أن كثافة الجزئ لاتعتمد فقط على تركيبه الكيميائى وبنائه الفراغى، ولكنها أيضا تعتمد على خاصية الـ Hydration أو كمية الماء المرتبطة بالجزئ، حيث يتحرك هذا الماء المرتبط مع الجزئ مما يقلل من كثافته المؤثرة Effective density فى عملية الطرد المركزى، وتتوقف كمية الماء المرتبط على تركيز الأيونات والجزيئات الأخرى المحبة للماء فى البيئة وهى التى تقوم بربط الماء إليها ومن ناحية أخرى قد ترتبط بعض الأيونات أو الجزيئات بالجزئ الكبير فتزيد من كثافته.

وعلى ذلك فإن الكثافة المؤثرة للجزئ تتأثر بكل من:

1- الطبيعة الكيميائية للجزئ (تركيبه الكيماوى والبنائى).

2- تركيز المواد الذائبة فى البيئة (الجزيئات والأيونات المحبة للماء).

لذلك فإن الاصطلاح Buoyant density هو تعبير يستعمل لوصف كثافة الجزئ المعين فى بيئة معينة، وعادة تكون هذه الحالة فى اللحظة التى تلتقى عندها حالتى الراسب والمحلول أى هى اللحظة التى يتوقف عندها ترسيب جزيئات المادة فى وسط معين.

ومما هو بالذكر أن الـ Buoyant density لبعض الجزيئات ذات الطبيعة الكيميائية الخاصة تختلف إختلافا جوهريا من بيئة إلى أخرى، وكمثال لذلك نجد أن الـ Buoyant density للحمض النووى DNA فى:

الماء 1.1 جم/سم^3 فى محلول ملحى 1.7 جم/سم^3 كثافته المحسوبة من تركيبه الكيميائى 2 جم/سم^3.

من ذلك يتضح أن كمية لا بأس بها من الماء ترتبط عن طريق روابط هيدروجينية مع جزئ الـ DNA فى المحلول المائى.

وعامل الحرارة هنا له تأثير واضح على كل من:

كثافة البيئة، لزوجة البيئة، درجة الـ Hydration وبالتالى على خاصية الـ Buoyant density.

ماذا يتم على الـ DNA وكيفية تقديره:

1- يؤخذ راسب الـ DNA ويغسل مرتين بكحول إيثايل 75% ثم كحول 95% ثم مخلوط من كحول إيثايل وإثير بنسبة 1:1 مرتين فى كل حالة ثم يغسل بعد ذلك بالإثير.

ملحوظة:

الإثير عبارة عن مذيب عضوى قابل للاشتعال ولذلك يحذر من سكبه فى الحوض أو الإلقاء به على أرضية المعمل ولكنه يجمع فى إناء ويسلم إلى عامل بالمعمل للتخلص منه بطريقة سليمة.

2- يجفف الراسب هوائيا وتعد أنبوبة قطرها 0.5- 1 سم وينقل إليها الراسب الجاف هوائيا.

3- يندى الراسب بواسطة محلول حمض بيركلوريك 57% ويجب أن تتم هذه العملية بحذر شديد جدا وتترك الأنبوبة حتى تجف البيركلوريك من على الجدار حتى لا تحدث فرقعة أثناء قفلها.

4- يتم قفل الأنبوبة على لهب بنزين ويتم هضم الراسب فى البيركلوريك فيتحول الـ DNA إلى القواعد الأزوتية المكونة له.

5- بعد ذلك يتم نشر الأنبوبة بواسطة مشرط حقن ويضاف إلى المحتوى نقطة أو نقطتين من الماء المقطر مع خلط الناتج جيدا بالماء المقطر ثم يؤخذ الجزء الرائق من الأنبوبة.

6- يتم عمل Spots من الجزء الرائق على ورقة كروماتوجرافى أو شريحة TLC محملا عليها سليلوز أو مثيل سليلوز ونجرى تفريد فى محلول مكون من

$HCl : Isopropanol : H_2O$

35 : 175 : 5

7- يتم الكشف عن كل قاعدة أزوتية بواسطة جهاز Chem-microscop وهو عبارة عن لمبة UV خاصة بإظهار القواعد الأزوتية.

ملحوظة:

يحذر من النظر فى أشعة الـ UV بدون أرتداء نظارة بيضاء تحمى العين من تأثير الـ UV الضاره.

8- يتم تحديد موضع كل قاعدة أزوتية بالقلم الرصاص ثم يتم قطع كل مساحة على حده ووضعها فى أنبوبة اختبار نظيفة.

9- يضاف لجميع الأنابيب حجم معلوم من 0.1 HCl ع.

10- تترك الأنابيب لمدة 15 دقيقة ثم يؤخذ المحلول الرائق (3-5 مللى) ويتم قراءة كل قاعدة عند الطول الموجى المناسب لها.

11- يتم حساب النسبة المولارية لكل قاعدة على حده.

ماهى أهمية استخدام حامض البيركلوريك والهيدروكلوريك:

1- يعتبر حامض البيركلوريك والهيدروكلوريك من المؤكسدات المتخصصة حيث يقوم بكسر رابطة الإستر وذلك فى الخطوة الأولى.

2- فى الخطوة الثانية يقوم بكسر رابطة الـ N-glucoside linkage حيث تخرج الـ Base وتكسر وحدة السكر إلى الفورمالدهيد وناتج الكحول الأول وحامض الفورميك وناتج الكحول الثانوى ومجموعة الهيمى أسيتال.

أهمية كسر الرابطة الجليكوسيدية فى دراسة التركيب القاعدى Base composition

1- تلعب دور كبير فى إثبات التركيب الكيميائى للأحماض النووية.

2- تستعمل حديثا فى تحديد التركيب النيوكليوتيدى للأحماض النووية.

3- تستعمل حديثا فى دراسة التركيب الأولى للأحماض النووية.

4- تفيد فى التعرف على نوع القواعد الأزوتية (بيرميدين – بيورين).

5- تفيد فى معرفة النشوء والتطور حيث وجد أن النباتات الأولية تحتوى على نسبة من A, T أقل من G, C فى الـ DNA بينما النباتات الراقية أو الأكثر تطورا عكس ذلك.

6- بتحليل القواعد فى الوسط القلوى يكون RNA أكثر حساسية وبالتالى يمكن فصل الـ RNA عن الـ DNA فى خليط منهما.

ميكانيكية كسر الرابطة الجليكوسيدية فى الأحماض النووية بواسطة الأحماض:

يوجد عدد كبير من الأحماض يمكن استخدامها لهذا الغرض ومنها ما هو:

أ- معدنى مثل: $HCL, HBr, H_2SO_4, HClO_4$

ب- عضوى مثل: $CCl_3COOH, CH_3COOH, HCOOH$

ويعتبر حامض البيركلوريك هو أفضل هذه الأحماض حيث لا يحدث أى تغيرات فى الوسط عند استخدامه. وفى هذه الطريقة يتم تسخين الأحماض النووية مع الأحماض المعدنية على درجة 100-125 °م ولمدة 1-4 ساعات فتكسر الرابطة الجليكوسيدية وتنفصل القواعد الأزوتية.

أما عن ميكانيكية الأحتمالات التى يمكن حدوثها تحت هذه الظروف فيمكن إيضاحها من المعادلات الموضحة التالية:

ويلاحظ أن:

كسر الرابطة بالأحماض عملية سهلة وأنه لا يوجد اختيار فى كسر الرابطة فى الوسط الحامضى بل أنه يتم كسر جميع الروابط للتعرف على النواتج من القواعد الأزوتية.

ثبات الـ RNA عن الـ DNA فى الأحماض:

من أكثر النظريات قبولا فى عملية كسر الرابطة الجليكوسيدية بالأحماض هى ميكانيكية تكوين بروتون الأكسجين فى حلقة الـ Furanose حيث يعقبها فتح الحلقة عن طريق انتقال الإلكترون خلالها.

ووجود مجموعة الـ OH على الـ C2 فى سكر الـ Ribose فى حالة الـ RNA تعمل على:

1- صعوبة تكوين بروتون الأكسجين نظرا لأن لها Inductive effect.

2- زيادة ثبات المركبات الوسطية نظرا لإعاقة حركة الإلكترونات خلال الحلقة.

وهذا يفسر الأساس الكيماوى لثبات الـ RNA الذى يحتوى مجموعة الـ OH على الـ C2 عن الـ DNA الذى لا يحتوى على هذه المجموعة على الـ C2 باستخدام الأحماض.

كيفية الحصول على الـ DNA بقدر الإمكان طبيعيا:

يتضح من خطوات الطريقة السابقة أنه يمكن بها فصل الأحماض النووية فى صورة غير طبيعية Denaturated (pH مرتفع – درجة الحرارة).

ولكى يمكن الحصول على الـ DNA بقدر الإمكان طبيعيا يمكن استخدام الطريقة التالية:

1- يؤخذ النسيج الحيوى وتتم عليه عمليات نزع الدهن وذلك بمزج النسيج الحيوى أو نقعه فى الإثير وتكرر هذه العملية بالمزج أو النقع.

2- يتم تجفيف العينة هوائيا ثم تطحن بعد ذلك بضربها فى خلاط يمتاز بأن الإناء الخاص به يتحمل درجات حرارة منخفضة حتى يتسنى طحن العينة فى الآزوت السائل.

ملحوظة:

يخشى عند استخدام الآزوت السائل ملامسته للجلد أو سقوطه عليه.

أهمية أو مميزات استخدام الآزوت السائل:

أ- يساعد على تكسير الجدر الخلوية.

ب- خفض درجة الحرارة إلى ما دون درجة حرارة فعل إنزيمات التحلل فى الخلية وبذلك تتم حماية الأحماض النووية من عمل الإنزيمات مثل إنزيم Nuclase وإذا لم يتوفر الآزوت السائل يتم طحن الأنسجة الحية فى محلول منظم (pH 8) حيث يتكون هذا المحلول من:

NaCl	0.15
Sodium Citrate	0.015
EDTA	0.0015

(Ethylene Diamine Tetra Acetic acid)

ولكل مكون من هذه المكونات أهمية كبيرة عند فصل الأحماض النووية كما يلى:

1- كلوريد الصوديوم NaCl:

يساعد على ذوبان نيكليوبروتين الكروماتين.

2- ملح سترات الصوديوم:

يعمل على المحافظة على درجة الـ pH عند 8 وكذلك تنظيمها.

3- الـ EDTA:

يستفاد منها فى تثبيط الإنزيمات التى تنطلق عند تكسير الجدر الخلوية حيث يتم ذلك بإحدى طريقتين:

أ- ارتباط المعادن بوحدات حامض الخليك فى الـ EDTA وبالتالى لا يتوفر العامل المساعد (الكاتيونات اللازمة لعمل الإنزيمات).

ب- ترتبط مجاميع الكربوكسيل لحمض الخليك مع بقايا الأحماض الأمينية مثل Serine, Theronine المتمثلة فى صورة مجموعة هيدروكسيل OH أو بقايا Arginine أو الـ Lysine فى مجموعة NH_2 وكذلك بقايا الحمض الأمينى Cysteine متمثلة فى مجموعة SH.

3- يضاف بعد استمرار الطحن فى المحلول المنظم SDS 5% فى كحول الإيثانول بحيث يكون التركيز النهائى فى مخلوط طحين العينة 1% ويستمر الطحن لمدة ربع ساعة، ويستفاد من SDS فى أنه يفيد فى تكسير الجدر الخلوية وخاصة مكوناتها من الليبوبروتين والجليكوجين.

4- يوضع المخلوط فى حمام مائى ويتم التسخين مع التقليب لمدة عشر دقائق مع المحافظة على درجة الحرارة عند 60 °م حيث يستفاد من ذلك فى زيادة فعل SDS فى تكسير الجدر الخلوية.

5- تبرد الآنية (الكأس) ثم يضاف محلول كلوريد الصوديوم 5M لضبط تركيز كلوريد الصوديوم فى المخلوط عند 1M ويستفاد من إضافة أو رفع كلوريد الصوديوم إلى 1M فى المساعدة على انفصال الأحماض النووية من مركب النيكليوبروتين.

6- يتم طرد مركزى للمخلوط عند عدد لفات من 4-6 آلاف لفة/دقيقة لمدة ربع ساعة حيث يتكون بعد عملية الطرد المركزى راسب وراشح. يؤخذ الراشح فى كأس نظيفة أو فى دورق مخروطى نظيف حيث يحتوى الراشح على كل من DNA, RNA.

7- يتم غسل الراسب والأجزاء المتبقية من النسيج الحيوى بواسطة محلول كلوريد الصوديوم 1 مولر مع ملاحظة أن تكون عملية الغسيل متكررة وبأقل حجم من كلوريد الصوديوم حتى لا تتم عملية التخفيف للأحماض النووية فى المحلول المتحصل عليه.

8- يتم ترسيب الأحماض النووية وما يصاحبها من بروتين بواسطة كحول إيثايل 95% بنسبة (1:2) كحول إيثايل : المحلول ويلاحظ عند إضافة كحول الإيثايل أن يكون مبرد ويضاف إلى المحلول بهدوء على جدار الكأس أو الدورق المخروطى من الداخل.

9- يترك المحلول بعد إضافة كحول الإيثايل فى الثلاجة مدة من نصف : 1 ساعة.

ويستفاد من طريقة إضافة كحول الإيثايل بهدوء على جدار الكأس فى:

1- تخليص الـ DNA الأنسجة النباتية من الصبغات التى توجد بها.

2- تخليص الـ DNA الأنسجة الحيوانية من ما قد يتبقى من الهيموجلوبين.

3- تخليص النيكليوبروتين من الكربوهيدرات.

كما يساعد وضع المخلوط فى الثلاجة على تقليل ذوبان الكربوهيدرات فى الوسط.

10- يفصل الـ DNA بساق زجاجية أو بواسطة ملعقة نظيفة من الأستلستيل أو الصلب غير القابل للصدأ.

11- يؤخذ راسب الأحماض النووية وتجرى عليه عملية غسيل وتجفيف بواسطة كحول إيثايل 95% ثم خلط كحول وإثير (1:1) ثم إثير وتجفيف الراسب هوائيا.

12- الراسب المتحصل عليه يحتوى على DNA, RNA والبروتين ولكى يتم التخلص من الـ RNA والبروتين نجرى الخطوات الأتية:

أ- يذاب الراسب فى محلول منظم عند pH 8 بمحلول منظم السترات مكون من NaCl وسترات الصوديوم فقط بنفس النسب سابقة الذكر 0.15، 0.015 على الترتيب.

ب- ثم يضاف مثل حجمه مخلوط من الكلوروفورم وكحول أيزو إمايل بنسبة 1:1 ويرج جيدا لمدة 10-15 دقيقة ثم يترك حتى يظهر سطح انفصال.

13- تسحب الطبقة المائية بواسطة سرنجة كبيرة وهكذا تكرر العملية حتى يتم سحب الطبقة المائية المحتوية على DNA, RNA ويتم تكرار هذه العملية أكثر من مرة.

14- يضاف إلى طبقة الريم أو الطبقة العضوية قليل من المحلول المنظم ويتم رجها لمدة خمس دقائق ثم تجمع الطبقة المائية إلى ما سبق لضمان جمع كل الـ DNA.

ملحوظة:

يفضل عند إجراء هذه العملية إضافة محلول إنزيم الـ Protease النشط وذلك للمساعدة على فصل البروتين من النيكليوبروتين.

15- يؤخذ المحلول ويحضن على درجة حرارة 37°م مع محلول أنزيم Ribonuclase الذى يقوم بتحليل الـ RNA إلى نيكليوتيدات حرة.

16- يضاف كحول إيثايل 95% بعد عملية التحضين مع الريبونيكليز بنسبة (1:2) لترسيب الـ DNA فقط.

17- يجرى على الـ DNA عملية غسيل وتجفيف بواسطة محلول إيثايل ثم مخلوط إيثايل وإثير ثم إثير فقط كما سبق.

18- يجفف الـ DNA هوائيا ويحفظ فى الثلاجة لقياس بعض الإختبارات علية مثل:

1- GC ratio.
2- Denaturation curve.
3- Hydrolization RNA and DNA.

أى قياس التوأم بين الـ DNA, RNA أو قياس التشابه بين DNA آخر.

الاختبارات الوصفية للأحماض النووية

أولا: الكشف عن الـ RNA وصفيا:

وذلك بالكشف عن سكر الـ Ribose:

1- يؤخذ 2 ملل من محلول الـ RNA + 2ملل من محلول الأورسينول (1جم أورسينول مذاب فى 100 ملل محلول كلوريد حديديك مذاب فى حمض الـ HCl المركز بنسبة 0.1%).
2- سخن فى حمام مائى لمدة 20 دقيقة فيتلون المحلول باللون الأزرق المخضر فى حالة وجود الـ Ribose دلالة على وجود الحمض النووى RNA.

وأساس هذا الاختبار:

هو تكوين الفورفيورال Furfural من السكر الـ Ribose وذلك بنزع ثلاث جزيئات ماء منه بواسطة حمض الـ HCl المركز، ثم يتكثف الفورفيورال مع الـ Orcinol ليعطى المركب المعقد ذو اللون الأزرق المخضر كما يتضح من المعادلات الآتية:

ثانيا الكشف عن الـ DNA وصفيا:

وذلك بالكشف عن سكر الـ Deoxyribose:

1- يؤخذ 1ملل من محلول الـ DNA + 4 ملل من محلول داى فينيل أمين Diphenylamine المحضر بإذابة 1 جم Diphenylamine فى 100 ملل حامض خليك ثلجى + 2.75 ملل حمض كبريتيك مركز.
2- يسخن المخلوط السابق لمدة عشرة دقائق فى حمام مائى يغلى ثم يبرد فيظهر لون أزرق أو بنفسجى محمر.

التقدير الكمى للأحماض النووية

تبنى طرق التحليل الكمى للأحماض النووية على أساس:

1- تقدير القواعد الأزوتية العطرية غير المتجانسة مثل الأدنين والجوانين واليوراسيل والثيامين والسيتوزين.

2- تقدير الأصل الكربوهيدراتى فى الأحماض النووية، الـ Ribose فى الـ RNA والـ Deoxyribose فى الـ DNA وذلك عن طريق التفاعلات اللونية.

3- تقدير فوسفور الأحماض النووية.

وفيما يلى تقدير الأحماض النووية عن طريق وحدة السكر:

يتم تقدير الـ Ribose and Deoxyribose لونيا على أساس أن لكل من السكرين الأحاديين طرق كيميائية مختلفة عن الأخر مما يتيح تقدير وتمييز كل من الـ RNA والـ DNA عن بعضهم البعض.

إلا أن أغلب الطرق مبنية على أساس تحرير مجموعة الدهيد السكر المرتبطة بها مع القواعد الأزوتية وذلك بإجراء التفاعلات الكيميائية فى وسط حمضى أو عن طريق معاملة الأحماض النووية بواسطة الأحماض حيث أن غليان الأحماض النووية مع Trichloroacetic acid 5% أو غليانها فى محلول HCl 0.05 N وذلك فى حمام مائى يتم كسر رابطة N-glycoside بين السكر والقواعد الأزوتية.

وتوجد عدة طرق مبنية على هذا الأساس:

تقدير الـ DNA (Deoxyribose):

أولا طريقة الـ Diphenylamine والمعروفة بطريقة Dische.

الجواهر الكشافة:

1- محلول Diphenylamine 1 جم مذاب فى 100 ملل حمض خليك ثلجى ثم يضاف 2.75 ملل حمض H_2SO_4 مركز.

2- محلول DNA يحتوى على 50 – 500 ملليجرام/ملليلتر.

طريقة العمل:

1- إلى حوالى 2 ملل من محلول الـ DNA يضاف 4ملل من محلول Diphenylamine ثم يسخن على حمام مائى لمدة عشرة دقائق ثم يبرد بعد ذلك يلاحظ أثناء التسخين بأن المحلول يتلون باللون الأزرق الثابت.

2- يقاس اللون الناتج على جهاز الـ Spectrophotometer عند طول موجى (595 nm).

ولقد أجرى تعديل لهذه الطريقة بواسطة العالم Burton وفيها:

- يذاب 1.5 جم من Diphenylamine فى 100 ملل حامض خليك ثلجى ساخن ويضاف إليه 1.5 ملل H_2SO_4 مركز.
- يحضر محلول أسيتالدهيد تركيزه 16 ملليجرام/1ملل ماء.
- يحلل الـ DNA بواسطة محلول حامض بيركلوريك قوته 0.5 ع لمدة 10 دقيقة وعلى درجة حرارة 70°م.

طريقة العمل:

1- يخلط 20 ملل من محلول Diphenylamine مع 0.1 ملل من محلول الأسيتالدهيد.
2- إلى حوالى 2 ملل من محلول الـ DNA المحلل بواسطة بيركلوريك يضاف 4 ملل من المخلوط السابق رقم 1.
3- يحضن المخلوط على درجة حرارة 30°م لمدة 16 – 20 ساعة.
4- يقاس اللون الأزرق المتكون بواسطة جهاز الـ Spectrophotometer على طول موجى (600 nm).

وقد أدى هذا التطور إلى زيادة حساسية هذه الطريقة حيث تصل حساسيتها إلى تقدير مقدار من

الـ DNA يقع ما بين 5 – 100 ميكروجرام.

ثانيا طريقة CERIOTTI:

الجواهر الكشافة:

1- محلول 0.04% Indol فى ماء مقطر.
2- حمض HCl مركز.
3- كلوروفورم.
4- محلول DNA محلل بواسطة 5% Trichloroacetic acid.

تمتاز هذه الطريقة بأنها حساسة حيث يمكن باستخدامها تقدير مقدار من الـ DNA ما بين 5 – 50 ميكروجرام.

طريقة العمل:

1- إلى 2 ملل من محلول الـ DNA أضف 1 ملل من محلول الـ Indol ثم أضف 1 ملل حامض HCl وسخن المحلول فى حمام مائى يغلى لمدة عشر دقائق ثم برد.

2- يستخلص ثلاث مرات باستخدام الكلوروفورم (4 ملل فى كل مرة فى قمع فصل حيث يتم فصل الطبقة المائية المتميزة باللون الأصفر.
3- يتم عمل طرد مركزى لهذه الطبقة ونفصل الشوائب ويقاس الأمتصاص الضوئى عند طول موجى
(490 nm).

ثالثا طريقة Webb:

الجواهر الكشافة:

1- محلول 0.5% بارا نيتروفينايل هيدرازين فى كحول إيثايل.
2- Butylacetate.
3- محلول NaOH أو KOH 1ع.
4- محلول الـ DNA محلل بواسطة 5% Trichloroacetic acid.

طريقة العمل:

1- أضف إلى 4 ملل من محلول الـ DNA 0.2 ملل من محلول بارا نيتروفينايل هيدرازين.
2- يسخن على حمام مائى لمدة 20 دقيقة مع وضع غطاء زجاجى على شكل كمثرى وذلك لمنع حدوث التبخير من المحلول.
3- يبرد المخلوط ثم يضاف 10 ملل من محلول Butylacetate.
4- تغلق الأنابيب جيدا بواسطة غطاء زجاجى مصنفر أو بسدادة كاويتشوك ثم ترج جيدا لمدة 5 دقائق.
5- تطرد الأنابيب فى جهاز طرد مركزى لمدة 5 دقائق على سرعة 2000 – 3000 لفه فى الدقيقة.
6- يتم فصل الطبقة المائية التى تكون عديمة اللون ويؤخذ منها 3 ملل ويضاف إليها 1 ملل من NaOH أو KOH 1 ع + 1ملل ماء مقطر فيظهر لون بنفسجى.
7- يقاس اللون المتكون على جهاز الـ Spectrophotometer على طول موجى (560 nm).

تقدير الـ RNA (تقدير سكر الـ Ribose):

أولا طريقة Mayboium:

الجواهر الكشافة:

1- محلول 0.1% كلوريد حديديك فى HCl مركز.
2- محلول أرسين يحضر بإذابة 10 ملليجرام أرسين لكل 1 ملل من المحلول الأول.
3- محلول RNA.

طريقة العمل:

1- 2:1 ملل من محلول RNA يضاف 2 ملل من محلول أرسين ويسخن المخلوط على حمام مائى لمدة 20 دقيقة.
2- يبرد المحلول ويقاس الأمتصاص الضوئى عند طول موجى (670 nm).

ثانيا طريقة Euler and Hahn:

1- فى هذه الطريقة يؤخذ 1ملل من محلول الـ RNA ويغلى لمدة عشر دقائق مع محلول كلوريد حديديك : حمض هيدروكلوريك مركز : حمض خليك ثلجى بالنسب التالية (0.07 : 1 : 6) على الترتيب.
2- يبرد المخلوط ثم يضاف 1 ملل من محلول 0.25% فلورجلوسينول فى مخلوط من HCl مركز : ماء : حمض خليك ثلجى بالنسب التالية (1 : 1 : 2) على الترتيب ويترك لمدة عشر دقائق.
3- يغلى المخلوط السابق فى حمام مائى لمدة 4 دقائق ثم يبرد ويترك لمدة 24 ساعة.
4- يقاس الامتصاص الضوئى على جهاز الـ Spectrophotometer عند طول موجى (680 nm).

ثالثا طريقة Webb:

تعتمد هذه الطريقة على تحويل سكر الـ Ribose إلى فورفيورال ثم تفاعل الأخير مع بروموفينيل هيدرازين.

طريقة العمل:

1- إلى 1 ملل من محلول RNA أضف 1 ملل من حمض (8 N) HCl ثم أضف 1 ملل زيلول و NaCl.

2- يسخن المخلوط لمدة ثلاث ساعات فى حمام مائى يغلى.
3- يبرد المخلوط ثم يضاف 2 ملل زيلول ويقلب جيدا ثم يطرد فى جهاز الطرد المركزى.
4- يضاف بعد ذلك محلول بروموفينايل هيدرازين.
5- يترك المخلوط لمدة ساعة على درجة حرارة 37 ^{o}م.
6- يقاس كثافة اللون الأصفر المتكون عند طول موجى (450 nm) بواسطة جهاز الـ Spectrophotometer.

ملحوظة:

تجدر الإشارة إلى أنه فى جميع الطرق السابقة يتم عمل منحنيات قياسية لعينات سكر الـ Ribose والـ Deoxyribose نقية حيث يتم بناء عليها تقدير ما ينتج من الـ RNA والـ DNA.

تقدير الأحماض النووية عن طريق وحدة الفوسفور:

تعتمد طريقة تقدير الفوسفور على تحويل الفوسفور من الصورة العضوية إلى الصورة غير العضوية وذلك باستخدام حمض البيركلوريك وحمض الكبريتيك المركز لإجراء عملية الهضم والتحليل للأحماض النووية.

ومن هذه الطرق:

طريقة مولبيدات الأمونيوم وفانيدات الأمونيوم:

أولا تحضير الجواهر الكشافة:

1- يذاب 22.5 جم مولبيدات الأمونيوم فى 400 ملل ماء مقطر.
2- يذاب 1.25 جم فانيدات أمونيوم فى 300 ملل ماء مقطر.
3- يضاف محلول رقم 1 على رقم 2 ويبرد إلى درجة حرارة الغرفة ثم يضاف 250 ملل حامض نيتريك مركز ويكمل المحلول إلى لتر.

ثانيا تحضير المحلول القياسى وعمل المنحنى القياسى:

- يذاب 0.2195 جم من KH_2PO_4 ويخفف إلى لتر فينتج محلول تركيزه 50 جزء فى المليون من الفوسفور.
- يؤخذ من المحلول الأخير (50 ppm) الحجوم التالية: 0.5, 5, 10, 15, 20 ml وتكمل إلى 50 ملل فنحصل على تركيزات 0.75 ,0.5 ,0.25 ,0.125 على الترتيب.

التقدير:

1- يؤخذ من محلول الـ DNA أو الـ RNA حجما يحتوى على (0.1 – 1 ملليجرام) أى يؤخذ الحجم المناسب الذى يعطى لونا مع الجوهر الكشاف.

2- ينقل هذا الدورق إلى دورق معيارى سعة 50 ملل.

3- يضاف 10 ملل من الجوهر الكشاف المحضر ثم يرج جيدا ويخفف بالماء المقطر حتى الحجم النهائى 50 ملل.

4- تقرأ الأمتصاص الضوئى بعد 30 دقيقة على طول موجى (470 nm).

اللون المتكون ناتج من تفاعل الفوسفات مع المولبيدات والفانيدات لونه أصفر.

5- تحسب كمية الفوسفور بالعينة من المنحنى القياسى السابق.

ملحوظة:

يمكن بعد فصل الـ DNA أو الـ RNA إجراء عملية الهضم بواسطة حمض البيركلوريك وحمض الكبريتيك المركز.

الخصائص الطبيعية للـ DNA:

1- فى سلسلة الحلزون المزدوج يلاحظ أن قواعد كل نيكلوتيدة تمتص كمية ضوء من Ultra Violet light أقل من النيكلوتيدات الحرة الفردية وهذا يرجع إلى تكدس أو وجود القواعد واحدة أمام الأخرى (مرصوصة).

2- عند تسخين محلول الـ DNA تدريجيا حتى تصبح الطاقة الحرارية كافية لتفتيت كل زوج من القواعد وبالتالى قوة تكدس القواعد فإن تركيب الـ DNA ينهار وتنتج سلسلة فردية عشوائية وهذا يسمى:

Melting of DNA double helical structure.

3- عندما يصبح الـ DNA يحتوى على سلاسل فردية فإن كثافة المحلول الضوئية O.D تزيد.

Deassociation & Reassociation:

الفك ثم إعادة الالتحام لتوضح نظام ترتيب القواعد فى الـ DNA ويلاحظ أن منحنيات هذا الاختبار عكس منحنيات الـ Denaturation وتتميز بها الأنواع المختلفة من الـ DNA من حيث التجانس Homogenlty أو عدم التجانس Hetrogenlty فى القواعد الأزوتية فيما يسمى بدرجة التجميع.

Denaturation & Renaturation:

يمكن عمل الـ Denaturation للـ DNA بواسطة:

1- القلويات.

2- الأحماض.

3- الحرارة.

والمقصود بالـ Denaturation فك السلسلتين الملتفتين حول بعضهما فى الـ DNA (التغير فى التركيب الطبيعى للـ DNA).

ويرجع حدوث الـ Denaturation إلى:

1- بواسطة القلويات:

عادة ما يكون أكسجين القواعد الأزوتية فى صورة Ketoform وعند استخدام القلويات تتحول إلى الصورة الـ Enolform وبالتالى لا تتكون الروابط الهيدروجينية بين القواعد وبعضها البعض.

2- فى حالة استخدام الأحماض يحدث Protonization حيث يكتسب نيتروجين القاعدة الآزوتية البروتون من الحامض ويتحول إلى Amonium form وبالتالى لا تتكون الرابطة الهيدروجينية.

3- فى حالة استخدام الحرارة نجد أن عند رفع درجة الحرارة عن 100 °م ينفرد شريطى الـ DNA ويمكن أن يعاد إلتحامه مره أخرى ولكن عند خفض درجة الحرارة تدريجيا وليس بشكل مفاجئ.

منحنيات الـ Renaturation or Reassociation:

يلاحظ فى منحنيات الـ Renaturation أنها عكس عملية الـ Denaturation وتمر بالمراحل الآتية:

ويستفاد من هذه المنحنيات فى:

1- تحديد مناطق تجانس تكرار القواعد الأزوتية فى الـ Hologenoma وتختلف Genoma الكائنات الحية عن بعضها البعض بدرجة تغيير فى الدور الحيوى للـ Genoma ففى Genoma الــ Prokaryotic نجـد أنـه Monophase علـى Genoma الــ Eukaryotic والتـى تعتبـر Diploid or Triploidphase.

فمثلا Genoma للإنسان تعتبر من نوع Threephase فتوجد مناطق مميزة لتكرار الـ DNA Human ويتميز Genoma الإنسان بوجود المراحل الآتية:

1- Rpetitive sequence.

2- Midle rpetitive sequence.

3- Highly repetitive sequence.

ثم حساب نسبة كل من هذه المناطق فى DNA genoma الكائنات الحية.

2- مقارنة Con. Curves (التركيز المولى فى الثانية) لأنواع DNA مختلفة وإيجاد التماثل والاختلاف بين هذه الأنواع من الـ DNA.

3- يمكن حصر (إيجاد) نشاط محدد لجزء من الـ Genoma عند تخليقة بعض الإنزيمات.

4- يمكن من منحنيات Renaturation قياس العمومية بين الكائنات الحية.