علم الأحياء الجزيئي

العملي

Practical of Molecular Biology

إعداد :

ا.م. عدنان فاضل العزاوي

٢٠١٧

التعليمات والإرشادات الواجب إتباعها في مختبر البيولوجي الجزيئي :

المقدمة : Introduction

بما أن أي نتيجة أو حقيقة علمية يجب أن تستند على عمل تجريبي، كان من الضروري القيام بعدد من التجارب، لان فهم الظواهر العلمية يكون أعمق عندما يتم مشاهدتها بصورة واقعية. ان العمل ألمختبري كغيره من الأعمال التي تحتاج إلى إدارة وتنظيم جيد ليصبح المختبر مختبراً مثالياً يخدم المسيرة العملية بشكل فعال ويحقق الأهداف التي وجد من أجلها ولكي يتم ذلك هناك العديد من الإرشادات ألمختبريه يجب الإلمام التام بها ومعرفة جميع الأعمال الإدارية والفنية التي تساعد على النهوض بمستوي الأداء ألمختبري.

وقبل القيام بأي تجربة أو عمل داخل المختبر يجب إتباع التعليمات التالية:

أولا": سجلات التجارب والتقارير :

تتضمن السجلات (الدفاتر) تدوين التجارب التي يتم انجازها في المختبر خلال السنة الدراسية، ويجب ان يتبع الطالب الإرشادات في كتابة التجارب وتسجيل البيانات والنتائج وكما يأتي:

١- اسم التجربة (العنوان) Title of the experiment.

٢- الغرض من التجربة Purpose ويثبت بجملة او بجملتين .

٣- الهدف من التجربة Objective : لماذا ولأي غاية وكيف ؟

٤- المواد وطرائق العمل Material & Methods .

٥- البيانات والنتائج Data & Result .

يجب تثبيت جميع البيانات خلال التجربة وكتابة (استنساخ) الأشكال والمخططات من المرجع العلمي او في جداول وأشكال جديدة ضرورية، الحسابات ، المعادلات ، الأخطاء التحليلية ، وتصحيح البيانات المدونة.

٦- المناقشة والاستنتاجات : Discussion & Conclusion.

والتي تتضمن مناقشة وربط النتائج والاستنتاجات والمقترحات.

٧- المصادر References.

ثانيا: قواعد السلامة في المختبر:

إن السلامة بمفهومها الحديث والشامل تعني المحافظة على عناصر الإنتاج الرئيسية التالية :

١- الإنسان داخل المؤسسة وخارجها.

٢- المواد الخام والمواد المنتجة.

٣- الأجهزة وأدوات الإنتاج.

٤- البيئة المحيطة من ماء وكهرباء وتربة.

وللمحافظة على السلامة يجب مراعاة قواعد السلامة التالية:

أولا :الآثار المترتبة على خطورة العمل ألمختبري:

أن العمل بالمختبر يقتضي التعامل مع معدات وأجهزة وأدوات متنوعة تحتاج لأداء أنشطة مختبريه مختلفة ، الأمر الذي قد يشكل خطورة كبيرة خصوصاً عند عدم التأني والحذر وعدم امتلاك المهارات اللازمة للتعامل ونظراً لأن العمل ألمختبري يمثل دعامة أساسية لدراسة العلوم وغيرها من المواد التطبيقية ، فإن الأحجام عنه يفقد دراسة هذه المواد جانباً مهماً وفعالاً من جوانب تعلمها الأمر الذي يدعو إلى ضرورة العمل على تحقيق الأمن ألمختبري وهنا تبرز مدى حاجة المختبرات إلى الأمان ، فمن البديهي أن لا يقبل الفرد على القيام بالأعمال التي تعرضه للضرر والأذى.

ثانيا : موقع ألمختبر حيث هناك قواعد واحتياطات خاصة بمكان ألمختبر ومنها:

١- اختيار الموقع المناسب من مبنى المؤسسة التعليمية (في مؤخرة المبنى) بعيداً قدر الإمكان عن قاعات الدراسة ويفضل ان يكون على هيئة مركز متكامل.

٢- أن يكون مناسباً لعدد الطلاب الذين يمارسون فيه أنشطة العمل ألمختبري.

ثالثا : الوقاية الشخصية داخل المختبر وتتضمن الأتي:

أ- وقاية العيون :

١ - يمنع ارتداء العدسات اللاصقة أثناء العمل في المختبرات .

٢ - النظارات الشمسية التجارية ليست وقائية داخل المختبر .

ب- القفازات : يجب استخدام القفازات الملائمة لنوع المادة الكيماوية .

ت- عدم الآكل والشرب والتدخين داخل المختبر.

ث- ارتداء الصدرية داخل المختبر لتجنب تلوث الملابس بالمواد الكيميائية والصبغات.

ج- تعقيم مكان العمل قبل البدء وبعد الانتهاء من العمل.

ح- يتم العمل داخل كابينة معقمة مع التأكد من عدم وجود أي تيارات هوائية ملوثة.

رابعا": **توفير أجهزة ومعدات السلامة في المختبر ومنها**:

١- إنذار جماعي ذو أزرار خارج غرف المختبرات لكافلة العاملين في المبنى.

٢- نظام إنذار خصوصي لكل مختبر.

٣- إشارات تحذيرية في أماكن الكيماويات الخطرة (السامة والقابلة للاشتعال).

٤- حاملات القوارير الزجاجية المحتوية على مواد خطرة .

٥- يجب وجود حاوية مخلفات معدنية أو من البلاستيك المقاوم لتجميع فضلا المواد الكيماوية المختلفة وأخرى للزجاج المكسور.

٦- يجب توفر معدات مكافحة الحرائق لكل مختبر ويجب تدريب العاملين في كل مختبر على استخدام الطفايات وأنواع الحريق كما يفضل توفير بطانية حريق (مصنوعة من الصوف ١٠٠%) في كل مختبر وفي مكان بارز ومعروف مع وجود إشارة توضيحية .

٧- الاستخدام الأمثل للمعدات:

أ - المغاسل: هذه المرافق ليس مكاناً للتخلص من فضلات المواد الكيماوية الخطرة.

ب- الثلاجات والخزائن المعدة لتخزين الكيماويات يجب أن تكون جيدة التهوية .

ج- الثلاجات العادية مشروع انفجار سهل إذا استخدمت لتخزين الكيماويات المتطايرة أو غير الثابتة .

د- يجب توفر ثلاجات أو برادات مقاومة للانفجار لمثل هذه المواد .

و- يجب تأشير كافة المواد الموجودة داخل الثلاجة وتفقدها من وقت لآخر .

٨- طرق المحافظة على المواد الكيماوية :

١- تحفظ المواد الشديدة الاشتعال والقابلة للالتهاب في مكان مظلم بعيداً عن الشمس مثل الأستيون /ثاني كبريتيد الكربون /الكحول / البنزين / وتوضع هذه المواد في رمل مندي بالماء وطبقة سميكة من كربونات الصوديوم .أما المواد التي لا تشتعل كالأملاح فتوضع على الرفوف العليا .

٢- الأحماض يجب أن تحتاج عناية فائقة في حفظها أو تناولها لخطورتها يجب أن تحفظ في غرفة صغير مفروشة بالرمل أو توضع في صندوق خشب والكمية التي تستعمل توضع في رجاجات لها سدادات مصغرة كما يوضع بالأرضيات مادة كربونات الصوديوم .

٣- الصوديوم والبوتاسيوم من المعادن لذلك تحفظ في زجاجات مملوءة بزيت البترول ويحكم غلقها وتوضع بعيداً عن الشمس .

٤- لا توضع الأحماض وبجانبها الجلسرين مثل الأستيون /ثاني كبريتيد الكربون /الكحول / البنزين / وتوضع هذه المواد في زجاجات قاتمة اللون. أما المواد التي لا تشتعل كالأملاح فتوضع على الرفوف العليا .

٥- يمنع استخدام الثلاجة الكيماوية لخزن الطعام والشراب ويجب أن يوضع عليها إشارة الكيماويات فقط

٦- كل وعاء يحتوي على ماد كيماوية لأغراض الخزن يجب أن يكون موسوم بشكل واضح .

٧- اقرأ التأشير بحرص قبل تناول المادة واستخدامها .

٨- يجب أن تحوي التأشيرة معلومات كاملة عن مخاطر المادة وكيفية تخزينها وتناولها ومعدات السلامة الشخصية الواجب ارتدائها والإسعاف الأولي الضروري عند ملامستها للشخص .

٩- لا تستخدم أي مادة غير موسومة بشكل رديء بحيث يصعب معه التعرف عليها بشكل سليم .

٩- قبل مغادرة المختبر:

١- أغلق كافة الأجهزة والمعدات غير الضرورية (كهرباء ، ماء ،غاز ، تفريغ) .

٢- اترك نوافذ. شافطة الأبخرة مفتوحة .

٣- أطفئ كافة نقاط الإضاءة .

٤- أغلق أبواب المختبر.

١٠- إدارة النفايات الخطرة:

العمل بالمختبر يؤدي إلى تكون فضلات ومخلفات وبالتالي تبرز ضرورة إدارة هذه المخلفات وتشمل إدارة المخلفات على: التخلص منها، معالجتها، إعادة تدويرها، إعادة استخدامها. وعند التخلص من المخلفات الضارة يجب التأكد من أنها لن تحلق الضرر بالإنسان أو الممتلكات أو البيئة وهناك قواعد للتعامل مع نفايات المواد الكيماوية ومنها :

١- المواد الكيماوية القابلة للذوبان في الماء فقط هي التي يمكن التخلص منها من خلال المغاسل وبالتالي إلى محطات المعالجة .

٢- محاليل المذيبات القابلة للاشتعال يجب تخفيفها إلى درجة كبيرة بالماء قبل أن تسكب في المغسل تجنباً لمخاطر الحريق الذي قد ينشأ عنها .

٣- الأحماض والقواعد القوية يجب تخفيفها إلى درجة حموضة بين (٣-١١) قبل سبكها في المغاسل على أن لا يقل معدل التفريغ داخل المغاسل عما يكافئ ٥٠ سم٣ / دقيقة من المادة المركزة .

٤- المواد ذات السمية العالمية يمنع التخلص منها داخل المغاسل مثل : الزئبق ، نيكل ، زرنيخ ،كروم ، كاديوم زنك ،مركبات الفنيول والسيانيد والكبريت .

٥- بما أن شبكة المغاسل داخل المختبر متصلة مع بعضها فإن سكب مادة من خلال مغسل أحد المختبرات قد يسبب تفاعل خطير عند التقائها مع مادة مسكوبة من مغسل أخرى لذا يجب الحذر والانتباه الشديد لذلك .
مثل : أمونيا + يود = انفجار شديد . سولفيد + حامض = غاز كبريتيد الهيدروجين السام.

٦- الكميات الكبيرة من مركبات الفلزات الثقيلة تسبب تلوثاً خطيراً لمصادر المياه الجوفية ولشبكة المجاري نفسها لذا يجب الابتعاد عن سكبها في المغاسل.

٧- لا تسكب المواد الغروية والصلبة في المغاسل منعاً لانسدادها .

٨- أن المحارق والمدافن الرسمية هي أفضل وسيلة للتخلص من النفايات الكيماوية إلا أنه يجب التنبه للمخاطر المحتملة التي قد تلحق بالبيئة من بعض هذه النفايات لذا يجب تحويل هذه المواد إلى مواد أقل ضرراً وصديقة للبيئة مثل : المواد المسرطنة يجب أكسدتها داخل محلول أولاً ثم التخلص منها .

٩- النفايات الكيماوية الصلبة يجب وضعها بحاويات خاصة مع ضرورة الانتباه بعدم وضع المواد ذات النشاط التفاعل الشديد في نفس الحاوية وأن تكون هذه الحاوية موسومة ومعروفة وأن يتم التخلص منها بصورة دورية متقاربة في الأماكن المخصصة لذلك.

١٠- النفايات الكيماوية السائلة تتطلب نفس الإجراءات المذكورة بالنسبة للمواد الصلبة .

١١- نفايات المذيبات التي لا تحتوي على مواد ذات نشاط تفاعلي شديد أو ذات قدرة اصدائية يمكن جمعها في وعاء واحد .

١٢- نفايات المذيبات المكلورة تجمع في إناء خاص بها مع ضرورة الانتباه عند حرقها لأنها تطلق عند ذلك كلوريد الهيدروجين مما يسبب تلوث الهواء القريب من المحرقة .

١٣- بعض المذيبات كالأثيرات والكحول الثانوية تنتج فوق أكاسيد عند بقائها لفترة طويلة .

١٤- بعض التفاعلات تؤدي إلى انفجار فوري .

١٥- إن إضافة مواد ساخنة إلى مذيبات في وعاء مغلق تؤدي إلى رفع الضغط بشكل كبير و بالتالي تسمح بالاشتعال الضغطي .

١٦- يجب استخدام أوعية مزدوجة عن نقل المواد المشعة لمنع التلوث أو الانسكاب في حالة كسر أحد الأوعية.

١٧- يجب تغطية المناضد من مواد ماصة للمواد المشعة ليسهل التخلص منها في حالة التلوث .

سابعا": إجراءات الطوارئ (انسكاب أو تسرب ، حريق ،انفجار،إصابة عمل) :

١- سلامتك أولاً ضرورية لكي تتمكن من التصرف في حالة الطوارئ .

٢- قدر الموقف بسرعة والمخاطر قبل اتخاذ أي إجراء استباقي.

٣- إذا كان هناك وجود لغازات سامة سواء بذاتها أو ناتجة عن احتراق مواد ما أو تفاعلات معينة فعليك أن تخلي المنطقة وتخرج منها بسرعة ولا يجوز بحق نفسك أن تعود إليها ولو لإنقاذ زميلك إلا بعد أن ترتدي معدات الوقاية الشخصية ، حتى لا تكون أنت ضحية أخرى .

٤- بعد حمايتك لنفسك وإذا كان هناك مصابين بسبب تأثير الغازات أو الأبخرة فيجب نقلهم فوراً إلى الهواء الطلق وإجراء التنفس الاصطناعي (في حالة فقدان التنفس)واستدعاء العناية الطبية فوراً أو نقل المصاب إليها .

٥- اصرخ من أجل طلب المساعدة .

٦- تفقد وجود مصابين .

٧- لا تحرك المصاب إلا إذا تأكدت من احتمالية تعرضه لمخاطر جديدة فعندها انقله من مكان الإصابة فورا" .

٨- بلغ خدمات الطوارئ فوراً ناقلاً لهم معلومات عامة عن مكان وطبيعة الحالة .

٩- عندما يطلب منك مغادرة المختبر فقد بوقف كافة التعليمات وإطفاء مصادر الشعلة وفصل أي جهاز أن يكون مصدر للحريق مع إغلاقه .

١٠-قم بإغلاق النوافذ والأبواب .

١١- قم بإخلاء المختبر بأسرع ما يمكن .

١٢-إذا كان الحريق بسيطاً فقم بإطلاق جرس الإنذار وقم بإطفائه باستخدام الطفاية المناسبة مع إغلاق الدوائر الكهربائية وخطوط الغاز .

١٣-تجنب الذعر والرعب فإنه يعيق الإجراء السليم ويزيد الحالة تعقيداً .

١٤-العناية بالشخص المصاب :قبل نقل المصاب للعناية الطبية أو نقلها له يجب تهيئة إجراءات الإسعافات الأولية اللازمة ومنها :

١- لا تحرك المصاب إلا إذا كان معرضاً لخطر جديد.

٢- حاول تهدئة المصاب وتطمينه.

٣- حافظ على دفء المصاب وتغطيته خاصة إذا كان مصاباً بصدمة.

٤- إجراء الإسعافات الأولية وتتضمن:

١- قبل البدء بالإسعاف تأكد من عدم وجود مخاطر مهددة لك أو للمصاب مع إزالتها إن وجدت .

٢- إذا كان هناك تلوث غازي فارتدي جهاز التنفس ثم قم بنقل المصاب إلى غرفة الطوارئ .

٣- قم بمعاينة فورية المصاب لتحديد نوع الإصابة .

٤- تدرج في إجراءات الإسعاف حسب أولويات المحافظة على الحياة وهي :

- التنفس الصناعي لفاقد التنفس .
- مساج القلب للمصاب بتوقف القلب .
- تضميد الجروح العميقة وذلك(بالضغط بواسطة قطعة قماش نظيفة) للمحافظة على كمية الدم والدورة الدموية ومنع الصدمة.
- تضميد الجروح السطحية بعد تنظيفها وتطهيرها بلفائف من الشاش المعقم .
- في حالة فقدان الوعي : قم بتحرير العنق والصدر من الملابس الضاغطة من مجاري التنفس والتهوية الجيدة .
- ابتلاع المواد الكيماوية :

١- تأكد من نوع وطبيعة المادة المبتلعة .

٢- أطلب الإسعاف الفوري أو نقل المصاب للطوارئ.

٣- لا تحث المصاب على التقيؤ مطلقاً .

- الحروق الحرارية :

١- ضع منديل مبلول ومحتوي على جليد مهروس على مكان الحرق لتخفيف ألم الحرارة في مكان الحرق .

٢- لا تستخدم المراهم وأوصل المصاب للعناية الطبية .

- انسكاب الكيماويات على مساحة كبيرة من الجسم :

١- استخدام الغاسلة الرذاذية فوراً لغسل الجسم وانزع الملابس الملوثة .

٢- اغسل الجزء المصاب لمدة ١٥ دقيقة بالماء ويمكن استخدام الصابون فقط إذا كان الجلد غير محروق وغير متهتك .

٣- لا تستخدم أي نوع من المراهم أو الكريمات أو غيرها من المواد وانقل المصاب للعناية الطبية فوراً .

٤- التعرض للماء البارد لفترة طويلة قد يسبب الهبوط العام في درجة حرارة الجسم .

- انسكاب الكيماويات على مساحة صغيرة من الجسم :

١- استخدم ماء الحنفية أو المغسلة الخاصة بالعين أو تيار ماء خفيف واغسل العين بالماء لمدة (١٥) دقيقة أو لحين وصول الطبيب .

٢- انزع العدسات اللاصقة فوراً.

٣- أبق العين مفتوحة أثناء الغسل وحرك البؤبؤ لتضمن غسل الأغشية الداخلية .

٤- إذا كان من الصعب تحريك المصاب فألقه على ظهره وقم بغسل العين المصابة .

- الصدمة الكهربائية :

١- لا تلمس المصاب .

٢- افصل التيار الكهربائي فوراً .

٣- قم بالإسعاف الأولي لنتائج الصدمة .

٤- أوصل المصاب للعناية الطبية .

١٥- في حالة انسكاب المواد الكيماوية :

١- الاستجابة الأولية :

أ- اصرخ من أجل المساعدة في حالة انسكاب كيماوي كبير مع التحذير من خطورة الانسكاب .

ب- قم بنقل المصابين أو أي شخص تعرض للتلوث الخارجي مع إجراء الإسعاف الأولي المناسب وال طلب المساعدة الطبية .

ت- ضع إشارة تحذيرية من خطر المادة المنسكبة في حالة عدم. القدرة الفورية على تطهير مكان الانسكاب.

ث- قم بإزالة ثم غسل الملابس الملوثة.

٢- احتواء وإزالة الانسكاب :

ا- حدد نوع المادة المنسكبة وامتدادها والمخاطر المحتملة .

ب- جهز معدات وملابس الوقاية المناسبة قبل البد بالتنظيف .

ج- لا تحاول معالجة الأمر وحيداً وليكن معك فريق واحذر من الإصابات والحوادث المتوقعة .

٣- في حالة وقوع حريق أو انفجار من مادة منسكبة :

١- حاول امتصاص الأبخرة والسوائل المنسكبة بواسطة مواد ماصة مخصصة لهذه الغاية ثم قم بتحويل هذه المواد إلى شافطة الأبخرة أو حاوية المخلفات الكيماوية المقاومة للحرق .

٢- قم بتهوية المختبر للتقليل من تركيز الغازات .

٣- عند تنظيف وإزالة المادة المنسكبة ليكن هناك شخص آخر وبحوزته طفاية الحريق المناسب للوضع الحاصل .

16- قواعد إجرائية للوقاية من الحريق:

لوقاية المختبر من التعرض للحرائق يجب الالتزام بما يلي :

ا- تجنب التدخين داخل المعمل .

٢- تأكد من سلامة توصيلات الغاز قبل إشعال المواقد الغازية .

٣- تجنب وجود أي مواد قابلة للاشتعال بالقرب من الموقد وهو مشتعل .

٤- أطفئ مواقد الغاز بعد استعمالها مباشرة مع أحكام قفل محابس الغاز .

٥- تأكد من سلامة توصيلات الكهرباء بالمعمل بصفة دورية .

٦- تجنب ترك زجاجات السوائل سريعة الالتهاب بجوار أي مصدر حرارة .

٧- تجنب ترك الفلزات سريعة الاشتعال والتي تشتعل ذاتياً في الهواء معرضة للهواء الجوي.

٨- أغلق عبوات المواد الكيماوية سريعة الاشتعال بإحكام فور استعمالها وخزنها في الأماكن الآمنة المناسبة .

٩- احفظ اسطوانات الغازات سريعة الاشتعال بعيداً عن مصادر الحرارة واللهب .

١٠- احفظ الاسطوانات الأكسجين إن وجدت بعيداً عن الشحوم والمواد البترولية الأخرى .

١١- التزم بقواعد التخزين الصحيحة لجميع المواد الكيماوية سريعة الاشتعال .

١٢- تجنب وجود قطع القماش الملوثة بالزيوت والسوائل البترولية بالقرب من مصادر الحرارة واللهب.

١٣- تعامل مع المواد ذات الأبخرة سريعة الاشتعال داخل خزانة الغازات.

١٤- علق لوحات إرشادية لكيفية التعامل الصحيح مع مصادر الحرارة والمواد الكيماوية الملتهبة في أماكن بارزة على جدران المعمل .

ثامنا": ملاحظات عامة :

١- تذكر عزيزي الطالب أن المختبر هو مكان العمل الجاد الهدف.

٢- تفقد المواد والأدوات للتأكد من صلاحيتها قبل البدء بالعمل.

٣- يتطلب العمل ألمختبري نمك الهدوء والدقة والتعاون مع زملائك ومسئول المختبر

٤- اقرأ التجربة جيدا" عدة مرات لغرض خفض فرص الأخطاء، كما أن التحضير المسبق لمتطلبات التجربة سوف يزيد من كفاءة وسرعة انجازها.

٥- إدخال المواد ذات العلاقة بالمختبر (سجل ، مواد مختبر، ...والخ) وترك كل المواد الأخرى خارج المختبر أو الأماكن المخصصة لها .

٦- إعادة جميع المواد المستخدمة إلى مكانها وغسل الزجاجيات وتجفيفها .

تصنيف المحاليل وطرق التعبير عن تركيزها:

الأهداف الرئيسية لهذا المختبر تتضمن الآتي :-

- المحاليل المنظمة Buffer solutions وأهميتها.
- تعريف المحلول.
- تصنيف المحاليل على أساس :

  أ- طبيعة المذيب والمادة المذابة

  ب- حجم دقائق المادة المذابة

  جـ- نسبة المادة المذابة للمذيب

  د- درجة توصيلها للتيار الكهربي
- الطرق التي يمكن أن نعبر بها عن تركيز المحلول (طرق تحضير المحلول) منها : المولارية – المولالية – النسبة المئوية – الكسر المولي – النورمالية (العيارية)– متابعة وفهم بعض الأمثلة المحلولة .

*المقدمة : Introduction

تعتمد معظم دراسات البيولوجي الجزيئي والهندسة الوراثية وجميع الدراسات والبحوث الأنزيمية والجزيئات الحيوية على المحاليل المنظمة (الدارئة) Buffer solutions للمحافظة على الفعالية الحيوية للجزيئات المعزولة من التأثيرات المباشرة للتغير في الرقم الهيدروجيني بسبب الفعالية ، او عند إضافة الحوامض او القواعد لتعديل الرقم الهيدروجيني pH .

يمكن أن يعرف المحلول المنظم (Buffer Solution): بأنه المحلول المكون من مزيج لحامض ضعيف وأحد أملاحه أو مزيج من قاعدة ضعيفة وأحد أملاحها ويمتاز بان له القدرة على مقاومة التغيرات في الرقم الهيدروجيني pH عند إضافة كميات قليلة من الحامض أو القاعدة عليه.

ولكي نتعرف على المحلول المنظم وكيف يؤدي دوره نعرض بعض الأمثلة الآتية :

مثال (١) :

عند الافتراض أن لدينا لترا من الماء مقطر (pH = 7) ثم أضيف إليه ١ مللتر من حامض الهيدروكلوريك درجة تركيزه 1.0 عياري أو واحد مللتر هيدروكسيد الصوديوم عيارته ٠,١ ع ماذا يحدث ؟

في **الحالة الأولى** وهي إضافة ١ ملل من حامض الهيدروكلوريك ١,٠ ع يتغير ال pH من ٧ إلى ٥ بينما في **الحالة الثانية** وهي إضافة ١ ملل من هيدروكسيد الصوديوم ٠,١ عياري يتحول ال pH من ٧ إلى ٩ أي أن التغير في ال pH واضح وملموس .

مثال (٢) :

نفرض أن لدينا لترا من مزيج لمحلولي حامض ضعيف وملحه مثل مزيج حامض الخليك وخلات الصوديوم أو مزيج لمحلولي قاعدة ضعيفة وملحها مثل هيدروكسيد الأمونيوم وكلوريد الأمونيوم ثم أضيف للمزيج الأول أو الثاني كمية من حامض HCl و NaOH وبنفس التركيز الذي استخدم في المثال (١) ماذا يحدث ؟

نلاحظ أن التغير في ال pH لمزيج الحامض الضعيف وملحه أو مزيج القاعدة الضعيفة وملحها نتيجة إضافة الحامض أو القاعدة يكون طفيفا وغير ملحوظ .

نستنتج من المثال السابق أن المحاليل المائية للحوامض أو القواعد تكون حساسة جدا للتغير في درجة الحموضة (الأس الهيدروجيني pH) نتيجة وجود أي مصدر لحامض أو قاعدة ، بينما محاليل الحوامض الضعيفة وأملاحها تقاوم هذا التغير في درجة ال pH وهذه المحاليل أطلق عليها أسم المحاليل المنظمة.

وتعتمد قدرة المحلول المنظم على عاملين هما :

- النسبة بين درجة التركيز الجزيئي للملح والحامض .
- درجة تركيز كل من الأملاح والحامض حيث تزداد القدرة كلما زادت درجة التركيز .

أهمية المحلول المنظم :

ان الغرض الأساسي للمحلول المنظم هو السيطرة على قيمة ال pH للمحلول، كما يمكن أن يلعب المحلول المنظم دور ثانوي وهو السيطرة على القوة الأيونية، كما يمكن ان يوثر على تركيب او فعالية البروتينات والأحماض النووية، كما يستعمل لتثبيت (موازنة) الأحماض النووية، مركبات الأحماض النووية- البروتين ، البروتينات والتفاعلات الكيموحيوية. اما المحاليل المنظمة المعقدة فانها تستخدم في الترحيل الكهربائي Electrophoresis تفاعلات يتطلب الكثير من العمليات الكيميائية والحيوية أن لا تتغير قيمة pH لوسط التفاعل كثيراً. بل تبقى قريبة من قيمة معينة. ومثال ذلك :

- أن الدم في جسم الإنسان لا يمكن أن يقوم بوظيفة نقل الأكسجين إلى الخلايا إلاّ أن تكون قيمة pH = ٧,٤ .
- أن الأنزيمات تحتاج لوسط تكون فيه قيمة pH ثابتة تقريباً لتعمل بنشاط.
- معالجة التربة لنمو المحاصيل المختلفة.

يعرف المحلول Solution: بأنه عبارة عن خليط متجانس من مادتين أو أكثر لا يحدث بينهما تفاعل كيميائي ، وهو عبارة عن نظام ذي طور أو صنف واحد لذوبانية مادة في أخرى لتكوين محلول متجانس يعتمد على طبيعة

المواد المتضمنة في عملية الذوبان ، وتتأثر الذوبانية بالتغيرات في **درجة الحرارة** و**بطبيعة المواد المكونة للمحلول** و**الضغط** ، بالرغم من أن المؤثر الأخير ذو أهمية بالنسبة للغازات فقط .

المادة الموجودة بوفرة في المحلول تسمى المذيب (**solvent**) بينما الموجودة بنسبة أقل تسمى المذاب (**solute**) .

ومع ذلك ، فإنه بالنسبة لمحلول صلب في سائل يشار دائماً للسائل بأنه المذيب ، علماً بأن هنالك حالات أخرى شاذة يكون فيها الصلب موجودا بكمية أكبر .

إن كثير من الكواشف المستخدمة في التجارب العلمية تكون بشكل محاليل كيميائية وفي اغلب الأحيان نحتاج إلى تحضير هذه المحاليل في المختبر وكلما كان تركيز المحلول وطريقة تحضيره دقيقة جدا والمواد الكيميائية المستخدمة ذات نوعية جيدة وغير منتهية الصلاحية كلما أمكن الحصول على محلول ذو مواصفات قياسية.

وفي معظم المختبرات يتم تحضير هذه المحاليل بشكل محاليل خزن مركزة concentrated stock solutions مكونة من كواشف ومواد عديدة موجودة بكميات كبيرة ومتنوعة ، وان اخذ حجم محدد من محلول الخزن بتركيز دقيق يمكن ان يضاف الى مادة مخففه (الماء مثلا) وبذلك يكون تركيز المادة قد خفف داخل محلول الخزن.

ويمكن أن يعرف **التركيز** بأنه الكمية النسبية للمذيب والمذاب في المحلول.

كما يمكن أن يعرف بأنه نسبة مقدار معين من المادة إلى حجم محدد. كما في القانون التالي:

$$\text{Concentration} = \frac{\text{Amount}}{\text{Volume}}$$

وعند تحضير أي محلول يجب مراعاة الإرشادات العامة التالية:

١- استخدام كواشف عالية النقاوة.

٢- استخدام ماء مقطر عالي النقاوة ولا ايوني.

٣- تعقيم المحلول بالطريقة المناسبة (الترشيح ، استخدام الموصدة والخ).

٤- ضبط قيمة أل pH باستخدام محاليل قياسية محضرة بطريقة دقيقة.

٥- تعليم الحاويات بالأسماء والتراكيز وبخط واضح.

تصنيف المحاليل: Classification of solutions

تصنف المحاليل اعتمادا على عدة أسس منها :

١- تصنيف المحاليل بناءً على طبيعة المذيب والمذاب:

في أي محلول ثنائي يمكن أن يكون كلاً من المذاب والمذيب غاز ، سائل أو صلب وبالتالي يمكن أن يكون هنالك تسعة أنواع من المحاليل حيث يتم تصنيف أنواع المحاليل بحسب الحالة الطبيعية للمادة كما في الجدول أدناه :

نوع المحلول	المذاب	المذيب	أمثلة
غاز	غاز	غاز	O_2 , CO_2 في الهواء
	سائل	غاز	بخار الماء في الهواء
	صلب	غاز	تسامي مادة صلبة في غاز (اليود في N_2)
سائل	غاز	سائل	O_2 في الماء
	سائل	سائل	الكحول الإثيلي في الماء
	صلب	سائل	سكر في الماء
صلب	غاز	صلب	غاز الهيدروجين في البالاديوم
	سائل	صلب	سائل البنزين في اليود الصلب
	صلب	صلب	السبائك (النحاس في الذهب)

٢- تصنيف المحاليل بناءً على حجم دقائق المادة المذابة:

عند وضع كمية من السكر في قليل من الماء ورج المخلوط فإن السكر يذوب ، ولا يمكن فصله بالترشيح ، ولا بترك المحلول ساكناً تحت تأثير الجاذبية الأرضية وعليه يكون حجم الدقائق (الجزئيات أو الأيونات) متناهية في الصغر ولا يمكن فصلها ولا رؤيتها بالعين المجردة أو الميكروسكوب . يسمى مثل هذا النوع من المحاليل **بالمحاليل الحقيقية** (**True Solutions**) .

أما إذا وضع مسحوق الطباشير في كمية من الماء ورج المخلوط فإننا نحصل على معلق من الطباشير في الماء ، يمكن رؤية دقائقه إما بالعين المجردة أو الميكروسكوب . إذا ترك المخلوط ساكناً فإن دقائق الجسم الصلب المعلقة تتجمع بمرور الوقت في قاع الإناء تحت تأثير الجاذبية الأرضية وعليه يكون هذا المحلول مختلفاً من الحالة الأولى ويسمى هذا النوع من المحاليل بالعوالق أو المعلقات (**المحاليل المعلقة**) (**suspensions**) . بين هاتين الحالتين (محاليل حقيقية ومعلقات) توجد حالة ثالثة تسمى **بالحالة الغروية**، يكون حجم الجزيئات (الدقائق) فيها وسطاً ويتراوح نصف قطر هذه الدقائق في أغلب المحاليل الغروية بين $10 - 1000A^\circ$ وعليه يكون المحلول الحقيقي له دقائق نصف قطرها أصغر من $10A^\circ$ والمعلقات نصف قطرها أكبر من $1000A^\circ$.

٣- تصنيف المحاليل بناءً على درجة توصيلها للتيار الكهربائي:

تصنف المحاليل من حيث درجة توصيلها للتيار الكهربائي إلى نوعين :

أ- **المحاليل الإلكتروليتية :** Electrolyte solutions

تتكون من مادة مذابة لها المقدرة على التأين في المذيب ، وبذلك تكون لها القدرة على توصيل التيار الكهربائي ، وتختلف درجة التأين من مادة لها المقدرة على التأين الكلي أو بنسبة عالية ، وفي هذه الحالة تسمى إلكتروليت قوي strong electrolytes مثل محاليل الأحماض والقواعد والأملاح في الماء ، ومادة تتأين جزئياً وتسمى إلكتروليت ضعيف .

ومن أمثلة الأحماض القوية حمض البيركلوريك $HClO_4$ ، حمض النيتريك HNO_3 وحمض الهيدوكلوريك

ومن أمثلة القواعد القوية هيدروكسيد الصوديوم ($NaOH$) ، هيدروكسيد الكالسيوم $Ca(OH)_2$ وهيدروكسيد البوتاسيوم (KOH).

ومن أمثلة الأملاح التي تتأين بنسبة عالية :

- أملاح تتكون من أحماض قوية ، وقواعد قوية ، مثل كلوريد الصوديوم $NaCl$
- أملاح تتكون من حمض قوي وقاعدة ضعيفة مثل ملح كلوريد الأمونيوم NH_4Cl
- أملاح تتكون من حمض ضعيف وقاعدة قوية مثل خلات الصوديوم CH_3COONa
- أملاح تتكون من حمض ضعيف وقاعدة ضعيفة مثل ملح كربونات الأمونيوم $(NH_4)_2CO_3$

أما الإلكتروليتات الضعيفة (weak electrolytes) فهي التي تتأين جزئياً في محاليلها ، وتكون ضعيفة التوصيل للتيار الكهربائي ، مثل الأحماض والقواعد الضعيفة . مثال لحمض ضعيف : حمض الخليك CH_3COOH ومثال لقاعدة ضعيفة : هيدروكسيد الأمونيوم . وعامه يتم التمييز بين الإلكتروليت القوي والإلكتروليت الضعيف بوضع سهم ذي اتجاه واحد للإلكتروليت القوي دلالة على التأين التام ووضع سهمين متعاكسين دلالة على عدم التأين الكامل أو الوصول إلى مرحلة الاتزان بين الجزيء المتأين وأيوناته في محاليلها المائية .

ب- **المحاليل غير الإلكتروليتية (Non - electrolytes solutions)**:

هي تلك المحاليل التي تتكون من مادة مذابة لا تتفكك إلى أيونات في محاليلها ، مثل محلول السكر في الماء ومحلول النشأ في الماء .

٤- تصنيف المحاليل بناءً على نسبة المادة المذابة للمذيب:

إذا كان المحلول لا يمكنه أن يُذيب زيادة من المادة المذابة عند نفس درجة الحرارة فيطلق عليه المحلول المشبع (Saturated Solution) ، أما إذا كان المحلول يمكنه أن يُذيب زيادة من المادة المذابة فيطلق عليه المحلول غير المشبع (Unsaturated Solution) ، أيضاً يمكن الحصول على محاليل فوق المشبعة (Super saturated) إذا كانت تحتوي على زيادة من المذاب أكثر مما يمكن إذابته عند درجة حرارة معينة في ظروف معينة.

*طرق التعبير عن تركيز المحلول:

لكي نوضح فكرة المحلول والذوبانية يجب أن نحدد كمية كل من المادة المذابة (**solute**) والمذيب (**solvent**) الموجودين بالمحلول ، وهناك طرق عديدة للتعبير عن تلك التركيز منها :

أولاً : المولارية (Molarity) (M) :

وهي وحدة التركيز الأكثر شيوعاً وتستخدم بكثرة في التحليل الحجمي ، وتُعرف بأنها عدد مولات المادة المذابة في كمية من المذيب لتكوين لترٍ أو ديسميتر مكعب من المحلول ويمكن توضيحها كالآتي :

$$\text{المولارية} = \frac{\text{عدد مولات المادة المذابة}}{\text{حجم المذيب باللتر (ديسم}^3\text{)}}$$

وحدة المولارية هي مول / لتر أو مول / ديسم ٣

فعند حساب مولارية أي محلول يجب معرفة شيئين أساسيين هما الوزن الجزيئي للمادة المذابة ،وزن المادة المذابة بالغرام وحجم المذيب بالمللتر.

اما في حالة كون مولارية المحلول معلومة ووزن المادة المذابة مجهول والمطلوب تحضير هذا المحلول يجب أن معرفة مولارية المحلول، الوزن الجزيئي للمادة المذابة وحجم المذيب بالمللتر.

وعندها يمكن تطبيق القانون التالي: المولارية $= \frac{\text{وزن المادة المذابة}}{\text{الوزن الجزيئي للمادة المذابة}} \times \frac{١٠٠٠}{\text{حجم المذيب بالمل}}$

لنحصل منه على وزن المادة المذابة اللازمة لتحضير هذا المحلول.

مثال (١) :

احسب مولارية محلول يتكون من إذابة 20 جرام هيدروكسيد الصوديوم في 500 سم٣ من الماء ؟

الحل :

$$\text{عدد مولات } NaOH = \frac{\text{الوزن}}{\text{الوزن ألجزيئي}} = \frac{20}{40} = 0.5 \text{ مول}$$

$$\text{حجم المذيب باللتر} = \frac{500}{1000} = 0.5 \text{ لتر}$$

$$\text{المولارية} = \frac{\text{عدد مولات المادة المذابة}}{\text{الحجم باللتر}} = \frac{0.5}{0.5} = 1.0 \text{ مول / لتر}$$

مثال (٢) : احسب مولارية حمض الكبريت (VI) المتكون من إذابة 49 جرام من الحمض في 100 سم٣ من الماء ؟

الحل :

$$\text{عدد مولات } H_2SO_4 = \frac{49}{98} = 0.5 \text{ مول}$$

$$\text{حجم المحلول باللتر} = \frac{100}{1000} = 0.1 \text{ لتر}$$

$$\text{المولارية} = \frac{0.5}{0.1} = 5.0\ M$$

مثال (١) : حضر ٢٥٠ ملي لتر من EDTA-Na2 ذو مولارية ٠,٥ ؟

الحل :

الوزن الجزيئي لأي مادة يمثل مجموع الأوزان الذرية ويمكن الحصول علية بصورة مباشرة من أي مصدر.

الوزن الجزيئي للمادة المذكورة هو ٣٧٢,٢٤ وعليه لتحضير هذا المحلول نحتاج إلى معرفة وزن المادة المذابة فقط وهذا يمكن استخراجه من القانون المذكور أعلاه.

ويمكن صياغة القانون أعلاه بالشكل التالي:

$$\text{الوزن} = \frac{\text{المولارية} \times \text{الوزن الجزيئي} \times \text{الحجم}}{١٠٠٠}$$

وبتطبيق القانون أعلاه :

$$\text{الوزن} = \frac{٠,٥ \times ٣٧٢,٢٤ \times ٢٥٠}{١٠٠٠}$$

الوزن = ٤٦,٥٣ غرام .

عملياً تحضر المحاليل المولارية باستخدام الدوارق الحجمية وذلك بأخذ الكمية المناسبة من المادة المذابة (٤٦,٥٣ غرام) وذلك بوزنها باستخدام الميزان الحساس بشكل دقيق ثم وضعها في الدورق الحجمي ، وبعدها يتم إضافة المذيب (وعادة ما يكون الماء) مع الرج المستمر حتى يصل مستوى المحلول العلامة الدالة على الحجم المطلوب (250 mL).

ويمكن حل المثال أعلاه باستخدام صيغة أخرى للقانون كالأتي :

وزن المادة المذابة بالغرام = الوزن الجزيئي غرام / مول × المولارية مول / لتر × الحجم بالتر

وباختصار المول مع المول واللتر مع اللتر نحصل على الوزن المادة المذابة بالغرام .

- **اما اذا كان لدينا مادة سائلة او محلول فيجب أن تتوفر لدينا المعلومات التالية:**

١- حجم المحلول الاخير (الثاني) بالمل او باللتر .

٢- مولارية المحلول الثاني .

٣- مولارية المحلول الاول (المركز).

٤- من المعلومات اعلاه يمكن حساب حجم المحلول الاول (اي الذي حجم المحلول الذي سوف يؤخذ من المحلول المركز بالمل) وذلك من القانون التالي :

$$\mathbf{M1 \times V1 = M2 \times V2}$$

وقد يكتب هذا القانون في بعض المصادر بالشكل $\mathbf{C1 \times V1 = C2 \times V2}$

علما ان **M1** هو تركيز (مولارية) المحلول الأول .

و **V1** حجم المحلول الأول.

و **M2** تركيز (مولارية) المحلول الثاني.

و **V2** حجم المحلول الثاني.

ملاحظة:

عندما نستخدم هذا القانون يجب أن تكون وحدات القياس موحدة لكل من الحجم والتركيز (الوزن)، وإذا كانت غير موحدة فيجب توحيدها ويتم ذلك بالضرب أو بالقسمة.

مثال (١) : حضر ١٠٠ مل من ١ مولاري محلول Hydrochloric acid من محلول Hydrochloric acid ١٢,١ مولاري ؟

الحل : نطبق القانون $\mathbf{M1 \times V1 = M2 \times V2}$ والتعويض نحصل على:

$$(12.1\ M) \times (\ V1\ ) = (1M\ ) \times (100\ ml\ )$$

وباختصار ال M من طرفي المعادلة نحصل على :

$$V1 = \frac{١٠٠}{١٢,١} = 8.26 \text{ ml from concentrated HCL}$$

إذن نأخذ ٨,٢٦ مل من محلول HCL المركز ونضعه في دورق زجاجي ثم نضيف إليه حوالي ٥٠ مل من الماء المقطر ونرجه بشكل جيد ثم نكمل الحجم إلى ١٠٠ مل .

مثال (٢) : : حضر ١ مل من محلول Protinase K بتركيز ١٠ mg/ml من محلول Protinase K بتركيز ٢٠ mg/ml ؟

الحل : نلاحظ أن لدينا محلول وليس مادة صلبة لذلك نطبق القانون $\mathbf{C1 \times V1 = C2 \times V2}$ ومن المعطيات في السوال نحتاج فقط حجم المحلول الاول أي حجم المحلول الذي يؤخذ من المكحلول الاول ثم نكمل الحجم الى ١ مل .

$$20\ mg/mL \times V1 = 10\ mg/ml \times 1\ mL$$

وباختصار mg/ml من طرفي المعادلة نحصل على :

$$V1 = \frac{10\ mL}{٢٠} = 0.5\ mL$$

اذن ناخذ 500 µL من المحلول الاول (المركز) ثم نكمل الحجم الى 1 mL اوالى ١٠٠٠µ L من الماء المقطر.

ملاحظة :

وفي بعض الأحيان يطلب تحديد الرقم الهيدروجيني pH للمحلول، في هذه الحالة وبعدما نحصل على الوزن او الحجم المطلوب لا نضيف كل المذيب وإنما نترك جزء قليل منه جانبا ونذهب إلى معايرة pH المحلول حيث سنضيف حامض قوي أو قاعدة قوية بشكل محلول وبعد الوصول إلى pH المطلوب نكمل حجم المحلول إلى الحجم المطلوب.

ثانياً : المولالية : Molality

ويرمز لها بالرمز (m) تعرف المولالية بأنها عدد مولات المادة المذابة في كيلوجرام واحد من المذيب وليس كيلوجرام واحد من المحلول النهائي . ويمكن توضيحها كالآتي :

إذا كان لدينا محلول يتكون من المادة المذابة (B) والمذيب (A) ، يمكن التعبير عن المولالية كالآتي :

$$\text{المولالية} = \frac{\text{عدد مولات المادة المذابة } (n_B)}{\text{وزن المذيب } (W_A) \text{ بالكيلو جرام}}$$

$$\text{المولالية} = \frac{n_B}{W_A\ /\ 1000}$$

بما أن $n_B = \frac{W_B}{M_B}$

حيث W_B = وزن المادة المذابة ، M_B = الوزن الجزيئي للمادة المذابة

$$\varepsilon \text{ المولالية } (m) = \frac{\frac{W_B}{M_B}}{\text{وزن المادة المذابة}} \times \frac{1000}{W_A}$$

أي أن مولالية المحلول = $\frac{\text{الوزن الجزيئي للمادة المذابة}}{\text{وزن المذيب}} \times 1000$

فمثلاً : يذاب 98 جرام من حمض الكبريتيك (الوزن الجزيئي للمادة المذابة) في 1000جرام من الماء للحصول على محلول مولالي . ليس لحجم المحلول النهائي أهمية ولا تختلف المولالية باختلاف درجة الحرارة .

مثال (١) : احسب مولالية محلول يتكون من إذابة 40 جرام هيدروكسيد الصوديوم مذابة في ٢ لتر من الماء ؟

الحل :

$$\text{عدد مولات هيدروكسيد الصوديوم} = \frac{\text{الوزن}}{\text{الوزن الجزيئي}} = \frac{40}{40} = 1.0 \text{ مول}$$

الوزن = الحجم × الكثافة

وزن المحلول بالكيلوجرام =1000 سم^{3} × 1 جم / سم^{3} = 1000 جرام

وذلك باستخدام كثافة الماء تعادل 1.0جم / سم^{3}

ε يمكن تطبيق القانون : المولالية = $\frac{\text{عدد مولات المادة المذابة}}{\text{وزن المذيب بالكيلوجرام}}$

$= \frac{1.0}{1000/2000} = 0.5$ m $= 0.5$ مول / كيلوجرام

أو باستخدام القانون : المولالية = $\frac{\text{الوزن للمذاب}}{\text{الوزن الجزيئي}} \times \frac{1000}{\text{وزن المذيب}}$

$= \frac{40}{40} \times \frac{1000}{2000} = 0.5$ مول / كيلوجرام

مثال (٢) : أذيب 0.288 جرام من مادة معينة في 15.2 جرام من البنزين (C_6H_6) ووجد أن مولالية المحلول تساوي 0,221 ، أحسب الوزن الجزيئي للمادة المذابة ؟

الحل :

$$m = \frac{W_B}{M_B} \times \frac{1000}{W_A}$$

$$0.221 = \frac{0.288}{M_B} \times \frac{1000}{15.2}$$

$$M_B = 85.73$$

ثالثاً : الكسر المولي (Mole Fraction):

ويُرمز له بالرمز (x) . ويعرف الكسر المولي (x) لأي مكونة في المحلول بأنه عدد مولات تلك المكونة مقسوماً على عدد المولات الكلية لجميع مكونات المحلول .

إذا اقترضنا أن n_A مول من مذاب A ، وأن n_B مول من مذاب B قد أذيبت في n_C مول من المذيب C فإن الكسر المولي لكل من هذه المكونات الثلاث يُعبر عنه كما يلي :

$$\text{الكسر المولي للمكونة } A = x_A = \frac{n_A}{n_A + n_B + n_C}$$

$$\text{الكسر المولي للمكونة } B = x_B = \frac{n_B}{n_A + n_B + n_C}$$

$$\text{الكسر المولي للمكونة } C = x_C = \frac{n_C}{n_A + n_B + n_C}$$

يلاحظ أن مجموع الكسور المولية للمكونات يساوي الوحدة

أي أن : $x_A + x_B + x_C = 1$

مثال (١) : احسب الكسر المولي لمكونات المحلول المكون من إذابة 20 جرام من هيدروكسيد الصوديوم في 500 سم^3 من الماء ؟

الحل : عدد مولات $NaOH = \frac{20}{40} = 0.5$ مول

عدد مولات الماء $= \frac{500}{18} = 27.8$ مول

الكسر المولي لـ $NaOH = \frac{0.5}{0.5 + 27.8} = 0.0176$

الكسر المولي للماء $1 - 0.0176 = 0.983$

أو التعويض في القانون $0.983 = \frac{27.8}{0.5 + 27.8}$

مثال (٢) : احسب الكسر المولي للنيتروجين في محلول يتكون من 14 جرام غاز النيتروجين ، 8 جرامات من غاز الأكسجين وجرام واحد من غاز الهيدروجين .

الحل :

عدد مولات غاز النيتروجين $= \frac{14}{28} = 0.5$ مول

عدد مولات غاز الأكسجين $= \frac{8}{32} = 0.25$ مول

عدد مولات غاز الهيدروجين $= \frac{1}{2} = 0.5$ مول

الكسر المولي للنيتروجين $= \frac{\text{عدد مولات النيتروجين } N_2}{\text{عدد مولات } N_2 + \text{عدد مولات } O_2 + \text{عدد مولات } H_2}$

$$= \frac{0.5}{0.5 + 0.25 + 0.5} = 0.4$$

رابعاً : النسبة المئوية :

يمكن التعبير عنها كالآتي :

أ- النسبة المئوية الوزنية (weight percentage):

ويرمز لها بالرمز (w/w) وهي عدد جرامات المادة المذابة منسوب إلى وزن مكونات المحلول (غالباً ما يكون 100 جرام) ، وتستخدم عامة في المحاليل ذات الطبيعة الصلبة . يمكن تعيين النسبة المئوية بالوزن للمادة المذابة (B) في وزن معين من المذيب (A) كالآتي :

$$wt\ \%\ of\ \ B=\left(\frac{w_B}{w_A+w_B}\right)\times 100$$

كما يمكن فهم النسب الوزنية بأنها متكاملة ، فمثلاً تتكون سبيكة معينة من معدني الذهب والنحاس وكانت نسبة النحاس الوزنية (w/w) 30% ، هذا يعني أن في كل 100 جرام من السبيكة ، هنالك 30 جرام نحاس و 70 جرام ذهب .

مثال : محلول يتكون من إذابة 10 جرام هيدروكسيد صوديوم في 100 جرام من الماء . أحسب النسبة المئوية لهيدروكسيد الصوديوم ؟

الحل :

كتلة المحلول = $100+10=110$ جرام

النسبة المئوية لـ $Na\,OH$ = (وزن هيدروكسيد الصوديوم / الوزن الكلي) × 100

$$=\frac{10}{110}\times 100=9.1\,\%$$

ب- النسبة المئوية الحجمية : (Volume Percentage):

ويرمز لها بالرمز (v/v) وهي حجم المادة المذابة منسوب لحجم المحلول (غالباً ما يكون 100 سم٣) وتستخدم عامة في المحاليل السائلة . يمكن تعيين النسبة المئوية بالحجم للمادة المذابة B كما يلي :

$$Volume\ \ \%\,of\ \ B=\frac{V_B}{V_{Total}}\times 100$$

كما يمكن فهم النسب الحجمية بأنها متكاملة كما هو الحال في النسب الوزنية . فمثلاً عندما يقال أن محلول معين يتكون من كحول وماء وكانت نسبة الكحول (v/v) 40% ، هذا يعني أن في كل 100 سم٣ من المحلول أن هنالك 40 سم٣ كحول و 60 سم٣ ماء .

جـ - النسبة المئوية لوزن فى حجم :

رمز لها بالرمز (w/v) وهي عبارة عن عدد جرامات المادة المذابة في 100 سم٣ من المذيب . فمثلاً عندما يقال أن محلول السكر في الماء تركيزه (w/v) 10% . هذا يعني أن 10 جرامات من السكر مذابة في 100 سم٣ من الماء.

خامساً : العيارية أو النورمالية (Normality)

ويرمز لها بالرمز (N) وهي عبارة عن عدد الجرامات المكافئة من المادة المذابة في لتر من المحلول .

فمثلاً عند إذابة 49 جرام من حمض الكبريت (VI) في لتر من الماء يتكون محلول مولاريته $0.5\ M$ ولكن نورماليته $1.0\ N$ وذلك لأن الوزن 49 جرام يمثل نصف الوزن الجزيئي وتكون المولارية :

$$\text{المولارية} = \frac{0.5}{1} = \frac{49/98}{1} = 0.5\ M$$

أما الوزن المكافئ لحمض الكبريتيك $= \frac{98}{2} = 49$ جرام

$$\text{النورمالية} = \frac{1}{1} = \frac{49/49}{1} = 1.0\ N$$

وعليه تكون العلاقة بين النورمالية والمولارية كالآتي :

النورمالية = المولارية × عدد الهيدروجينات الحمضية في الحامض

= المولارية × عدد الهيدوكسيدات القاعدية في القاعدة

سادسا": التعبير عن التركيز بالعامل X:

يمكن التعبير عن تركيز المحلول بشكل مضاعف مقارنتا" مع تركيز محلول العمل القياسي Standard work solution أي إن تركيز المواد الموجودة داخل هذا المحلول يكون ضعف تركيزها ضمن محلول العمل Work solution بمقدار معين ويتم إذابتها في حجم محدد من المذيب وعند التحضير يتم فقط تخفيف هذا المحلول المركز إلى التركيز المطلوب.

إن الهدف الأساسي من هذه الطريقة هو التقليل من حجم المحلول المراد تحضيره ليتم نقله أو حفظه بشكل أسهل.

مثلا" :

بعض محاليل الترحيل الكهربائي Electrophoresis تحضر بشكل محاليل مركزة للقوة (١٠ X) اي ان تركيز هذا المحلول والذي يسمى أحيانا" محلول الخزن Stock solution هو عشرة أضعاف تركيز محلول العمل (X ١)، أي إن كل مكون من مكونات هذا المحلول يزيد عشرة أضعاف عن تركيزه في محلول العمل، وعند تحضير محلول العمل المطلوب يتم إضافة المذيب (الماء) للحصول على التركيز المطلوب.

لتحضير (1 L) 1000 ml محلول (١ X) TBE من (١٠ X) TBE المركز نأخذ ١٠٠ مل من المحلول المركز (١٠X) TBE ونضيف إليها ٩٠٠ مل من الماء المقطر Distil water فنحصل على محلول TBE بتركيز(١X).

ويمكن حساب ذلك من خلال الآتي:

$$10\ X\ \text{Buffer} \times \frac{n\ ml}{1000\ ml} = 1X\ \text{Buffer}$$

n ml مقدار (الحجم) بالمل الذي يؤخذ من المحلول المركز ثم يضاف له المذيب لتكوين محلول العمل المطلوب.

وباختصار Buffer من الطرفين يصبح لدينا الآتي:

$$\frac{10\ X\ n}{1000} = 1X$$

نضرب طرفي المعادلة ب ١٠٠٠

$$(1000) \times \frac{10\ X\ n}{1000} = 1X\ \ (1000)$$

وباختصار (1000) من طرف المعادلة الأيسر يصبح لدينا الأتي:

$$10\ X\ n = 1000\ X$$

وبقسمة طرفي المعادلة على 10 X تصبح المعادلة :

$$\frac{10\ X\ n}{10\ X} = \frac{1000\ X}{10\ X}$$

وبالاختصار ينتج لنا الآتي:

$$n=100$$

إذن نأخذ ١٠٠ مل من المحلول المركز بتركيز 10 X ونضيف إليه ٩٠٠ مل من المحلول المخفف (المذيب) لنحصل على محلول بتركيز 1X.

البادئات المترية : Metric Prefixes

البادئ المتري : عبارة عن رمز مختزل يستخدم ليدل على قيمة كبيرة أو صغيرة جدا للوحدة الأساسية كبديل للتعبير عنها كقوة (١٠). الوحدات الأساسية المستخدمة بكثرة في العلوم البيولوجية هي : المتر ، الغرام ، ألمول ، اللتر. وبسبب بساطة استخدامها فان البادئات المترية تستخدم بشكل واسع في علم الأحياء الجزيئي.

من الجدول أدناه نلاحظ أن ١ نانوغرام (1 nanogram ng) تعادل ١ × $١٠^{-٩}$ أي أن هناك ١ × $١٠^{٩}$ نانوغرام لكل واحد غرام، وكذلك الحال فان واحد مايكرولتر µL يساوي (يكافئ) ١ × $١٠^{-٦}$ لتر، اي هناك ١ × $١٠^{٦}$ µL لكل واحد لتر. عندما نعبر عن الكميات باستخدام البادئات المترية يتم اختيار البادئة لكي يمكن كتابة القيمة بشكل رقم صغير . مثلا للتعبير عن القيمة gram ٠,٠٠٠٠٠٠٠٠٥ يمكن كتابتها 0.05 µg أو 50ng أو ٥٠,٠٠٠ pg .

يوضح الجدول التالي البادئات الواسعة الاستخدام وقيمها :

Metric Prefix	Abbreviation	Power of I0
giga--	G	10^{9}
mega-	M	$١٠^{٦}$
kilo-	k	$١٠^{٣}$
milli-	m	10^{-3}
micro-	µ	$10^{-٦}$
nano-	n,	$10^{-٩}$
pico-	P	$10^{-١٢}$
femto	f	$10^{-١٥}$
atto-	a	$10^{-١٨}$

Abbreviations

المختصرات:

هناك العديد من المختصرات المستخدمة بكثرة ومنها:

No.	Abbreviation	English Meaning	Arabic Meaning
1	>	Greater than	اكبر من
٢	<	Less than	اصغر من
٣	dL	Deciliter (100ml)	ديسي لتر ١٠٠ مللتر
٤	g	gram	غرام
٥	IU	International Unit	وحدة دولية
٦	mg	milligram	ملي غرام
٧	L	Liter	لتر
٨	Mg/dL	milligram / Deciliter	ملي غرام لكل ديسي لتر
٩	mL	milliliter	ملي لتر
١٠	mm	millimeter	ملي متر
١١	ng	nanogram	نانو غرام

١٢	nmol	nanomole	نانو مول
١٣	pg	picogram	بيكو غرام
١٤	µm	Micron(micrometer)	مايكرو متر
١٥	µL	Microliter	مايكرو لتر

طرق تحطيم الخلايا: Methods of Cell Breaking

هناك العديد من التقنيات التي تستخدم لتحطيم الخلايا من اجل استخلاص الجزيئات الحيوية المطلوبة الموجودة فيها وفيما يلي أهم هذه الطرق:

اولا": التقنيـــات الميكانيكيـــة: Mechanical Techniques

١. تقنية السحق الآلي: Automated Milling Technique

في هذه التقنية يستخدم الهاون Mortar والمدقه (يد الهاون) Pestle لتحطيم الخلايا، هنا توضع العينة المراد سحقها في الهاون ثم تضاف لها بعض المواد لتسهيل عملية سحقها ومنها مادة النتروجين السائل التي تمتاز بأنها ذات درجة حرارة - ١٧٦° ،عند إضافتها إلى العينة وبعد السحق الجيد تتحول العينة إلى مسحوق Powder ، وفي عدم توفر هذه المادة يمكن استخدام الرمل او مسحوق الزجاج والذي يضاف بكميات مناسبة لكمية العينة المستخدمة.

٢. تقنية استخدام المكسرات الميكانيكية: French Press Technique

تعتمد التقنية على تكسير الخلايا من خلال وضعها في محلول واستخدام الضغط والتفريغ في أجهزه ميكانيكية خاصة.

ثانيا": التقنيات الفيزياوية: Physical Methods

١. الموجات الفوق الصوتية: Sonication

يتم تعريض الخلايا لموجات او ذبذبات فوق الصوتية او عالية التردد، تقسم الموجات الصوتية إلى:

أ. موجات صوتية مسموعة تقع ترددتها بين ١٦٠٠٠ – ١٠٠٠٠.

ب. موجات فوق الصوتية Super Sound Waves وتقع ترددتها بين ١٦٠٠٠ – ٢٠٠٠٠.

ت. الأمواج الفائقة Ultrasound Wave والتي تقع ترددتها فوق ٢٠٠٠٠.

تكون الموجات الصوتية ضمن المدى المسموع غير مؤثرة على خلايا الأحياء المجهرية، بينما تؤثر الترددات الفائقة على خلايا الأحياء المجهرية إذ تتسبب في تلف بعض الجزيئات الكبيرة مثل البروتين والأحماض النووية، واستمرار هذه الترددات يؤدي إلى حدوث اهتزازات عنيفة لمكونات الخلية مما يدمر عضيات الخلية وبالتالي موتها. من مساوئ هذه الطريقة حصول تحطيم للمادة الوراثية والجزيئات البروتينية الكبيرة ولكن هذه الطريقة مفيدة في استخلاص الأنزيمات والمكونات الداخلية على شرط التبريد لذا لا يجوز إطلاق الذبذبات إلا لفترة ٤٠ – ٢٠ ثانية والتوقف للتبريد ولمدة ٦ – ٣ مرات.

٢. التجميد والإذابة: Freezing & Thawing

يؤدي تجميد الخلايا وإذابتها بسرعة لمرتين على الأقل إلى تحطم الأنسجة ولكن هذه الطريقة لها الكثير من المساوئ.

ثالثا": التقنيات الكيميائية: Chemical Techniques

١. استخدام المنظفات: Detergents

يمكن تعريف المنظفات بأنها مركبات ذات نهايتين محبة وكارهة للماء تتداخل مع مكونات أغشية الخلية Lipoprotein وتخترقها مما يؤدي إلى تدميرها وبالتالي إلى النفاذية الكاملة لغشاء الخلية وخروج مكوناتها. يفضل عند استخدام المنظفات تدعيمها بمركب ال EDTA لغرض المحافظة على عضيات الخلية من التلف واحيانا" يستخدم السكروز Sucrose.

هنالك ثلاث أنواع من المنظفات وهي:

١. المنظفات السالبة: Anion Detergents

مثل ال SDS

٢. المنظفات الموجبة: Cation Detergents

مثل ال Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)

٣. المنظفات المتعادلة : Neutral detergent

مثل Triton X-100

٢. المعالجة الحامضية أو القاعدية: Acid or Base Treatments

وهي محدودة الاستخدام مع الأنظمة الحيوية.

رابعا": الطرائق البيولوجية: **Biological Methods**

١. استخدام الانزيمات الحالة Hydrolysis Enzymes ومنها استخدام أنزيم Lysozyme.

٢. العاثيات Phages والتي يكون استخدامها محصور في مجال البحوث فقط.

٣. المضادات الحياتية Antibiotics ومنها استخدام البنسلين Penicilin ومشتقاته لتحطيم كبسولة البكتريا الضارية.

استخلاص الحامض النووي الدنا: **DNA extraction**

يشكل الحامض النووي الدنا نسبة صغيرة من مكونات الخلية وعادة ما يوجد في أماكن محددة ومعروفة من الخلية. في الخلية بدائية النواة Procaryotic cell يوجد الدنا بشكل مكثف ومتمركز في مكان يدعى المنطقة النووية Nucleoi والتي لا تنفصل عن بقية مكونات الخلية بغشاء خلوي. اما في الخلية حقيقة النواة Eucaryotic cell فيوجد الدنا في مكان محدد وهو النواة والتي تنفصل عن بقية اجزاء الخلية الاخرى بغشاء خلوي، حوالي ٩٠% من الدنا يوجد في النواة ضمن الكروموسوم ويسمى الدنا النووي Nuclear DNA اما البقية فيوجد في المايتوكوندريا ويسمى الدنا المايتوكونديريDNA Mitochondrial وفي البلاستيدات الخضراء ويسمى الدنا البلاستيدي Chloroplast DNA . اما في الفيروسات فيوجد المنا محاط بالغلاف البروتيني ويشكل ٣٠-٥٠% من الكتلة الكلية للفايروس.كمية الدنا الموجودة في الفيايروس قلية جدا بالمقارنة مع كميتة الدنا الموجودة في الخلايا الحقيقية والبدائية النواة.

تعد عملية استخلاص الدنا من العمليات الضرورية للحصول على نموذج الدنا، وايا" كان مصدر الاستخلاص (بكتريا، خلايا نباتية، خلايا حيوانية) فان عملية الاستخلاص تتضمن ازالة الشوائب للحصول على الدنا نقيا". ان عملية استخلاص الدنا من الكائنات الحية مهمة جدا وتمثل الخطوة الأولى والأساسية للعديد من التجارب والفحوصات المختبرية الوراثية الاخرى.يمكن ان تعرف عملية الاستخلاص بشكل عام بأنها عملية الحصول على

مادة محددة مج المجموع الكلي للمواد الاخرى بواسطة التاثير الفيزيائي اوالكيميائي. ان استخلاص الدنا في حالات كثيرة تمثل المطلب الاساسي للعديد من العمليات الجزيئية الاخرى.

الاهداف الرئيسية لاستخلاص الدنا هي:

١- فصل الدنا من كل مكونات الخلية الاخرى ضمن خطوات متسلسلة، ويجب ان يكون هذا الدنا نقيا" وبدون اي ملوثات من بروتينات او كربوهيدرات او RNA والخ. يمكن فصل الدنا عن المكونات الاخرى لان وزنه الجزيئي عالي مقارنة بالجزيئات الأخرى.

٢- الحصول على تركيز او كمية كافية من الدنا لإجراء التجارب الأخرى المطلوبة.

٣- تحضير دنا ذو نقاوة عالية وخالي من الملوثات الاخرى.

٤- تجهيز دنا ذو وزن جزيئي عالي High molecular weight (HMW) وتسمى هذه العملية Integrity والذي يتراوح 50 to 200 kbp.

تعد مبادئ عزل واستخلاص الدنا من الكائنات الحية واحدة لجميع الطرق لذلك فان جميع الطرق المستخدمة لاستخلاص الدنا تتضمن الخطوات الاربعة التالية:

١- تحضير المستخلص الخلوي (تكسير الخلايا) Preparation of cell extract (Cells breakage)

تكسير الجدران والأغشية الخلوية لتسهيل خروج الدنا وبقية مكونات الخلوية الأخرى ودون التعرض لأي أضرار أخرى. هناك العديد من الطرق المستخدمة في تكسير الجدران والأغشية الخلوية مثل الطحن grinding، المزج او الخلط blending ، الضغط العالي high pressure كل هذه الطرق تسمى التكسير الميكانيكي والتي تعطي قوة عالية لتكسير الجدران أو الأغشية الخلوية.

تكسير الخلايا النباتية يتم باستخدام النتروجين السائل الذي يكون ذو درجة حرارة واطئة جدا ١٧٦ تحت الصفر مع الهاون mortar والذي توضع فيه العينة والمدقة او يدة الهاون pestle والذي يستخدم للسحق. الخلايا الحيوانية فانها تمزج او تفرم لزيادة المساحة السطحية.اما الخلايا البكتيرية فلا تحتاج لمثل هذه العمليات.تكسير الخلايا يتم باستخدام الطرق الكيميائية (المنظفات detergents) و / او باستخدام الطرق الانزيمية. المنظفات تعمل على إذابة اللبيدات الموجودة في الاغشية الخلوية بالإضافة الى أنها تملك تأثير تثبيطي لأنزيمات DNases التي تعمل على

تحليل ال DNA ويمكن ان تمسخ البروتينات وبذلك تساعد في ازالة البروتينات من المحلول. الاغشية الخلوية تحطم او تحلل باستخدام محلول الاستخلاص والذي يحتوي علىEDTA و SDS في اغلب الاحيان. ال EDTA يعمل على ازالة ايونات Mg^{2+} والتي تمثل الدعامة الأساسية في حفظ التركيب الكلي للغشاء الخلوي. اما ال SDS فانه يساعد في تحطيم الأغشية الخلوية بإزالة اللبيدات من تلك الاغشية.

٢- تنقية الدنا من المستخلص الخلوي: Purification of DNA from cell extract

بالإضافة الى الدنا يحتوي محلول المستخلص الخلوي كميات من البروتينات والحامض النووي الرنا RNA لذلك يجب التخلص من هذه الملوثات للحصول على الدنا بشكل نقي.

١- إزالة البروتينات: Removal of Protein

يتم فصل الدنا عن المكونات الخلوية الأخرى باستخدام العديد من عمليات إزالة البروتينات والتي تسمى Deproteinization Process من خلال استخدام معاملات بروتينية وأنزيمية.يتم ازالة البروتينات من المحلول بالاعتماد على الصفات (الخواص) الفيزيائية للبروتينات والأحماض النووية والتي تمثل الاختلاف في عملية الذوبان، **وهناك طريقتين لإزالة البروتينات من المحلول هي:**

١- إزالة البروتينات باستخدام المذيبات العضوية: Deproteinization using organic solvents

معظم الطرق المستخدمة لإزالة البروتينات تعتمد على الاختلاف في ذوبانية الأحماض النووية والبروتينات المذيبات العضوية. الأحماض النووية جزيئات محبة للماء hydrophilic molecules وتذوب بسهوله ضمن المحلول (الطبقة) المائية، أما البروتينات فانها تحتوي على بقايا (جذور) كارهة للماء تجعلها تذوب في المذيب العضوي.أشهر المذيبات العضوية المستخدمة في ازالة البروتينات هي الفينول phenol والكلوروفورم chloroform المضاف اليه كمية قليلة isoamyl alcohol .

الفينول مادة بلورية في درجة حرارة الغرفة، يتحول الى سائل باذابته في محلول Tris-HCL ذو اس هيدروجيني ٨. ان البروتينات تحتوي على بقايا (جذور) كثيرة كارهة للماء متمركزة في وسط الجزيئة، وجزيئات الفينول من ناحية أخرى كارهة جدا للماء عليه عندما يتم مزج محلول المستخلص الخلوي مع حجم مماثل من محلول الفينول فان بعض جزيئات الفينول تميل الى الذوبان في لب (وسط،مركز) جزئية البروتين بدلا ذوبانها في الماء وبالتالي

تنتشر جريئة الفينول في وسط جزيئة البروتين وأخيرا تجعلها تنتفخ ثم تنفجر او تمسخ denature . جزيئات البروتين الممسوخة تذاب ضمن طبقة الفينول أما جزيئات الأحماض النووية والتي لا تملك الجزيئات الكارهة للماء فإنها تبقى ضمن الطبقة المائية العلوية.ضمن هذه المرحلة لا يستطيع الفينول إزالة كل البروتينات من المحلول وعليه تكرر عملية الاستخلاص بالفينول مرة ثانية لإزالة كل البروتينات الموجودة ضمن المحلول. مع كل مرحلة استخلاص يتم فقدان حوالي ٢٠% من جزيئات الدنا وبما ان الفينول مادة سامة Toxic وعملية تحضيره مزعجة لانه ذو رائحة كريهة لذلك يفضل استخدام الطرق الانزيمية في إزالة البروتينات.

أما الكلوروفورم فانه لا يذوب في الماء ولا تفقد جزئيات الدنا حتى عندما تعاد عملية الاستخلاص به عدة مرات.فعالية الكلوروفورم في إزالة البروتينات The deproteinization action of chloroform مبنية على قدرة الكلوروفورم على مسخ البروتينات وجعلها تدخل ضمن الطبقة الوسطى المتكونة بينه وبين الماء the water–chloroform interphase ونتيجة لذلك يرتفع تركيز البروتينات ضمن الطبقة الوسطى مما يؤدي الى ترسيبها. بما ان فعالية الكلوروفورم في إزالة البروتينات تحصل ضمن الطبقة الوسطى المتكونة بينه وبين الماء لذلك فان فعالية الكلوروفورم تزداد بزيادة المساحة السطحية، لانجاز ذلك يتكون اولا" شكل مستحلب من الكلوروفورم والماء، ونظرا" لان الكلوروفورم لا يستطيع الاختلاط او الامتزاج مع الماء بالشكل الاعتيادي لذلك يتم التحريك (الاهتزاز) القوي vigorous shaking للمزيج لانجاز ذلك، وفي بعض الاحيان يضاف ال isoamyl alcohol ليساعد في تكوين المستحلب وزيادة المساحة السطحية للماء والكلوروفورم .

٢- إزالة البروتينات باستخدام الأنزيمات: Deproteinization using Enzymes

يمكن ان تزال البروتينات من مزيج المستخلص الخلوي باستخدام الانزيمات والتي من اكثرها استخداما" ال proteinase K و pronase ، كلا الأنزيمين ثابتة جدا وتستخلص من الفطريات بشكل طبيعي ويمكن ان تحضر بشكل صناعي وتمتاز بكونها خالية من انزيمات DNase ولكن تكون غالية الثمن.هذه الانزيمات تكون فعالة جدا بوجود تراكيز واطئة من المنضفات السالبة anionic detergent وتراكيز عالية من الاملاح وال EDTA ومدى واسع من الاس الهيروجيني (pH 6.0–10.0) ودرجة

الحـراة المثلـى لهـا (50–67°C)، لـذلك تسـتطيع ان تحطـم البروتينـات بـدون ان تحتـاج الـى عوامـل مساعدة.

المشكلة في استخدام هذه الانزيمـات انهـا تستطيع ان تزيل ٨٠-٩٠% من البروتينـات الموجـودة وهذا يعـود الـى ان تحطـيم البروتينـات يعتمـد علـى تركيـز الانـزيم والمـادة الاسـاس. عمليـا" معـدل ازالـة البورتينـات the deproteinization rate يعتمد فقط علـى تركيـز المـادة الاسـاس (substrate) للانـزيم بسبب انـه ليس عمليـا" ان تضـاف كميـة كبيـرة من الانـزيم لتسـريع التفاعل عند تركيـز منخفض من المادة الاساس، وكاي تفاعل كميائي فان تركيـز المـادة الاسـاس يقل كلمـا تقدم وقت التفاعل، لمعالجـة هذا التباطؤ ولاكمال الانزيم عمله الى نهاية الوقت المحدد يتم استخدام تركيز عالي من الانزيم والمادة الاساس حيث ان الانزيم يستطيع ازالـة ٨٠-٩٠% من البروتينـات ضـمن الوقت المعقول.هذه المشكلة يمكن ان تعالج باستخدام احد المذيبات العضوية في الاستخلاص ولمرة واحدة فقط.

٢- إزالة الحامض النووي ال RNA : Removal of RNA

ازالة الحامض النووي الرنا خلال عملية استخلاص الدنا باستخدام الانزيمات ولكن هذه الانزيمـات لا تزيل كل الرنـا الموجـود ولـذلك نلاحظ بقـاء كميـة قليلـة منـه مـع الحـامض النـووي الـدنا. من افضـل وارخـص الانزيمـات المستخدمة لهذا الغرض هـي ribonuclease A and ribonuclease T 1 والتـي تستطيع ان تحطم جزيئة الرنا وخاصة عند القاعدة السايتوسين C و اليوراسيل U .

بعد استخدام المذيبات العضوية او الانزيمات في تحطيم البروتينات وازالة الحـامض النـووي الرنـا يتم ترسـيب البروتينـات الممسـوخة باسـتخدام الترسـيب الميكـانيكي (الطـرد المركـزي Centrifugation) والـذي يـتم إجـراءه بعد التحضـين فـي الحمـام المـائي Water Bath مباشـرتا" او احيانـا" يسبق عمليـة الطـرد المركـزي اضـافة محلـول يهدروكسـيد الصـوديوم ذو التركيـز العـالي (٥ - ٦ مـولاري) حيـث

يؤدي ذلك الى ترسيب البروتينات وبقية المكونات الخلوية ضمن الطبقة السفلى (الأثقل) اما الدنا فيبقى ضمن الطبقة المائية بشكل ذائب ويحتاج الى عملية ترسيب.

٣- ترسيب الحامض النووي الدنا: precipitation of the DNA

يتم ترسيب الدنا الموجود ضمن الطبقة المائية بتركيزه (تجميعه) باستخدام نوعين رئيسين من الكحول وهما الايثانول ethanol والايزوبروبانول isopropanol.

جزيئات الماء القطبية Polar تحيط بجزيئات الدنا في المحلول المائي aqueous solution ،عملية ذوبان الدنا في الماء تحصل عن طريق تفاعل قوي بين الشحنة السالبة لمجموعة الفوسفات لجزيئة الدنا مع الشحنة الموجبة لجزيئة الماء مما يؤدي الى ذوبان الدنا في الماء.

ترسيب الدنا بالكحول يعتمد على اساس تقليل ذوبانية الدنا في الماء،حيث يتم اضافة الكحول الى المحلول المائي والذي يعمل على تجميع خيوط الدنا ضمن المحلول المائي بسحب جزيئات الماء منها. بعدها يتم سحب خيوط الدنا المتجمعة والتي عادتا" تكزن باللون الابيض باستخدام الخطاف Hook باستخدام عملية الطرد المركزي لترسيب خيوط الدنا في اسفل انبوبة الاختبار.

عندها يتم اضافة محلول 70% ethanol بمقدار ٢ مل الى الدنا المترسب وتحريكه بهدوء لغرض غسل الدنا وازالة بقية الاملاح المترسبة معه. بعد ذلك نرسب الدنا من هذا المحلول باستخدام عملية الطرد المركزي وتترك انبوبة الاختبار مفتوحة لمدة نصف ساعة لتجف خيوط الدنا بشكل تام وتتطاير بقايا جزيئات الايثانول.

اخيرا" يتم اذابة الدنا المترسب باضافة محلول TE او الماء المقطر وبمقدار ١٠٠- ٥٠٠ µL حسب كمية الدنا المترسب ثم يترك المحلول الاخير الى اليوم التالي بدرجة حرارة الغرفة لغرض ذوبان الدنا ضمن المحلول بشكل تام ويفضل التحريك Shaking اذا توفر ذلك.

٤. تقدير تركيز ونقاوة الدنا: Determination of the Purity and Quantity of DNA

المرحلة الأخيرة في اي عملية استخلاص للاحماض النووية (DNA, RNA) هي تقييم النتيجة، بالنسبة للدنا يتضمن ذلك تقدير نقاوة الدنا وتركيزه. يتم تقدير تركيز ونقاوة الاحماض النووية باستخدام التقدير الطيفي باستخدام

جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer System ،تستعمل طريقة الامتصاص عند الطول الموجي ٢٦٠nm لقياس كمية الدنا او الرنا او كليهما في محاليلها وهي طريقة سريعة وسهلة ودقيقة لقياس كمية الأحماض النووية.

تستعمل كمية الامتصاص (الكثافة الضوئية Optical Density) عند الطول الموجي nm ٢٦٠ لقياس كمية الدنا لان الحامض النووي الدنا يملك اعلى امتصاص للكثافة الضوئية عند هذا الطول الموجي واقل امتصاص عند الطول الموجي ٢٣٠nm . اما كمية الامتصاص عند الطول الموجي nm ٢٨٠ فتستخدم لتقدير كمية البروتينات الموجودة ضمن محلول الدنا.ان كثافة ضوئية قدرها ١ تقابل ٥٠ مايكروغرام من الدنا لكل ١ مل (50µg/ml) بينما تقابل (40µg/ml) للحامض النووي الرنا.

تتصف المحاليل النقية للدنا او للرنا بقيمة الكثافة الضوئية للطولين الموجيين ٢٦٠ مقسومة على ٢٨٠ وهي ١,٨ للدنا و٢ للرنا وتقل القيمة في حالة وجود ملوثات لنموذج الحامض النووي كالبروتينات وغيرها.

وظيفة المواد والمحاليل الكيميائية المستخدمة في استخلاص الأحماض النووية:

No.	المادة أو المحلول	الوظيفة
1.	**EDTA**	يعمل على تحليل جدار الخلية من خلال قيامه بسحب ايونات المغنسيوم الموجبة Mg^{++} التي تحافظ على استقرارية جدران وأغشية الخلايا
2.	**Tris - HCl**	يحافظ على استقرارية ال pH المحلول.
3.	**CTAB**	منظف موجب الشحنة يذيب الأغشية الخلوية ويكون معقد مع ألدنا مما يسهل عملية ترسيبه بوجود محلول ملحي واطئ التركيز أو بإضافة محلول الايزوبروبانول. كما يعمل على إزالة السكريات المتعددة polysaccharides ويبقى الدنا في المحلول.
4.	**Isopropanol**	يقوم بترسيب الدنا عن طريق سحب جزيئات الماء المرتبطة مع الدنا،

		يضاف بحجم مماثل لحجم المحلول الذائب فيه الدنا.
5.	**Ethedium bromid**	صبغة لها قابلية التألق عند التعرض للأشعة الفوق بنفسجية ولها القابلية على الارتباط مع الحامض النووي المزدوج DNA
6.	**RNase**	أنزيم يقوم بتحليل جزيئات الحامض النووي الرنا RNA.
7.	**DNase**	أنزيم يقوم بتحليل جزيئات الحامض النووي الرنا DNA.
8.	**Ethanol 70 %**	يقوم بغسل جزيئات الدنا من خلال إزالة بقايا الأملاح المستخدمة في الاستخلاص.
9.	**Ethanol 100%**	يقوم بسحب جزيئات الدنا المرتبطة مع جزيئة الدنا مما يؤدي ذلك الى تحويل الدنا من الشكل الذائب الى الشكل الغير ذائب وبالتالي ترسيبه.
10.	**SDS**	منظف ايوني سالب الشحنة Anion Detergent يقوم بمسخ بروتينات الغشاء الخلوي ويعمل على فصل البروتينات المرتبطة مع جزيئة الدنا وتحليلها.
11.	**Sodium acetate**	احد الأملاح التي تستخدم في ترسيب ألدنا لان هذا الملح سريع الذوبان في الايثاول % ٧٠ مما يؤدي إلى إزالته بسهولة من ألدنا خلال الغسل مع الايثانول % ٧٠ .
12.	**NaCl**	يتأين إلى +Na و -Cl ، ايون الصوديوم الموجب الشحنة يرتبط مع ألدنا السالب الشحنة هذا يسمح لجزيئه ألدنا لتترسب في الكحول. بدون استخدام هذا الملح يبقى ألدنا سالب الشحنة وسوف يبقى في الطبقة المائية للمحلول.
13.	**Chloroform**	مذيب عضوي له صفة القطبية (صفة القطبية للمذيب : هو المذيب الذي يعمل على توزيع المحتويات الخلوية بين طورين عضوي ومائي)، عند إجراء عملية الطرد المركزي Centrifugation تتوزع الدهون والبروتينات وبقية المحتويات الخلوية في طور بيني Interphase أما

		الأحماض النووية فإنها تتواجد ضمن الطبقة المائية لقابليتها للذوبان في الماء.
14.	**Phenol**	مذيب عضوي يقوم بمسخ البروتينات، جزيئة البروتين تحتوي على بقايا كارهة للماء التي تتمركز في مركز الجزيئة، عندما يمزج المحلول الحاوي على البروتينات الذائبة مع الفينول، جزيئات الفينول تنتشر في مركز جزيئة البروتين مما يؤدي الى انتفاخها وأخيرا مسخها.
15.	**Isoamyl Alcohol**	يمنع تكوين الرغوة عند استخدام الكلوروفورم ويساعد على زيادة المساحة السطحية للكلوروفورم لإزالة البروتينات.
16.	**Proteinase K**	أنزيم يعمل على تحطيم بروتينات الغشاء الخلوي يستخدم بكثرة مع الخلايا الحيوانية والبكتريا السالبة الشحنة.
17.	**Sodium Perchlorate**	تزيل هذه المادة البروتينات الخلوية الناتجة من تحلل الأغشية الخلوية خلال الاستخلاص. تستخدم بتركيز عالي وتعمل على إزالة ال SDS والبروتينات الذائبة وتمنع البروتينات للترسب مع الدنا خلال عملية ترسيبه بالايثانول.
18.	**TE**	لإذابة ال DNA ، لتثبيط بقايا أنزيم ال DNase إن وجدت.
19.	**Ethanol 100%**	يقوم بترسيب ال DNA عن طريق سحب جزيئات الماء وبالتالي تحويل ال DNA من الشكل الذائب الى الشكل الغير ذائب مم يؤدي الى ترسيبه
20.	**Ethanol 70%**	لغسل عينة ال DNA من خلال إزالة بقايا الأملاح والشوائب الأخرى.
21.	**Liquid Nitrogen**	يعمل على تحطيم جدران الخلايا النباتية لأنه ذو درجة حرارة ١٧٦ تحت الصفر.
22.	**Mgcl2**	يحافظ على الأحماض النووية من تأثير الأنزيمات الحالة مثل أنزيم اللايسوزايم Lysozyme

23.	**Triton – X 100**	احد أنواع المنظفات المتعادلة Neutral detergent التي تقوم بإذابة البروتينات بدون مسخها.
24.	**β-Mercaptoethanol**	عامل اختزال قوي جدا يقوم بتكسير جسور السستين Systein residues للبروتينات مما يؤدي الى تغيير تركيبها.
25.	**PVP**	احد مكونات محلول الاستخلاص extraction المستخدم لاستخلاص الدنا من النباتات الغنية بالمركبات الفينولية حيث يساعد امتزاز (adsorption) هذه المركبات الفينولية.
٢٦.	**Lysozyme**	أنزيم يستخدم مع ال EDTA حيث يقوم بتكسير الجدار الخلوي او بتحليل الغشاء الخلوي للبكتريا.
٢7.	**Sarkosyl**	منظف ايوني سالب الشحنة يستخدم بدلا من ال SDS نتيجة لذوبانيته العالية في المحاليل ذات التركيز العالي اما ال SDS لا يذوب في المحاليل ذات التركيز العالي .
٢7.	**Ammonium acetate**	احد الأملاح التي تستخدم في ترسيب ألدنا ويفضل في الاستخدام لانه عالي الذوبان في الايثانول ومن السهل ازالته من الدنا نتيجة لتحلله الى ايونات ammonium و acetate . استخدام خلات الامونيوم Ammonium acetate يفضل على استخدام Sodium acetate لأنه يعمل على إزالة النكليوتيدات ثلاثية الفوسفات او الأحماض النووية المزدوجة الصغيرة (الأقل من (bp 30). بالإضافة إلى قدرة خلات الامونيوم على إزالة المنظفات وبعض الملوثات والتي تثبط الأنزيمات المستخدمة في تجارب إعادة ارتباط الدنا Recompenent DND .

الترحيل الكهربائي للدنا في هلام الاكاروز : Agarose Gel Electrophoresis of DNA

اكتشفت هذه التقنية في السبعينات من القرن الماضي وقد عوضت عن تقنية المحلول المتدرج الكثافة Ultra-Centrifugal Sucrose Gradient ، والتي تتضمن وضع محلول ألدنا فوق محلول متدرج الكثافة من السكروز ثم تجرى عملية نبذ مركزي فائق السرعة، بحيث تتكون حزم حسب تدرج كثافة السكروز حيث أن مرورها سيكون حسب أطوالها وأوزانها الجزيئية. من مساوئ هذه التقنية المتدرجة الكثافة هي صعوبة فصل القطع التي تكون متقاربة بالأطوال والأوزان الجزيئية واستخلاصها كما إن تنقية القطع من السكروز يحتاج إلى عملية طويلة لذلك تم استبعاد هذه الطريقة تماما" بعد إمكانية استخدام تقنية الترحيل الكهربائي. يمثل الفصل باستعمال الترحيل الكهربائي في الهلام احد أكثر التقنيات البسيطة والمهمة في فصل وتنقية وتعريف ألدنا والرنا. إن الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis طريقة قياسية سريعة وبسيطة لفصل وتشخيص وتنقية قطع ألدنا خلال مرورها ضمن الهلام وتستخدم:

١. لفصل مزيج من قطع الدنا DNA ، الرنا RNA ، البروتين Protein.

٢. لحساب الوزن الجزيئي للجزيئات المفصولة من الهلام مقارنة مع مؤشر Marker ذو وزن جزيئي معلوم.

أنواع الهلام المستخدم في الترحيل الكهربائي: Types of Gel Using in Gel Electrophoresis

١. هلام الأكاروز Agaros Gel Electrophoresis (AGE)

إن هلام الاكاروز المستخدم بشكل واسع في هذه التقنية عبارة عن سلسلة متشابكة من السكريات المتعددة المكونة من الكالكتوز ومشتقاته والمرتبطة مع بعضها بأواصر هيدروجينية لتكوين شبكة معقدة Complex Net تعتمد فتحاتها Pores على تركيز الاكاروز فكلما كان التركيز عاليا" كلما كانت الفتحات اصغر والعكس صحيح، يتضح من ذلك ان قابلية الهلام على فصل القطع تعتمد على تركيزه فكلما زاد التركيز كلما زادت قابلية الفصل. إن تركيز هلام الاكاروز يتراوح بين % 2 – 0.5 وبطول ١٢ سم ، والأكثر استخداما" هو % 1 – 0.7 والذي يستخدم لفصل قطع دنا كبيرة الوزن الجزيئي 20Kbp – 200bp.

٢. هلام اكريل امايد متعدد Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

هو عبارة عن ناتج ارتباط مادة الاكريل امايد المتبلورة مع مادة بز - اكريل امايد Bis-acrylamide لتكوين شبكة معقدة ذات ثقوب اصغر قطرا" من تلك الموجودة في هلام الاكاروز، ولهذا السبب فان هلام اكريل امايد متعدد أكثر ملائمة في فصل قطع ألدنا الأصغر والتي تتراوح بين 200 bp – 1 ، ويكون التركيز الأفضل للاكريل امايد متعدد هو ٧,٥% ولكن من مساوئ هذا النوع من الهلام (الطريقة) انه أصعب وذو كلفة عالية بالمقارنة مع الاكاروز.

هلام الأكاروز: Agaros Gel Electrophoresis (AGE)

ان مبدأ هذه العملية يعتمد على مرور الجزيئات خلال وسط (حقل) كهربائي يجهز بالشحنات السالبة من احد الأطراف وبالشحنات الموجبة من الطرف الأخر وبذلك سوف تحصل حركة دائرية للشحنات الكهربائية، بما ان جزيئة الدنا تملك الشحنة السالبة نتيجة لوجود مجموعة الفوسفات لذلك يجب ان تكون الحفر Wells التي ستوضع بها عينة الدنا من جهة القطب السالب لكي تتحرك جزيئة ألدنا باتجاه القطب الموجب نتيجة لانجذاب الشحنات السالبة نحو الموجبة مما يؤدي الى انفصالها حسب الوزن الجزيئي.

سوف نتناول بالتفصيل الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز وكما يأتي:

اولا"- المواد والأجهزة المطلوبة: Materials & Equipments Required

١. **الأجهزة** :

إن الأجهزة والأدوات المطلوبة لهذه التقنية تشمل الآتي:

ت	اسم الجهاز أو الأداة	المصطلح
١.	الميزان الحساس	Balance
٢.	الميكروويف	Microwave
٣.	مجهز القدرة	Power Supply
٤.	خزان الترحيل الكهربائي	Electrophoresis Tank
٥.	صينية (حوض) صب الهلام	Tray of Gel
٦.	جهاز الأشعة فوق البنفسجية	UV – Transilluminator
٧.	الة تصوير رقمية	Digital Camera
٨.	المشط	Comb
٩.	البوصلة	Compass
١٠.		Para film
١١.	الشريط الورقي اللاصق	Tape
١٢.	المقص	scissors
١٣.	الماصة الدقيقة	Micropipette
١٤.	نهايات الماصات الالكترونية	Tips

٢. المواد والمحاليل الكيميائية:

اما المواد والمحاليل الكيميائية المطلوبة فتشمل:

١. الاكاروز: Agaros

٢. دارئ الترحيل الكهربائي: Electrophoresis Buffer

والذي يسمى محلول (Tris Borate EDTA) TBE بقوة X10 ويتكون هذا المحلول من:

- ٠,٨٩ مولار Tris-base
- ٠,٨٩ مولار Boric acid
- ٠,٠٢ مولار EDTA pH 8

يحضر ٢٠٠ مل من محلول TBE X١٠ وذلك باخذ٢١,٦ غم من Tris-base مع ١١ غم من حامض البوريك و إذابتها في ١٦٠ مل ماء مقطر ، ثم إضافة ١٠ من محلول Na2EDTA بتركيز ٠,٤ مولار ويتم ضبط الـ pH الى٧,٨ بعدها أكمل الحجم إلى ٢٠٠مل بالماء المقطر ثم عقم بالموصدة. وعند كل استخدام يتم تخفيفه بإضافة تسعة أجزاء ماء مقطر للحصول على TBE X1 .

٣. محلول التحميل بقوة X10 : Loading buffer

حضر من إذابة ٠,٢٥ غم من صبغة البروموفينول الزرقاء في ٥٠% كليسيرول وأضيف محلول EDTA بتركيز ٦٠ ملي مولار ذو pH 8.0 وأكمل الحجم إلى ١٠٠مل بالماء المقطر. وتم حفظه على درجة ٤ م.

٤.صبغة بروميد الإثيديوم: Ethidium bromide :

تم تحضيرها بتركيز ١٠ ملغم/مل وذلك بإذابة ١٠٠ ملغم من مسحوق الصبغة في ١٠ مل من الماء المقطر وحفظت في قنينة معقمة في درجة حرارة ٤هم لحين الاستعمال. وحينها تمت إضافة ٤٠ مايكروليتر/لتر من الماء المقطر.

ثانيا"- العوامل المؤثرة على هجرة الدنا خلال هلام الاكاروز:

يتعمد جريان الدنا عبر الاكاروز في مجال كهربائي من القطب السالب الى القطب الموجب على عوامل كثيرة منها لا

١. الوزن الجزيئي للدنا:

يعتمد جريان جزيئات الدنا على اوزانها الجزيئية، فجزيئات الدنا قد تكون خطية (مستقيمة) Linear مفردة او مزدوجة او على شكل حلزون وهي بذلك تختلف في البنية والوزن الجزيئي. تهاجر جزيئات الدنا بسرعة تتناسب تناسبا" عكسيا" مع لوغارتم ١٠ لوزنها الجزيئي.

٢. تركيز الاكاروز:

تختلف سرعة رحيل الجزيئات المتشابهة بتغير تركيز الاكاروز المستعمل لعملية الفصل وبهذا فان علاقة ثابتة توجد بين لوغارتم سرعة الترحيل M وتركيز هلام الاكاروز T التي تتمثل بالعلاقة:

$$Logu = logm^{m}o - k_r - t$$

حيث تمثل m^o السرعة الحرة للترحيل، ويمثل ال k_r معامل الإعاقة Retardation Coefficient وهو ثابت يتعلق بعاملي خصوصية الهلام وحجم وشكل الجزيئات المرحلة. ولهذا فان استعمال هلام الاكاروز بتراكيز مختلفة يمكن تسخيره لتوضيح كثير من الاوزان الجزيئية للدنا كما موضح في الجدول التالي:

ت	كمية الاكاروز في الهلام %	قدرة الهلام على فصل جزيئات الدنا الخطية (كيلو قاعدة)
١,	0.3	5 – 60
٢,	٠,٦	1 – 20
٣,	٠,٧	0.8 – 10
٤,	٠,٩	0.5 – 7
٥,	١,٢	0.4 – 6
٦,	١,٥	0.2 – 4
٧,	٢	0.1 - 3

٣. الشكل البنائي للدنا:

تختلف أشكال ألدنا البنائية في سرعة جريانها في هلام الاكاروز. الشكل الدائري المغلق Closed Circular والشكل الدائري المشروخ Nicked Circular والشكل المستقيم Linear ذوات الأوزان الجزيئية المتشابهة تهاجر في تركيز معين من هلام الاكاروز بسرع مختلفة.

٤. كمية التيار الكهربائي:

تتناسب سرعة جريان جزيئات الدنا الخطية مع كمية الفولتية المستعملة للترحيل ومع زيادة كمية الفولتية الى درجة معينة فان جريان الجزيئات ذوات الاوزان الكبيرة ستزداد ولهذا فان قابلية الفصل بالاكاروز يمكن تقسيمها وتحسينها باستعمال تيار مقداره ٥ فولت / سم^{٢}.

٥. المحتوى النوعي للقواعد في الدنا ودرجة الحرارة:

لا يتأثر الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز بما يحتويه الدنا من قواعد نايتروجينية كما يحدث لو استعمل هلام الاكرلمايد، كما ان تغير درجة الحرارة لا يؤثر في سرعة الترحيل. يستعمل الترحيل بوضع افقي عادة لفصل جزيئات الدنا بواسطة هلام الاكاروز مما يوفر قدرة في استعمال تراكيز واطئة للاكاروز في الفصل.

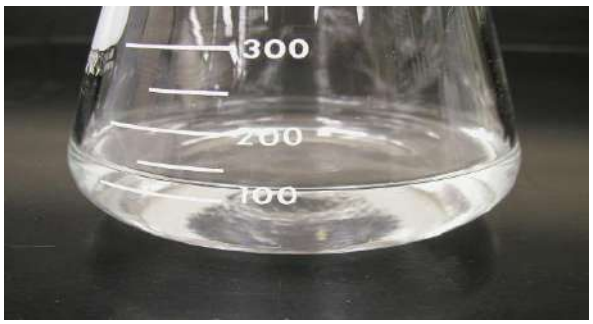
ثالثا"- طريقة العمل: Procedure

١. تحضير الاكاروز:

يحضر الهلام حسب سعة الصينية Tray الموجودة في جهاز الترحيل الكهربائي، وعادتا" يوزن ١ غم من الاكاروز ويوضع في دورق مخروطي ثم يضاف له ١٠٠ مل من دارئ Tris – Borate – EDTA (Buffer TBE) المحضر مسبقا"، وتتم الإذابة بواسطة الحرارة ويفضل استخدام جهاز أل Microwave ولمدة دقيقتين، يتم ملاحظة المحلول المتكون يجب أن يكون صافي وذو لون مائي، يترك لفترة ٥-٣ دقائق بدرجة حرارة الغرفة لتصل درجة حرارة المحلول إلى ٥٥ – ٥٠ درجة مئوية.

1.Weighting

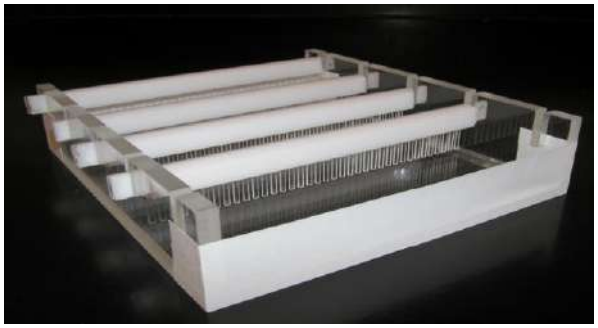
2. buffering

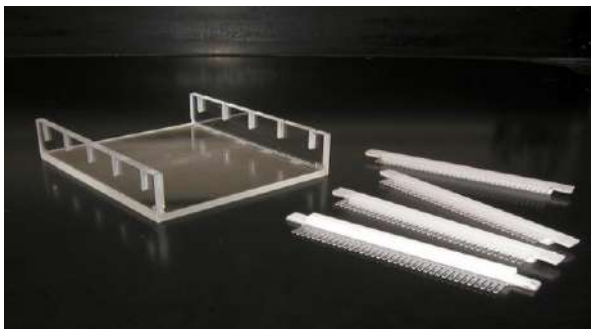


3. heating

2. تحضير الصينية:

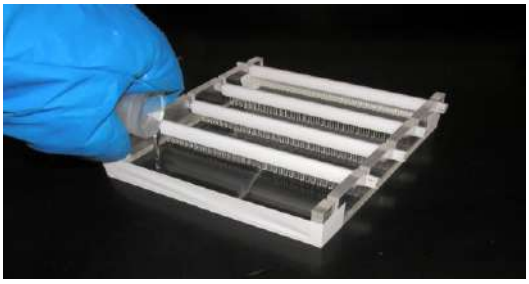
تحضر الصينية (الحوض) بربط الأطراف بشكل جيد وتوضع على سطح مستوي (المنضدة) ويتم موازنتها باستخدام البوصلة بوضعها في وسط الصينية، بعدها يوضع المشط Comb في احد أطراف الصينية وفي بعض الاحيان يستخدم اكثر من مشط في نفس الوقت.





٣. صب الهلام:

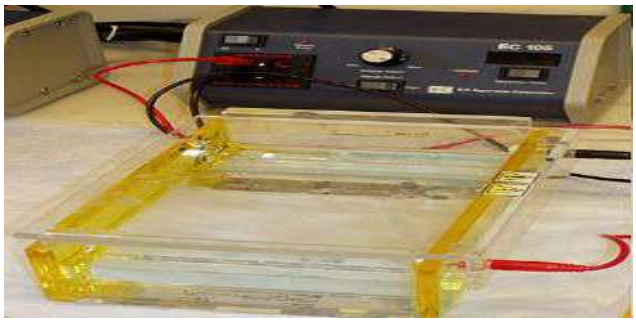
يصب الهلام في الصينية بهدوء ومن احد الأطراف لمنع تكون الفقاعات في الهلام وفي حال تكون الفقاعات يتم ازالتها مباشرة بواسطة نهاية ال Tip معقم ويترك ليتصلب، بعدما يتصلب يتم رفع المشط برفق وبطريقة عمودية.



٤. تحضير الخزان:

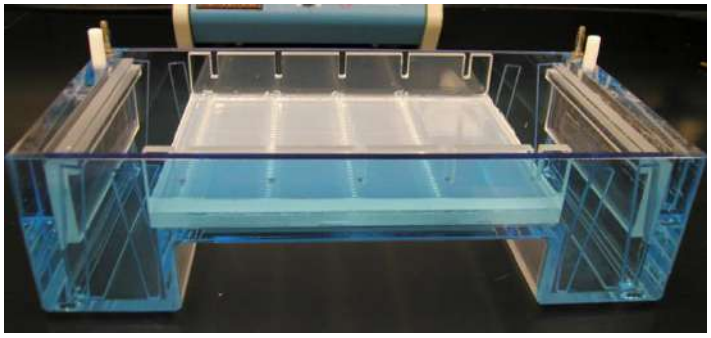
يوضع الخزان Tank على مكان مستوي ويتم موازنته بنفس طريقة موازنة حوض صب الهلام، يحتوي الخزان على قاعدة وسطية لوضع الحوض الحاوي على الهلام عليها، يملا الخزان بدارئ TBE بحيث يغمر الهلام

بالمحلول، يزود الخزان بغطاء والذي تربط معه الأقطاب السالبة والموجبة من جانب ومن الجانب الأخر تربط الأقطاب مع مجهز القدرة Power Supply.



٥. وضع الهلام داخل الخزان:

يوضع الحوض الحاوي على الهلام في الخزان في موقعه على أن يغطي محلول TBE الهلام ويجب ان تكون الحفر من جهة القطب السالب.

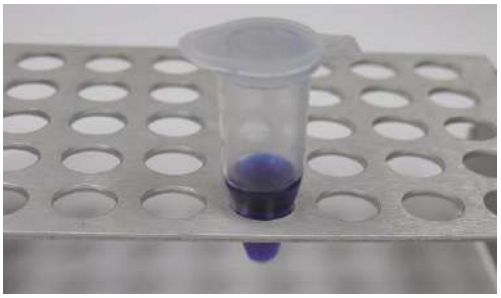


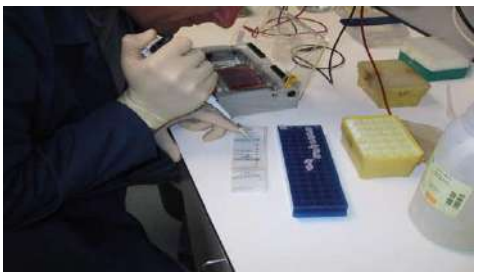
٦. تحضير نموذج ألدنا:

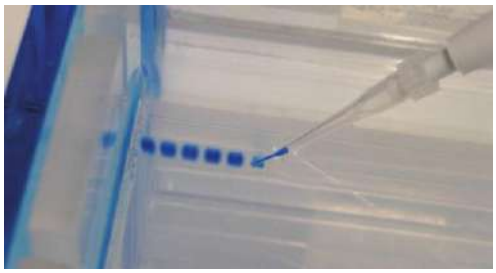
١. نأخذ قطعة من ال Para film وتوضع على سطح المنضدة وتثبت من أطرافها باستخدام الشريط الورقي اللاصق.

٢. يضاف دارئ التحميل Loading Buffer إلى ال Para film وبنسبة ٧ حجم من الدارئ إلى ٣ حجم من ألدنا لكل عينة وتخلط بشكل جيد باستخدام ال Tip المرتبط بالماصة الدقيقة Micropipette .

٣. يسحب المزيج بالكامل باستخدام نفس ال Tip وينقل الى الحفرة الموجودة في الهلام، مع مراعاة إعداد خريطة توضح مكان وضع العينات في الحفر لضمان عدم نسيان أماكن العينات.





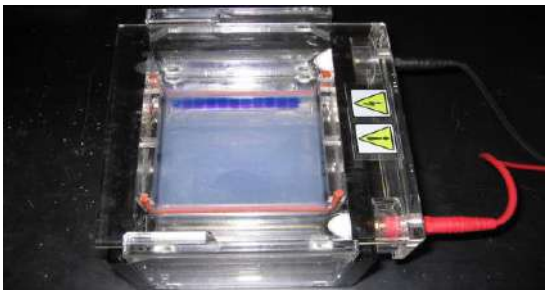


٧. تشغيل الجهاز:

١. يوضع غطاء الخزان بالشكل الصحيح لضمان الترحيل من القطب السالب الى القطب الموجب ويتم تشغيل مجهز القدرة Power Supply على فولتية ٤٥ V وامبيرية 180 Mili-amber ولمدة ١٥ دقيقة كمرحلة اولى.

٢. بعد انتهاء ال ١٥ دقيقة نسمع صوت المنبه من مجهز القدرة، نعدل الفولتية الى 80 V وامبيرية 180 Mili-amber ولمدة ساعة.

٣. يتم مراقبة سير الترحيل من خلال حركة صبغة ال Bromophenol blue كمؤشر (Indicator).

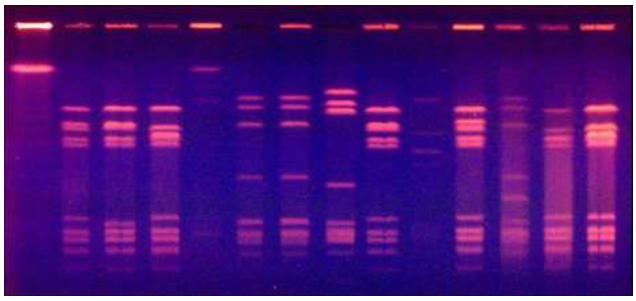


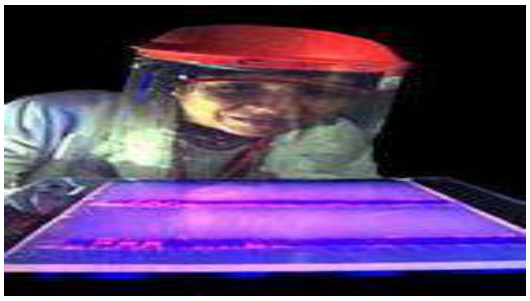
٨. تصبيغ الهلام:

١. بعد انتهاء وقت الترحيل الثاني يتم إطفاء مجهز القدرة أولا" ويرفع الغطاء بهدوء ثم يرفع الحوض الحاوي على الهلام برفق وينقل إلى حوض اخر يحتوي على صبغة ال Ethidium Bromide حيث يوضع الهلام داخل حوض صبغة برفق لضمان عدم تكسر قطعة الهلام ولمدة ساعة والحذر عند التعامل مع هذه الصبغة بارتداء القفازات السميكة لكونها مادة مسرطنة Carcinogenic. ان فائدة هذه الصبغة تتمثل في قدرتها على الارتباط بجزيئة الدنا المزدوجة الخيط اكثر من ارتباطها بالجزيئة المفردة الخيط (الرنا) .

٢. بعد انتهاء وقت التصبيغ ينقل الهلام برفق من حوض التصبيغ إلى مسرح Stage جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV – Transiluminator ويوضع غطاء الجهاز ثم يشغل.

٣. نتيجة لارتباط صبغة ال Ethidium Bromide مع جزيئات الدنا وقدرتها على التألق عند تعرضها للاشعة فوق البنفسجية نلاحظ وجود حزم بالون الوردي وهي حزم الدنا ، نقوم بالتقاط صورة للهلام باستخدام اي نوع من انواع الكاميرات لغرض توثيق هذه الصورة والاحتفاظ بها.





Extraction of Genomic DNA From Whole Blood.

The Instruments:

The following equipment's are used throughout this procedure:

No	Instrument
1.	Magnetic stirrer
2.	Shaking water bath
3.	Portable autoclave
4.	Microfuge
5.	pH-meter
6.	Analytical balance
7.	Water distiller
8.	Vortex

The chemicals:

The chemicals are used in this procedure:

No	Chemical
1.	Ammonium Chloride
2.	Potassium Hydrogen Carbonate
3.	SDS
4.	Di, sodium ethylene diamin tetra acetic acid (Na_2EDTA)
5.	Tris-Hcl
6.	Isopropanol
7.	Hydrochloric acid
8.	Ethanol
9.	Sodium chloride
10.	Sodium hydroxide
11.	Proteinase k

The Equipments:

The following instruments are used in this procedure**:**

No.	Equipment
1.	Rack for tubes
2.	Tips with different sizes
3.	Eppendorf tubes (1.5 size)
4.	Racks for Eppendorf tubes
5.	Micropipette (transfer pipette) (2-20µl, 10-100µl,100-1000µl)
6.	Biohazard Container
7.	Pipette

The Preparation of Buffers:

1. 10M NaOH :

It is prepared by dissolving **40g** of **NaOH** in 80ml of distill water the volume is made up to **100ml** by distill water.

2. R.B.Cs Lysis buffer :

It is prepared dissolving **4.145 g of Ammonium Chloride** , and **0.5 g of Potassium Hydrogen Carbonate**, and **0.185 g** of **Na2EDTA** in **450 ml** of distill water, the **pH** is adjust to (**7.6**) using (**10 N**) **NaOH**. The volume is made up to **500 ml** by distill water and sterilize by autoclaving and store **at 4^{o}C.**

3. 10% SDS Solution :

It is prepared by dissolving **100g** of **SDS** in **900ml** of distill water with heating at **68C** to assist dissolution adjust volume **to one liter**.

4. Cell Lysis Buffer:

It is prepared dissolving **1.576 g of Tris - HCL** , and **0.744 g of Na2EDTA**, and **2.922 g** of **NaCl** in **450 ml** of distill water, the **pH** is adjust to (**7.4**) using (**10 N**) **NaOH**. The volume is made up to **500 ml** by distill water and sterilize by autoclaving and store **at 4^{o}C.**

5. **Proteinase k (20mg/ml):**

   It is prepared by dissolving 20 mg of Proteinase k in 1 ml of distill water mixing well and store at -20 ^{o}C.

6. **5.3 M NaCl:**

   It is prepared by dissolving 77.44 g of in 250 ml of distill water mixing well and store at Room Temperature.

7. **Ethanol (70%):**

   comprise of **70 ml** absolute ethanol and **30 ml** of distill water.

8. **Isopropanol:**

   Ready to use.

The Procedure:

1. **300 µL** of the thaw or fresh blood sample , is mixed well with **900 µL** of **2X lyses buffer** (**Buffer A**) in a sterile Eppendorf tube, by inverting several times and the mixture is left on ice or **0^{o}C** for **15 minutes** inverting occasionally**.**
2. The mixture is then centrifuge in a bench centrifuge at **10.000 rpm** for **10 minutes** to obtain a nuclear pellet.
3. Add a further **600 µL** of **Buffer A**, mix vigorously and centrifuge at **10.000 rpm** for **5 minutes** (this step is necessary when the cell pellet remains red or brown after the first spin)**.**
4. To the remaining white pellet, **500 µL** of **(Buffer B)** was added, and followed by **50 µL** of **10% SDS**, mixed by vortexing vigorously for 1 min until the mixture was re-suspended and well dissolved by gentle pipeting**.**
5. To Latter mixture **10 µL** of fresh, refrigerated **Proteinase k solution** (20mg/ml) was added and the tubes mixed well by inverting several times and incubated in a water bath at 55 C° for 90 min, gently invert the tubes a few times during incubation.
6. Following incubation the tubes were placed on ice to cool for 2-5 minutes, **500 µL** of **5.3 M Nacl** was added and vortex for 1 minutes, followed by centrifugation at **15.000 rpm** for **5 minutes** at room temperature.

7. The supernatant is then removed to another Eppendorf tube and **equal volume** of **cold isopropanol** was added.
8. The Eppendorf tube left at **0°C for 1–5 minutes.**
9. The tubes were inverted **5-6 times** gently **to precipitated DNA**, then centrifuged **at 10.000 rpm** for **5 minutes**. The supernatant from this last step discarded and **ethanol (70%) was added**, again tubes centrifuged **10.000 rpm** for **5 minutes**.
10. The supernatant discarded and **200-300 µL** of distil water was added to re-suspended (dissolved) **DNA**.
11. The stock **DNA** is kept frozen at **(-20°C)** until use.

Rapid Extraction of High Quality DNA from Whole Blood

The Instruments:

The following equipment's are used throughout this procedure:

No	Instrument
1.	Magnetic stirrer
2.	Shaking water bath
3.	Portable autoclave
4.	Microfuge
5.	pH-meter
6.	Analytical balance
7.	Vortex

The chemicals:

The chemicals are used in this procedure:

No	Chemical
1.	sucrose
2.	$MgCL_2$
3.	SDS
4.	Triton X-100
5.	Di, sodium ethylene diamin tetra acetic acid (Na_2EDTA)
6.	Tris-Hcl
7.	Sodium citrate
8.	Hydrochloric acid
9.	Ethanol
10.	Sodium hydroxide

The Equipments:

The following instruments are used in this procedure**:**

No.	Equipment
1.	Tips with different sizes
2.	Eppendorf tubes (1.5 size)
3.	Racks for Eppendorf tubes
4.	Micropipette (transfer pipette) (2-20µl, 10-100µl,100-1000µl)
5.	Biohazard Container
6.	Pipette

Blood collection:

Blood should be collected in EDTA-containing vacutainer tubes. As will all body fluids, blood represents a potential biohazard, thus care should be taken in all steps requiring

handling of blood. If the subject is from a known high-risk category, additional precautions may be required. Blood samples can be stored at room temperature for DNA extraction within the same working day or at refrigerator for later uses.

Standard chemicals:

This method uses standard chemicals that can be obtained from any major supplier; we used chemicals supplied by Sigma Co. as follow:

1. **EDTA (0.5 M), pH 8.0:**

   Add 186.1 gr of anhydrous EDTA to 800 ml of distilled water. Adjust pH to 8.0 with NaOH pellets. Make up to 1 liter with distilled water. Autoclave at 15 p.s.i. for 15 min.

2. **1 M Tris-HC1, pH 7.6:**

   Dissolve 121.1 gr of Tris base in 800 ml of distilled water. Adjust pH with concentrated HCl. Allow mixture to cool to room temperature before finally correcting pH. Make up to 1 liter with distilled water. Autoclave at 15 p.s.i. for 15 min.

3. **Red blood cell lysis buffer:**

   0.01 M Tris-HCl pH 7.6, 320 mM sucrose, 5 mM MgC12, 1% Triton X 100.

   Add 10 ml of 1 M Tris, 109.54 gr of sucrose, 1.01 gr $MgC1_2$, adjust pH to 8.0 and finally add 10 ml of Triton X-100 to 800 ml of distilled water, and make up to 1 liter with distilled water. Autoclave at 15 p.s.i. for 10 min. Sugars at high temperature can cause caramelization (browning), which degrades the sugars [5].

4. **Nucleic lysis buffer:**

   0.01 M Tris-HC1, 11.4 mM sodium citrate, 1 mM EDTA, 1 % sodium dodecyl sulphate (SDS).

   Take 10 ml of 1 M Tris-HC1 (pH 7.6), 3.75 gr of anhydrous EDTA (pH 8.0), 10 gr SDS, 2.94 gr of sodium citrate, and adjust pH to 8.0. Make up to 1 liter with distilled water. Autoclave 15 min at 15 p.s.i.

5. **TE Buffer, pH 8.0:**

Take 5 ml of 1 M Tris-HCl, pH 7.6, 2 mL of 0.5 M EDTA, pH 8, and make up to 1 liter with distilled water. Adjust pH to 8.0 and autoclave 15 min at 15. p.s.i.

6. **Chloroform prechilled to 4°C.**
7. **Ethanol (100%) prechilled to -20°C.**

Procedure of DNA Extraction:

1. Before starting DNA extraction, liquid blood venogects should be shake gently by rotating blood mixer (vortex).

2. Pour 500 µl of blood into a 1.5 ml eppendorf tube and add 1000 µl of red cell lysis buffer. Shaking microfuge tube gently for 3 min (up to homogenizing), then spin for 5 minutes at 7000 rpm.

3. Discard supernatant and repeat steps 1-3 two or three more times to remove hemoglobin. It is important to breakdown the pellet by vortexing and rinses it well in red blood cell lysis buffer in order to clean the white blood cells from residual of hemoglobin.

4. Placing the tube on tissue paper for few seconds downward. Be careful from cross-contamination between different samples.

5. Add 400 µl of nucleic lysis buffer to eppendorf tube. **Note**: if the pellet formed, you must pipette the pellet up to dissolve it.

6. Place tube in water bath for **15** min **at 55ºC**.

7. Allow to cool to room temperature.

8. Add 100 µl of saturated 5M NaCl and 600 µl of ice-cold chloroform chloroform to eppendorf tube and mix on a rotating blood mixer at room temperature for **15** min then spin it for 5 minutes at 7000 rpm.

9. Transfer 400 µl of supernatant to a new 1.5 ml tube.

10. Add 800 µl of cold (-20°C) absolute Ethanol and shake it gently then vortex it. DNA should appear as a mucus-like strand in the solution phase.

11. Spin the microfuge tube for one minute at 12000 rpm to precipitate, then discard supernatant carefully and let tube be completely dried in room temperature (Place Eppendorf tube downward on the tissue paper).

12. Add 50µl of TE to it then vortex; keep eppendorf tube of DNA in 4°C or -20°C for later uses. We routinely use about one µl per PCR reaction without adverse affects. DNA can be quantified and diluted to a working concentration at this point or simply use 1 µl per PCR reaction. We expect that the yield of this procedure be 100 to 300 ng/µl, DNA. Using the above method, high quality DNA samples from a sheep population were extracted for gene mapping studies.

Extraction of Genomic DNA From Whole Blood:By Sodium Chlorate:

The Instruments:

The following equipment's are used throughout this procedure:

No	Instrument
1.	Magnetic stirrer
2.	Shaking water bath
3.	Portable autoclave
4.	Microfuge
5.	pH-meter
6.	Analytical balance
7.	Water distiller
8.	Vortex

The Chemicals:

The chemicals are used in this procedure:

No	Chemical
1.	Sodium hydroxide
2.	Sodium Perchlorate
3.	SDS
4.	Di, sodium ethylene diamin tetra acetic acid (Na_2EDTA)
5.	Tris-Hcl
6.	Chloroform
7.	Ethanol
8.	Sodium chloride

The Equipments:

The following instruments are used in this procedure**:**

No.	Equipment
1.	Rack for tubes
2.	Tips with different sizes
3.	Eppendorf tubes (1.5 size)
4.	Racks for Eppendorf tubes
5.	Micropipette (transfer pipette) (2-20µl, 10-100µl,100-1000µl)
6.	Biohazard Container
7.	Pipette

The Preparation of Buffers:

1. Red blood cell lysis buffer: 10mM Tris-HCl, 320 mM sucrose, 5 mM MgC12, 1% Triton X 100.

It is prepared by dissolving 0.157 g of Tris-HCl, 10.95g of sucrose and 0.1 g of $MgCl_2$ in 80 ml of distill water, adjust the pH to 8.0 and 1 ml of Triton X-100 was added, finally the volume is made up to 100 ml by the distill water and sterilize by autoclave at

15 p.s.i. for 10 min. Sugars at high temperature can cause caramelization (browning), which degrades the sugars.

2. 10 M NaOH :

It is prepared by dissolving **40 g** of **NaOH** in 80ml of distill water the volume is made up to **100 ml** by distill water.

3. Cell Lysis Buffer:

0.4 M Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.06 M EDTA, 10 % sodium dodecyl sulfate (SDS), adjust pH to 8.

It is prepared by dissolving 6.3 g of Tris-HCL and 2.23 g of Na2EDTA and 0.88 g of NaCl in 80 ml of distill water, the pH is adjust to (8) using (10 N) NaOH. The volume is made up to 100 ml with distill water. Sterilize by autoclaving and add 10 g of SDS.

4. 5 M Sodium Perchlorate:

Dissolve 7 g of sodium perchlorate in 8 mL distilled water, make up to 10 mL.

5. Chloroform prechilled to 4°C.

6. Ethanol (100%) prechilled to -20°C.

7. Ethanol (70%):

comprise of 70 ml absolute ethanol (100%) and 30 ml of distill water.

The Procedure:

1. Place **300 µL** whole blood in a 1.5-mL Eppendorf tube, add **1200 µL** reagent A.

2. Mix on a rolling or rotating blood mixer for **5 min** at **room temperature**.

3. Centrifuge at **10,000** rpm for **5 min** at room temperature.

4. Discard supernatant without disturbing cell pellet. Remove remaining moisture by inverting the tube and blotting onto tissue paper.

5. Re-suspend pellet in **750 µL** of reagent A by vortexing for **30 seconds** at medium speed. Centrifuge at **10,000** rpm for **5 minutes**.

6. Add **500 µL** reagent B and vortex briefly to resuspend the cell pellet.

7. Add **100 µL** of 5*M* sodium perchlorate , mix by inverting tube several times.

8. Place tube in water bath for **60**min **at 65ºC**.

9. Allow to cool to room temperature.

10. Add **700 µL** ice-cold chloroform. Then mix on a rotating mixer for **30 - 60 min**.

11. Centrifuge at **10,000** rpm for 5 minutes.

12. Transfer upper phase into a clean Eppendorf tube using a sterile pipet.

13. Add equal volume from ice-cold ethanol and invert gently to allow DNA to precipitate**.** Using a freshly prepared flamed Pasteur pipet, spool the DNA onto the hooked end, transfer to a 1.5-mL Eppendorf tube and allow to air-dry , Or Centrifuge at 10,000 rpm for 5 minutes discard the supernatant.

14. Wash the pellet by add **500 µL** of **70 %** ethanol. Centrifuge at **10,000** rpm for **10** minutes.

15. Resuspend in **200 µL** TE buffer.

Extraction of Genomic DNA From Animal Tissue:

(Working with Proteinase k)

The Instruments:

The following equipment's are used throughout this procedure:

No	Instrument
1.	Magnetic stirrer
2.	Shaking water bath
3.	Portable autoclave
4.	Microfuge
5.	pH-meter
6.	Analytical balance
7.	Water distiller
8.	Vortex

The chemicals:

The chemicals are used in this procedure:

No	Chemical
1.	Sodium hydroxide
2.	Proteinase k
3.	SDS
4.	Di, sodium ethylene diamin tetra acetic acid (Na_2EDTA)
5.	Tris-Hcl
6.	Isopropanol
7.	Hydrochloric acid
8.	Ethanol
9.	Sodium chloride

The Equipments:

The following instruments are used in this procedure**:**

No.	Equipment
1.	Tips with different sizes
2.	Eppendorf tubes (1.5 size)
3.	Glass centrifuge tubes
4.	Racks for Eppendorf tubes
5.	Micropipette (transfer pipette) (2-20µl, 10-100µl,100-1000µl)
6.	Biohazard Container
7.	Pipette
8.	Petri dishes
9.	

The Preparation of Buffers:

1. 10M NaOH :

It is prepared by dissolving **40g** of **NaOH** in 80ml of distill water the volume is made up to **100ml** by distill water.

2. 10% SDS Solution :

It is prepared by dissolving **100g** of **SDS** in **900ml** of distill water with heating at **68C** to assist dissolution adjust volume **to one liter**.

3. Cell Lysis Buffer:

It is prepared dissolving **1.576 g of Tris - HCL** , and **0.744 g of Na2EDTA**, and **2.922 g** of **NaCl** in **450 ml** of distill water, the **pH** is adjust to (**7.4**) using (**10 N**) **NaOH**. The volume is made up to **500 ml** by distill water and sterilize by autoclaving and store **at 4^{o}C.**

4. Proteinase k (20mg/ml):

It is prepared by dissolving 20 mg of Proteinase k in 1 ml of distill water mixing well and store at -20 ^{o}C.

5. **5.3 M NaCl:**

It is prepared by dissolving 77.44 g of in 250 ml of distill water mixing well and store at Room Temperature.

6. **Ethanol (70%):**

comprise of **70 ml** absolute ethanol and **30 ml** of distill water.

7. **Isopropanol:**

Ready to use.

The Procedure:

1. Place the Petri dish in an ice bucket filled with dry ice, this is a good way to precool the Petri dish before adding the tissue sample.
2. The frozen Animal tissue sample is thawed, put **10-20 mg** of each tissue in a Petri dish containing **100 µL** of cell lysis buffer and chop it into a very small pieces with sterile scalpel blade, then transfer the mixture to sterile Eppendorf tube.
3. To the mixture, **400 µL** of **(Buffer B)** was added, and followed by **50 µL** of **10% SDS**, mixed by vortexing vigorously for 1 min until the mixture was re-suspended and well dissolved by gentle pipeting**.**
4. To Latter mixture **10 µL** of fresh, refrigerated **Proteinase k solution** (20mg/ml) was added and the tubes mixed well by inverting several times and incubated in a water bath at 55 C° for 90 min, gently invert the tubes a few times during incubation.
5. Following incubation the tubes were placed on ice to cool for 2-5 minutes, **500 µL** of **5.3 M Nacl** was added and vortex for 1 minutes, followed by centrifugation at **14.000 rpm** for **5 minutes** at room temperature.
6. The supernatant is then removed to another Eppendorf tube and **equal volume** of **cold isopropanol** was added.
7. The Eppendorf tube left at **-20^{o}C for 5 minutes.**

8. The tubes were inverted **5-6 times** gently **to precipitated DNA**, then centrifuged **at 14.000 rpm** for **3 minutes**. The supernatant from this last step discarded and **ethanol (70%) was added**, again tubes centrifuged **14.000 rpm** for **3 minutes**.
9. The supernatant discarded and **200-300 µL** of distil water was added to re-suspended (dissolved) **DNA**.
10. The stock **DNA** is kept frozen at **(-20^{o}C)** until use.

Extraction of Genomic DNA From Animal Tissue:

(Working with Sodium Chlorate)

The Instruments:

The following equipment's are used throughout this procedure:

No	Instrument
1.	Magnetic stirrer
2.	Shaking water bath
3.	Portable autoclave
4.	Microfuge
5.	pH-meter
6.	Analytical balance
7.	Water distiller
8.	Vortex

The Chemicals:

The chemicals are used in this procedure:

No	Chemical
1.	Sodium hydroxide
2.	Sodium Perchlorate
3.	SDS
4.	Di, sodium ethylene diamin tetra acetic acid (Na_2EDTA)
5.	Tris-Hcl
6.	Chloroform
7.	Ethanol
8.	Sodium chloride

The Equipments:

The following instruments are used in this procedure**:**

No.	Equipment
1.	Rack for tubes
2.	Tips with different sizes
3.	Eppendorf tubes (1.5 size)
4.	Racks for Eppendorf tubes
5.	Micropipette (transfer pipette) (2-20µl, 10-100µl,100-1000µl)
6.	Biohazard Container
7.	Pipette

The Preparation of Buffers:

1. 10 M NaOH :

It is prepared by dissolving **40 g** of **NaOH** in 80ml of distill water the volume is made up to **100 ml** by distill water.

2. Cell Lysis Buffer:

0.4 M Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.06 M EDTA, 10 % sodium dodecyl sulfate (SDS), adjust pH to 8.

It is prepared by dissolving 6.3 g of Tris-HCL and 2.23 g of Na2EDTA and 0.88 g of NaCl in 80 ml of distill water, the pH is adjust to (8) using (10 N) NaOH. The volume is made up to 100 ml with distill water. Sterilize by autoclaving and add 10 g of SDS.

3. 5 M Sodium Perchlorate:

Dissolve 7 g of sodium perchlorate in 8 mL distilled water, make up to 10 mL.

5. Chloroform prechilled to 4°C.

6. Ethanol (100%) prechilled to -20°C.

7. Ethanol (70%):

comprise of 70 ml absolute ethanol (100%) and 30 ml of distill water.

The Procedure:

1. The frozen Animal tissue sample is thawed, put **10-20 mg** of each tissue in a Petri dish containing **100 µL** of cell lysis buffer and chop it into a very small pieces with sterile scalpel blade, then transfer the mixture to 2 mL sterile Eppendorf tube.

2. To the mixture, **500 µL** of **(Buffer B)** was added, mixed by vortexing vigorously for 1 min until the mixture was re-suspended and well dissolved**.**

3. Add **100 µL** of 5*M* sodium perchlorate , mix by inverting tube several times.

3. The Eppendorf tubes placed in water bath for **90** min at 65ºC, gently invert the tubes a few times during incubation.

4. Allow for 5 min to cool to room temperature.

5. Add **700 µL** ice-cold chloroform. Then mix on a rotating mixer for **30 - 60 min**.

6. Centrifuge at **10,000** rpm for **5** minutes.

7. Transfer upper phase into a clean Eppendorf tube using a sterile pipet.

8. Add equal volume from ice-cold ethanol and invert gently to allow DNA to precipitate**.**

9. Centrifuge at 10,000 rpm for 5 minutes, discard the supernatant.

10. Wash the pellet by add **500 µL** of **70 %** ethanol. Centrifuge at **10,000** rpm for **10** minutes.

11. Resuspend in **200 µL** TE buffer.

A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for PCR analysis

Jafar Amani[1], Roohallah Kazemi[2], Ali Reza Abbasi[2], Ali Hatef Salmanian[1]

IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY, Vol. 9, No. 1, January 2011

The Instruments:

The following equipment's are used throughout this procedure:

No	Instrument
1.	Magnetic stirrer
2.	Shaking water bath
3.	Portable autoclave
4.	Microfuge
5.	pH-meter
6.	Analytical balance
7.	Water distiller

The Equipments:

The following instruments are used in this procedure**:**

No.	Equipment
1.	Tips with different sizes
2.	Eppendorf tubes (1.5 size)
3.	Racks for Eppendorf tubes
4.	Micropipette (transfer pipette) (2-20µl, 10-100µl,100-1000µl)
5.	Biohazard Container
6.	Pipette

The chemicals:

The chemicals are used in this procedure:

No	Chemical
1.	Tris-Hcl
2.	Sodium chloride
3.	Di, sodium ethylene diamin tetra acetic acid (Na2EDTA)
4.	SDS
5.	Chloroform
6.	Isoamyl Alcohol
7.	Isopropanol
8.	Liquid Nitrogen.

The Preparation of Buffers:

1. Extraction Buffer 25 ml:

It is prepared by dissolving **1.0 g** of **CTAB, 7.87 g** of **Tris-HCL** and **9.3 g of Na2EDTA,** and **14.62 g** of **NaCl** in **40 ml** of distill water. Adjust all to **pH** (**8**) using NaOH and make up volume to **50 ml** with distill water, sterilize by autoclaving.

2. TE buffer: pH 8.0:

Take 5 ml of 1 M Tris-HCl, pH 7.6, 2 mL of 0.5 M EDTA, pH 8, and make up to 1 liter with distilled water. Adjust pH to 8.0 and autoclave 15 min.

3. Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) :

To prepare **100 ml** of this mixture **96ml** of **chloroform** is added to **4ml** of **Isoamyl alcohol** and stored in a dark bottle at **4C** until use.

4. Isopropanol : Ready to use.

The Procedure:

1. In the present study, samples for PCR analysis (usually leaf tissue) were collected into a sterile eppendorf tube. The tissue was softened for 15 s at room temperature, using a sterile tip as grinder, without any buffer.

2. 500 µl of extraction buffer (200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) (Edwards *et al*., 1991) was added to the tube and mixed for 5 s.
3. In order to disrupt plant cells completely, the tube was placed in a water bath at 60°C for 60 min.
4. Subsequently, an equal volume of chloroform: iso-amyl alcohol (24:1) was added to the sample, which was then mixed and centrifuged at 15,000 g for 5 min, at 4°C.
5. The aqueous supernatant was transferred to a new eppendorf tube, to which an equal volume of isopropanol was added, mixed and incubated at -20°C for 30 min.
6. Following centrifugation at 15,000 g for 5 min, the pellet was dried and dissolved in (100 µl) TE buffer.
7. Finally, for precipitation of starch and other insoluble polysaccharides, the tube was placed on ice for 5 min and centrifuged at 15000 g for 2 min; the resulting white pellet was mostly starch (Deshmukh *et al*., 2007). The supernatant containing the DNA was stable at 4 °C.

Plant Genomic DNA Extraction using CTAB:

The Instruments:

The following equipment's are used throughout this procedure:

No	Instrument
1.	Magnetic stirrer
2.	Shaking water bath
3.	Portable autoclave
4.	Microfuge
5.	pH-meter
6.	Analytical balance
7.	Water distiller
8.	Vortex

The chemicals:

The chemicals are used in this procedure:

No	Chemical
1.	CTAB (Hexadecyl trimethyl-ammonium bromide)
2.	Sodium chloride
3.	PVP (polyvinyl pyrrolidone (vinylpyrrolidine homopolymer)
4.	Di, sodium ethylene diamin tetra acetic acid (Na_2EDTA)
5.	Tris-Hcl
6.	Chloroform
7.	Ethanol (ice cold).
8.	Sodium chloride
9.	Iso Amyl Alcohol
10.	Liquid Nitrogen.
11.	Ammonium Acetate

The Equipments:

The following instruments are used in this procedure**:**

No.	Equipment
1.	Rack for tubes
2.	Tips with different sizes
3.	Eppendorf tubes (1.5 size)
4.	Glass centrifuge tubes
5.	Racks for Eppendorf tubes
6.	Micropipette (transfer pipette) (2-20µl, 10-100µl,100-1000µl)
7.	Biohazard Container
8.	Pipette

The Preparation of Buffers:

1. CTAB buffer 50 ml:

It is prepared by dissolving **1.0 g** of **CTAB, 7.87 g** of **Tris-HCL** and **9.3 g of Na2EDTA,** and **14.62 g** of **NaCl** in **40 ml** of distill water. Adjust all to **pH** (**8**) using NaOH and make up volume to **50 ml** with distill water, sterilize by autoclaving.

5. Ethanol (70%):

comprise of **70 ml** absolute ethanol (100%) and **30 ml** of distill water.

6. Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) :

To prepare **100 ml** of this mixture **96ml** of **chloroform** is added to **4ml** of **Isoamyl alcohol** and stored in a dark bottle at **4C** until use.

7. 7.5M Ammonium acetate :

It is prepared by dissolving **5.782g** Ammonium acetate in **10ml** distilled water sterilize by filtration (micropore filter) with **0.20 µm**.

8. Absolute Ethanol (ice cold): Ready to use.

The Procedure:

1. Grind 100 mg of plant tissue to a fine paste in approximately 500 µl of CTAB buffer.

2 . Transfer CTAB/plant extract mixture to a Eppendorf tube.

3. Incubate the CTAB/plant extract mixture for about ٦0 min at 55ºC in a recirculating water bath.

4. After incubation, to each tube add 250 µl of Chloroform : Iso Amyl Alcohol (24:1) and mix the solution on a rotating mixer for 5 min. After mixing, spin the tubes at 14000 rpm for 5 min.

5. Transfer the upper aqueous phase only (contains the DNA) to a clean microfuge tube.

6. To each tube add 50 µl of 7.5 M Ammonium Acetate followed by 500 µl of ice cold absolute ethanol.

7. Invert the tubes slowly several times to precipitate the DNA. Generally the DNA can be seen to precipitate out of solution. Alternatively the tubes can be placed for 10 min at -20 ºC after the addition of ethanol to precipitate the DNA.

Following precipitation, the DNA can be pipetted off by slowly rotating/spinning a tip in the cold solution. The precipitated DNA sticks to the pipette and is visible as a clear thick precipitate.

8.To wash the DNA, transfer the precipitate to new microfuge tube containing 500 µl of ice cold 70 % ethanol and slowly invert the tube. Repeat. ((alternatively the precipitate can be isolated by spinning the tube at 13000 rpm for a 3 min to form a pellet. Remove the supernatant and wash the DNA pellet by adding two changes of ice cold 70 % ethanol)).

9. After the wash, spin the DNA into a pellet by centrifuging at 13000 rpm for 3 min. Remove all the supernatant and allow the DNA pellet to dry (approximately 15 min). Do not allow the DNA to over dry or it will be hard to re-dissolve.

10.Resuspend the DNA in sterile DNase free water (approximately 50-400 µl H2O; the amount of water needed to dissolve the DNA can vary, depending on how much is isolated).

11. After resuspension, the DNA is incubated at 65 ºC for 20 min to destroy any DNases that may be present and store at 4ºC.

DNA Extraction by Modified CTAB Extraction Method According to Moller *et al* :

Global Journal of Molecular Scicnces 5 (1): 37-12,2010 India.

ISSN 1990-92-11 IDOSI Publications. 2010

V. Karthikeyan, [2]S. Patharajan, [3]P. Palani. [l]D. Spadaro, ***•'ML.*** Gullino and [1]A. Garibaldi.

The Instruments:

The following equipment's are used throughout this procedure:

No	Instrument
1.	Magnetic stirrer
2.	Shaking water bath
3.	Portable autoclave

4.	Microfuge
5.	pH-meter
6.	Analytical balance
7.	Water distiller
8.	Vortex

The Equipments:

The following instruments are used in this procedure**:**

No.	Equipment
1.	Tips with different sizes
2.	Eppendorf tubes (1.5 size)
3.	Glass centrifuge tubes
4.	Racks for Eppendorf tubes
5.	Micropipette (transfer pipette) (2-20µl, 10-100µl,100-1000µl)
6.	Biohazard Container
7.	Pipette

The chemicals:

The chemicals are used in this procedure:

No	Chemical
1.	Tris-Hcl
2.	Di, sodium ethylene diamin tetra acetic acid (Na_2EDTA)
3.	SDS
4.	Proteinase K
5.	CTAB (Hexadecyl trimethyl-ammonium bromide)
6.	Sodium chloride
7.	Chloroform
8.	Isoamyl Alcohol

9.	Ethanol (ice cold).
10.	Isopropanol
11.	sodium acetate
12.	RNAse A

The Preparation of Buffers:

1. Lysis Buffer: **10 ml**

It is prepared by dissolving **0.156 g** of **Tris-HCL** and **0.04 g of Na2EDTA,** and **200 m g** of **SDS** in **60 ml** of distill water. Adjust all to **pH** (**8**) using NaOH and make up volume to **10 ml** with distill water, sterilize by autoclaving.

2. Proteinase k (20mg/ml):

It is prepared by dissolving 20 mg of Proteinase k in 1 ml of distill water mixing well and store at -20 ^{o}C.

3. 5 M NaCl:

4. It is prepared by dissolving 2.92 g of in 10 ml of distill water mixing well and store at Room Temperature.

5. 10% CTAB Solution :

It is prepared by dissolving **10g** of **CTAB** in **10ml** of distill water with heating at **68°C** to assist dissolution.

6. Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) :

To prepare **100 ml** of this mixture **96ml** of **chloroform** is added to **4ml** of **Isoamyl alcohol** and stored in a dark bottle at **4C** until use.

7. Isopropanol:

Ready to use.

8. Ethanol (70%):

comprise of **70 ml** absolute ethanol (100%) and **30 ml** of distill water.

9. RNAse A

It is prepared by dissolving l0mg of RNAse A in **1ml** of distill water.

Procedure:

1. 50mg of fungal mycelia was scraped from l0 days old PDA cultures, manually ground in 2 ml of microfuge tubes with micro pestle adding 500 uL of pre-warmed (60°C) TES lysis buffer (100mM Tris pH 8.0; l0mMEDTA pH 8.0; 2% SDS).
2. 5µL (100ug) of proteinase K 20mg/ml were added to the ground material, incubated in 60°C for 60 min.
3. 140uL of 5M NaCl and 64 uL of 10% (w/v) of CTAB were added to the suspension incubated at 65°C for 10 min.
4. DNAs were extracted by adding equal vol. of chloroform: isoamylalcohol (24:1) centrifuged at 14000xg/ l0min.
5. DNA was precipitated by adding 0.6 vol (200 uL)of cold isopropanol and 0.1 vol (100 uL)of 3M sodium acetate pH 5.2 and maintained at -20°C,
6. Centrifuged and washed twice with 70% ethanol suspended in l00ul of TE (l0mM Tris pH 8.0; 1mM EDTA pH 8.0).
7. RNA was digested by adding l0mg/ml of RNAse A and incubating at 37°C for 45min and stored -20°C for further use.

A Simple and Rapid Method for the Preparation of Gram Negative Bacterial Genomic DNA:

The Instruments:

The following equipment's are used throughout this procedure:

No	Instrument
1.	Magnetic stirrer
2.	Shaking water bath
3.	Portable autoclave
4.	Microfuge
5.	pH-meter

6.	Analytical balance
7.	Water distiller
8.	Vortex

The chemicals:

The chemicals are used in this procedure:

No	Chemical
1.	Sodium hydroxide
2.	Glacial acetic acid
3.	SDS
4.	Di, sodium ethylene diamin tetra acetic acid (Na_2EDTA)
5.	Tris Base
6.	Chloroform
7.	Hydrochloric acid
8.	Ethanol
9.	Sodium chloride

The Equipments:

The following instruments are used in this procedure**:**

No.	Equipment
1.	Rack for tubes
2.	Tips with different sizes
3.	Eppendorf tubes (1.5 size)
4.	Glass centrifuge tubes
5.	Racks for Eppendorf tubes
6.	Micropipette (transfer pipette) (2-20µl, 10-100µl,100-1000µl)
7.	Biohazard Container
8.	Pipette

Preparation of Solution:

1. Lysis Buffer Solution:

It is prepared by:

1. Dissolve 0.242 g of Tris Base, 57 µL of Glacial acetic acid and 1 ml of 0.5 M EDTA solution.
2. To the above solution add 0.02 g of sodium acetate and 0.1 g of SDS.
3. The volume make up to 8 ml by distill water. Adjust the pH to (7.8), the volume complete to 10 ml by distill water.
4. Mix well, dissolve the solution with heating in water bath to assist dissolution.

2. 5 M NaCl Solution:

It is prepared by dissolving 2.92 g of Sodium Chloride in 10 ml of distill water.

3. Ethanol 70 %:

comprise of **70 ml** absolute ethanol and **30 ml** of distill water.

4. Ethanol 100 %:

Ready to use.

5. Chloroform:

Ready to use.

The Procedure:

1. 1.5 ml of a saturated culture was harvested with centrifugation for 5 min at 14,000 rpm.

2. The cell pellet was resuspended and lysed in **200 µL** of lysis buffer **(**40 mM Tris-acetate pH 7.8, 1 Mm EDTA, 20 mM sodium-acetate, 1 % SDS**)** by vigorous pipetting.
3. To remove most proteins and cell debris, **66 µL** of 5M NaCl solution was added and mixed well, and then the viscous mixture was centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at 4°C.
4. After transferring the clear supernatant into a new Eppendorf tube, an equal volume of chloroform was added, Then mix on a rotating mixer for **15 min** when a milky solution was completely formed.
5. Following centrifugating at 14,000 rpm for 5 min, The supernatant is then removed to another Eppendorf tube and **double volume** of 100% EtOH was added.
6. The tubes were inverted **5-6 times** gently **to precipitated DNA**, then centrifuged **at 10.000 rpm** for **3 minutes**.
7. The supernatant from this last step discarded and 1 ml of **ethanol (70%) was added**, again tubes centrifuged **10.000 rpm** for **3 minutes**.
8. **Repeating Step 7.**
9. The supernatant discarded and **100 µL** of distil water was added to re-suspended (dissolved) **DNA**.
10. The stock **DNA** is kept frozen at **(-20^{o}C)** until use.

Genomic DNA Extraction Method From Gram Positive Bacterial

DNA extraction was according to Roeder and Broda (1987) and Thottappilly et al. (1999) with some modification.

The Instruments:

The following equipment's are used throughout this procedure:

No	Instrument
1.	Magnetic stirrer
2.	Shaking water bath
3.	Portable autoclave
4.	Microfuge
5.	pH-meter
6.	Analytical balance
7.	Vortex

The Chemicals:

The chemicals are used in this procedure:

No	Chemical
1.	CTAB
2.	2-mercaptoethanol
3.	Sodium chloride
4.	Di, sodium ethylene diamin tetra acetic acid (Na_2EDTA)
5.	Tris-Hcl
6.	SDS
7.	Hydrochloric acid
8.	Ethanol
9.	Sodium hydroxide

The Equipments:

The following instruments are used in this procedure**:**

No.	Equipment
1.	Rack for tubes
2.	Tips with different sizes
3.	Eppendorf tubes (1.5 size)
4.	Racks for Eppendorf tubes
5.	Micropipette (transfer pipette) (2-20µl, 10-100µl,100-1000µl)
6.	Biohazard Container
7.	Pipette

The Preparation of Buffers:

1. **2X CTAB buffer (50 mM Tris, pH 8.0; 0.7 mM NaCl; 10 mM EDTA; 2% CTAB; 0.1% 2-mercaptoethanol):**

   It is prepared by dissolving of **0.08 g Tris-HCL, 0.001 g** of **NaCl**, **0.04 g of Na2EDTA 200 mg** of **CTAB,** and10 µL of 2-mercaptoethanol in **6 ml** of distill water. Adjust all to **pH** (**8**) using NaOH and make up volume to **10 ml** with distill water, sterilize by autoclaving.

2. **20% sodium dodecyl sulfate:**

   It is prepared by dissolving **2g** of **SDS** in **10ml** of distill water with heating at **68C** to assist dissolution.

3. **Phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1):**

   It is prepared by mixing 25 ml of saturated phenol (pH 8), 24 ml of chloroform and 1 ml of isoamyl alcohol in dark bottle.

4. **Absolute ethanol:**

   Ready to use

5. **70% ethanol:**

   comprise of **7 ml** absolute ethanol and **3 ml** of distill water.

6. TE buffer:

It is prepared by adding 2.5ml of 1M Tris pH (8.0), to 0.5 ml of 0.5M EDTA pH (8.0), the volume made up to 250ml by distill water, autoclave and store at 4^{o}C.

Procedure:

1. Transfer several colonies of gram positive bacterial isolates to 10 ml of nutrient bruth and incubate for 24 hours at 37 °C.

2. Into the 1.5 ml eppendorf tube, pipette 1.5 ml of the overnight bacterial culture and spun at 14.000 rpm for 3 min in microcentrifuge. then washing with 200 µL TE buffer.

3. The washed bacterial cells suspension in 200 µL of 2xCTAB buffer, mixing briefly by vortex.

4. Add 100 µL of 20% SDS and incubated at 65°C for 20 min.

5. After incubation, add 200 µL of phenol : chloroform : isoamyl alcohol with gentle mixing, then centrifuged at 10000 rpm for 10 min.

6. Transfer the aqueous phase (upper layer) to new eppendorf tubes and add an equal volume of phenol : chloroform : isoamyl alcohol. The tubes mixing gently on a rotary mixer for 5 minutes, followed by centrifugation at 10000 rpm for 10 minutes.

7. Transfer the aqueous phase to another new eppendorf tubes and double volume of -20°C absolute ethanol, to precipitate DNA.

8. The tubes were inverted 5-6 times gently to precipitated DNA, then centrifuged at 10.000 rpm for 10 minutes. The supernatant from this last step discarded, then add 1 ml of ethanol (70%), again tubes centrifuged 10.000 rpm for 5 minutes.

9. The supernatant discarded and 100 µL of distil water, then add to re-suspended (dissolved) **DNA**.

10. The stock **DNA** is kept frozen at **(-20^{o}C)** until use.

استخلاص الدنا البلازميدي: Plasmid DNA Extraction

البلازميدات عبارة عن اعداد كثيرة من الدنا اللولبي المزدوج الدائري المغلق عالي الالتفاف supercoiled circular closed DNA تتواجد خارج الدنا الكروموسومي الاصلي للخلية البكتيرية.

تعتمد طرق تنقية البلازميدات اساسا" على الاختلاف في الطبيعة الفيزيائية لكل من الدنا البلازميدي والدنا الكروموسومي ولاسيما من ناحيتي الحجم size والشكل الفيزيائي configuration حيث ان حجم البلازميدات يكون صغير جدا مقارنة مع حجم كروموسوم بكتريا E.coli في حين توجد بلازميدات اصغر من ذلك بكثير، ام من ناحية الشكل فعلى الرغم من ان البلازميدات تشابه كروموسوم البكتريا في كونها حلزونا" مزدوجا" دائريا" الا انها توجد داخل الخلايا بشكل مختلف عن الكروموسوم حيث تكون ملتفة على نفسها مكونه جزئيات عالية الالتفاف supercoiled وتبقى الجزيئات على هذا الشكل ما دام كان كل من خيطي الحلزون سليمين بدون كسر.

يطلق على هذه الجزيئات العالية الالتفاف اسم الجزيئات الدائرية المغلقة تساهميا" Covalently closed circular molecules (ccc). وفي حالة تعرض اي من خيطي الحلزون، تفقد الجزيئة خاصية الالتفاف العالي وتبدأ بالتراخي مكونه جزيئة دائرية مفتوحة open – circular molecule اما في حالة قطع خيطي الحلزون في نفس المكان فستنتج جزيئة خيطية Liner molecule.

يشمل عزل الدنا الجينومي Genomic DNA كل الدنا الموجود في الخلية، ففي البكتريا يشمل الدنا الكروموسومي والدنا البلازميدي ويكون العزل مشابه في كلا الحالتين، الا ان الخطوة الاحقة والمهمة هي تنقية الدنا البلازميدي عن الدنا الكروموسومي وتوجد عدة طرق لعزل الدنا البلازميدي ومنها:

١. طريقة المسخ القاعدي Alkaline Denaturation
٢. طريقة الطرد المركزي في محلول السيزسوم متدرج الكثافة بوجود بروميد الايثيديوم Ethidium bromide-caesium chloride density gradient centrifugation
٣. طريقة الغليان: Boiling method.
٤. طريقة الترسيب الملحي Salting out method.

تدعى طريقة استخلاص الدنا البلازميدي بالطريقة القاعدية المصغرة Minimum alkaline preparation وتختصر ب Mini-prep وهي كالأتي:

Minipreparation or Rapid Plasmid Isolation Procedure:

1. Cultures from transformed colonies will be grown overnight in 2 mls of selective medium (LB + 50 ug/ml Ampicillin) in sterile 18 mm test tubes at 37o C and 250 rpms in the shaking incubator.
2. Pipette 1.5 mls of bacterial culture into eppendorf tubes and centrifuge cells in the Eppendorf centrifuge at maximum speed for 60 seconds to pellet cells.
3. Resuspend pellet thoroughly in 100 ul Lysozyme buffer, (Solution I). Note: Incomplete suspension of the cell culture will greatly reduce your plasmid yield.
4. Add a tiny bit of lysozyme on the end of a toothpick to the suspended cells and swirl toothpick in the tube to mix.
5. Incubate at RT° for 20 minutes.
6. Add 200 ul of lytic mix (Solution II) and MIX GENTLY by inversion.

   Note: use freshly prepared lytic mix and treat the mixture gently from this point on. Rough handling will shear the chromosomal DNA into small pieces which will then contaminate your plasmid by co-precipitating with the plasmid.
7. Place on ice 5 minutes.
8. Add 150 ul of Potassium Acetate Buffer (Solution III) MIX GENTLY by inversion.
9. Place in ice water for 10 minutes to precipitate large cellular constituents such as cell wall, membrane proteins and chromosomal DNA.
10. Spin in the Eppendorf centrifuge 5 minutes.

11. Decant supernatant to clean eppendorf tube by pouring or by transferring with a Pasteur pipette.

12. Fill tube with RT° 95% EtOH-mix by inversion, and centrifuge 5 minutes.

13. Pour off ethanol, keep pellet, and dry pellet under vacuum in the Vacuum centrifuge evaporator for 10 minutes.

Note: It is important to remove all ethanol because it inhibits the activity of enzymes.

14. Add 30 ul of sterile nanopure water to the DNA pellet and mix well by vortexing for 1 minute to reconstitute the plasmid DNA.

15. Place the plasmid in a well -labelled tube at -20° C for long term storage.

Buffers for Alkaline Lysis DNA Extraction:

1. **Solution I - 100 mls of Lysozyme buffer:**

   It is consist of:

   - 50mM glucose (1.8 mls of 50% glucose).
   - 25mM Tris HCl (2.5 mls of 1 M Tris, pH 7.6).
   - 10 mM EDTA (2 mls of 0.5 M EDTA, pH 8).
   - 94 mls of ddH2O

2. **Solution II - 10 mls of Lytic mix (make fresh each time):**

   It is consist of:

   - 0.2 N NaOH final concentration (from10 M Stock) 100 uL 10 M NaOH.
   - 1% SDS (1ml 10% SDS).

- 8.9 mls ddH2O.

3. **Solution III - Potassium acetate buffer:**

- 5 M K Acetate 60 ml.
- Glacial acetic acid 11.5 ml.
- H2O 28.5 ml.

Note: Solution III will always be used cold, store at 4° C or on ice.

4. **5 M Potassium acetate (F.W. 98.14)**:

It is prepared by dissolving 49.07 g of Potassium acetate in 70 ml H2O the volume is made up to 100ml by distill water Sterilize by autoclaving (15 minutes).

Glacial acetic acid:

Molecular Formula	C2H4O2
Molecular Weight	60.05

Isolation of plasmid DNA-small scale method:

World Journal of Microbiology & Biotechnology 19: 239–241, 2003.

Amjad B. Khalil1,*, Ghandi H. Anfoka1 and Salwa Bdour2

The described procedure is for 1.5 ml aliquots of an overnight culture of thermophilic bacteria or fresh single colonies from plates. Eppendorf-type tubes (1.5 ml) were used throughout and all centrifugations were carried out at maximum speed capable of generating 6–8000 rpm.

The Instruments:

The following equipment's are used throughout this procedure:

No	Instrument
1.	Magnetic stirrer

2.	Portable autoclave
3.	Microfuge
4.	pH-meter
5.	Analytical balance
6.	Water distiller
7.	Vortex

The Equipments:

The following instruments are used in this procedure**:**

No.	Equipment
1.	Tips with different sizes
2.	Eppendorf tubes (1.5 size)
3.	Racks for Eppendorf tubes
4.	Micropipette (transfer pipette) (2-20µl, 10-100µl,100-1000µl)
5.	Biohazard Container
6.	Pipette

The Chemicals:

The chemicals are used in this procedure:

No	Chemical
1.	Glucose
2.	Di, sodium ethylene diamin tetra acetic acid (Na_2EDTA)
3.	Trizma base
4.	Sucrose
5.	Lysozyme
6.	Sodium hydroxide (NaOH)
7.	SDS
8.	Ammonium acetate

9.	Isopropanol
10.	Tris–HCI
11.	Hydrochloric acid

The Preparation of Buffers:

1. Lysis Buffer: 10 ml

It is prepared by dissolving 0.09 g glucose, 0.035 g EDTA, 0.03 g Trizma base, 2.5 g sucrose) in 6 ml of distill water . Adjust the pH to (8.0). The volume is made up to 10 ml by the distill water and sterilize by autoclaving.

2. Lysozyme:

It is prepared by dissolving 1 mg of Lysozyme in 1 ml of distill water.

3. alkaline SDS Buffer: 10 ml (make fresh each time).

It is prepared by dissolving of 0.8 g NaOH and 1 g SDS in 10 ml distill water.

4. 7.5 M ammonium acetate:

It is prepared by dissolving 5.782 g of ammonium acetate in 10ml distilled water sterilize by filtration (micropore filter) with 0.20 µm.

5. Isopropanol: Ready to use.

6. TE buffer (10mM Tris–HCI, 1 mM EDTA, pH 8.0).

It is prepared by dissolving 0.016 g of Tris-HCl and 0.004 g of Na2EDTA in 7 ml of D.W, Adjust the pH to (8.0). The volume is made up to 10 ml by the distill water and sterilize by autoclaving.

PROCEDURE:

1. The 1.5 ml culture aliquots were centrifuged for 2 min, the supernatant was decanted.

2. Pellet resuspended in 100 µL of lysis buffer.

3. Lysozyme was added at 1 mg/ml. The suspension was incubated at 37 °C for 15 min.

4. 100 µL of alkaline SDS was added to the mixture gently, and it was kept on ice for 15 min.

Note: Rough handling will shear the chromosomal DNA into small pieces which will then contaminate your plasmid by co-precipitating with the plasmid.

5. 100 µL of 7.5 M ammonium acetate was then added to the mixture and it was kept on ice for 15 min.
6. The mixture was centrifuged at 6000 rpm for 10 min. The supernatant was transferred to a new sterile centrifuge tube.
7. 400 µL of isopropanol was added to the new tube, mixed and kept at room temperature for 15 min.
8. Centrifuged at 7000 rpm for 10 min. The pellet was resuspended in 100 µL 2 M ammonium acetate and kept on ice for 15 min. The supernatant was saved and 200 µL of isopropanol was added to it, it was kept at room temperature for 10 min, and centrifuged at 8000 rpm for 15 min.
9. The pellet was dried for 15 min at room temperature, and then resuspended in 50 µL of TE buffer.

DNA Extraction from Paraffin-Embedded Tissues

Hongxin Fan and Margaret L. Gulley

1. Introduction:

In routine histopathology, most tissues are fixed in formalin and embedded in paraffin for long-term preservation. DNA can be extracted from these tissues for subsequent molecular analysis by amplification methods. We describe herein a protocol for DNA preparation from paraffin-embedded tissues based on published procedures ***(1–3)***. In brief, tissue sections are placed into microfuge tubes, then deparaffinized with xylene. The xylene is removed with ethanol washes, and the tissue is treated with proteinase K to make DNA available for amplification.

This protocol is simple, but there are several factors that influence the success of subsequent DNA amplification assays, including the type of fixative that is used, the duration of fixation, the age of the paraffin block, and the length of the DNA segment to be amplified (*see* **Note 1**). Ethanol fixation preserves DNA much better than does formalin. Formalin fixation randomly chops DNA in a duration-dependent manner, resulting in partial degradation. Even more severe DNA degradation occurs in bone samples subjected to acid decalcification. Because of this degradation, formalin-fixed tissue is not suitable for Southern blot analysis or for amplification of large DNA segments. Nevertheless, polymerase chain reaction (PCR) amplification of segments ranging up to 1300 bp has been reported ***(2)***, and consistent amplification of segments up to 300 bp is commonly achieved from archival fixed tissues.

Be aware that partial degradation of DNA may result in sampling bias, and therefore results should be interpreted with caution. For example, amplification of DNA from one cell may produce a PCR product that is not representative of the entire population of cells in the tissue. For this reason, it is wise to run tests in duplicate and always with appropriate controls.

2. Materials:

2.1. Reagents:

1. Xylene.

2. 100% Ethanol.

3. Proteinase K stock solution (20 mg/mL).

4. TEN buffer: 10 m*M* Tris-HCl, pH 8.0, 1 m*M* EDTA, pH 8.0, 20 m*M* NaCl.

5. 10% SDS.

2.2. Equipment:

1. Microcentrifuge.

2. Heating block or water bath to hold 1.5-mL Eppendorf tubes.

3. Microtome.

3. Methods:

Preparation of paraffin-embedded tissue for DNA amplification involves several manual manipulations; therefore precautions should be taken to avoid contamination, such as changing gloves frequently. When opening and closing microfuge tubes, do not touch the rim or inside of the cap. (Many laboratory scientists place a fresh gauze square over their thumb when opening a tube, or use a cap-opener device or screw-top lids.) Appropriate negative controls must be used to alert for contamination.

3.1. Cutting and Deparaffinizing Sections:

1.Use a microtome to cut five sections, 5–20 μm thick, from a paraffin block, and place these directly into a 1.5-mL microfuge tube. The thickness of the sections depends on the size of the biopsy. For a small biopsy (up to 3 mm), 20-μm thick sections may be required, whereas a large biopsy requires only 5-μm thick sections.

Although multiple thin sections can be placed in a single tube, fewer thick sections are more practical for processing. *See* **Note. 2** for special precautions against contamination.

2. Add 800 μL of xylene to each tube, close, mix by gentle vortexing, and then incubate at room temperature for 10 min. Pellet the tissue by centrifugation for 5 min in a

microfuge at full speed (20,000 rpm). Carefully remove and discard the supernatant using a pipet; do not disturb the tissue. If any translucent white paraffin remains, repeat the xylene wash one to two more times.

3. Add 800 µL of 100% ethanol to each tube, close the lid, and mix by inverting. Pellet the tissue by centrifugation for 5 min in a microfuge at full speed (20,000 rpm), and carefully remove and discard the supernatant with a pipet. Repeat the ethanol wash one more time, and remove as much supernatant as possible.

4.Open the tubes and let the residual ethanol evaporate by incubating in a dry heat block at 55°C for 15–30 min or until the sample is completely dry. (Speed vacuum drying is not recommended because of the risk of contamination.)

3.2. Proteinase K Digestion

12. To the dried tissue samples add 1 ml of TEN buffer containing 200 µg/mL of proteinase K (prepared by mixing 10 µL of proteinase K stock solution in 1 ml of TEN buffer). and followed by **50 µL** of **10% SDS**, mixed by vortexing briefly for 1 min until the mixture was re-suspended and well dissolved by gentle pipeting**.**

2. Close the tubes and incubate at 55°C for 2 hours. Gently invert the tubes a few times during incubation.

3. Spin briefly to remove any liquid from the cap. Cover the caps tightly with cap locks (PGC Scientifics, Gaithersburg, MD) to prevent them from popping open during high-temperature incubation. Incubate in a 95°C heat block for exactly 10 min to inactivate the proteinase K (*see* **Note 3**). Pellet the tissue in a microfuge at full speed

(20,000 rpm) for 10 min, and then transfer the supernatant to a clean tube and discard the pellet.

4. Add double volume from ice-cold ethanol and invert gently to allow DNA to precipitate**.** Centrifuge at 20,000 rpm for **10** minutes, discard the supernatant.

5. Wash the pellet by add **500 µL** of **70 %** ethanol. Centrifuge at **20,000** rpm for **10** minutes.

6. Resuspend in **50 µL** TE buffer.

7. Store DNA at –20°C, and avoid thawing and refreezing. (Freshly prepared samples are more efficiently amplified than those stored frozen, perhaps because the freeze-thaw cycle damages DNA.)

4. Notes:

1.The most important factor affecting DNA quality is the type of fixative employed and the duration of fixation. Tissues fixed between 12 and 24 h in ethanol, acetone, Omnifix, or 10% buffered formalin usually yield good-quality DNA; but B-5, Zenker's, or Bouin's solutions, or duration of fixation longer than 5 d, are poor prognostic factors for PCR productivity ***(2,4)***. Prior studies showed that when the length of □-globin amplification product increased (175, 324, and 676 bp), the percentage of fixed tissues containing amplifiable DNA decreased (100, 69, and 45%) ***(5)***. And when the age of a block increased, PCR productivity decreased ***(6,7)***, although some blocks stored for more than 40 yr were successfully studied ***(8)***.

2.It is important that no tissue be carried over from one case to the next during microtomy. Between each block, shift to a fresh part of the blade. Use smoothedge

rather than toothed forceps for transporting sections into tubes. Do not allow bleach to come in contact with the tissue or the DNA will be destroyed. Ice cubes used to cool a block should be discarded between cases.

3. Longer incubation at 95°C may damage DNA, whereas shorter incubation may not fully inactivate proteinase K. Additional time is needed for volumes >500 μL.

4. The optimal amount of template for an amplification reaction depends on numerous factors specific to each sample, such as DNA concentration and presence of inhibitors. It is useful to test several concentrations of each template (e.g., 1 and 10 μL of template per 100-μL PCR). Large tissues may necessitate the use of a smaller fraction of the template (e.g., 0.1 μL). The amount of template that is "tolerated" in a PCR may be affected by residual fixation chemicals or paraffin, excessive tissue debris, and other factors. If the first attempt fails, a 10-fold dilution will often reduce inhibitors while still retaining enough DNA to allow amplification.

5. Amplification of DNA prepared from paraffin-embedded tissue is less efficient than amplification of DNA from fresh or frozen tissues. To compensate for this reduced efficiency, consider modifying the thermocycling parameters by increasing the number of cycles and lengthening the duration at each temperature within the cycle ***(1)***.

Reference :

Methods in Molecular Medicine, vol. 49 : Molecular Pathology Protocols

Edited by: A. A. Killeen © Humana Press Inc., Totowa, NJ

DNA Extraction From Plasma and Serum:

1. The chemicals:

No.	Chemicals
1.	Di, sodium ethylene diamin tetra acetic acid (Na_2EDTA)
2.	Tris-base
3.	Tris-Hcl
4.	Protienase K
5.	Hydrochloric acid
6.	SDS
7.	Ethanol
8.	Glycogen
9	Sodium hydroxide
10.	Ammonium acetate
11.	Phenol
12.	Chloroform

2. The Equipments:

No.	Equipments
1.	Magnetic stirrer
2.	Portable autoclave
3.	Centrifuge
4.	Microfuge
5.	Shaking water bath
6.	pH-meter
7.	Analytical balance
8.	Water distiller
9	Vortex
10.	MicroCentrifuge

3. **The Instruments:**

No.	**Instrument**
1.	Micropipette (transfer pipette**)** (2-20µl, 10-100µl, 100-1000µL).
2.	Biohazard Container
3.	Biohazard Bags
4.	Glass centrifuge tubes
5.	Pasteur pipettes
6.	Eppendorf tubes
7.	Tips with different size
8.	Pipettes (1ml, 5ml, 10ml)

Preparation of Stock Solutions:

1. **1M Tris HCI pH 8.0 :**

   Prepare by dissolving 60.55g of Tris base in 400 ml of distill water . Concentrate HCI are added to adjust the pH to (8.0). The volume is made up to 500ml by the distill water and sterilize by autoclaving.

2. **0.5 M EDTA pH 8.0 :**

   Prepare by dissolving 93.05g of EDTA in 400ml of distill water and stir vigorously on a magnetic stirrer . The pH is adjust to (8.0) using (10N) NaOH. The volume is made up to 500ml by distill water and sterilize by autoclaving.

3. **10M NaOH :**

   It is prepared by dissolving 40g of NaOH in 80ml of distill water the volume is made up to 100ml by distill water.

4. **Phenol :**

   It is prepared by melting crystalline phenol at 68C water bath and then overlaid with an equal volume of 1M Tris pH (8.0) and is allowed to stand overnight at 4C. The 1M Tris is then discard to be replace by 0.1M Tris pH (8.0), store at 4C for up to 4 weeks .

5. **10% SDS Solution :**

It is prepared by dissolving 100g of SDS in 900ml of distill water with heating at 68C to assist dissolution adjust volume to one liter.

6. **7.5M Ammonium acetate :**

   It is prepared by dissolving 5.782g Ammonium acetate in 10ml distilled water sterilize by filtration (micropore filter) with 0.20 µm.

7. **Absolute ethanol (100%):**

   Ready to use

8. **Ethanol 70% :**

   Comprise of 70 ml absolute ethanol and 30 ml of distill water.

9. **Glycogen (10 mg/mL):**

   It is prepared by dissolving 10g of Glycogen in 1ml of distill water store at 4°C until use.

10. **Proteinase K 5 mg/mL:**

    It is prepared by dissolving 5 mg of Proteinase K in 1ml of distill water store at -20 °C until use.

Preparation of Buffers (Work) Solutions:

1. **TE Buffer :**

   It is prepared by adding 2.5ml of 1M Tris pH (8.0), to 0.5 ml of 0.5M EDTA pH (8.0) , the volume made up to 250ml by distill water, autoclave and store at 4^{o}C.

2. **Phenol : chloroform (1:1, v/v):**

   It is prepared by mixing one volume of equilibrated phenol pH (8.0) with one volume of chloroform This solution store in a light-tight bottle at 4°C.

3. **10X SDS/Proteinase K:**

   It is consist of 10 g/100 mL lauryl sulfate (SDS), 5 mg/mL proteinase K.

   For each sample of serum or plasma 1.5 mL of 1X SDS/Proteinase K solution is prepared by mixing the following volumes:

   1. 150 µL of SDS (10%), (As final concentration 1%).

   2. 7.5 µL of Proteinase K (5 mg/mL), (As final concentration 50 µg/mL).

3. The volume is made up to 1.5 ml (Final volume) by add 1342.5 of distill water.

Procedure:

1. Place 1.5 mL serum or plasma into a 10-mL centrifuge tube.

2. Add 1.5 mL of 1X SDS/proteinase K solution in the tube containing the serum and mix well.

3. Digest overnight at 55ºC in water bath.

4. Add 3 mL phenol :chloroform solution.

5. Vortex for 30 s and centrifuge for 10 min at 1000*g* using a swing-out rotor.

6. Transfer aqueous layer to fresh tube and repeat **steps 4** and **5**.

7. Transfer aqueous layer to fresh tube and add 5 µL glycogen (10 mg/mL), 1 mL of 7.5*M* ammonium acetate, and 8 mL of 100% ethanol.

8. Mix by inverting and centrifuge at 2500*g* for 40 min.

9. Carefully remove supernatant and wash pellet in 10 mL of 70% ethanol.

10. Centrifuge at 2500*g* for 10 min. Carefully remove last traces of ethanol and allow to air-dry for 10 min before redissolving the pellet in 100 µL TE.