الفصل الثاني

الفصل اللوني (الكروماتوجرافي) لبعض المركبات النباتية
Chromatography of Plant Compounds

مقـــدمة

تحتوي النباتات الراقية وكذلك الطحالب والفطريات على عديد من العناصر والتي تعد ضرورية جداً لعمليتي النمو والتكاثر حيث يستغلها النبات في بناء العديد من المركبات. هذه المركبات يمكن تقديرها في المستخلصات الناتجة من طرق الاستخلاص المباشر بالماء الحار أو المذيبات أو باستخدام أجهزة معينة مثل جهاز الاستخلاص (سوكسلت) Soxhelt، وبعد عملية الاستخلاص يمكن فصل المركبات عن بعضها بطرق عديدة منها طرق الفصل اللوني والتي تلعب دوراً مهماً في الدراسات الفسيولوجية للنبات، وكذلك لبعض من الكائنات الدقيقة.

طرق الفصل اللوني Chromatography

تتميز طرق الفصل اللوني إلى عدد من الطرق المستخدمة لفصل مادة أو خليط من المواد من المستخلص النباتي خاصة إذا كانت الكمية ضئيلة ومن ثم تقديرها كمياً. يعتمد التحليل اللوني على ظاهرة توزيع المخلوط المراد فصله بين نظامين، الأول طور ثابت Stationary phase والذي يكون في الغالب إما سائلاً وإما صلباً. والثاني طور متحرك Mobile phase حيث يقوم الطور المتحرك بحمل المواد فوق النظام الثابت الذي قد يكون شريطاً من ورق الترشيح filter paper أو مادة بها خاصية الامتزاز Adsorption في أنبوب زجاجي أو مذيب مناسب آخر. لذلك فطرق الفصل اللوني متعددة وكل نوع

Obeikandl.com

قد يكون بأشكال مختلفة حسب الاحتياج (الوهيبي، وآخرون،٢٠٠٦م). ومن طرق الفصل اللوني المعروفة ستقتصر دراستنا على اختيار ثلاث طرق مختلفة، تبعاً لنوع المركب المراد فصله وهي :

١- الفصل اللوني الورقي Paper Chromatography.

٢- الفصل اللوني على ألواح الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography. (TLC) .

٣- الفصل اللوني العمودي Column Chromatography.

التجربة رقم (٥): الفصل اللوني على الورق Paper Chromatography للسكريات (الكربوهيدرات)

مقدمـــة

تعتبر السكريات من النواتج الأولية لعملية البناء الضوئي في النبات، ومن جهة أخرى فتعتبر السكريات البادئات الأولية لجميع المركبات العضوية الأخرى، وتعرف السكريات كيميائياً بأنها إما عديدة الهيدروكسيل الألدهيدية Polyhydroxyl aldehydes مثل الجلوكوز وإما عديدة الهيدروكسيل الكيتونية Poly hydroxyl ketones مثل الفركتوز. يطلق على السكريات ذات المجموعة الألدهيدية أو بها مجموعة قابلة للتحول سريعاً إلى مجموعة ألدهيدية مصطلح سكريات مختزلة Reducing sugars. تعود هذه التسمية لتفاعل المجموعة الألدهيدية مع أيون النحاس ثنائي التكافؤ Cu^{++} وتحويله إلى أيون نحاس أحادي التكافؤ Cu^{+} يترسب على هيئة أكسيد النحاسوز Cu_2O ذي اللون الطوبي.ويمكن تصنيف السكريات كالتالي :

Obeikandi.com

١- سكريات أحادية وعدد ذرات الكربون بها يتراوح من ٣ ـ ٩ وأشهرها ثلاثية الكربون مثل الجليسرالدهيد وخماسية الكربون مثل البنتوز وسداسية الكربون مثل الجلوكوز.

٢- سكريات ثنائية وأشهرها السكروز (وحدتين من السكريات الأحادية مثل الجلوكوز والفركتوز).

٣- عديدات التسكر مثل السليلوز والنشا (يتكون من تكرار ارتباط وحدات من الجلوكوز).

الهدف من التجربة

هو التدريب على استخلاص السكريات وتجزئتها وتقدير السكريات الكلية الموجودة في النسيج النباتي.

الفكرة القائمة عليها

فصل المركبات بعضها عن بعض بواسطة مادة مذيبة على قطعة أو شريط من أوراق فصل خاصة (مثل أوراق الترشيح) عن طريق قوتين مختلفتين، الأولى وهي القوة الجاذبة وهذه ناتجة عن سريان المادة المذيبة وانتشارها في ورقة الفصل ومدى اختلاف ذوبان المواد في تلك المادة المذيبة ، والثانية هي القوة المعوقة وهي ناتجة عن قوة الامتزاز للمادة على السليلوز و المكونة من ورقة الفصل اللوني وقوة التجزئة لطورين سائلين غير ممتزجين هما المادة المذيبة والماء الموجود في أوراق الفصل اللوني نفسه، ومحصلة هذه القوة هي التي تعمل على فصل المواد عن بعضها عن بعض في هذا النوع من الفصل اللوني (Smith and Feinberg,1972).

Obeikandl.com

المواد وطريقة العمل

أولاً المواد الكيميائية والأدوات والأجهزة

١- عينات نباتية (مستخلص لبعض الأعضاء النباتية).

٢- شرائط ورق الترشيح (واتمان رقم ١).

٣- كلوروفورم Chloroform .

٤- محلول المذيب Solvent ويتكون من : (خلات الإيثيل Ethyl acetate + حمض الخل Acetic acid + ماء مقطر Water بنسبة ٣ : ٣ : ١٤).

٥- سكريات (١٪ من كل من سكروز، جلوكوز، فركتوز، مالتوز، رافينوز).

٦- محلول الإظهار ويتكون من كل من

أ) نترات فضة $AgNO_3$ مركز + ١٠٠مل أسيتون + ماء مقطر.

ب) ٤ جم هيدروكسيد صوديوم NaOH + ٢٠٠مل كحول إيثيلي.

ج) محلول ثيوسلفات الصوديوم $Na_2S_2O_3$.

٧- قمع فصل.

٨- أوراق وأقماع ترشيح.

٩- أنابيب شعرية.

١٠- مجفف هوائي كهربائي (أو استعمال صنبور الهواء air بالمعمل).

١١- مقص مشرشر.

ثانيا: طريقة العمل

١- يؤخذ ٥ مل من المستخلص النباتي ويضاف إليها كمية من الكلوروفورم في قمع الفصل وترج بشدة حتى يزول اللون وذلك للتخلص من الصبغات النباتية ثم يرشح ويحتفظ بالراشح كعينة للسكريات.

obeikandi.com

٢- جهز شريط الفصل (شريط واحد لكل مادة) ويكون طوله ٦٠سم تقريباً، ثم حدد وعلى بعد ١٠سم نقطة البداية Origin وكتابة اسم السكر المعلوم أو رقم العينة باستخدام قلم الرصاص فقط.

٣- ابدأ عملية التنقيط Spotting وذلك بأخذ ٠.١ مل من كل عينة متوفرة باستخدام أنبوبة شعرية وحملها في المكان المحدد على الشريط وجففها بالمجفف الكهربائي. كرر العملية ثلاث مرات على الأقل. لاحظ تخصيص شريط منفصل لكل عينة وكل سكر.

٤- بعد الانتهاء من عملية التنقيط والتجفيف يتم قص الطرف البعيد عن نقطة البداية بمقص مشرشر لتحديده وينقل الشريط كاملاً إلى حوض الفصل الموجود به المذيب (E.A.W.)، وذلك لعملية السريان Running وتترك لمدة ٢٤ ساعة، حيث تكون حركة المذيب هابطة Descending، (انظر الشكل رقم ٣).

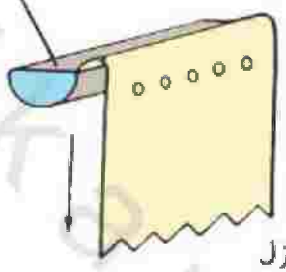
٥- بعد انتهاء المدة أو وصول مقدمة المذيب إلى قرب الطرف يتم نقل الأشرطة وتعليقها حتى تجف تماماً.

٦- بعد عملية التجفيف تجرى عملية الإظهار Detection كالتالي:

أ) مرر كل شريط في محلول التفاعل (يتكون من نترات الفضة المركز $AgNO_3$ مضافاً إليها ١٠٠مل أسيتون وإن تكون راسب أبيض فيذاب بالماء المقطر)، ومن ثم تجفيف الشريط.

ب) يمرر الشريط مرة أخرى بعد التجفيف في محلول آخر (يتكون من ٤ جرام هيدروكسيد صوديوم NaOH مذاب في ١٠مل ماء مقطر ثم إضافة ٢٠٠ مل من الكحول الإيثيلي)، ثم جفف الشريط مرة أخرى.

ج) بعد التجفيف تمرر الأشرطة على محلول ثيوسلفات الصوديوم $Na_2S_2O_3$ ثم تغسل الأشرطة بالماء المقطر وتجفف.



الشكل رقم (٣). الفصل الكروماتوجرافي على الورق بطريقة المذيب النازل.

ثالثاً: حساب قيمة الثابت النسبي Rg

١- سجل جميع نتائج التجربة في جدول .

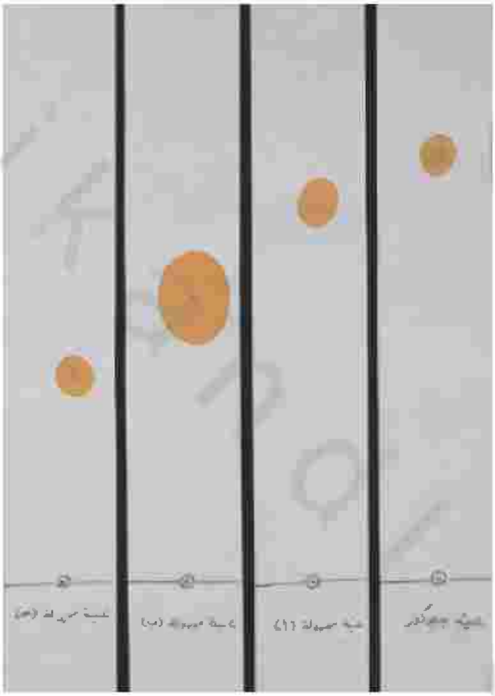
٢- قس المسافة التي قطعها الجلوكوز وكذلك السكريات الأخرى ابتداء من نقطة البداية Origin حتى مركز البقعة، (انظر الشكل رقم ٤).

٣- احسب الثابت النسبي لكل عينة منسوباً إلى الجلوكوز وهو ما يرمز له بالرمز Rg .

$$\text{الثابت النسبي Rg} = \frac{\text{المسافة التي قطعها السكر في حركته (سم)}}{\text{المسافة التي قطعها الجلوكوز في حركته (سم)}}$$

obeikandi.com

٤- اكتب تقريراً مفصلاً عن خطوات التجربة العملية والنتائج المتحصل عليها مع ذكر كيفية التعرف على محتويات العينة من السكريات بالاستعانة بالثابت النسبي لكل سكر.



الشكل رقم (٤). يوضح طريقة اظهار بقع السكريات على أوراق Whatman -١- في تجربة الفصل اللوني الورقي Paper Chramatography.

obeikandi.com

obeikandl.com

مقدمة في فسيولوجيا النبات العملية

تقرير التجربة العملية

عنوان التجربة: ....

اسم الطالب: ....

الرقم الجامعي: ....

تاريخ بدء التجربة: ....

تاريخ نهاية التجربة: ....

تاريخ تقديم التقرير: ....

١- الملخص:

....

....

....

....

٢- الهدف من التجربة:

....

....

....

....

obeikandl.com

٣– المواد وطريقة العمل (مختصرة من التجربة):

....

....

....

٤– النتائج:

....

....

....

٥– المناقشة:

....

....

....

٦– إجابة الأسئلة:

....

....

....

٧– المراجع :

....

....

....

٨– استفسارات عن النقاط غير الواضحة:

....

....

....

obeikandl.com

التجربة رقم (٦) : الفصل اللوني على الطبقة الرقيقة للأحماض الأمينية Thin Layer Chromatography (TLC)

مقــدمة

يعد هذا النوع من التحليل اللوني نمطاً أو تحويراً لطريقة الفصل اللوني الورقي حيث يستخدم عادة ألواحاً زجاجية أو بلاستيكية (عادة بالأطوال ٢٥ × ٢٥ سم) مطلية بمادة ذات خواص امتزازية تمثل الطور الثابت وميزتها سهولة التعامل وصغر الأدوات وكونها مجهزة تجارياً بمواد على هيئة طبقة رقيقة من مواد مختلفة توفر احتياج الفصل والتحليل، كذلك فإنها أنسب في بعض التجارب كفصل الأحماض الأمينية.

أولاً : المواد والأدوات اللازمة

١- مستخلص العينة النباتية محضر سابقاً.

٢- أحماض أمينية معروفة كمواد أصلية Authentic markers.

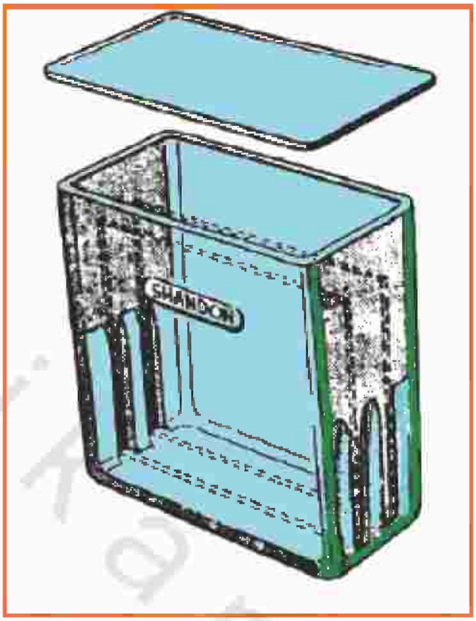
٣- ألواح زجاجية أو بلاستيكية مغطاة بمادة الامتزاز Adsorption (يستعمل الألومينا أو السيليكا أو غيرها من المواد المشابهة).

٤- أنابيب شعرية.

٥- صندوق الفصل اللوني وهو عبارة عن وعاء زجاجي مستطيل ذو غطاء زجاجي محكم، (انظر الشكل رقم ٥).

٦- المذيب ويتكون من بيوتانول وحمض الخل والماء B.A.W. بنسبة ٦ : ٣ : ١٢ (حيث الماء ١٢ جزءاً).

٧- الكاشف وهو عبارة عن محلول النتهيدرين المذاب في ٠,٣٪ أسيتون.



الشكل رقم (٥). وعاء الفصل الكروماتوجرافي على الطبقات الرقيقة.

ثانياً : طريقــة العمــل

١- قبل التجربة وبفترة مناسبة توضع الشرائح الزجاجية أو البلاستيكية المطلية بمادة الامتزاز في فرن عند درجة حرارة ٨٠ °م للتخلص من الرطوبة.

٢- يؤخذ خط بالقلم الرصاص على بعد نحو ١ سم من حافة اللوح ثم يقسم إلى أجزاء متساوية بعيدة عن بعضها نسبياً.

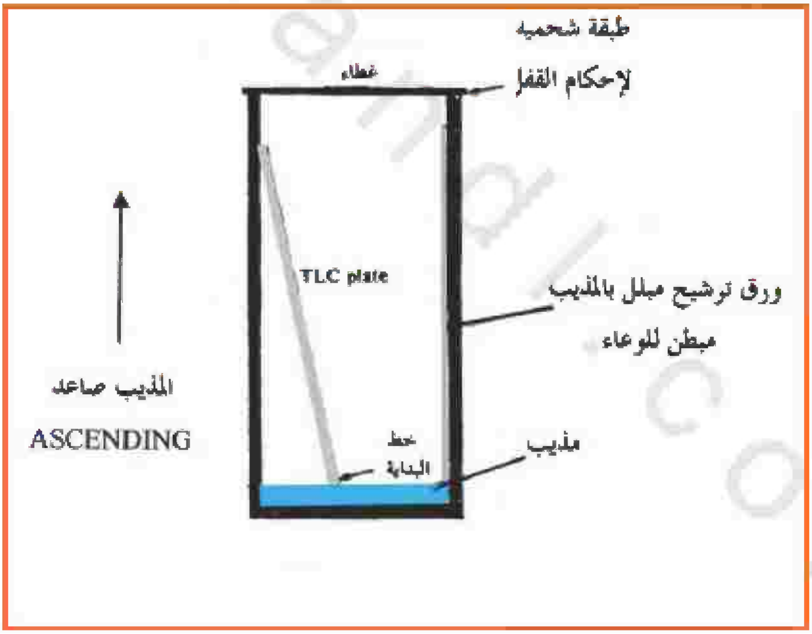
٣- توضع كميات صغيرة جداً (محددة الحجم عند الحاجة للتقدير الكمي) على هيئة قطرات صغيرة من المستخلص بواسطة أنبوبة شعرية وتسمى العملية بالتنقيط Spotting ، كما يوضع كميات مماثلة في المواقع الأخرى من المركبات الأصلية (الأحماض الأمينية) المراد تحديد وجودها وكميتها في المستخلص وهذا ما يعرف

obeikandl.com

بالعلامة (المَعْلَم) الأصلية Authentic marker ، يمكن استخدام أكثر من عينة وأكثر من علامة حسب الحاجة.

٤- بعد جفاف القطرات توضع الألواح في الصندوق الزجاجي وبقاعة المذيب (الطور السائل) بحيث يكون مستوى المذيب تحت النقط.

٥- تترك الألواح داخل الصندوق بعد تغطيته بإحكام حتى يصل المذيب صاعداً Ascending ، (انظر الشكل رقم ٦) إلى قرب نهاية طرف اللوح (قبل النهاية بنحو ٣ سم تقريباً).



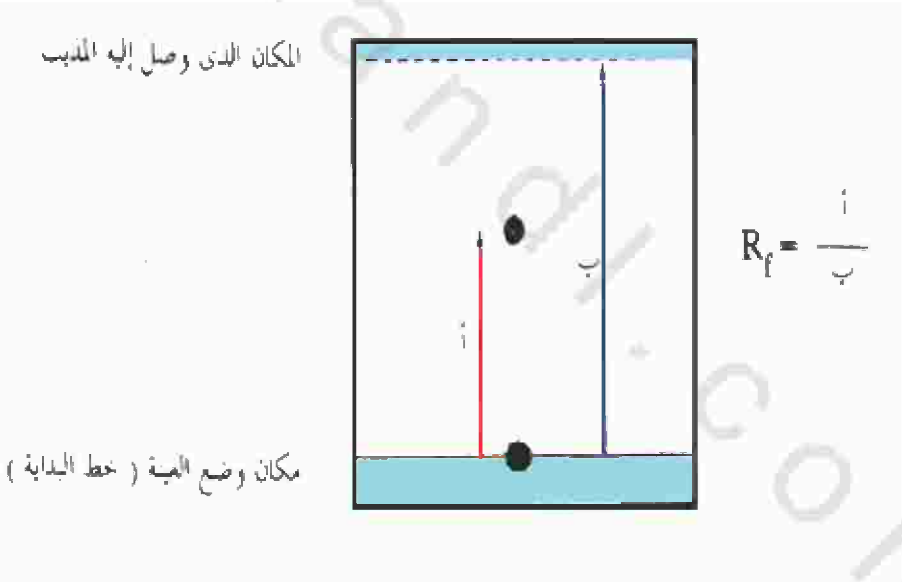
الشكل رقم (٦). رسم توضيحي لوعاء الفصل الكروماتوجرافي على الطبقات الرقيقة. موضح به مكان المذيب وطرف اللوح مغمور به أسفل خط البداية، ويبطن الوعاء.

٦- بعد سريان المذيب Running ترفع الألواح وتترك لتجف.

٧- تجرى عملية الإظهار Detection وذلك برش الألواح بمحلول النتهيدرين لتحديد مواقع المركبات.

٨- توضع الألواح بعد الرش في فرن على درجة حرارة ٦٠ °م لمدة ١٠ دقائق فتظهر البقع الملونة.

٩- تقاس المسافة التي قطعها المركب من بداية التنقيط، وكذلك المسافة من البداية إلى نهاية المذيب، (انظر الشكل رقم ٧).



الشكل رقم (٧). رسم توضيحي للكروماتوجراف يوضح معنى معدل سريان المـادة (Rf) حيث ترمز (أ) للمسافة التي سارها المادة، وترمز (ب) للمسافة التي سارها المذيب.

obeikandl.com

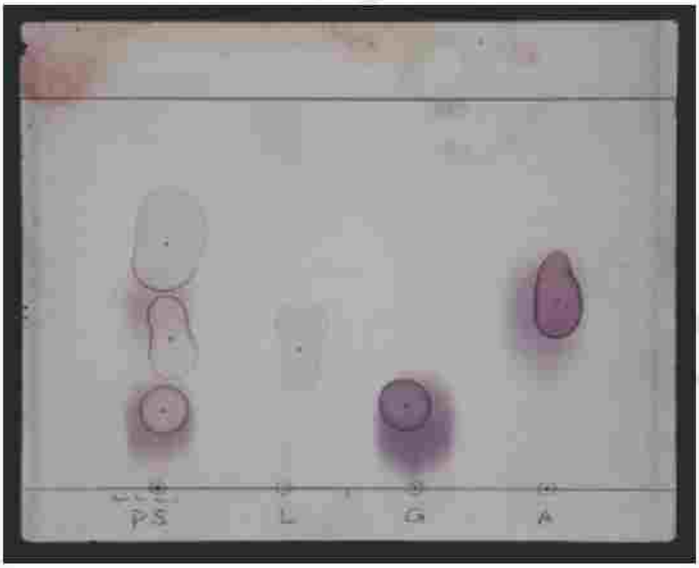
١٠- يحسب الثابت النسبي Rf :

الثابت النسبي Rf = المسافة التي قطعها المركب في حركته (سم) / المسافة التي قطعها المذيب في حركته (سم)

١١- يمكن تقدير المركب كمياً وذلك بعملية كشط المنطقة ونقلها كمياً إلى أنبوبة زجاجية بها مذيب مناسب وبعد الذوبان ترشح في دورق معياري محدد الحجم.

ثالثاً: عرض النتائج وكتابة التقرير

تسجل جميع الملاحظات وتدون القراءات بحيث ترتب في طريقة عرض معينة (جداول أو رسوم بيانية) أو صور للألواح وعليها بقع الأحماض الأمينية، (انظر الشكل رقم ٨) ثم يكتب التقرير.



الشكل رقم (٨). يوضح إظهار بقع الأحماض الأمينية على الألواح في تجربة الفصل اللوني على الألواح الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC)

Obeikan.com

obeikandl.com

مقدمة في فسيولوجيا النبات العملية

تقرير التجربة العملية

عنوان التجربة: ....

اسم الطالب: ....

الرقم الجامعي: ....

تاريخ بدء التجربة: ....

تاريخ نهاية التجربة: ....

تاريخ تقديم التقرير: ....

١- الملخص:

....

....

....

....

٢- الهدف من التجربة:

....

....

....

....

obeikandl.com

٣- المواد وطريقة العمل (مختصرة من التجربة):

....

....

....

٤- النتائج:

....

....

....

٥- المناقشة:

....

....

....

٦- إجابة الأسئلة:

....

....

....

٧- المراجع :

....

....

....

٨- استفسارات عن النقاط غير الواضحة:

....

....

....

obeikandl.com

الفصل اللوني على الأعمدة Culumn Chromatography للصبغات النباتية

مقـــدمة

يعتبر الفصل الكروماتوجرافي على الأعمدة من أقدم أنواع الفصل اللوني، حيث استخدمت في بادئ الأمر لفصل الصبغات النباتية (الكلوروفيل Chlorophyll والزانثوفيل Xanthophyll والكاروتينات Carotenes) حيث أنها تنفصل في طبقات ملونة Coloured bands على العمود. وتستعمل طريقة الفصل الكروماتوجرافي على الأعمدة الآن كثيراً في مجال النبات والأحياء الدقيقة كالطحالب وفي مجال الكيمياء الحيوية، وذلك ليس فقط لفصل المواد الملونة بل لفصل كثير من المركبات البيوكيميائية غير الملونة مثل الأحماض النووية والنيوكليوتيدات والأحماض الأمينية وخلافها. ومن المناسب الآن ذكر الملاحظات العامة التي يجب أن تؤخذ في الاعتبار عند تحضير الأعمدة وعند إجراء الفصل عليها.

أ) **الأعمدة Column**

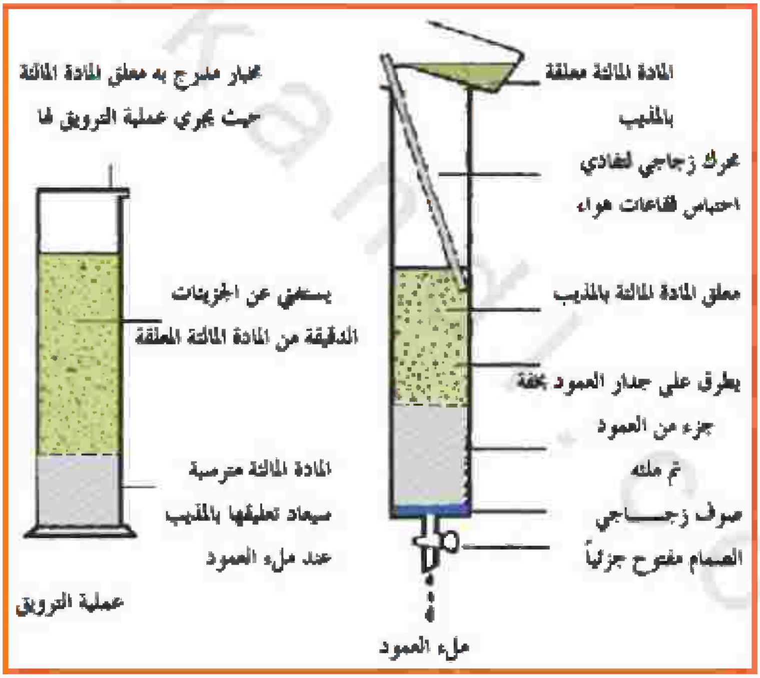
تكون أعمدة الفصل الكروماتوجرافي عادة من الزجاج بأطوال وأقطار مختلفة وعموماً تعطي الأعمدة الطويلة فصلاً جيداً للمكونات أفضل من الأعمدة القصيرة الواسعة ولكن يفضل في حالة فصل كميات كبيرة للمواد استعمال أعمدة ذات أقطار كبيرة.

ب) **إعداد المواد التي سيتم الفصل عليها**

تستخدم العديد من المواد لملء أعمدة الفصل الكروماتوجرافي مثل الألومينا والسيليكاجل والسليلوز وتحتاج هذه المواد لمعاملتها بالمذيب قبل تعبئة العمود بها حتى تنتفخ جزئياتها بالمذيب وتستقر بالقاع Settle حيث تتم عملية الاتزان الديناميكي (وتسمى هذه العملية Equilibration)، ثم تزال

الجزئيات الدقيقة المعلقة بالمذيب بواسطة عملية الترويق Decantation، كما بالشكل رقم (٩) ومن الممكن تكرار هذه العملية عدة مرات حتى يتم التخلص من الجزيئات الدقيقة.

(إذا لم تجرى هذه العملية يلاحظ أن سرعة المذيب في العمود تُبطأ تدريجياً؛ نتيجة لانسداد الفراغات بين جزيئات المادة بواسطة الجزيئات الدقيقة).



الشكل رقم (٩). إعداد العمود للفصل الكروماتوجرافي.

Obeikandl.com

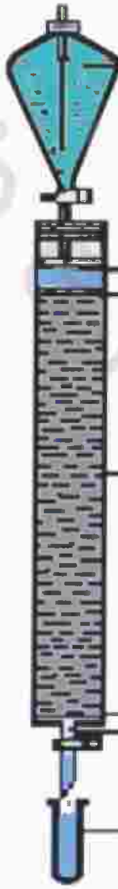
ج) ملء العمود Packing the Column

يثبت العمود في وضع رأسي على حامل ثم يملأ إلى ثلث ارتفاعه بالمذيب وذلك بعد وضع طبقة من الصوف الزجاجي في النهاية السفلى للعمود. تضاف المادة المالئة بعد ذلك والتي تكون على هيئة معلق بالمذيب وذلك باستخدام ماصة مدرجة ذات فتحه كبيرة أو تصب بمساعدة قضيب زجاجي؛ لمنع تجمع أي فقاعات بالعمود، ثم يسمح للمعلق بأن يستقر ويزال المذيب الزائد. وقبل إضافة دفعة جديدة من معلق المادة يجب أن يحرك سطح الطبقة المترسبة بالعمود حركة دائرية بواسطة المحرك الزجاجي؛ وذلك لمنع ترسيب المادة على هيئة طبقات.

تكرر العمليات السابقة إلى أن نصل إلى الارتفاع المطلوب للعمود. بعد غسل العمود عدة مرات بالمذيب يلاحظ في المرة الأخيرة للغسيل أن يبقى سطح العمود مغطى بطبقة رقيقة من المذيب لا يقل ارتفاعها عن نصف سنتيمتر؛ وذلك لمنع جفاف السطح العلوي للعمود.

د) إضافة العينة المراد فصل مكوناتها Application of the sample

تذاب العينة أولاً في أقل حجم من المذيب ثم تضاف إلى سطح العمود بواسطة ماصة ثم يفتح صمام العمود حتى تصل العينة والمذيب إلى المنطقة الواقعة أسفل سطح العمود مباشرة. يضاف بعد ذلك المذيب قطرة قطرة من أعلى العمود وذلك بتوصيله إلى مضخة سوائل ثم تضبط سرعتها لكي تعطي حوالي ١٦ قطرة في الدقيقة مثلاً (في بعض الأحيان وفي التجارب الأولية وعند عدم توفر مضخة سوائل يضاف المذيب من قمع فصل مثلاً أعلى العمود ويعرض أسفل العمود لضغط منخفض بواسطة مضخة مائية حتى تساعد على سير العينة والمذيب خلال العمود بسرعة أكبر)، (انظر الشكل رقم ١٠). يراعى دائماً عدم السماح لسطح العمود بالجفاف.



الشكل رقم (١٠). رسم توضيحي للعمود الكروماتوجرافي أثناء الفصل.

هـ) إزالة المواد التي تم تفريدها من العمود Elution

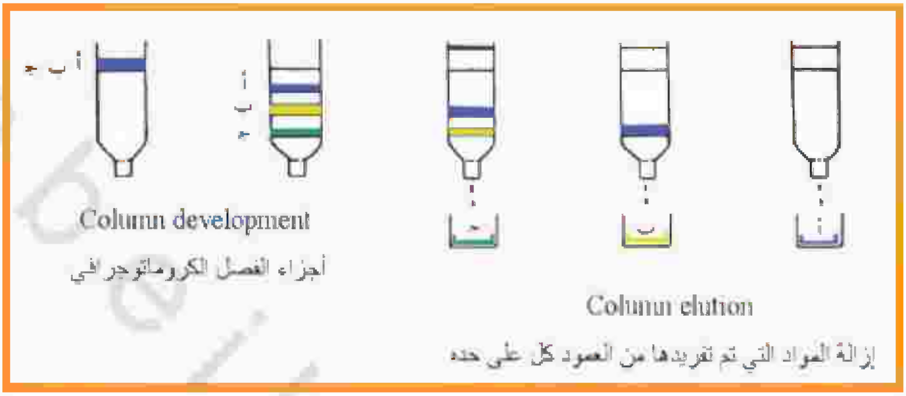
تزال المواد التي تم تفريدها من العمود، وذلك باستخدام المذيب المناسب، وتزال هذه المواد تدريجياً واحدة تلو الأخرى Stepwise elution، ويستخدم في أغلب الأحيان مذيب متدرج التركيز Gradient لهذا الغرض وأحياناً يستخدم

مذيب متدرج في الرقم الهيدروجيني pH أو متدرج في القطبية Polarity تسمى في هذه الحالة Gradient elution.

و) تجميع وتحليل العينات التي تم تفريدها The Collection and analysis of fractions

يتم الحصول على الأجزاء المفردة (Fractions) في عدد من أنابيب الاختبار إما بطريقة يدوية، (انظر الشكل رقم ١١) وإما بطريقة آلية باستخدام جهاز تجميع الأجزاء الآلي Fraction collector ، وهذه الطريقة هي الشائعة الاستخدام حيث يضبط الجهاز لتجميع إما عدداً معيناً من النقاط (١٥ نقطة مثلاً) أو حجماً معيناً (١ مليلتر مثلاً) بكل أنبوبة اختبار قبل التحرك إلى أنبوبة الاختبار التالية لها في الترتيب ثم يجرى تحليل كل جزء من الأجزاء المفردة Fractions (والموجود كل منها بأنبوبة اختبار منفصلة)، وذلك للتعرف على احتمال وجود أحد المكونات المطلوبة في العينة ثم تعيين تركيزها.

فمثلاً عند تفريد الأحماض النووية باستخدام هذه الطريقة يجرى قياس مقدار امتصاص الضوء لكل أنبوبة (Fraction) عند الطول الموجي ٢٦٠ نانومتر ثم تمثيل النتائج بيانياً بحيث يمثل المحور الرأسي امتصاص الضوء عند طول الموجة ٢٦٠ نانومتر ويمثل المحور الأفقي رقم الأنبوبة (Fraction number)، ومن منحنى الرسم البياني الناتج يمكن معرفة أي الأنابيب التي بها المحلول ذو أكبر امتصاص للضوء وهي التي بها مكونات العينة المفصولة. وتزود أغلب أجهزة تجميع الأجزاء الآلية Fraclion collector بجهاز لقياس امتصاص الضوء (U.V. Cord) وجهاز لرسم المنحنى أوتوماتيكياً (Chart recorder).



الشكل رقم (١١). رسم توضيحي للفصل الكروماتوجرافي على الأعمدة وفيه يضاف محلول محتوي على ثلاث مواد أ ، ب ، ج إلى العمـــود حيث يتم تفريدها ثم يستخدم مذيبات مختلفـــة لإزالة كل مكون على حـــدة.

obeikandl.com

مقدمة في فسيولوجيا النبات العملية

تقرير التجربة العملية

عنوان التجربة: ....

اسم الطالب: ....

الرقم الجامعي: ....

تاريخ بدء التجربة: ....

تاريخ نهاية التجربة: ....

تاريخ تقديم التقرير: ....

١- الملخص:

....

....

....

....

٢- الهدف من التجربة:

....

....

....

....

obeikandl.com

٣- المواد وطريقة العمل (مختصرة من التجربة):

....

....

....

٤- النتائج:

....

....

....

٥- المناقشة:

....

....

....

٦- إجابة الأسئلة:

....

....

....

٧- المراجع :

....

....

....

٨- استفسارات عن النقاط غير الواضحة:

....

....

....

obeikandl.com

التجربة رقم (٧): الفصل اللوني الإدمصاصي على الأعمدة للصبغات النباتية المستخلصة من أوراق النبات

Separation of Leaf Pigments by Adsorption Chromatography

obeikandl.com

مقدمـــة

الفكرة الأساسية هي التعرف على أنواع المواد الملونة الموجودة في أوراق النباتات وذلك بإجراء الفصل الكروماتوجرافي الإدمصاصي على الأعمدة.

الأدوات والمواد المستخدمة

١- عمود كروماتوجرافي بطول ٢٠ سم وقطر ١سم .

٢- أوراق سبانخ طازجة .

٣- ألومينا Alumina .

٤- كربونات كالسيوم .

٥- مسحوق سكر سكروز Icing sugar .

٦- كبريتات صوديوم لا مائية Sodium Sulphate anhydrous .

٧- إثير بترولي درجة غليانه ٦٠ ـ ٨٠ ° م Petrolium ether .

٨- ميثانول Methanol.

٩- بنزين Benzen.

١٠- صوف زجاجي Glass wool .

١١- خلاط كهربائي Blender أو هاون صيني ويده Mortar and Pestle .

طريقــة العمــل

أولاً : استخلاص الصبغات النباتية

١- تقطع الأوراق النباتية (السبانخ) في الخلاط (أو في هاون صيني) مع خليط من المذيبات المكونة من إثير بترولي وميثانول بنسبة (٩ : ٣).

٢- يرشح المعلق خلال ورق ترشيح للحصول على الراشح المحتوي على الصبغات الذائبة فيه.

٣- يوضع الراشح بقمع فصل ويغسل بالماء؛ وذلك لإزالة الميثانول (ويلاحظ عدم الرج بشدة لكي لا يتكون مستحلب) ويجرى فصل الطبقة التي بها الصبغات وهي طبقة المذيبات العضوية عن الطبقة المائية، حيث يستغنى عن الطبقة المائية ويحتفظ بالطبقة الأخرى التي بها الصبغات.

٤- تزال آثار الماء من المحلول المحتوي على الصبغات، وذلك بإضافة كبريتات الصوديوم اللامائية، ثم يرشح بعد ذلك لإزالة المادة الصلبة.

٥- يمكن إجراء عملية تركيز للمحلول ولكن بحرص وذلك بالتبخير (في خزانة الغازات) إلى أن يصبح المحلول مركزاً.

ثانيا: تحضير العمود

١- تحضير مادة العمود(الأولومينا وكربونات الكالسيوم ومسحوق السكروز كل على حده)، بمعاملتها بالمذيب المستخدم وهو إثير بترولي ثم توضع طبقة رقيقة من الصوف الزجاجي في أسفل العمود، ويملأ بالألومينا (بارتفاع ٥ سم) ثم كربونات كالسيوم فوقها (بارتفاع ٧ سم)، ثم السكروز (بارتفاع ٧ سم) مع مراعاة عدم جفاف العمود.

٢- يغسل العمود بكميات من مذيب مكون من خليط من البنزين و ايثر بترولي بنسبة ١ : ٤ وهو المذيب الذي سيستخدم بعد ذلك في إزالة الصبغات، (انظر الشكل رقم ١٢).

الشكل رقم (١٢). يوضح طريقة الفصل اللوني للصبغات النباتية على الأعمدة Column Chromatography .

ثالثاً: فصل وتفريد الصبغات وإزالتها من العمود

١- يضاف المستخلص إلى العمود ثم ينتظر حتى يصل المذيب إلى الطبقة التي تحت سطح العمود مباشرة، حيث يضاف المذيب (المكون من بنزين و إيثر بترولي

obeikandl.com

بنسبة ١ : ٤) بعد ذلك نقطة نقطة؛ وذلك لتفريد الصبغات ثم استخلاصها واحدة تلو الأخرى. (ويلاحظ عند الاستخلاص أن يجمع المستخلص في أنابيب بحيث يجمع بكل أنبوبة عشرون نقطة من المستخلص أو ثلاثون نقطة تبعاً لسرعة الاستخلاص).

٢- تجمع الأجزاء المفردة Fractions بطريقة يدوية أو آلية في أنابيب اختبار، ثم يقاس امتصاصها الضوئي (عند طول موجة ٤٣٠ نانومتر)، ثم يرسم منحنى يوضح العلاقة بين الامتصاص للضوء ورقم الأنبوبة Fraction number.

النتائج

١- ما لون مستخلص الصبغات (قبل إجراء تفريد له) ؟

٢- بعد إجراء فصل الصبغات النباتية كروماتوجرافياً. اذكر ما عدد الصبغات المفصولة وما لون كل منها ؟

٣- ارسم منحنى يوضح العلاقة بين الامتصاص للضوء ورقم الأنبوب Fraction number وذلك في ورقة رسم بياني منفصلة.

Obeikandl.com

مقدمة في فسيولوجيا النبات العملية

تقرير التجربة العملية

عنوان التجربة: ....

اسم الطالب: ....

الرقم الجامعي: ....

تاريخ بدء التجربة: ....

تاريخ نهاية التجربة: ....

تاريخ تقديم التقرير: ....

١– الملخص:

....

....

....

....

٢– الهدف من التجربة:

....

....

....

....

obeikandl.com

٣- المواد وطريقة العمل (مختصرة من التجربة):

....

....

....

٤- النتائج:

....

....

....

٥- المناقشة:

....

....

....

٦- إجابة الأسئلة:

....

....

....

٧- المراجع :

....

....

....

٨- استفسارات عن النقاط غير الواضحة:

....

....

....

obeikandl.com

التجربة رقم (٨): الفصل اللوني الإدمصاصي على الأعمدة للصبغات النبـــــاتيةالمستخـــلصة من بتلات أزهــــــار بعض النبـــاتات

Separation of Flower pigments by Adsorption Chromatography

obeikandl.com

مقدمـــة

الفكرة الأساسية هي التعرف على أنواع المواد الملونة الموجودة في بتلات الأزهار؛ وذلك بإجراء الفصل الكروماتوجرافي الإدمصاصي على الأعمدة.

الأدوات والمواد المطلوبة

١- بتلات أزهار.

٢- هاون صيني.

٣- صوف زجاجي Glass wool .

٤- قمع فصل.

٥- حمام مائي.

٦- عمود زجاجي أو سحاحة .

٧- بنزين Benzene .

٨- كحول ميثايل Methanol.

٩- كبريتات صوديوم لا مائية.

١٠- ألومينا.

١١- مسحوق سكر سكروز Icing Sugar .

١٢- أسيتون .

طريقة العمل

أولاً: استخلاص الصبغات النباتية

١- يؤخذ حوالي ٥ جرام من بتلات الأزهار وتطحن في هاون صيني بعد إضافة ٢٠ مليلتر من مذيب مكون من بنزين Benzene وكحول ميثايل (بنسبة ٢ : ١) ويفضّل إضافة قليل من الرمل للمساعدة على الطحن الجيد.

٢- يرشح المستخلص بورق ترشيح أو خلال صوف زجاجي، ثم ينقل الراشح إلى قمع الفصل.

٣- يضاف حوالي ١٠ مل من الماء المقطر ثم ترج محتويات القمع جيداً، ثم يترك القمع فترة حتى تنفصل محتوياته إلى طبقتين، يجرى بعد ذلك فصل الطبقة المائية السفلى المحتوية على كحول ميثايل في كأس ويستغنى عنها، ويحتفظ بالطبقة العليا التي ما تزال في قمع الفصل.

٤- أعد الخطوة رقم ٣ السابقة وذلك بإضافة الماء إلى الطبقة العليا ثم رج محتويات القمع جيداً ثم اتركه فترة حتى تنفصل المحتويات إلى طبقتين وتخلص من الطبقة المائية السفلى كما سبق واحتفظ بالطبقة العليا. (تعاد هذه الخطوة مرتين أو ثلاث مرات حتى تصبح الطبقة المائية السفلى عديمة اللون تقريباً).

٥- تؤخذ الطبقة العليا (طبقة البنزين) وتوضع في كأس ثم يبخر المذيب بوضع الكأس على حمام مائي مغلي حتى تحصل على مادة صلبة عجينية (لوجود بعض الماء).

٦- تذاب المادة الصلبة المتحصل عليها في حوالي ٥ مل بنزين Benzene ثم يضاف كبريتات الصوديوم اللامائية (Na_2SO_4) لامتصاص أي آثار للماء ويرج جيداً.

٧- تجرى عملية ترويق Decantation لطبقة البنزين الرائقة وتنقل إلى كأس آخر ويجرى التبخير كما سبق حتى الجفاف. (في حالة احتمال وجود آثار من الماء تعاد الخطوتين رقم ٦ ، ٧ مرة أخرى).

ملاحظة: يلاحظ أن الطبقة المائية التي تتخلص منها في المراحل الأولى تحتوي على لون أخضر وهو كنتيجة لوجود الكلوروفيل حيث إنه لايذوب في الماء.

ثانياً: تجهيز العمود للفصل الكروماتوجرافي

١- يستخدم الألومينا أو مسحوق السكر Icing Sugar كمادة حاملة.

٢- يمسك عمود زجاجي ينتهي بأنبوبة مطاطية يمكن غلقها أو فتحها بواسطة مشبك (أو سحاحة زجاجية) في حامل رأسياً ثم يوضع بأسفله قليل من الصوف الزجاجي (أو القطن غير الماص)، مع مراعاة عدم كبسه ليسمح للسوائل بالنفاذ خلاله.

٣- يؤخذ حوالي ٥ جم من المادة الحاملة (ألومينا أو مسحوق السكر والتي سبق تجفيفها على درجة ١١٠ °م لمدة حوالي ١٥ ساعة)، ثم يضاف إليها كمية من البنزين وتحرك حتى تكون معلقاً.

٤- يصب المعلق في العمود الزجاجي بعناية مع مراعاة أن يغطي البنزين سطح المعلق في العمود دائماً. ويراعى عدم وجود فقاعات هوائية محبوسة بالعمود ولتلافي ذلك يطرق على العمود (بواسطة قلم رصاص مثلاً) أثناء تعبئته.

٥- يمكن استخدام كمية إضافية من البنزين إذا لزم الأمر لتكملة نقل المعلق للعمود. ويراعى عدم جفاف العمود في جميع الأوقات.

٦- يضاف حوالي ٢٠ مل أخرى من البنزين إلى العمود ويسمح لها بأن تمر خلال العمود وعند وصول مستوى المذيب إلى حوالي ١ سم فقط أعلى العمود، يغلق الصمام (المشبك).

ثالثاً: إجراء الفصل الكروماتوجرافي

١- يذاب مستخلص الأزهار الجاف (المتحصل عليه في الخطوة رقم ٧ من أولاً). في حوالي ١ مل من البنزين ثم ينقل كمياً بواسطة ماصة إلى أعلى العمود (مع مراعاة المحافظة على عدم التأثير على الطبقة السطحية للعمود).

٢- افتح الصمام (المشبك) ثم اسمح للمذيب بالسريان إلى أن يصل سطحه إلى مستوى سطح العمود بالضبط وعند ذلك أضف كمية من البنزين تدريجياً (حوالي ٢٠ مل) تكفي لفصل المكونات على العمود.

٣- يلاحظ بعد ذلك انفصال اللون الأصفر في طبقة أو طبقتين ولكن أغلب الطبقات الأخرى لم تتحرك وظلت على سطح العمود (وذلك لأن البنزين مذيب غير قطبي).

٤- أضف بعد ذلك حوالي ٥ مل من الأسيتون في البنزين (٥٪ حجم / حجم)، ولاحظ ماذا يحدث.

٥- أضف دفعات كل منها ٥ مل من الأسيتون في البنزين بحيث يكون تركيز الأسيتون في كل دفعة أعلى من السابقة لها إلى أن يضاف الأسيتون فقط ولاحظ ما يحدث.

٦- توضع أنابيب اختبار أسفل العمود ويجرى جمع للأجزاء المفردة وإما بطريقة يدوية أو آلية ويلاحظ أن بعض هذه الأجزاء المفردة يحتوي على الصبغات.

النتـــــائج

١- ماذا تلاحظ بعد إضافة البنزين لتفريد الصبغات على العمود ؟

٢- ماذا حدث بعد إضافة كمية من الأسيتون على البنزين (٥٪) ؟

٣- ماذا يحدث عند إضافة دفعات كل منها (٥ مل) من الأسيتون على البنزين إلى العمود بحيث يكون تركيز الأسيتون في كل دفعة أعلى من السابقة لها إلى أن يضاف أسيتون فقط ؟

obeikandl.com

obeikandl.com

مقدمة في فسيولوجيا النبات العملية

تقرير التجربة العملية

عنوان التجربة: ....

اسم الطالب: ....

الرقم الجامعي: ....

تاريخ بدء التجربة: ....

تاريخ نهاية التجربة: ....

تاريخ تقديم التقرير: ....

١- الملخص:

....

....

....

....

٢- الهدف من التجربة:

....

....

....

....

obeikandl.com

٣– المواد وطريقة العمل (مختصرة من التجربة):

....

....

....

٤– النتائج:

....

....

....

٥– المناقشة:

....

....

....

٦– إجابة الأسئلة:

....

....

....

٧– المراجع :

....

....

....

٨– استفسارات عن النقاط غير الواضحة:

....

....

....

obeikandl.com

التجربة رقم (٩) : فصل الأحماض النووية (DNA) وتقنية (PCR)
Nucleic Acids Extraction and Polymerase Chain Reaction Technique

مقدمـــة

توجد الأحماض النووية في جميع الخلايا الحية حيث إنها ليست مسئولة فقط عن حمل وانتقال الصفات الوراثية (التعليمات الجينية) ولكنها تتحكم أيضاً في ترجمة هذه التعليمات عند تخليق (بناء) البروتينات المختلفة بالخلايا وذلك بتحكمها في ترتيب وتتابع الأحماض الأمينية لكل بروتين يتكون بالخلايا. ويوجد نوعان من الأحماض النووية في الخلايا هما Deoxy ribonucleic acid ويسمى باختصار **DNA** والآخر Ribonucleic acid ويسمى باختصار **RNA**. والأحماض النووية عامة عبارة عن جزيئات كبيرة Macro molecules (أي أنها مركبات مبلمرة ذات وزن جزيئي مرتفع)، وهي تتركب من نيوكليوتيدات عديدة Polynucleotides ترتبط بعضها ببعض بواسطة روابط ثنائية الأستر الفوسفاتية Phosphodiester bonds بين ذرات الكربون ٣ ، ٥ في السكر الخماسي (أحد مكونات النيوكليوتيدة). حيث تتكون النيوكليوتيدة من :

١- سكر خماسي :

- ريبوز (في حمض RNA)
- ديوكسي ريبوز (في حمض DNA)

٢- قاعدة نيتروجينية :

- بيورين :

أدينين A

جوانين G

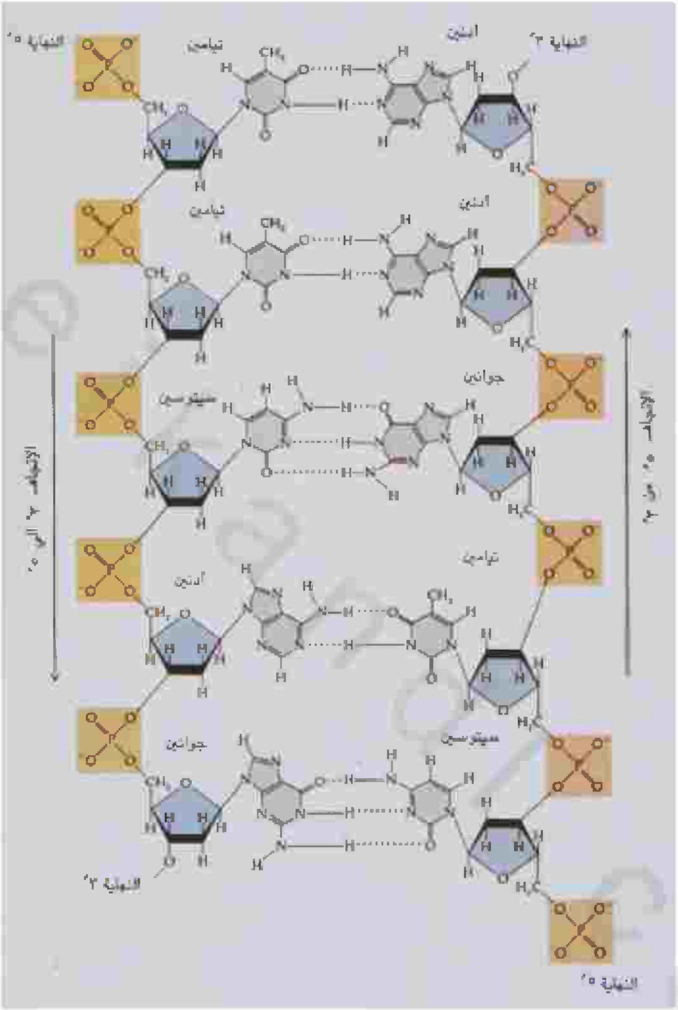
- بريميدين :

ثايمين	T	(في حمض DNA)
يوراسيل	U	(في حمض RNA)
سيتوسين	C	

٣- مجموعة فوسفات

تتحلل الأحماض النووية تحللاً مائياً (إماءة Hydrolysis) جزئياً بواسطة القلويات القوية إلى وحداتها الأساسية (النيوكليوتيدات). أما عند إجراء التحلل المائي للأحماض النووية بواسطة الأحماض فإنها تتحلل تحليلاً كاملاً، فعند استخدام حمض البيركلوريك Perchloric acid (٦ عياري) والتسخين لمدة ساعة على درجة حرارة ١٠٠ °م فإنها تتحلل تدريجياً إلى نيوكليوتيدات والتي تتحلل بدورها إلى فوسفات السكر وتنفرد القواعد النيتروجينية على حالة حرة. ويتكون حمض DNA من سلسلتين عديدة النيوكليوتيدات تلتف حول بعضها لتشكل حلزون مزدوج Double helix ثابت، (انظر الشكل رقم ١٣). ويعود ثباته إلى الروابط الهيدروجينية Hydrogen bonds التي تربط بين أزواج القواعد النيتروجينية إذ يرتبط :

$$T \equiv A \text{ ، } G \equiv C \quad \text{حيث} \quad \frac{A}{T} = \frac{C}{G} = ١ \text{ تقريباً}$$



الشكل رقم (١٣). يوضح التركيب الجزيئي للسلسلة المزدوجة من الحمض DNA (نموذج واتسون وكريك).

اقترح هذا الحلزون من قِبَل العالمان Watson , Crick عام ١٩٥٣، بناء على معلومات الأشعة السينية للعالم Wilkins. وقد أجريت تجارب عديدة لاستخلاص

obeikandi.com

الأحماض النووية بالأخص DNA يستهدف منها حديثا ما يسمى بتحديد البصمة الوراثية DNA Fingerprint Determination وهو مصطلح يطلق على تقنية معملية لمقارنة نمط أجزاء من DNA بين فردين أو أكثر من الكائنات المختلفة وتستخدم هذه التقنية المعملية في معرفة مدى التقارب الوراثي على طول شريط جزئ الحمض النووي DNA . وكان من أفضلها تقنية (ISSR) Inter Simple Sequence Repeat والتي تطورت بواسطة كل من (Bornet, B. and Branchard, M. 2001). ومهما اختلفت الطرق الخاصة بتحديد البصمة الوراثية أو عُدلت إلا أنها تتفق جميعها في استخلاص الحمض النووي أولاً ثم تقدير تركيزه ونقاوته وتضاعفه وتضخيمه بما يسمى بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) ، ولما كانت تلك العمليات معقدة ومكلفة وتحتاج إلى وقت ودقة فقد وقع الاختيار على تلك التقنية التي تعتبر من أبسط الطرق وأقلها مجهوداً.

أولاً: استخلاص الحمض النووي Extraction of DNA

المقصود بالاستخلاص هنا هو إتباع خطوات محددة لترسيب الحمض الحمض النووي من خلايا بعض النباتات باستخدام محاليل كيميائية معينة وبفعل قوة الطرد المركزي وتأثير بعض من المحاليل المنظمة والإنزيمات المناسبة، (انظر الشكل رقم ١٤).

الأدوات والمواد اللازمة

١- نسيج نباتي من (أوراق حديثة النمو). Plant tissue .

٢- نيتروجين سائل Liquid Nitrogen .

٣- محلول استخلاص يسمى (EB-CTAB Extraction Buffer).

وهو يتكون من :

Reagents	Final concentration	For 100 ml.
CTAB	2%	2g
PVP (MW4000)	2%	2g
NaCl	14 M	28 ml
EDTA (pH 8.0)	20 mM	4 ml
Tris-HCl	100 mM	10 ml
2- mercapto ethanol	2%	2 ml

الشكل رقم (١٤). يوضح وحدة أو كابينة استخلاص ال DNA وتحضير محلول PCR

Extraction of DNA and Preparation of PCR Solution.

حضر المحلول السابق ولكن بدون CTAB، PVP، ٢- ميركابتول إيثانول ثم ضعها في الأوتوكلاف للتحضين لمدة ٢٠ دقيقة، وعندما يراد استعمال هذا المحلول المنظم يضاف إليه المركبات الثلاثة السابقة ويسخن على حمام مائي على درجة ٦٥ °م لإذابتها.

٤-	Chloroform : Isoamyl alcohol		24:1 V/V
٥-	Isopropanol		100 %
٦-	WB :		
		Ethanol	76 %
		Ammonium Acetate	10 mM
٧-	TE (1x):		
		Tris-HCl	1 mM
		EDTA (pH 8.0)	0.1 mM
٨-	RNAase		10 mg / mL
٩-	NaCl (5M)		292.2 g / L
١٠-	Ethanol		100 %
١١-	Ethanol		70 %

ملاحظات

- يضاف إنزيم RNAase للتخلص من الحمض النووي RNA.
- يضاف مركب خلات الأمونيوم Amonium acetate لفصل البروتين عن DNA.
- يضاف مركب ٢- مريكابتو إيثانول لتحليل البروتينات.
- يضاف محلول TE كمادة حفظ للحمض النووي DNA.

Obeikandl.com

المقصود بالرموز السابقة

- CTAB = hexa cyclotrimethyl ammonium bromide.
- EDTA = Ethyl diamine tetra acetic acid إيثيلين ثنائي أمين رباعي حمض الخل
- WB = Wash Buffer
- EB = Extraction Buffer
- TE = Tris-Hcl + EDTA
- PVP = Polyvinyl Pyrrolidone

١٢- ماصات دقيقة Automatic pipettes (انظر الشكل رقم ١٥ أ ، ب).

١٣- جهاز طرد مركزي حديث Micro centrifuge (انظر الشكل رقم ١٦ أ ، ب ، ج).

١٤- جهاز الرج السريع Vortex ،

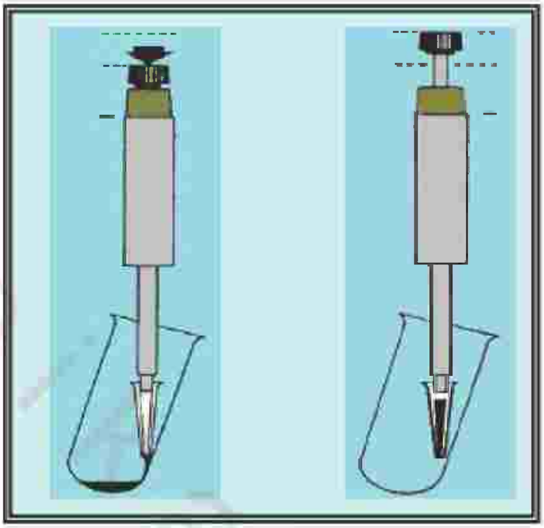
١٥- جهاز تعقيم (تحضين) Autoclave ،

١٦- جهاز قياس الطيف الضوئي (مجهز بأشعة فوق بنفسجية) UV-Spectrophotometer .

١٧- ميزان رقمي حساس Digital balance .

١٨- حمام مائي Water bath .

Obeikandi.com



الشكل رقم (١٥-أ). الماصة الأوتوماتيكية.

الشكل رقم (١٥-ب). يوضح نماذج مختلفة من الماصات الأوتوماتيكي لزوم بعض التجارب الفسيولوجية.

الشكل رقم (١٦ـــ أ). يوضح جهاز الطرد المركزي الدقيق **Micro Centrifuge**.

الشكل رقم (١٦ـــ ب) جهاز الطرد المركزي **Centrifuge**.

الشكل رقم (١٦ـــ جـــ). ١ : أنبوبة الطرد المركزي الدقـــــيق (Micro Centrifuge tube)،
٢ : أنبوبة ترشيح لمستخلص RNA (Filter RNA Extraction tube) ،
٣ : أنبوبة PCR (PCR tube).

خطوات العمل

١- حضر المحلول المنظم EB ثم ضعه في حمام مائي على درجة ٦٥ °م.

٢- اطحن العينات النباتية (أوراق النبات) باستخدام النيتروجين السائل حتى تتحول إلى بودرة ناعمة ثم توضع في أنبوبة سعة ١,٥ مل وتحفظ في الثلاجة مباشـــرة (٣ °م).

٣- أضف ٧٠٠ ميكرولتر (700 μl) من المحلول المنظم EB سابقة التسخين ثم رج جيداً.

٤- حضن الأنبوبة ومحتوياتها في حمام مائي على درجة حرارة ٦٥ °م لمدة ١- ٢ ساعة أو أكثر (كلما طالت المدة كانت كريات Pellets الحمض النووي الناتجة صافية أكثر).

obeikandi.com

٥- استخلص بإضافة حجم متساوٍ من كل من الكلوروفورم وكحول الأيزوأمايل، ثم قلب لمدة ٥ دقائق ثم اطرد العينات بجهاز الطرد المركزي الدقيق بمعدل ١٤٠٠٠ دورة في الدقيقة لمدة ١٠ دقائق على درجة حرارة الغرفة.

٦- انقل الطبقة العليا والمحتوية على الحمض النووي DNA إلى أنبوبة جديدة سعة ١,٥ مل، ثم رسب الحمض النووي باستخدام $\frac{2}{3}$ حجم من محلول الأيزوبروبانول (لمدة ٥ دقائق على درجة حرارة الغرفة) ثم رج برفق (٣-٥ مرات) تلاحظ ظهور خيوط DNA .

٧- لترسيب الحمض النووي تماماً ضع العينة (DNA) في جهاز الطرد المركزي واطرد بمعدل ١٤٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٠ دقائق وذلك لترسيب DNA في أسفل الأنبوبة.

٨- تخلص من الطبقة الطافية (العليا) ثم اغسل الكريات مرتين بمحلول الغسيل (WB).

٩- باستخدام الهواء جفف الكريات المترسبة (الحمض النووي) لمدة ساعة حتى تتأكد تماماً من تطاير جزيئات الكحول المتبقية. أعد إضافة مركب TE بمعدل ٣٠٠ ميكرولتر ثم احفظ العينة بالثلاجة.

١٠- أضف ٣ ميكرولتر من إنزيم RNAase (بمعدل ١٠ مجم/ مل) وحضن على درجة ٣٧ °م لمدة ½ ساعة في حمام مائي.

١١- أضف إلى الحمض النووي المذاب ٢٠٠ ميكرولتر من كلوريد الصوديوم تركيزه ٥ مولار (5M Nacl).

١٢- أعد الترسيب بإضافة ٢ حجم من كحول الإيثانول ١٠٠ ٪ ثم حضن على درجة (- ٢٠ °م) لمدة ٢٠ دقيقة.

١٣- اغسل كريات DNA الناتجة بحوالي ٥٠٠ ميكرولتر من الإيثانول ٧٠ ٪ وجفف بعد ذلك هوائياً ثم اغسل كريات DNA مرة أخرى بإضافة الماء المعقم أو TE (يتميز راسب الحمض النووي الناتج بهذه الطريقة باحتفاظه بجميع خواصه الحيوية وبإمكانية ذوبانه في المحاليل المائية مرة أخرى).

ثانياً: تقدير تركيز ونقاوة Purity حمض DNA

يتم تقدير نقاوة DNA باستخدام جهاز قياس الطيف الضوئي بالأشعة الفوق بنفسجية UV- Spectrophotometer وذلك عند أطوال موجات ٢٦٠ ، ٢٨٠ نانومتر، وتعتبر نسبة النقاوة مقبولة إذا تراوحت قراءة الجهاز من ١,٧ — ١,٩ عند تلك الأطوال الموجية (٢٦٠، ٢٨٠ نانومتر) (انظر الشكل رقم ٣٤ أ ، ب).

ثالثاً: تقنية (PCR) Polymerase chain Reaction

مقدمـــة

PCR هي عبارة عن تقنية جزيئية حيوية تستخدم في إنتاج الدلائل الجزيئية DNA Markers وتعتمد على تضاعف قطعة DNA التي تحتوي على الجين (المورث) المرغوب وذلك بفعل الإنزيمات، ولكي نقوم بعمل هذه التقنية على الوجه الصحيح لابد من معرفة الخصائص التالية :

• تختلف التقنية أحياناً في مكوناتها وكذلك نسب وتركيزات هذه المكونات، تبعاً لعوامل عديدة كمصدر جزئ DNA ونوعية الكائن تحت الدراسة.

• تسمح هذه التقنية بإنتاج أكثر من ١٠ مليون نسخة من جزيئات DNA المستهدفة من جزيئات قليلة جداً وذلك بعملية التضاعف أو التضخيم لجزئ DNA الأساسي بفعل وجود البادئ Primer.

• البادئ (PCR primers) يتكون من سلسلة طولها ١٥- ٣٠ نيوكليوتيدة. فعلى سبيل المثال يكون البادئ :

5' - GTC ACA CAT TAG GGC AGC TGC ACA -3'

والنسبة المثلى للقاعدتين النيتروجينيتين في البادئ لا بد وأن تكون من ٤٠- ٦٠ ٪. وتستخدم القواعد النيتروجينية (جوانين ـ سيتوسين ـ أدينين ـ ثايمين) على صورة مركب يسمى dNTPs.

• لأجل عزل قطعة معينة من الحمض النووي تحمل المورث المطلوب، فإنه يجب تقطيع الحمض النووي بأحد الإنزيمات القاطعة Restriction enzymes وهي إنزيمات متخصصة غالباً في تقطيع سلاسل الحمض النووي من مواقع معينة، وتتوقف مواقع القطع على نوع الإنزيم. لذا لابد أن يكون حجم هذه الإنزيمات القاطعة لا يقل نسبته عن ١ : ١٠ حجم / حجم من محلول التفاعل النهائي. فمثلاً نجد أن الإنزيم يقوم بالقطع في المواقع التي تشير لها الأسهم

5' _ CTG CA⇓G _ 3'

3' _ G⇑AC GTC _ 5'

• لا بد وأن يضبط تركيز محلول كلوريد الماغنسيوم $MgCl_2$ للحصول على نواتج مثلى من تقنية PCR، فقد أوصت التجارب على أن يكون تركيزه بين (١,٥ – ٤ mM) فلو قل تركيز أيون Mg^{2+} يسبب ذلك خفضاً في إنتاجية تقنية ال PCR.

• الكمية المثلى من قالب Template ال DNA في حجم من التفاعل قدره $50\ \mu l$ لابد وأن تتراوح بين ($0.1\text{-}1\ \mu g$) وذلك لل DNA الجينومي (genomic DNA). ويمكن القول بأنه يستخدم جهاز PCR لقياس التفاعل التسلسلي للتعدد الشكلي Polymorphism وذلك لتقدير البصمة الوراثية لل DNA والتي تتلخص في إضافة بادئ

من DNA النقي والمستخلص من النبات وإنزيم DNA polymerase في محلول كابح مناسب، ويحضن التفاعل بدرجة حرارة مناسبة للإنزيم حيث ينفصل DNA إلى سلاسل أحادية منفصلة. تخفض بعد ذلك درجة الحرارة حتى يرتبط البادئ مع الDNA في مواقع معينة من القواعد النيتروجينية، مكملة Integration للقواعد المكونة للبادئ. بعد ذلك ترفع الحرارة إلى ٧٢ °م لبناء أجزاء من DNA تكون مكملة للـ DNA الجينومي. تعاد دورة الحرارة مرة أخرى وتكرر بمعدل ٤٠ مرة لبناء كميات كثيرة من الحمض النووي المتضاعف Ampilified DNA المتكونة وبذلك تظهر البصمة الوراثية لأنواع DNA المستخلصة من النباتات المراد مقارنتها وتحديد أوجه التشابه والاختلاف في جزيئات DNA بينها. تتم المقارنة بوضع النواتج في جهاز الهجرة الكهربية بعد حقنها في هلام Gel (٢٪ أجاروس) ثم يرفع الجهد (الفولت) لمدة معينة فتنفصل جزيئات ال DNA التي تم فيها الالتحام مع البادئ الذي يحتوي على الجين المرغوب.

ونظراً لأن الحمض النووي DNA سالب الشحنة لذلك تهاجر قطع الحمض النووي باتجاه القطب الموجب، وتتناسب سرعة الهجرة مع حجم هذه القطع حيث تهاجر القطع الصغيرة بشكل أسرع. ولتحديد ذلك ينقل الجل بما فيه DNA إلى صبغة بروميد الإثيديم ثم توضع الألواح تحت الأشعة الفوق بنفسجية فتظهر الحزم bands وبذلك يمكن تحديد جزيئات DNA المهجنة وبذلك يمكن تصويرها.

يتكون برنامج تقنية PCR بجهاز Apliton thermal cycler PCR (Thermoline, USA)، كما بالشكل رقم (١٧ أ ، ب). من بروتوكول Protocol يناسب كل من النباتات والفطريات والبكتيريا، كما يلي :

الشكل رقم (١٧ــ أ). جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل PCR Machine (Thermal Cycler) لتضخيم جزئ DNA

الشكل رقم (١٧ــ ب). جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل PCR Machine (Thermal Cycler) لتضخيم جزئ DNA

obeikandl.com

أ) المكونات الأساسية

Master Mix	Per reaction	Notes
Dest.Sterlized water	18.89 µl	
10x PCR Buffer	2.75 µl	
$MgCl_2$ (25mM)	0.55 µl	
dNTPs (20mM)	0.137 µl	بعد إتمام التحضير- يضاف Taq
Taq,DNA Polymerase (5U / µl)	0.22 µl	آخر شيء
Primer (15 P mol / µl)	1.65 µl	
Total	22 µl	يجرى طرد مركزي بمعدل
		١٠٠٠٠ مرة في الدقيقة لمدة
DNA Template (5 ng / µl)	3 µl	دقيقة واحدة.
Final Total / reaction	25 µl	

حالياً : يمكن شراء عبوة واحدة Kit كما بالشكل رقم (١٨).تحتوي على كل من :

محلول PCR المنظم 10 x PCR buffer

كلوريد الماغنسيوم Mg Cl_2 (25 mM)

إنزيم Taq Taq DNA Polymerase (5 ng / µl)

القواعد النيتروجينية d NTPs

obeikandl.com

الشكل رقم (١٨). يوضح عبوات جاهزة من المواد الكيميائيـــــة والمحلول المنظم والإنزيمات (Chemical, Buffer and enzyme) QIA GEN KIT

ب) خطوات العمل

يجب مراعاة درجات الحرارة المطلوبة والأوقات المحددة وعدد مرات إعادة بعض الخطوات، كما بالجدول التالي :

obeikandl.com

معايير برنامج PCR	درجة الحرارة المئوية	الزمن / لكل دورة	عدد مرات الدورات
Initial Denaturation	٩٤ °م	٣٠ ثانية	مرة (دورة) واحدة
Denaturation	٩٤ °م	٣٠ ثانية	٤٠ مرة (دورة)
Annealing	٣٥ °م	٩٠ ثانية	٤٠ مرة (دورة)
Primary Extension	٧٢ °م	٣٠ ثانية	٤٠ مرة (دورة)
Final Extension	٧٢ °م	٥ دقائق	مرة (دورة) واحدة
Cooling	٤ °م	Stand - by	حتى وقت التحليل

شرح الخطوات

Initial Denaturation : تجرى على درجة حرارة لمدة ٣٠ ثانية حيث يبدأ النشاط الإنزيمي Enzyme activation في عمله، حيث يبدأ التغير الأولي.

Denaturation : وتعرف بتغير طبيعة المركب، فعند وصول الحرارة إلى درجة ٩٤ °م يبدأ فصل جزيء DNA إلى خيطين منفصلين (½ دقيقة).

Annealing : وتعرف بمرحلة التثبيت حيث يتم اتحاد البادئ Primer مع DNA الخاص بالنبات وذلك على درجة حرارة تتراوح من ٣٥- ٦٥ °م على حسب طول البادئ، فعند التبريد ببطء قد يحدث إعادة لتكوين الشكل الحلزوني ذي السلسلتين مع إمكانية حدوث تبادل بين السلاسل.

obeikandl.com

Primary Extension : أحياناً تسمى هذه المرحلة بالبلمرة Polymerization أي اتحاد الجزيئات المتشابهة حيث يعمل إنزيم DNA Polymerase على ملء الفراغ الذي يوجد بين قطعتي البادئ.
يتم تكرار المراحل الثلاثة الأخيرة بمعدل ٤٠ مرة (دورة) حتى يتم التحام البادئ مع DNA للنبات.

Final Extension : يتم فيها تضاعف الجزء الذي حدث به التحام بين البادئ Primer و DNA (النبات) أي Genomic DNA

Cooling وتسمى (Hold temperature at 4°c) حيث تحفظ العينة (دائماً) على هذه الدرجة

ج) التفريد الكهربي الهلامي Gel – Elctrophoresis

بعد الانتهاء من عملية التضخيم Amplification لجزيئات الحمض النووي DNA، تبدأ عملية التفريد (الفصل) الكهربي على ألواح الجل، (انظر الشكل رقم ١٩).

الشكل رقم (١٩). يوضح (أ) وحدة التفريد الكهربائي الأفقية (ب) وحدة القوى لجهاز التفريد الكهربي، Electrophoresis Power Pack

Obeikandl.com

١- لتحضير ١٠٠ مل من محلول الأجاروس (Agarose 1.2٪)، زن ١.٢ جم من الأجاروس في كأس beaker أو في دورق مخروطي conical flask ثم أضف إليه ١٠٠ مل من محلول TBE (5x) أو TAE.

٢- استخدم الميكروويف microwave (انظر الشكل رقم ٢٠) أو مسطح ساخن Hot plate لإذابة المحلول حتى يصبح صافياً.

الشكل رقم (٢٠). ميكروويف Microwav>e.

٣- اترك المحلول ليبرد حتى درجة حرارة ٥٥ °م قبل إجراء عملية الصب، ثم أضف إليه صبغة بروميد الإيثيديم Ethidium bromide بمعدل ½ ميكروجرام / مل.

٤- حدد قالب أو مسطح الجل بوضع إطار من ورق معدني لاصق.

٥- ضع المشط Comb بالقالب عمودياً بحيث تكون أسنانه فوق سطح القالب بحوالي ١- ٢ مم.

٦- صب المحلول الهلامي (الجل) في القالب بعمق ٥ مم، ثم دع الجل يبرد حتى يتماسك (يصبح صلب) لمدة حوالي ٢٠ دقيقة على درجة حرارة الغرفة.

٧- انزع المشط برفق وحرص لأعلى ونلاحظ تكون الفتحات الصغيرة (العيون) في قالب الجل. بعد ذلك اغمر الجل بمحلول TAE المنظم أو TBE (نفس المستخدم في التحضير سابقاً) حتى تغمر الفتحات.

٨- لتحميل العينات على جل الأجاروس، اخلط ١٠ ميكرولتر من صيغة البروموفينول الزرقاء Bromophenol blue + ٣٠٪ جليسرول (تركيزه ٠,٢٢٥) باستعمال الماصة المخصصة لذلك بمعدل ٥ – ١٢ ميكرولتر منها في كل فتحة (عين).

(مادة البروموفينول الزرقاء تشير إلى مدى ما وصل إليه DNA مع ملاحظة أن DNA يتحرك من القطب السالب إلى الموجب).

٩- توضع القوالب بجهاز التفريد الكهربي بعد تشغيله على جهد من ٥٠ – ١٥٠ فولت حتى تهاجر (تتحرك) علامات الصبغة dye markers إلى مسافات مناسبة (تعتمد على مدى رؤية حزم الحمض النووي DNA bands) ، انظر الشكل رقم (٢١أ، ب).

١٠- يجرى الفصل الكهربي لمدة ثلاث ساعات تقريباً، ثم تنقل العينات (قوالب الجل) إلى جهاز التصوير ذي الأشعة الفوق بنفسجية المكون من UV-transilluminator وكاميرا Polaroid، (انظر الشكل رقم ٢٢).

الشكل رقم (٢١ــ أ). يوضح وحدة نظام تحليل الصورة الناتجة من التفريد الكهربي.

الشكل رقم (٢١ ــ ب). يوضح تحليل التفريد الكهربائي لمستخلص DNA.

obeikandl.com

الشكل رقم (٢٢). يوضح جهاز العرض الضوئي بالأشعة الفوق بنفسجية Ultra violet transilluminate.

تحضير المحاليل والصبغات

محلول TBE [5x]

Tris	٥٤	جم
Boric Acid	٢٧,٥	جم
EDTA (0.5M)	٢٠	مل

محلول TBE [1x]

لتحضيره يجرى تخفيف محلول TBE [5x] بنسبة ١ : ٤ ماء مقطر.

أي نسبة ٢٠ ٪ محلول TBE [5x] يضاف إليها ٨٠ ٪ ماء مقطر .

صبغة Ethidium Bromide

تتكون من مسحوق الصبغة بمعدل ١٠ مجم لكل ١٠ مل ماء مقطر.

Loading buffer (Bromophenol blue)

يحضر بإذابة ٧ مل ماء مقطر .

+ ٢,٥ جم سكروز.

+ ٢٥ مجم من مسحوق الصبغة Bromophenol blue .

+ ٣ مل ماء مقطر (مرة أخرى).

جل الأجاروس Gel – Agarose

١ جم أجاروس ٢ ٪ .

+ ١٠٠مل محلول منظم TBE (1x) .

+ ٥ ميكرولتر من Ethidium Bromide .

obeikandl.com

مقدمة في فسيولوجيا النبات العملية

تقرير التجربة العملية

عنوان التجربة: ....

اسم الطالب: ....

الرقم الجامعي: ....

تاريخ بدء التجربة: ....

تاريخ نهاية التجربة: ....

تاريخ تقديم التقرير: ....

١- الملخص:

....

....

....

....

٢- الهدف من التجربة:

....

....

....

....

obeikandl.com

٣– المواد وطريقة العمل (مختصرة من التجربة):

....

....

....

٤– النتائج:

....

....

....

٥– المناقشة:

....

....

....

٦– إجابة الأسئلة:

....

....

....

٧– المراجع :

....

....

....

٨– استفسارات عن النقاط غير الواضحة:

....

....

....

obeikandi.com