وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الانبار
كلية العلوم

القسم: علوم الحياة
المادة: بايولوجي جزيئي عملي
عنوان المختبر: استخلاص الحامض النووي

المختبر الثاني

اعداد مدرس مساعد هاله مهدي حمد
كلية العلوم قسم علوم الحياة

استخلاص الحامض النووي

- الأحماض النووية هي عبارة عن جزيئات كبيرة الوزن الجزيئى توجد في جميع الخلايا الحية في صورة طليقة أو متحدة مع البروتين ،وتتكون أساسا من وحدات عديدة من النيكلوتيدات الأحادية المرتبطة مع بعضها وتحمل الصفات الوراثية وهى المسؤولة عن نقل المعلومات لتخليق البروتين. وبدأ علماء (الكيمياء الحيوية) أبحاثهم على الأحماض النووية منذ حوالي مائة عام مضت حين إستطاعوا فصلها من أنوية الخلايا فالأحماض النووية توجد في كل الخلايا الحية حيث أنها ليست فقط مسؤولة عن حمل وانتقال (الصفات الوراثية) ولكنها تتحكم أيضاً في ترجمة هذه التعليمات عند تكوين البروتينات المختلفة بالخلايا وذلك بتحكمها في ترتيب وتتابع الأحماض الأمينية لكل بروتين يتكون بكل خلية والأحماض النووية لها وزن جزيئيي مرتفع وهي عبارة عن نيوكلتيدات (بولي نيوكلتيدات) وحداتها البنائية هي النيوكلتيدات.

خواص الحامض النووى DNA

- تمتص القواعد الآزوتية من نوع البيورين والبيرميدين الموجودة في الأحماض النووية الأشعة الفوق بنفسجية بدرجة كبيرة عند موجة ذات طول 260 نانوميتر.
- عند تسخين الحمض النووي DNA المبلمر بدرجة كبيرة ببطء فان السلسلتين الحلزونيتين تبتعدان عن بعضهما وتسمى عملية الابتعاد هذه بعملية انفصال السلسلتين Melting. وبزيادة درجة الحرارة تزداد درجة الامتصاص النوعي , وتسمى درجة الحرارة التي يحدث عندها الزيادة المفاجئة في الامتصاص للأشعة فوق البنفسجية بدرجة حرارة الانفصال Melting temperature Tm للحمض النووي , ولكل نوع من انواع الحمض النووي DNAدرجة Tmخاصة به .
- ويمكن فصل سلسلتي الحمض النووي DNAعن بعضهما إذا انخفض رقم pHالمحلول عن 4 او اذا ارتفع عن 11 . حيث أن الأحماض النووية عبارة عن الكتروليتات عديدة Polyelectrolytes مع وجود شحنة سالبة واحدة لكل وحدة نيوكليوتيدية (هذه الشحنة ناتجة عن تاين الفوسفات ثنائي الاستر) في نطاق pHمن 4 الى 11 .
- عند اعادة تبريد المحلول ببطء فانه يحدث اعادة لتكوين الشكل الحلزوني ذو السلستين مع امكانية حدوث تبادل بين السلاسل وتسمى هذه العملية Annealing.

استخلاص الحامض النووي

- تم إجراء أول عزل للحمض النووي في عام 1869 من قبل فريدريك ميشر. ويعتبر في الوقت الحاضر مجرد إجراء روتيني في البيولوجيا الجزيئية أو تحليلات الطب الشرعي. بالنسبة للطريقة الكيميائية ، فهناك العديد من الطرق المختلفة المستخدمة في الاستخلاص، واختيار المجموعة الصحيحة سيوفر الوقت في إجراءات الاستخلاص التنقية.

الخطوات الاساسية للاستخلاص

- اولها يجب جمع الخلايا المراد دراستها.
- تحطيم أغشية الخلايا ليتم مزج الحمض النووي مع السيتوبلازم داخل (تحلل الخلية).
- يتم تكسير الدهون من غشاء الخلية والنواة بالمواد الخافضة للتوتر السطحي.
- تكسير البروتينات عن طريق إضافة انزيم البروتياز (اختياري).
- تحطيم الحمض النووي الريبي عن طريق إضافة RNase(اختياري).
- يتم معالجة العالق بمحلول ملح مركز (محلول ملحي) لجعل حطام الخلايا مثل البروتينات المكسورة والدهون والحمض النووي الريبي RNA تتكتل معًا.
- الطرد المركزي للمحلول ، الذي يسهل فصل الحطام الخلوي المتكتل عن الحمض النووي DNA.
- تنقية الحمض النووي من البروتينات والأملاح والكواشف المستخدمة أثناء خطوة تحلل الخلية. الإجراءات الأكثر شيوعًا هي:

1- ترسيب بالإيثانول عادة يتم بواسطة الإيثانول المثلج أو الأيزوبروبانول. نظرًا لأن الحمض النووي غير قابل للذوبان في هذه الكحوليات ، فإنه سوف يتجمع معًا ، وتتكون بشكل حبيبات عند الطرد المركزي. يتم تحسين ترسيب الحمض النووي عن طريق زيادة القوة الأيونية ، عادة عن طريق إضافة أسيتات الصوديوم.

2- استخلاص الفينول - الكلوروفورم الذي يمسخ فيه الفينول البروتينات في العينة. بعد الطرد المركزي للعينة ، تبقى البروتينات الممسوخة في الطور العضوي بينما يتم خلط الطور المائي المحتوي على الحمض النووي مع الكلوروفورم لإزالة بقايا الفينول من المحلول.

3- تنقية بواسطة Minicolumn الذي يعتمد على حقيقة أن الأحماض النووية ترتبط (بالامتزاز) بالطور الصلب (السيليكا أو غيرها) اعتمادًا على الرقم الهيدروجيني وتركيز الملح في المحلول.

يمكن إزالة البروتينات الخلوية والهيستون المرتبطة بالحمض النووي إما عن طريق إضافة البروتياز أو عن طريق ترسيب البروتينات مع أسيتات الصوديوم أو الأمونيوم ، أو استخلاصها بمزيج الفينول وكلوروفورم قبل ترسيب الحمض النووي.

بعد العزل ، يتم إذابة الحمض النووي في محلول قلوي قليلًا ، عادةً في محلول TE، أو في ماء شديد النقاء.

1 –استخلاص الحامض النووي من الانسجة النباتية

- تطحن الأنسجة المراد إستخلاص الأحماض النووية منها على درجة حرارة منخفضة (أقل من40 درجة م) وذلك بعد إضافة محلول مائي للفينول المركز وصوديوم دوديسايل سلفات Sodium dodecyl sulfate أو أي مادة اخرى مناسبة لتقليل الجذب السطحي إليها . بعد هذه المعاملة يتغير التركيب الطبيعي للبروتينات الموجودة بالأنسجة وتصبح غير ذائبة في المحلول المائي وترسب بينما نجد أن الأحماض النووية تظل ذائبة في المحلول المائي. وبترك المطحون المتجانس الناتج ينفصل إلى طبقتين سائلتين ويمكن الإسراع بفصل الطبقتين بإجراء عملية طرد مركزي على درجة حرارة منخفضة . حيث يتم بعدها فصل الطبقة العليا المائية (والمحتوية على الأحماض النووية جميعها) عن الطبقة السفلى الأخرى الغنية بالفينول والتي يستغنى عنها.
- ترسب الأحماض النووية من الطبقة المائية المفصولة وذلك بإضافة كحول الإثيل اليها بعد ذلك يفصل الراسب المتكون بواسطة الطرد المركزي . وتنقى الأحماض النووية به بإذابته في الماء ثم إعادة ترسيبه بالكحول كما سبق وفصله بالطرد المركزي على صورة نقية.
- ويمكن فصل كل من الحمضين النووين DNAو RNA كل على حدة بعد ذلك إما بمعاملته بإنزيم ريبونيوكليز Ribonucleasa وذلك لتكسير الحمض النووي RNA وتحويله إلى جزيئات صغيره ذائبة مع ترك الحمض النووي DNA كما هو بدون التأثير عليه. أو بمعاملة الخليط بإنزيم ديؤكسي ريبونيوكليز Deoxyribonuclease حيث تتكسر جزيئات الحمض النووي DNA تاركاً الحمض النووي RNA بدون تأثر . وبعد التخلص من أحد الحمضين النوويين يضاف محلول مائي للفينول وذلك لترسيب وإزالة ماتبقى من بروتين ثم تفصل الطبقة المائية المحتوية على الحمض النووي المراد الحصول عليه بالطرد المركزي . حيث بضاف لها بعد ذلك كحول الإيثايل لترسيب الحمض النووي.
- وحيث أن الحمض النووي DNAعلى صورته الطبيعية عبارة عن لولب حلزوني طويل فإن إضافة كحول الإيثايل إليه ينتج عنه ترسيب DNAعلى هيئة راسب طويل ليفي حيث يمكن الحصول عليه من المحلول.
- بلفه حول محرك زجاجي حيث يوضع بعد ذلك في مذيب مناسب مثل الأسيتون لتجفيفه حيث يسهل إزالته جافاً عن المحرك الزجاجي ويحفظ جافاً في زجاجات على درجة حرارة – 20 درجة م.

2- استخلاص الحامض النووي DNAمن البكتريا السالبة لصبغة غرام .E.coli

- تنمية الخلايا:

1. تنشر البكتريا المراد استخلاص الاحماض النووية منها على وسط صلب ملائم وتحضن بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة، بعدها تؤخذ مستعمرة منفردة وتستعمل لتلقيح50 مل من وسط لوريا السائل Luria broth وتحضن بدرجة 37م لمدة 24 ساعة.
2. ينقل المزروع السائل إلى أنبوبة بولي اثيلين معقمة و ينبذ بسرعة 4000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق.
3. يزال الرائق ويعلق الراسب في5 مل من دارئ TE ثم تنبذ الأنابيب بسرعة 4000 دورة/دقيقة .
4. تكرر الخطوة السابقة (عملية الغسل Washing) لمرتين بعدها يعلق الراسب في 5 مل من الدارئ وتحفظ الانابيب بدرجة 4 م لحين الاستعمال .

- استخلاص الدنا من البكتريا

1- انقل المزروع البكتيري الى انبوبة ابندروف .
2- ضعها في جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000-16000 دورة لمدة دقيقة واحدة .
3- اضف 200 µ امن محلول GT buffer (محلول يستعمل لتنظيم pH) الى الانبوبة ثم رجها بقوة
4- احضنها بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.
5- اضف 200 µlمن محلول بفر GB (لتحليل مكونات الخلية) ثم رج بقوة لمدة 5 ثوان .
6- احضن بدرجه 70 م لمده 10 دقائق.
7- اضف 5 µlمن محلول Rnase الى الانبوبه .
8- احضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.
9- اضف 200 µlمن محلول الايثانول المركز ثم رج الانبوبه بقوة.
10- ضع انبوبة spin column GD في داخل انبوبة جمع collection tube ثم انقل محتويات الانبوبه اليها .
11- ضع الانبوبة في جهاز السنترفيوج بسرعة 14-16000 دورة لمدة 2 دقيقة .
12- استبدل انبوبة الجمع بواحدة جديدة .
13- اضف 400 µlالى انبوبة .GD
14- ضع الانبوبة في جهاز السنترفيوج بسرعة 14-16000 دورة لمدة 30 ثانية.
15- اضف 600 µlمن محلول الغسل . Wash buffer
16- ضع الانبوبة في جهاز السنترفيوج بسرعة 14-16000 دورة لمدة 30 ثانية.
17- استبدل انبوبة الجمع بانبوبة ابندروف لتخزين الدنا فيها .
18- اضف 100 µlمن محلول . Elution buffer
19- اترك الانبوبة لمدة 3-5 دقائق حتى يمتص المحلول من قبل اغشية السيليكا.
20- ضع الانبوبة في جهاز السنترفيوج بسرعة 14-16000 دورة لمدة 30 ثانية, ثم خذ انبوبه الابندروف واحكم اغلاها واخزنها في درجة حرارة -4 ?م لحين استعمالها لاحقا في الفحوصات المطلوبة .

3- استخلاص الحمض النووي DNA من الدم

- تجميع الدم بواسطة أنابيب تجميع الدم
- عمل فصل لها بواسطة جهاز الطرد المركزي300 دورة في الدقيقة لمدة 15 دقيقة.
- تظهر 3 طبقات بعد عملية الفصل سحب الطبقة العليا وهي البلازما و وضعها في أنابيب صغيرة
- نعمل على الطبقة الوسطى والسفلى وذلك بإضافة محلول تكسير كريات الدم الحمراء RBC Lysis Solution.
- يرج باليد لمده 5 دقايق
- نضيف محلول ترسيب البروتين Protein Precipitation Solution نعمل لها رج ونتركها 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة.
- نضع العينات في جهاز الطرد المركزي centrifuge سوف يظهر طبقتين نحتفظ بالرائق ونتخلص من الراسب وذلك بنقل الرائق لأنابيب جديدة.
- اضافه اثانول 70% وتخلط باليد لمده 15 دقيقه نضع العينات في جهاز الطرد المركزي ويتم ازاله الرائق ومن ثم قلب الانبوبه على ورق ماص و تترك 15 دقيقه.
- اضافه الماء المؤين و بعدها تحفظ بالثلاجه
- تترك عينة الحمض النووي الدنا DNAلمدة يوم كامل لتذوب ثم نقيس التركيز بجهاز الطيف المرئي Spectrophotometer.
- تظهر لنا فصل خيوط الـ DNAالمستخلص من الدم.

خطوات استخلاص الحمض النووي ال DNAمن بذور النبات بطريقة CTAB

1- طحن - ٢٠٠ ملغم من البذور النباتية (بوجود النتروجين السائل) ومن ثم إضافة ٥٠٠ ميكرولتر من محلوول منظم CTAB .

2- ينقل الخليط لأنبوبة صغيرة ثم يحضن في حمام مائي ٥٥ درجة مئوية لمدة 15 دقيقة

3- بعد التحضين تنقل لطرد المركزي في جهاز الطرد المركزي ١٢٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ٥ دقائق.

4- ينقل الرائق إلى أنابيب طرد مركزي دقيقة ولكل أنبوبة يضاف ٢٥٠ ميكرولتر من خليط الكلوروفورم او كحول الايزواميل .

5- يخلط بالتقليب إلى أن يتكون مستحلب, ثم يطرد بالطرد المركزي ١٣٠٠٠ دورة/دقيقه لمدة دقيقه.

6- تنقل الطبقة المائية العليا فقط إلى أنبوبة نظيفة ويضاف لها ٥٠ ميكرولتر من خلات الصوديوم و مباشرة 500 ميكرولتر من الكحول الاثيلي المطلق المبرد.

7- تقلب الأنابيب عدة مرات بخفه لترسيب الحامض النووي دون تكسيره وعندها يمكن رؤية الراسب الخيطي - للحموض النووي. او يمكون وضع الانابيب لمدة ساعة فوي ثلج - 20 م بعد إضافة الكحول السابق لترسيب ال DNA.

8- لغسل الحمض النووي يرسب باستخدام طرد مركزي ثم يتخلص من الطبقة الرائقة ويضاف 500 ميكرولتر من الكحول الاثيلي الثلجي ٧٠ ٪ وتقلب الأنبوبة بخفه وتعاد هذه الخطوة بالطرد المركزي ١٣٠٠٠ دورة/دقيقه لمدة دقيقه حتى يتكون الراسب ابيض في قاع الأنبوبة.

9- يتم التخلص من الرائق ويترك راسب الحامض النووي ليوف بالهواء ١٥ دقيقة تقريبا(تتم العملية في كابينة عزل معقمة, نتخلص بهذه الخطوة من الكحول.

10- يعاد إذابة الحمض النووي في الماء المقطر او - . TE puffer

11- في حال توفر إنزيم -) Rnase ١٠ميكروغرام/مل(يضاف إلى المواء قبول إذابة محلول الحموض النووي في الماء) ١٠ ميكرولتر /مل من الماء.

12 يتم تقدير نقاوة الحمض باستخدام - spectrophotometer

12-تخزين العينة من الحمض النووي DNA في تجميد العميق

المصادر

- http://www.uobabylon.edu.iq/uobColeges/lecture.aspx?fid=6&depid=3&lcid=58741
- http://www.geneaid.com/products/dna-extraction/genomic-dna-purification-0
- https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_extraction