فصل الحمض النووي الديوكسي ريبوزي من الأنسجة النباتية DNA

٢٥١حدق

العام الجامعي 1435 هـ

امل الغامدي

أولاً :الاستخلاص Extraction

- استمرار البحث عن طرق أكثر دقة للحصول على حمض نووي أكثر نقاوة أدى إلى تطوير العديد من البروتوكولات
- بالرغم من ذلك لازالت الخطوات الأساسيه لعملية فصل الحمض النووي بدون تغيير حيث يتم عزله عن المواد الخلوية الأخرى بطريقة تضمن الحفاظ عليه في صورة أقرب إلى الشكل الطبيعي دون تكسر.
- يمكن تعديل الطرق الرئيسية مع التغييرات البسيطه للحصول على منتج بكميات تكفي لعدة استخدامات وهي:

أولاً :الاستخلاص Extraction

1- طحن الأنسجة المحتوية على الحمض النووي المراد دراسته أو الكشف عنه , وتسمى الخطوة تحليل الخلايا Cell lysis

- باستخدام طرق ميكانيكيه مثل الطحن مع النيتروجين السائل لتكسير الجدر والأغشية الخلوية
- و طرق حيوية مثل استخدام انزيم المحلل Lysozyme
- أو طرق كيميائية بالمحاليل عالية القلوية

2- تحليل الدهون في الأغشيه البلازميه باستخدام ماده منظقه detergent مثل : Sodium dodecyl suphate(SDS).

- يجب أن يتم الفصل في وسط له ظروف تقوم بتثبط الإنزيمات والمواد الكيميائيه الضاره.
- حيث توضع الخلايا أثناء الطحن التام مباشرة في محلول منظم ملائم مثل CTAB buffer

ما هي EDTA و CTAB؟

- هي عوامل خلب Chelating asgent تقوم بتجميع وحجز الأيونات الموجبه ثنائية التكافؤ مثل ايونات المغنيسيوم Mg^{++} وايونات الكالسيوم Ca^{++} .
- وبالتالي تلعب دورا في تثبيط عمل انزيم المحلل للحمض النووي Dnase الذي يحتاج إلى هذه الأيونات ليقوم بعمله في تحليل الحمض النووي DNA.

ثانياً :التنقيه Purification

- يتم إزالة الجسيمات الغير قابلة للتحلل حيث يتم فصل البروتينات الهستونيه والخلويه والمواد الغير قابلة للذوبان باستخدام الطرد المركزي ومواد مذيبة كالكلوروفورم.
- لإزالة البروتينات:

1- تحليل البروتينات باستخدام انزيم محلل للبروتينات prtoease وهي خطوه احتياطيه يتم اجراءها عادة للتأكد من عدم (أو تقليل) تلوث عينة الحمض النووي بالبروتينات.

2- أو ترسيب البروتينات باستخدام مادة خلات الصوديوم أو الأمونيوم Sodium or ammonium acetate

3- أو فصل البروتينات باستخدام مخلوط من الكلوروفورم والفينول، قبل خطوة ترسيب الحمض النووي.

- يجب ترسيب الحمض النووي وتحويله من الصوره الذائبه إلى الراسب الخيطي باستخدام الكحول الايثيلي المثلج أو كحول الايوزبروبانول لعدم ذوبانية الحمض النووي بها حيث يتم فصل الأملاح الملوثة له(القابلة للذوبان في الكحول)ويظهر الحمض في صورة راسب خيطي.

ثالثاً :الإذابه و الحفظ

- يتم تعليق الحمض النووي النقي بإذابته في ماء مقطر معقم أو في محلول منظم مثل TE (Tris EDTA) buffer.
- باستخدام هذه الطريقة يمكن الحصول على حمض نووي نقي وسليم من الأنسجه النباتيه.

رابعاً :التحقق من جودة الحمض النووي

- يتم عن طريق فصل العينة الناتجه من خطوات الاستخلاص على جل الاجاروز المصبوغ ببروميد الإثيديوم Ethedium bromide.
- ثم يتم تصوير قطع الحمض النووي الناتجه تحت ضوء الأشعه فوق البنفسجيه UV (Ultra violet wave lengths)

خامساً :التحقق من وجود الحمض النووي

- بإضافة صبغه ثنائي فينيل الأمين Diphenyl amine إلى الحمض النووي DNA المستخلص.
- ويتم تسخين الحمض النووي لدرجة أعلى من ٩٥درجة مئوية
- عند وجود الحمض النووي DNA في وسط حمضي لوجود الصبغة السابقة، فينتج تفاعل لوني ويعطي مركب أزرق اللون
- لتحديد تركيز الحمض النووي يتم قراءة كثافة امتصاص محلول الـ DNA المستخلص للأشعة عند ٦٠٠نانومتر ومقارنته مع منحنى قياسي من تركيز الحمض النووي المعروف مسبقاً.

سادساً :درجة نقاوة الحمض النووي

- لقياس درجة نقاوة الحمض النووي :يتم قياس الكثافة الضوئية عند 260 و280 نانومتر.
- حيث يمتص الحمض النووي الأشعه فوق البنفسجيه عند $\frac{260}{280}$

بينما تمتص البروتينات الحلقية الموجات عند 280 نانومتر فقط.

- الحمض النووي النقي يعطي نسبة $\frac{260}{280}$

تساوي 1.8 وقد تكون خالبة نسبيا من البروتينات.

- وتعتبر العينة ملوثة بالبروتينات إذا كانت النسبة أقل من 1.8.

سابعاً :قياس كمية الحمض النووي

- يمكن قياس كمية الحمض النووي باستخدام إنزيمات القطع، ثم فصله على جل الاجاروز المصبوغ ببروميد الإثيديوم ومقارنة كتلته مع كتلة حمض نووي معلوم الوزن الجزيئي (DNA marker or ladder).

الأدوات:

محلول منظم CTAB buffer	أنابيب طرد مركزي دقيقه
الكحول الاثيلي الثلجي المطلق و ٧٠٪	هاون ومدقة
النيتروجين السائل	جهاز طرد مركزي دقيق
٧.٥مولار من خلات الأمونيوم	حمام مائي ٥٥درجة مئوية
الكلوروفورم :كحول الايزواميل (٢٤:١)	محلول منظم TBE 1X
محلول التحميل 6X	جل الاجاروز وجهاز الفصل الكهربي

خطوات العمل

1. يطحن ٢٠٠ملغم من اوراق النبات الغضه في ٥٠٠ميكرولتر من محلول منظم CTAB buffer.
2. ينقل الخليط لأنبوبة صغيرة ثم يحضن في حمام مائي ٥٥درجة مئوية رجاج لمدة ١٥دقيقه.
3. يطرد الخليط في جهاز الطرد المركزي ١٢٠٠٠لفة\دقيقة لمدة ٥دقائق.
4. ينقل الرائق إلى أنابيب طرد مركزي دقيقة ولكل أنبوبة يضاف ٢٥٠ ميكرولتر من خليط الكلوروفورم والفينول.
5. يخلط بالتقليب ثم الطرد المركزي ١٣٠٠٠لفة\دقيقه لمدة دقيقه.

خطوات العمل

6. تنقل الطبقة المائية العليا فقط الى أنبوبة نظيفه ويضاف لها ٥٠ميكرولتر من خلات الصوديوم ومباشرة ٥٠٠ميكرولتر من الكحول الاثيلي المطلق الثلجي.

7. تقلب الأنابيب عدة مرات بخفه لترسيب الحمض النووي دون تكسيره وعندها يمكن رؤية الراسب الخيطي للحمض النووي ولضمان الترسيب الكامل يمكن وضع المحلول في -٢٠درجة مؤية لمده ساعه.

8. بعد الترسيب يمكن سحب الحمض النووي على نهاية الماصه الدقيقه بتحريكها دائربا في المحلول الثلجي.

9. لغسل الحمض النووي ينقل الراسب الى أنبوبة بها ٥٠٠ميكرولتر من الكحول الاثيلي الثلجي ٧٠٪ وتقلب الانبوبه بخفه وتعاد هذه الخطوه أو يمكن استبدالها بالطرد المركزي ١٣٠٠٠لفة/دقيقه لمدة دقيقه حتى يتكون الراسب من الحمض النووي في قاع الانبوبة.

خطوات العمل

10. يتم التخلص من الرائق وتعاد الخطوه السابقه مرتين متتاليتين.

11. بعد الغسل، يرسب الحمض النووي بالطرد المركزي.

12. يتم التخلص من الرائق ويترك راسب الحمض النووي ليجف في هواء المعمل (١٥دقيقة تقريبا).

13. يعاد إذابة الحمض النووي في الماء المقطر المعقم الخالي من إنزيم Dnase (بحجم ٥٠- ٤٠٠مبكرولتر / مل من الماء) حسب كمية الحمض النووي المستخلص؟؟؟

14. في حال توفر إنزيم (Rnase ١٠ميكروجرام/مل)يضاف الى الماء قبل إذابة محلول الحمض النووي DNAفي الماء (١٠بحجم ميكرولتر /مل من الماء).

التخلص من الإنزيم DNase

- بعد إذابة الحمض النووي يحضن المحلول في حمام مائي ٦٥ درجه مئوية لمدة ٢٠دقيقة للتخلص من أي أنزيمات محللة للحمض النووي DNA(مثل DNases).
- يحفظ الحمض النووي في درجة حرارة ٤درجة مئويه.