عزل الحمض النووي DNA من الكائنات الدقيقة بدائية النواه

مثل بكتيريا القولون

Escherichia coli

ملخص خطوات عزل الحمض النووي DNA

أولاً: الاستخلاص DNA Extraction:

1- تحليل الخلايا Cell Lysisوتحرير الحمض النووي: تحويل الخلية إلى صورة spheroplast عن طريق هضم الجدار الخلوي. تتم هذه الخطوة باستخدام انزيمات هاضمة مثل Lysozymeأو المواد شديدة القلوية Alkaline analysis ويستخدم السكروز للحفاظ على الضغط الاسموزي الملائم لعدم انفجار الـ spheroplast من الانفجار.

2- التخلص من المكونات الأخرى في الـ spheroplast مثلال الجزيئات الكبرى وأهمها البروتينات وانسياب الحمض النووي ومحتويات الخلايا.

ثانياً: التنقية DNA purification: فصل الحمض النووي DNA الكروموسومي عن الحمض النووي الريبوزي RNA والبلازميد.

أولا: تحليل الخلية وتحرير الحمض النووي DNA:
تحلل الخلية باستخدام الإنزيمات المحللة أو حبيبات زجاجية او بلورية في أثناء الطرد المركزي.

دور الإنزيم Lysozymre:
يقوم بتحفيز التحليل المائي للرابطة الجليكوسيدية لمكونات الجدار الكربوهيدراتية (peptidoglycan) وبالتالي تحطيم الغلاف الخارجي ويحرر الحمض النووي DNAوغيره من مكونات الخليه.
دور المحلول المنظم Buffer solution:
لا بد أن يكون الوسط المتواجد به محلول المحتوي على الـ DNA في صورة محلول منظم، محلول ملحي يحتوي على EDTA.
بسبب تأين الحمض النووي DNA وحمله لشحنه سالبه فإنه أكثر ثباتاً وذوبانا في المحاليل الملحيه عنه في الماء المقطر.

أهمية الـ EDTA:

1- ترتبط مع الأيونات الموجبة ثنائية الشحنه مثل (Cd^{+2}, Mg^{+2}, Mn^{+2}) التي قد تكون أملاح مع مجموعات الفوسفات الأيونية في الحمض النووي DNA.

2- تثبيط الإنزيم المحلل للحمض النووي deoxyribonuclease لأنه يحتاج إلى أيونات المغنيسيوم Mg^{+2}أو المنجنيزMn^{+2} لكي يقوم بوظيفته في تحليل الحمض النووي DNA.

- الوسط القلوي (pH=8) يقلل التفاعلات الإلكتروليتيه بين الحمض النووي DNA والهيستونات القلوية والأمينات عديدة التكافؤ.
- القلوية العالية (درجة pH العالية) تقلل من نشاط انزيم nuclease وتغير طبيعة البروتين denature.
- كما تساعد على فصل البروتينات المرتبطة بالحمض النووي DNA بزيدة القلوية والشحنة الموجبة للبروتينات الهيستونيه.

- ثانياً: فصل معقد الحمض النووي DNA والبروتين:

تستخدم المنظفات عادة في هذه المرحلة لتعطيل التفاعلات الأيونية بين الهستونات موجبة الشحنه مع الشحنة السالبة للحمض النووي DNA.

يستخدم عادة sodium dodecyl sulphate(SDS):

1- منظف متأين يرتبط مع البروتينات ويعطيها صفة شديدة الأيونية.

2- متلف للإنزيمات المحللة للـ DNA (deoxyribonucleases) وغيره من البروتينات.

- التراكيز العالية من الأملاح (مثل NaCl وغيره) تضاف للتأكد من الفصل التام للبروتينات المرتبطة بالحمض النووي DNAعنه وتزيل الرابطة مع الأمينات موجبة الشحنة.
- حيث تضعف الأملاح قوة الارتباط الأيوني بين الحمض النووي والمركبات موجبة الشحنه.

ثالثاُ: فصل الحمض النووي DNA عن غيره من مكونات الخلية الذائبة

في هذه المرحلة، يجب التأكد من خلو المحلول من البروتينات وذلك باستخدام خليط الكلوروفورم مع الكحول isoamyl alcohol ثم الطرد المركزي.

بعد ذلك تظهر3 طبقات:

طبقة عليا سائلة، وطبقة سفلى عضوية وبينهما طبقة وسطية تمثل شريط منضغط من البروتين الموه.

يسبب الكلوروفورم تشويه سطحي للبروتين

والكحول isoamyl alcohol يقلل الرغوه ويساعد على ثبات الطبقة الفاصلة المحتوية على البروتين وتفصل بين الطبقتين .

- تحتوي الطبقة العليا على الأحماض النووية ويتم فصلها ويتم ترسيب الحمض النووي باستخدام كحول الإيثانول.
- بسبب الطبيعة المتأينة للحمض النووي DNA يصبح غير قابل للذوبان إذا تواجد في وسط عضوي منخفض القطبية.
- يكون الحمض النووي راسب خيطي الشكل ويمكن جمعه بلفه على عصا زجاجية.
- قد يتلوث الحمض النووي المعزول بالبروتينات والحمض النووي RNA.
- يمكن التخلص من البروتين بإذابة الحمض النووي المترسب في وسط ملحي وإعادة استخدام خليط الكلوروفورم والكحول isoamyl alcohol حتى لا يبقى اي بروتين في الطبقة الوسطى.

- لا يترسب الحمض النووي RNA مع الـ DNAولكنه قد يتواجد في صورة ملوثة للحمض النووي DNA.
- يمكن التخلص منه باستخدام الإنزيم المحلل له Ribonuclease(RNase) بعد التخلص من البروتين.
- قد يستخدم الكحول isoprobanol لترسيب الحمض النووي DNA تاركاً الحمض النووي RNA في المحلول.
- يمكن إعادة خطوات فصل البروتين والحمض النووي RNA عدة مرات للحصول على حمض نووي DNA عالي النقاوة.
- بهذه الطريقة يفترض أن يتم فصل 50% من المحتوى الكلي للحمض النووي DNA في الخلية، ممتوسط المحصول يساوي 1-2 ملجم لكل جم من الوزن الرطب للخلايا البكتيرية.

الهدف من استخلاص الحمض النووي DNA البكتيري

- تحديد الخريطة الوراثية المحتوية على جميع الجينات الخاصة بالكائن الحي الدقيق.
- يحمل الحمض النووي في تركيبه الجزيئي وتتابع القواعد النيتروجينيه جميع المعلومات الوراثية في صورة جينات.
- عند فصل الحمض النووي DNA للكائنات يمكن معرفة نسبة الجوانين إلى السيتوسين G:C% وبالتالي تعريف الكائن الحي ومعرفة المملكة التي يتبعها.
- استخدام الحمض النووي DNA في تجارب التقنيه الحيوية Biotechnology: مثل ربط جينات معينة مع الحمض النووي DNA للبكتيريا في عمليات انتاج بعض المواد البروتينيه أو في المجالات الدوائية وفي مجال Gene therapy.

«تجربة استخلاص الحمض النووي DNA من بكتيريا *E. coli*»

- **<u>الغرض من التجربة:</u>** الحصول على الحمض النووي الكرموسومي للبكتيريا بصورة نقيه.

- **<u>الأدوات :</u>**

1- بيئة مرق Luria Bertani (LB).

2- عزلة نقية من بكتيريا *E. Coli* .

3- محلول منظم Buffer(Tris/EDTA/glucose) ويرمز له ALS-I.

4- 2 عياري هيدروكسيد الصوديوم 2 N NaOH.

5- 4% من محلول SDS(Sodium dodecyl sulphate).

6- 3 مولار أسيتات الصوديوم 3 M Sodium Acetate pH=6.0.

7- محلول خليط (phenol/Chloroform/Isoamyl

alcohol(25:24:1

8- كحول Isoprpanol.

9- كحول 70% Ethanol.

10- ماء مقطر منزوع الأيونات Distilled deionized

water(DDW).

11- أنابيب بلاستيكية معقمة ذات غطاء

.(1.5-2 ml)Eppendorf tubes

13- ماصات دقيقة الكترونيه Electromicropipett

مختلفة الأحجام

.(2-20µl, 10-100µl, 100-1000µl)

14- نهايات الماصات الألكترونية.

- Tips with different size

15- حوامل للأنابيب.

- (Racks for tube)

16- حوامل لنهايات الماصات Quarts cuvettes .

14- جهاز الرج (Vortex) .

15- جهاز الطيف المرئي(Spectrophotometer) .

16- جهاز طرد مركزي دقيق Microcentrifuge.

16- علبة للتخلص من المستهلكات Biohazard Container

17- أكياس للتخلص من المستهلكات Biohazard Bags

أولاً: تحضير المحاليل المستخدمه في الاستخلاص:

1-تحضير محاليل الأساس Stock solutions:

أولاً: نحسب الوزن الجزيئي لحمض الهيدروكلوريك HCl = 1*1.008 + 1* 35.453 = 36.461 جم/مول

ثانياً: عدد المولات في 1 مولار =؟

∴ الوزن بالجرام = المول * الوزن الجزيئي = 1 *36.461= 36.461جم

1000 ml DDW

1M Tris HCl

0.5M EDTA

- أولاً: نحسب الوزن الجزيئي EDTA = 292.2جم/مول
- ثانياً: عدد المولات في 0.5 مولار =؟
- ∴ الوزن بالجرام = المول * الوزن الجزيئي = 0.5 *292.2= 146.1جم

10% SDS

- أولاً: يوزن 10 جم من SDS
- ثانياً: يذاب في 100mL of DDW

أولاً: تحضير المحاليل المستخدمه في الاستخلاص:

1-تحضير المحاليل المنظمة Buffers

1- محلول ALS-I:

: يتكون من

2.5 ml of Tris HCl (stock: 1M, pH 8)

2.5 ml of EDTA (stock: 0.5M, pH 8)

0.9 gm of Glucose

يضاف إلى 100 مل ماء مقطر DDW ، ويحفظ عند درجة حرارة 4°م.

أولاً: تحضير المحاليل المستخدمه في الاستخلاص:
1-تحضير المحاليل المنظمة Buffers

2- محلول 2 عياري من هيدروكسيد الصوديوم 2 N NaOH

يحسب الوزن الجزيئي لهيدروكسيد الصوديوم = 40جم/مول

العيارية= المولارية × n

2= س × 1

س = 2 مولار=عدد المولات في لتر= 2 مول /لتر

المول = الوزن بالجرام (جم)/ الوزن الجزيئي (جم/مول)

الوزن بالجرام = المول × الوزن الجزيئي = 2 × 40 =80 جم.

3- 4% من محلول SDS(Sodium dodecyl sulphate).

4 جم تذاب في 100 مل ماء مقطر منزوع الأيونات DDW.

4- 3 مولار أسيتات الصوديوم 3 M Sodium Acetate pH6.0

.... الصيغه البنائية = $C_2H_3NaO_2$

1. MW=136.08 gm/mol
2. 3*136.08 = 408.24 جم
3. محلول خليط (phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol)25:24:1

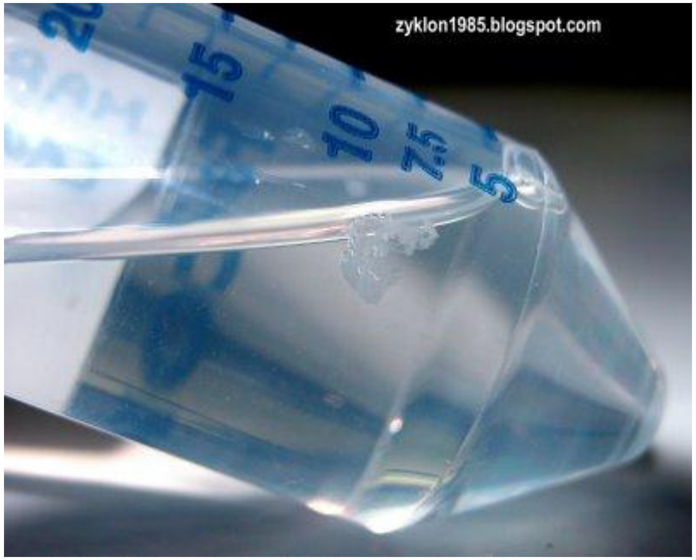
ثالثًا: خطوات استخلاص الحمض النووي DNA البكتيري:

- يلقح 5 مل من بيئة LB بلقاح نقي من بكتيريا *E. coli* وتحضن لمدة 12-24 ساعه عند 37˚م.
- ونحتفظ بأنبوبة بيئة LB بدون تلقيح وتحضن أيضاً.
- ينقل 1.5 مل من المزرعة إلى أنبوبة طرد مركزي دقيقة microcentrifuge ويطرد لمدة دقيقتين ثم نتخلص من الرائق.
- يعلق الراسب في 120uLمن محلول منظم Buffer (Tris/EDTA/glucose) وترج الأنبوبة في جهاز Vortex جيداً (يجب تعليق الراسب جيداً للتأكد من عدم تكتل الخلايا البكتيريه).

ثالثًا: خطوات استخلاص الحمض النووي DNA البكتيري:

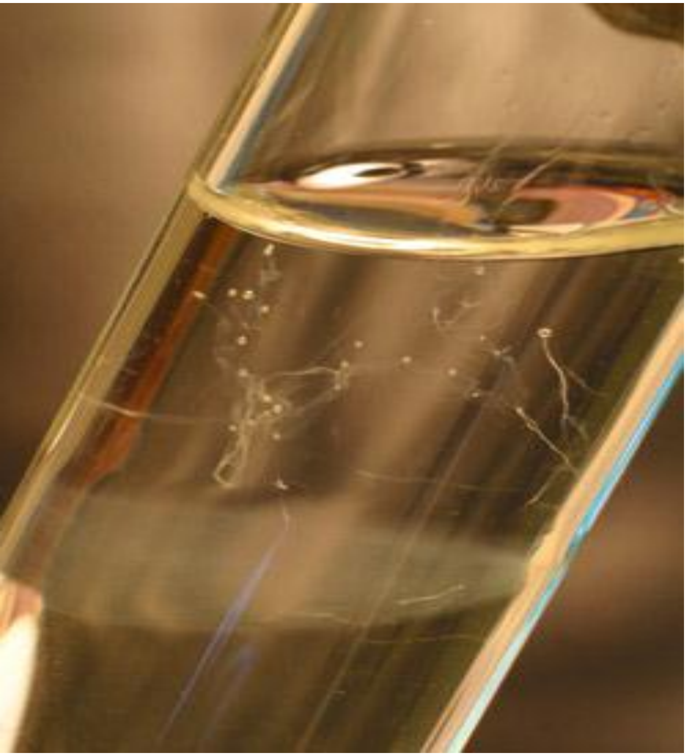
- يضاف إلى الراسب 8uLمن محلول 2Nمن هيدروكسيد الصوديوم NaOH و 8uL من محلول SDS 4% ثم يرج المزيج جيداً بدون استخدام جهاز الرج vortex.
- يضاف مباشرة 22uL من 3Mمن محلول أسيتات الصوديوم NaAc في درجة pH=6.0. ويرج المزيج جيداً بدون جهاز الرج ثم يرسب المزيج بالطرد المركزي الدقيق لمدة 10 دقائق.

ثالثًا: خطوات استخلاص الحمض النووي DNA البكتيري:



- باستخدام الماصة الدقيقة يتم سحب الراسب والتخلص منه. يتم ترسيب الرائق بالطرد المركزي لمدة دقيقتين ثم ينقل الرائق إلى أنبوبة طرد مركزي معقمة.
- يضاف إلى الأنبوبة 2uL من 10ug/mL لانزيم RNaseالمثبط بالحرارة وتحضن في درجة 37م لمدة 10دقائق.
- يستخلص الرائق مرتين باستخدام 100uLمن الخليط من (الفينول: الكلوروفورم: كحول أيزوأميل).
- يضاف 1vol من الأيزوبروبانول إلى الطبقة العلوية الشفافة، يمزج الخليط ويترك لمدة 5 دقائق.

ثالثًا: خطوات استخلاص الحمض النووي DNA البكتيري:



- يرسب المزيج لمدة 5 دقائق على السرعة الفائقة للطرد المركزي ثم نتخلص من الرائق.
- يغسل الراسب مرتين باستخدام 200uL من كحول 70% Ethanol ثم يطرد كل مره وبعدها يترك الراسب ليجف.

ثالثًا: خطوات استخلاص الحمض النووي DNA لبكتيري:

يعلق الراسب في الماء المقطر المعقم لاستخدام الحمض النووي المعزول في الخطوات التالية كالتركيز والتنقية.

ملاحظة: يجب تسجيل التغير في المحلول بعد كل خطوة.

ملاحظات هامة اثناء العمل

- الحرص على عدم الرج بصورة عنيفة لتجنب ظهور الرغوه.
- المادة القلوية SDS مع الحرارة العالية 55-60 °م تؤدي إلى إذابة الدهون في الجدار الخلوي وتحرر الحمض النووي.
- يمكن استخدام انزيم proteinsae K مع الحرارة العالية أيضاً لتخلص من أي بروتينات قد ترتبط مع الحمض النووي .
- يضاف الكحول الثلجي ويمكن اضافته عن طريق ادخال الماصة الى نهاية الانبوبه ومن ثم تحميله في الانبوبة، أو إضافة الكحول في انبوبة معقمة ثم يضاف المحلول اليها ، أو إضافته ببطء بالسكب بماصة باستير.

ملاحظات هامة اثناء العمل

- لا يذوب الحمض النووي في الكحول بعكس جميع مكونات البروتوبلازم الخلوي التي تذوب في الكحول تاركة الحمض النووي في شكل راسب
- يجب ترك المحلول ليستقر لمدة 2-3 دقائق ويجب عدم رج الأنبوبة في هذه المرحلة لرقة تركيب الحمض النووي .
- ويمكن ملاحظة ترسب الحمض النووي في طبقة الكحول على هيئة مادة بيضاء لزجه .
- نستخدم عامل درجة الحرارة العالية أعلى من 60˚م ليجب أن لا تزيد درجة حرارة الحمام المائي عن 70˚م لانه يتكسر وتتغير طبيعته اذا زادت الحرارة عن 80˚م.

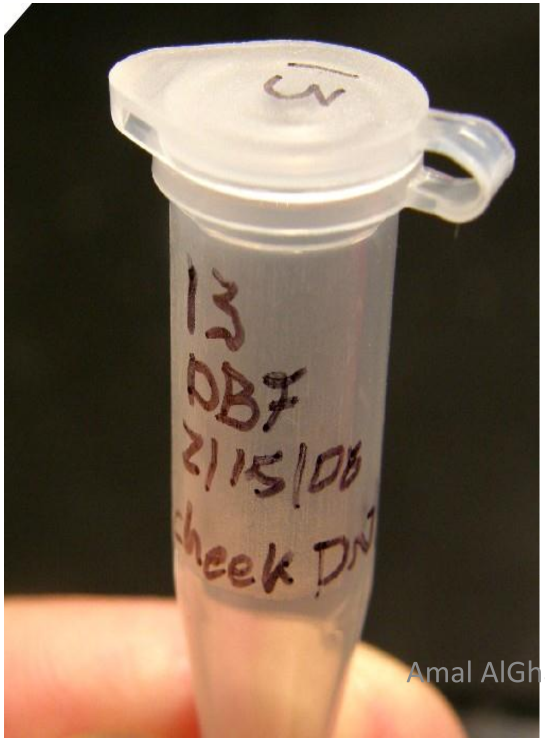
حساب تركيز الحمض النووي DNA
باستخدام جهاز الطيف الضوئي SPECTROPHOTOMETER

1- يحسب درجة الامتصاص عند كل من الأطوال الموجيه (نانومترnm)

230-240-250-260-270-280-290-300-310

2- نسجل نسبة الأشعة الممتصة والصادره عن المحلول.

3- يتم عمل منحنى من العلاقة بين محورين السيني يمثل الأطول الموجيه والصادي مقدار الأشعة الممتصة.



حساب تركيز الحمض النووي DNA
باستخدام جهاز الطيف الضوئي SPECTROPHOTOMETER

3- conversion factor: معامل التحويل = OD 260 *1= 50 mg of DNA/mL

4- نحسب درجة تركيز الحمض النووي بالتعويض في المعادلة:

$$\text{Conc. Of DNA (ug/ml)} = \frac{O.D.260 \times 50 \times dilution\ factor}{1000}$$

With dilution factor of 25 (i.e. 2ml in 48ml), this formula reduced to:

mg DNA/mL = OD 260 x 1.25

Results: OD 260/OD 280 = 1.7-1.8

- إذا كان تركيز الحمض النووي خارج هذا المدى لا تكون العينة صالحه.
- وهذا يعني عدم ذوبان الحمض النووي أوجود شوائب مثل البروتينات .
- لذلك يتم إعادة الترسيب باستخدام المخلوط الكحولي.

شكراً