المعمل الثالث:

استخلاص الحمض النووي منقوص الأكسجين DNA من خلايا الأنسجة النباتية.

251 حدق

العام الجامعي 1438-1439 هـ

أولاً :الاستخلاص Extraction

- استمر البحث عن طرق أفضل للحصول على حمض نووي أكثر نقاوة مما أدى إلى تطوير العديد من البروتوكولات.
- بالرغم من ذلك لازالت الخطوات الرئيسية لعملية الاستخلاص بدون تغيير حيث يتم فصله عن الجزيئات الخلوية الأخرى بطريقة تضمن الحفاظ عليه في صورة أقرب إلى الشكل الطبيعي دون تكسر أو تغير.

2- 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.

أولاً :الاستخلاص Extraction

يمكن تعديل الطرق الرئيسية مع تغييرات طفيفه للحصول على الحمض النووي المفصول بكميات تكفي لعدة اختبارات معملية ويمكن تلخيص الطرق الرئيسية كالتالي:

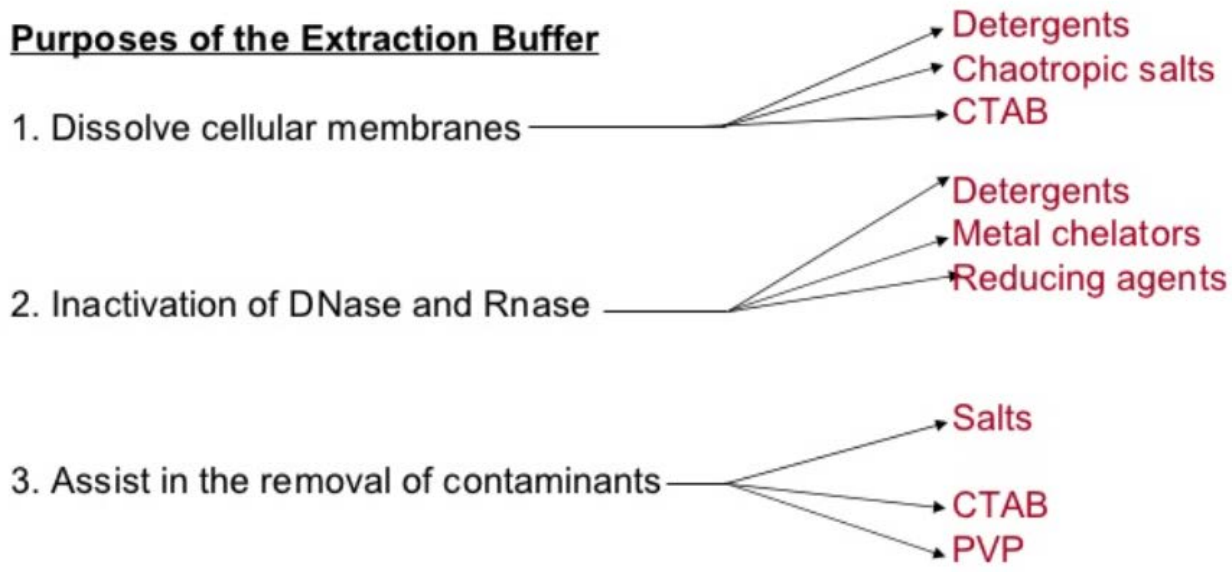
1- طحن الأنسجة المحتوية على الحمض النووي المراد دراسته أو الكشف عنه ,وتسمى الخطوة تحليل الخلايا Cell lysis

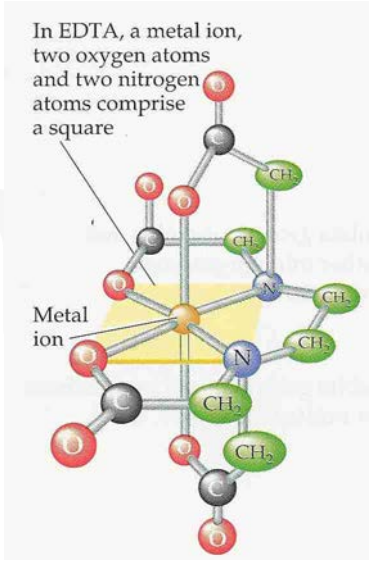
- باستخدام طرق ميكانيكيه مثل الطحن مع النيتروجين السائل لتكسير الجدر والأغشية الخلوية
- و طرق حيوية مثل استخدام انزيم المحلل Lysozyme
- أو طرق كيميائية بالمحاليل عالية القلوية

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

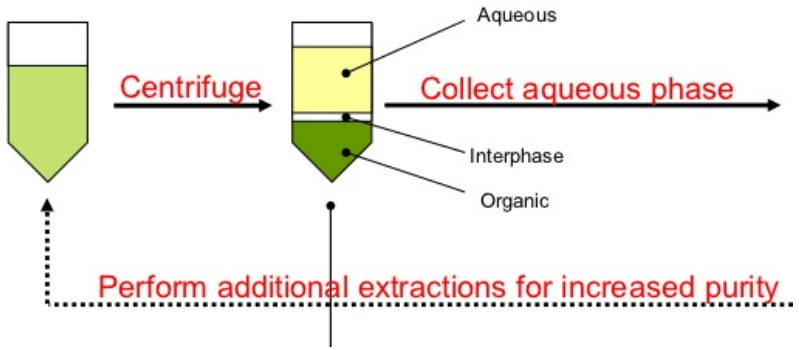
ما هي EDTA و CTAB؟

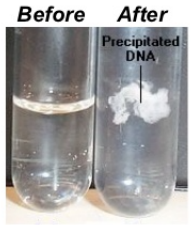
- هي عوامل خلب Chelating agent تقوم بتجميع وحجز الأيونات الموجبه ثنائية التكافؤ مثل ايونات المغنيسيوم Mg^{++} وايونات الكالسيوم Ca^{++} .
- وبالتالي تلعب دوراً في تثبيط عمل إنزيم المحلل للحمض النووي DNase الذي يحتاج إلى هذه الأيونات ليقوم بعمله في تحليل الحمض النووي DNA.



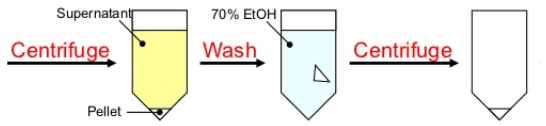


ثانياً:التنقيه Purification والترسيب Precipitation (الاستخلاص العضوي organic extraction)





جامعة الملك سعود
King Saud University



- يتم إزالة الجزيئات غير قابلة للتحلل و يتم فصل البروتينات الهستونيه والخلويه والمواد غير قابلة للذوبان باستخدام الطرد المركزي ومذيبات عضوية كالكلوروفورم والفينول.

<u>لإزالة البروتينات:</u>

1- تحليل البروتينات باستخدام انزيم محلل للبروتينات prtoease

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

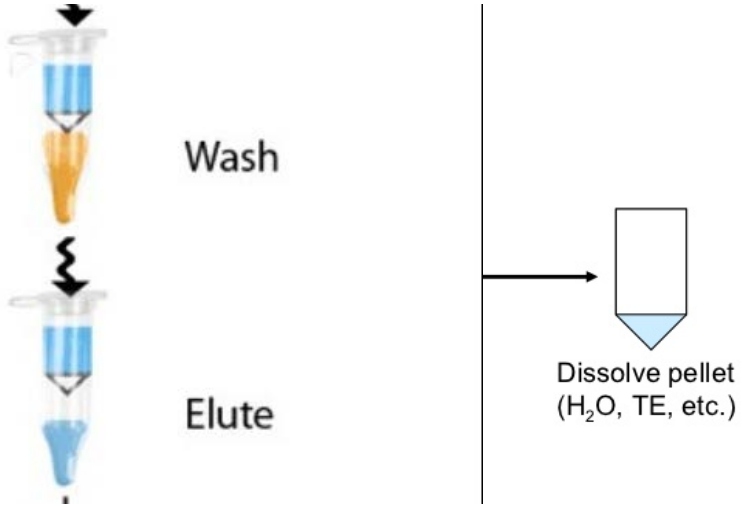
3- فصل البروتينات باستخدام خليط من الكلوروفورم والفينول، قبل خطوة ترسيب الحمض النووي.

- يجب ترسيب الحمض النووي وتحويله من الصوره الذائبه إلى الراسب الخيطي باستخدام الكحول الأيثيلي المثلج أو كحول الايوزبروبانول لعدم ذوبانية الحمض النووي بها حيث يتم فصل الأملاح (المواد الملوثة للحمض النووي DNA قابلة للذوبان في الكحول).

Add alcohol and salt to precipitate nucleic acids from the aqueous fraction

- Pellet down nucleic acids.
- Wash pellet with 70% ethanol to remove residual salts and other contaminants.
- Discard ethanol and allow pellet to dry.

ثالثاً :الإذابه و الحفظ



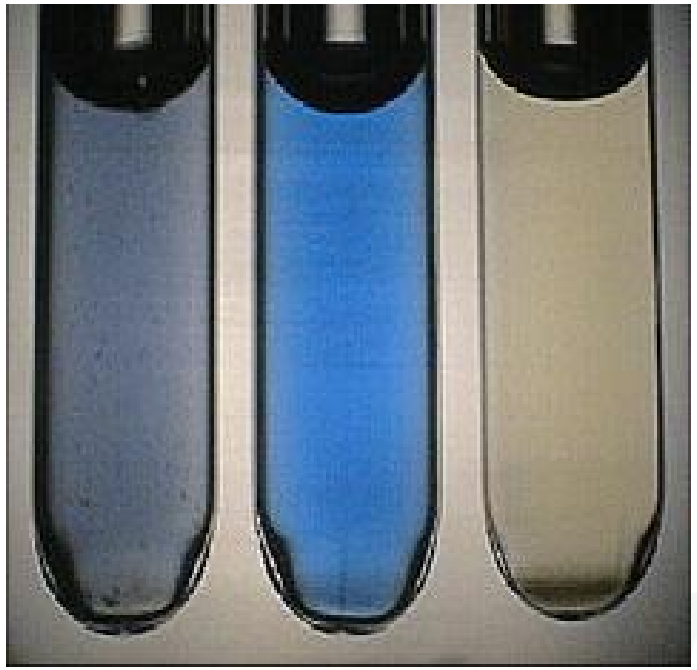
- يتم تعليق resuspense الحمض النووي النقي بإذابته في ماء مقطر معقم أو في محلول منظم مثل TE (Tris EDTA) buffer.
- باستخدام هذه الطريقة يمكن الحصول على حمض نووي نقي وسليم من خلايا أنسجه نباتيه غضة.

رابعاً: التخلص من الإنزيم DNase

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

Amal Alghamdi

خامساً :التحقق من وجود الحمض النووي ثم قياس تركيزه:



positive results - blue indicates presence of DNA

negative result - clear

- بإضافة صبغه ثنائي فينيل الأمين Diphenyl amine إلى الحمض النووي DNA المستخلص.
- ثم تسخين الحمض النووي لدرجة أعلى من ٩٥°م.
- عند وجود الحمض النووي DNA في وسط حمضي لوجود الصبغة السابقة، فينتج تفاعل لوني ويعطي مركب أزرق اللون.

Amal Alghamdi

سادساً :درجة نقاوة الحمض النووي:

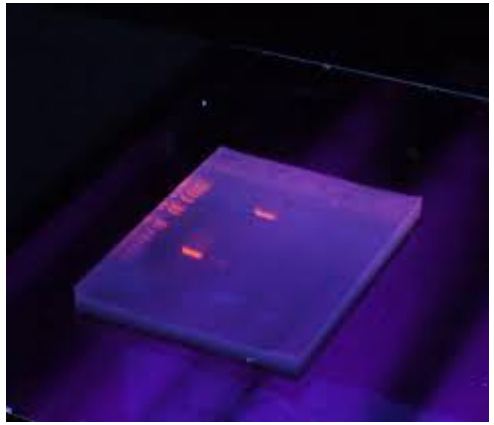
- يتم قياس الكثافة الضوئية OD عند طول موجي 260و280 نانومتر.
- حيث يمتص الحمض النووي الأشعه فوق البنفسجيه عند 260 بشكل أكبر وعند 280 بصورة أقل والعكس صحيح للبروتينات.
- الحمض النووي النقي يعطي نسبة $\frac{260}{280}$ تساوي 2 - 1.8 وفي هذه الحاله تكون العينة خالية نسبيا من الملوثات مثل الدهون والكربوهيدرات وخاصة البروتينات.
- وتعتبر العينة ملوثة بالبروتينات إذا كانت النسبة أقل من 1.7.

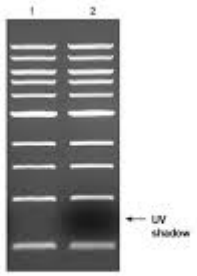
سابعاً :قياس تركيز و كمية الحمض النووي

جامعة الملك سعود
King Saud University

- يمكن قياس تركيز الحمض النووي عن طريق قراءة كثافة امتصاص محلول الـ DNA المستخلص للأشعة عند ٦٠٠نانومتر ومقارنته مع منحنى قياسي من تركيز الحمض النووي المعروف مسبقاً. أو باستخدام جهاز Nanodop spectrophotometer.

ثامناً : رؤية الحمض النووي و تحديد الوزن الجزيئي





UV shadow comparison
The new Gel Loading Dye, Purple (6X), no SDS, (Lane 1) included in the Quick-Load Purple 1kb DNA Ladder does not cast a UV shadow over the underlying bands, unlike the Gel Loading Dye, Blue (6X) (Lane 2).

- عن طريق فصل العينة الناتجه من خطوات الاستخلاص على جل الأجاروز المصبوغ ببروميد الإثيديوم Ethedium bromide.
- ثم يتم تصوير قطع الحمض النووي الناتجه تحت ضوء الأشعه فوق البنفسجيه UV (Ultra violet wave lengths).
- ويمكن تحديد وزنه الجزيئي بمقارنة الأشرطة مع أشرطة حمض نووي معلوم الوزن الجزيئي (DNAmarker 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

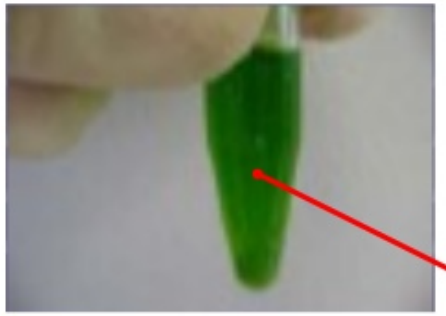
خطوات العمل

1. يطحن ٢٠٠ملغم من اوراق النبات الغضه في ٥٠٠ ميكرولتر من محلول منظم CTAB buffer.
2. ينقل الخليط لأنبوبة صغيرة ثم يحضن في حمام مائي ٥٥°م 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 ٢٥٠ميكرولتر من خليط الكلوروفورم والفينول.
5. يخلط بالتقليب ثم الطرد المركزي ١٣٠٠٠لفة\دقيقه لمدة دقيقه.

Step 1: Disruption of cell walls by grinding

Grind sample into a fine powder to shear cell walls and membranes

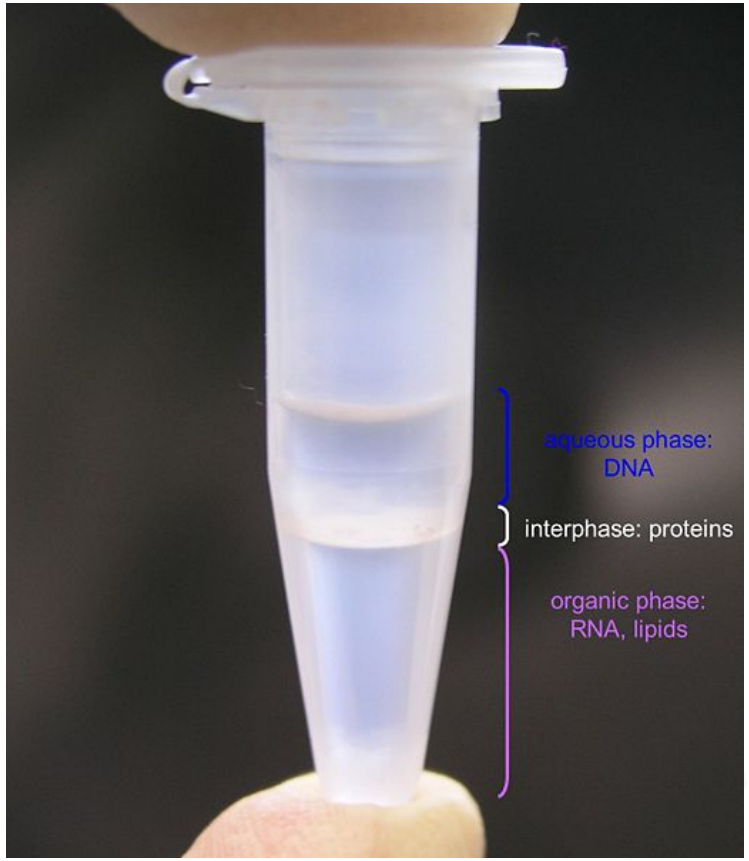
Step 2: Lysis of cells in extraction buffer



Mix thoroughly with extraction buffer to dissolve cell membranes and inhibit nuclease activity

تحليل الشوائب

خطوات العمل



6. تنقل الطبقة المائية العليا فقط الى أنبوبة نظيفه ويضاف لها ٥٠ ميكرولتر من خلات الصوديوم ومباشرة ٥٠٠ميكرولتر من الكحول الأثيلي 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 (Dnaseبحجم 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).

فيديو لطريقة استخلاص الحمض النووي من خلايا النبات

جامعة الملك سعود
King Saud University

Plant Genome Extraction

https://www.youtube.com/watch?v=PgwWuTDaPd4

Amal Alghamdi