

فصل الحمض النووي الديوكسي ريبوزي من الأنسجة النباتية DNA

٢٥١ حدق
العام الجامعي 1435 هـ

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 الأساسية 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 البسيطة 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 ميكانيكية 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 الأغشية البلازمية باستخدام مادة منظقه detergent مثل : Sodium dodecyl sulphate (SDS).

- يجب أن يتم الفصل في وسط له ظروف تقوم بتنشيط الإنزيمات والمواد الكيميائية الضاره.

- حيث توضع الخلايا أثناء الطحن التام مباشرة في محلول منظم ملائم مثل CTAB buffer

ما هي EDTA و CTAB؟

- هي عوامل خلب Chelating agent تقوم بتجميع وحجز الأيونات الموجبة 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: التنقية Purification

- يتم إزالة الجسيمات الغير قابلة للتحلل حيث يتم فصل البروتينات الهستونية والخلوية والمواد الغير قابلة للذوبان باستخدام الطرد المركزي و مواد مذيية كالكلوروفورم.
- لإزالة البروتينات:

1- تحليل البروتينات باستخدام انزيم محلل للبروتينات *prtoease* وهي خطوه احتياطييه 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 الايزوبروبانول لعدم ذوبانية الحمض النووي بها حيث يتم فصل الأملاح الملوثة له (القابلة للذوبان في الكحول) ويظهر الحمض في صورة راسب خيطي.

ثالثاً: الإذابة والحفظ

- 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 الأنسجة النباتية.

رابعاً: التحقق من جودة الحمض النووي

- يتم عن طريق فصل العينة الناتجة من خطوات الاستخلاص على جل الأجاروز المصبوغ ببروميد الإثيديوم Ethidium bromide.
- ثم يتم تصوير قطع الحمض النووي الناتجة تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية 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 ٩٥ درجة 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 ٦٠٠ نانومتر 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 الأشعة فوق البنفسجية 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 خالصة نسبياً 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 الأجاروز المصبوغ ببروميدي الإيثيديوم ومقارنة كتلته مع كتلة حمض نووي معلوم الوزن الجزيئي (DNA marker or ladder).

الأدوات:

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

خطوات العمل

1. يطحن ٢٠٠ ملغم من اوراق النبات الغضه في ٥٠٠ ميكرو لتر من محلول منظم CTAB buffer.
2. ينقل الخليط لأنبوبة صغيرة ثم يحضن في حمام مائي ٥٥ درجة مئوية رجاج لمدة ١٥ دقيقة.
3. يطرد الخليط في جهاز الطرد المركزي ٢٠٠٠ الفة \دقيقة لمدة ٥ دقائق.
4. ينقل الرائق إلى أنابيب طرد مركزي دقيقة ولكل أنبوبة يضاف ٢٥٠ ميكرو لتر من خليط الكلوروفورم والفينول.
5. يخلط بالتقليب ثم الطرد المركزي ٣٠٠٠ الفة \دقيقة لمدة دقيقة.

خطوات العمل

6. تنقل الطبقة المائية العليا فقط الى أنبوبة نظيفه ويضاف لها ٥٠ ميكرو لتر من خلات الصوديوم ومباشرة ٥٠٠ ميكرو لتر من الكحول الايثيلي المطلق الثلجي.
7. تقلب الأنابيب عدة مرات بخفه لترسيب الحمض النووي دون تكسيهه وعندها يمكن رؤية الراسب الخيطي للحمض النووي ولضمان الترسيب الكامل يمكن وضع المحلول في - ٢٠ درجة مئوية لمدة ساعة.
8. بعد الترسيب يمكن سحب الحمض النووي على نهاية الماصه الدقيقه بتحريكها دائريا في المحلول الثلجي.
9. لغسل الحمض النووي ينقل الراسب الى أنبوبة بها ٥٠٠ ميكرو لتر من الكحول الايثيلي الثلجي ٧٠٪ وتقلب الانبويه بخفه وتعاد هذه الخطوه أو يمكن استبدالها بالطرد المركزي ٣٠٠٠ الفة/دقيقه لمدة دقيقه حتى يتكون الراسب من الحمض النووي في قاع الانبويه.

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 ليحجف في هواء المعمل (١٥ دقيقة تقريبا).
13. يعاد إذابة الحمض النووي في الماء المقطر المعقم الخالي من إنزيم Dnase (بحجم ٥٠ - ٤٠٠ ميكرو لتر / مل من الماء) حسب كمية الحمض النووي المستخلص؟؟?
14. في حال توفر إنزيم (Rnase ١٠ ميكروجرام / مل) يضاف الى الماء قبل إذابة محلول الحمض النووي DNA في الماء (١٠ ابحجم ميكرو لتر / مل من الماء).

التخلص من الإنزيم DNase

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