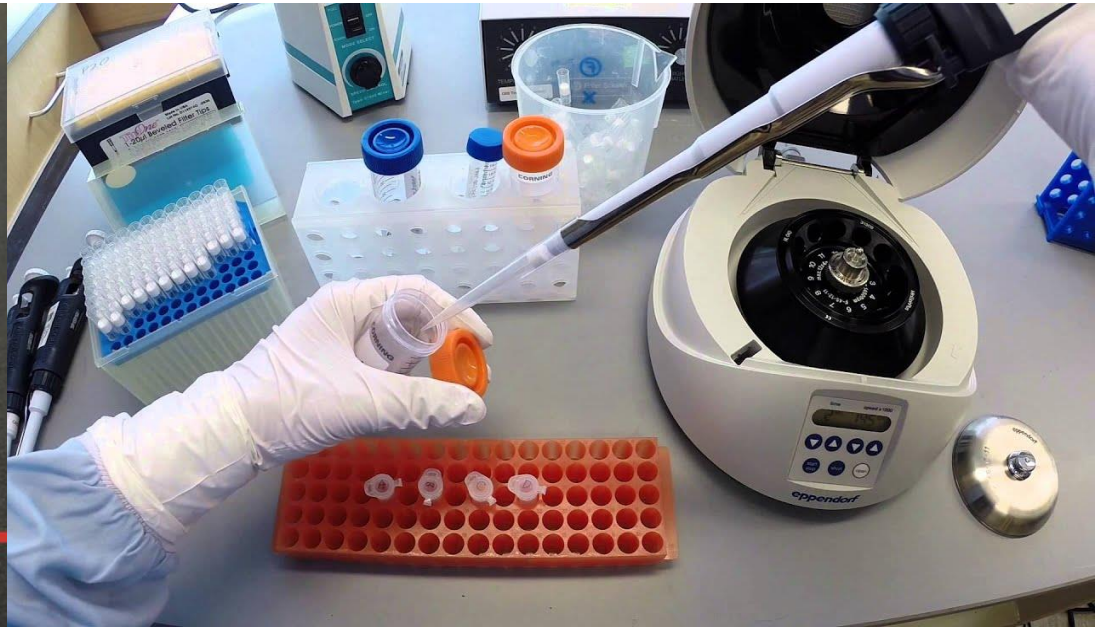
ترسيب وتقدير تركيز الDNA



أستاذ المادة

الدكتور هشام فياض

٣- ترسيب الحامض النووي الدنا: precipitation of the DNA

يتم ترسيب الدنا الموجود ضمن الطبقة المائية بتركيزه (تجميعه) باستخدام نوعين رئيسين من الكحول وهما الايثانول ethanol والايزوبروبانول isopropanol.

جزيئات الماء القطبية Polar تحيط بجزيئات الدنا في المحلول المائي aqueous solution ،عملية ذوبان الدنا في الماء تحصل عن طريق تفاعل قوي بين الشحنة السالبة لمجموعة الفوسفات لجزيئة الدنا مع الشحنة الموجبة لجزيئة الماء مما يؤدي الى ذوبان الدنا في الماء.

ترسيب الدنا بالكحول يعتمد على اساس تقليل ذوبانية الدنا في الماء،حيث يتم اضافة الكحول الى المحلول المائي والذي يعمل على تجميع خيوط الدنا ضمن المحلول المائي بسحب جزيئات الماء منها. بعدها يتم سحب خيوط الدنا المتجمعة والتي عادتا" تكون باللون الابيض باستخدام الخطاف Hook باستخدام عملية الطرد المركزي لترسيب خيوط الدنا في اسفل انبوبة الاختبار.

عندها يتم اضافة محلول ethanol 70% بمقدار ٢ مل الى الدنا المترسب وتحريكه بهدوء لغرض غسل الدنا وازالة بقية الاملاح المترسبة معه. بعد ذلك نرسب الدنا من هذا المحلول باستخدام عملية الطرد المركزي وتترك انبوبة الاختبار مفتوحة لمدة نصف ساعة لتجف خيوط الدنا بشكل تام وتتطاير بقايا جزيئات الايثانول.

اخيرا" يتم اذابة الدنا المترسب باضافة محلول TE او الماء المقطر وبمقدار ١٠٠ - ٥٠٠ µL حسب كمية الدنا المترسب ثم يترك المحلول الاخير الى اليوم التالي بدرجة حرارة الغرفة لغرض ذوبان الدنا ضمن المحلول بشكل تام ويفضل التحريك Shaking اذا توفر ذلك.

٤. تقدير تركيز ونقاوة الدنا: Determination of the Purity and Quantity of DNA

المرحلة الأخيرة في اي عملية استخلاص للاحماض النووية (DNA, RNA) هي تقييم النتيجة، بالنسبة للدنا يتضمن ذلك تقدير نقاوة الدنا وتركيزه. يتم تقدير تركيز ونقاوة الاحماض النووية باستخدام التقدير الطيفي باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer System، تستعمل طريقة الامتصاص عند الطول الموجي ٢٦٠nm لقياس كمية الدنا او الرنا او كليهما في محاليلها وهي طريقة سريعة وسهلة ودقيقة لقياس كمية الأحماض النووية.

تستعمل كمية الامتصاص (الكثافة الضوئية Optical Density) عند الطول الموجي ٢٦٠ nm لقياس كمية الدنا لان الحامض النووي الدنا يملك اعلى امتصاص للكثافة الضوئية عند هذا الطول الموجي واقل امتصاص عند الطول الموجي ٢٣٠nm . اما كمية الامتصاص عند الطول الموجي ٢٨٠ nm فتستخدم لتقدير كمية البروتينات الموجودة ضمن محلول الدنا.ان كثافة ضوئية قدرها ١ تقابل ٥٠ مايكروغرام من الدنا لكل ١ مل (50µg/ml) بينما تقابل (40µg/ml) للحامض النووي الرنا.

تتصف المحاليل النقية للدنا او للرنا بقيمة الكثافة الضوئية للطولين الموجيين ٢٦٠ مقسومة على ٢٨٠ وهي ١,٨ للدنا و٢ للرنا وتقل القيمة في حالة وجود ملوثات لنموذج الحامض النووي كالبروتينات وغيرها.

وظيفة المواد والمحاليل الكيميائية المستخدمة في استخلاص الأحماض النووية:

No.	المادة أو المحلول	الوظيفة
1.	**EDTA**	يعمل على تحليل جدار الخلية من خلال قيامه بسحب ايونات المغنسيوم الموجبة Mg^{++} التي تحافظ على استقرارية جدران وأغشية الخلايا
2.	**Tris - HCl**	يحافظ على استقرارية ال pH المحلول.
3.	**CTAB**	منظف موجب الشحنة يذيب الأغشية الخلوية ويكون معقد مع ألدنا مما يسهل عملية ترسيبه بوجود محلول ملحي واطئ التركيز أو بإضافة محلول الايزوبروبانول. كما يعمل على إزالة السكريات المتعددة polysaccharides ويبقى الدنا في المحلول.
4.	**Isopropanol**	يقوم بترسيب الدنا عن طريق سحب جزيئات الماء المرتبطة مع الدنا. يضاف بحجم مماثل لحجم المحلول الذائب فيه الدنا.
5.	**Ethedium bromid**	صبغة لها قابلية التألق عند التعرض للأشعة الفوق بنفسجية ولها القابلية على الارتباط مع الحامض النووي المزدوج DNA
6.	**RNase**	أنزيم يقوم بتحليل جزيئات الحامض النووي الرنا RNA.

7.	**DNase**	أنزيم يقوم بتحليل جزيئات الحامض النووي الرنا DNA.
8.	**Ethanol 70 %**	يقوم بغسل جزيئات الدنا من خلال إزالة بقايا الأملاح المستخدمة في الاستخلاص.
9.	**Ethanol 100%**	يقوم بسحب جزيئات الدنا المرتبطة مع جزيئة الدنا مما يؤدي ذلك الى تحويل الدنا من الشكل الذائب الى الشكل الغير ذائب وبالتالي ترسيبه.
10.	**SDS**	منظف ايوني سالب الشحنة Anion Detergent يقوم بمسخ بروتينات الغشاء الخلوي ويعمل على فصل البروتينات المرتبطة مع جزيئة الدنا وتحليلها.
11.	**Sodium acetate**	احد الأملاح التي تستخدم في ترسيب ألدنا لان هذا الملح سريع الذوبان في الايثانول ٧٠ % مما يؤدي إلى إزالته بسهولة من ألدنا خلال الغسل مع الايثانول ٧٠ % .
12.	**NaCl**	يتأين إلى +Na و -Cl ، ايون الصوديوم الموجب الشحنة يرتبط مع ألدنا السالب الشحنة هذا يسمح لجزيئه ألدنا لتترسب في الكحول. بدون استخدام هذا الملح يبقى ألدنا سالب الشحنة وسوف يبقى في الطبقة المائية للمحلول.
13.	**Chloroform**	مذيب عضوي له صفة القطبية (صفة القطبية للمذيب : هو المذيب الذي يعمل على توزيع المحتويات الخلوية بين طورين عضوي ومائي)، عند إجراء عملية الطرد المركزي Centrifugation تتوزع الدهون والبروتينات وبقية المحتويات الخلوية في طور بيني Interphase أما الأحماض النووية فإنها تتواجد ضمن الطبقة المائية لقابليتها للذوبان في الماء.	

14.	**Phenol**	مذيب عضوي يقوم بمسخ البروتينات، جزيئة البروتين تحتوي على بقايا كارهة للماء التي تتمركز في مركز الجزيئة، عندما يمزج المحلول الحاوي على البروتينات الذائبة مع الفينول، جزيئات الفينول تنتشر في مركز جزيئة البروتين مما يؤدي الى انتفاخها وأخيرا مسخها.
15.	**Isoamyl Alcohol**	يمنع تكوين الرغوة عند استخدام الكلوروفورم ويساعد على زيادة المساحة السطحية للكلوروفورم لإزالة البروتينات.
16.	**Proteinase K**	أنزيم يعمل على تحطيم بروتينات الغشاء الخلوي يستخدم بكثرة مع الخلايا الحيوانية والبكتريا السالبة الشحنة.
17.	**Sodium Perchlorate**	تزيل هذه المادة البروتينات الخلوية الناتجة من تحلل الأغشية الخلوية خلال الاستخلاص. تستخدم بتركيز عالي وتعمل على إزالة ال SDS والبروتينات الذائبة وتمنع البروتينات للترسب مع الدنا خلال عملية ترسيبه بالايثانول.
18.	**TE**	لإذابة ال DNA ، لتثبيط بقايا أنزيم ال DNase إن وجدت.
19.	**Ethanol 100%**	يقوم بترسيب ال DNA من طريق سحب جزيئات الماء وبالتالي تحويل ال DNA من الشكل الذائب الى الشكل الغير ذائب ثم يؤدي الى ترسيبه
20.	**Ethanol 70%**	لغسل عينة ال DNA من خلال إزالة بقايا الأملاح والشوائب الأخرى.
21.	**Liquid Nitrogen**	يعمل على تحطيم جدران الخلايا النباتية لأنه ذو درجة حرارة ١٧٦ تحت الصفر.
22.	**Mgcl2**	يحافظ على الأحماض النووية من تأثير الأنزيمات الحالة مثل أنزيم الليسوزايم Lysozyme

23.	**Triton – X 100**	احد أنواع المنظفات المتعادلة Neutral detergent التي تقوم بإذابة البروتينات بدون مسخها.
24.	**β-Mercaptoethanol**	عامل اختزال قوي جدا يقوم بتكسير جسور السستين Systein residues للبروتينات مما يؤدي الى تغيير تركيبها.
25.	**PVP**	احد مكونات محلول الاستخلاص extraction المستخدم لاستخلاص الدنا من النباتات الغنية بالمركبات الفينولية حيث يساعد امتزاز (adsorption) هذه المركبات الفينولية.
٢٦.	**Lysozyme**	انزيم يستخدم مع ال EDTA حيث يقوم بتكسير الجدار الخلوي او بتحليل الغشاء الخلوي للبكتريا.
٢٧.	**Sarkosyl**	منظف ايوني سالب الشحنة يستخدم بدلا من ال SDS نتيجة لذوبانيته العالية في المحاليل ذات التركيز العالي اما ال SDS لا يذوب في المحاليل ذات التركيز العالي .
٢٧.	**Ammonium acetate**	احد الأملاح التي تستخدم في ترسيب الدنا ويفضل في الاستخدام لانه عالي الذوبان في الايثانول ومن السهل ازالته من الدنا نتيجة لتحلله الى ايونات ammonium و acetate . استخدام خلات الامونيوم Ammonium acetate يفضل على استخدام Sodium acetate لأنه يعمل على إزالة الفوسفات ثلاثية الأحماض النووية المزدوجة الصغيرة (الأقل من (bp 30). بالإضافة إلى قدرة خلات الامونيوم على إزالة المنظفات وبعض الملوثات والتي تثبط الأنزيمات المستخدمة في تجارب إعادة ارتباط الدنا Recompenent DND .

الخلاصة

١- هناك نوعين من الكحول في ترسيب الDNA

٢- عملية اذابة ال DNA تعتمد طريقة التغاير بالشحنات

٣- اضافة الكحول تعمل على ترسيب الDNA

٤- يستخدم المطياف الضوئي في تقدير تنقية ال DNA

٥- هناك طول موجي خاص بالحامض النووي وأخر خاص بالبروتينات

٦- لكل مادة في محاليل الاستخلاص وظيفة خاصة