المحاضرة السادسة ....

فصل الأحماض النووية

Isolation Of Nucleic Acid

تعد عملية استخلاص الدنا من العمليات الضرورية للحصول عليه واستخدامه في الاختبارات الجزيئية والتحليلات الجنائية وايا كان مصدر الاستخلاص (بكتريا،خلايا نباتية،خلايا حقيقية النواة) فان عملية الاستخلاص توفر ايضا ازالة الشوائب كالبروتينات والدهون وغيرها من الشوائب الكيميائية.

ويمكن تلخيص خطوات الاستخلاص كالاتي:

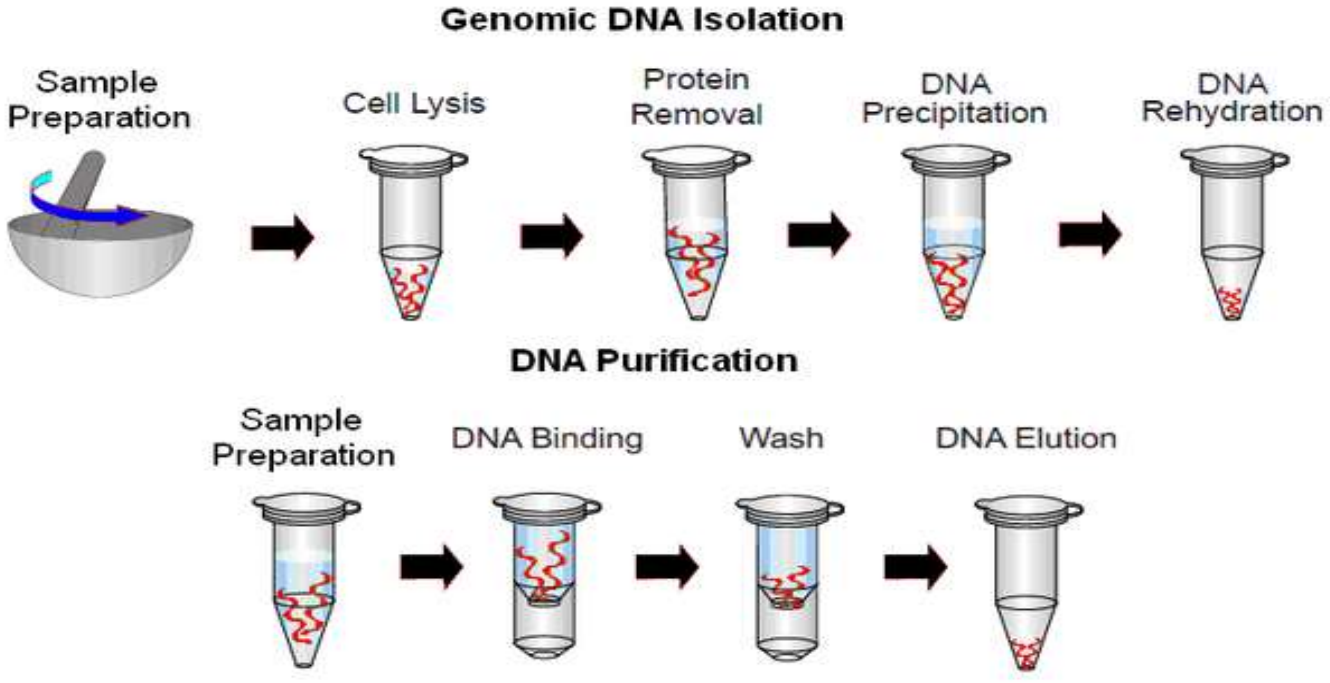
1 - تحليل الخلايا Cell lyses واخراج محتوياتها واذا كانت الخلايا محتوية على جدار كالخلايا النباتية فيجب تحطيم الجدار الخلوي اولا وعادة يتم ذلك بالتبريد الفائق (بواسطة النتروجين السائل حيث يوفر درجة حرارة تقترب من 190_م

2- تحليل الانوية (Nucli lyses) للخلايا حقيقية النواة.

3 - اضافة محلل RNAase الذي يقوم بتحليل الحامض النووي الرايبوزي RNA والذي يعتبر احد ملوثات الدنا والملوث الاخر هو البروتين. ويتم التخلص من البروتينات بواسطة الترسيب وفي هذه الخطوة يتم استخدام مذيبات عضوية وبفرات (buffers) عالية التركيز بالأملاح.

4 - تنقية DNA من محاليل الخطوة 3 بواسطة الكحول ويستخدم الايثانول المبرد او الايزوبروبانول المبرد لكن الاخير يمتاز بترسيبه للسكريات مع DNA في درجات الحرارة الواطئة.

5 - وضع الـ DNA في بفر ملائم للحفاظ عليه ويوضع في درجة -20 م.



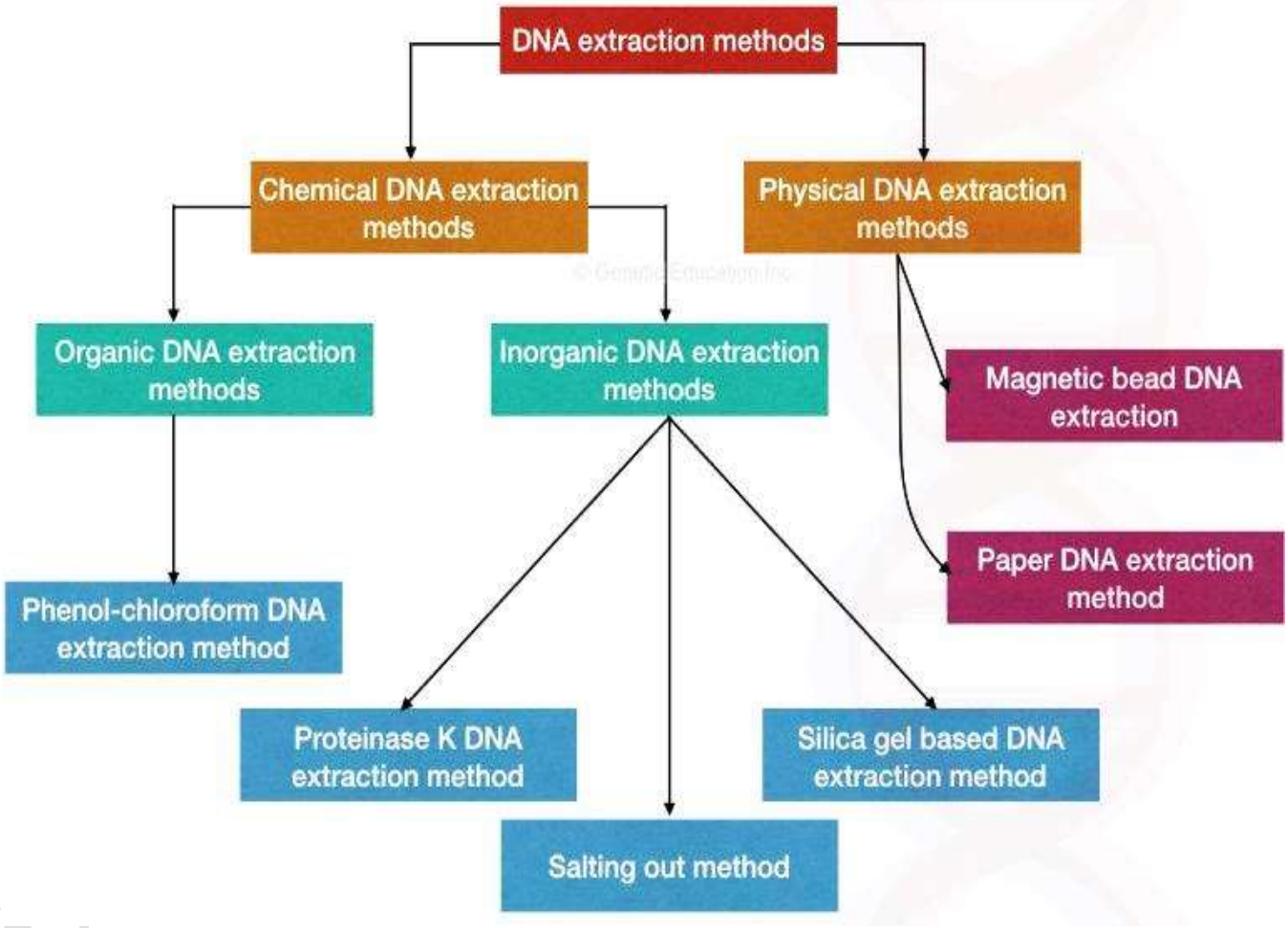
المحاضرة السادسة ....

الطرق المستخدمة في استخلاص الاحماض النووية

Methods used in extracting Nucleic acids

هناك انواع مختلفة من طرق استخلاص الحمض النووي ، ويتم تصنيف طرق استخلاص الحمض النووي بشكل عام إلى فئتين:

- طريقة استخلاص الحمض النووي باستخدام المواد الكيميائية.
- استخلاص الحمض النووي بالطريقة الميكانيكية.



المحاضرة السادسة ....

استخلاص الحامض النووي DNA من العينات النباتية

تحضير العينات النباتية Preparation of plant samples

يؤخذ 0.2 غرام من الاوراق النباتية الفتية والنظيفة والخالية من الاصابات الحشرية والمرضية وتغسل عدة مرات بالماء المقطر المعقم، لتنظيفيها من الأتربة والعوالق ثم تمسح بقطن طبي مغمس بالكحول بتركيز 70% لغرض تعقيميها، ثم تقطع إلى قطع صغيرة باستخدام مقص حاد نظيف معقم، وتوضع في جفنه خزفية (هاون خزفي) ويضاف إليها النتروجين السائل Liquid Nitrogen بعناية فائقة وبحذر شديد لتجنب الأضرار التي يحدثها النتروجين عند ملاسته للجلد أو أي من الأعضاء الظاهرة من الجسم، ثم طحنت العينات بشكل جيد حتى تحولت إلى مسحوق ابيض، وحفظ المسحوق بحافظة العينات حجم 10 مليلتر وتعلم بعلامات خاصة ، ثم تغسل أدوات الطحن بعناية فائقة بالكلور بتركيز 10% عند تكرار الطحن لكل صنف، وتحفظ العينات في المجمدة على إنها مُعدة للاستخلاص .

استخلاص الدنا DNA Extraction

هنالك العديد من البروتوكولات المستخدمة في استخلاص الـ DNA من العينات النباتية ، وفيما يلي وصف لأحد هذه الطرق وتعرف بطريقة الـ CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium-Bromide)

(2 % CTAB, 20 mM EDTA·Na_2·$2H_2O$, 1.4 M NaCl and 100 mM Tris, pH 8) .

وحسب ما ذكرها كل من Doyle (1991) و Aitchitt *et al.* (1993) مع بعض التعديلات، وحسب الخطوات الأتية:-

1- يؤخذ مقدار 100 ملغرام من المسحوق النباتي المعد مسبقاً ويوضع في أنبوب Eppendorf tubes سعة 2 مليلتر ويعطى رقماً على الأنبوب منعا لاختلاط العينات .

المحاضرة السادسة ....

2- يضاف 800 مايكروليتر من محلول CTAB Buffer الى الانبوب ويرج جيداً عدة مرات حتى يمتزج المحلول بالعينة جيداً.

3- توضع العينات في حمام مائي بدرجة 65 °م لمدة 30 دقيقة مع مراعاة الرج كل عشرة دقائق وبصورة هادئة لفصل الدهون والبروتين والبقايا النباتية عن الاحماض النووية .

4- يضاف لكل عينة 600 مايكروليتر من محلول Chloroform : Iso Amyl Alcohol (24:1) وتمزج باستخدام المازج الكهربائي جهاز (Vortex) بهدف فصل المواد الدهنية التي تذوب في المذيب العضوي الكلوروفورم عن الاحماض النووية التي تذوب في الوسط المائي .

5- تنقل العينات بعدها الى جهاز الطرد المركزي Centrifuge المبرد بسرعة 10000 دورة/ دقيقة لمدة عشر دقائق.

6- بعد عملية الطرد المركزي ينقل الوسط المائي المحتوي على الاحماض النووية (الطبقة العليا) فقط بوساطة ماصة دقيقة Micro pipette وبهدوء الى انابيب أبندروف سعة 1.5 مليلتر جديدة .

7- يضاف لكل عينة 600 مايكروليتر من كحول isopropanol المبرد ويمزج جيدا بهدوء داخل الانبوب عدة مرات ثم وضعت في التبريد عند درجة حرارة – 20 °م لمدة 20 دقيقة لترسيب الدنا.

8- بعد ذلك توضع العينات في جهاز الطرد المركزي Centrifuge المبرد بسرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة عشرة دقائق.

9- بعد اخراج العينات من الطرد المركزي يتم التخلص من الكحول بحذر مع مراعاة الحفاظ على DNA من الفقد والذي يتجمع في قعر الانبوب . بعدها تترك العينات لتجف في الهواء لمدة 15 دقيقة.

10- بعد التجفيف يضاف لكل عينة 100 مايكروليتر من Ammonium Acetate (5.2 M) يتبعها إضافة 700 مايكروليتر من كحول الايثانول المطلق Absolute ethanol المبرد وتمزج ببطيء عدة مرات لترسيب DNA .

11- مرة اخرى توضع العينات بجهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 10000 دورة / دقيقة لمدة عشرة دقائق.

د. احمد يوسف لفته - كلية الزراعة - جامعة البصرة

المحاضرة السادسة ....

12- بعدها يتم التخلص من المحلول بحذر ويترك الراسب بعدها يتم الغسل بإضافة 600 مايكروليتر من كحول Ethanol المبرد 75% ومزج بقلب الانبوب عدة مرات باليد.

13- بعد عملية الغسل تُطرد العينات بجهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 10000 دورة / دقيقة لمدة خمسة دقائق، ثم يتم التخلص من المحلول بحذر وترك الراسب الذي يحوي الـ DNA بعدها تترك الانابيب لتجف لمدة 30 دقيقة.

14 - يضاف 100 مايكروليتر من الماء المقطر او محلول TE buffer لكل عينة ثم تحفظ في التبريد عند درجة حرارة 4 °م باعتبارها DNA نقي لحين الاستخدام.