***استخلاص الاحماض النوويةDNA EXTRACTION***

**الأحماض النووية هي عبارة عن جزيئات كبيرة الوزن الجزيئى توجد في جميع الخلايا الحية في صورة طليقة أو متحدة مع البروتين ،وتتكون أساسا من وحدات عديدة من النيكلوتيدات الأحادية المرتبطة مع بعضها وتحمل الصفات الوراثية وهى المسئولة عن نقل المعلومات لتخليق البروتين . وبدأ علماء (الكيمياء الحيوية) أبحاثهم على الأحماض النووية منذ حوالي مائة عام مضت حين إستطاعوا فصلها من أنوية الخلايا فالأحماض النووية توجد في كل الخلايا الحية حيث أنها ليست فقط مسؤولة عن حمل وانتقال (الصفات الوراثية) ولكنها تتحكم أيضاً في ترجمة هذه التعليمات عند تكوين البروتينات المختلفة بالخلايا وذلك بتحكمها في ترتيب وتتابع الأحماض الأمينية لكل بروتين يتكون بكل خلية والأحماض النووية لها وزن جزيئيي مرتفع وهي عبارة عن نيوكلتيدات (بولي نيوكلتيدات) وحداتها البنائية هي النيوكلتيدات.**

**خواص الحامض النووى DNA**

* تمتص القواعد الآزوتية من نوع البيورين والبيرميدين الموجودة في الأحماض النووية الأشعة الفوق بنفسجية بدرجة كبيرة عند موجة ذات طول 260 نانوميتر (260 nm) .
* عند تسخين الحمض النووي DNA المبلمر بدرجة كبيرة ببطء فان السلسلتين الحلزونيتين الشكل تبتعدان عن بعضهما وتسمى عملية الابتعاد هذه بعملية انفصال السلسلتين Melting. وبزيادة درجة الحرارة تزداد درجة الامتصاص النوعي , وتسمى درجة الحرارة التي يحدث عـندها الـزيادة الـمفـاجـئة في الامـتـصـاص لـلأشـعـة فوق البـنفسجية بـدرجة حرارة الانـفـصـال(Melting temperature Tm ) للحمض النووي , ولكل نوع من انواع الحمض النووي DNA درجة Tm خاصة به .
* ويمكن فصل سلسلتي الحمض النووي DNA عن بعضهما إذا انخفض رقم pH المحلول عن 4 او اذا ارتفع عن 11 . حيث أن الأحماض النووية عبارة عن الكتروليتات عديدة ( Polyelectrolytes ) مع وجود شحنة سالبة واحدة لكل وحدة نيوكليوتيدية ( هذه الشحنة ناتجة عن تاين الفوسفات ثنائي الاستر ) في نطاق pH من 4 الى 11 .
* عند اعادة تبريد المحلول ببطء فانه يحدث اعادة لتكوين الشكل الحلزوني ذو السلستين مع امكانية حدوث تبادل بين السلاسل وتسمى ههذه العملية Annealing .

**الاهمية الحيوية للأحماض النووية**

تمثل الاحماض النووية البنك المركزى الخلوى الذى يحتوى على جميع أسرار الصفات الوراثية وشفرات تكوين البروتين التى يؤدى وجودها الى ظهور الصفات كما يؤدى اختفاءها الى غياب الصفات أوربما ظهور أمراض .

**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 ازالةالشوائب كالبروتينات والدهون وغيرها من الشوائب الكيميائية.ويمكن تلخيص خطوات الاستخلاص كالاتي :

1. تحليل الخلاياCell 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 RNAaseالذي 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 بالاملاح.
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 الـDNA في بفر ملائم للحفاظ عليه ويوضع في درجة -20 م˚.



**1 - الانسجة النباتية**

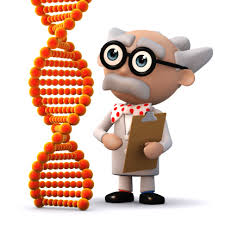
تطحن الأنسجة المراد إستخلاص الأحماض النووية منها على درجة حرارة منخفضة (أقل من40 درجة م) وذلك بعد إضافة محلول مائي للفينول المركز وصوديوم دوديسايل سلفات Sodium dodecyl sulfate (أو أي مادة اخرى مناسبة لتقليل الجذب السطحي) إليها . بعد هذه المعاملة يتغير التركيب الطبيعي للبروتينات الموجودة بالأنسجة وتصبح غير ذائبة في المحلول المائي وترسب بينما نجد أن الأحماض النووية تظل ذائبة في المحلول المائي. وبترك المطحون المتجانس الناتج ينفصل إلى طبقتين سائلتين ويمكن الإسراع بفصل الطبقتين بإجراء عملية طرد مركزي على درجة حرارة منخفضة . حيث يتم بعدها فصل الطبقة العليا المائية (والمحتوية على الأحماض النووية جميعها) عن الطبقة السفلى الأخرى الغنية بالفينول والتي يستغنى عنها.

ترسب الأحماض النووية من الطبقة المائية المفصولة وذلك بإضافة كحول الإيثايل اليها بعد ذلك يفصل الراسب المتكون بواسطة الطرد المركزي . وتنقى الأحماض النووية به بإذابته في الماء ثم إعادة ترسيبه بالكحول كما سبق وفصله بالطرد المركزي على صورة نقية.

ويمكن فصل كل من الحمضين النووين DNA و RNA كل على حدة بعد ذلك إما بمعاملته بإنزيم ريبونيوكليز (Ribonucleasa) وذلك لتكسير الحمض النووي RNA وتحويله إلى جزيئات صغيره ذائبة مع ترك الحمض النووي DNA كما هو بدون التأثير عليه . أو بمعاملة الخليط بإنزيم ديؤكسي ريبونيوكليز (Deoxyribonuclease) حيث تتكسر جزيئات الحمض النووي DNA تاركاً الحمض النووي RNA بدون تأثر . وبعد التخلص من أحد الحمضين النوويين يضاف محلول مائي للفينول وذلك لترسيب وإزالة ماتبقى من بروتين ثم تفصل الطبقة المائية المحتوية على الحمض النووي المراد الحصول عليه بالطرد المركزي . حيث بضاف لها بعد ذلك كحول الإيثايل لترسيب الحمض النووي.

وحيث أن الحمض النووي DNA على صورته الطبيعية عبارة عن لولب حلزوني طويل فإن إضافة كحول الإيثايل إليه ينتج عنه ترسيب DNA على هيئة راسب طويل ليفي حيث يمكن الحصول عليه من المحلول

بلفه حول محرك زجاجي حيث يوضع بعد ذلك في مذيب مناسب مثل الأسيتون لتجفيفه حيث يسهل إزالته جافاً عن المحرك الزجاجي ويحفظ جافاً في زجاجات على درجة حرارة – 20 درجة م.

[](http://www.google.com/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0CAcQjRw&url=http://www.thinkstockphotos.in/image/stock-photo-3d-mad-scientist-studies-a-dna-strand/476289623&ei=OLdDVIuaFIjWPM6BgdAP&bvm=bv.77648437,d.ZWU&psig=AFQjCNFkzfdftG2XbPvP04qNgQmo_zLk6g&ust=1413810341741938)

***2- استخلاص الحامض النووي DNA من البكتريا السالبة لصبغة غرام E.coli.***

**تنمية الخلايا:**

1. تنشر البكتريا المراد استخلاص الاحماض النووية منها على وسط صلب ملائم وتحضن بدرجة37 م لمدة24 ساعة، بعدها تؤخذ مستعمرة منفردة وتستعمل لتلقيح50 مل من وسط لوريا السائلLuria broth وتحضن بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة.

.2ينقل المزروع السائل إلى أنبوبة بولي اثيلين معقمة و ينبذ بسرعة4000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق.

.3يزال الرائق ويعلق الراسب في5 مل من دارئTE ثم تنبذ الأنابيب بسرعة 4000 دورة/دقيقة .

.4 تكرر الخطوة السابقة (عملية الغسلWashing ) لمرتين بعدها يعلق الراسب في5 مل من الدارئ وتحفظ الانابيب بدرجة 4 م لحين الاستعمال .

***استخلاص الدنا***

1. انقل المزروع البكتيري الى انبوبة ابندروف .
2. ضعها في جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000-16000دورة *لمدة دقيقة واحدة* ***.***
3. ***اضف 200l µ من محلول GT buffer الى الانبوبة ثم رجها بقوة***
4. ***احضنها بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.***
5. ***اضف 200 µl من محلول بفر GB ثم رج بقوة لمدة 5 ثوان .***
6. ***احضن بدرجه 70 ˚م لمده 10 دقائق.***
7. **اضف 5 µlمن محلول ٌ RNaseالى الانبوبه .**
8. **احضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.**
9. **اضف 200 *µl من محلول الايثانول المركز ثم رج الانبوبه بقوة.***
10. **ضع انبوبة spin column GD في داخل انبوبة جمع collection tube ثم انقل محتويات الانبوبه اليها .**
11. **ضع الانبوبة في جهاز السنترفيوج بسرعة 14-16000 دورة لمدة 2 دقيقة .**
12. **استبدل انبوبة الجمع بواحدة جديدة .**
13. **اضف 400 *µl الى انبوبة GD.***
14. **ضع الانبوبة في جهاز السنترفيوج بسرعة 14-16000 دورة لمدة 30 ثانية.**
15. **اضف 600 *µl* من محلول الغسل Wash buffer .**
16. **ضع الانبوبة في جهاز السنترفيوج بسرعة 14-16000 دورة لمدة 30 ثانية.**
17. **استبدل انبوبة الجمع بانبوبة ابندروف لتخزين الدنا فيها .**
18. **اضف 100 *µl* من محلول Elution buffer .**
19. **اترك الانبوبة لمدة 3-5 دقائق حتى يمتص المحلول من قبل اغشية السيليكا.**
20. **ضع الانبوبة في جهاز السنترفيوج بسرعة 14-16000 دورة لمدة 30 ثانية,ثم خذ انبوبه الابندروف واحكم اغلاها واخزنها في درجة حرارة -4 ̊م لحين استعمالها لاحقا في الفحوصات المطلوبة .**

****