الجامعة	**جامعة الانبار**
الكلية	**التربية للبنات**
القسم	**علوم الحياة**
المرحلة	**الرابعة**
اسم المادة باللغة العربية	**البايولوجي الجزيئي**
اسم المادة باللغة الانكليزية	**Molecular biology**
اسم التدريسي	**م.م. نبأ قيس جميل**
عنوان المحاضرة باللغة العربية	**استخلاص -2- DNA**
عنوان المحاضرة باللغة الإنكليزية	**DNA Extraction -2-**
رقم المحاضرة	**2**
المصادر او المراجع	**Bergtrom,Gerald.Basic Cell and Molecular Microbiology and Molecular Biology Reviews**

استخلاص الحامض النووي DNA Extraction

يشكل الحمض النووي نسبة صغيرة من مكونات الخلية وعادة ما يوجد في اماكن محددة و معروفة من الخلية. في الخلية بدائية النواة Prokaryotic cell يوجد DNA بشكل مكثف ومتمركزفي المنطقة النووية Nucleoid التي لا تنفصل عن بقية مكونات الخلية بغشاء خلوي . اما في حقيقية النواة Eukaryotic cell حيث يوجد DNA في مكان محدد وهو النواة والتي تنفصل عن بقية اجزاء الخلية بغشاء خلوي حوالي % 90 من DNA يوجد في النواة ضمن الكروموسوم ويسمى Nuclear DNA اما البقية فيوجد في المايتوكندريا ويسمى Mitochondrial DNA وفي البلاستيدات الخضراء يسمى Chloroplast DNA . اما في الفايروسات فيوجد DNA محاط بالغلاف البروتيني ويشكل % 50-30 من الكتلة الكلية للفايروس . كميةDNA الموجودة في الفايروسات قليلة جدا بالمقارنة مع كمية DNA الموجودة في الخلايا بدائية النواة و حقيقية النواة.

تعد عملية استخلاص DNA من العمليات الضروروية للحصول عليه واستخدامه في الاختبارات الجزيئية والتحليلات الجنائية وأياً كان مصدر الاستخلاص (بكتريا، خلايا نباتية، خلايا حقيقية النواة) فان عملية الاستخلاص توفر أيضا إزالة الشوائب كالبروتينات والدهون وغيرها من الشوائب الكيميائية.

تختلف طرق أستخلاص الحمض النووي، اعتمادًا على نوع العينة حيث ان طريقة استخلاص الحمض النووي للنبات تختلف عن طريقة الدم و كذلك عن البكتريا.

يتم تصنيف طرق استخلاص الحمض النووي إلى:

1. طرق استخراج الحمض النووي القائمة على المواد الكيميائية (أو المحاليل).
2. طرق استخلاص الحمض النووي من خلال المرحلة الصلبة (الطريقة الفيزيائية).

خطوات استخلاص DNA

1- تحليل الخلايا(Cell lyses) وإخراج محتوياتها وإذا كانت الخلايا محتوية على جدار كالخلايا النباتية فيجب تحطيم الجدار الخلوي اولاً وعادة يتم ذلك بالتبريد الفائق (بوساطة النايتروجين السائل حيث يوفر درجة حرارة تقترب من - 190 م°.

2- تحليل الأنوية (Nuclei lyses) للخلايا حقيقة النواة.

3- إضافة محلل (RNA ase) الذي يقوم بتحليل الحامض الرايبوزي RNA (والذي يعتبر احد ملوثات الدنا والملوث الآخر هو البروتينات) و يتم التخلص من البروتينات بواسطة الترسيب وفي هذه الخطوة يتم استخدام مذيبات عضوية وبفرات(buffers) عالية التركيز بالأملاح .

4- تنقية الـDNA- من محاليل الخطوة3- بوساطة الكحول(يستخدم الايثانول المبرد او الايزوبروبانول المبرد لكن الاخير يمتاز بترسيبه للسكريات مع الـDNA في درجات الحرارة الواطئة).
وضع الـDNA في بفر ملائم للحفاظ عليه ويوضع في درجة - 20 م°.

الأهداف الرئيسية لأستخلاص DNA

1. فصل الـDNA عن مكونات الخلية الاخرى يجب ان يكون الدنا نقيا من الملوثات المتمثلة بالبروتينات او الكربوهيدرات او RNA. يمكن فصل الـDNA عن المكونات الاخرى لان وزنه الجزيئي عالي.
2. الحصول على تركيز او كمية كافية من الـDNA لأجراء التجارب المطلوبة
3. تحضير DNA ذو نقاوة عالية خالي من الشوائب
4. تجهيز DNA ذو وزن جزيئي عالي يتراوح بين 50 to 200 bp

وظيفة بعض المواد والمحاليل الكيميائية المستخدمة في استخلاص الأحماض النووية

No.	المادة أو المحلول	الوظيفة
1.	EDTA	يعمل على تحلل جدار الخلية من خلال قيامه بسحب ايونات المغنيسيوم الموجبة التي تحافظ على استقرارية جدران واغشية الخلايا
2.	Tris-HCl	يحافظ على استقرار pH المحلول
3.	CTAB	منظف موجب الشحنة يذيب الاغشية الخلوية ويكون معقد مع الدنا مع وجود محلول ملحي واطئ يسهل عملية الترسيب كما يعمل على ازالة السكريات المتعددة ويبقى الدنا في المحلول
4.	Isopropanol	يعمل على ترسيب الدنا عن طريق سحب جزيئات الماء المرتبطة مع الدنا
5.	Ethedium bromid	صبغة لها قابلية التألق عند التعرض للأشعة الفة البنفسجية ولها القابلية على الارتباط مع الحامض النووي المزدوج
6.	RNase	انزيم يقوم تحليل الحامض النووي الرنا RNA
7.	DNase	انزيم يقوم تحليل الحامض النووي الدنا DNA

وظيفة بعض المواد والمحاليل الكيميائية المستخدمة في استخلاص الأحماض النووية

No.	المحلول او الوظيفة	الوظيفة
8.	Ethanol 100 %	يقوم بسحب جزيئات الدنا المرتبطة مع جزيئة الدنا مما يؤدي الى تحويل الدنا من الشكل الذائب الى الشكل الغير ذائب وبالتالي ترسيبه
9.	Ethanol 70 %	يقوم بغسل جزيئات الدنا من خلال ازالة بقايا الاملاح المستخدمة في الأستخلاص
10.	SDS	منظف ايوني سالب الشحنة يقوم بمسخ بروتينات الغشاء الخلوي حيث يعمل على فصل البروتينات المرتبطة مع جزيئة الدنا وتحليلها
11.	NaCl	يتأين الى +Na و -Cl ايون الصوديوم الموجب الشحنة يرتبط مع الدنا السالب الشحنة فيعمل على ترسب الدنا في الكحول . بدون استخدام هذا الملح هذا سوف يبقى الدنا سالب الشحنة في الطبقة المائية للمحلول
12.	Proteinase K	انزيم يعمل على تحطيم بروتينات الغشاء الخلوي يستخدم بكثرة مع الخلايا الحيوانية والبكتريا سالبة الشحنة