الكلية	التربية للعلوم الصرفة
القسم	علوم حياة
المادة باللغة الانجليزية	**Practical Molecular Biology**
المادة باللغة العربية	البايولوجي الجزيئي العملي
المرحلة الدراسية	الرابعة
اسم التدريسي	م.م. حسين رياض عبدالكريم
عنوان المحاضرة باللغة الانجليزية	**General principles of DNA isolation**
عنوان المحاضرة باللغة العربية	المبادئ العامة لعزل الـ **DNA**
رقم المحاضرة	3
المصادر والمراجع	Watson, J.D.; Baker, T.A,; Bell, S.P.; Gann, A. (2004). Molecular .Biology of the Gene. 5th Ed. Pearson edution
	Clark, D. (2006). Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution. Elsevier Inc.
	Santos, D.M. (2011). Genetic Engineering, Recent Developments in application. Apple Academic press.
	عماش، هدى صالح مهدي.(١٩٩٤). مبادئ علم الحياة الجزيئي. كلية العلوم . جامعة بغداد.
	البكري ، غالب حمزة.(١٩٩٠). مبادئ الهندسة الوراثية. جامعة البصرة.

محتوى المحاضرة

UNIVERSITY OF ANBAR

البايولوجي الجزيئي العملي

لطلاب كلية التربية للعلوم الصرفة \ قسم علوم الحياة \ المرحلة الرابعة

المختبر الثالث: المبادئ العامة لعزل الـ DNA

المبادئ العامة لعزل الـ DNA

يشكل الحامض النووي الدنا نسبة صغيرة من مكونات الخلية وعادة ما يوجد في أماكن محددة ومعروفة من الخلية في الخلية بدائية النواة Prokaryotic cell يوجد الدنا بشكل مكثف ومتمركز في مكان يدعى المنطقة النووية Nucleoid والتي لا تنفصل عن بقية مكونات الخلية بغشاء خلوي. أما في الخلية حقيقة النواة Eukaryotic cell فيوجد الدنا في مكان محدد وهو النواة والتي تنفصل عن بقية أجزاء الخلية الأخرى بغشاء خلوي، حوالي 90% من الدنا يوجد في النواة ضمن الكروموسوم ويسمى الدنا النووي Nuclear DNA أما البقية فيوجد في المايتوكوندريا ويسمى الدنا المايتوكونديري Mitochondrial DNA وفي البلاستيدات الخضراء ويسمى الدنا البلاستيدي Chloroplast DNA. أما في الفيروسات فيوجد محاط بالغلاف البروتيني ويشكل من 30 إلى 50 % الكتلة الكلية للفايروس.

تعد عملية استخلاص الدنا من العمليات الضرورية للحصول على نموذج الدنا وأياً كان مصدر الاستخلاص (بكتريا، خلايا نباتية، خلايا حيوانية) فان عملية الاستخلاص تتضمن ازالة الشوائب للحصول على الدنا نقياً. إن عملية استخلاص الدنا من الكائنات الحية مهمة جداً وتمثل الخطوة الأولى والأساسية للعديد من التجارب والفحوصات المختبرية الوراثية الأخرى يمكن أن تعرف عملية الاستخلاص بشكل عام بأنها عملية الحصول على مادة محددة مع

المجموع الكلي للمواد الأخرى بواسطة التأثير الفيزيائي أو الكيميائي. أن استخلاص الدنا في حالات كبيرة تمثل المطلب الأساسي للعديد من العمليات الجزيئية الأخرى.

الأهداف الرئيسية لاستخلاص الدنا هي:

1. فصل الدنا من كل مكونات الخلية الأخرى ضمن خطوات متسلسلة، ويجب أن يكون هذا الدنا نقياً قدر الامكان من الملوثات مثل البروتينات أو السكريات أو الكربوهيدرات أو RNA والخ. يمكن فصل الدنا عن المكونات الأخرى لأن وزنه الجزيئي عالي مقارنة بالجزيئات الأخرى.
2. الحصول على تركيز وكمية كافية من الدنا لإجراء التجارب الأخرى المطلوبة.
3. تحضير دنا ذو نقاوة عالية.

تعد مبادئ عزل واستخلاص الدنا من الكائنات الحية واحدة لجميع الطرائق لذلك فأن جميع الطرائق تتضمن الخطوات الأربعة التالية:

1. **تحضير المستخلص الخلوي، محلول تكسير الخلايا (Preparation of cell extract (Cells breakage:** لتكسير الجدران والأغشية الخلوية لتسهيل خروج الدنا وبقية مكونات الخلوية الأخرى ودون التعرض لأي أضرار أخرى، هناك العديد من الطرق المستخدمة في تكسير الجدران والأغشية الخلوية مثل الطحن Grinding، المزج أو الخلط Blend، الضغط العالي High pressure كل هذه الطرائق تسمى التكسير الميكانيكي والتي تعطي قوة عالية لتكسير الجدران أو الأغشية الخلوية. حيث يتم تكسير الخلايا النباتية يتم باستخدام النتروجين السائل الذي يكون ذو درجة حرارة واطئة جداً 179 تحت الصفر مع الهاون Mortar والذي توضع فيه العينة والمدقة أو يد الهاون Pestle والذي يستخدم للسحق، الخلايا الحيوانية فإنها تمزج أو تفرم لزيادة المساحة السطحية أما الخلايا البكتيرية فلا تحتاج لمثل هذه العمليات لتكسير الخلايا بل تتم باستخدام الطرق الكيميائية (المنظفات Detergents) أو باستخدام الطرق الأنزيمية. تعمل المنظفات على إذابة اللبيدات الموجودة في الأغشية الخلوية بالإضافة إلى التأثير تثبيطي لأنزيمات DNases التي تعمل على تحليل الـ DNA ويمكن أن تمسخ البروتينات وبذلك تساعد في ازالة البروتينات من المحلول. الأغشية الخلوية تحطم أو تحلل باستخدام محلول الاستخلاص والذي يحتوي على EDTA وSDS في أغلب الأحيان. الـ EDTA يعمل على ازالة أيون Mg والتي تمثل الدعامة الأساسية في حفظ التركيب الكلي للغشاء الخلوي. أما SDS فانه يساعد في تحطيم الأغشية الخلوية بإزالة اللبيدات من تلك الأغشية.
2. **تنقية الدنا من المستخلص الخلوي**: بالإضافة إلى الدنا يحتوي محلول المستخلص الخلوي على البروتينات و الحامض النووي الرنا RNA يجب التخلص من هذه الملوثات للحصول على الدنا بشكل نقي:

A: **إزالة البروتينات**: يتم فصل الدنا عن المكونات الخلوية الأخرى باستخدام العديد من عمليات إزالة البروتينات والتي تسمى Deproteinization Process من خلال استخدام معاملات بروتينية وأنزيمية يتم ازالة البروتينات من

المحلول بالاعتماد على الصفات والخواص الفيزيائية للبروتينات والأحماض النووية والتي تمثل الاختلاف في عملية الذوبان، وهناك طريقتين لإزالة البروتينات من المحلول هي:

- ✯ **ازالة البروتينات باستخدام المذيبات العضوية Deproteinization using organic solvents**:

معظم الطرق المستخدمة لإزالة البروتينات تعتمد على الاختلاف في ذوبانية الأحماض النووية والبروتينات والمذيبات العضوية. الأحماض النووية جزيئات محبة للماء hydrophilic molecules وتذوب بسهولة ضمن المحلول (الطبقة المائية، أما البروتينات فنها تحتوي على بقايا (جذور) كارهة للماء تجعلها تذوب في المذيب العضوي. أشهر المذيبات العضوية المستخدمة في ازالة البروتينات في الفينول Phenol والكلوروفورم المضاف إليه كمية قليلة من Isoamyl alcohol.

الفينول مادة بلورية في درجة حرارة الغرفة، يتحول إلى سائل عند اذابته في محلول Tris-HCL ذو أس هيدروجيني 8. إن البروتينات تحتوي على بقايا (جذور) حرة كارهة للماء متمركزة في وسط الجزيئة، وجزيئات الفينول من ناحية أخرى كارهة جداً للماء عليه عندما يتم مزج محول المستخلص الخلوي مع حجم ممثل من محلول الفينول فان بعض جزيئات الفينول تميل إلى الذوبان في لب (وسط) جزئية البروتين بدلاً من ذوبانها في الماء وبالتالي تنتشر جزيئة الفينول في وسط جزيئة البروتين وأخيراً تجعلها تنتفخ ثم تنفجر أو تمسخ Denture. جزيئات البروتين الممسوخة تذاب ضمن طبقة الفينول أما جزيئات الأحماض النووية والتي لا تملك الجزيئات الكارهة للماء فإنها تبقى ضمن الطبقة المالية العلوية ضمن هذه المرحلة لا يستطيع الفينول إزالة كل البروتينات من المحلول وعليه تكرار عملية الاستخلاص بالفينول مرة ثانية لإزالة كل البروتينات الموجودة ضمن المحلول. مع كل مرحلة استخلاص يتم فقدان حوالي 25% من جزيئات الدنا وبما أن الفينول مادة سامة Toxic وعملية تحضيرها أمر مزعج وذو رائحة كريهة لذلك يفضل استخدام الطرق الأنزيمية في إزالة البروتينات.

أما الكلوروفورم فإنه لا يذوب في الماء ولا يفقد جزئيات الدنا حتى عندما تعاد عملية الاستخلاص به عدة مرات، فعالية الكلورفورم في إزالة البروتينات The deproteinization action of chloroform مبنية على قدرة الكلوروفورم على مسخ البروتينات وجعلها تدخل ضمن الطبقة الوسطى المتكونة بينه وبين الماء The water-chloroform interphase ونتيجة لذلك يرتفع تركيز البروتينات ضمن الطبقة الوسطى مما يؤدي إلى ترسيبها، بما أن فعالية الكلوروفورم في إزالة البروتينات تحصل ضمن الطبقة الوسطى المتكونة بينه وبين الماء لذلك فان فعالية الكلوروفورم تزداد لزيادة المساحة السطحية، ولإنجاز ذلك يتكون أولاً شكل مستحلب من الكلوروفورم والماء، ونظراً لأن الكلوروفورم لا يستطيع الاختلاط أو الامتزاج مع الماء بالشكل الاعتيادي لذلك يتم التحريك بالاهتزاز القوي Vigorous shaking للمزيج لإنجاز ذلك، وفي بعض الأحيان يضاف الـ Isoamyl alcohol ليساعد في تكوين المستحلب وزيادة المساحة السطحية للماء والكلوروفورم.

- ✯ **إزالة البروتينات باستخدام الأنزيمات Deproteinization using Enzymes**:

يمكن أن تزال البروتينات من مزيج المستخلص الخلوي باستخدام الأنزيمات والتي من أكثرها استخداماً الـ Proteinase K وPronase، كلا الأنزيمين ثابتين جداً وتُستخلص من الفطريات بشكل طبيعي ويمكن أن تحضر بشكل صناعي وتمتاز بكونها خالية من انزيمات DNase ولكن تكون غالية الثمن. تكون فعالة جداً بوجود تراكيز واطئة من المنظفات السالبة Anionic detergent وتراكيز عالية من الأملاح والـ EDTA ومدى واسع من الأس الهيدروجيني (pH 6.0–10.0) ودرجة الحراة المثلى لها (50–67°C)، لذلك تستطيع أن تحطم البروتينات بدون أن تحتاج إلى عوامل مساعدة.

المشكلة في استخدام هذه الأنزيمات انها تستطيع أن تزيل 80 إلى 90 % من البروتينات الموجودة وهذا يعود إلى أن تحطيم البروتينات يعتمد على تركيز الأنزيم والمادة الأساس. عملياً معدل ازالة البروتينات The deproteinization rate يعتمد فقط على تركيز المادة الأساس (Substrate) للأنزيم.

بسبب انه ليس عملياً أن تضاف كمية كبيرة من الأنزيم لتسريع التفاعل عند تركيز منخفض من المادة الأساس، وكأي تفاعل كيميائي فان تركيز المادة الأساس يقل كلما تقدم وقت التفاعل، لمعالجة هذا التباطؤ ولإكمال الأنزيم عمله إلى نهاية الوقت المحدد يتم استخدام تركيز عالي من الأنزيم والمادة الأساس حيث أن الأنزيم يستطيع ازالة 80 إلى 90 % ومن البروتينات ضمن الوقت المعقول. هذه المشكلة يمكن أن تعالج باستخدام أحد المذيبات العضوية في الاستخلاص ولمرة واحدة فقط.

B. إزالة الحامض النووي الـ RNA (Removal of RNA): ازالة الحامض النووي الرنا خلال عملية استخلاص الدنا باستخدام الأنزيمات ولكن هذه الأنزيمات لا تزيل كل الرنا الموجود ولذلك نلاحظ بقاء كمية قليلة منه مع الحامض النووي الدنا. وإن من أفضل وأرخص الأنزيمات المستخدمة لهذا الغرض هي Ribonuclease A and Ribonuclease T والتي تستطيع أن تحطم جزيئة الرنا وخاصة عند القاعدة السايتوسين أو اليوراسيل. بعد استخدام المذيبات العضوية أو الأنزيمات في تحطيم البروتينات وازالة الحامض النووي الرنا يتم ترسيب البروتينات الممسوخة باستخدام الترسيب الميكانيكي (الطرد المركزي Centrifugation) والذي يتم إجراءه بعد التحضين في الحمام المسائي Water Bath مباشرةً أو أحياناً يسبق عملية الطرد المركزي إضافة محلول هيدروكسيد الصوديوم ذو التركيز العالي (5 إلى 6 مولار) حيث يؤدي ذلك إلى ترسيب البروتينات وبقية المكونات الخلوية ضمن الطبقة السفلى (الأثقل) أما الدنا فيبقى ضمن الطبقة المائية بشكل ذائب ويحتاج إلى عملية ترسيب.

3. ترسيب الحامض النووي الدنا (Precipitation of the DNA):

يتم ترسيب الدنا الموجود ضمن الطبقة المائية باستخدام نوعين رئيسين من الكحول وهما الايثانول Ethanol والأيزوبروبانول 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 إلى ذوبان الدنا في الماء. ترسيب الدنا بالكحول يعتمد على أساس

تقليل ذوبانية الدنا في الماء، حيث يتم إضافة الكحول إلى المحلول المائي والذي يعمل على تجميع خيوط الدنا ضمن المحلول المائي بسحب جزيئات الماء منها. بعدها يتم تجميع الدنا باستخدام عملية الطرد المركزي لترسيب خيوط الدنا في أسفل أنبوبة الاختبار. عندها يتم اضافة محلول Ethanol بتركيز 70 % بمقدار 2 مل إلى الدنا المترسب وتحريكه بهدوء، لغرض غسل الدنا وازالة بقية الاملاح المترسبة معه. بعد ذلك يترسب الدنا من المحلول بالطرد المركزي.

4.اذابة DNA: يتم اذابة الدنا المترسب بإضافة محلول **Elution Buffer** او الإذابة **TE** أو الماء المقطر حسب كمية الدنا المترسب.

الجدول أدناه يوضح وظيفة المواد والمحاليل المستخدمة في عزل الـ DNA:

ت	المادة أو المحلول	الوظيفة
.1	EDTA	يعمل على تحليل جدار الخلية من خلال قيامه بسحب أيونات المغنسيوم الموجبة ++Mg التي تحافظ على استقرارية جدران وأغشية الخلايا.
.2	Tris - HCl	يحافظ على استقرارية pH المحلول.
.3	CTAB	منظف موجب الشحنة يذيب الأغشية الخلوية ويكون معقد مع الدنا مما يسهل ترسيبه بوجود محلول ملحي واطئ التركيز أو بإضافة محلول الايزوبروبانول، كما يعمل على إزالة السكريات المتعددة 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	Ethidium bromide	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 الدنا 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 إلى تحويل الدنا من الشكل الذائب إلى الشكل الغير ذائب وبالتالي ترسيبه.
.10	SDS	منظف أيوني سالب الشحنة Anion Detergent يقوم بمسخ بروتينات الغشاء الخلوي ويعمل على فصل البروتينات المرتبطة مع جزيئة الدنا وتحليلها.
.11	Sodium acetate	أحد الأملاح التي تستخدم في ترسيب الدنا لأن هذا الملح سريع الذوبان في الإيثانول 70% مما يؤدي إلى إزالته بسهولة من الدنا خلال الغسل مع الايثانول 70%.
.12	NaCl	يتأين إلى Na^+ و Cl^-، أيون الصوديوم الموجب الشحنة يرتبط مع الدنا السالب الشحنة هذا يسمح لجزيئة الدنا لتترسب في الكحول. بدون استخدام هذا الملح يبقى الدنا 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 تتوزع الدهون والبروتينات وبقية المحتويات الخلوية في طور بيني أما الأحماض النووية فإنها تتواجد ضمن الطبقة المائية لقابليتها لذوبان فدي 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 وأخيراً 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	تزيل هذه المادة البروتينات الخلوية الناتجة من تحلل الأغشية الخلوية خلال الاستخلاص. تستخدم

	Perchlorate	بتركيز عالي وتعمل على إزالة الـ SDS والبروتينات الذائبة وتمنع البروتينات للترسب مع الدنا خلال عملية ترسيبه بالإيثانول.
.18	TE	لإذابة الـ DNA، لتثبيط بقايا أنزيم الـ DNase إن وجدت.
.19	Liquid Nitrogen	يعمل على تحطيم جدران الخلايا النباتية لأنه ذو درجة حرارة 176 تحت الصفر.
.20	$MgCl_2$	يحافظ على الأحماض النووية من تأثير الأنزيمات الحالة مثل أنزيم اللايسوزايم.
.21	Triton – X 100	أحد أنواع المنظفات المتعادلة Neutral detergent التي تقوم بإذابة البروتينات بدون مسخها.
.22	β-Mercaptoethanol	عامل اختزال قوي جداً يقوم بتكسير جسور السستين Cysteine residues للبروتينات مما يؤدي إلى تغيير تركيبها.
.23	PVP	أحد مكونات محلول الاستخلاص المستخدم لاستخلاص الدنا من النباتات الغنية بالمركبات الفينولية حيث يساعد امتزاز هذه المركبات الفينولية.
.24	Lysozyme	أنزيم يستخدم مع الـ EDTA حيث يقوم بتكسير الجدار الخلوي أو بتحليل الغشاء الخلوي للبكتريا.
.25	Sarkosyl	منظف أيوني سالب الشحنة يستخدم بدلاً من الـ SDS نتيجة لذوبانيته العالية في المحاليل ذات التركيز العالي، أما الـ SDS فلا يذوب في المحاليل ذات التركيز العالي.
.26	Ammonium acetate	أحد الأملاح التي تستخدم في ترسيب الدنا ويفضل في الاستخدام لأنه عالي الذوبان في الإيثانول ومن السهل ازالته من الدنا نتيجة لتحلله إلى أيونات Ammonium وAcetate. استخدام Ammonium acetate يفضل على استخدام Sodium acetate لأنه يعمل على إزالة النيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات أو الأحماض النووية المزدوجة الصغيرة (الأقل من 30bp) بالإضافة إلى قدرة خلات الأمونيوم على إزالة المنظفات وبعض الملوثات والتي تثبط الأنزيمات المستخدمة في تجارب إعادة ارتباط الدنا.