الجلسة الثالثة

استخلاص DNA (DNA Extraction)

استخراج أو استخلاص الحمض النووي منقوص الأكسجين هو عملية تستخدم لتنقية و استخلاص DNA باستخدام طرق كيميائية أو فيزيائية من عينه بيولوجيه، و ذلك عن طريق فصل الحمض النووي عن البروتين و أغشية الخلايا و المكونات الخلوية الأخرى.
المبدأ الأساسي لاستخلاص DNA هو تحلل الأغشية (الخلوية و النووية) ثم فصل الحمض النووي عن البروتينات و أغشية الخلايا و المكونات الخلوية الأخرى.

الخطوات الأساسية لاستخلاص DNA و التي تكون متشابهة بين جميع الطرق:

1- تحلل الخلية Cell dissolution : تحلل الخلية و النواة لاستخراج DNA .
2- الترسيب Precipitation: إزالة الشوائب و البروتينات من العينة.
3- التنقية Purification: للحصول على DNA نقي و جاهز للاستخدام.

يتم تصنيف طرق استخلاص الـ DNA إلى:

1- الطرق المعتمدة على المحاليل و المواد الكيميائية التي يستحدم بها:

أ. محاليل عضوية، مثل الفينول، و الكلوروفورم، فينول الكلوروفورم، و كحول الأيزو أميل و غيرها.....
ب. غير عضوية، مثل: طريقة دودي سلفات الصوديوم (SDS)، و طريقة سيتيل تريميثيل بروميد الأمونيوم (CTAB)، و طريقة التمليح (Salting-out)، و طريقة بروتيناز k (Proteinase k)، و أيضا التقنيات المعتمدة على هلام السيليكا.....

2- الطرق المعتمدة على المرحلة الصلبة (الطريقة الفيزيائية)

سنتطرق هنا لإحدى الطرق غير العضوية و هي طريقة SDS.

استخلاص الـDNA باستخدام سلفات دوديسيل الصوديوم SDS

1- جمع الحيوانات المنوية

تؤخذ النطاف من خلال شق في الغدة التناسلية، يتم فرم الأنسجة بواسطة مشرط وتوضع في المحلول الواقي (1) ثم يتم ترشيح السائل المعلق على قطعة من القماش المعالج. بعد ذلك نقوم بعملية التثفيل لمدة عشر دقائق وبسرعة 19000 دورة في الدقيقة.

ثم نقوم بالتخلص من القسم الطافي (المعلق).

بعد ذلك نقوم بغسل الناتج وذلك بوضعه في المحلول الواقي (2) ثم نقوم بالتثفيل لمدة عشر دقائق وبسرعة 19000 دورة في الدقيقة. نعيد هذه الخطوة حتى نحصل على القسم الطافي بشكل صاف تماما.

2- تنقية النوى من الحيوانات المنوية

نضع الناتج من الحيوانات المنوية في المحلول الواقي رقم (3) ثم نقوم بخض المعلق الناتج بهدوء بواسطة جهاز يتحرك أفقيا (Dance) لكي يكون متجانسا.

نقوم بعد ذلك بعملية تثفيل بسرعة 3000 دورة في الدقيقة لمدة عشر دقائق بدرجة حرارة 4 مئوية.

ثم نتخلص من القسم الطافي ونكرر هذه الخطوة مرتين.

نضع الناتج المتبقي لدينا في المحلول الواقي رقم (4) (حجم المحلول الواقي يساوي 4 أضعاف حجم محلول النوى).

نقوم بعد ذلك بعملية تثفيل بسرعة 3000 دورة في الدقيقة لمدة عشر دقائق بدرجة حرارة 4 مئوية ثم نتخلص من القسم الطافي ونكرر هذه الخطوة مرتين ثم نضع الناتج في المحلول الواقي رقم (5).

3- استخلاص الـ DNA

نضيف سلفات دوديسيل الصوديوم $NaSO_4(CH_2)_{11}CH_3$ للوصول إلى محلول بتركيز 0.5% (الهدف منه هو عمل ثقوب في غشاء النواة لخروج الـDNA)، و أنزيم البروتيناز K (proteinase K) بتركيز 50 ملغ/مل (الهدف من هذا الأنزيم هو تحطيم متعددات الببتيدات أي البروتينات إلى وحدات صغيرة، وبالتالي من السهل التخلص منها بعد ذلك عن طريق مرحلة واحدة من الاستخلاص الفينولي). ونضيف أيضا أنزيمات الريبونوكلياز ribonucleases ومهمتها هضم سريع لجزيئات الـ RNA إلى وحدات بسيطة و هي الريبونكليوتيدات، ونترك المحلول لمدة 10 إلى 12 ساعة في درجة حرارة 4 مئوية مع خض لطيف على الجهاز Dance.

بعد ذلك نقوم باستخدام محلول الفينول كلوروفورم (الحجم 1/1) ونكرر العملية ثلاث مرات. الاستخلاص الأخير للـ DNA يتم باستخدام الكلوروفورم فقط.

4- ترسيب الـ DNA

نقوم بترسيب المحلول الناتج وذلك بإضافة الإيزوبروبانول ونتركه ليلة كاملة وبدرجة حرارة 4 مئوية.

(يتم ترسيب الـ DNA بالايتانول (2 حجم) أو باستخدام الايزوبروبانول (0.6 حجم) يشتمل في الواقع على جعل جزئ الـ DNA غير منحل).

بشكل عام يترسب الـ DNA في الايتانول بدءا من التركيز 67 % . و إن إضافة الأملاح مثل اسيتات الصوديوم أو الأمونيوم يطرد الماء من الـDNA من خلال اخذ الشوارد السطحية و أيضا تحافظ على بنية من الـDNA.

يجب التخلص من هذه الأملاح في النهاية عن طريق الغسل باستخدام الايتانول بتركيز 75% .

نقوم بأخذ مادة الـ DNA المترسبة بواسطة ماصة وبعد ذلك نغسل الـ DNA بالكحول ذات التركيز75%

يتم تجفيف الـ DNA باستخدام المخلية الهوائية ثم نقوم بتمديد الـ DNA بالماء المقطر المعالج بثنائي ايتيل بيروكاربونات، ويحفظ بدرجة حرارة 4 مئوية في حال استخدامه بعد قليل أو اليوم الثاني، و يحفظ في درجة حرارة (-20) للاستخدام فيما بعد.

5- تنقية الـ DNA باستخدام كلوريد السيزيوم

نقيس تقريبيا حجم المحلول (1إلى 2 ملغ من DNA في 5 مل من الماء و pH =8).

نضيف 1 غ من كلوريد السيزيوم لكل 2.5 مل من المحلول ثم نخض المحلول بلطف ونضف 20 ميكروليتر من بروميد الايتيديوم (تركيز 10 ملغ\مل) لكل 1 مل.

نضع 3 مل من محلول (كلوريد السيزيوم+ بروميد الايتيديوم) السابق في أنبوب يسمح بالتثفيل بسرعة كبيرة، نضيف إليها بهدوء محلول الـ DNA ونكمل الحجم بالماء مع pH =8

نثفل الأنبوب 30000 دورة في الدقيقة لمدة 20 ساعة.

نأخذ الناتج ذات اللون الأحمر القاتم بواسطة سيرنك مدبب ثم نضعه في أنبوب سعته 15 مل.

نتخلص من بروميد الايتيديوم بواسطة كمية مماثلة من البيوتانول-1 المشبع بالماء. نثفل بسرعة 2000 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق ثم نقوم بالتخلص من القسم العلوي من المحلول ونكرر ذلك حتى اختفاء اللون الأحمر.

بعد ذلك نضيف 1 حجم من الـ DNA مقابل 1000 حجم من الماء.

6- معايرة كمية الـ DNA باستخدام مقياس المطياف الضوئي

قبل البدء بالتجارب من الضروري جدا معرفة كمية الـ DNA الموجودة بشكل دقيق في المحلول، وذلك عن طريق قياس تراكيز الـDNA بواسطة قياس امتصاصية الأشعة الفوق بنفسجية (U.V) بجهاز التحليل الطيفي spectrophotometry. تتناسب كمية الأشعة فوق البنفسجية الممتصة من محلول يحتوي على جزيئات من الـDNA بشكل مباشر مع كمية هذا الأخير الموجودة في العينة.

تقاس الامتصاصية غالبا عند طول موجة 260 نانومتر، و تشير الامتصاصية 1 عند طول موجة 260 نانومتر (A 260) إلى وجود 50 µg من الـDNA مضاعف السلسلة في الميلي ليتر الواحد من المحلول (50 µg/ml).
ويمكن تحديد نقاوة عينة الـDNA بواسطة قياس الامتصاصية بالأشعة الفوق بنفسجية.

في عينة الـDNA المحضرة يجب أن تكون نسبة امتصاصية الأشعة عند طول الموجة 260 و 280 مقدرة مابين (A260/A280 = 1,83 -2,32).

في حال أن القيمة أقل من 1,83 عند طول هذه الموجات ذا دليل على تلوث عينة DNA بالبروتينات.

في حال أن القيمة أكبر من 2,32 عند طول هذه الموجات ذا دليل على تلوث عينة DNA باللبيدات و RNA.