**الجلسة الثانية**

# فصل عضيات الخلية و استخلاص RNA

# Separation of cell organelles and Extraction RNA

**مقدمة:**

إن استخلاص الـ DNA وعزله وأيضا" استخلاص الـ RNA هو تقنية تسمح بعزل الحمض الريبي النووي من الخلايا أو النسج والناتج من عملية الاستخلاص يستخدم فيما بعد للدراسات التي تخص علم البيولوجيا الجزيئية مثل الاستنساخ وتفاعلات التسلسل البوليميري PCR و RT-PCR وغيرها.

إن النسج العصبية والحيوانات المنوية والعضلات تشكل مصدرا" غنيا" جدا" بالحمض النووي DNA، لذلك تستخدم هذه النسج لاستخلاص الـ DNA .

يوجد طرق مختلفة لاستخلاص الـ DNA ولكن المبدأ واحد.

بشكل عام نستطيع أن نميز عدة خطوات أساسية في الطريقة الخاصة لعزل الـ DNA:

1 - جمع النسج وعزلها

2 - عزل وتنقية النوى.

3 - استخلاص الحمض النووي DNA بشكل نظيف حسب النقاوة المرجوة.

4 - يتم الانتهاء من عملية الاستخلاص بتنقية الحمض النووي الناتج عن طريق استخدام تقنية التدرج لكلوريد السيزيوم Cs cl .

## أولا"- فصل عضيات الخلية Separation of cell organelles

**التقنيات المستخدمة في فصل العضيات**

يوجد تقنيتين مستخدمتين على نطاق واسع في المختبرات من أجل فصل الجزيئات بشكل عام حسب الكثافة:

- الطرد المركزي بالتدرج المستمر
- الطرد المركزي بالتدرج المتقطع

## ***1- الطرد المركزي بالتدرج المستمر Isopycnique***

تتم عملية الطرد المركزي بالتدرج المستمر باستخدام كلورد السيزيوم Cs cl بكثافة معينة وبإخضاعه لقوة من الجاذبية المكثفة التي تشكل تلقائيا تدرجا من الكثافة المستمرة.

إن هذا المحلول المتدرج يصل إلى مئة وحدة من الكثافات المختلفة، وبالتالي فإن الجزيئات المضافة إلى محلول كلوريد السيزيوم ستتوضع خلال عملية الانتقال في منطقة التدرج التي لها نفس كثافة الجزيئات المضافة.

هذا النوع من النبذ بسرعة فائقة جدا هو عملية حاسمة ودقيقة جدا.

- **الاستخدامات الرئيسية لهذه التقنية**

**1-** تحضير البلاسميدات والفاجات أو آكلات الجراثيم وأيضا تنقية الشكل اللولبي للبلاسميدات الجرثومية. هذه البلاسميدات يجب أن تكون منفصلة عن بروتينات الـ RNA البكتيري وعن DNA الصبغي الخيطي، إذ أن هذه الجزيئات الكبيرة تملك كثافات متقاربة تتراوح بين 1.25 و 1.3 غ/مل.

إن وجود كلوريد السيزيوم سيحفز تثبيت الشوارد $Cs^+$ بشكل مختلف على هذه الجزيئات الكبيرة، وبالتالي فان الكثافة الظاهرية ستكون مختلفة.

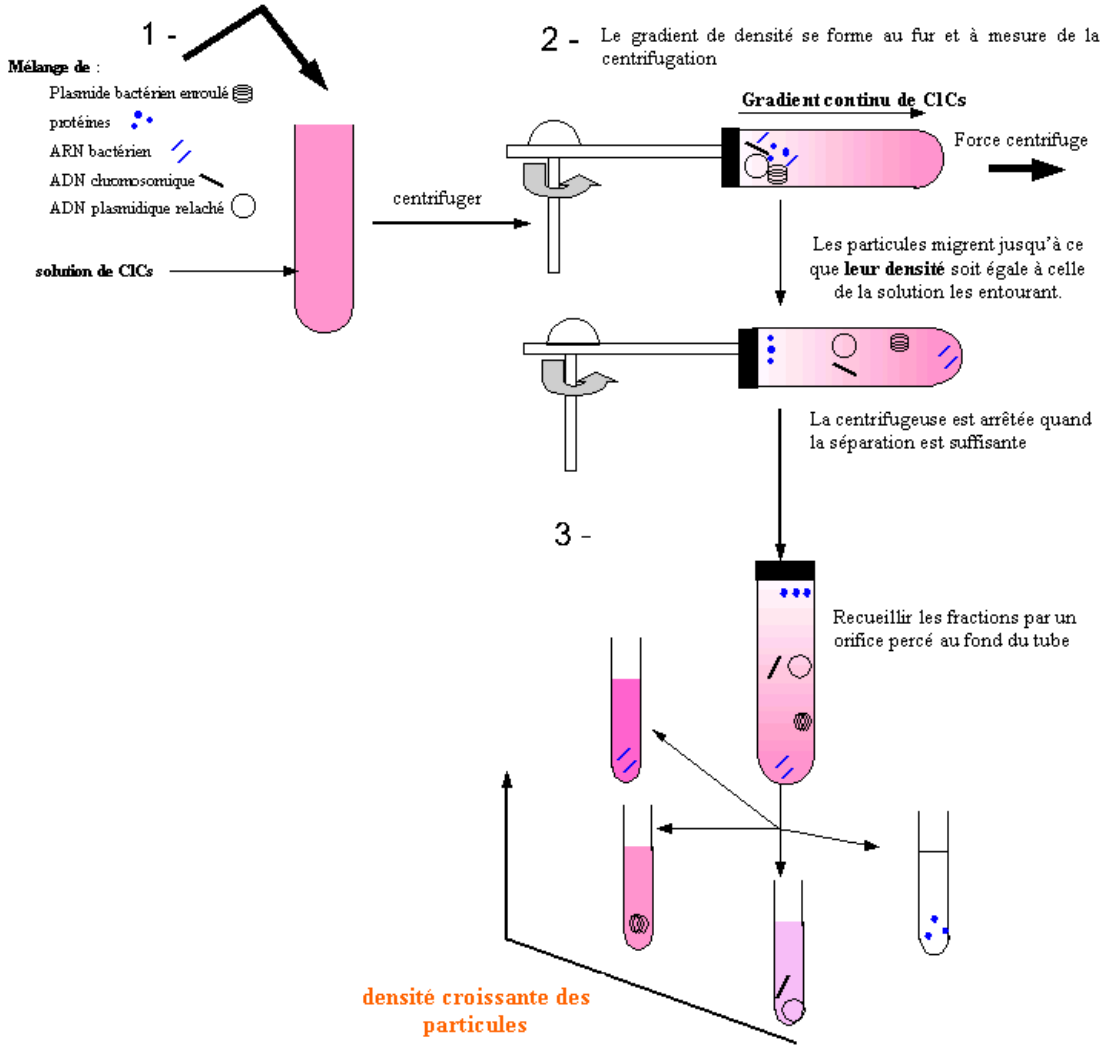
البروتين 1.3 غ/مل

RNA 1.75- 1.89 غ/مل

DNA 1.6- 1.79 غ/مل

هذه الجزيئات ستكون سهلة الفصل عن بعضها البعض من خلال عمليات الطرد المركزي.

**2-** الفصل بين الجزيئات المتطابقة التي تكون واحدة منها موسومة بالعناصر الثقيلة.


1 -
Mélange de :
Plasmide bactérien enroulé
protéines
ARN bactérien
ADN chromosomique
ADN plasmidique relaché
solution de ClCs
centrifuger
2 - Le gradient de densité se forme au fur et à mesure de la centrifugation
Gradient continu de ClCs
Force centrifuge
Les particules migrent jusqu'à ce que leur densité soit égale à celle de la solution les entourant.
La centrifugeuse est arrêtée quand la séparation est suffisante
3 -
Recueillir les fractions par un orifice percé au fond du tube
densité croissante des particules

***2- الطرد المركزي بالتدرج المتقطع أو غير المستمر (الطرد المركزي على وسادة)***

في هذه التقنية يتم تشكيل التدرج مسبقا من خلال رواسب متتابعة ( تسمى منصات) من كلوريد السيزيوم بكثافات متزايدة.

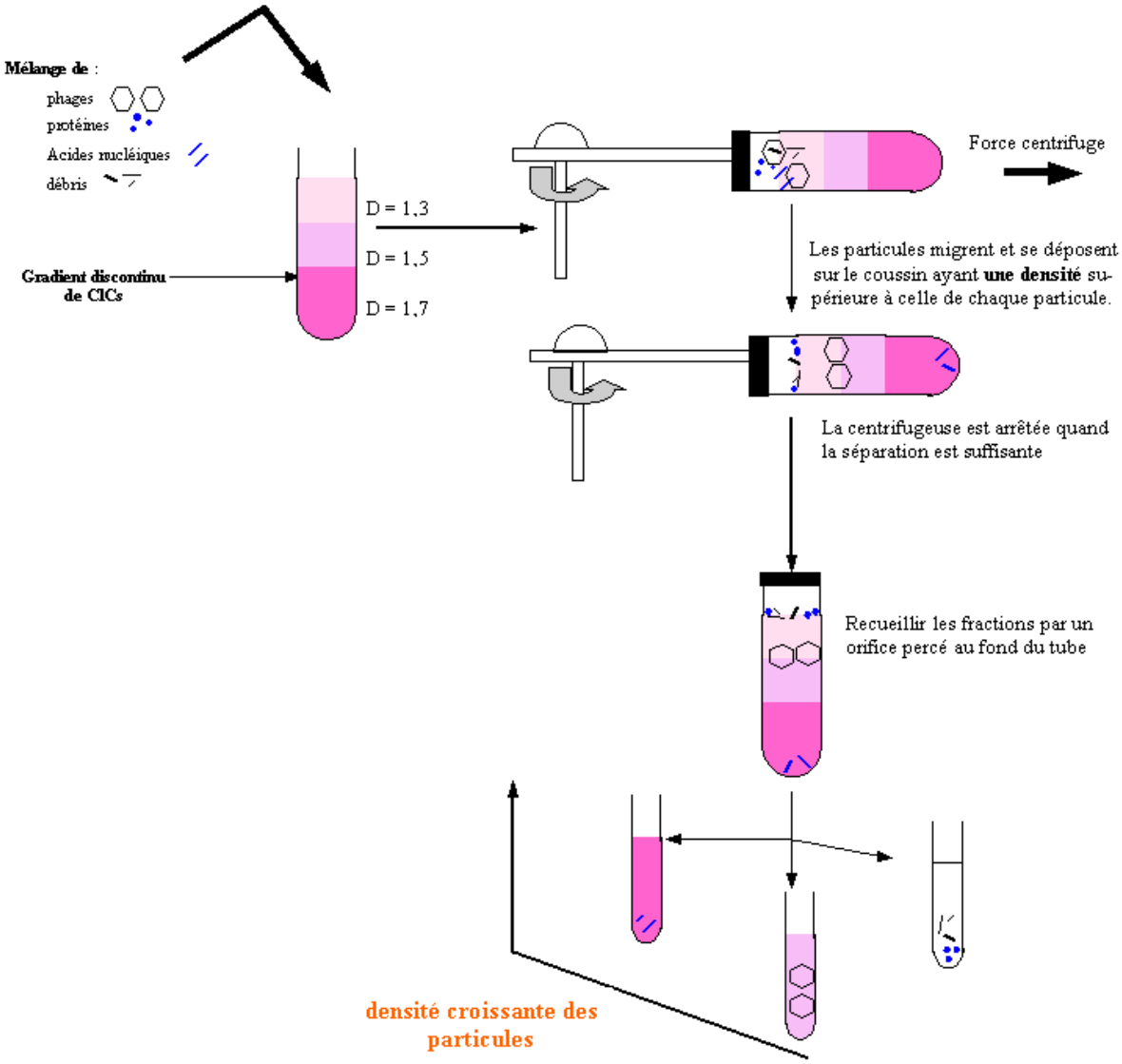
إن الجزيئات المختلفة والجسيمات الفيروسية وآكلات الجراثيم ستتوضع خلال عملية التثفيل فوق طبقة كلوريد السيزيوم التي لا تستطيع العبور من خلالها.

في الواقع وحدها الجزيئات التي لها كثافة أعلى من تلك الخاصة بمنصة كلوريد السيزيوم هي التي تستطيع عبورها والنفاذ من خلالها.

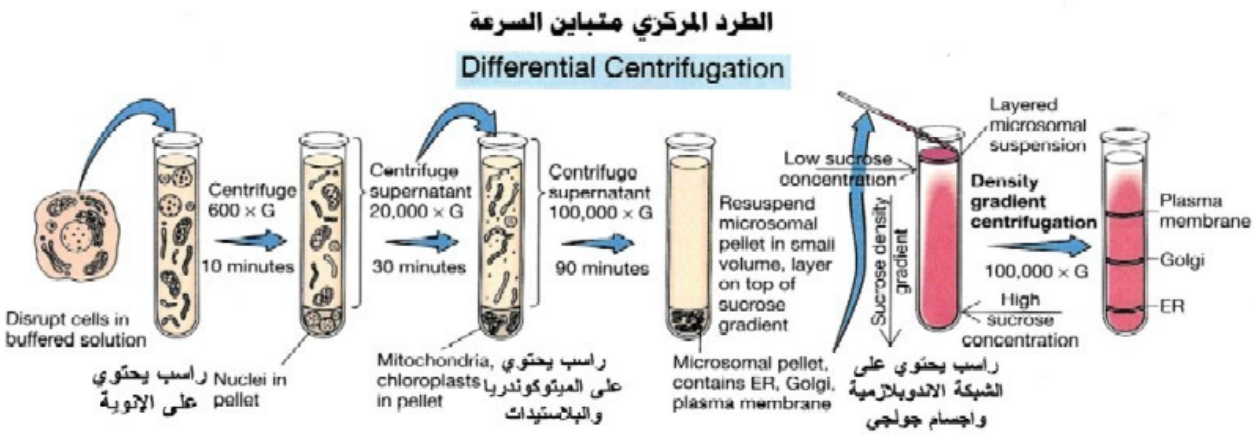
هذا النمط من التثفيل يسمح بفصل سريع وسهل لخليط من الأحماض النووية والتي لها كثافات مختلفة وكذلك الأحماض المجانسة.

- الاستخدامات الرئيسية لهذه التقنية:

تساعد في التحضير السريع وبشكل واسع لآكلات الجراثيم والفيروسات ذات الكثافات المعروفة.


Mélange de :
phages
protéines
Acides nucléiques
débris
Gradient discontinu de CICs
D = 1,3
D = 1,5
D = 1,7
Force centrifuge
Les particules migrent et se déposent sur le coussin ayant une densité supérieure à celle de chaque particule.
La centrifugeuse est arrêtée quand la séparation est suffisante
Recueillir les fractions par un orifice percé au fond du tube
densité croissante des particules

# عزل مكونات الخلية بواسطة الطرد المركزي



**المثفلة**

# ثانيا"- استخلاص الـ RNA (Extraction RNA)

عند القيام باستخلاص الـ RNA يجب الأخذ بعين الاعتبار ما يلي:

- أن تكون الأدوات المستخدمة سواء كانت من البلور أو البلاستيك معقمة جيدا.
- أن تكون جميع المحاليل المستخدمة محضرة باستخدام الماء المقطر مرتين على الأقل والمعالجة باستخدام ثنائي ايتيل البيروكاربونات ( DEPC 0.1% ) من أجل تثبيط عمل أنزيمات الريبونوكلياز.
- استخدام القفازات المطاطية بشكل دائم خلال العمل و استبدالها باستمرار.
- إن المادة الحية المستخدمة يجب أن تكون مستخلصة حديثا قدر الإمكان أو مستخلصة و مجمدة في الآزوت السائل.

**الاستخلاص السريع للـ RNA باستخدام التريزول TRISOL**

TRISOL = خليط تجاري من الفينول و الآيزوتيوسيانات الكاندين الذي يمنع فعل أنزيمات حلمهة الـ RNA

**طريقة العمل:**

- نأخذ 50 ملغ من الأنسجة المسحوقة ونضعها في 1 مل من محلول التريزول .
- نترك المحلول السابق لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة ثم نضيف 0.2 حجم من الكلوروفورم ونخض بقوة.
- يثفل المزيج السابق لمدة 15 دقيقة بسرعة 10000 دورة في الدقيقة و بدرجة حرارة 4 مئوية.
- يؤخذ الطور السائل العلوي ويوضع في أنبوب جديد ونقوم بالترسيب بإضافة 0.5 مل من الايزوبروبانول.
- نثفل بسرعة 10000 دورة في الدقيقة لمدة 15 دقيقة .
- يتم غسل الناتج باستخدام الكحول 75% ويتم تجفيف الناتج باستخدام المخلية الهوائية.
- إذا كان الـ RNA الناتج ليس للاستخدام المباشر يجب حفظه مترسبا في الايتانول. يحفظ في درجة حرارة - 20 مئوية.