استخلاص الحامض النووي الدنا: DNA extraction

يشكل الحامض النووي الدنا نسبة صغيرة من مكونات الخلية وعادة ما يوجد في أماكن محددة ومعروفة من الخلية. في الخلية بدائية النواة Procaryotic cell يوجد الدنا بشكل مكثف ومتمركز في مكان يدعى المنطقة النووية Nucleoi والتي لا تنفصل عن بقية مكونات الخلية بغشاء خلوي. اما في الخلية حقيقة النواة Eucaryotic cell فيوجد الدنا في مكان محدد وهو النواة والتي تنفصل عن بقية اجزاء الخلية الاخرى بغشاء خلوي، حوالي ٩٠% من الدنا يوجد في النواة ضمن الكروموسوم ويسمى الدنا النووي Nuclear DNA اما البقية فيوجد في المايتوكوندريا ويسمى الدنا المايتوكونديري Mitochondrial DNA وفي البلاستيدات الخضراء ويسمى الدنا البلاستيدي Chloroplast DNA . اما في الفيروسات فيوجد المنا محاط بالغلاف البروتيني ويشكل ٣٠-٥٠% من الكتلة الكلية للفايروس.كمية الدنا الموجودة في الفيايروس قلية جدا بالمقارنة مع كميتة الدنا الموجودة في الخلايا الحقيقية والبدائية النواة.

تعد عملية استخلاص الدنا من العمليات الضرورية للحصول على نموذج الدنا، وايا" كان مصدر الاستخلاص (بكتريا، خلايا نباتية، خلايا حيوانية) فان عملية الاستخلاص تتضمن ازالة الشوائب للحصول على الدنا نقيا". ان عملية استخلاص الدنا من الكائنات الحية مهمة جدا وتمثل الخطوة الأولى والأساسية للعديد من التجارب والفحوصات المختبرية الوراثية الاخرى.يمكن ان تعرف عملية الاستخلاص بشكل عام بأنها عملية الحصول على مادة محددة مج المجموع الكلي للمواد الاخرى بواسطة التاثير الفيزيائي اوالكيميائي. ان استخلاص الدنا في حالات كثيرة تمثل المطلب الاساسي للعديد من العمليات الجزيئية الاخرى.

الاهداف الرئيسية لاستخلاص الدنا هي:

١-فصل الدنا من كل مكونات الخلية الاخرى ضمن خطوات متسلسلة، ويجب ان يكون هذا الدنا نقيا" وبدون اي ملوثات من بروتينات او كربوهيدرات او RNA والخ. يمكن فصل الدنا عن المكونات الاخرى لان وزنه الجزيئي عالي مقارنة بالجزيئات الأخرى.

٢-الحصول على تركيز او كمية كافية من الدنا لإجراء التجارب الأخرى المطلوبة.

٣-تحضير دنا ذو نقاوة عالية وخالي من الملوثات الاخرى.

٤-تجهيز دنا ذو وزن جزيئي عالي High molecular weight (HMW) وتسمى هذه العملية Integrity والذي يتراوح 50 to 200 kbp.

تعد مبادئ عزل واستخلاص الدنا من الكائنات الحية واحدة لجميع الطرق لذلك فان جميع الطرق المستخدمة لاستخلاص الدنا تتضمن الخطوات الاربعة التالية:

١- تحضير المستخلص الخلوي (تكسير الخلايا) Preparation of cell extract (Cells breakage)

تكسير 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 او الخلط blending، الضغط العالي high pressure كل هذه الطرق تسمى التكسير الميكانيكي والتي تعطي قوة عالية لتكسير الجدران أو الأغشية الخلوية.

تكسير الخلايا النباتية يتم باستخدام النتروجين السائل الذي يكون ذو درجة حرارة واطئة جدا ١٧٦ تحت الصفر مع الهاون mortar والذي توضع فيه العينة والمدقة او يدة الهاون pestle والذي يستخدم للسحق. الخلايا الحيوانية فانها تمزج او تفرم لزيادة المساحة السطحية.اما الخلايا البكتيرية فلا تحتاج لمثل هذه العمليات.تكسير الخلايا يتم باستخدام الطرق الكيميائية (المنظفات detergents) و / او باستخدام الطرق الانزيمية. المنظفات تعمل على إذابة اللبيدات الموجودة في الاغشية الخلوية بالإضافة الى أنها تملك تأثير تثبيطي لأنزيمات DNases التي تعمل على تحليل ال DNA ويمكن ان تمسخ البروتينات وبذلك تساعد في ازالة البروتينات من المحلول. الاغشية الخلوية تحطم او تحلل باستخدام محلول الاستخلاص والذي يحتوي علىEDTA و SDS في اغلب الاحيان. ال EDTA يعمل على ازالة ايونات Mg^{2+} والتي تمثل الدعامة الأساسية في حفظ التركيب الكلي للغشاء الخلوي. اما ال SDS فانه يساعد في تحطيم الأغشية الخلوية بإزالة اللبيدات من تلك الاغشية.

٢- تنقية الدنا من المستخلص الخلوي: Purification of DNA from cell extract

بالإضافة الى الدنا يحتوي محلول المستخلص الخلوي كميات من البروتينات والحامض النووي الرنا RNA لذلك يجب

التخلص من هذه الملوثات للحصول على الدنا بشكل نقي.

١- إزالة البروتينات: Removal of Protein

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 (الخواص) الفيزيائية للبروتينات والأحماض النووية والتي تمثل الاختلاف في عملية الذوبان، **وهناك طريقتين لإزالة البروتينات من المحلول هي:**

١- إزالة البروتينات باستخدام المذيبات العضوية: Deproteinization using organic solvents

معظم الطرق المستخدمة لإزالة البروتينات تعتمد على الاختلاف في ذوبانية الأحماض النووية والبروتينات المذيبات العضوية. الأحماض النووية جزيئات محبة للماء hydrophilic molecules وتذوب بسهوله ضمن المحلول (الطبقة) المائية، أما البروتينات فانها تحتوي على بقايا (جذور) كارهة للماء تجعلها تذوب في المذيب العضوي.أشهر المذيبات العضوية المستخدمة في ازالة البروتينات هي الفينول phenol والكلوروفورم chloroform المضاف اليه كمية قليلة isoamyl alcohol .

الفينول مادة بلورية في درجة حرارة الغرفة، يتحول الى سائل باذابته في محلول Tris-HCL ذو اس هيدروجيني ٨. ان البروتينات تحتوي على بقايا (جذور) كثيرة كارهة للماء متمركزة في وسط الجزيئة، وجزيئات الفينول من ناحية أخرى كارهة جدا للماء عليه عندما يتم مزج محلول المستخلص الخلوي مع حجم مماثل من محلول الفينول فان بعض جزيئات الفينول تميل الى الذوبان في لب (وسط،مركز) جزيئة البروتين بدلا ذوبانها في الماء وبالتالي تنتشر جريئة الفينول في وسط جزيئة البروتين وأخيرا تجعلها تنتفخ ثم تنفجر او تمسخ denature . جزيئات البروتين الممسوخة تذاب ضمن طبقة الفينول أما جزيئات الأحماض النووية والتي لا تملك الجزيئات الكارهة للماء فإنها تبقى ضمن الطبقة المائية العلوية.ضمن هذه المرحلة لا يستطيع الفينول إزالة كل البروتينات من المحلول وعليه تكرر عملية الاستخلاص بالفينول مرة ثانية لإزالة كل البروتينات الموجودة ضمن المحلول. مع كل مرحلة استخلاص يتم فقدان حوالي ٢٠% من جزيئات الدنا وبما ان الفينول مادة سامة Toxic وعملية تحضيره مزعجة لانه ذو رائحة كريهة لذلك يفضل استخدام الطرق الانزيمية في إزالة

البروتينات.

أما الكلوروفورم فانه لا يذوب في الماء ولا تفقد جزئيات الدنا حتى عندما تعاد عملية الاستخلاص به عدة مرات.فعالية الكلوروفورم 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 الى ترسيبها. بما ان فعالية الكلوروفورم في إزالة البروتينات تحصل ضمن الطبقة الوسطى المتكونة بينه وبين الماء لذلك فان فعالية الكلوروفورم تزداد بزيادة المساحة السطحية، لانجاز ذلك يتكون اولا" شكل مستحلب من الكلوروفورم والماء، ونظرا" لان الكلوروفورم لا يستطيع الاختلاط او الامتزاج مع الماء بالشكل الاعتيادي لذلك يتم التحريك (الاهتزاز) القوي vigorous shaking للمزيج لانجاز ذلك، وفي بعض الاحيان يضاف ال isoamyl alcohol ليساعد في تكوين المستحلب وزيادة المساحة السطحية للماء والكلوروفورم .

٢- إزالة البروتينات باستخدام الأنزيمات: Deproteinization using Enzymes

يمكن ان تزال البروتينات من مزيج المستخلص الخلوي باستخدام الانزيمات والتي من اكثرها استخداما" ال proteinase K و pronase ، كلا الأنزيمين ثابتة جدا وتستخلص من الفطريات بشكل طبيعي ويمكن ان تحضر بشكل صناعي وتمتاز بكونها خالية من انزيمات DNase ولكن تكون غالية الثمن.هذه الانزيمات تكون فعالة جدا بوجود تراكيز واطئة من المنضفات السالبة anionic detergent وتراكيز عالية من الاملاح وال EDTA ومدى واسع من الاس الهيروجيني (pH 6.0–10.0) ودرجة الحراة المثلى لها (50–67°C)، لذلك تستطيع ان تحطم البروتينات بدون ان تحتاج الى عوامل مساعدة.

المشكلة في استخدام هذه الانزيمات انها تستطيع ان تزيل ٨٠-٩٠% من البروتينات الموجودة وهذا يعود الى ان تحطيم البروتينات يعتمد على تركيز الانزيم والمادة الاساس. عمليا" معدل ازالة البورتينات the deproteinization rate يعتمد فقط على تركيز المادة الاساس (substrate) للانزيم بسبب انه ليس عمليا" ان

تضاف كمية كبيرة من الانزيم لتسريع التفاعل عند تركيز منخفض من المادة الاساس، وكاي تفاعل كميائي فان تركيز المادة الاساس يقل كلما تقدم وقت التفاعل، لمعالجة هذا التباطؤ ولاكمال الانزيم عمله الى نهاية الوقت المحدد يتم استخدام تركيز عالي من الانزيم والمادة الاساس حيث ان الانزيم يستطيع ازالة ٨٠-٩٠% من البروتينات ضمن الوقت المعقول.هذه المشكلة يمكن ان تعالج باستخدام احد المذيبات العضوية في الاستخلاص ولمرة واحدة فقط.

٢- إزالة الحامض النووي ال RNA : Removal of RNA

ازالة الحامض النووي الرنا خلال عملية استخلاص الدنا باستخدام الانزيمات ولكن هذه الانزيمات لا تزيل كل الرنا الموجود ولذلك نلاحظ بقاء كمية قليلة منه مع الحامض النووي الدنا. من افضل وارخص الانزيمات المستخدمة لهذا الغرض هي ribonuclease A and ribonuclease T 1 والتي تستطيع ان تحطم جزيئة الرنا وخاصة عند القاعدة السايتوسين C و اليوراسيل U .

بعد استخدام المذيبات العضوية او الانزيمات في تحطيم البروتينات وازالة الحامض النووي الرنا يتم ترسيب البروتينات الممسوخة باستخدام الترسيب الميكانيكي (الطرد المركزي Centrifugation) والذي يتم إجراءه بعد التحضين في الحمام المائي Water Bath مباشرتا" او احيانا" يسبق عملية الطرد المركزي اضافة محلول يهدروكسيد الصوديوم ذو التركيز العالي (٥ - ٦ مولاري) حيث يؤدي ذلك الى ترسيب البروتينات وبقية المكونات الخلوية ضمن الطبقة السفلى (الأثقل) اما الدنا فيبقى ضمن الطبقة المائية بشكل ذائب ويحتاج الى عملية ترسيب.

٣-ترسيب الحامض النووي الدنا: precipitation of the DNA

يتم ترسيب الدنا الموجود ضمن الطبقة المائية بتركيزه (تجميعه) باستخدام نوعين رئيسين من الكحول وهما الايثانول

ethanol والايزوبروبانول 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 الى ذوبان الدنا في الماء.

ترسيب الدنا بالكحول يعتمد على اساس تقليل ذوبانية الدنا في الماء،حيث يتم اضافة الكحول الى المحلول المائي والذي يعمل على تجميع خيوط الدنا ضمن المحلول المائي بسحب جزيئات الماء منها. بعدها يتم سحب خيوط الدنا المتجمعة والتي عادتا" تكزن باللون الابيض باستخدام الخطاف Hook باستخدام عملية الطرد المركزي لترسيب خيوط الدنا في اسفل انبوبة الاختبار.

عندها يتم اضافة محلول 70% ethanol بمقدار ٢ مل الى الدنا المترسب وتحريكه بهدوء لغرض غسل الدنا وازالة بقية الاملاح المترسبة معه. بعد ذلك نرسب الدنا من هذا المحلول باستخدام عملية الطرد المركزي وتترك انبوبة الاختبار مفتوحة لمدة نصف ساعة لتجف خيوط الدنا بشكل تام وتتطاير بقايا جزيئات الايثانول.

اخيرا" يتم اذابة الدنا المترسب باضافة محلول TE او الماء المقطر وبمقدار μL ١٠٠ -٥٠٠ حسب كمية الدنا المترسب ثم يترك المحلول الاخير الى اليوم التالي بدرجة حرارة الغرفة لغرض ذوبان الدنا ضمن المحلول بشكل تام ويفضل التحريك Shaking اذا توفر ذلك.

٤.تقدير تركيز ونقاوة الدنا: Determination of the Purity and Quantity of DNA

المرحلة الأخيرة في اي عملية استخلاص للاحماض النووية (DNA, RNA) هي تقييم النتيجة، بالنسبة للدنا يتضمن ذلك تقدير نقاوة الدنا وتركيزه. يتم تقدير تركيز ونقاوة الاحماض النووية باستخدام التقدير الطيفي باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer System ،تستعمل طريقة الامتصاص عند الطول الموجي ٢٦٠nm لقياس كمية الدنا او الرنا او كليهما في محاليلها وهي طريقة سريعة وسهلة ودقيقة لقياس كمية الأحماض النووية.

تستعمل كمية الامتصاص (الكثافة الضوئية Optical Density) عند الطول الموجي ٢٦٠ nm لقياس كمية الدنا لان

الحامض النووي الدنا يملك اعلى امتصاص للكثافة الضوئية عند هذا الطول الموجي واقل امتصاص عند الطول الموجي ٢٣٠nm . اما كمية الامتصاص عند الطول الموجي ٢٨٠ nm فتستخدم لتقدير كمية البروتينات الموجودة ضمن محلول الدنا.ان كثافة ضوئية قدرها ١ تقابل ٥٠ مايكروغرام من الدنا لكل ١ مل (50µg/ml) بينما تقابل (40µg/ml) للحامض النووي الرنا.

تتصف المحاليل النقية للدنا او للرنا بقيمة الكثافة الضوئية للطولين الموجيين ٢٦٠ مقسومة على ٢٨٠ وهي ١.٨ للدنا و٢ للرنا وتقل القيمة في حالة وجود ملوثات لنموذج الحامض النووي كالبروتينات وغيرها.

طريقة العمل:

١. يفضل استخدام محلول منظم في عملية القياس وافضلها محلول TE ويفضل الابتعاد عن استخدام الماء المقطر لانه قد يؤدي الى انفصال شريطي الدنا.

٢. يستعمل المذيب نفسه المستعمل في الاذابة في تصفير جهاز المطياف الضوئي.

٣. تملئ حاوية النموذج Cuvette بمقدار µL ١٩٨٠ من المذيب ثم يضاف له µL ٢٠ من نموذج الدنا ويمزج بشكل جيد ثم تقرأ الكثافة الضوئية على الطول الموجي ٢٦٠ و ٢٨٠ نانومتر.

٤. تقسم قيمة القراءة عند ٢٦٠ على قيمة القراءة عند ال ٢٨٠ وتمثل القيمة الناتجة مقدار قيمة نقاوة الدنا وتمثل القيمة اعلى نقاوة للدنا، اذا انخفضت القيمة عن ذلك فهذا يشير الى وجود ملوثات مع الدنا ومن ابرزها البروتينات، اما اذا ارتفعت اعلى من ٢ فان ذلك يشير الى وجود الحامض النووي الرنا.

٥. يتم تقدير تركيز الدنا في المحلول من خلال تطبيق المعادلة التالية:

$$\text{DNA } \mu g/mL = OD260 \times 100 \text{ (Dilution Factor)} \times 50$$

ال ١٠٠ تمثل معامل التخفيف للعينة وال ٥٠ تقابل ٥٠ مايكروغرام من الدنا لكل كثافة ضوئية قدرها ١. واذا اردنا ان نحصل على تركيز الدنا بالمايكروغرام لكل ميكرولتر(µg/ µl) يتم قسمة المعادلة اعلاه على ١٠٠٠.