كلية العلوم

القسم : **علم الحياة**

السنة : **الرابعة**

المادة : وراثة جزيئية

المحاضرة : السابعة/عملي/

{{ A to Z مكتبة }}

Facebook Group : A to Z مكتبة

2026

٣

كلية العلوم ، كلية الصيدلة ، الهندسة التقنية

يمكنكم طلب المحاضرات برسالة نصية (SMS) أو عبر(What's app-Telegram)على الرقم 0931497960

استخلاص الاحماض النووية من النباتات الراقية

قبل البدء بعملية الاستخلاص لا بد من اختيار العينة المناسبة لعملية الاستخلاص ومعرفة طريقة التعامل معها ريثما تصل إلى المخبر، بحال لم تكن العينات النباتية مزروعة بأصص ومتوضعة بمكان قريب من المخبر.

اختيار العينة النباتية لعملية استخلاص الـ DNA:

تتعلق كمية ونوعية الـ DNA المستخلصة بنوع ومواصفات العينة النباتية المستخدمة، لذلك هناك مجموعة من المميزات التي يجب أن تتوفر في الجزء الذي سيستخدم بالاستخلاص.

1- أن تكون الأنسجة المستخدمة غضة، نموات حديثة، مثل أوراق فتية أو جذور فتية، وذلك لأن الجدر الخلوية في النموات الفتية تكون مازالت ابتدائية غير متخشبة فتكون عملية تحطيمها والتخلص منها أسهل. تعطي النموات الفتية كمية من الـ DNA أكبر من النموات المسنة وذلك بسبب زيادة عدد الخلايا وزيادة كمية الـ DNA لأنها في مرحلة نشاط وانقسامات خلوية.

2- أن تكون خالية من الكائنات الممرضة سواء كانت حشرات وبيوضها، أو فطريات أو بكتريا ... لتجنب تلوث الـ DNA بـ DNA كائن آخر.

بعد اختيار العينة، توضع في قطعة من الشاش أو أي نسيج معقم ضمن كيس من البلاستيك يحمل بطاقة تعريف بالعينة، ثم توضع إما بوعاء يحتوي على الآزوت السائل (حرارة الآزوت السائل $-196^{o}C$) أو بوعاء يحتوي على الثلج. تؤدي درجة الحرارة المنخفضة لتخفيض درجة حرارة العينة مما يؤدي لإيقاف نشاط أنزيم الـ DNase مؤدياً لحماية الـ DNA من التحطيم، وذلك ريثما تصل العينة إلى المخبر ويتم الاستخلاص.

استخلاص الأحماض النووية من الأنسجة الغضة بطريقة الـ CTAB :

مستلزمات عملية الاستخلاص:

* سائل الاستخلاص ذو التركيب:

2X CTAB= 1.4 M NaCl, 100mM Tris-HCl, pH= 8, 20 mM EDTA, 2% CTAB

* كحول الأيزوبروبانول أو الكحول الايتيلي المطلق (لترسيب الأحماض النووية)
* سائل غسيل الـ DNA: الكحول الأيتيلي 76%.
* مزيج الكلوروفورم / كحول ايزواميل بنسبة (24 كلوروفورم / 1 كحول أيزوأميل)
* أنزيم RNase.
* الماء المقطر والمعقم.

مراحل عملية الاستخلاص:

- يؤخذ 2غ من الأوراق النباتية الفتية الخضراء (حمص أو عدس) النظيفة والخالية من الكائنات الممرضة.
- تطحن الأوراق في 10 مل من سائل الاستخلاص 2X CTAB، المسخن إلى درجة حرارة $65^{O}C$.
- ينقل سائل الاستخلاص المحتوي على مسحوق الأوراق إلى أنابيب سعة 30 مل وتوضع في حمام مائي، على درجة حرارة $65^{O}C$ لمدة 45 -30 دقيقة مع التحريك الهادئ، مما يساعد على مزج مكونات العينة وتجانسها

وإيصال مكونات سائل الاستخلاص لكامل أجزاء الخلية للقيام بعملها من فصل الدهون والبروتينات والبقايا النباتية عن الأحماض النووية.

تؤدي عملية الطحن السريع إلى تحطيم الجدر السللوزية، كما أن درجة حرارة سائل الاستخلاص أثناء الطحن وخلال فترة التحضين تؤدي إلى تخفيض نشاط انزيم DNase الذي يقوم بعملية تحطيم الـ DNA، إضافة إلى أن مادة الـ EDTA الموجودة ضمن سائل الاستخلاص تتحد مع شوارد المغنيزيوم Mg^{++} الضرورية لتنشيط عمل انزيم التحطيم، مما يساهم في حماية الاحماض النووية من التحطيم أثناء عملية الاستخلاص.

– تخرج العينات من الحمام المائي ويضاف إليها حجم مماثل من مزيج الكلوروفورم / كحول الأيزوأميل. تمزج العينات جيداً وتوضع على المنضدة المتحركة لمدة 15 دقيقة، وذلك بهدف فصل المواد الدهنية التي تذوب في الوسط العضوي (الكلوروفورم) عن الأحماض النووية التي تذوب في الوسط المائي (سائل الاستخلاص).

– توضع العينات في جهاز الطرد المركزي (المثفلة) وتجرى عملية تثفيل بسرعة 5000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة $20^{O}C$. يلاحظ بنهاية عملية التثفيل تشكل طبقتين في كل أنبوب، طبقة عليا شفافة تمثل الوسط المائي المذاب فيه الأحماض النووية، وطبقة سفلى خضراء اللون تمثل الوسط العضوي الذي يحتوي على المواد الدهنية وبعض الصبغات التي تذوب في الكلوروفورم، ويلاحظ توضع البروتين على شكل طبقة بيضاء تفصل بين الطبقتين السابقتين.

– ينقل الوسط المائي المحتوي على الأحماض النووية (الطبقة العلوية) إلى أنبوب جديد ويضاف له بما يعادل 0.6 من حجمه من كحول الإيزوبروبانول. تمزج محتويات الانبوب بقلب الأنبوب رأساً على عقب بهدوء عدة مرات، ويمكن خلال هذه العملية مشاهدة ترسب الـ DNA على شكل خيوط بيضاء قطنية الشكل. تترك العينة لمدة 30 دقيقة على درجة الحرارة العادية كي يترسب الـ DNA. إذا كانت كمية الـ DNA قليلة وغير مرئية تترك العينة بدرجة حرارة ($4^{O}C$) لليلة كاملة حيث تساعد درجة الحرارة المنخفضة على زيادة ترسيب الـ DNA.

– يتم تجميع الـ DNA وترسيبه عن طريق وضع الأنبوب في المثفلة بسرعة 10.000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة، بدرجة حرارة $4^{O}C$، مما يؤدي إلى ترسيب الـ DNA في قاع الأنبوب. يلاحظ التصاق الـ DNA على جدار قعر الانبوب.

– بعد نهاية التثفيل، يستبعد السائل مع مراعاة عدم انزلاق الـ DNA والـ RNA من الفقد (يكونان متجمعين كراسب في قاع الأنبوب).

– يضاف 5 مل من الكحول الأيتيلي 76% لغسل الأحماض النووية من أثار البروبانول ومن ثم يجمع الراسب عن طريق عملية التثفيل لمدة 10 دقائق على سرعة 10.000 دورة/ دقيقة وبدرجة حرارة $4^{O}C$.

– تعاد عملية الغسيل مرة ثانية بنفس الظروف السابقة.

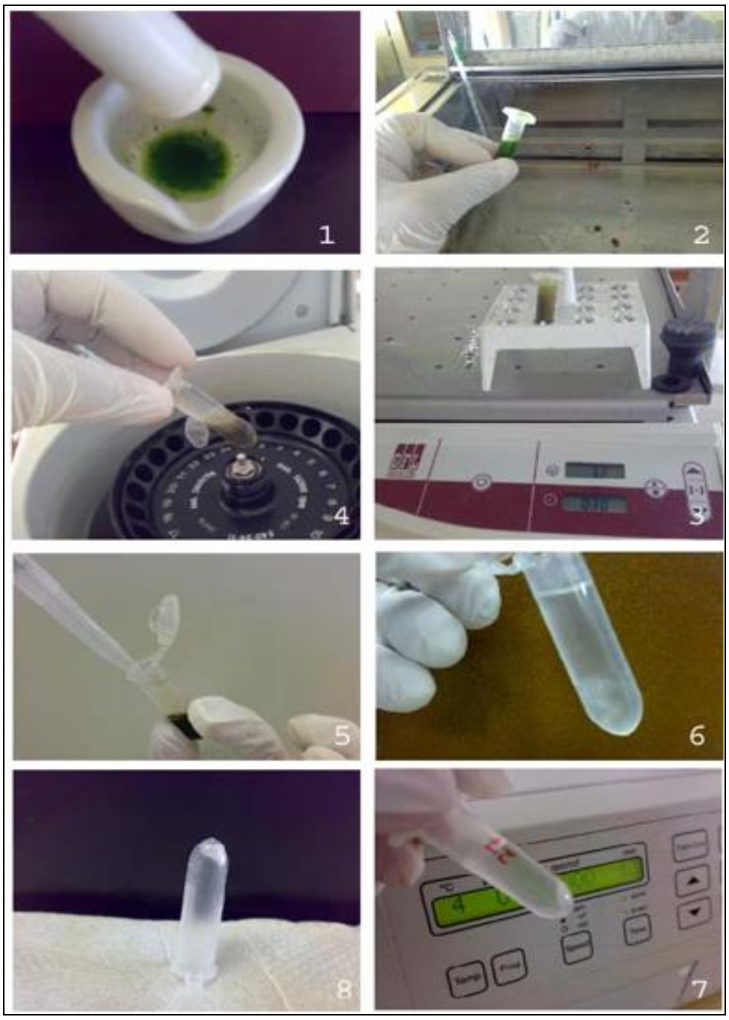
– يستبعد الكحول بدقة متناهية وتترك الأنابيب بوضع مقلوب على ورقة ترشيح حتى تجف.

– يضاف 1000 ميكرو ليتر (مكل) من الماء المقطر والعقيم إلى الأحماض النووية المتجمعة في القاع وتوضع على المنضدة المتحركة، ضمن أوعية تحتوي على الثلج، حتى الذوبان الكامل للـ DNA.

– يتم التخلص من الـ RNA الذي يترسب مع الـ DNA بمعاملة العينات بأنزيم الـ RNase الذي يحطم جزيئات الـ RNA وذلك لمدة 30 دقيقة على درجة حرارة $37^{O}C$. تعاد عملية ترسيب الـ DNA مرة ثانية بإضافة حجمين من الكحول الإيتيلي المطلق ومزجه وتركه حتى نرى الـ DNA يترسب على شكل خيوط(ترسب الـDNA على شكل

خيوط يمكن رؤيتها بالعين المجردة)، يجمع بالقاع من خلال عملية التثفيل بالظروف السابقة ثم يستبعد الكحول ويجفف الـ DNA كما سبق.

– تحفظ عينات الـ DNA بعد تمام ذوبانها في المجمدة ($-20^{O}C$) لحين الاستخدام.



الاختبارات النوعية والكمية للـ DNA

تحتاج التحاليل الجزيئية التي تعتمد على جزيئة الـ DNA إلى نوعية معينة من الـ DNA للحصول على نتائج دقيقة وواضحة، لذلك لابد من إخضاع الـ DNA الذي حصلنا عليه بعملية الاستخلاص لمجموعة من الاختبارات التي تحدد نوعية الـ DNA وجودته وتركيزه.

يخضع الـ DNA المستخلص لنوعين من الاختبارات:

أولاً: الاختبارات النوعية: هي اختبارات تهدف لمعرفة نوعية الـ DNA من حيث بنيته الفيزيائية ونقاوته من الملوثات المكونة من البروتينات ومكونات الخلية الأخرى وآثار المواد المستخدمة بعملية الاستخلاص.

ثانياً: الاختبارات الكمية: هي اختبارات تهدف لمعرفة تركيز الـ DNA في العينة المستخلصة ومن ثم كمية الـ DNA الكلية المستخلصة من العينة الأساسية.

أولاً: الاختبارات النوعية:

2- اختبار نقاوة الـ DNA:

يعد البروتين من أهم المركبات التي تلوث الـ DNA، ويسبب فشل مراحل تحليل جزيئات الـ DNA باستخدام أنزيمات التحديد أو أنزيم تكثيف الـ DNA لاحقاً، لذلك يتم اختبار الـ DNA بعد الاستخلاص للتأكد من خلوه من التلوث بالبروتين.

يعتمد الاختبار على خصائص المواد بامتصاص الأشعة باستخدام جهاز السبكتروفوتوميتر. تتميز كل مادة بامتصاصها الأعظمي لأشعة الطيف الضوئي عند طول موجة معينة، حيث يمتص البروتين الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet (U.V.) عند طول موجة 240nm، في حين تمتص الأحماض النووية الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجة 260nm. من المعروف أن الاحماض النووية تمتص الاشعة فوق البنفسجية بسبب وجود البنية الحلقية للقواعد الازوتية.

يتم تجهيز عينة من الـ DNA المستخلص وتمرر بجهاز السبكتروفوتوميتر وتؤخذ قراءات امتصاص للعينة لأشعة الـ UV عند طول الموجتين 240nm و 260nm، وتستخدم هذه القراءات لمعرفة مدى وجود تلوث بالبروتين وذلك وفق المعادلة التالية:

$$\frac{O.D._{260nm}}{O.D._{280nm}} = 1.8 - 2$$

تعبر (O.D.260nm) عن قراءة الكثافة النظرية Optical density (O.D.) للعينة عند طول الموجة 260nm، وتدل على مقدار امتصاص الـ DNA الموجود في العينة من أشعة الـ UV.

تعبر (O.D.240nm) عن قراءة الكثافة النظرية Optical density (O.D.) عند طول الموجة 240nm، وتدل على مقدار امتصاص البروتين الموجود في العينة من أشعة الـ UV.

إذا كان حاصل قسمة القراءتين يتراوح مابين 2 – 1.8، فهذا يدل على نقاوة الـ DNA وعدم تلوثه بالبروتين، وكلما قلت النسبة عن 1.8 يدل على وجود تلوث بالبروتين، وبهذا الحالة لابد من إعادة تنظيف الـ DNA من البروتين قبل استخدامه بالتحاليل اللاحقة.

ثانياً: الاختبارات الكمية:

1- تقدير تركيز الـ DNA

يمكن تقدير تركيز الـ DNA في العينة المستخلصة بطريقتين:

- الطريقة التقريبية باستخدام جهاز الرحلان الكهربائي.
- الطريقة الدقيقة باستخدام مقياس الطيف الضوئي (السبكتروفوتوميتر).

تقدير تركيز الـ DNA باستخدام مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer

يتم تقدير كمية الـ DNA باستخدام مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer من خلال تقدير امتصاص الأشعة فوق البنفسجية من قبل عينة الـ DNA عند طول موجة يساوي 260 نانومير.

تؤخذ قراءات الكثافة الضوئية (O.D.260nm) للعينة المختبرة، ونعتمد بحساب تركيز الـ DNAعلى العلاقة التالية:

كل قراءة 1=O.D.260nm ، تعني أن كل (1) مل من السائل (العينة) يحتوي على (50) ميكروغرام (مكغ) من الـ DNA .

$$1\ O.D._{260nm} = 50\mu g\ DNA/\ 1mL$$

عندما نريد معرفة تركيز الـ DNA بعينة ما، لا نأخذ العينة كما هي بعد الاستخلاص ، حيث يكون تركيز الـ DNA فيها مرتفع، وإنما نقوم بتجهيز عينة جديدة تناسب حجم الانابيب المستخدمة باجهزة الطيف الضوئي.

مثال:

ليكن حجم أنابيب جهاز الطيف الضوئي مساو (1mL)، ونريد أن نأخذ 10μL من عينة الـ DNA لتقدير الـ DNA. يتم تجهيز العينة بإضافة الماء المقطر لنصل لحجم 1mL(سعة الانبوب). هذا يعني أننا قمنا بتخفيف العينة، لذلك نقوم بحساب مايسمى معامل التخفيف والذي يساوي:

معامل التخفيف = حجم العينة المستخدمة بالقياس (حجم الانبوب)/ الكمية المأخوذة من العينة بعد الاستخلاص.

أي:

عامل التخفيف بالمثال = X 100 =1000μL/ 10μL

أي عامل التخفيف هو مائة مرة، لانه كي نحصل على العينة التي وضعت بالجهاز، استخدمنا 10 مكل من عينة الـ DNA وأضفنا لهم 990 ميكروليتر ماء مقطر. بهذه الحالة عند حساب تركيز الـ DNA بعينة الـ DNA، لابد من أخذ عامل التخفيف بعين الاعتبار وتصبح المعادلة:

تركيز الـDNA / 1 مل من العينة (بعد الاستخلاص)= قراءة الكثافة النظرية x 50 x عامل التخفيف (100)

تركيز الـ DNA / 1 ميكروليتر من العينة = قراءة الكثافة النظرية x 50 x عامل التخفيف/ 1000

كفاءة عملية الاستخلاص:

يقصد بكفاءة عملية الاستخلاص، كمية الـ DNA الكلية المستخلصة من عينة نباتية ما، وتقدر على شكل نسبة مئوية للـ DNA في العينة النباتية.