ملخص خطوات عزل الحمض النووي DNA

أولاً تحليل الخلية وتحرير الحمض النووي DNA

تحلل الخلية باستخدام الانزيمات المحللة او حبيبات زجاجية او بلورية في اثناء الطرد المركزي أو الانزيم الانزيم LYSOZYME

يقوم بتحفيز التحليل المائي للرابطة الجليكوسيدية لمكونات الجدار الكربوهيدراتية PEPTIDOGLYGAN وبالتالي تحطيم الغلاف الخارجي وبحرر الحمض النووي DNA وغيره من المكونات.

في وجود الخلايا داخل المحلول المنظم BUFFER SOLUTION

لابد ان تكون الوسط المتواجد به محلول المحتوى على DNA في صورة محلول منظم ، محلول ملحي يحتوى على EDTA يسبب تأين الحمض النوويDNA وحملة لشحنة فإنه أكثر ثباتا وذوبانا في المحاليل الملحية عنه في الماء المقطر.

أهمية ال EDTA

أ. ترتبط مع الايونات الموجبة ثنائية الشحنة مثل(CD^{+2}– MG^{+2}– MN^{+2}_) التى قد تكون املاح مع مجموعات الفوسفات الايونية في الحمض النووي DNA <

ب. تثبيط الانزيم المحلل للحمض النووي DEOXYRIBONUCLEASE لانه يحتاج الي ايونات المغنيسيوم MG^{+2} او المنجنيز MN^{+2} لكي يقوم بوظيفته في تحليل الحمض النووي DNA

ت. الوسط القلوي PH 8 يقلل التفاعلات الالكتروليتية بين الحمض النووي DNA والهيستونات القلوية القلوية والاميدات عديدة التكتافؤ.

ث. القلوية العالية تقلل من نشاط NUCLEASE وتغير طبيعة البروتين DENATURE.

ج. كما تساعد على فصل البروتينات المرتبطة بالحمض النووي DNA يزيد القلوية والشحنة الموجبة للبروتينات الهيستونية.

ثانياً فصل معقد الحمض النووي DNA والبروتين

تستخدم المنظفات عادة في هذه المرحلة لتعطيل التفاعلات الايونية بين الهستونات موجبة الشحنة مه الشحنات السالبة للحمض النووي DNA، يستخدم عادة SDS (SODIUM DODECYL SULPHATE)

- منظف نتأين يرتبط مع البروتينات ويعطيها صفة شديدة الايونية.
- متلف للانزيمات المحلله DNA وغيره من البروتينات.

التركيز العالية من الاملاح مثل NaCl وغيره تضاف للتأكيد من الفصل التام للبروتينات المتربطة بالحمض النووي DNA عنه ونزيل الرابطة مع الاميدات موجبة الشحنة.

حيث تضعف الاملاح قوة الارتباط الايوني بين الحمض النووي والمركبات موجبة الشحنة.

ثالثاً فصل الحمض النووي DNA عن غيره من مكونات الخلية الذاتية، في هذه المرحلة يجب التأكد من خلو المحلول من البروتينات وذلك باستخدام خليط الكلورفورم مع الكحول ISOAMYL ALCOHOL ثم الطرد المركزي بعد ذلك تظهر ثلاث طبقات.

الطبقة العلوية : طبقة سائلة وطبقة سفلى عضوية وبينهما طبقة وسطى تمثل شريط منضغط من البروتين المتميه.

يسبب الكلورفورم تشوية سطحي للبروتين

والكحول ISOAMYL ALCOHOL يقلل الرغوة ويساعد على ثبات الطبقة الفاصلة المحتوية على البروتين وتفصل بين الطبقتين .

تحتوى الطبقة الأولى على الاحماض النووي ويتم فصلها ويتم ترسيبها باستخدام الكحول الايثانول.

- بسبب الطبيعة المتأينة للحمض يالنووي ويصبح غير قابل للذوبان اذا تواجد في وسط عضوي منخفض القطبية .
- يكون الحمض النووي راسب خيطي الشكلي ويمكن جمعه بلفة على عصى زجاجية
- قد يتلوث الحمض النووي المعزول بالبروتينات والحمض النووي RNA >
- يمكن التخلص من البروتين بإذابة الحمض النووي المترسب في وسط ملحي وإعادة استخدام خليط الكلورفورم والكحول والكحول ISOMYL ALCOHOL حتى يبقى أي بروتين في الطبقة الوسطى.

- لا يترسب الحمض النووي RNAمع ال DNA ولكنه قد يتواجد في صورة ملوثة للحمض للحمض النووي DNA

- يمكن التخلص منه باستخدام الانزيم المحلله له RNASE – RIBONUCLEASE بعد التخلص من البروتين قيد يستخدم الكحول ISOPROBANOL للترسيب الحمض النووي DNAتاركا الحمض النووي RNA في المحلول

- يمكن اعادة خطوات فصل البروتين والحمض النووي RNA عدة مرات للحصول على حمض DNA على النقاوة.

- بهذه الطريقة يفترض ان يتم فصل 50 % من المحتوى الكلى للحمض النووي DNA في الخلية متوسط المحصول يساوي 2-1 ملجم لكل من الوزن الرطب من الخلايا البكتيريه.

الهدف من استخلاص الحمض النووي DNA البكتيريا

- تحديد الخريطة الوراصية المحتوية على جميع الجينات الخاصة بالكائن الحي الدقيق.
- يحمل الحمض النووي في تركيبه الجزيئي وتتابع القواعد النيتروجينة جميع المعلومات الوراثية في صورة جينات
- عند فصل الحمض النووي DNAللكائنات يمكن معرفة نسبة الجوانين الي السيتوسين وبالتالي تعريف الكائن الحي ومعرفة المملكة التى يتبعها.

- استخدام الحمض النووي DNA في تجارب التقنية الحيوية BIOTECHNOLOGY : مثل ربط جينات الحمض DNAالبكتيريا في عمليات بعض المواد البروتينية او في المجالات الدوائية في مجال GENE THERAPY.