تجربة استخلاص الحمض النووي DNA من خلايا بدائية النواة مثل بكتيريا القولون

DNA EXTRACTION FROM PROKARYOTIC CELL

الجزء العملي لمقرر وراثة الأحياء الدقيقة

251 حدق

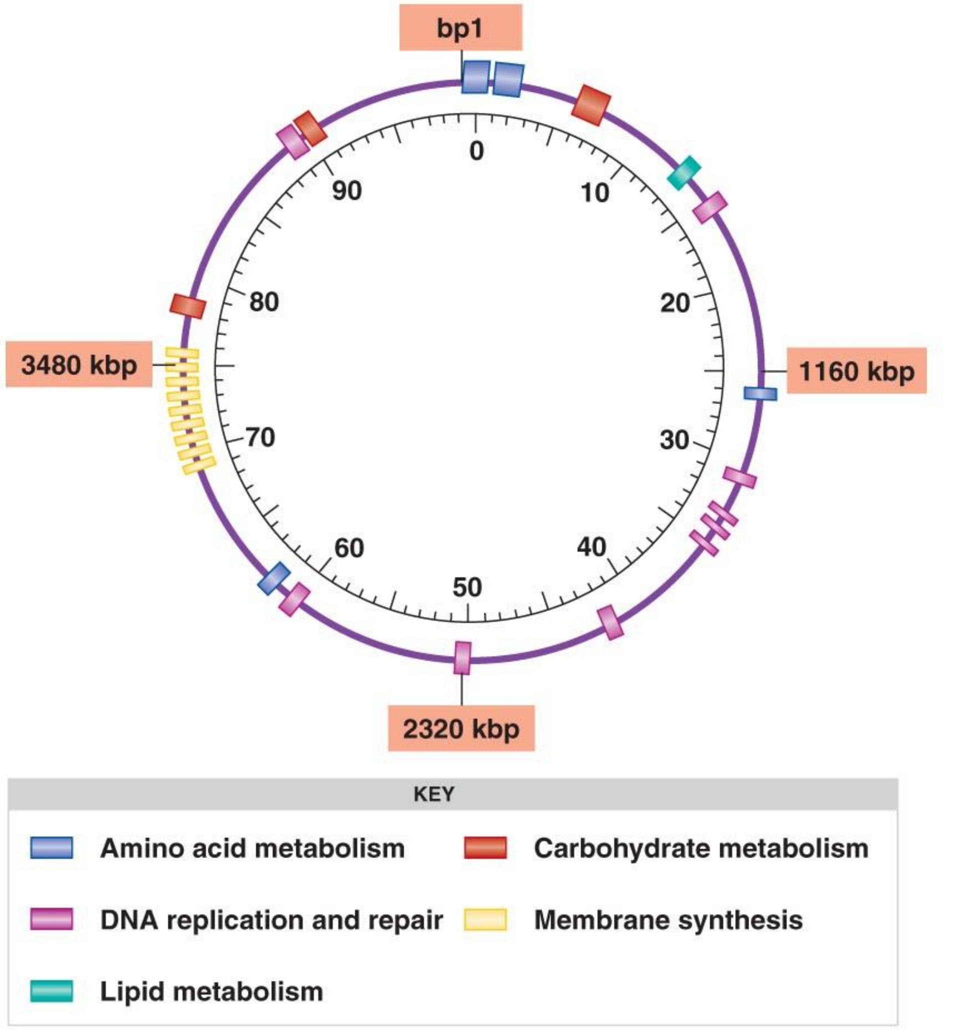
- يعمل جزيء **DNA** بنفس الكيفية في سائر أنواع الكائنات الحية، و بالتالي ما نتعلمه عن كائن يمكن تطبيقه على كائن آخر، لذا أعتمد علماء الأحياء مبدأ "إجراء التجارب على كائنات بسيطة التركيب مثل البكتيريا و الفطريات و من ثم تطبيق النتائج المفيدة على الإنسان".
- * في أواسط الستينات، اكتشف عالم الفيزياء" GEORGE GAMOW " وهو يعمل ضمن مجموعة علماء أنشاها وسماها **(RNA TIE CLUB)** بالإضافة إلى العالم MARSHALL NIRENBERG وآخرون.
- أن المعلومات الوراثية تكون مرتبة بشكل منظم سمي "شفرة وراثية **GENETIC CODE**" و نال كذلك جائزة نوبل .

مثلاً: نظرية العالمين الفرنسيين " جاكوب و مونر " :-

- (بعد دراسات على بكتيريا E. COLI التي تنتج عدد محدود من الإنزيمات عند زراعتها في بيئة بها لاكتوز، و لا تنتج هذه الخمائر في غياب اللاكتوز من بيئة التنمية):
- [مجموعة الجينات التي تقوم بالسيطرة على تكوين بروتينات معينة تسمى "جينات تركيبية "GENES STRUCTURAL
- و هي تقع تحت سيطرة جين آخر يقع على احد جوانبها ، ينظم عملها و يسمى "جين منظم "REGULATING GENES].

- بنيت نظرية "جاكوب و مونر" على دراسة للأحياء الدقيقة،و هناك أدلة تؤيد وجود ذات النظام في جينات الأحياء المعقدة.

الخريطة الوراثية لبكتيريا القولون
GENETIC ENGINEERING



(b) A genetic map of the chromosome of *E. coli.* The numbers inside the circle indicate the number of minutes it takes to transfer the genes during mating between two cells; the numbers in colored boxes indicate the number of base pairs.

الغرض من التجربة

الحصول على الحمض النووي **الكرموسومي** للبكتيريا بصورة نقيه.

الأدوات
MATERIAL

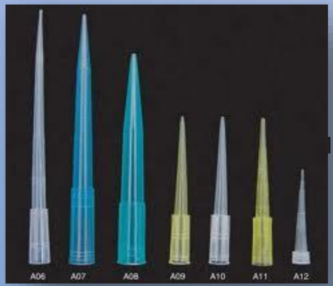
مرق LURIA BERTANI (LB).

عزلة نقية من بكتيريا *E. COLI* .

محلول منظم Buffer(Tris/EDTA/glucose) ويرمز له ALS-I.	محلول خليط phenol/Chloroform/Isoamyl) alcohol(25:24:1
2 عياري هيدروكسيد الصوديوم NaOH 2 N.	كحول Isoprpanol.
4 % من محلول SDS(Sodium dodecyl sulphate).	كحول 70% Ethanol.
3 مولار أسيتات الصوديوم 3 M Sodium Acetate pH=6.0	ماء مقطر منزوع الأيونات Distilled deionized water(DDW).

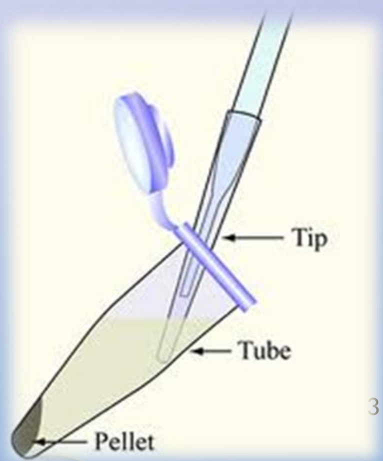
الأدوات
MATERIAL

ماصات دقيقة الكترونيه Micropipette مختلفة الأحجام (2-20µl, 10-100µl, 100-1000µl).	**أنابيب بلاستيكية معقمة ذات غطاء Microcentrifuge Tubes (1.5-2 ml).**
أغطية الماصات الدقيقة. Tips with different size	حوامل للأنابيب. (Racks for tube)
جهاز تحليل الطيف المرئي(Spectrophotometer) .	جهاز الرج (Vortex) .
علبة للتخلص من المستهلكات Biohazard Container	جهاز طرد مركزي دقيق Microcentrifuge.



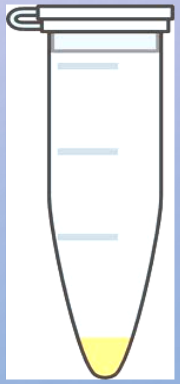
طريقة العمل
METHOD

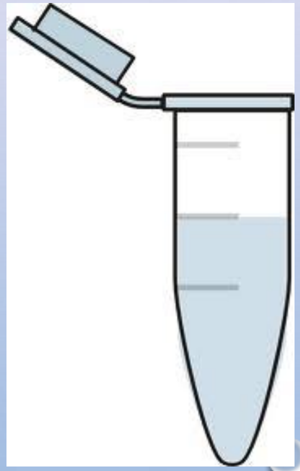
- **أولاً: تحضير المحاليل المنظمة BUFFERS المستخدمه في الاستخلاص: (راجعي الدرس العملي السابق).**
- **ثانياً: خطوات استخلاص الحمض النووي DNA البكتيري:**
- يلقح 5 مل من بيئة LB بعزلة نقية من بكتيريا *E. COLI* وتحضن لمدة 12-24 ساعه عند 37°م.
- ينقل 1.5 مل من المزرعة إلى أنبوبة طرد مركزي دقيقة MICROCENTRIFUGE ويطرد لمدة دقيقتين ثم نتخلص من الرائق.

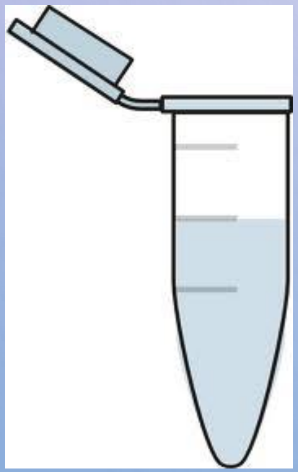


طريقة العمل
METHOD

- يعلق الراسب في 240ULمن محلول منظم BUFFER (TRIS/EDTA/GLUCOSE) وترج الأنبوبة في جهاز VORTEX جيداً (يجب تعليق الراسب جيداً للتأكد من عدم تكتل الخلايا البكتيريه).







طريقة العمل
METHOD

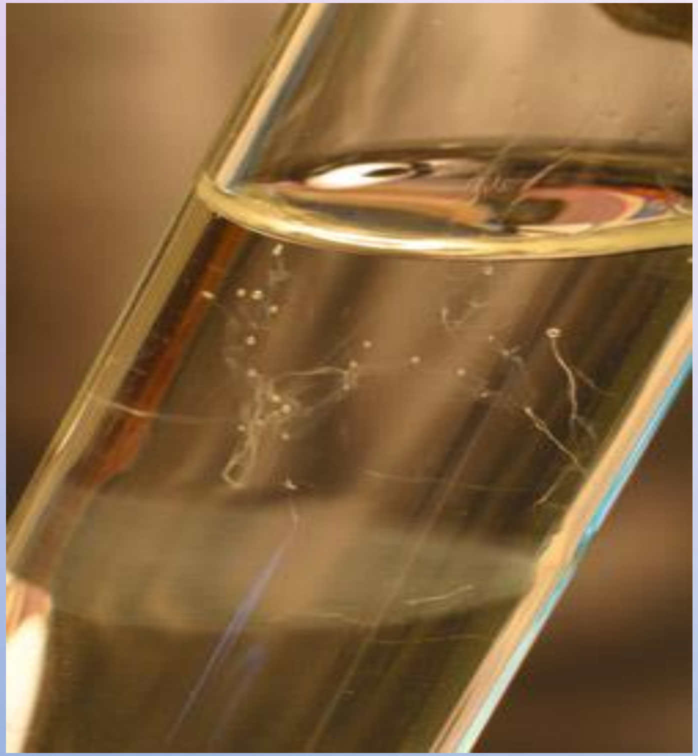
- يضاف إلى الراسب 20UL من محلول 2N من هيدروكسيد الصوديوم NAOH و 20UL من محلول SDS 4% ثم يرج المزيج جيداً بدون استخدام جهاز الرج VORTEX.
- يضاف مباشرة 40UL من 3M من محلول أسيتات الصوديوم NAOAC في درجة PH=6.0. ويرج المزيج جيداً بدون جهاز الرج ثم يرسب المزيج بالطرد المركزي الدقيق لمدة 10 دقائق.

طريقة العمل
METHOD

- باستخدام الماصة الدقيقة يتم سحب الراسب والتخلص منه. يتم ترسيب الرائق بالطرد المركزي لمدة دقيقتين ثم ينقل الرائق إلى أنبوبة طرد مركزي معقمة.
- يضاف إلى الأنبوبة 4UL من 10UG/ML لانزيم RNASE المثبط بالحرارة وتحضن في درجة 37م لمدة 10دقائق.

- يستخلص الرائق مرتين باستخدام 200ULمن الخليط من (الفينول: الكلوروفورم: كحول أيزوأميل).
- يضاف 1VOL (200UL) من الأيزوبروبانول إلى الطبقة العلوية الشفافة، يمزج الخليط ويترك لمدة 5 دقائق.

طريقة العمل
METHOD



- يرسب المزيج لمدة 5 دقائق على السرعة الفائقة للطرد المركزي ثم نتخلص من الرائق.
- يغسل الراسب مرتين باستخدام 400UL من كحول 70% ETHANOL ثم يطرد كل مره وبعدها يترك الراسب ليجف.

طريقة العمل
METHOD

يعلق الراسب في الماء المقطر المعقم لاستخدام الحمض النووي المعزول في الخطوات التالية كالتركيز والتنقية.

ملاحظة: يجب تسجيل التغير في المحلول بعد كل خطوة.

ملاحظات هامة اثناء العمل

- الحرص على عدم الرج بصورة عنيفة لتجنب ظهور الرغوه.
- المادة القلوية SDS مع الحرارة العالية 55-60 °م تؤدي إلى إذابة الدهون في الجدار الخلوي وتحرر الحمض النووي.
- يمكن استخدام انزيم PROTEINSAE K مع الحرارة العالية أيضاً لتخلص من أي بروتينات قد ترتبط مع الحمض النووي .
- يضاف الكحول الثلجي ويمكن اضافته عن طريق ادخال الماصة الى نهاية الانبوبه ومن ثم تحميله في الانبوبة، أو إضافة الكحول في انبوبة معقمة ثم يضاف المحلول اليها ، أو إضافته ببطء بالسكب بماصة باستير.

ملاحظات هامة اثناء العمل

- لا يذوب الحمض النووي في الكحول بعكس جميع مكونات البروتوبلازم الخلوي التي تذوب في الكحول تاركة الحمض النووي في شكل راسب
- يجب ترك المحلول ليستقر لمدة 2-3 دقائق ويجب عدم رج الأنبوبة في هذه المرحلة لرقة تركيب الحمض النووي .
- ويمكن ملاحظة ترسب الحمض النووي في طبقة الكحول على هيئة مادة بيضاء لزجه .
- نستخدم عامل درجة الحرارة العالية أعلى من 60°م ليجب أن لا تزيد درجة حرارة الحمام المائي عن 70°م لانه يتكسر وتتغير طبيعته اذا زادت الحرارة عن 80°م.

حساب تركيز الحمض النووي DNA
باستخدام جهاز الطيف الضوئي SPECTROPHOTOMETER

1- يحسب درجة الامتصاص عند كل من الأطوال الموجيه (نانومترNM)

260-280

2- نسجل قراوة الكثافة الضوئية .O.D من الجهاز.

3- يتم تقدير كل من تركيز الحمض النووي DNA ودرجة نقاوته كما يلي.

حساب تركيز الحمض النووي DNA
باستخدام جهاز الطيف الضوئي SPECTROPHOTOMETER

3- نحسب تركيز الحمض النووي DNA بالتعويض في المعادلة:

$$\text{CONC. OF DNA (UG/ML)} = \frac{O.D.260 \times 50 \times dilution\ factor}{1000}$$

معامل التحويلCONVERSION FACTOR: = 1* OD 260 =50 MG OF DNA/ML

WITH DILUTION FACTOR OF 25 (I.E. 2ML IN 48ML), THIS FORMULA REDUCED TO:

MG DNA/ML = OD 260 X 1.25

4- لقياس درجة النقاوة من الشوائب البروتينية نطبق في القانون:

$OD\ 260/OD\ 280 \geq 1.7\text{-}1.8$

- إذا كان تركيز الحمض النووي أقل من هذا المدى لا تكون العينة صالحه.
- وهذا يعني عدم ذوبان الحمض النووي أو وجود شوائب مثل البروتينات .
- لذلك يتم إعادة الترسيب باستخدام المخلوط الكحولي.

ملخص خطوات عزل الحمض النووي DNA

أولا: تحليل الخلية وتحرير الحمض النووي DNA:

تحلل الخلية باستخدام الإنزيمات المحللة أو حبيبات زجاجية او بلورية في أثناء الطرد المركزي.

أو الإنزيم LYSOZYME:

يقوم بتحفيز التحليل المائي للرابطة الجليكوسيدية لمكونات الجدار الكربوهيدراتية (PEPTIDOGLYCAN) وبالتالي تحطيم الغلاف الخارجي ويحرر الحمض النووي DNAوغيره من مكونات الخليه.

في وجود الخلايا داخل المحلول المنظم BUFFER SOLUTION:

لا بد أن يكون الوسط المتواجد به محلول المحتوي على الـ DNA في صورة محلول منظم، محلول ملحي يحتوي على EDTA.

بسبب تأين الحمض النووي DNA وحمله لشحنه سالبه فإنه أكثر ثباتاً وذوبانا في المحاليل الملحيه عنه في الماء المقطر.

أهمية الـ EDTA:

1- ترتبط مع الأيونات الموجبة ثنائية الشحنه مثل (CD^{+2}, MG^{+2}, MN^{+2}) التي قد تكون أملاح مع مجموعات الفوسفات الأيونية في الحمض النووي DNA.

2- تثبيط الإنزيم المحلل للحمض النووي DEOXYRIBONUCLEASE لأنه يحتاج إلى أيونات المغنيسيوم MG^{+2} أو المنجنيز MN^{+2} لكي يقوم بوظيفته في تحليل الحمض النووي DNA.

- الوسط القلوي (PH=8) يقلل التفاعلات الإلكتروليتيه بين الحمض النووي DNA والهيستونات القلوية والأمينات عديدة التكافؤ.
- القلوية العالية (درجة PH العالية) تقلل من نشاط انزيم NUCLEASE وتغير طبيعة البروتين DENATURE.
- كما تساعد على فصل البروتينات المرتبطة بالحمض النووي DNA بزيدة القلوية والشحنة الموجبة للبروتينات الهيستونيه.

• ثانياً: فصل معقد الحمض النووي DNA والبروتين:

تستخدم المنظفات عادة في هذه المرحلة لتعطيل التفاعلات الأيونية بين الهستونات موجبة الشحنه مع الشحنة السالبة للحمض النووي DNA.

يستخدم عادة SODIUM DODECYL SULPHATE(SDS):

1- منظف متأين يرتبط مع البروتينات ويعطيها صفة شديدة الأيونية.

2- متلف للإنزيمات المحللة للـ DNA(DEOXYRIBONUCLEASES) وغيره من البروتينات.

- التراكيز العالية من الأملاح (مثل NACL وغيره) تضاف للتأكد من الفصل التام للبروتينات المرتبطة بالحمض النووي DNAعنه وتزيل الرابطة مع الأمينات موجبة الشحنة.
- حيث تضعف الأملاح قوة الارتباط الأيوني بين الحمض النووي والمركبات موجبة الشحنه.

ثالثاُ: فصل الحمض النووي DNA عن غيره من مكونات الخلية الذائبة

في هذه المرحلة، يجب التأكد من خلو المحلول من البروتينات وذلك باستخدام خليط الكلوروفورم مع الكحول ISOAMYL ALCOHOL ثم الطرد المركزي.

بعد ذلك تظهر3 طبقات:

طبقة عليا سائلة، وطبقة سفلى عضوية وبينهما طبقة وسطية تمثل شريط منضغط من البروتين الموه.

يسبب الكلوروفورم تشويه سطحي للبروتين

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

- تحتوي الطبقة العليا على الأحماض النووية ويتم فصلها ويتم ترسيب الحمض النووي باستخدام كحول الإيثانول.
- بسبب الطبيعة المتأينة للحمض النووي DNA يصبح غير قابل للذوبان إذا تواجد في وسط عضوي منخفض القطبية.
- يكون الحمض النووي راسب خيطي الشكل ويمكن جمعه بلفه على عصا زجاجية.
- قد يتلوث الحمض النووي المعزول بالبروتينات والحمض النووي RNA.
- يمكن التخلص من البروتين بإذابة الحمض النووي المترسب في وسط ملحي وإعادة استخدام خليط الكلوروفورم والكحول ISOAMYL ALCOHOL حتى لا يبقى اي بروتين في الطبقة الوسطى.

- لا يترسب الحمض النووي RNA مع الـ DNAولكنه قد يتواجد في صورة ملوثة للحمض النووي DNA.
- يمكن التخلص منه باستخدام الإنزيم المحلل له RIBONUCLEASE(RNASE) بعد التخلص من البروتين.
- قد يستخدم الكحول ISOPROBANOL لترسيب الحمض النووي DNA تاركاً الحمض النووي RNA في المحلول.
- يمكن إعادة خطوات فصل البروتين والحمض النووي RNA عدة مرات للحصول على حمض نووي DNA عالي النقاوة.
- بهذه الطريقة يفترض أن يتم فصل 50% من المحتوى الكلي للحمض النووي DNA في الخلية، ممتوسط المحصول يساوي 1-2 ملجم لكل جم من الوزن الرطب للخلايا البكتيرية.

الهدف من استخلاص الحمض النووي DNA البكتيري

- تحديد الخريطة الوراثية المحتوية على جميع الجينات الخاصة بالكائن الحي الدقيق.

- يحمل الحمض النووي في تركيبه الجزيئي وتتابع القواعد النيتروجينيه جميع المعلومات الوراثية في صورة جينات.

- عند فصل الحمض النووي DNA للكائنات يمكن معرفة نسبة الجوانين إلى السيتوسين G:C% وبالتالي تعريف الكائن الحي ومعرفة المملكة التي يتبعها.

- استخدام الحمض النووي DNA في تجارب التقنيه الحيوية BIOTECHNOLOGY: مثل ربط جينات معينة مع الحمض النووي DNA للبكتيريا في عمليات انتاج بعض المواد البروتينيه أو في المجالات الدوائية وفي مجال GENE THERAPY.

أمثلة إستخدام الحمض النووي DNA في تجارب التقنيه الحيوية :BIOTECHNOLOGY

جدول 16.6	بعض منتجات البروتين من تقنية الدنا الاتحادي	
المنتج	**المصدر**	**الاستخدام**
الانسولين البشري	بكتريا القولون	علاج داء السكري
هرمون النمو البشري	بكتريا القولون	علاج قصور النمو
عامل النمو الجلدي	بكتريا القولون	علاج الحروق, القُرح "القرحات"
الانترلوكين -2	بكتريا القولون	علاج ممكن للسرطان
هرمون النمو البقري	بكتريا القولون	يساعد في تسمين الأبقار
انزيم هضم السيليولوز	بكتريا القولون	تحليل السيليولوز لإطعام الحيوانات
تاكسول	بكتريا القولون	علاج لسرطان المبايض
انترفيرون (ألفا وجاما)	خميرة الخباز, بكتريا القولون	علاج ممكن للسرطان والعدوى الفيروسية
تطعيم فيروس الالتهاب الكبدي B	خميرة الخباز	الوقاية من الفيروسات الكبدية
هرمون تكون الكريات الحمراء	خلايا ثديية	علاج فقر الدم
عامل VIII	خلايا ثديية	علاج نزيف الدم
منشط مولد بلازما الأنسجة	خلايا ثديية	علاج نوبات القلب وبعض الجلطات القلبية

Human insulin produced by bacteria
أنسولين بشري مُنتج بواسطة البكتيريا

مالسبب؟؟؟

- إذا كانت المادة الوراثية للبكتيريا قادمة من الخلية الأم خلال الانشطار الثنائي، فلماذا نلاحظ وجود تغير في الصفات والقدرات الخاصة بالأجيال الأحدث من نفس النوع البكتيري مثل مقاومة المضادات الحيوية؟.

شكراً