أنواع الاستخلاص من الدم والبكتيريا والنباتات

تختلف طرق استخلاص الـDNA بناءً على مصدره (الدم او البكتيريا أو النباتات او الفطريات وغيرها) بسبب الاختلاف في تركيب الخلايا.

المبادئ الأساسية لاستخلاص الحمض النووي

عملية استخلاص الـ DNA تعتمد على عدة مراحل أساسية:

1. **تحضير العينة**.
2. **تحليل العينة وتمزيق الخلايا** :تكسير الجدران والأغشية الخلوية للوصول إلى الحمض النووي.
3. **إزالة البروتينات والشوائب** :باستخدام كواشف كيميائية مثل البروتيناز K أو الأملاح.
4. **ترسيب وتنقية الحمض النووي** :باستخدام الكحول (الإيثانول أو الأيزوبروبانول) لفصل الـ DNAعن باقي المكونات .

استخلاص الحمض النووي من الدم

يتم استخلاص الحمض النووي من كريات الدم البيضاء، لأن خلايا الدم الحمراء لا تحتوي على نواة.

1. **تحضير العينة:**
   - جمع عينة الدم في انابيب حاوية على مادة EDTA (مضاد تخثر لمنع تجلط الدم) وتحفظ في درجة حرارة الغرفة اذا كانت عملية الاستخلاص تتم في نفس اليوم، او تحفظ في الثلاجة اذا كانت عملية الاستخلاص في وقت لاحق.
   - تمزج عينة الدم جيدا باستخدام جهاز Vortex ثم تنقل الى انبوب ابيندورف Eppendorf .
2. **تحليل العينة وتمزيق الخلايا:**
   - اضافة محلول تحلل كريات الدم الدارئ (Red lysis buffer) لتحليل كريات الدم الحمراء، ثم تجرى عليه عملية الطرد المركزي لفصل محلول كريات الدم الحمراء (الهيموكلوبين) عن جزيئات كريات الدم البيضاء التي سوف تترسب.
   - يتم التخلص من الرائق وتعاد الخطوات لازالة كل الهيموكلوبين والابقاء على الراسب.
   - إضافة محلول تحلل النواة الدارئ (Nucleic lysis buffer) الذي يساعد على تحلل الخلايا وإطلاق الحمض النووي من داخل النواة.
3. **إزالة البروتينات والشوائب:**
   - استخدام إنزيم البروتيناز K لتفكيك البروتينات.
   - إضافة محلول الفينول-كلوروفورم لفصل البروتينات عن الحمض النووي.
4. **ترسيب وتنقية الـ:DNA**
   - إضافة الإيثانول البارد لترسيب الحمض النووي.
   - غسل العينة بالكحول وتنقيتها للحصول على DNA عالي الجودة.

استخلاص الحمض النووي من البكتيريا

تمتلك البكتيريا كروموسوم دائري وبلازميدات يمكن استخلاصها بشكل منفصل أو معاً. والبلازميدات (Plasmids) هي جزيئات DNA دائرية صغيرة مستقلة توجد داخل الخلايا البكتيرية وبعض خلايا حقيقية النواة، لكنها منفصلة عن الكروموسوم البكتيري الرئيسي.

هناك عدة طرق ولكن البحوث اثبتت ان استخدام طريقة الـ Microwave هي افضل واكفأ طريقة في انتاج كمية من الـDNA ذات تركيز جيد وقراءة جيدة في جهاز الـNanodrop.

1. **تحضير العينة:**
   - زراعة البكتيريا في وسط غذائي مناسب.
   - طردها مركزياً لفصل الخلايا من الوسط السائل.
2. **تحليل وتمزيق الخلايا:**
   - تحلل الجدار الخلوي باستخدام محلول TE الدارئ وبعض المواد كيميائية مثل SDS
   - يحظن الخليط في درجة حرارة 65 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة.
   - اجراء الطرد المركزي ويزال الرائق.
   - يوضع الانبوب في جهاز المايكرويف لمدة دقيقة وتكرر العملية مرتين او ثلاثة.
3. **إزالة البروتينات والدهون:**
   - إضافة إنزيم البروتيناز K وفينول-كلوروفورم ومحلول TE لإزالة البروتينات ثم تدخل الى الطرد المركزي.
4. **ترسيب وتنقية الـDNA:**
   - استخدام الإيثانول أو الأيزوبروبانول لترسيب الـDNA، ثم غسله بالكحول للحصول على عينة نقية.

استخلاص الحمض النووي من النباتات

تعد النماذج النباتية من اصعب المواد في استخلاص الحمض النووي عالي النقاوة فتحتوي الخلايا النباتية على **جدار خلوي صلب** يتطلب تحليله بكفاءة. كما تحتوي بعض النباتات على **مركبات بوليفينولية** تعيق عملية الاستخلاص. في معظم الحالات يتم استخدام النايتروجين السائل لتجميد المواد النباتية يعقبها عملية طحن الانسجة المجمدة بالهاون. ان استخدام النايتروجين السائل يكون صعب نوعا ما بسبب صعوبة نقله والتعامل معه، لهذ السبب فقد تم تحوير طريقة مناسبة وسهلة لعملية الاستخلاص

1. **تحضير العينة:**
   - يوزن 0.3 غرام من النسيج النباتي.
   - يوضع على شريحة نظيفة ويقطع بشفرة حادة
   - ينقل النسيج الى انبوب ابندورف.
2. **تحليل وتمزيق الخلايا:**
   - إضافة محلول الاستخلاص الدارئ EBA (Extraction buffer A) ومحلول الاستخلاص الدارئ EBB (Extraction buffer B) .
   - اجراء عملية المزج ثم التحضين بدرجة حرارة 65 درجة مئوية لمدة عشر دقائق.
3. **إزالة الشوائب والبروتينات:**
   - يوضع المحلول في الثلج ويضاف له بوتاسيوم اسيتيت Potassium acetate المبرد لترسيب البروتينات والشوائب الاخرى، وتحضن العينة في الثلج لمدة 3 دقائق.
   - إجراء الطرد المركزي المبرد بحرارة 4 درجة مئوية.
4. **ترسيب وتنقية الـDNA:**
   - ينقل 1 مل من الرائق الى انبوب ابندورف جديد ويضاف له ايزوبروبانول Isopropanol المبرد لترسيب الحمض النووي ثم تحضن العينة في الثلج لمدة 20 دقيقة.
   - اجراء الطرد المركزي ويطرح الرائق ثم يغسل الراسب من الاملاح والشوائب المتبقية بإضافة الإيثانول للحصول على عينة نقية.

تجربة استخلاص الحمض النووي (DNA) من الفراولة باستخدام مواد منزلية

الأدوات والمواد المطلوبة:

1. **حبة فراولة** (لأنها تحتوي على 8 نسخ من كل كروموسوم، مما يجعل الاستخلاص أسهل). كما يمكن تطبيق هذه الطريقة على فواكه أخرى تحتوي على كمية جيدة من الحمض النووي، مثل الموز والكيوي والتوت، لكن بعض الفواكه قد تكون أقل كفاءة في الاستخلاص بسبب احتوائها على كمية أقل من الـDNA أو لوجود مركبات قد تتداخل مع العملية مثل الحمضيات.
2. **كوب ماء دافئ.**
3. **ملعقة صغيرة من الملح** (يساعد على استقرار الحمض النووي وفصله عن البروتينات).
4. **ملعقة كبيرة من سائل تنظيف الصحون** (يكسر الأغشية الخلوية والأنوية لتحرير الـDNA).
5. **كحول إيزوبروبيلي أو كحول طبي (70% أو أكثر)** (يساعد في ترسيب الـDNA). يجب أن يكون الكحول باردًا ويفضل حفظه في الفريزر قبل الاستخدام، لأن انخفاض درجة الحرارة يقلل من ذوبانية الحمض النووي في الكحول، مما يسهل ترسبه وفصله عن باقي مكونات الخليط. والكحول البارد يساعد أيضًا في منع تحلل الـ DNA بفعل الإنزيمات الموجودة في الخلايا، مما يحافظ على جزيئات الـ DNA بحالة جيدة.
6. **كيس بلاستيكي صغير قابل للقفل** لسحق الفراولة.
7. **مصفاة أو قطعة قماش قطنية** لتصفية الخليط.
8. **كوب زجاجي شفاف** لرؤية الـDNA.
9. **عود تنظيف الأذن أو عود أسنان** لجمع الـDNA.

خطوات التجربة:

1- تحضير محلول التحلل

- في كوب، امزج ½ **كوب ماء دافئ + ملعقة صغيرة ملح + ملعقة كبيرة من سائل تنظيف الصحون.**
- حرك الخليط بلطف حتى يذوب الملح تمامًا.

2- سحق الفراولة

- ضع الفراولة داخل الكيس البلاستيكي، ثم أضف إليها **3ملاعق كبيرة من محلول التحلل.**
- أغلق الكيس بإحكام، ثم اسحق الفراولة جيدًا باستخدام يديك لمدة 2-3 دقائق حتى تصبح سائلة تمامًا.

3- تصفية الخليط

- اسكب الخليط المهروس من الكيس عبر مصفاة أو قطعة قماش قطنية في كوب زجاجي شفاف.
- تخلص من البقايا الصلبة واحتفظ بالسائل.

4- إضافة الكحول لترسيب الحمض النووي

- ببطء، اسكب **كمية مساوية من الكحول البارد** على جدار الكوب فوق خليط الفراولة دون تحريكه.
- انتظر لبضع دقائق، وستبدأ خيوط بيضاء أو غائمة بالظهور في الطبقة العلوية، وهو الحمض النووي.

5- جمع الحمض النووي

- استخدم عود تنظيف الأذن أو عود أسنان لالتقاط خيوط الـ DNAوملاحظتها عن قرب.