الجامعة السورية الخاصة
SYRIAN PRIVATE UNIVERSITY

كـلـيـــة الصيدلة
Faculty of Pharmacy

السنة الثالثة

مقرر الهندسة الوراثية (الجينية)

المحاضرة الثانية

2019-2020

د. شادي سكرية

تقانات في الهندسة الجينية
Techniques in genetic engineering

١- تحضير الحموض النووية
Nucleic acid preparation

١- تحضير الحموض النووية
Nucleic acid preparation

تتطلب جميع الدراسات في مجال الهندسة الجينية والتطبيقات الطبية الروتينية الحصول على عينة من **الحموض النووية DNA وRNA**.

الكميات المطلوبة من هذه المواد البيولوجية للقيام بالدراسة صغيرة جداً لا تتجاوز **بضعة ميكروغرامات.**

يمكن استفراد DNA من أي نمط خلوي يحوي على نواة، لكن في كثير من الأحيان **يتم اللجوء إلى الدم كمصدر لـ DNA لدى الإنسان،** في حين يتطلب تحضير mRNA اللجوء إلى نمط خلوي معين (النمط الخلوي الذي يعبر عنه).

خطوات التحضير:

- **حل الخلايا:** دارئة حل Lysis Buffer مناسبة والحصول على محلول يحوي مزيج من الحموض النووية والبروتينات والليبيدات.
- التخلص من البروتينات والمواد العضوية الأخرى: **الاستخلاص الفينولي.**
- ترسيب DNA: بوساطة الكحول (**الترسيب الكحولي**).
- غسل DNA بالكحول ٧٠%.
- إعادة حل DNA بالماء أو بدارئة ملحية.

طريقة تحضير DNA من الدم:

تفجير كريات الدم الحمر بهدف التخلص منها والبيض بهدف الحصول على النوى.

حل النوى بدارئة تحوي مزيج من **منظف Detergent** (سولفات ديدوسيل الصوديوم **SDS**) ومن بروتيناز **عالية الفعالية كالبروتياز K**. تؤدي المعالجة بهذا المزيج إلى **تحطيم الأغشية النووية وتخريب البروتينات الرابطة لـDNA** وبالتالي تحرر DNA النووي.

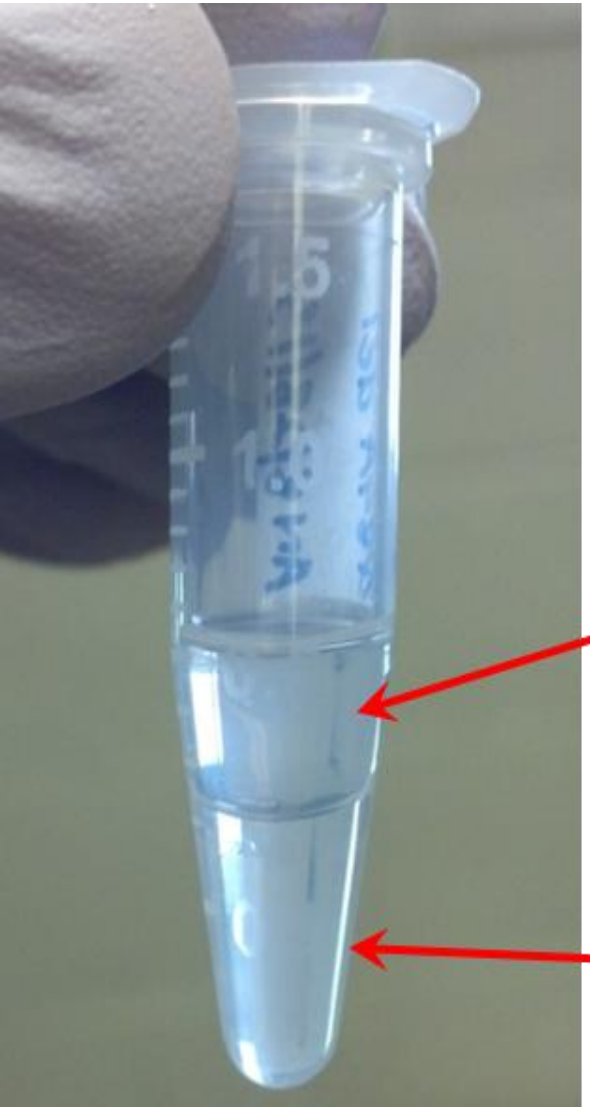
الاستخلاص الفينولي

للتخلص من البروتينات والمواد العضوية الأخرى (اللبيدات) ضمن الخلاصة الخلوية الحاوية على الحموض النووية، يتم استعمال **محلات عضوية** حيث تنحل الحموض النووية في المحاليل المائية في حين تنحل البروتينات واللبيدات في المُحلات العضوية التي لا تحل الحموض النووية.

عادة ما يستعمل **الفينول**.

الفينول محل عضوي لا يمتزج مع الماء

يستعمل لتخلص من البروتينات واللبيدات التي تشوب محلول ما من الحموض النووية.



حيث تبقى الحموض النووية منحلة في المحاليل المائية في حين أن البروتينات واللبيدات تنحل بسهولة في الفينول الذي لا يستطيع حل الحموض النووية.

الترسيب الكحولي

يهدف الترسيب الكحولي إلى الحصول على الحموض النووية الموجودة في محلول ما بشكل صلب مما يمكّننا من إعادة حلها في محلول جديد بغية تغيير تركيز هذه الحموض، أو تغيير الدارئة المنحلة فيها.

أهم أنواع الترسيب الكحولي:

- الترسيب باستخدام الكحول الإيتيلى (الإيتانول):

إن إنجاز هذا النوع من الترسيب يتطلب شرطيين:

الأول: استخدام دارئة ذات قوة أيونية عالية تحوي على ملح أحادي التكافؤ

الثاني: استخدام إيتانول عالي التركيز (ثلاثة حجوم من الإيتانول المطلق لكل حجم من العينة).

في هذه الشروط تترسب الحموض النووية بشكلٍ كاملٍ تقريباً.

يقدر الزمن اللازم للترسيب **بعدة ساعات** وذلك حسب تركيز الحموض النووية في العينة حيث يزداد هذا الزمن مع انخفاض تركيز الحموض النووية في المحلول ويمكن أن **تسرع العملية بالتبريد** إلى الدرجة -20 م°.

- الترسيب باستخدام الإيزوبروبانول:

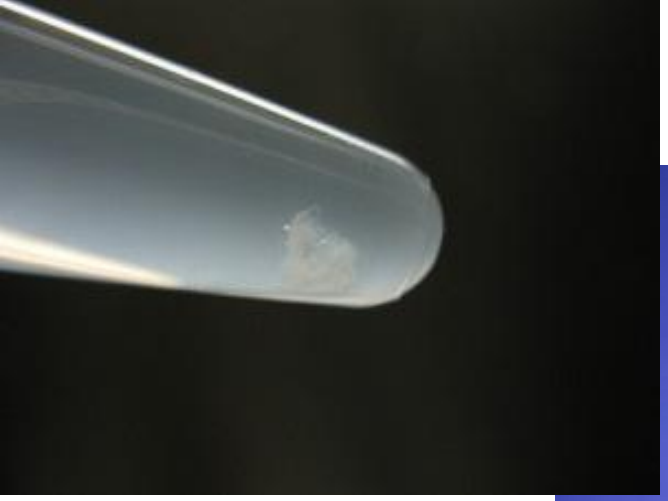
المبدأ هو نفسه فيما يتعلق بالترسيب بالإيتانول مع فرقين أساسيين:

الأول: ليس هناك من ضرورة لاستخدام أي نوع من الأملاح.

والثاني: يجب أن يساوي الحجم المستخدم من الإيزوبروبانول حجم العينة.

يتميز الترسيب باستخدام الإيزوبروبانول بأنه **ترسيب فوري** (لا داعي للانتظار لساعات) وأن **الشدف الصغيرة من DNA لا تترسب** باستخدام هذه الطريقة.

ومهما كانت الطريقة المستخدمة للترسيب يجب **غسل الرسابة** بعدها **بالكحول الإيتيلي بتركيز 70%** (لاحتوائه على كمية من الكحول كافية لإبقاء DNA مترسب وكمية كافية من الماء لحل الأملاح) لإزالة الأملاح العالقة بالحموض النووية وبعدها تجفف الرسابة ويعاد حلها ضمن الماء المقطر أو ضمن دارئة من TE (Tris+EDTA).



تحضير RNA الكلي Total RNA:

تعتبر دراسة RNA أكثر صعوبة من دراسة DNA وذلك لضعف بنيتها في مقاومة الريبونكلياز كـ RNaseA.

يتم مجانسة النسيج أو الخلايا التي يراد استفراد RNA ابتداءً منها، وذلك ضمن دارئة مناسبة تحوي مواد مثبطة لعمل الريبونكلياز.

نحصل على جناسه تحوي البروتينات والحموض النووية.

للحصول على RNA غير المشوب بـDNA يمكن اللجوء إلى طريقة سريعة تقوم على **الترسيب التفاضلي لكل من DNA وRNA** بالاعتماد على pH الوسط والتركيز الكحولي المستخدم

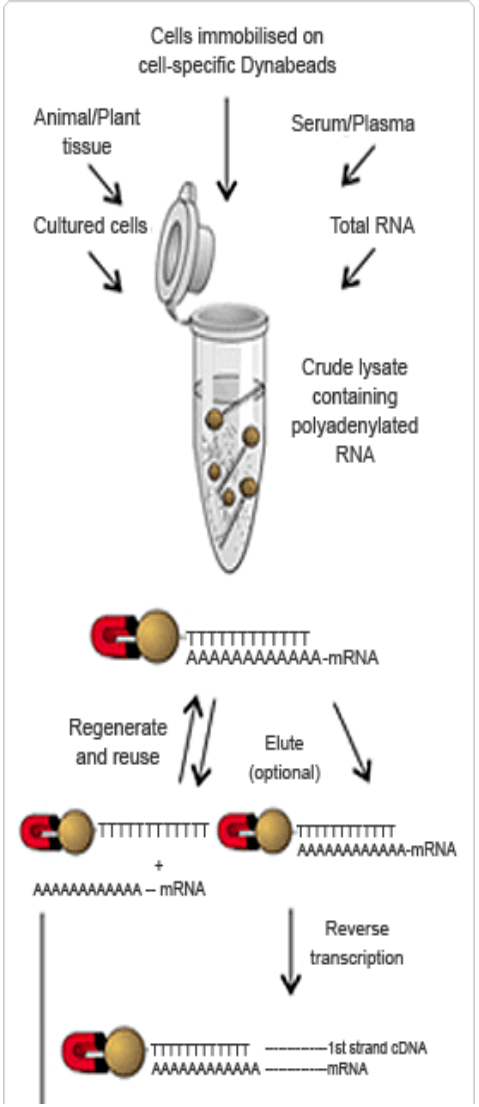
كما يمكن تحطيم DNA بوساطة أنزيم نكلياز مناسب.

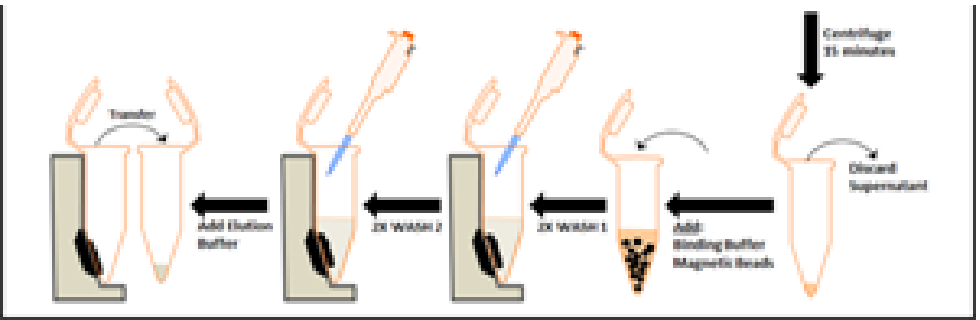
نلجأ إلى الاستخلاص الفينولي لتخلص من البروتينات.

والترسيب الكحولي للحصول على RNA الكلي.

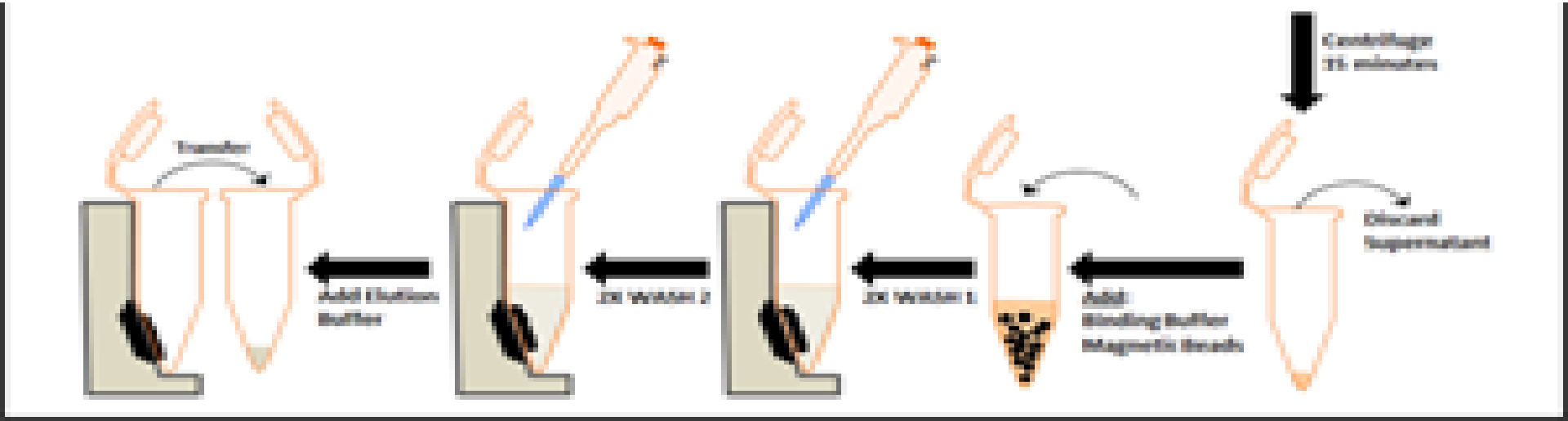
تحضير mRNAs (Messenger) الكلي

يملك السوِاد الأعظم من mRNA لحقيقيات النوى ذيلاً مؤلفاً من تسلسل طويل من عديد الأدنيل الذي يمكن أن يتجاوز طوله ٢٠٠ نكليوتيد أحياناً. يمكن الاستفادة من هذه الخاصية لتنقية الرسيل بوساطة أطقم Kits جاهزة للاستعمال تحوي على كرات مكروية معدنية ممغنطة مغطاة بتسلسلات من قليل التيميدين Oligo-dT تستخدم لعزل الرسيل.





حيث تخلط بالمحلول الحاوي على RNA الكلي فيرتبط mRNA بقليلات التيميدين، يجمع بعدها الرسيل بسهولة باستخدام مغناطيس يوضع على حافة الأنبوب فترتبط الكرات الممغنطة بحافة الأنبوب الملاصق للمغناطيس رابطةً معها الرسيل، يتم عندها التخلص من السائل المحيط بالكرات الحاوي على باقي أنواع RNA.



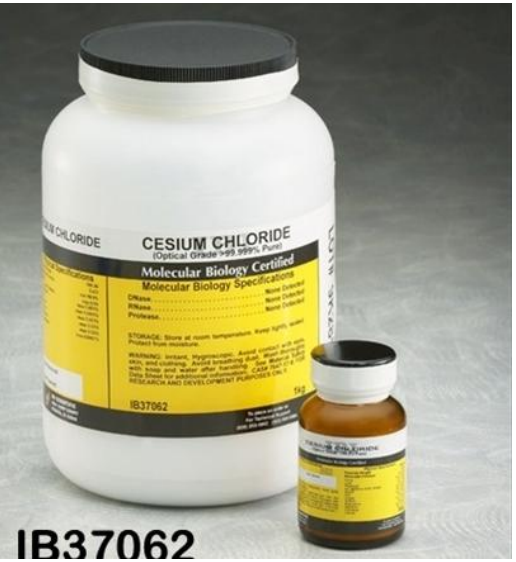
تنقية الحموض النووية باستعمال التثفيل الفائق على مدروج كثافة مستمر من محلول لكلور السيزيوم

- تعرف هذه الطريقة بتسدم التوازن equilibrium sedimentation حيث يستعمل فيها محلول عالي التركيز من كلور السيزيوم (6M) الذي يتمتع بخاصية فيزيائية نوعية تتمثل بقدرته على تشكيل مدروج كثافة مستر **continuous density gradient** عند تثفيله بسرعات فائقة ٤٠٠٠٠٠g.

تنقية الحموض النووية باستعمال التثفيل الفائق على مدروج كثافة مستمر من محلول لكلور السيزيوم

- تمزج العينة مع محلول كلور السيزيوم في الأنبوب وتثفل بسرعة معينة، يتشكل أثناء عملية التثفيل مدروج الكثافة وتنفصل مكونات العينة بتحركها أعلى وأسفل حتى الوصول إلى المكان المناسب من المدروج الذي يصبح فيه كثافة العينة تساوي كثافة المدروج حيث تعرف هذه الكثافة بكثافة الطفو Buoyant density، ولا يمكن لها أن تتحرك بعد ذلك مهما طال زمن التثفيل.

Preparative density-gradient ultracentrifugation of DNA



تعد هذه الطريقة حساسة للغاية يمكن باستعمالها الفصل بين DAN وRNA والبروتينات.

كما يمكن فصل DNA النووي عن DNA الميتوكوندري أو البلاسميدي.

كما يمكن بوساطتها فصل بين جزئيين من DNA متماثلين أحدهما يحوي النظير الثقيل heavy isotope والأخر النظير الخفيف مثل 15N و 14N.