المراحل المتبعة للحصول على الDNA

اولاً:- الاستخلاص Extraction

سحق وتحطيم الأنسجة والخلايا المحتوية على الحمض النووي المراد دراسته أو الكشف عنه, وتسمى الخطوة تحليل الخلايا Cell lysis ويتم بطريقتين:-

1- **باستخدام طرق ميكانيكيه مثل الطحن مع النيتروجين السائل او التجفيف لتكسير الجدر والأغشية الخلوية**
2- **طرق حيوية مثل استخدام الانزيم المحلل Lysozyme العدة القياسية .**

يجب أن يتم الفصل في وسط له ظروف تقوم بتثبط الإنزيمات والمواد الكيميائيه الضاره، اذ توضع الخلايا بعد الطحن التام مباشرة في محلول منظم ملائم مثلCTAB . وتحليل الدهون و البروتينات في الأغشيه البلازميه باستخدام ماده detergent.

ثانياً:- التنقية Purification

هي إزالة الجسيمات الغير قابلة للتحلل والمواد الغير قابلة للذوبان باستخدام الطرد المركزي وبعض المذيبات العضوية (كالكلوروفورم).

لإزالة البروتينات:-

1- **استخدام انزيم محلل للبروتينات protease وهي خطوة احتياطية تجرى عادة للتأكد من عدم تلوث عينة الحامض النووي بالبروتينات.**
2- **ترسيب البروتينات باستخدام مادة خلات الصوديوم أو الأمونيوم Sodium or ammonium acetate**
3- **أو فصل البروتينات باستخدام مخلوط من الكلوروفورم والفينول، قبل خطوة ترسيب الحمض النووي.**

ثالثا:- ترسيب الحامض النووي

1- يجب ترسيب الحامض النووي وتحويله من الصوره الذائبه الى الحالة الصلبة.
2- استخدام الكحول المثلج الايثيلي أو كحول الايوزبروبانول لعدم ذوبان الحامض النووي فيهما.
3- اذ يتم تفصل الأملاح الملوثة له (القابلة للذوبان في الكحول) ويظهر الحامض النووي في صورة راسب خيطي

رابعا- الإذابة والحفظ

1- تعليق الحامض النووي النقي بإذابته في ماء مقطر معقم أو في محلول منظم مثل TE buffer .

2- باستخدام هذه الطريقة يمكن الحصول على حامض نووي نقي من الأنسجه النباتية.

خامسا- التحقق من جودة الحمض النووي

1- يتم عن طريق فصل العينة على جل الاكاروز المصبوغ ببروميد الإثيديوم Ethedium bromide
2- يتم الكشف عن قطع الحامض النووي الناتجه تحت ضوء الأشعه فوق البنفسجيه.UV

سادساً- درجة نقاوة الحامض النووي

لقياس درجة نقاوة الحمض النووي

1- قياس الكثافة الضوئية عند ٢٦٠ و٢٨٠ نانومتر اذ يمتص الحامض النووي الأشعه فوق البنفسجيه عند ٢٦٠ و٢٨٠ بينما تمتص البروتينات الحلقية الموجات عند ٢٨٠ نانومتر فقط.
2- -الحمض النووي النقي يعطي نسبة ٢٨٠/٢٦٠ تساوي 1.8.
3- -وتعتبر العينة ملوثة بالبروتينات إذا كانت النسبة أقل من 1.8 .

سابعاً -قياس كمية الحمض النووي

يستخدم جهاز المطياف الضوئي او nanodrop لتقدير كمية الحامض النووي.

أستخلاص الDNA

تعد عملية استخلاص الدنا من العمليات الضرورية للحصول عليه واستخدامه في الاختبارات الجزيئية والتحليلات الجنائية وايا كان مصدر الاستخلاص (بكتريا,خلايا نباتية,خلايا حقيقية النواة) فان عملية الاستخلاص توفر ايضا ازالة الشوائب كالبروتينات والدهون وغيرها من الشوائب الكيميائية.

يمكن أستخلاص الDNA بعدة طرق أعتماداً على نوع Kit المستخدم والشركة المصنعة.

طريقة العمل

1- ناخذ 100-200ملغم من النسيج النباتي مع 800 مل من محلول CTAB
2- ننقل المحلول الى انبوبة Centrifuge وتحفظ في حمام مائي بدرجة حرارة 55C

3- ينقل المحلول الى Centrifuge لمدة خمس دقائق على 13000دورة/الدقيقة ثم ينقل المحلول الى انبوبة Centrifuge ثانية.
4- نضيف 400مل من Chloroform وتخلط لمدة 5 دقائق على 13000دورقة/دقيقة.
5- نأخذ الطبقة العليا اي طبقة الDNA وتنقل الى انبوبة Centrifuge جديدة.
6- نضيف 50 مل من محلول مائي عالي الملحية ثم نضيف 500مل من الايثانول البارد.
7- ترج الانبوبة عدة مرات وتترك ليترسب الDNA.
8- ينقل الى Centrifuge لمدة 5 دقائق على 12000دورة/دقيقة.
9- نتخلص من المحلول ونضيف 500 مل من الايثانول البارد.
10- تنقل العينة الى Centrifuge 13000دورة/دقيقة ثم نزيل الطبقة العليا ويترك الDNA ينقل الDNA ويخزن في درجة حرارة منخفضة.