قواعد الأمان في المخبر

يعد الالتزام بشروط الأمان أثناء العمل في تجارب ومخابر البيولوجيا والوراثة الجزيئية مسؤولية كل طالب وباحث وذلك حفاظاً على سلامته وسلامة الآخرين، ولتجنب الحوادث التي قد تؤدي إلى إصابات مؤلمة وخطيرة.

للحد من المخاطر التي يمكن أن يتعرض لها الباحث في المخبر، لا بد بداية من التعرف على المواد والأجهزة التي تستخدم بكثرة في مخابر التقانات الحيوية، والتي يجب التعامل معها بالكثير من الحيطة والحذر.

1- المواد المسببة للطفرات والمواد المسرطنة:

تعتبر أغلب المواد الكيميائية التي ترتبط مع ال DNA وتستخدم لأهداف مختلفة في المخبر، مواد محدثة للطفرات وقد تكون مسرطنة، من أهم الأمثلة عليها مادة بروم الايثيديوم Ethidium bromide .

تستخدم هذه المادة بشكل كبير جدا في مخابر التقانات الحيوية بهدف كشف ال DNA وال RNA، سواء في الهلامات أثناء عملية الرحلان الكهربائي، أو في الأنابيب أثناء عمليات تنقية أنواع مختلفة من ال DNA تبعاً لبنيتها وكثافتها وبوجود كلور السيزيوم، أو غيرها من التقنيات.

من الاحتياطات المتبعة عند التعامل مع بروم الايثيديوم:

- ارتداء القفازات الطبية عند وزن كميات من بروم الايثيديوم لاستخدامها في تحضير المحاليل واستخدامها في عمليات التلوين.

- يفضل وضع كمامة على الأنف والفم أثناء التعامل مع بروم الايثيديوم وهو على شكل مسحوق أو بودرة ويفضل أن يكون العمل ضمن ساحبة غازات.

- لا ترمى المحاليل المستخدمة من بروم الايثيديوم مباشرة في الأحواض كي لا تذهب إلى مياه الصرف الصحي لمنع تسربها لأي حقل أو ماء مخزن أو ...الخ، وإنما لا بد من معاملتها بطرق معينة لتخليص المحاليل من النسبة العظمى من بروم الايثيديوم، كتمرير هذه المحاليل على طبقة من الفحم النشيط أو غيرها.

- الهلامات التي تلون ببروم الايثيديوم لا ترمى بعد الانتهاء من تحليلها مع القمامة العادية وإنما ترمى في أكياس منفصلة وتعامل معاملة خاصة.

- يفضل تلوين الهلامات ببروم الايثيديوم بعد نهاية الرحلان الكهربائي وعدم إضافة بروم الايثيديوم إلى سائل الرحلان الكهربائي وذلك لتجنب تلوث أجهزة الرحلان الكهربائي بهذه المادة.

- بحال سقوط هذه المادة على الأرض أو على طاولات العمل، فان المحارم الورقية التي تستخدم بتجفيف ما سقط منها، ترمى في أكياس قمامة خاصة بها وليس مع باقي قمامة المخابر.

2- المواد الكيميائية المؤذية والسامة والحارقة:

- هناك بعض المواد السامة أو المخرشة للجهاز التنفسي والتي تستخدم بكثرة في تحاليل الـ DNA، نذكر منها مادة الأكريلاميد التي تستخدم لتجهيز الهلامات التي تستخدم كأوساط لتحميل عينات ال DNA في عملية الرحلان الكهربائي العامودي. تتصف هذه المادة بأنها مخرشة للجهاز التنفسي وتسبب اضراراً للجهاز العصبي عند استخدامها بشكل مسحوق أو بودرة لكونها تتطاير في الجو المحيط، لذلك لا بد من وضع الكمامات والتعامل معها بوجود ساحبة الغازات، كما يجب تجنب تلوث الأيدي عندما تكون بحالة سائلة بعد إذابتها بمحلول الرحلان الكهربائي بها من خلال استخدام القفازات المطاطية، وتنتهي خطورتها بعد أن تتم عملية تكاثفها (بلمرتها) وتتحول إلى الحالة الجامدة (الصلبة).

- يراعى تجنب الحروق بالفينول، و بالأحماض والقلويات.....الخ

- تحفظ هذه المواد بعبوات مناسبة وبطريقة محكمة الاغلاق.

3- الأشعة فوق البنفسجية:

تعتبر الطاولة المصدرة للأشعة فوق البنفسجية إحدى مصادر الأذية للباحث، حيث تؤثر عند النظر إليها مباشرة على نظره لدرجة كبيرة قد تؤدي لفقدان البصر في الحالات القصوى، كما أنها تسبب الحروق للجلد عند تعرضه لفترة طويلة نسبياً.

يمكن تجنب أضرارها من خلال استخدام النظارات الواقية أو الأقنعة المصنوعة من مواد تسمح بالرؤية وتحد من مرور الأشعة من خلالها ووصولها لأعيننا أو لجلدنا وبشرتنا.

4- أجهزة الرحلان الكهربائي:

وخاصة تلك المستخدمة في عمليات الرحلان الكهربائي العمودي، حيث يستخدم تيار كهربائي عالي الشدة، وبالتالي يجب التأكد من وضعه بمكان جاف بعيد عن أماكن استخدام وتجمع المياه.

كذلك يجب أخذ الاحتياطات والتأكد من عدم تسرب السوائل من أجهزة الرحلان الكهربائي، وعدم ترك أغطية أجهزة الرحلان الكهربائي مفتوحة وهي موصولة بالتيار الكهربائي، وكذلك عدم تشغيل الأجهزة إلا إذا كانت الأيدي جافة.

5 -السخانات الكهربائية ذات المحرك المغناطيسي:

تستخدم لتسخين وإذابة بعض المواد، ترتفع درجة حرارتها لأكثر من 200 درجة مئوية، ويجب الانتباه عند الانتهاء من استخدام الجهاز ان يترك ما يشير لارتفاع درجة حرارتها (لكون الجهاز لا يبرد بسرعة) لتجنب أذية أي زميل اخر بالمخبر.

بالإضافة لما سبق، هناك بعض الإجراءات التي يطلب الالتزام بها لرفع مستوى الأمان في مخابر التقانات الحيوية بشكل عام، مثل:

- ارتداء لباس المخبر باستمرار (المعطف الابيض المخبري- القفازات البلاستيكية التي تستخدم لمرة واحدة فقط) لتجنب التلوث بالمحاليل والماد الملونة والصبغات.

- عدم تناول الطعام والشراب أثناء العمل، كذلك يمنع التدخين، ونزع العدسات، ووضع الأقلام التي تستخدم أثناء العمل في المخبر في الفم وذلك لتلافي التلوث بأي من المواد الضارة أو السامة أو المسرطنة.

- تجنب ارتداء الأحذية المفتوحة من الأمام لتلافي الحروق ببعض السوائل الساخنة أو الحامضية أو القلوية بحال سقوط أي منها عند التحضير، كذلك يطلب تجنب ارتداء الكعب العالي لتأمين سهولة وسرعة الحركة عند التعرض لأي حادث مفاجئ في المخبر.

- الانتباه لعدم وضع الأيدي على طاولات التسخين الكهربائية التي قد تتجاوز درجة حرارتها ال 200 درجة مئوية، والتي قد تكون قيد الاستعمال أو بعد الاستعمال مباشرة وذلك تجنباً للحروق، وبحال انتهائك من استخدام هذه السخانات للتو، يفضل وضع ما يشير إلى أن درجة حرارتها ما زالت مرتفعة ليتجنبها الآخرون في المخبر.

- منع سحب السوائل بالماصات باستخدام الفم منعا باتاً، لتجنب المخاطر التي تنجم عن أبخرة بعض السوائل المخرشة للجهاز التنفسي، وكذلك لتجنب وصول المحاليل الحارقة، أو السامة أو المسرطنة إلى الفم ومن ثم إلى الجهاز الهضمي.

- تجنب النظر الى الاشعة فوق البنفسجية بدون نظارات او قناع.

- مراعاة غسل الأيدي قبل مغادرة المخبر.

أهم الأجهزة المستخدمة في مخابر البيولوجيا الجزيئية ومبدأ عملها

تحتاج تجارب البيولوجيا الجزيئية وبالتحديد تجارب التقانات الحيوية التي تعتمد على دراسة وتحليل ومقارنة جزيئة ال DNA لمجموعة من الاجهزة والادوات والتي تعتبر اساسية لتنفيذ هذا النوع من الدراسات.

سنتعرف في هذه الجلسة على أهم الاجهزة المستخدمة والمتوفرة لدينا في مخبر الوراثة الجزيئية في مخابر التقانات الحيوية.

1-الحمام المائيWater Bath :

عبارة عن حوض يحتوي على ماء ويحتوي على مصدر لرفع درجة الحرارة مع منظم ليؤمن ثباتها على الدرجة المطلوبة، له عدة اشكال واحجام.

الحمام المائي عبارة عن حوض من الستانلس ستيل مزدوج الجدران يؤمن عزل حرارة الماء عن حرارة الجو الخارجي ومزود بغطاء ليحافظ على درجة الحرارة لأكبر فترة ممكنة، يحوي الحوض بالداخل على عربة متحركة مرتبطة بذراع يتصل بمفتاح تشغيل من الخارج مع محدد لسرعة الحركة ليؤمن تجانس حرارة الماء بالحوض وليساعد على تحريك وتجانس محتويات العينات المحضنة بالحوض.

يحتوي الجهاز على وشيعة تسخين مرتبطة بمفتاح ومؤشر على الجهاز من الخارج لاختيار ومراقبة الحرارة المطلوبة.

الغاية من استخدام الجهاز: تحضين العينات لتأمين درجة الحرارة المطلوبة للعينات بما يناسب الهدف من العمل وذلك لفترة زمنية محددة، بالإضافة لتأمين تجانس حرارة ومحتوى العينة من خلال عملية التحريك.

المبدأ الأساسي بالعمل :وجود وشيعة تؤمن عملية التسخين مرتبطة بمسبر يدل على درجة الحرارة ومتصل بفاصل واصل اوتوماتيكي يؤمن ثبات درجة الحرارة على الدرجة المطلوبة، أي عندما تصل درجة الحرارة بالحمام المائي للدرجة المطلوبة ينفصل التيار ويعود للعمل عندما تنخفض درجة الحرارة عن الدرجة المحددة .الجهاز مزود بمفاتيح من الخارج لإشعال واطفاء الجهاز اضافة للوحات لتوضيح ومراقبة درجات الحرارة بالإضافة لمؤشر يحدد سرعة الحركة.

2- المثفلة Centrifuge :

جهاز ذو جدران سميكة، يحتوي جوفه على حامل يتوضع عليه رأس (قابل للتغيير)يحمل تجاويف تناسب انابيب بقياسات واحجام مختلفة .يحمل من الخارج لوحات تساعد على تحديد السرعة، والزمن ودرجة الحرارة المناسبة لعملية التثفيل التي نقوم بها.

الغاية من استخدام الجهاز :فصل الاوساط أو المواد ذات الكثافات المختلفة عن بعضها البعض.

المبدأ الأساسي بالعمل :تعريض العينات لعملية طرد مركزي بسرعات كبيرة ومحددة ولفترات زمنية معينة وبدرجات حرارة معينة، مما يؤدي لفصل الاوساط عن بعضها تبعاً لكثافتها ويمكن بعد ذلك استبعاد بعض الأوساط والاحتفاظ بالأوساط الأخرى.

3- مقياس الطيف الضوئيSpectrophotometer :

الغاية من استخدام الجهاز :هو التعرف على وجود عناصر معينة في محلول ما وتركيز هذه العناصر، يلزمنا بمخابر البيولوجيا بشكل اساسي للتعرف على نقاوة ال DNA المستخلص من عينة ما ومعرفة تركيزه وبالتالي الكمية التي تم استخلاصها.

المبدأ الأساسي بالعمل :تعريض العينة لأشعة بأطوال موجات محددة (مناسبة للمادة المدروسة) ويعتمد على معرفة كمية الاشعة الممتصة من قبل جزيئات مادة ما عند طول موجة معين، وبالنسبة للأحماض النووية، الاشعة الممتصة هي الأشعة فوق البنفسجية Ultra violet (U.V.)وتتناسب كمية الاشعة الممتصة طرداً مع كمية الحمض النووي في العينة المدروسة.

من المعروف ان الاحماض النووية تمتص الاشعة فوق البنفسجية بسبب وجود البنية الحلقية للقواعد الآزوتية، ويكون الامتصاص الأعظمي عند طول الموجة 260 n.m.

كل قراءة على جهاز السبكترومتر للكثافة النظرية =1 ، يدل على ان العينة المختبرة تحوي على 50 ميكروغرام من ال DNA في 1 مل من العينة.

تركيز الـ DNA /1 ميكروليتر من العينة = قراءة الكثافة النظرية x 50 x / عامل التمديد 1000 /

نقاوة الـ DNA: القراءة عند طول موجة 260nm/ القراءة عند طول موجة 280nm

قيمة النقاوة بين(1.8- 2) تعني ان الـ DNA نقي وغير ملوث بالبروتينات

4 - جهاز الدوران الحراري(جهاز الPCR):

استخدام الجهاز: لمكاثرة قطعة محددة من ال DNA والحصول على عدد كبير من النسخ المتطابقة ليصل عددها لمليارات من الجزيئات بدءاً من جزيئة واحدة، يتم تحديد القطعة المراد مكاثرتها من خلال استخدام زوج من بادئات معينة وتعريض العينات لدورات حرارية تتألف كل منها من 3 مراحل (فصل ال DNA ، ارتباط البادئة بالقالب DNA ، تصنيع واستطالة السلاسل الجديدة).

المبدأ الأساسي بالعمل :يعتمد على آلية تسمح ببرمجة الجهاز لتأمين عدد معين من الدورات لفترات زمنية محددة ودقيقة وكذلك بدرجات حرارة معينة، يتميز الجهاز الجيد بآلية سريعة ودقيقة في عملية الانتقال بين درجات الحرارة المختلفة (من 96 ، الى 56 ، ثم 72 ، ولفترات محددة، ومن ثم البدء بدورة جديدة بشكل متتابع.)

5 - جهاز الرحلان الكهربائي Electrophoresis :

استخدام الجهاز :لفصل جزيئات ال DNA تبعا لوزنها الجزيئي ، على وسط(هلامة أغاروز أوبولي أكريلاميد)، بوجود تيار كهربائي وسائل رحلان كهربائي وبشدة تيار محددة.

المبدأ الأساسي بالعمل :تعريض عينات ال DNA لتيار كهربائي (من جهاز خاص يزود بتيار كهربائي معروف الشدة) يجعل جزيئات ال DNA تهاجر من القطب السالب إلى القطب الموجب تبعا لوزنها الجزيئي.

6- جهاز التصوير والتوثيق:Gel documentation

استخدام الجهاز : لتصوير الهلامات والتعرف على ال DNA وحفظ الصور للاستفادة منها في معرفة نوعية ال DNA بعد الاستخلاص او لكشف الاختلافات بين قطع DNA من افراد معينة.

للتعرف على نقاوة ال DNA المستخلص من عينة ما ومعرفة تركيزه وبالتالي الكمية التي تم استخلاصها.

لدراسة الاختلافات بين DNA الافراد المدروسة باستخدام تقنيات مختلفة.

المبدأ الأساسي بالعمل :وجود مصدر للأشعة فوق البنفسجية وكاميرا والية لنقل الصورة الى شاشة معينة وان تكون الهلامة معاملة ببروم الايثيديوم الذي يدخل ضمن جزيئة ال DNA ويشكل معقد يتوهج بتعريضه للأشعة فوق البنفسجية وتتناسب شدة التوهج طرداً مع كمية ال DNA على الهلامة.

الطاولة المتحركة - الهزاز الافقيShaker :

استخدام الجهاز :لمزج العينات وتأمين تجانس المكونات المختلفة اثناء مراحل مختلفة من العمل، سواء باستخلاص الاحماض النووية او التلوين ببروم الايثيديوم .يمكن اختيار السرعة المناسبة لظروف العمل.

عزل الأحماض النووية

(DNA-RNA ISOLATION)

تعتبر الهندسة الوراثية أو ما يعرف أحياناً بهندسة المورثات من أحدث الطرق العلمية في تغيير التركيب الوراثي والتحكم بالصفات الوراثية للكائن الحي (نبات – حيوان – إنسان) مع إضافة بعض المورثات ذات الصفات الاقتصادية الهامة وبطريقة سريعة بهدف زيادة الإنتاج الزراعي والحيواني كماً ونوعاً.

إن الخطوة الأولى في برنامج الهندسة الوراثية هي عزل واستخلاص الأحماض النووية (DNA-RNA) والتي تعتبر الخطوة الأولى لتحليل بنية الجينوم وتعبير وظائف المورثات عند جميع الكائنات الحية.

حوالي 90% من التقانات الحيوية تبدأ باستخلاص الأحماض النووية

كمية ونوعية وسلامة (DNA-RNA) تؤثر بشكل مباشر على سلامة العمل.

نقاط يجب أخذها بعين الاعتبار:

1. لا توجد طريقة كاملة (بدون ملاحظات)
2. لكل طريقة ميزات وعيوب
3. هناك مجموعة من بروتوكولات العمل
4. اختيار طريقة العمل يعتمد على :

1- الهدف

2- نوع الحمض النووي ← DNA (نووي – بلاسميد)
← RNA (كلي – رسول)

3- الكمية المطلوبة من الأحماض النووية

4- نوعية الأحماض النووية وتؤخذ باتجاهين ← سلامة الأحماض النووية
← تلوثها بالبروتينات أو بأي جزيئات أخرى غير مرغوبة

صفات الطريقة الجيدة والفعالة:

1- تعطي كمية جيدة من الأحماض النووية بدون تلوث
2- غير انتخابية وتسمح باستخلاص معظم الأحماض النووية الموجودة في الخلايا
3- لا تؤثر على البنية الفيزيائية والكيميائية للأحماض النووية ولا تؤدي إلى تفكيكها، فعند استخلاص (DNA) يجب تجنب الطحن الميكانيكي كما يجب أن تكون أنزيمات العمل خالية من المواد المفككة لل (DNA)
4- سريعة وبسيطة وكلما زادت سرعتها وبساطتها كانت أفضل

ما المقصود باستخلاص ال (DNA):

هو فصل (DNA) عن باقي مكونات الخلية والحصول على محلول يحتوي (DNA) ويمثل جميع المعلومات الوراثية في الكائن الحي المراد دراسته.

معلومات عن (DNA) المدروس:

1- يشكل 1% من حجم مكونات الخلية
2- عند حقيقيات النوى يوجد ضمن النواة ويشغل 90% من حجم النواة بينما عند بدائيات النوى فهو كروموزوم حلقي حر ضمن السيتوبلاسما

3- يشكل (30%- 50%) من كتلة الفاج أو الفيروس وغالباً محاط بمعطف بروتيني
4- من السهل فصل (DNA) عن باقي مكونات الخلية الأخرى بسبب الحجم الضخم لجزيئة

في الخلية النباتية توجد المادة الوراثية (DNA) في أعضاء وهي النواة والصانعات الخضراء والميتاكوندريا ولذلك فإن استخلاص المادة الوراثية يعني عزلها من هذه الأعضاء وذلك يتطلب عزل هذه الأعضاء عن بقية أجزاء الخلية.

إن عزل المادة الوراثية من النواة أمر سهل لكن من الصعب عزلها من الصانعات الخضراء والميتاكوندريا بالإضافة إلى أن الصانعات الخضراء لا توجد في جميع الخلايا (توجد فقط في الخلايا النباتية).

أهمية عزل الوراثية:

تفيد عملية عزل المادة الوراثية في ثلاثة أمور:

تحليل بنية الجينوم ودراسة تتابع الأسس النيكليوتيدية (DNA)

دراسة تعبير المورثة (RNA)

التعرف على وظائف المورثة (البروتين)

مراحل عزل المادة الوراثية

يتم عزل المادة الوراثية وفق ثلاث خطوات تتلخص بالآتي:

1- تحطيم الخلايا التي توجد بداخلها المادة الوراثية (تحطيم)
2- فصل طبقة الأحماض النووية عن طبقة البروتين (فصل)
3- ترسيب الأحماض النووية (ترسيب)

أولاً – تحطيم الخلايا (Cell lysis):

هنالك مجموعة من الطرق تسمح بتحطيم الخلايا ،واختيار الطريقة يعتمد على تركيب الخلية ،و تتم هذه العملية بإحدى الطرق التالية:

1- الطريقة الأنزيمية حيث نضيف أنزيم (Proteinase- K) يعمل هذا الانزيم على حلمهة البروتينات.
2- التحطيم الميكانيكي يتم بواسطة جهاز خاص يعمل على مبدأ الأمواج فوق الصوتية تقوم هذه الأمواج بتحطيم الجدر الخلوية.
3- الطريقة الكيميائية وهي الأكثر شيوعاً تتضمن إضافة محلول استخلاص مؤلف من (بالنسبة للـ DNA) محلول (Tris) ، مادة (EDTA) ، مادة (SDS) مع (RNA) نضيف كلور الليتيوم أيضاً

تكون تراكيز هذه المواد مختلفة عنها في محلول استخلاص (RNA) كما أن هذه التراكيز أيضاً تختلف حسب نوع الخلية التي يتم استخلاص (DNA) منها.

وعلى افتراض أننا نقوم باستخلاص (DNA) من خلايا الأوراق تتميز برهافتها

توضع الأوراق ضمن جفنة للطحن مصنوع من مادة البورسلان حيث أنه لابد تعقيم هذه الجفنة بوضعه في جهاز الأوتوكلاف على درجة حرارة C^o105 .

ممكن أن نضيف مع الأوراق الموضوعة في الجفنة مادة الآزوت السائل درجة حرارته (C^o 196-) وبالتالي نتيجة انخفاض درجة حرارته يقوم بتكسير الجدران الخلوية ويحول المادة النباتية إلى بودرة ثم نضيف بعض ذلك محلول الاستخلاص ونستمر

بالطحن ليتشكل مزيج مؤلف من المادة النباتية ومحلول الاستخلاص ثم توضع في أنبوب اختبار سعة 105 مل ونضيف 500ميكروليتر من محلول فينول- كلوروفورم (1:1) ثم نقوم بعملية التثفيل.

ثانياً-عملية الفصل:

تعتمد هذه المرحلة بشكل أساسي على الاختلاف في الخصائص الفيزيائية بين الأحماض النووية والبروتينات من حيث:

1- الانحلالية
2- الحجم الذي يشغله كل منهما
3- حساسية كل منهما للأنزيمات

الأحماض النووية منحلة (محبة للماء) بينما البروتينات تحوي أحماض أمينية كارهة للماء بالتالي انحلاليتها في الماء منخفضة وتنحل بشكل جزئي في المحاليل العضوية.

بعد الحصول على المزيج المؤلف من المادة النباتية، محلول الاستخلاص، فينول- كلوروفورم، نقوم برج العينة مع بعضها البعض ثم نجري عملية الطرد المركزي (التثفيل) على درجة حرارة (C°4) وسرعة 7500 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق نلاحظ تشكل طبقة علوية (الطور المائي) يحتوي على الأحماض النووية حيث أن هذه الأحماض النووية محبة للماء وتتحلل فيه ويكون لون هذا الطور مائل للصفرة أو شفاف، طبقة سفلية (الطور الفينولي) تحوي البقايا النباتية ولونه أخضر غامق تتوضع البروتينات مع الفينول وتتجمع في السطح البيني، لأن البروتين يحوي بقايا كارهة للماء ولها خاصية الانحلال في المواد العضوية.

نكرر إضافة فينول- كلوروفورم عدة مرات وتفصل الطبقة المائية العلوية من المستحلب الحاوية على الأحماض باستخدام ماصة حيث يتم ترسيبها.

ثالثاً- مرحلة الترسيب (على شكل مادة ليفية بيضاء)

يتم ترسيب الأحماض النووية (DNA) بإحدى الطريقتين:

1- إضافة الإيزوبروبانول
2- إضافة الكحول+ أسيتات الصوديوم

لكن تعتبر طريقة الترسيب بالإيزوبروبانول أكثر نقاوة من الترسيب بالكحول لعدة أسباب منها:

1- الكحول سريع التطاير على عكس الإيزوبروبانول الأقل تطايراً
2- الكحول يرسب مع (DNA) بروتينات في حين الإيزوبروبانول يرسب (DNA) بشكل نقي
3- الكحول يرسب فقط الجزيئات الكبيرة من (DNA) ولا يرسب القطع الصغيرة في حين أن الإيزوبروبانول يرسب الجزيئات الكبيرة والصغيرة
4- بالإضافة إلى أن أسيتات الصوديوم عبارة عن ملح تعمل على تقطيع الروابط الهيدروجينية بين الأسس النكليوتيدية.

ترسيب (RNA) يتم بواسطة كلور الليتيوم وهذه الطريقة :

1- تعتبر طريقة خاصة نوعية لترسيب (RNA) ولا تفيد في (DNA) والبروتين
2- تعطي (RNA) عالي النقاوة مفيد في عملية النسخ العكسي

رسابة الحموض النووية تغسل بالإيتانول (70%) لإزالة الأملاح ومن ثم تجفف ،ويضاف إلى الحموض النووية محلول (TE) أو الماء وتحفظ في الثلاجة بدرجة حرارة (– 20 C°).

وظائف المواد الكيميائية المضافة:

محلول (Tris): يحافظ على PH بين (8_10) لأنه إذا انخفض عن 8 فإن الحمض النووي ينحل ضمن الطور الفينولي، إذا زاد عن 10 فإن الروابط الهيدروجينية تتكسر وبالتالي تتباعد سلسلتي (DNA) عن بعضهما

حمض إيثلين داي أمين تيترا أسيتات (EDTA): أثناء تحضير (DNA) يوجد أنزيم يسمى (DNAase) يقوم بهضم الكمية القليلة من (DNA) وبالتالي فإن هذه المادة تثبط عمل هذا الأنزيم من خلال إزالة شوارد المغنزيوم التي تدخل في تركيب الجدر الخلوية وبالتالي خلخلة هذه الجدر ولأن أنزيم (DNAase) يحتاج شوارد المغنزيوم للقيام بعمله.

سلفات دودسيل الصوديوم (SDS):

1- يثبط عمل (DNAase)
2- يشحن جميع الأحماض الأمينية الموجودة ضمن البروتينات بشحنة سالبة (حيث تبقى الأحماض المشحونة بشحنة سالبة محتفظة بشحنتها وتتحول الأحماض الأمينية الموجبة إلى سالبة.
3- يفرق تحت الوحدات المرتبطة مع بعضها لتشكل البروتين
4- تخريب البروتينات الأخرى الموجودة بالخلايا
5- حل اللبيدات الموجودة في الأغشية الخلوية

محلول فينول ـ كلوروفورم :للتخلص من البروتينات الفينول يقوم بإزالة اللبيدات وبقايا الخلية ،الكلوروفورم يزيل الفينول

(β-mercaptiethanol) يقوم بتكسير الروابط الكبريتية

ملاحظة: خلال مراحل استخلاص (DNA) حتى نحافظ على الروابط الهيدروجينية بين السلسلتين يجب أن يوجد ضمن محلول الاستخلاص مادة تمنع تكسير الروابط الهيدروجينية وهي (Nacl)

انتهت الجلسة