أستخلاص الحمض النووي DNA

استخلاص الحمض النووي هو أولى المراحل المعملية في تحليل البصمة الوراثية، وأهمها لما تتميز به هذه المرحلة من القدرة على التعامل المباشر مع عينات الآثار البيولوجية المرفوعة من مسرح الجريمة، حيث إن هذه العينات لها طبيعة متغيرة تتميز بوجود تلوثات بيئية متعددة ملتصقة بالعينة، فضلاً عن مكوث العينة لفترات زمنية متفاوتة بدون حفظها بالطريقة المثلى للحفاظ على الحمض النووي بداخلها، مما يعرض المكونات الحيوية للعينة للفساد، وقد يؤثر ذلك سلباً على سلامة الحمض النووي .لذلك فإن الاستخلاص مهمته تنقية الآثار البيولوجية من كل ما قد يؤثر على سلامة الحمض النووي وكذلك عزل الحمض النووي عن باقي مكونات الخلية لإمكان التعامل معه بعد ذلك.

توجد العديد من الطرق المعملية المختلفة لاستخلاص الحمض النووي من داخل أنوية الخلايا البشرية .تعتمد كل طريقة من طرق الاستخلاص على مبدأ علمي معين **Scientific Principle**في استخلاص الحمض النووي، وكذلك طريقة عملية ذات خطوات محددة لتنفيذ هذا المبدأ العلمي، بهدف استخلاص مادة الحمض النووي DNA من العينة البيولوجية وعزلها عن باقي مكونات الخلية في صورة نقية .فيما يلي، سيتم شرح المبدأ العلمي، والخطوات العملية لأشهر وأنجح طرق استخلاص الحمض النووي وأكثرها تطبيقاً في المجالات الطبية الشرعية والجنائية وهي:

١- الاستخلاص العضوي للحمض النووي **Organic DNA extraction** t
٢- استخلاص الحمض النووي بواسطة كواشف **Qiagen DNA extraction Kit**
٣- استخلاص الحمض النووي بواسطة بطاقات FTA.

الاستخلاص العضوي للحمض النووي Organic DNA extraction

المبدأ العلمي

تحتوي طرق استخلاص الحمض النووي عادةَ على آليات ميكانيكية و/أو كيميائية يتم من خلالها تكسير جُدُر الخلايا واستخراج محتويات الخلية للحصول على الحمض النووي .هذا الأمر يكون سهلاً في حالة التعامل مع عينات تحتوي على وفرة من الخلايا، بينما يتطلب الأمر حرصاً شديداً في حال التعامل مع العينات المرفوعة من مسرح الحادث لاحتوائها على أعداد ضئيلة من الخلايا إلى جانب احتمال تعرضها للتعفن ومن ثم وجود الحمض النووي في حالة غير سليمة .

الطريقة العضوية لاستخلاص الحمض النووي هي إحدى الطرق التقليدية التي تَستخدم الكيماويات العضوية لعزل مادة الحمض النووي،ويمكن إجمال خطوات العمل بهذه الطريقة في أربع خطوات هي:

1- إذابة المواد البيولوجية الموجودة بالأثر المرفوع من مسرح الحادث.

2- فصل المواد البروتينية عن مادة الحمض النووي وتميؤها.

3 -إزالة البروتينات التي تم فصلها في محلول الاستخلاص.

4 -تنقية الحمض النووي.

أهم المواد الكيمياوية المستخدمة في هذا النوع من الأستخلاص هي :

EDTA : تمنع إنزيمات) nucleases (من تكسير الحمض النووي عن طريق اتحاد جزيئاتها مع أيونات الماغنيسيوم ثنائية التكافؤ) Mg^{+2} (التي تُشكل عاملاً مساعداً لتلك الإنزيمات.

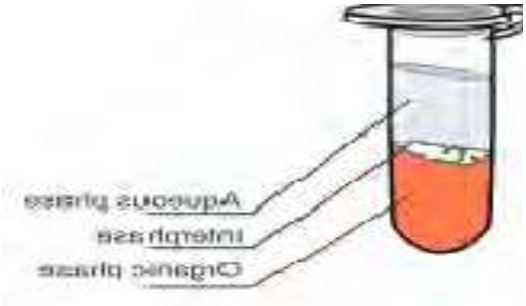
Tris–HCL : تتفاعل مع جزيئات) Lypopolysaccharides (الموجودة على الجدارالخارجي للخلايا مما يجعلها تتميز بخاصية النفاذية، وتزيد هذه الخاصية من معدل دخول EDTA إلى داخل الخلية.

Nacl : يوجد بتركيز معين لضمان أن البروتينات والملوثات المحتمل وجودها في العينات قد تم فصلها في الوسط العضوي بمعزل عن الحمض النووي الموجود في الوسط المائي، ويشترك معه في هذه الوظيفة تركيز pH.

SDS : تعمل جزيئاته على تحلل جدر الخلايا، فصل بروتينات الهستون Histone proteinsعن جزيئات الحمض النووي المصاحبة لها في التكوين الكروموسومي، ثم إبدال طبيعة بروتينات الهستون))Denaturation، وتحطيم المكونات الثانوية للبروتينات مما يُقلل مقدرتها على الذوبان والبقاء في الوسط المائي.

Proteinase K : يعمل تحلل بروتينات الهستون، وهو الأفضل للاستخدام في عملية الاستخلاص لأنه يعمل بنشاط في وجود مدى واسع من تركيز أيونات الهيدروجين pH: 4–12.5، كما يعمل بنشاط في وجود SDS ، ولا يتأثر سلباً بوجودEDTA.

في الخطوة الثالثة يتم إزالة البروتينات التي تم تميؤها عن طريق إضافة خليط (الفينول، الكلوروفورم، كحول الأيزو أميل)



يعمل **الفينول** (**Phenol**)على تغيير طبيعة البروتينات Protein (Denaturation)

من خلال تحويل التركيب الر**باعي** أو التركيب الثلاثي أو التركيب الثانوي الي تركيب بسيط يتألف من سلاسل الأحماض الأمينية .وبما أن الفينول غير قابل للاختلاط بالماء، فإنه يقوم بعزل جزيئات البروتين بعد تغيير طبيعتها في الوسط العضوي .وفي أثناء هذه العملية، تبقى جزيئات الحمض النووي في الوسط المائي في حالتها المزدوجة Doubl strand DNA.

أما الكلوروفورم (Chloroform فهو سائل عديم اللون يتميز بالذوبان القليل في الماء ولكنه يختلط بالمذيبات العضوية مثل الفينول.كما يتميز بأنه أعلى كثافة من الماء وأقل كثافة من الفينول ولذلك فإنه يعمل على تكوين سطح بيني واضح بين الوسط المائي الذي يحتوي على الحمض النووي والوسط العضوي الذي يحتوي على البروتينات المفصولة المرتبطة بجزيئات الفينول .هذا بالإضافة إلى أن الكلوروفورم يستطيع إذابة دهون الخلية.

أما كحول الأيزو أميل Isoamyl Alcohol فهو عادةً ما يوجد في عملية استخلاص الحمض النووي بغرض منع تكوين الرغوة الكثيفة الناتجة عن استخدام الفينول، فهو يُساعد في سهولة الكشف عن السطح البيني المُتَكَون بين الوسطين

المائيوالعضوي، ولذلك فهو يُضاف بكميات ضئيلة بالمقارنة بالكواشف الكيميائية الأخرى.

في الخطوة الأخيرة من الاستخلاص العضوي، يتم ترسيب الحمض النووي DNA من الوسط المائي الموجود به، عن طريق الترسيب بالكحول الإثيلي Ethanol Precipitation

أهم مميزات طريقة الأستخلاص بالمذيبات العضوية كونها الطريقة المثلى للتعامل مع العينات
الجنائية التي تحتوي على كمية ضئيلة من الحمض النووي و/أو التي تحتوي على جزيئات حمض نووي غير سليمة بفعل التعفن أو الحريق.فضلا عن كونها تعد غير مكلفة **أما بالنسبة لأهم مضارها** تحتوي على العديد من المخاطر من جراء استخدام الكواشف الكيميائية المُضِرة
بصحة الإنسان ضرر بليغ، لذلك يجب إتباع أقصى عوامل الأمان عند العمل بها.
بالأضافة الي انها تعد معقدة، حيث تُستخدم فيها عدد كبير من الخطوات .

٢- استخلاص الحمض النووي باستخدام كواشف QIAGEN DNA Extraction
المبدأ العلمي

لقد أحدثت تقنيات استخلاص الحمض النووي باستخدام كواشف QIAGENنقلة نوعية في كيفية الحصول على حمض نووي عالي النقاوة من جميع الآثارالبيولوجية حتى المفتقرة منها للحمض النووي بحالة جيدة، وبدون استخدام مواد كيماوية شديدة الخطورة .تَستخدم تقنيات الاستخلاص باستخدام كواشف QIAGEN أحد المبادئ العلمية للفصل التي تسمى فصل الأيونات السالبة بمساعدة الوسط الصلب Solid)

phase) anion exchange chromatography يتم ذلك بمساعدة راتنج QIAGEN، وهوراتنج مسامي يرتكز على قاعدة من السيليكا (SiO_2) ، ويمتلك كثافة عالية من مجموعات ثنائي إيثيل أمينو إيثيل Diethylaminoethyl groups (DEAE)التي تم تصميمها خصيصاً بغرض عزل الأحماض النووية.

تتم عملية استخلاص وتنقية الحمض النووي باستخدام كواشف QIAGENعلى أساس التفاعل بين مجموعات الفوسفات السالبة المكونة للعمود الفقري للدنا، ومجموعات (DEAE)الموجبة، الموجودة على سطح راتنج(QIAGEN) .

يحتوي راتنج QIAGEN على خرزات من السيليكا (Silica beads) لها حجم محدد، وسطحها له طلاء كيميائي محب للماء، مما يجعل هناك ازدواج كثيف بين هذه القاعدة من السيليكا ومجموعات(DEAE) الأمر الذي يؤدي إلى انتقاء راتنج QIAGENللأحماض النووية دون غيرها من جزيئات البروتين، السكر، ...إلخ.

تتكون طريقة فصل وتنقية الحمض النووي باستخدام كواشف QIAGEN من أربع خطوات أساسية هي:

1-التحلل :تحلل العينات وتحرير جزيئات الحمض النووي.

2-الارتباط :ارتباط جزيئات الحمض النووي المُحررة بمرشح عمود الفصل

3-الغسل :غسل مرشح عمود الفصل.

4-الإزالة :إزالة الحمض النووي المستخلص والمحتجز في مرشح عمود الفصل .

الخطوة الأولى :التحلل:

يتم تحلل عينات الآثار البيولوجية تحت ظروف درجات حرارة عالية وبمساعدة كل من إنزيم البروتييز Qiagen Protease ، والمحلول المنظم (Buffer ATL)واللذان يعملان على تحلل جدار ومكونات الخلايا.

الخطوة الثانية :ارتباط الحمض النووي المحرر بمرشح عمود الفصل:

يتم إضافة المحلول المنظم) Buffer AL (إلى سائل الاستخلاص لضمان ارتباط جيد للحمض النووي بمرشح عمود الفصل .حيث يتم امتزاز الحمض النووي Adsorptionعلى مرشح السيليكا silica gel membrane عقب إجراء الطرد المركزي .

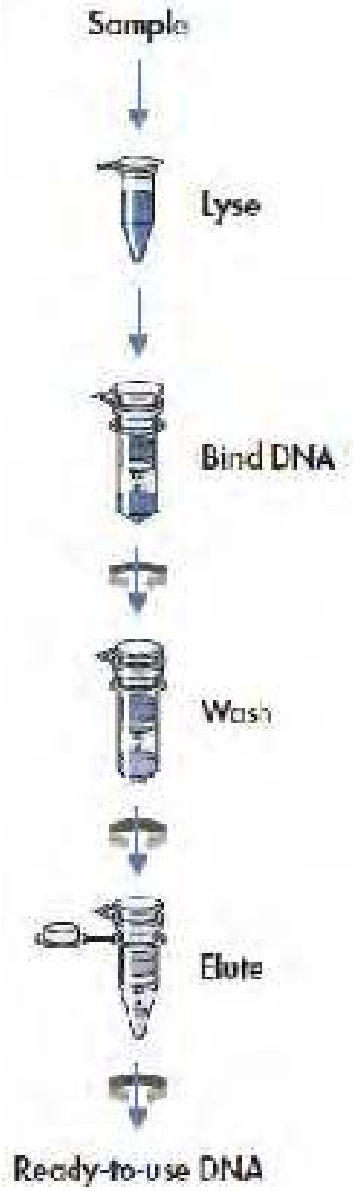
الامتزاز (Adsorption) : هي عملية التصاق الذرات، الأيونات، أوالجزيئات الحيوية التابعة لغاز، سائل، أو المواد الصلبة المُذَوَّبة، إلى سطح معين .هذه العملية ينتج عنها تكوين طبقة من المادة الممتَزة (Adsorbate) التي تتمثل في الذرات أو الأيونات أو الجزيئات الحيوية،(مثال :جزيئات الحمض النووي) DNA على سطح الامتزاز (Adsorbent) الذي يتمثل في مُرشح عمود الفصل.

الخطوة الثالثة :غسل الملوثات ومكونات الخلايا

بعد احتجاز جزيئات الحمض النووي في مرشحات الفصل، يتم غسل المرشح من الملوثات والمكونات الأخرى الناتجة عن عملية التحلل، حيث يحدث ذلك بإضافة كل من المحلول المنظم(Buffer AW1) (Buffer AW2) .

الخطوة الرابعة :إزالة الحمض النووي المستخلص

تتم إزالة الحمض النووي المستخلص في الخطوة الأخيرة، والعالق بمرشح عمود الفصل بمساعدة كمية قليلة من) Buffer AE (أو الماء منزوع الأيونات للحصول على تركيز عال من جزيئات الدنا.



خطوات فصل وتنقية الحمض النووي باستخدام

استخلاص الحمض النووي بواسطة بطاقات FTA

FTA DNA Extraction

المبدأ العلمي

يَرجع استخدام بطاقات FTA للثمانينيات من القرن الماضي عندما اخترعها العالمان؛ Burgoyne و Fowler في جامعةFlinders في أستراليا .كان الهدف من ابتكار هذه البطاقات هو إمكانية حفظ عينات الحمض النووي لفترات زمنية طويلة، وحماية الحمض النووي من التكسير والتحلل بفعل إنزيمات النيوكلييز Nucleases . ترجع تسمية تكنولوجيا بطاقات FTA إلى العبارة الإنجليزية Fast : Technology for Analysis of nucleic acids«، وتعني» التقنية السريعة لفحص الحمض النووي وتعتمد التقنية على المعالجة الكيميائية لورق الترشيح بإضافة مادة قاعدية ضعيفة Weak Base، عامل مُكَلب Chelating Agent ، مادة مُذيبة Detergent، وحمض Uric Acid إليه .بحيث تُضاف عينة الحمض النووي إلى ورق الترشيح المعالج لحفظها لمدة طويلة، وحماية الحمض النووي بداخلها من التحلل,تلتصق العينات البيولوجية مثل الدم أو اللعاب، إلى ورق الترشيح المعالَج من خلال آلية التشابك في حين أن خليط الكيماويات المحمل على البطاقة يعمل على تحلل جُدُر الخلايا وجُدُر الأنوية وتحلل جزيئات البروتين(مثال :بروتينات الهستون المرتبطة بالكروموسومات)، وإبطال نشاط إنزيمات البروتييز .إذاً فعندما يتم وضع العينة على بطاقة FTA، يتم تحرر مادة الحمض النووي خارج الخلايا، والحفاظ عليها في

صورة مستقرة .تتميز عينات الحمض النووي المخزنة على بطاقاتFTA بالحفاظ على الحمض النووي بداخلها من التكسير، بفعل إنزيمات البروتييز، الأكسدة، التكسير بفعل الأشعة فوق بنفسجية، أو بفعل الميكروبات أوالفطريات.

يُمكن أن نُجمل مميزات العمل بتقنية بطاقات FTA في النقاط التالية:

1-تلتقط الحمض النووي من الخلايا، وتحتفظ به في خطوة واحدة.

2-الحمض النووي المحفوظ عليها يكون جاهزاً لخطوات التحليل اللاحقة(مثل التكثير)بعد أقل من 30 دقيقة.

3-يتم حفظ الحمض النووي بها لسنوات عديدة، وفي درجة حرارة الغرفة العادية.

4-يوجد أنواع من بطاقات FTA تأخذ ألواناً مختلفة عند وضع العينة عليها، لسهولة التعامل مع العينات ذات اللون الشفاف(مثال:عينات اللعاب)

أما بالنسبة للبصمة الوراثية تحديداً، فتُستخدم بطاقات FTA في الأغراض الآتية:

1-تجميع عينات قواعد البيانات.

2-تجميع عينات من المشتبه بهم في القضايا الجنائية.

3-تجميع عينات من الأطراف المختلفة في قضايا أثبات الأبوة والنسب .

4- تجميع العينات من أقارب الضحايا في الحوادث الإرهابية أوالكوارث الجماعية للاستعراف على هوياتهم.

بطاقات FTA

FT89436601
Place Bar Code Here