مختبر ٤

استخلاص الحامض النووي الرايبوزي RNA بواسطة الكت في الدم

Total RNA Mini Kit (Blood/cultured cells)

مقدمة:-

الحامض النووي الرايبوزي RNA هو من الجزيئات المتعددة الوحات Polymeric molecule والذي يساهم في العديد من الفعاليات الحيوية مثل التشفير coding وتنظيم عمل الجينات والسيطرة على عملية التعبير عنها gene regulation and expression.

- **تركيب الـ RNA:-**

يتواجد الـ RNA في الخلايا عادة بشكل خيط منفرد single strand منطوي على نفسه. يتكون من وحات صغيرة متعددة هي النيوكليوتيدات والتي بدورها تتألف من سكر خماسي Ribose يرتبط مع مجموعة فوسفات ذات شحنة سالبة في ذرة الكاربون رقم 3 من السكر الخماسي وقاعدة نتروجينية في كاربون رقم 1 . تود مجموعة هيدروكسيل مرتبطة مع ذرة الكاربون رقم 2 مما يجعل جزيئة الـ RNA أكثر عرضة للتحلل بسبب عملية الـ hydrolysis.

- **مقارنة بين تركيب كل من الـ DNA & RNA :-**

١- بعكس الـ DNA (double strand) ، RNA يتواجد في العديد من أدواره الحيوية بشكل جزيئة أحادية الخيط single stranded molecule ويمتلك سلسلة نيوكليوتيدية أقصر من الـ DNA ، الا أن الـ RNA يكون intra- strand double helixes من خلال عملية ازدواج القواعد المكملة complimentary base pairing كما هو الحال في tRNA.

٢- يحتوي الـ DNA على سكر منقوص الاوكسجين deoxyribose (السكر لايحتوي على مجموعة هيدروكسيل مرتبطة مع ذرة الكاربون رقم 2) بينما يمتلك الـ RNA سكر خماسي رايبوزي Ribose. امتلاك مجموعة الهيدروكسيل يجعل الـ RNA أكثر عرضة للتحلل المائي hydrolysis.

٣- القاعدة النتروجينية المكملة لـ A في الـ DNA هي T بينما تستبدل بالـ U في الـ RNA.

أنواع جزيئات الـ RNA:-

١- mRNA.
٢- tRNA.
٣- rRNA.
٤- Non-coding RNA.

- يتم تصنيع mRNA من الـ DNA بعملية الاستنساخ Transcription لذا فانه يحمل المعلومات الوراثية الخاصة بتخليق البروتينات في الخلية. في الخلايا حقيقية النواة eukaryotic cell، بمجرد أن

تتم عملية استنساخ الـ precursor RNA (pre-mRNA) من الـ DNA، تتم معالجته الى mature mRNA بازالة الـ introns (التتابعات غير المشفرة الموجودة ضمن تركيب pre-mRNA).

- يتم نقل mRNA من النواة الى السايتوبلازم وبالتحديد الى الرايبوسومات كي تتم عملية الترجمة translation الى البروتينات المعنية بمساعدة tRNA الذي يعمل على اضافة الأحماض الأمينية واحا تلو الآخر الى سلسلة البروتين المخلق.
- في الخلايا بدائية النواة prokaryotic cells ولانها لاتمتلك تركيب نووي مميز ، يتم ارتباط الـ mRNA بالرايبوسومات اثناء عملية استنساخه من الـ DNA.

الجزء العملي:-

Total RNA Mini Kit (Blood/cultured cells)

صمم هذا اكت لاستخلاص وتنقية الـ RNA الكلي من خلايا الدم والخلايا المزروعة والخلايا البكتيرية. المحاليل Detergents وملح chaotropic salt (هي الاملاح التي لها القدرة على التداخل مع الأواصر الهيدروجينية والثلاثية اي انها تؤثر على تركيب الجزيئات المتعددة الوحات مثل البروتينات والأحماض النووية. مثال: ايثانول الفينول واليوريا) المستخدمة تعمل على تحليل الخلايا وتثبيط عمل انزيم الـ RNase (بالاضافة الى خطوة نهائية اختيارية وهي المعاملة بانزيم DNase لازالة بقايا الـ DNA). وجود الـ RNA في أملاح chaotropic salt يجعله أكثر قابلية للارتباط بألياف الزجاج الداخلة ضمن تركيب عمود الفصل spin column ، أما الشوائب فيتم التخلص منه بغسل عمود الفصل بمحلول الغسل wash buffer. يتم اذابة الـ RNA المنقى في النهاية باستعمال ماء مقطر خالي من انزيم الـ RNA (RNase- free water) . عملية التنقية باستعمال الكت تستغرق 30 دقيقة والـ RNA المنقى يمكن استخدامه في التجارب التالية:

RT-PCR Northen blotting primer extension , mRNA selection and cDNA synthesis.

الخطوات اللازم اتباعها لتقليل التلوث بانزيم الـ RNase:-

١- يجب ارتداء الصدرية والكفوف اثناء العمل.
٢- كل الأدوات المستخدمة والماصات الأوتوماتيكية يجب أن تكون معقمة (Rnase-Free).

- **الخطوة الاختيارية لازالة بقايا الـ DNA:**

في الخطوة الأولى: تضاف 100 مايكروليتر من انزيم DNase I (المحضر في محلول يتكون من :

50 mM Tris-HCl (Ph=7.5), 10 mM $MnCl^2$, 50 ug/ml BSA at 25^oC)

الى منتصف عمود الـ RB column يترك في حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق ثم ننقل الى عملية الغسل في خطوة رقم 4.

طريقة العمل:-

١- تحليل خلايا الدم الحمراء وجمع الخلايا RBC lysis and Cell harvesting:

- اجمع دم انسان في أنبوب مانع للتخثر (RNase-Free) anti-coagulant-treated collectiontibe.
- اضف 1 مل من الـ RBC lysis buffer الى انبوب ابندورف 1.5 ml eppendorf tube (RNase-Free).
- اضف 300 µl من دم الانسان و امزج العينة بالتقليب.
- احضن العينات على الثلج لمدة 10 دقائق (رج العينة بشكل متقطع ولفترات قليلة اثناء الحضن في الثلج).
- ضع العينات في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق وعلى درجة حرارة 4°C و 3000 xg.
- اهمل الراشح بشكل تام ثم أعد تعليق الراسب (الخلايا البيضاء) باستخدام 100 µl of RBC lysis buffer بواسطة المايكروبايبيت.

٢- تحليل الخلايا:-

- اضف 400 µl of RB buffer و 4µl of b-mercaptoethanol الى الخلايا المعاد تعليقها من الخطوة رقم 1 ورج العينة بشكل قوي vortex.
- احضن العينات في درجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.

٣- تنقية RNA (RNA binding):

- أضف 400 µl of 70% ethanol محضر في ماء مقطر خالي من انزيمي الـ RNase ، DNase الى العينة التي تم تحليلها في الخطوة رقم 2 مع الرج بشكل قوي vortex مع تكسير أي راسب متبقي بواسطة البابيبيت.
- ضع الـ RB column في أنابيب جمع العينات collection tube.
- انقل 500 µl من المحلول السابق الى RB column.
- ضع العينات في جهاز الطرد المركزي 14000-16000 xg for 1 min.
- اهمل المحلول المترشح خلال العمود وانقل ماتبقى من الخليط السابق الى نفس عمود الفصل.
- اطرد العينات مركزيا لمدة دقيقة واحدة 14000-16000 xg.
- اهمل المحلول المترشح خلال العمود ثم انقل عمود الفصل الى انبوب جمع العينات آخر نظيف.
- خطوة اختيارية: تحطيم ماتبقى من الـ DNA (انظر الملاحظة المذكورة أعلاه).

٤- مرحلة الغسل:-

- اضف 400 µl of W1 buffer الى RB column.
- ضع العينات في جهاز الطرد المركزي لمدة 30 ثانية 14000-16000xg.
- اهمل المحلول المترشح خلال العمود ثم انقل RB column الى انبوب جمع العينات.
- اضف 600 µl of Wash buffer.

- اطرد العينات مركزيا 14000-16000 xg لمدة 30 ثانية.
- اهمل الراشح ثم أعد عمود الفصل الى أنبوب جمع العينات.
- اضف 600 µl of Wash buffer.
- اطرد العينات مركزيا 14000-16000 xg لمدة 30 ثانية.
- اهمل الراشح ثم أعد عمود الفصل الى أنبوب جمع العينات.
- جفف عمود الفصل بالطرد المركزي 14000-16000 xg لمدة 3 دقائق.

٥- اذابة الـ RNA:

- ضع عمود الفصل الذي تم تجفيفه في الخطوة السابقة في أنبوب ابندورف (RNase-free).
- اضف 50 µl of RNase-free water في منتصف عمود الفصل.
- اترك الأنبوب لمدة 1 دقيقة لضمان ان RNase-Free water قد تم امتصاصه من قبل الفلتر المستخدم في عمود الفصل.
- اطرد العينات مركزيا 14000-16000 xg لمدة 1 دقيقة لتجميع الـ RNA المتبقي.
- خطوة اختيارية 2: تحطيم بقايا الـ DNA كما هو مذكور أعلاه.