المختبر الرابع :عزل الـ DNA من عينات الدم

يعتبر الدم من النماذج الاكثر شيوعا في ابحاث البيولوجيا الجزيئية كمصدر للحصول على كمية جيدة وبنقاوة عالية من الـ DNA، وذلك لسهولة سحب العينات واحتوائها على كم كبير من خلايا الدم البيض بالرغم من وجود كمية كبيرة من كريات الدم الحمرالتي تحتاج الى معاملة اولية للتخلص منها.

الهدف من التجربة: استخلاص الـ DNA من الدم.

طريقة العمل:

- تحضير المحاليل الكيميائية

اولاً: محلول تحليل كريات الدم الحمراء R.B.Cs Lysis buffer

| (0.01M Tris-HCL, pH 7.4, 320 mM sucrose, 100mM MgCl2, 1% Triton X-100).

يحضر 100 مل منه بوزن 0.157 غم من مادة Tris-HCL ، ووزن 10.59 غرام من مادة Sucrose ووزن 0.952 من $Mgcl_2$ و ا مل من مادة Triton X−100 توضع سويتا" في دورق الزجاجي ثم يضاف إليها 80 مل من الماء المقطر، تحرك بشكل جيد لغرض إذابة مكونات المحلول ثم يعدل ال pH إلى (8) ويكمل حجم المحلول الى (100 مل) باستخدام الماء المقطر، ثم يحفظ 4 م.

ثانياً: محلول تكسير محتويات الخلية: Cell Lysis Solution

0.01M Tris-HC1, 114 mM sodium citrate, 100 mM Na2EDTA, 1 % (SDS).

يحضر 100مل منه بوزن 0.157 غم من مادة Tris-Hcl ، و3.73 غم من مادة Na2EDTA و3.35 غم مادة sodium citrate و1 غرام من مادة SDS توضع سوية في الدورق الزجاجي ثم يضاف إليها 80 ملى الماء المقطر، تحرك بشكل جيد لغرض إذابة مكونات المحلول ثم يعدل ال pH إلى (8) ويكمل حجم المحلول الى الحجم النهائي (100 مل) باستخدام الماء المقطر، يعقم المحلول بالموصدة Autoclave عند درجة حرارة ١٢١هم وتحت ضغط 1.5 جو ولمدة 15 دقيقة ثم يحفظ بدرجة حرارة 4 مئوية.

ثالثاً: ايثانول 70%:

يحضر 100 مل منه بمزج 70 مل من الايثانول المطلق و 30 مل من الماء المقطر في قنينة مظلمه، يحفظ المحلول بدرجة حرارة 4 م لحين الاستعمال.

رابعاً: ايثانول 100%:

خامساً: كلوريد الصوديوم 5.3 مولاري.

يحضر من اذابة 7.74 غم من كلوريد الصوديوم في 25 مل من الماء المقطر.

سادساً : كلوروفورم

سابعاً : أمونيوم أسيتيت 7.5 مولاري :

يحضر بإذابة 5.8 غم من الامونيوم استيت في 10 مل من الماء المقطر ثم يمزج بشكل جيد .

ثامناً: المحلول الملحي Normal Saline :

يحضر بإذابة 0.9 غم ان كلوريد الصوديوم في 100 مل من الماء المقطر ثم يمزج بشكل جيد.

- جمع العينات : يتم جمع العينات عن طريق سحب 2 مل من الدم الوريدي ثم تحفظ بانابيت اختبار سعة 5مل حاوية على مادة EDTA ثم تقلب الانابيب جيدا ليتم المزج لمدة 5 دقائق، بعد ذلك تحفظ الانابيب في الثلاجة لمدة قصيرة او بالتجميد لفترات طويلة لحين الاستخلاص.
- خطوات عملية الاستخلاص:

اولا: تحليل كريات الدم الحمراء :

1. سحب 250 µL من الدم ووضعها في انبوبة حجمها 1.5مل ثم يضاف اليها **1000 µ** من محلول تحليل كريات الدم الحمر (كمية المحلول المضافة تمثل ثلاث الى اربع اضعاف حجم الدم).
2. توضع الأنابيب على جهاز ال shaker لمدة اربعة دقائق لغرض المزج وتحليل كريات الدم الحمراء.
3. يتم طرد المركزي للانابيب على سرعة 14000 rpm لمدة 3 دقائق.

4. يتم التخلص من الرائق مع الاحتفاظ بالراسب ثم يضاف **500 µL** من محلول تحليل كريات الدم الحمراء ومزج الراسب باستخدام الماصة الدقيقة ثم المازج (Vortex) لمدة دقيقة الى أن يتم تفتيت الراسب.

5. يجرى الطرد المركزي للانابيب على سرعة 14000 rpm لمدة 2 دقائق.

6. يتم التخلص من الرائق ثم يضاف **600 µL** من المحلول الملحي ومزج الراسب باستخدام الماصة الدقيقة ثم المازج (Vortex) لمدة دقيقة إلى أن يتم تفتيت الراسب.

7. يتم الطرد المركزي للأنابيب على سرعة 14000 rpm ولمدة دقيقتين، تكرر الخطوات السابقة إلى أن تحصل على راسب ابيض (صافي) يمثل كريات الدم البيضاء الخالية من بقايا الهيموغلوبين.

ثانيا : تحليل الخلايا (تحليل الراسب الخلوي)

1. اضف **500 µL** من محلول تحليل مكونات الخلية (الموضوع سابقا في الحمام الماني) و امزج الراسب باستخدام الماصة الدقيقة ثم المازج (Vortex) لمدة دقيقة الى ان يتم تفتيت الراسب ويصبح المحلول رائقا، ضع الانابيب في حمام مائي على درجة 65 م لمدة 20 دقيقة مع تحريكها بالتقليب بين الحين والأخر (كل5 دقائق).

2. بعدها تترك الانابيب لمدة 3 الى 5 دقائق لتكتسب درجة حرارة الغرفة.

3. اضف **100 µL** مايكرو ليتر من محلول NaCl ثم امزج الأنابيب بالتقليب ثم أضف **600 µL** من الكلوروفورم وانقل الانابيب الى جهاز الهزاز Shaker لتمزج برفق لمدة دقيقتين ثم تمزج بقوة لمدة 3 دقيقة.

4. تطرد الانابيب مركزيا بسرعة 14000 rpm لمدة 5 دقائق.

ثالثا" : ترسيب الى DNA:

1. انقل حوالي **500 µL** مايكروليتر من الطبقة الثانية العليا الى انبوبة أبندروف جديدة.

2. اضيف نفس حجم المنقول (**500 µL**) من Isopropanol المبرد و **50 µL** من محلول الأمونيوم استيت واتركه لمدة 6-4 دقائق ثم قلبت الانابيب بهدوء إلى الأعلى والأسفل لترسيب الدنا.

3. اجري طرد مركزي للأنابيب على بسرعة 14000 rpm ولمدة 5 دقائق على درجة حرارة 4 م.

4. نغسل الراسب باضافة **500 µL** من الكحول الإثيلي ٧٠% وطرد مركزي على سرعة 14000 rpm ولمدة 5 دقائق بعدها تم تجفيف الراسب بترك الانابيب لمدة ساعة في الحاضنة على درجة حرارة ٣٧ او بتركها على درجة حرارة الغرفة الى ان يجف الايثانول.
5. اضيف **100 µL** من الماء المقطر المعقم إلى الدنا المستخلص لغرض الاذابة ثم وضعت الانابيب في الحمام الماني بدرجة حرارة 55 لمدة نصف ساعة أو لمدة ساعتين في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٧.
6. حفظت الانابيب بالتجميد لحين الاستعمال-