الجامعة	**الانبار**
الكلية	**التربية للبنات**
القسم	**علوم الحياة**
المرحلة	**الرابعة**
اسم المادة باللغة العربية	**البايولوجي الجزيئي**
اسم المادة باللغة الانكليزية	**Molecular biology**
اسم التدريسي	**م.م. نبأ قيس جميل**
عنوان المحاضرة باللغة العربية	**استخلاص DNA من عينة الدم**
عنوان المحاضرة باللغة الإنكليزية	**Extraction NDA from blood sample**
رقم المحاضرة	**3**
المصادر او المراجع	**Bergtrom, Gerald.Basic Cell and Molecular Microbiology and Molecular Biology Reviews**

استخلاص ال DNA من عينات الدم

يعتبر الدم من النماذج الأكثر شيوعا في ابحاث البيولوجيا الجزيئية كمصدر للحصول على كمية جيدة وبنقاوة عالية من ال 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 ال DNA من الدم.

طريقة العمل:

* تحضير المحاليل الكيميائية

اولاً: محلول تحليل كريات الدم الحمراء

R.B.Cs Lysis buffer

M Tris-HCL, pH 7.4, 320 mM sucrose, 100mM MgCI2, 1% Triton X-0.01) | .(100

يحضر 100 مل منه بوزن 0.157 غم من مادة Tris-HCL ، ووزن 10.59 غرام من مادة Sucrose ووزن 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

.(M Tris-HC1, 114 mM sodium citrate, 100 mM Na2EDTA, 1 % (SDS0.01

يحضر 100مل منه بوزن 0.157 غم من مادة Tris-Hcl ، و3.73 غم من مادة Na2EDTA و 3.35 غم مادة sodium citrate و 1 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 ١٢١ هم وتحت ضغط 1.5 جو ولمدة 15 دقيقة ثم يحفظ بدرجة حرارة 4 مئوية.

ثالثا: 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.

رابعا : 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 ML من الدم ووضعها في انبوبة حجمها 1.5مل ثم يضاف اليها 1000 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 µL 500 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 µLمن المحلول الملحي ومزج الراسب باستخدام الماصة الدقيقة ثم المازج لمدة دقيقة إلى أن يتم تفتيت الراستب

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 µL 500من محلول تحليل مكونات الخلية (الموضوع سابقا في الحمام الماني) وامزج 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 (كل 5 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 µL 500 مايكروليتر من الطبقة الثانية العليا الى انبوبة أبندروف جديدة.

2. اضيف نفس حجم المنقول (500 uL) من sopropanol المبرد و50 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 مL 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
لغرفة الى ان يجف الايثانول.

5. اضيف 100 مL من الماء المقطر المعقم إلى الدنا المستخلص لغرض الاذابة ثم وضعت الانابيب في الحمام لماني بدرجة حرارة 55 لمدة نصف ساعة أو لمدة ساعتين في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٧.

6. حفظت الانابيب بالتجميد لحين الاستعمال-