استخلاص الـمادة الوراثية من دم الانسان
Human Blood DNA Extraction

علم الوراثة الجزيئي العملي

قسم علوم الحياة - المرحلة الثالثة

المختبر السابع 2019-2020

د. هبة عباس جاسم

Reference المصادر

1- gSYNC™ DNA Extraction Kit : http://www.geneaid.com/sites/default/files/GS15_0.pdf

2- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. eds., 2012. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic press.

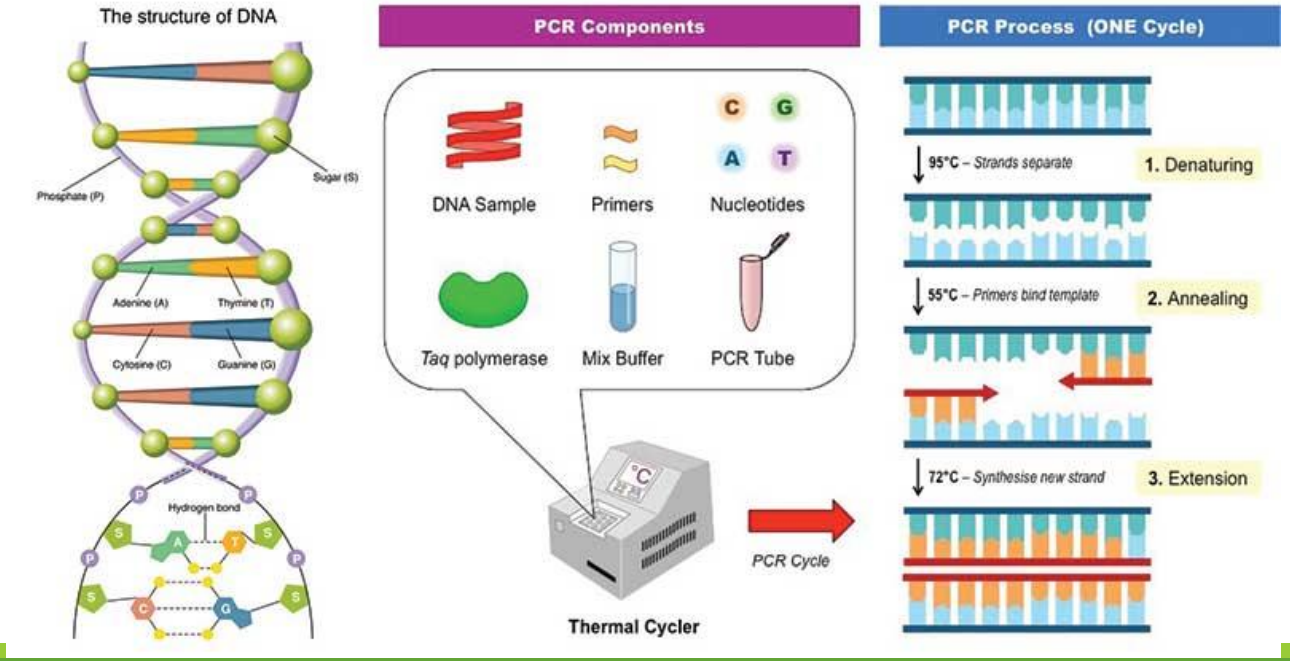
المادة الوراثية (الحمض النووي DNA)

يوجد الـDNA في جميع الخلايا التي تحتوي على نواة، ومن ثم فانه يتواجد في جميع المواد الحيوية .

ان اي دراسة وراثيه للكائنات الحيه تتطلب استخلاص (استخراج) جزيئة DNA نقية من العينة البيولوجية لغرض استخدامها في الدراسات الوراثية المختلفة لذلك فقد قام العلماء والباحثين بتطوير عدد من الطرق لاستخلاص الدنا تختلف في اسسها ومتطلباتها .

تفاعل البوليمراز المتسلسل
(PCR) Polymerase chain reaction

تهدف تقنية ال PCR الى تضخيم جزيئات قليلة من الحمض النووي DNA، بعد استخلاصه من خلايا او سوائل الجسم وبالتالي الحصول على كميات كبيرة منه بحيث يمكن اجراء التحليل عليها.



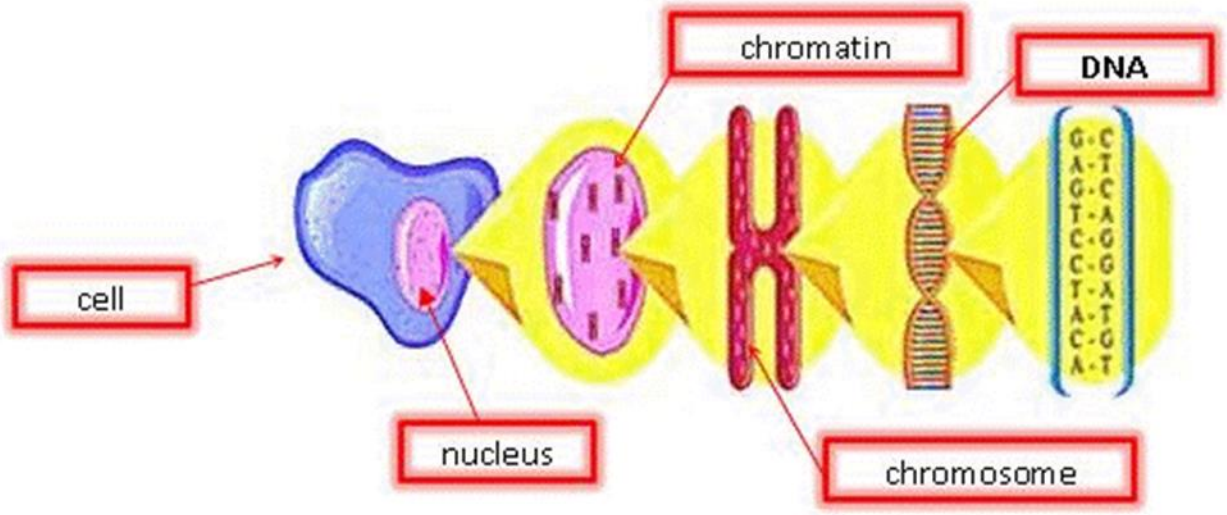
متطلبات تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل PCR Requirements

أولا: قالب الحمض النووي DNA template

للحصول على قالب الحمض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين DNA template من عينة الدم يجب المرور بمرحلة الاستخلاص. حيث تضاف بعض المواد للتخلص من الغشاء السايتوبلازمي والغشاء النووي و التخلص من البروتينات المرتبطة مع الـ DNAللحصول على قالب DNA نقي. وذلك اما بتحضير المحاليل او باستعمال محاليل جاهزة (Kit).

الهدف من التجربة

استخلاص الـ DNA النقي من عينة دم الانسان



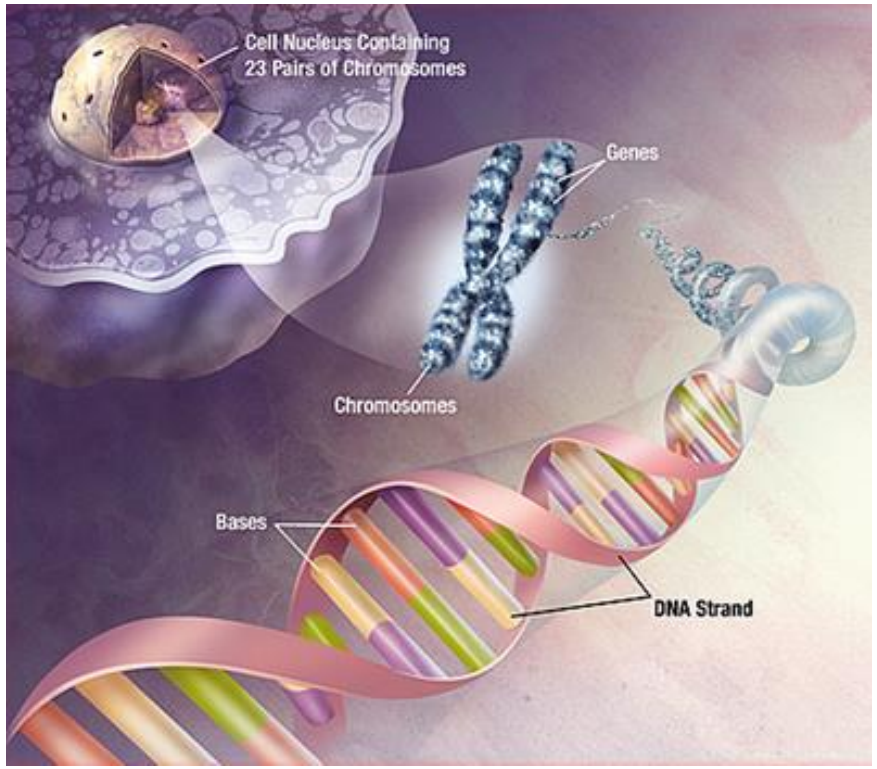
الاساس العلمي للاستخلاص:

1- تأحليل RBC

2- تحليل الاغشية السايتوبلازمية والنووية

2- تنقية الاحماض النووية

3- تجميع الاحماض النووية



:Materials المواد

* Blood sample

* gSYNC DNA Extraction Kit

* GSB Buffer

* W1 Buffer

* Wash Buffer (dilute ratio 1/5 by ethanol) e.g. 1ml + 4 ml ethanol, Mix

* Proteinase K2 (dissolve ratio 1%) e.g. 1 mg + 100 µl ddH_2O (7-8.5 pH), Vortex then centrifuge

* Elution Buffer

* GS Columns

* 2 ml Collection tubes

* Prepare Phosphate Buffer Saline (PBS pH 7.2)

* 1.5 microcentrifuge tubes.

طريقة العمل Method
خطوات استخلاص الـDNA من عينة الدم Blood Protocol Procedure

اولا: تحضير العينة Sample Preparation

- اسحب 2-5 مل دم من الانسان ويستعمل مباشرة او يحفظ في انبوبة مانعة تخثر لحين الاستخدام.
- ضع 200 µl من عينة الدم في انبوبة الطرد المركزي 1.5 مل . ثم اضف 20 µl Proteinase K (يساعد على تحطيم البروتينات والحفاظ على الDNA من التحلل). امزج الخليط باستخدام الماصة Pipet، ثم احضن الانبوب في درجة حرارة 60°C لمدة 5 دقائق.

ملاحظة: في حالة اجراء التجربة على دم الطيور او الاسماك يفضل استعمال 10 µl ثم تكمل الى 200 µl في PBS.

ثانيا: تحلل الخلايا Cell Lysis

- اضف 200 µl من GSB Buffer(وظيفته تذويب محتويات الخلية ماعدا الـDNA) امزجه بقوة ، ثم احضنه في درجة حرارة 60°C لمدة 5 دقائق. (امزج الانبوب كل دقيقتين)

امزج ال GSB Bufferمع العينة الى ان يتكون محلول متجانس. مزج العينة بشكل متناوبة خلال الحضن يساعد على زيادة فاعلية Proteinase K في تحلل الخلايا و وتحطيم البروتينات.

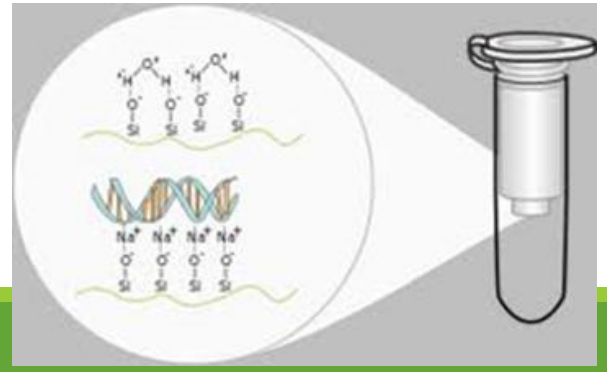
ملاحظة: خلال فترة الحضن ، ضع 200 µl من Elution Bufferفي انبوبة الطرد المركزي 1.5 مل، ثم ضعها على درجة حرارة 60°C لحين الاستعمال (الخطوة الخامسة).

التخلص من الـحمض النووي الرايبوزي RNA Removal: بعد انتهاء مدة الحضن في 60ºC مع GSB Buffer، اضف 5 µl من (RNase A، 50 mg/ml)، امزج الانبوب بقوة ثم اتركه في درجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.

Sample preparation and cell lysis

ثالثا: DNA Binding

- اضف 200 µl من الايثانول المطلق (وظيفته غسل وتنظيف الـ DNA من الشوائب) الى العينة و امزجها مباشرة بقوة لمدة 10 ثواني. ان لم تمتزج جيدا ممكن مزجها باستخدام الماصة pipette، الى ان تصبح عينة متجانسة.
- ضع GS Column في انبوبة حجم 2 ml، انقل كل الخليط من الانبوبة 1.5 الى GS Column، ثم توضع في جهاز الطرد المركزي على قوة 14-16,000 x g لمدة دقيقة واحدة.
- في حالة لم يمر المحلول خلال المرشح يمكن زيادة وقت الطرد المركزي الى ان يرشح كل المحلول. بعد ذلك انقل GS Column الى انبوية طرد مركزي جديدة 2 ml



DNA binding to membrane while contaminants remain suspended

رابعا: محلول الغسل Wash solution

- اضف 400 µl من محلول الغسل W1 Buffer الى GS Column. ثم ضع الانبوب في جهاز الطرد المركزي على قوة 14-16,000 x g لمدة 30 ثانية.

Wash (removal of contaminants while DNA remains bound to membrane)

- يسكب الراشح ثم يعاد ال GS Column الى انبوبة 2 ml.
- اضف 600 µl من محلول الغسل Wash buffer الى العينة. ثم توضع في جهاز الطرد المركزي على قوة 14-16,000 x g لمدة 30 ثانية، ثم اسكب الراشح.
- اعد GS Column الى انبوب 2 ml ثم ضعه في جهاز الطرد المركزي لمدة 3 دقائق على قوة 14-16,000 x g لكي يجفف عامود الترشيح

ملاحظة: عملية الطرد المركزي لفترة 5 دقائق على قوة 14-16,000 x g ثم الحضن في درجة حرارة 60°C لمدة 5 دقائق سوف يساعد على تجفيف GS Column للتخلص من كل اثار الايثانول.

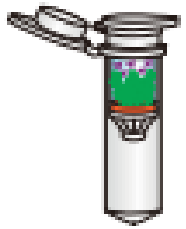
Elution of pure genomic DNA which is ready for subsequent reactions

خامسا: Elution

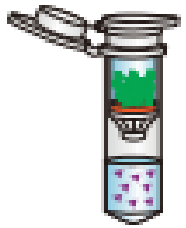
- ينقل GS Column الجاف الى انبوبة طرد مركزي 1.5 ml نظيفة، ثم يضاف 100 µl من محلول Elution سخن مسبقا (10 ml Tric-HCl, pH8.5, 25°C)، TE Buffer(10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8) او ماء مقطر(ddH_2O 7-8.5 pH) التي تسخن بدرجة حرارة 60-70 °Cالى مركز عمود الترشيح لكي تمتص بالكامل ، ثم يترك لمدة 3 دقائق.
- بعد ذلك يوضع الانبوب في جهاز الطرد المركزي على قوة 14-16,000 x g لمدة 30 ثانية للحصول على الـDNA النقي.

ملاحظة: للحصول على DNA مركز يمكن اضاف (30-50 µl) من محلول ال elution. اما في حالة تجميع اكبر كمية من ال DNA يمكن اعادة اضافة محلول الازالة الى ان تصل الحجم الى 200µl .

Sample preparation and cell lysis



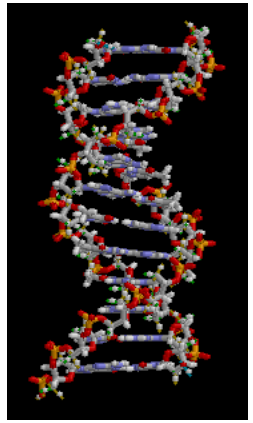
DNA binding to membrane while contaminants remain suspended



Wash (removal of contaminants while DNA remains bound to membrane)

Elution of pure genomic DNA which is ready for subsequent reactions

النتائج Results :

الحصور على DNA نقي يستخدم كقالب في الخطوات اللاحقية في تقنية الـPCR

يستعمل مستخلص ال DNAمباشرة او يحفظ في درجة حرارة 20 C-