**المختبرالخامس**

**استخلاص الدنا من الدم البشري باستخدام عدة تجارية مجهزة من الشركات**

الطريقة المستخدمة في هذه التجربة تشابه طريقة الاستخلاص بالفينول كلوروفورم من حيث المبدا والتخلص من الانزيمات المحطمة للدنا لكن الفرق هو انه في هذه الحالة يتم استخدام مادة كيمياوية تثبط الانزيمات بدلامن استخدام الفينول او الكلوروفورم لمسخها وترسيبها وترسيب الدنا على اغشية متخصصة بذلك وتتم كالاتي:

اولا: تحليل كريات الدم الحمر

1. يتم سحب 2 من من الدم الوريدي ووضعها في انبوبة حاوية على مادة الـ EDTA المانعة للتخثر ومزجها جيدا ثم يسحب 300 مايكروليتر ويوضع في انبوبة eppendrof معقمة .
2. يضاف 900 مايكروليتر من محلول تحليل كريات الدم الحمر RBC Lysis buffer ويمزج بقلب الانبوبة لعدة مرات (يجب عدم استخدام المازج vortex) وتحضن الانابيب بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق ثم تنبذ بسرعة 30000 xg لمدة خمس دقائق.
3. يزال الرائق تماما وتعلق الخلايا في 100 مايكروليتر من محلول تحليل كريات الدم الحمر.

\*ملاحظة يتم في الخطوات السابقة التخلص من كريات الدم الحمر بتحليلها في محلول hypotonic وذلك لعدم احتوائها على حامض نووي من نوع الدنا بسبب عدم احتوائها على انوية. وتتم هذه الخطوات في حالة الدم الحديث السحب والمخزون بالتبريد فقط وليس الدم المجمد frozen blood حيث تعامل في هذه الحالة بطريقة اخرى تختلف عن هذه الطريقة

ثانيا: تحليل الخلايا الحاوية على الانوية

1. يضاف 200 مايكروليتر من محلول تحطيم الخلايا FABG Buffer ويمزج بالمازج.
2. تحضن الانابيب بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق وخلال فترة الحضن تقلب الانبوبة كل 3 دقائق.
3. في حالة الرغبة بالتخلص من الحامض النووي الرايبوزي يتم اضافة 5 مايكروليتر من محلول انزيم rnase a ويحضن لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة.

ثالثا: ارتباط الدنا بالاغشية DNA Binding

1. يضاف 200 مايكروليتر من الايثانول النقي ويمزج بالمازج لمدة 10 sec.
2. توضع انابيب الفصل (FABG Colum) او اعمدة الفصل (separation colum) في انابيب الجمع بعناية.
3. تنقل العينة الى داخل انابيب الفصل وتنبذ بسرعة 14000 دورة/ دقيقة لمدة 3 دقائق. ثم يزال الراشح من انابيب الجمع ويعاد وضع انابيب الفصل في انابيب جمع مرة ثانية.

الغسل Washing :

1. يضاف 400 مايكروليتر من محلول الغسل الاول W1الى انابيب الفصل وينبذ بسرعة 14000 دورة/ دقيقة لمدة 30 ثانية.
2. يزال الراشح ويغسل الدنا باضافة 600 مايكروليتر من محلول الغسل الثاني Wash buffer ثم ينبذ ويزال الراشح.
3. يجفف الدنا بوضع اعمدة الفصل في انابيب ابندروف معقمة ونبذه مركزيا لمدة 3 دقائق. (لغرض التخلص من بقايا محلول الغسل لان وجودها يقلل من ذوبان الدنا في محلوله ويجعله غير ملائم للاستخدامات اللاحقة.

اذابة الدنا Elution

1. يضاف 100 مايكروليتر من محلول جمع الدنا elution buffer او محلول TE المسخن الى درجة 70 مئوي ويترك لمدة 5 دقائق او لحين امتصاصه تماما من الاغشية. (مالسبب)
2. تنبذ الانابيب بسرعة 14000 دورة لمدة 30 ثانية ثم ترفع انابيب الفصل ويقسم الدنا الناتج على انابيب صغيرة ويخزن بالتجميد لحين الاستخدام.