مختبر ٢

استخلاص الـ DNA من الدم البشري بطريقة Kit

اسم الكت Genomic DNA Mini Kit (Blood)

مكونات الكت:-

1- RBC Lysis Buffer

2- (GT) Buffer

3- (GB) Buffer

4- W1 Buffer

5- Wash Buffer

6- Elution Buffer

7- GD Column

8- 2 ml Collection Tube

طريقة العمل:-

A- نسحب 2 ml من الدم الوريري بواسطة محقنة طبية معقمة disposable ويوضع الدم في أنابيب بلاستيكية معقمة حاوية على مادة مانعة للتخثر Anticoagulant (EDTA) تحرك الانبوبة لمزج المادة المانعة للتخثر مع الدم للمحافظة على العينة من التلف.

B- 1 -Sample Preparation Step:-

1- ينقل 300 µl من الدم الى أنبوب أبندورف eppendorf tube بحجم 1.5 ml.

2- يضاف (3x) ثلاثة أضعاف العينة من محلول RBC Lysis buffer ويخلط بواسطة التقليب ولايستخدم الهزاز (vortex).

3- تحضن الأنبوبة لمدة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة.

4- يعمل طرد مركزي لمدة 5 دقائق وبسرعة (3000 rpm) دورة/دقيقة، ويزال الراشح تماما.

5- يضاف 100 µl من محلول RBC Lysis buffer وتخلط بالمايكروبايبيت عدة مرات (لاعادة تعليق راسب الخلايا البيض leukocyte.

-:Cell Lysis Step -2

1- يضاف 200 µl من محلول GB buffer الى أنبوب الأبندورف ثم تخلط بعناية.

2- تحضن في الحمام المائي بدرجة حرارة C^{o} 60 لمدة 10 دقائق وخلال الحضن يقلب الأنبوب كل ثلاة دقائق.

3- في نفس الوقت يوضع محلول Elution buffer (200 µl) لكل عينة في الحمام المائي وبنفس درجة الحرارة ليتم استخدامه في الخطوة الخامسة.

-:DNA Binding Step -3

1- يضاف 200 µl من الايثانول المطلق absolute ethanol الى العينة ثم تخلط بواسطة الرج shaking لمدة 10 ثواني.

2- يوضع عمود GD في أنبوب الجمع ثم ينقل كل الخليط الى عمود GD.

3- يعمل طرد مركزي بسرعة 14,000-16,000 rpm دورة/دقيقة لمدة 3 دقائق.

4- يتم ازالة أنبوب الجمع ويوضع عمود GD في أنبوب جمع جديد.

-:Wash Step -4

1- يضاف 400 µl من محلول W1 buffer الى عمود GD ثم يعمل طرد مركزي 14,000-16,000 rpm دورة/دقيقة لمدة 45 ثانية.

2- يتم ازالة الراشح ويرجع عمود GD في أنبوب الجمع.

3- يضاف 600 µl من محلول Wash buffer الى عمود GD.

4- يعمل طرد مركزي بسرعة 14,000-16,000 rpmدورة/دقيقة ولمدة 45 ثانية ويزال الراشح.

5- يرجع عمود GD الى أنبوب الجمع.

6- يعمل طرد مركزي مرة أخرى لمدة 3 دقائق وبنفس السرعة وذلك ليجف خليط العمود.

-:DNA Elution Step -5

1- ينقل عمود GD الجاف الى أنبوب أبندورف جديدة ونظيفة.

2- يضاف 100 µl من محلول Elution buffer أو TE (الذي تم تسخينه سابقا) الى مركز عمود GD.

3- تحضن العينة لمدة 3 دقائق بدرجة حرارة الغرفة ليتم امتصاص محلول Elution buffer أو TE.

4- يعمل طرد مركزي بسرعة 14,000-16,000 rpm دورة/دقيقة ولمدة 45 ثانية ليتم اذابة الـ DNA الذي تمت تنقيته.