مختبر ٥

استخلاص الـ DNA بواسطة

Fully Automated Nucleic Acid Extraction System

ExiPrep$^{TM}_{16}$ Plus/ ExiPrep^{TM}

يستعمل جهاز ExiPrep$^{TM}_{16}$ Plus/ ExiPrep^{TM} لاستخلاص الـ DNA وذلك لعدة أسباب أهمها:-

١- يستخلص الـ DNA ذاتيا بواسطة جهاز مبرمج وفق نظام خاص ومميز ومتطور.
٢- تجري عملية الاستخلاص وفق نظام محكم.
٣- يكون فرصة التعرض الى التلوث أقل.
٤- يمكن معرفة كمية الـ DNA التي يتم الحصول عليها.
٥- يمكن الحصول على الـ DNA او الـ RNA خلال 40-60 دقيقة.

يكون هناك كت خاص بكل مصدر يراد الحصول منه على الـ DNA فمثلا الكت الخاص باستخلاص الـ DNA من الانسان يختلف عن الكت الخاص من عزل الـ DNA من النبات وكذلك يختلف عن البكتريا او الحيوان وهكذا ..... كما أن هذا الجهاز لايقتصر على عزل Genomic DNA بل يمكن أن يتم عزل الـ RNA أو الـ DNA البلازميد، اذ أن بالاضافة الى الكت فان لكل مصدر يراد عزل الـ DNA منه كود خاص به يعطى للجهاز ويتم استخلاص الـ DNA منه على اساس الرقم الذي يعطى للجهاز وفق قائمة خاصة مرفقة مع الجهاز تأتي من الشركة المصنعة.

أنواع الكت الخاصة بعزل الـ DNA:-

١- الكت الخاص باستخلاص الـ DNA من الانسان مثلا (blood ، urine ،.....).
٢- الكت الخاص باستخلاص الـ DNA من animal tissue.
٣- الكت الخاص باستخلاص الـ DNA من cultured cells .
٤- الكت الخاص باستخلاص الـ DNA من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة گرام والخمائر.
٥- الكت الخاص باستخلاص الـ DNA من الأنسجة النباتية والبذور.

يحتوي الكت على cartridges يحتوي على كل البفرات الخاصة بعملية الاستخلاص والتي تشمل binding buffer ، washing buffer ، elution biffer و magnetic bead solution وكل cartridge يكون محكم الغلق بواسطة الفويل لكي يحميه من التسرب او التبخر والتلوث ويمكن للـ cartridge أن يحفظ بدرجة حرارة (15-25ºC) لأكثر من سنتين .

يحتوي الكت ايضا على انزيمات محللة مثل Proteinase K ، RNase كما يحتوي على disposable tips و reaction tubes و elution tubes كما يحتوي على DNase – Rnase – free.

بعض العينات تحتاج معاملتها بمعاملات خاصة قبل البدء بعملية الاستخلاص مثلا عند الاستخلاص من الأنسجة الحيوانية (عضلات ، كبد ، قلب .....) تتطلب اذابة 20 mg من proteinase K في 1.0 ml من DNase-and RNase-free water ووضعه في shaking water bath بدرجة حرارة 60ºC ومن ثم عمل centrifuge ، كذلك يجب وضع tissue lysis buffer في shaking water bath بدرجة حرارة 60ºC ومن ثم عمل centrifuge تجنبا لترسب البفر اثناء فترة الخزن ومن ثم أخذ الراشح.

أما عند عزل الـ DNA من البكتريا الموجبة لصبغة گرام أو الخمائر فيجب معاملة العينة قبل البدء بعملية الاستخلاص بواسطة lyticase أو lysozyme للحصول على spheroplasts ثم تعلق الـ spheroplasts بـ provided resuspension buffer للحصول على النتيجة المطلوبة.

تقدير الأحماض النووية Nucleic acid quantitation

تعد تقدير الحامض النووي في العينة عملية مهمة لتحديد مقدار تركيز الـ DNA أو الـ RAN في العينة ودرجة نقاوته وتعتمد على هذه العملية الكثير من الفحوصات والتفاعلات الخاصة بالـ DNA مثل جهاز الـ PCR وأجهزة وراثية أخرى.

هناك العديد من الطرق المستعملة لقياس الـ DNA في العينة منها:-

١- جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer
٢- جهاز nanodrop

جهاز nanodrop

يعتبر قياس الحامض النووي DNA أو RNA في هذا الجهاز عملية سهلة وسريعة اضافة الى انها تكشف لنا نسبة الخطأ المحتمل وجوده في العينة. ان القراءات القياسية للحامض النووي هي كالآتي:-

DNA= 1.8 ~

RNA= 2.0 ~

أما القراءات التي تختلف عن هذه النسب فهي دلالة على وجود تلوث في العينة، أي أن العينة لازالت حاوية على البروتين أو بعض المواد الأخرى. تتم القراءة عند طول موجي 260-280 nm.

طريقة عمل الجهاز:-

١- اختر الأيقونة الخاصة بالجهاز (nanodrope) الموجودة على سطح المكتب.
٢- اختر nucleic acid من القائمة.
٣- اختر نوع الحامض النووي.

٤- اختر الوحدة القياسية الخاصة بالحامض النووي وهي ng/µl.
٥- اختر الطول الموجي الملائم المراد فحصه، أن الطول الموجي 260-280 هو الملائم لقياس وتقدير الحامض النووي.
٦- اختر الأيقونة (add to the report) لاضافة جميع القياسات الخاصة بجميع عيناتك وحفظها لحين الرجوع اليها عند الحاجة.
٧- صفر الجهاز بواسطة الـ blank (المحلول المذيب للحامض النووي) يجب أن يكون هذا المحلول مذيب جيد للحامض النووي اضافة الى ان الـ blank المستعمل لتصفير الجهاز يجب أن يكون بنفس درجة الـ pH ونفس الدرجة الأيونية للمحلول المستعمل للمذيب للحامض النووي.
٨- ضع 1-2 µl من محلول البلانك على عدسة الجهاز ثم انزل ذراع الجهاز ثم اضغط على كلمة blank.
٩- نظف العدسة بورق التنظيف الخاص ثم ضع العينة واضغط على كلمة (measure) ليبدء الجهاز بالقياس.