## مختبر ١٠

# تنقية الحامض النووي DNA

تستدعي الحاجة أحيانا الى عزل وتنقية قطعة DNA معينة من بين خليط من القطع المختلفة. ويوفر الترحيل الكهربائي الهلامي وسيلة مناسبة لذلك، حيث يمكن استخلاص الحزمة المرغوب فيها، بعد تحديد موقعها على الهلام بصورة نقية وبدون أن تتلوث ببقية الحزم.

تتطلب بعض التطبيقات مثل الكلونة ، تحديد ومعرفة تتابع DNA الى تنقية قطع الـ DNA من هلام الأكاروز أو من خليط تفاعل الـ PCR ، اذ تجهز هذه الطريقة التخلص من التلوث الذي ممكن أن يرافق عملية تضخيم الـ DNA ومن ضمنها تلوث العينة بالدايمر – برايمر ، التلوث نتيجة لاضافات الـ PCR أو تضخيم البرايمر.

علاوة على فائدة هذه الطريقة في فصل جزيئات الـ DNA فانه مفيد أيضا في اختيار قطع DNA بأحجام مختلفة خاصة عند استعمال أكثر من برايمر في نفس الوقت وفصل القطعة المطلوبة بعد تحديد حجمها على هلام الأگاروز ، كما تعتبر هذه الطريقة مفيدة أيضا في فصل الأشكال الفيزياوية المختلفة لجزيئة DNA معينة فالبلازميد pBR322 مثلا يمكن أن يكون على ثلاثة أشكال فقد يكون على شكل دائرة مغلقة تساهميا أو دائرة مفتوحة أو على شكل جزيئة خطية. وعلى الرغم من تماثل الوزن الجزيئي لهذه الأشكال الا أن معدل هجرتها على الهلام يكون مختلفا بحيث يكون كل شكل منها حزمة في موقع معين من الهلام حيث أن الطبيعة الفيزياوية للأشكال الثلاثة هي التي تسبب اختلاف في معدل هجرتها . تكون حركة جزيئة الدائرة المفتوحة في الهلام أبطأ من غيرها لأنها لاتمتلك الشكل المضغوط الذي تتميز به الجزيئة الدائرية المغلقة تساهميا والذي يساعدها في المرور بسرعة خلال ثقوب الهلام ، كما لايمكنها التسلل بسهولة خلال الثقوب كما هي الحال مع الجزيئة الخطية. علما أن نمط الهجرة هذا لايكون ثابتا تحت كل الظروف وانما يكون عرضة للتغير حسب ظروف الترحيل الكهربائي ، فأن تركيز الهلام المستعمل وشدة التيار الكهربائي والوزن الجزيئي للـ DNA المعنية ونوع المحلول المنظم المستخدم في الترحيل الكهربائي كلها عوامل قد تؤثر على نمط هجرة الأشكال الفيزياوية الثلاثة لجزيئة الـ DNA .

**اسم الكت المستخدم** **Gel / PCR DNA fragments extraction kit**

مكونات الكت:-

١- DFB puffer
٢- W1 buffer
٣- Wash buffer
٤- Elution buffer
٥- DF columns
٦- 2 ml collection tubes

**طريقة العمل:-**

١- تقطع حزمة الحامض النووي DNA المرحلة كهربائيا في هلام الأگاروز Agarose gel بواسطة شفرة معقمة.
٢- تنقل (300 mg) من قطعة الجل gel slice الى أنبوبة ابندورف معقم.
٣- اضف 500 µl من محلول DF buffer الى العينة وتخلط بجهاز vortex.
٤- تحضن العينة بالحمام المائي بدرجة حرارة (55-60) م° ولمدة (10-15) دقيقة حتى تذوب قطعة الأگاروز تماما. وخلال الحضن اقلب الأنبوبة كل 2 دقيقة . (احضن محلول elution buffer).
٥- برد العينة المذابة بدرجة حرارة الغرفة لمدة 3 دقائق.
٦- ضع DF column في أنبوب الجمع.
٧- انقل 800 µl من خليط العينة الى DF column.
٨- اعمل طرد مركزي 14000-16000 xg لمدة 30 ثانية.
٩- تتم ازالة الراشح وتوضع DF column في أنبوب .
١٠- اضف 600 µl من محلول wash buffer الى DF column وانتظر لمدة 1 دقيقة.
١١- اعمل طرد مركزي 14000-16000 xg دورة لمدة 30 ثانية ويتم التخلص من الراشح.
١٢- أضف 600 µl من محلول Wash buffer الى DF column وانتظر لمدة 1 دقيقة.
١٣- اعمل طرد مركزي 14000-16000 xg لمدة 30 ثانية وتخلص من الراشح.
١٤- أعد عملية الطرد المركزي والأنبوب فارغ الى أن يتم جفافه.
١٥- انقل الأنبوب DF column الجاف الى أنبوب أبندورف جديد معقم.
١٦- أضف (20-50) µl من محلول elution buffer أو TE buffer الى مركز DF column ويترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة 2 دقيقة ليتم التأكد من امتصاص محلول elution.
١٧- اعمل طرد مركزي 14000-16000 xg لمدة 2 دقيقة.
١٨- يحفظ الـ DNA بدرجة حرارة 20°C – ويكون الـ DNA جاهزا لغرض التجربة كدراسة التتابع sequencing أو لأغراض الكلونة المختلفة وغيرها.

**ملاحظات:-**

- فائدة DF buffer يحتوي على chaotropic salt التي تستخدم لاذابة الأگاروز ومسخ الانزيمات. فقطع الـ DNA الموجودة في المحلول ترتبط مع خليط الألياف الزجاجية لكولوم DF.
- يحتوي محلول DF على مادة guanidine thiocyanate الخطرة لذلك يجب الحذر عند استعمالها.
- Wash buffer يعمل على ازالة الشوائب (يحتوي على الايثانول).
- Elution bufferيعمل على اذابة قطع الـ DNA وانزالها من الكولوم ويحفظ الـ DNA.