University of Isfahan

Faculty of Biological Science and Technology

Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology

Farzaneh Forouharfar

استخراج DNA از بافت غده تیموس

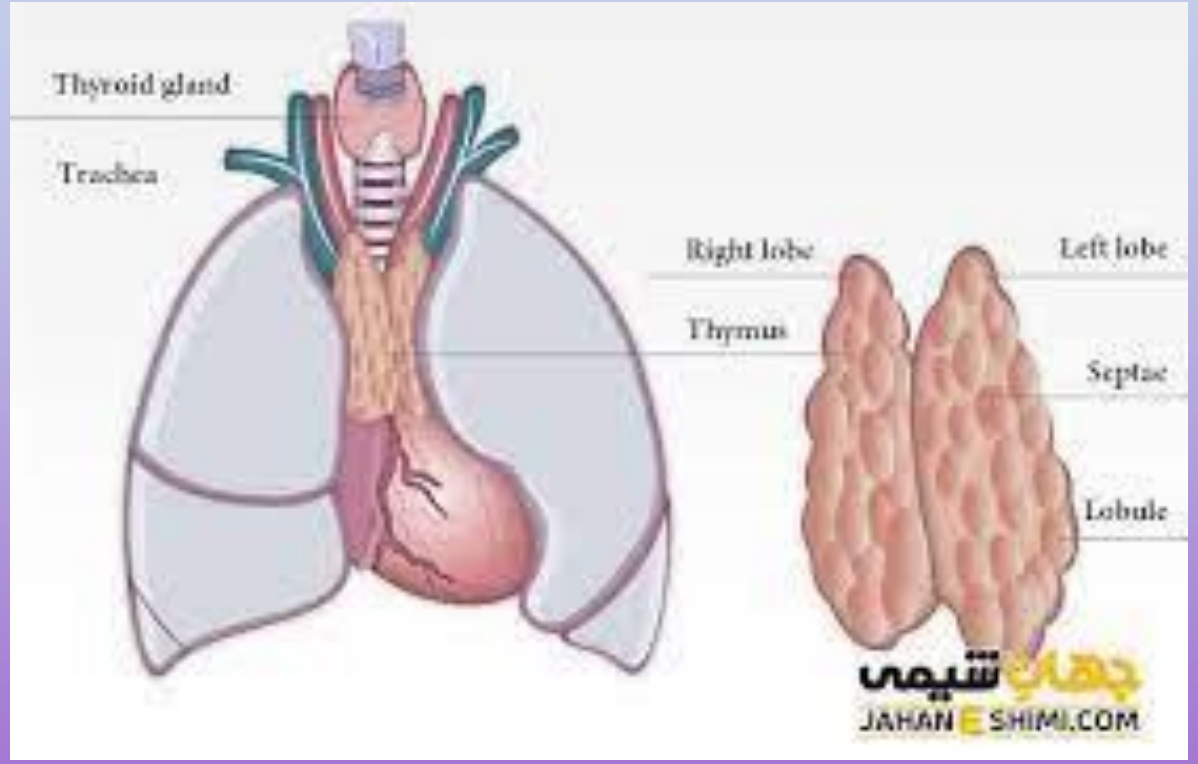
DNA extraction from the thymus gland

Farzaneh Forouharfar

مقدمه:

«غده تیموس» (Thymus Gland)، یکی از اجزای سیستم لنفاوی محسوب می‌شود، در پشت جناغ سینه و بین ریه‌ها قرار دارد و فقط تا سن بلوغ به فعالیت خود ادامه می‌دهد. بعد از بلوغ، اندازه تیموس به آرامی کاهش می‌یابد و بافت‌های آن با چربی جایگزین می‌شوند.

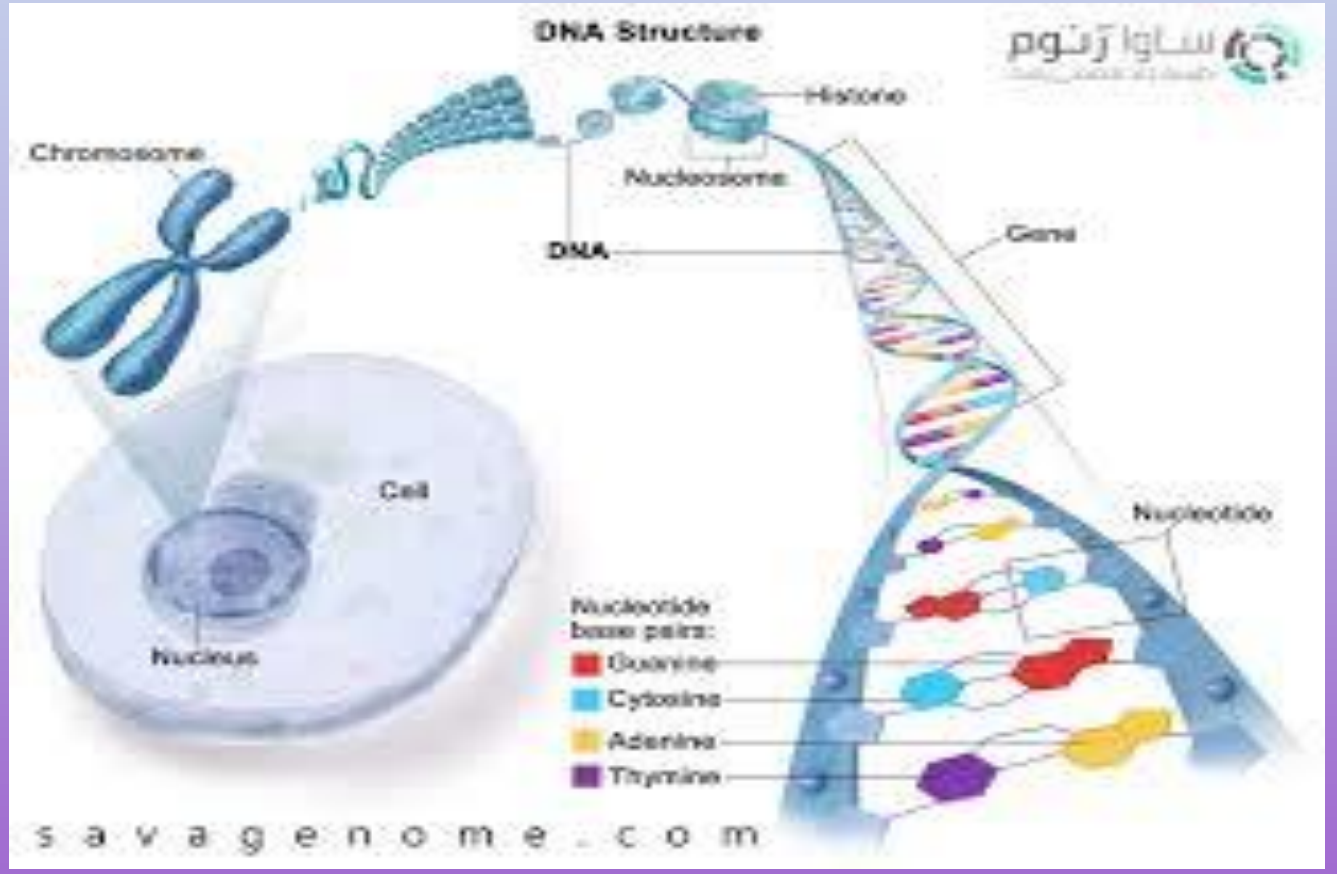
تیموس یک اندام کوچک لنفوئیدی در پشت قفسه سینه، از اجزای سیستم ایمنی و همچنین
«سیستم غدد درون‌ریز» (Endocrine System)بدن است. درون تیموس نوعی از سلول‌های لنفوسیت به نام سلول‌های T، بالغ می‌شوند. این سلول‌ها برای عملکرد دفاعی سیستم ایمنی اکتسابی در مقابل عوامل بیگانه، ضروری هستند.



Farzaneh Forouharfar

- در دو لوب تیموس، تیموسیت‌ها (thymusytes)به لنفوسیت-تی بلوغ پیدا می‌کنند و این سلول‌ها پس از بلوغ از تیموس مهاجرت کرده و مجموعه ی لنفوسیت های-تی را به صورت یک مجموعه ی جانبی تشکیل می‌دهند. نبود تیموس در سال‌های اولیه که از جهش ژنتیکی حاصل می‌شود، موجب اختلال در دستگاه ایمنی می‌شود و مقاومت در برابر بیماری‌های عفونی را کاهش می‌دهد. تجمع لنفوسیت های-تی در اوایل زندگی شروع می‌شود، در نتیجه، عمل آن در افراد بزرگسال کاهش می‌یابد. در افراد مسن به سختی تیموس قابل تشخیص است اما به فعالیت خود به عنوان یک غده ی درون ریز و برای تحریک دستگاه ایمنی ادامه می‌دهد.
- نکته ی قابل توجه این است که،تیموس به علت اینکه در خون سازی نقش دارد و دارای هسته های بزرگ است. به همین دلیل می توان به راحتیDNA آن را استخراج کرد

Farzaneh Forouharfar

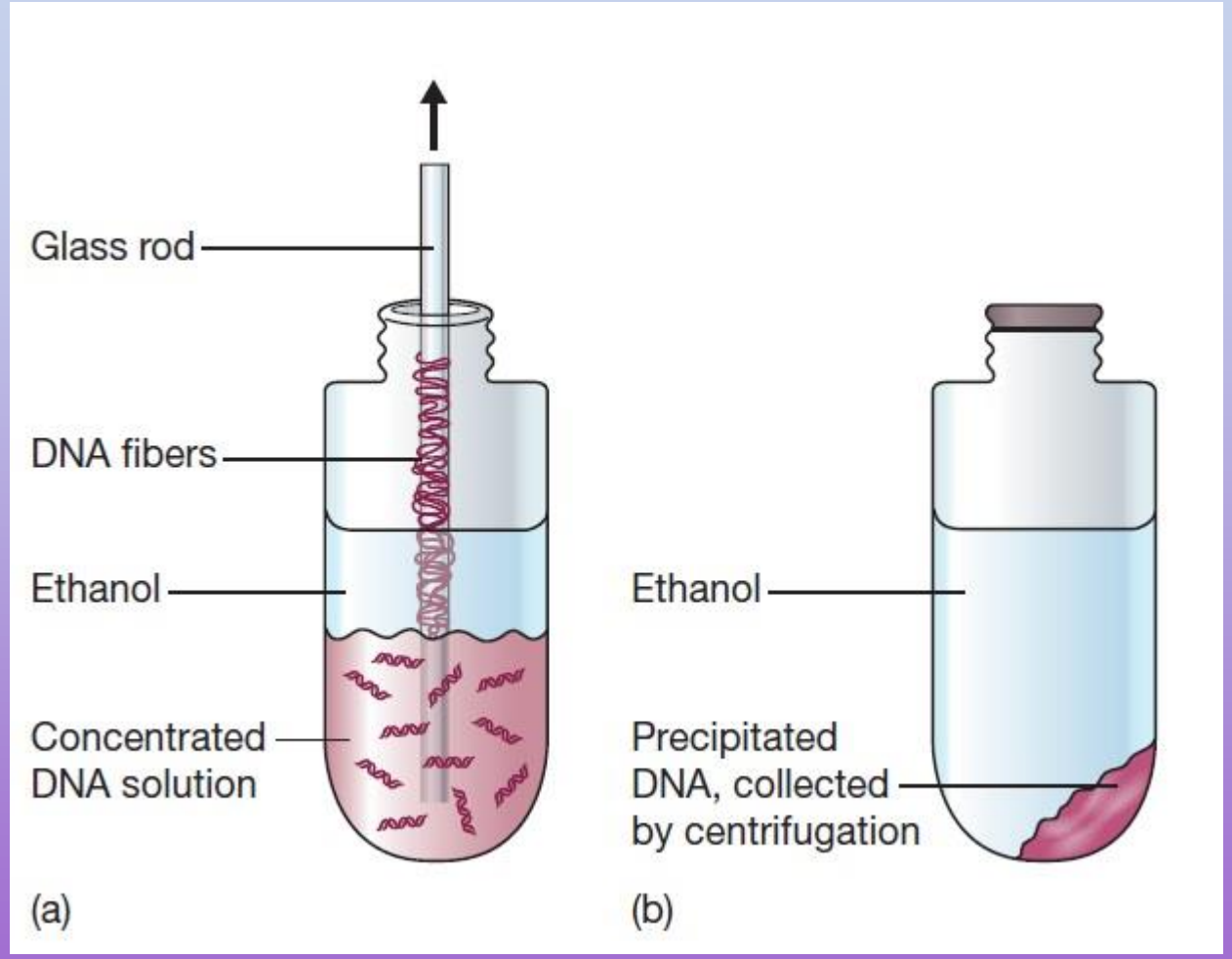


Farzaneh Forouharfar

وسایل موردنیاز

- بافر استخراج
- بافت تیموس
- اپندرف
- پارچه صافی
- هاون چینی
- محلولهای مورد نیاز

Farzaneh Forouharfar



Farzaneh Forouharfar

Farzaneh Forouharfar

- 1.اولین مرحله ، باید بافت را هموژنیزه کرد.بافت را به قطعات خیلی کوچک تقسیم کرده و در هاون چینی ریخته و می سائیم تا له شود.سپس بافر ایزوتونیک(بافر استخراج:0.9%NaCl (غلظت طبیعی بدن) ، $0.5m\mu\ EOTA$، $(25m\mu\ Tris\ PH = 7.7)$
- اگر بخواهیم از سلول های کشت،DNAاستخراج کنیم ؛ از هموژنایز های شیشه ای استفاده می کنیم که اندازه های مختلف دارند.

- 2.مخلوط درون هاون را با پارچه ی تنظیف چند لایه ، صاف می کنیم.
- 3. 500mμ از مخلوط (محلول)صاف شده را برداشته و در اپندرف ریخته و SDS 10%50μl
- و چند بار اپندرف را وارونه می کنیم. سلول های حیوانی ، درلیز SDSمی شوند.(باکتری هاو مخمر ها،دیواره ی پلی ساکاریدی دارند و با SDSلیز نمی شوند)
- SDS تمام پروتئین هارا دناتوره می کند.DNAها دارای پروتئین ها (هیستون ها)هستند.SDSاین هارا جدا می کند تا DNAها بار منفی پیدا کنند زیرا پروتئین ها به DNAبار مثبت می دهد.
- 4.ترکیب فنل_کلروفرم_ایزوآمیل الکل مخلوط و به نسبت24:24:1درست شود.
- *فنل و کلروفرم به منظور استخراج پروتئین ها و ایزو آمیل الکل به منظور جلوگیری از کف کردن، بعد از ورتکس استفاده می شود.

- بعد از اضافه کردن فنل،کلرو فرم و ایزوآمیل الکل ،به مدت طولانی و به شدت ورتکس انجام می دهیم.
- پس از ورتکس،باید نمونه را سانتریفوژکنیم
- *در اپندورف یک فاز در پایینDNAوRNAو اسید آمینه های محلول تشکیل می شود.
- قسمت های قطبی یا هیدروفیل پروتئین ها به طرف فاز آبی و قسمت هیدروفوب به طرف فنل کلروفرم قرار می گیرد. محلول رویی(آبی)را به اپندورف دیگر منتقل می کنیم.
- 5.مرحله ی 4 را 3 بار دیگر تکرار می کنیم تا دیگر رسوب سفید رنگ تشکیل نشود.
- 6.در اینمرحله محلول رویی را برداشته باید خارج کرد .
- این کار 2 بار و به وسیله پیپی پت انجام می شود.

- 5.مرحله ی 4 را 3 بار دیگر تکرار می کنیم تا دیگر رسوب سفید رنگ تشکیل نشود.
- 6.در اینمرحله محلول رویی را برداشته باید خارج کرد .
- این کار 2 بار و به وسیله پیپی پت انجام می شود.
- 7.حالDNA را با چرخاندن میله ی شیشه ای در محلول ،جدا می کنیم.
- می توان برای جدا سازی ،از سانتریفیوژ نیز استفاده کرد که به منظور این کار0.5mlایزوپروپیل (سرد)و یا 1ml الکل(سرد)100%اضافه می کنیم.اگر از الکل استفاده کنیم ؛ 2تا 2.5برابر حجم که داریم و یا اگر ایزوپروپیل استفاده کردیم باید 1تا1.5mlبرابر حجم اضافه کنیم.
- اگر می خواهیم کنیم باید ؛ الکل یا ایزوپروپیل را ،آرام به اپندورف اضافه کنیم.سپس با میله ی شیشه ای برداشت می کنیم.
- به این صورت که میله ی شیشه ای را آرام در محلول می چرخانیم تا DNAدور آن بچرخد.

- DNA را به اپندورف حاوی500MLاتانول70%اضافه می کنیم تا با اتانول70%ششته شودو در سانتریفیوژ در دور 11000به مدت
- 5-4-3دقیقهDNAرا رسوب می دهیم.
- بعد از ریختن اتانول70%؛می گزاریم رسوب در اپندرف خشک شود. بعد از 2-3ساعت رسوب را در آب 100µlحل می کنیم.

- *در صورتی که مرحله ی 4را انجام ندهیم؛می توانیم بعد از اضافه کردن الکل یا ایزوپروپیل با میله ی شیشه ای در اپندرف 3لایه فرو برده و آرام می چرخانیم تا DNAها را جذب کند و وارد اتانول 70% به میزان 500µlدر اپندرف جدید فرو می بریم و بقیه ی مراحل را انجام می دهیم.