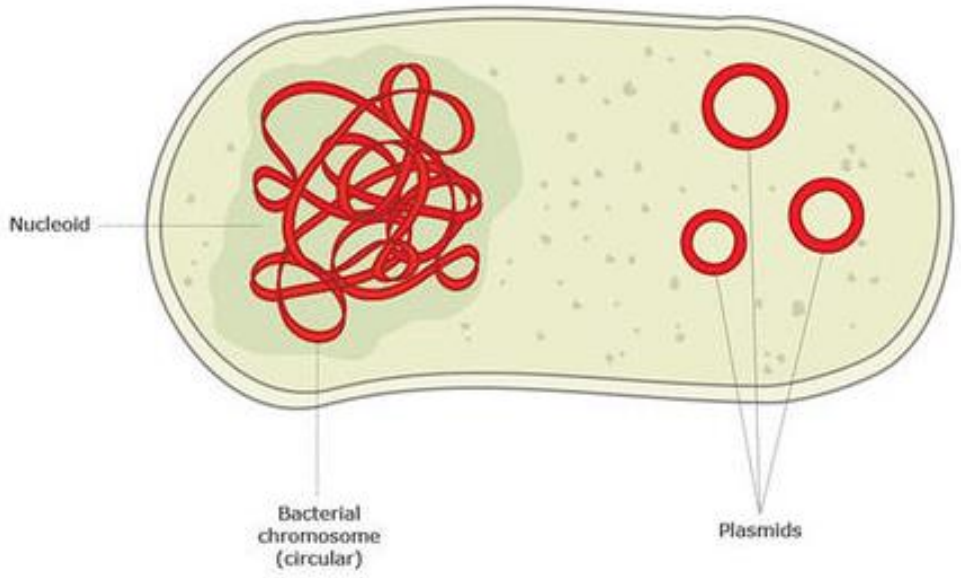
المختبر الثاني

عزل الدي أن أي Isolation of DNA

توجد طرق مختلفة لعزل الـ DNAويعتمد اختيار الطريقة على عدة أمور:

1. **نوع الكائن المراد عزل الـ DNA منه.**
2. **نوع الـ DNA المراد عزله.**



يمكن تقسيم الـ DNA الى نوعين:

DNA كروموسومي في كل الكائنات الحية .

DNA بلازميدي هو عبارة عن قطعة صغيرة دائرية من الـ DNAمفصولة عن كروموسوم البكتيريا المضيفة لذلك وجود البلازميد أو عدم وجوده في البكتريا لايؤثر على حياتها لأنه ليس جزء من الكروموسوم, لكن وجوده قد يساعد على اعطاء صفات غير موجودة أصلا في الكائن الحي المجهري. أهم صفة محمولة في البلازميد هو مقاومتها للمضادات الحيوية .

الغرض من استخلاص الـ DNA:

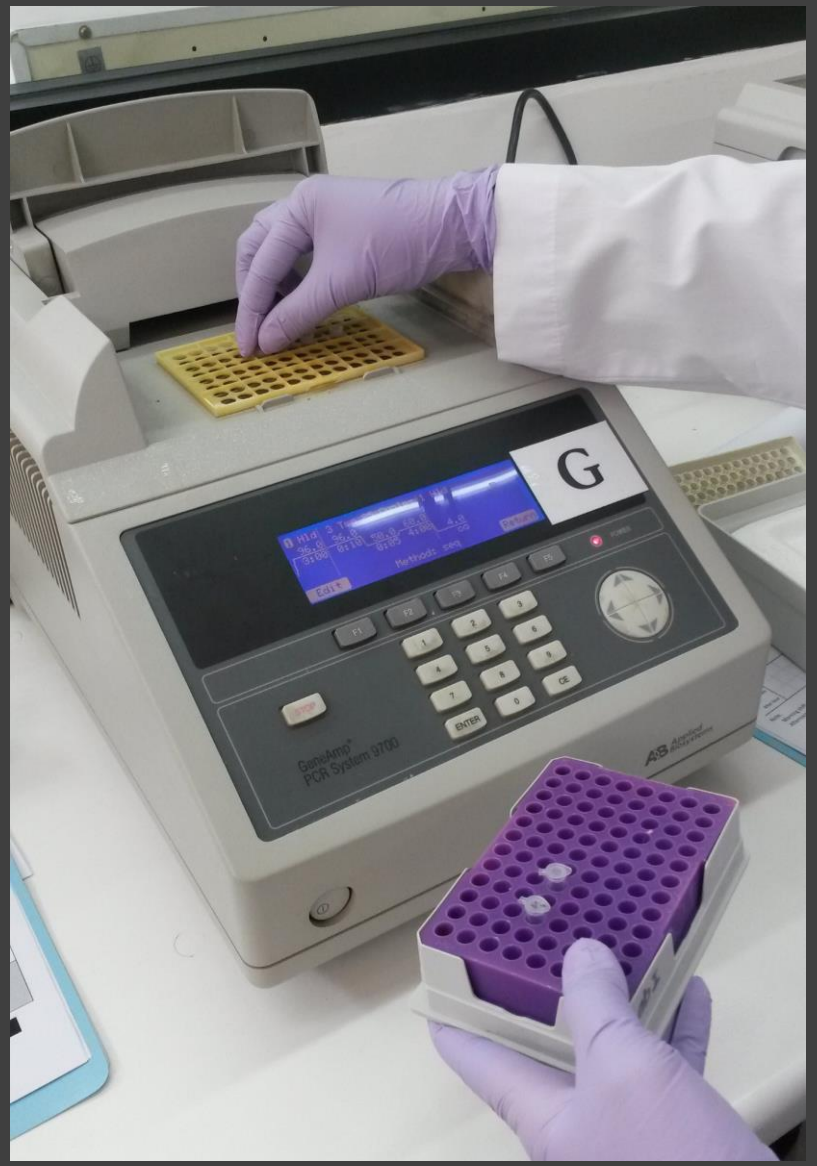
أ- لمعرفة طول الـ DNA أو استخدام في تجارب خاصة.
ب- تضخيم جزء معين من ال DNA باستخدام تقنية الـ PCR.

- **لغرض استخلاص الـ DNA من أي كائن لابد أن نمر بثلاث مراحل:**

1. مرحلة جمع الخلايا.
2. تكسير او تحلل الخلايا (الجدار الخلوي في الخلايا البكتيرية والنباتية, الغشاء البلازمي والغشاء النووي).
3. استخلاص الـ DNA.

- **الأجهزة المستخدمة :**

- جهاز الطرد المركزي و يساعد على فصل المواد حسب وزنها حيث يصبح لدينا راسب وراشح .
- الحمام المائي بدرجات مختلفة .
- الميزان الحساس .



- جهاز الترحيل الكهربائي وله فائدة في فصل الـ DNA و يتكون من حوض الترحيل والأمشاط .

- مايكروبايبيت تقاس بوحدة µl وأنابيب خاصة تسمى eppendorff tubeبحجم 1.5 ml.
- جهاز مدور حراري Thermocycler يرفع درجة الحرارة من 40ºC الى 90ºC خلال ثواني لغرض تضخيم ال DNA

-

المحاليل المستخدمة:

1. TE.
2. Tris.
3. EDTA.
4. NaCl.
5. SDS.
6. فينول – كلوروفورم.
7. TBE.
8. TAE.

عزل الـ DNAمن الخلايا البكتيرية

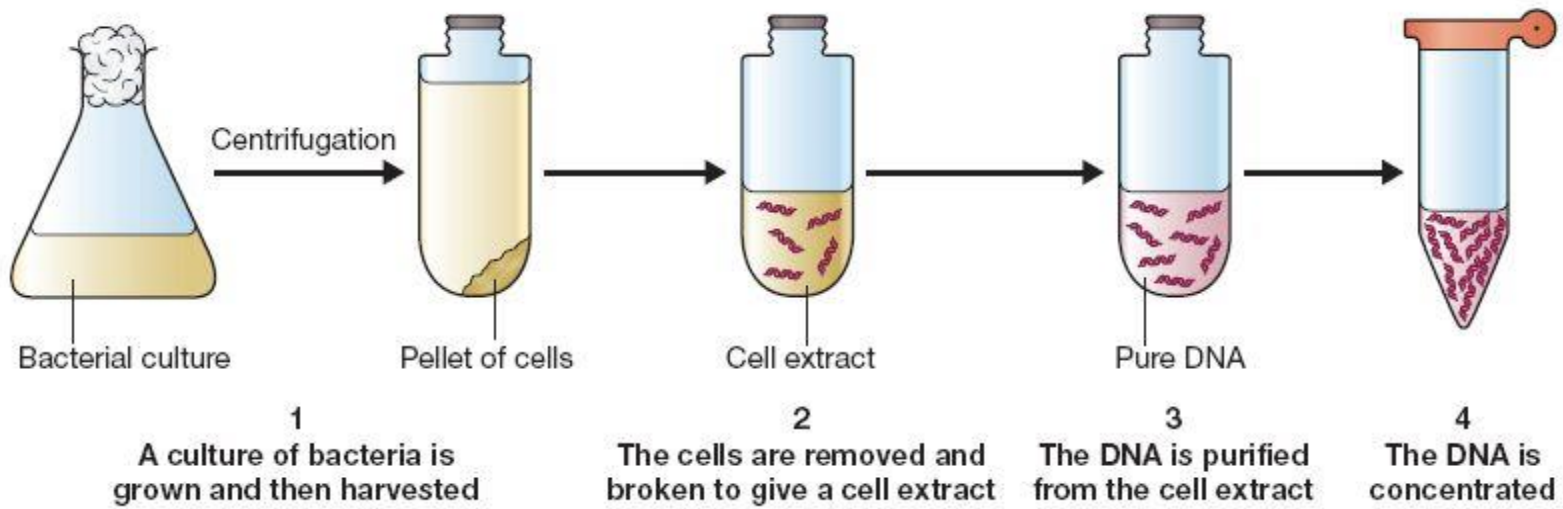
Isolation of DNA from Bacteria

يعتبر الـ DNAالمادة الأساس لدراسة وراثة الأحياء المجهرية وذلك لكونه حاملاً للصفات الوراثية من خلال تتابع القواعد النتروجينية الداخلة في تركيبه.

في أي عملية استخلاص يوجد نوعان من طرق العزل أما Manual أو Kit

Purification of DNA from

(1) A culture of bacteria is grown and then **harvested**.
(2) The cells are broken open to release their contents.
(3) This **cell extract** is treated to remove all components except the DNA.
(4) The resulting DNA solution is concentrated.



***عزل DNA من الخلايا البكتيرية بطريقة الـ Kit**

- يؤخذ 3- 2مستعمرة من بكتريا وتزرع في مرق مغذي Nutreint brothوتحضن بدرجة حرارة 37م° لأنها الدرجة الحرارية المثلى للبكتريا (فطريات بدرجة 25م°). ولمدة 18ساعة (نستدل على النمو في brothمن خلال العكورة وان كانت قليلة).

- يؤخذ 1 ml من Bacteria brothبواسطة Micropipete 1000 (100-µl) عادة Micropipeteتسحب 1مل = 1000مايكروليتر (متغيرة على أساس حدودها) , (ترج انبوبة brothلأن النمو البكتيري يكون في الأسفل).
- سحب 1 mlويوضع في eppendorf (اذا كان tipفانه يسحب ويسرب ويغير الحجم).
- نضع الـ eppendorfفي جهاز الطرد المركزي لكي نجمع الخلايا (الهدف من هذه الخطوة هو تجميع الخلايا بتكوين راسب).
- يهمل الراشح ويبقى الراسب (تجميع الخلايا).
- نضع 600 µlمن محلول Cell lysis solutionيحطم الجدار الخلوي وجدار البلازما لأن ضمن مكوناته يحتوي lysozymeانزيم حال يعمل على تحليل الجدار الخلوي للخلية البكتيرية وكذلك يحتوي على SDSوالتي تعمل على تحليل الغشاء البلازمي والذي ضمن مكوناته بروتين ودهون أي منظف detergentوعملية المزج بالتقليب يميناً ويساراً.

Cell lysis solution
Cell lysis solutions
are used for the chemical disruption of cells.
BiologyWise.com

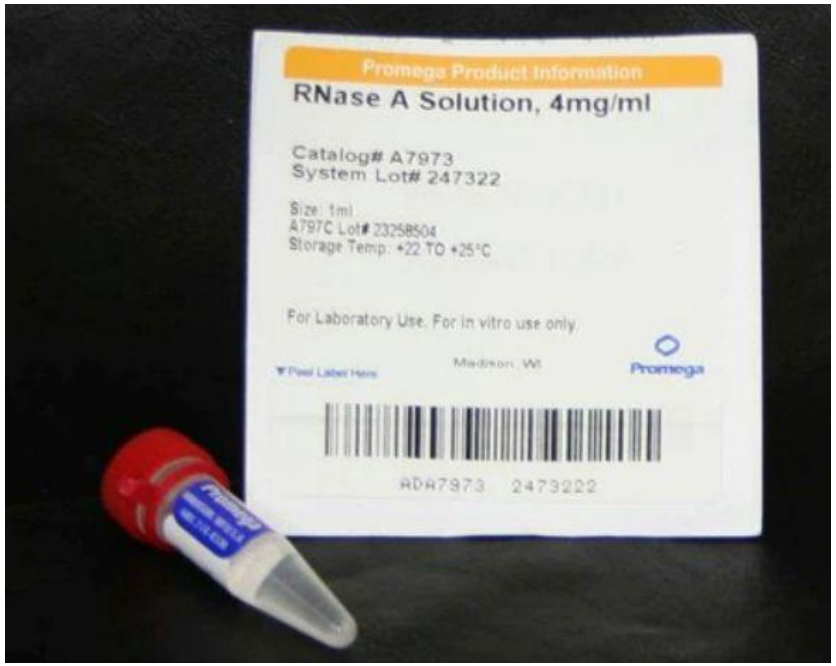
- يحضن المزيج بدرجة حرارة 80م° ولمدة 5دقائق في water path .
- بعدها نضيف 3µlمن RNAaseليحلل الـ RNAكل انزيم يحتاج الى وقت وحرارة لكي ينشط والحرارة المثلى لهذا الانزيم هي 37م° لذلك يبرد باليد.

- نضيف 200 µlمن محلول Protein precipitationالذي يحوي على خلات الأمونيوم الموجودة ضمنه وتعمل على ترسيب البروتين.).جهاز لمزج العينة (Vortexبجهاز Protein precipitationنقوم بمزج
- بعدها نضعه في Centerfugeبسرعة 13000دورة لمدة 3دقائق.
- نأخذ الراشح لأنه حاوي على DNAوالراسب يحوي بروتين.
- ينقل الراشح الى eppendorfجديدة.

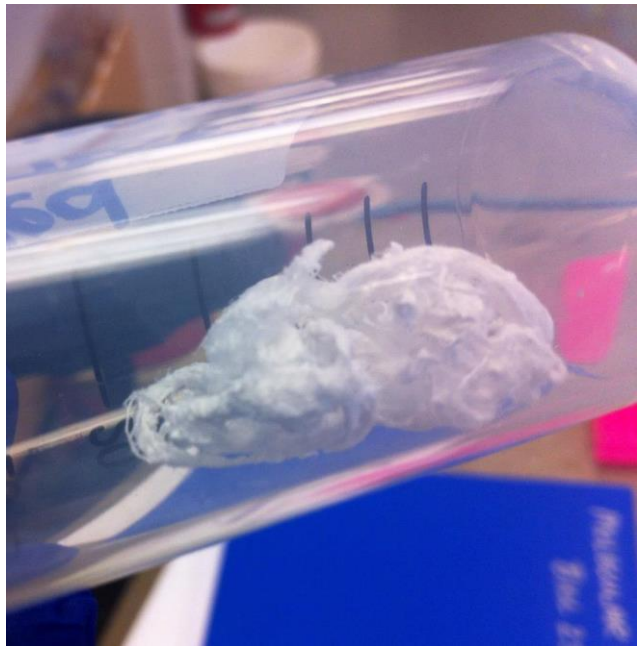
* نقوم بتنقية الـ DNAبواسطة الكحولات لأنها تعمل على ترسيب الـ DNA .

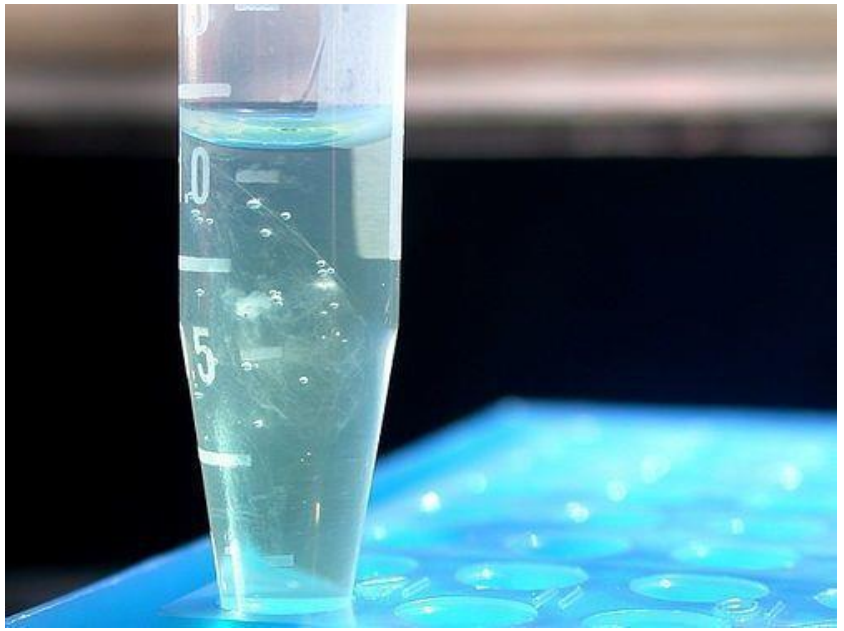
يستخدم isopropanolكمرسب جيد للـ DNAويكون أفضل من الايثانول % 70الذي يستخدم 3مرات أو أكثر ثم نعمل له طرد مركزي بسرعة 13000 xg ولمدة 2دقيقة ونأخذ الراسب لأنه حاوي على DNA.

لزيادة كفاءة النقاوة نضيف 600 µlمن الايثانول لغرض غسل وتنقية وترسيب DNAثم طرد مركزي 13000 xgولمدة 2دقيقة وبعدها نترك الايثانول يتبخر ونحفظ الـ DNAالنقي المترسب حيث يضاف
TE buffer (DNA Rehydration). من100µl


Promega Product Information
RNase A Solution, 4mg/ml
Catalog# A7973
System Lot# 247322
Size: 1ml
A797C Lot# 23258504
Storage Temp: +22 TO +25°C
For Laboratory Use. For in vitro use only.
Madison, WI
Promega
ADA7973 2473222

Protein Precipitation Solution




10
5