

المختبر السابع : عزل الـ DNA من البكتريا

تعتبر تجربة استخلاص الـ DNA من التجارب العلمية المهمة لأنها الأساس للبحوث العلمية المتعلقة بتحديد جينات الضراوة والمقاومة للمضادات الحيوية، لذلك من الضروري الحصول على الدنا بدرجة نقاوة جيدة وغير ملوث بالملوثات الخلوية او بالأحياء المجهرية الاخرى.

الهدف من التجربة : استخلاص الـ DNA من البكتريا

تحضير المحاليل:

A. محلول تحليل الخلايا:

1. قم بإذابة 0.242 غم من base Tris ، و 57 ميكرو لتر من حمض الخليك الثلجي و 1 مل من 0.5 مولار من

محلول EDTA

2. أضف إلى المحلول أعلاه 0.02 غم من الصوديوم استيت و 0.1 غم من SDS.

3. اكمل الحجم إلى 8 مل بواسطة الماء المقطر. أضبط الأس الهيدروجيني إلى (7.8)، ثم اكمل الحجم حتى 10 مل

من الماء المقطر.

4. يمزج المحلول جيدا ، تكمل عملية الاذابة باستخدام الحمام المائي.

B. محلول كلوريد الصوديوم 5 مولار:

يتم تحضيره بإذابة 2.92 غم من كلوريد الصوديوم في 10 مل من الماء المقطر.

C. الإيثانول 70%:

D. الإيثانول 100%:

E. الكلوروفورم.

طريقة العمل :

1. يتم أخذ 1.5 مل من مزرعة بكتيرية ثم تطرد مركزيا لمدة 5 دقائق عند 14000 دورة في الدقيقة.
2. يتم تعليق وتحليل الراسب الخلوي في 200 ميكرو لتر من محلول التحلل عن طريق استخدام المايكروباييت.
3. لإزالة معظم البروتينات وبقايا الخلايا ، يتم إضافة 66 مايكرو ليتر من محلول كلوريد الصوديوم 5 مولار مع المزج الجيد، ثم يتم الطرد المركزي للخليط على 12000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق عند 4 م.
4. بعد نقل الطبقة العليا الصافية إلى أنبوب إيبندورف جديد، يتم إضافة حجم متساوٍ من الكلوروفورم ، ثم يمزج بوضعه على جهاز الهزاز shaker لمدة 15 دقيقة حتى يتكون محلول حليبي الشكل.
5. ثم الطرد المركزي عند 14000 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق ،بعدها يتم ترفع الطبقة العليا إلى أنبوب إيبندورف جديدة ويضاف حجم مضاعف من كحول الإيثانول المطلق بنسبة 100.
6. يتم تقليب الأنابيب 5-6 مرات بلطف إلى ان يترسب الحمض النووي ، ثم الطرد المركزي عند 10.000 دورة في الدقيقة لمدة 3 دقائق.
7. يتم التخلص من الرائق وإضافة 1 مل من الإيثانول (70%) ، ثم تطرد مركزيا بسرعة 10.000 دورة في الدقيقة لمدة 3 دقائق.
8. كرر الخطوة 7.
9. يتم التخلص من الطبقة المائية وتترك الانابيب لتجف ثم يضاف 100 مايكروليتر من الماء المقطر لإعادة تعليق (الراسب) DNA.
10. يتم تجميد الحمض النووي عند -20 درجة مئوية لحين الاستخدام لاحقا.