المختبر السادس : عزل الـ DNA من عينات نباتية

يتم عادة عزل الاحماض النووية من اجزاء مختلفة من النباتات مثل الاوراق والجذور والبذور والازهار...الخ. الاوراق هي النموذج الافضل للعزل لاحتوائها على كمية كبيرة من الخلايا ضمن مساحة صغيرة نوعا ما ولسهولة الحصول عليها مع العلم قد تختلف الكمية التي نحصل عليها حسب عمر الاوراق وكمية المواد الايضية الثانوية في خلاياها.

الهدف من التجربة : عزل الـ DNA من النباتات.

طريقة العمل:

جمع العينات : يتم جمع اوراق فتية صغيرة في العمر خالية من الاصابات الفطرية واستخدامها كنماذج للتجربة.

المحاليل المستخدمة في عزل الـ : **DNA**

أولا: محلول الاستخلاص Extraction Buffer : يتكون محلول الاستخلاص من:

- 1.4 مولار NaCl
- 100 ملي مولار Tris-Hcl
- 20 ملي مولار Na2 EDTA
- 2 % CTAB

يحضر 100 مل منه بأذابة 8.2 غم من NaCl و1.57 غم من Tris-Hcl و 0.744 غم من Na2 EDTA و 2 غرام من CTAB. ثم يعدل الـ pH الى 8 ويعقم بالموصدة .

ثانيا:محلول الغسل Washing buffer : حضر 100 مل منه بإذابة 0.136 غم من خلات الأمونيوم في 76مل إيثانول مطلق وأكمل الحجم إلى 100مل بالماء المقطر.

ثالثا: محلول كلوروفورم: كحول الايزواميلي (1:24): حضر 100 مل منه بمزج 96مل من الكلوروفورم مع 4 مل من الكحول الآيزواميلي وحفظ في قنينة محكمة معتمة عند درجة حرارة 4م .

رابعا: محلولTE : والذي يتكون من:

- 0.01 مولار Tris-Hcl
- 0.001 مولار Na2 EDTA .

اكمل الحجم إلى 100 مل باستخدام الماء المقطر ويعقم بالموصدة. يمكن استخدام الماء المقطر المعقم للاذابة بدلا من محلول TE.

طريقة الاستخلاص:

1. يتم وزن 1 الى 2 غم من الأوراق الطرية لكل عينة وبعد غسلها بالماء المقطر تقطع الى قطع صغيرة ثم يضاف اليها النتروجين السائل Liquid nitrogen (او تحفظ بالتجميد قبلها بيوم) في هاون خزفي ثم تطحن وتكرر العملية لعدة مرات حتى تصبح العينة بشكل مسحوق أبيض قدر الإمكان.
2. يوضع المسحوق في أنابيب زجاجية ويضاف اليها 5مل من محلول الاستخلاص المحفوظ في حمام مائي بدرجة 65 ْمْ وتحضن الأنابيب في الحمام المائي الهزاز بالدرجة الحرارية نفسها ولمدة 60–90 دقيقة.
3. تترك الأنابيب لكي تكتسب درجة حرارة الغرفة ثم يضاف إليها 4 مل من محلول الكلوروفورم:الكحول الآيزواميلي (1:24) لكل أنبوب مع التحريك المستمر مدة 15 دقيقة.
4. تنقل الأنابيب إلى جهاز الطرد المركزي وتبذ بسرعة 4000 دورة/دقيقة مدة (15) دقيقة.
5. ترفع الطبقة المائية العليا بواسطة ماصة دقيقة Micropipette إلى أنبوب آخر معقم ويضاف الحجم السابق نفسه من محلول الكلوروفورم ويقلب بهدوء لمدة 3 دقائق ثم ينبذ بالسرعة نفسها مرة ثانية.
6. ترفع الطبقة المائية العليا بواسطة ماصة دقيقة وتوضع في أنابيب جديدة معقمة ويتم إضافة 3 مل من كحول الآيزوبروبانول المبرد ومن ثم تمزج بالتقليب الهادئ إلى أن تظهر خيوط بيضاء تمثل خيوط الـ DNA اما في حالة كون كمية الـ DNA قليلة لاتظهر بشكل خيوط بيضاء بل تكون منتشرة ضمن المحلول، يتم ترسيب الدنا بالطرد المركزي على سرعة 6000 دورة لمدة 10 دقائق.
7. تسكب الطبقة العليا ويضاف الى الراسب 2مل محلول الغسل وتترك لمدة 5 الى 10 دقائق.

8. تطرد الانابيب مركزيا على سرعة 6000 دورة لمدة 10 دقائق. يسكب المحلول ويجفف الراسب ثم يضاف اليه 200–400 مايكروليتر من محلول الإذابة TE او الماء المقطر وبالتحريك بين فترة وأخرى إلى أن تتم الإذابة للـDNA تماما.

9. وبعد ذلك تحفظ عينات الـDNA(Stock sample) في درجة حرارة – 20مْ لاستعمالها في التجارب اللاحقة.