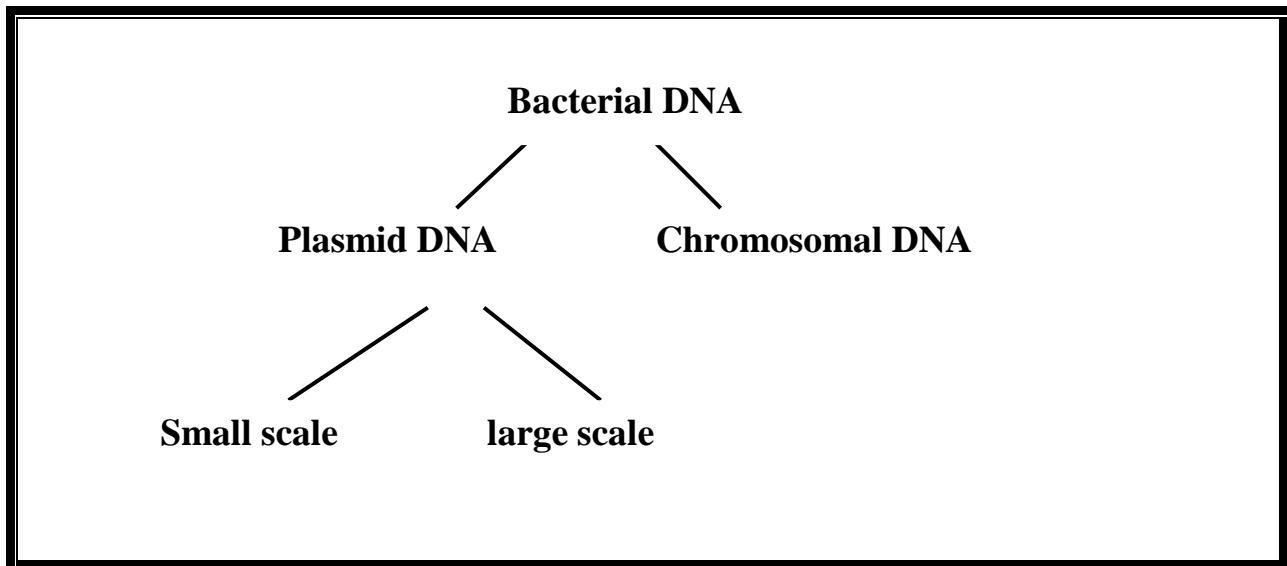


استخلاص وتنقية البلازميد

Plasmid extraction and Purification

البلازميدات: هي عباره عن قطع DNA تقع في سايتوبلازم الخلية البكتيرية وخارج الكروموسوم وتوجد بعدة اشكال اما دائيرية مغلقه closed circle او مفتوحة open circle او خطية linear .



هناك تناوب عكسي بين حجم البلازميدات و عدد النسخ ، الفائدة لها قابلية انتخابية تمكن البكتيريا من العيش في ظروف استثنائية مثل مقاومة المضادات الحيوانية او ايض المركبات العضوية كذلك إنتاج السموم.

يعتمد هذا التصنيف على:

- ١- الوزن الجزيئي للـ DNA البلازميدي.
- ٢- عدد نسخ البلازميدات في الخلية البكتيرية .

تصنف حسب الوظيفة الى :

- ١- الاقترانية: لها القابلية على حصول الاقتران الجنسي F-plasmid .
- ٢- الايضية: لها القابلية على نمو البكتيريا على ايض المركبات العضوية (الصناعية) -الملوثات - مثل مادة Toluone xylene تدخل في مجال Bioremediation السيطرة الحيوية .
- ٣- الضراوة: لها القابلية على انتاج سموم (وسيلة دفاعية) مثل بكتيريا Clostridium tetani مثل neuro toxin

مختبر وراثة أحياء مجهرية

٤- المقاومة: لها القابلية على إنتاج إنزيمات محللة للمضادات الحيوانية مثل Blactamase Ampicillinاكتشف في اليابان سنة ١٩٥٧ من بكتيريا Shigella المسببة لمرض الدزنوري.

طرق انتقال البلازميدات:

- ١- الاقتران Conjugation
- ٢- التحول الجرثومي Transformation Streptococcus اكتشف من قبل كرفت ١٩٢٨ - pneumonia .
- ٣- التوصيل Transduction .
- ٤- اكتشفت من قبل نورثون جوشوا ١٩٥٣ Joshaa Transposable genes .

طريقة العمل :

- ١- أعد تعليق الخلية البكتيرية في $250 \mu\text{l}$ من محلول P1 في أنبوب ابندروف.
- ٢- أضاف $250 \mu\text{l}$ من محلول P2 ويمزج بواسطة القلب للأنبوب من ٦-٤ مرات.
- ٣- أضاف $350 \mu\text{l}$ من محلول N3 ثم يمزج بالاقتران من ٦-٤ مرات.
- ٤- يطرد مركزياً المزيج بواقع ١٠٠٠٠ لمدة ١٠ دقائق.
- ٥- يوضع الراسح في أنبوبة Qiaprep column بواسطة الصب أو الإضافة بالبايبيت.
- ٦- يفضل تنشيط الكولوم بغسلة بـ $50 \mu\text{l}$ من محلول PB ويطرد مركزياً لمدة ٣٠ ثانية spin ويطرد النافذ.
- ٧- ينشط الكولوم بـ $75 \mu\text{l}$ من حلول PE ويطرح النافذ.
- ٨- يوضع الـ DNA في الكولوم Qiaprep column في $1.5 \mu\text{l}$ من أنبوب الابندروف ويضاف $50 \mu\text{l}$ من محلول الـ EB ويترك دقيقة واحدة ثم يطرد مركزياً لمدة دقيقة واحدة.
- ٩- يؤخذ النافذ ويعمل له ترحيل كهربائي .