# مختبر ١

## استخلاص الـ DNA من البكتريا

عملية استخلاص الـ DNA من العمليات الضرورية للحصول على نموذج الـ DNA وأيا كان مصدر الاستخلاص (بكتريا ، خلايا نباتية ، خلايا حقيقية النواة) فان عملية الاستخلاص توفر ايضا ازالة الشوائب كالبروتينات والدهون وغيرها من الشوائب الكيمياوية.

توجد طريقتين لعزل الـ DNA:

١- Kit method: مجموعة من المحاليل محضرة من قبل شركات وتكون مرفقة بطريقة عمل.
٢- Manual method: تتكون من مجموعة من المحاليل تكتب أسماءها وتركيزها وتحضر عادة في المختبر.

*** لعزل الـ DNA في أي كائن لابد من اجراء مجموعة من الخطوات:**

١- جمع الخلايا: وهي مصدر الـ DNA.

٢- تحليل الخلايا: التخلص من كافة المعوقات التي تمنع من الوصول الى الـ DNA ومن هذه العوائق جدار الخلية (الجدار الخلوي) والغشاء البلازمي.

٣- استخلاص الـ DNA: فصل الـ DNA من الشوائب والبروتينات والـ RNA.

**الأجهزة المستخدمة:**

١- جهاز الطرد المركزي اذ يساعد على فصل المواد حسب حجمها حيث يصبح لدينا راسب وراشح.
٢- الحمام المائي بدرجات مختلفة.
٣- الميزان الحساس.
٤- جهاز الترحيل الكهربائي وله فائدة في فصل الـ DNA اذ أن لصعوبة رؤية الـ DNA بالعين المجردة فلابد من استخدام تقنية الترحيل الكهربائي حيث يتكون من حوض الترحيل والأمشاط.
٥- مايكروبايبيت تقاس بوحدة µl l وأنابيب خاصة تسمى eppendorff tube بحجم 1.5 ml.
٦- جهاز مدور حراري يرفع درجة الحرارة من 40 $C^o$ الى 50 $C^o$ خلال ثواني أي مضخم للـ DNA.

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

**١- Sample preparation**

ينقل $1*10^6$ من المزرعة البكتيرية الى 1.5 ml أبندورف تيوب ويعمل له طرد مركزي 14,000-16,000 xg لمدة دقيقة واحدة يتم التخلص من الراشح ويضاف الى الراسب 200 µl/sample من Gram+buffer ثم يعمل له رج ويخلط بواسطة البايبيت ويحفظ التيوب بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق ويقلب من 3-2 مرات.

**٢- Cell lysis**

يضاف 200 µl من GB buffer الى العينة وتخلط جيدا بواسطة الرج لمدة 5 ثواني ثم تحضن في درجة حرارة 60 $C^o$ لمدة 10 دقائق الى أن تصبح العينة رائقة تماما وخلال فترة الحضن يقلب التيوب كل 3 دقائق . خلال هذه الخطوة يوضع elution buffer (200 µl per sample) في درجة حرارة 60 $C^o$ لحين استخدامها في الخطوة رقم ٥ .

**٣- DNA binding**

يضاف 200 µl من الايثانول ويخلط جيدا بواسطة الرج واذا ظهر راسب يمكن التخلص منه بواسطة البايبيت . يوضع GD column على انبوب بحجم 2 ml وينقل الخليط له ثم يعمل طرد مركزي 14,000-16,000 xgلمدة دقيقتين ثم ينقل GD column الى انبوب تجميع 2 ml جديد.

**٤- Wash**

يضاف 400 µl من W1 buffer الى الكولوم ويعمل له طرد مركزي 14,000-16,000 xg لمدة 30 ثانية ثم يتخلص من الراشح ويعاد وضع الكولوم على تيوب التجميع ويضاف له 600 µl من wash buffer ويعمل طرد مركزي 14,000-16,000 xg لمدة 30 ثانية ويتخلص من الراشح ويعاد وضع الكولوم مرة اخرى على انبوب التجميع ويعمل طرد مركزي لمدة 14,000-16,000 xg لمدة 3 دقائق الى أن يجف تماما.

**٥- DNA elution**

ينقل ال GD column الى 1.5 ml ابندورف تيوب نظيف ويضاف له 100 µl من pre-heated elution buffer في المركز ويوضع بصورة عمودية لمدة 3 دقائق الى أن يمتص البفر تماما ثم يعمل له طرد مركزي 14,000-16,000 xg لمدة 30 ثانية ثم يحفظ الـ DNA الى$C^o$ 20- .