مختبر ٩

عزل البلازميدات بطريقة التحلل القاعدي

Plasmids Isolation by Alkaline Lysis

تعتبر هذه الطريقة من الطرق السريعة والشائعة في تنقية دنا البلازميد وتتضمن تحليل الببتيدوكلايكان بواسطة اللايزوزيم، ثم يعمل كل من SDS و NaOH على زيادة تأثير تحليل الخلايا ومسخ DNA الكروموسومي . اذ تعتمد هذه الطريقة على امكانية مسخ جزيئات الدنا الغير ملتفة بشكل عالي .

المواد:

١- مزرعة بكتيرية.
٢- أنابيب أبندورف معقمة بحجم 1.5 ml و 2 ml.
٣- 200 µl من المحلول P1 (50 mM glucose ، 25 mM Tris-HCl ، pH 8.0 ، 10 mM EDTA).
٤- 200 µl من المحلول P2 (50 mM glucose ، 25 mM Tris-HCl ، pH 8.0 ، 10 mM EDTA) الحاوي على 8 mg/ml من اللايزوزيم.
٥- 0.5 ml من المحلول P3 (0.2 N NaOH ، 1% SDS).
٦- 0.5 ml من 7.5 M ammonium acetate.
٧- 1 ml آيزوبروبانول .
٨- 1ml من 70% (v/v) ايثانول .
٩- 70 µl من محلول P4 (10 mM Tris-HCl، pH 8.0 ، 1mM EDTA ، 10 µg/ml RNase المحفوظ بالثلج).
١٠- جهاز vortex.
١١- أكياس ثلج.
١٢- جهاز طرد مركزي مبرد.

طريقة العمل:

١- ينقل 1.9 ml من المزرعة البكتيرية الى أنبوب أبندورف بحجم 2 ml ويعمل طرد مركزي بدرجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة واحدة، ثم يتم التخلص من الرائق ثم تعاد عملية الطرد المركزي.
٢- يعلق الراسب بحجم 100 µl من المحلول P1 ويعمل vortex يجب أن تعلق جميع الخلايا.
٣- يضاف 100 µl من المحلول P2 ويمزج بواسطة التقليب مرتين.
٤- يحفظ الخليط بدرجة حرارة المختبر لمدة 5 دقائق.

٥- يضاف 400 µl من محلول P3 المحضر حديثا. ويمزج بالتقليب لمرتين . يجب أن يكون الخليط صافي ولزج.
٦- توضع الأنابيب على الثلج لمدة 5 دقائق.
٧- يضاف 300 µl من 7.5 M ammonium acetate (pH 7.8) يمزج الخليط مرة أو مرتين بواسطة التقليب.
٨- توضع الأنابيب على الثلج لمدة 10 دقائق، تقلب الأنابيب كل دقيقتين .
٩- يعمل طرد مركزي لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة مبردة.

١٠- ينقل الرائق بواسطة البايبيت الى انبوب أبندورف 1.5 ml .

١١- يضاف 0.6 volume (عادة 400-500 µl) من الآيزوبروبانول ويحفظ بدرجة حرارة المختبر لمدة 10 دقائق ، يمزج بالتقليب.

١٢- يعمل طرد مركزي لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة المختبر.

١٣- يمزج الرائق مع حجم مساوي من 70% ايثانول ويخلط بالبايبيت. ثم يعمل له طرد مركزي لمدة 3 دقائق بدرجة حرارة المختبر.

١٤- اقلب التيوب على ورقة مجففة للتخلص من الايثانول.

١٥- يعلق الراسب بـ 30 µl من المحلول P4 ثم يمزج بواسطة البايبيت.

١٦- يعلم الانبوب ويحفظ بدرجة حرارة -20ºC .