الجامعة	**الانبار**
الكلية	**التربية للبنات**
القسم	**علوم الحياة**
المرحلة	**الرابعة**
اسم المادة باللغة العربية	**البايولوجي الجزيئي**
اسم المادة باللغة الانكليزية	**Molecular biology**
اسم التدريسي	**م.م. نبأ قيس جميل**
عنوان المحاضرة باللغة العربية	**استخلاص DNA من البكتريا**
عنوان المحاضرة باللغة الإنكليزية	**Extraction DNA from bacteria**
رقم المحاضرة	**4**
المصادر او المراجع	**Bergtrom,Gerald.Basic Cell and Molecular Microbiology and Molecular Biology Reviews**

استخلاص الDNA من البكتريا

تعتبر تجربة استخلاص ال DNA من التجارب العلمية المهمة لأنها الاساس 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 ال DNA من البكتريا

تحضير المحاليل:

A- محلول تحليل الخلايا

1. قم بإذابة 0.242 غم من base Tris ، و 57 ميكرولتر من حمض الخليك الثلجي و 1 مل من 0.5 مولار من EDTA محلول
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.

الإيثانول 70%

الإيثانول 100

الكلوروفورم

طريقة العمل :

1. يتم اخذ 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 ميكرولتر من محلول التحلل عن طريق استخدام المايكروبابيت.

3. لإزالة معظم البروتينات وبقايا الخلايا ، يتم إضافة 66 مايكرو ليتر من محلول كلوريد الصوديوم 5 مولار مع المزج لجيد، 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 اضافة 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 الايثانول 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 .DNA (الراسب)
10. يتم تجميد الحمض النووي عند -20 درجة مئوية لحين الاستخدام لاحقا.