

الجامعة	الانبار
الكلية	التربية للنبات
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 النبات
عنوان المحاضرة باللغة الإنكليزية	Extraction DNA from plant
رقم المحاضرة	5
المصادر او المراجع	Bergtrom,Gerald.Basic Cell and Molecular Microbiology and Molecular Biology Reviews

استخلاص 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:

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

يحضر 100 مل منه بأذابة 8.2 غم من NaCl و 1.57 غم من Tris-Hel و 0.744 غم من Na₂ EDTA و 2 غرام من CTAB. ثم يعدل ال PH الى 8 ويعقم بالموصدة .
ثانيا :محلول الغسل Washing buffer : حضر 100 مل منه بإذابة 0.136 غم من خلات الأمونيوم في 76 مل إيثانول مطلق وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .
ثالثا: محلول كلوروفورم: كحول الأيزواميلي (1:24): حضر 100 مل منه بمزج 96 مل من الكلوروفورم مع 4 مل من الكحول الأيزواميلي وحفظ في قنينة محكمة معتمدة عند درجة حرارة 4 م .
رابعا : محلول TE : والذي يتكون من:

• Tris-Hcl مولار 0.01

• Na₂ EDTA مولار 0.001 .

أكمل 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 م 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 الأيزواميلي (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 الأيزوبروبانول المبرد ومن ثم تمزج بالتقليب الهادئ إلى أن تظهر خيوط بيضاء تمثل خيوط ال DNA اما في حالة كون كمية ال DNA قليلة لا تظهر 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 DNA تماما.

9. وبعد ذلك تحفظ عينات ال DNA (Stock sample) في درجة حرارة - 20م لاستعمالها في التجارب اللاحقة.

