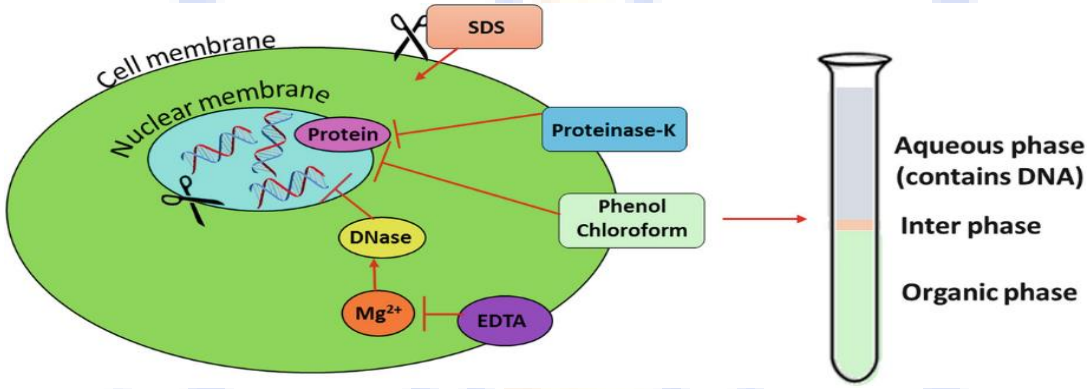
الكلية	التربية للعلوم الصرفة
القسم	علوم حياة
المادة باللغة الانجليزية	Practical Molecular Biology
المادة باللغة العربية	البايولوجي الجزيئي العملي
المرحلة الدراسية	الرابعة
اسم التدريسي	م.م. حسين رياض عبدالكريم
عنوان المحاضرة باللغة الانجليزية	DNA extraction from Bacteria
عنوان المحاضرة باللغة العربية	من البكتريا DNA استخلاص الحامض النووي
رقم المحاضرة	4
المصادر والمراجع	Watson, J.D.; Baker, T.A,; Bell, S.P.; Gann, A. (2004). Molecular .Biology of the Gene. 5th Ed. Pearson edution
	Clark, D. (2006). Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution. Elsevier Inc.
	Santos, D.M. (2011). Genetic Engineering, Recent Developments in application. Apple Academic press.
	عماش، هدى صالح مهدي.(١٩٩٤). مبادئ علم الحياة الجزيئي. كلية العلوم . جامعة بغداد.
	البكري ، غالب حمزة.(١٩٩٠). مبادئ الهندسة الوراثية. جامعة البصرة.

محتوى المحاضرة

UNIVERSITY OF ANBAR

البايولوجي الجزيئي العملي

لطلاب كلية التربية للعلوم الصرفة \ قسم علوم الحياة \ المرحلة الرابعة



UNIVERSITY OF ANBAR

المختبر الرابع: استخلاص الحامض النووي DNA من البكتريا

تنمية الخلايا:

1. تنشر البكتريا المراد استخلاص الاحماض النووية منها على وسط صلب ملائم وتحضن بدرجة37 م لمدة24 ساعة، بعدها تؤخذ مستعمرة منفردة وتستعمل لتلقيح50 مل من وسط لوريا السائلLuria broth وتحضن بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة.
2. ينقل المزروع السائل إلى أنبوبة بولي اثيلين معقمة و ينبذ بسرعة4000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق.
3. يزال الرائق ويعلق الراسب في5 مل من دارئ TE ثم تنبذ الأنابيب بسرعة 4000 دورة/دقيقة .
4. تكرر الخطوة السابقة (عملية الغسلWashing) لمرتين بعدها يعلق الراسب في5 مل من الدارئ وتحفظ الانابيب بدرجة 4 م لحين الاستعمال .

♦ استخلاص الدنا DNA Extraction

اولا : مرحلة تحليل الخلايا Cell lyse.

1. انقل المزروع البكتيري الى انبوبة ابندروف 1.5 ml.
2. ضعها في جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000-16000 دورة لمدة دقيقة واحدة .
3. اضف 200µ l من محلول GT buffer الى الانبوبة ثم رجها بقوة
4. احضنها بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.
5. اضف 200 µl من محلول بفر GB ثم رج بقوة لمدة 5 ثوان .
6. احضن بدرجه 70 °م لمده 10 دقائق.
7. اضف 5 µlمن محلولRNase الى الانبوبه .
8. احضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.

ثانيا: ربط الـ DNA Binding - DNA.

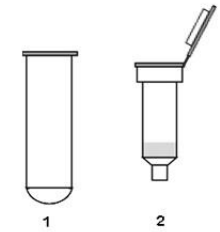
9. اضف 200 µl من محلول الكحول المطلق 100% (الايثانول) المركز ثم رج الانبوبه بقوة.
10. ضع انبوبة spin column GD في داخل انبوبة جمع collection tube ثم انقل محتويات الانبوبه اليها .
11. ضع الانبوبة في جهاز السنترفيوج بسرعة 14-16000 دورة لمدة 2 دقيقة .

ثالثاً: مرحلة الغسل (غسل العينة Washing).

12. استبدل انبوبة الجمع بواحدة جديدة .
13. اضف 400 µl من Wash 1 الى انبوبة GD.
14. ضع الانبوبة في جهاز السنترفيوج بسرعة 14-16000 دورة لمدة 30 ثانية.
15. اضف 600 µl من محلول الغسل Wash buffer .
16. ضع الانبوبة في جهاز السنترفيوج بسرعة 14-16000 دورة لمدة 30 ثانية.

رابعا: مرحلة الاذابة Elution.

17. انقل انابيب GS الى انبوبة ابندورف 1.5 ml جديدة .
18. اضف 100 µl من محلول Elution buffer مسخن مسبقا في الحمام المائي بدرجة حرارة 60˚.
19. اترك الانبوبة لمدة 3-5 دقائق حتى يمتص المحلول من قبل اغشية السيليكا.
20. ضع الانبوبة في جهاز السنترفيوج بسرعة 14-16000 دورة لمدة 30 ثانية، بعدها تهمل انبوبة GS ثم خذ انبوبه الابندروف واحكم اغلاها واخزنها في درجة حرارة -4˚ م في التجميد لحين استعمالها لاحقا في الفحوصات المطلوبة .

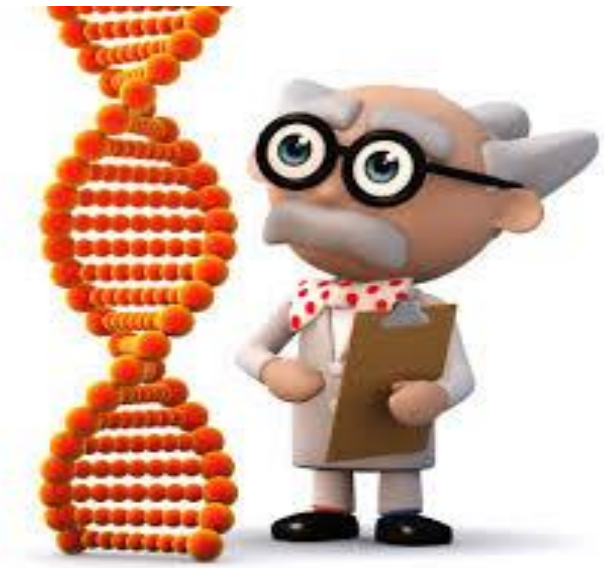


1 collection tube: volume 2ml
2.Spin column:volume 0.8 ml

Binding ability

Plasmid/genomic DNA
up to 15-30 µg
RNA max to 60-100 µg

Thank you for listening



UNIVERSITY OF ANBAR