تجربة عـــــزل البـــلازميـــــــــــد
Experiment: PLASMID ISOLATION

Extraction of Bacterial Plasmid DNA from *Escherichia col*

الأدوات Material & Reagents:

مزارع نقية من Lauria Bertani لبكتيريا القولون.
أنابيب طرد مركزي سعة ١,٥ مل
أنابيب مرق LB بها ١٠٠ ملجم/مل من المضاد الحيوي البنسلين Ampicillin.

المحلول الأول Solution I
50mM Glucose
25mM Tris HCl
10mM EDTA

المحلول الثاني Solution II
1% SDS
0.2 N NaOH (pH 12.0)

المحلول الثالث Solution III
3M Sodium Acetate (pH 5.0)

المحلول المنظم TE Buffer
10mM Tris-HCl
10 mM EDTA

RNase (1mg/ml)

Phenol: Cholorophorm: Isoamyl alcohol (25:24:1)

Absolute Ethanol
70% Ethanol
1% agarose gel & an electrophoresis apparatus

طريقة العمل Procedure:

١. يلقح ملىء عقدة من مزرعة حديثة لبكتيريا القولون في حجم ٥ مل من مرق LB يحتوي على ١٠٠ ملجم/مل من المضاد الحيوي أمبسيللين Ampicillin وتحضن عند ٣٧ م في حضان الهزاز لمدة ١٦ ساعه.
٢. ثم ينقل ١,٥ مل من المزرعة إلى أنبوبة طرد مركزي ويطرد لمدة ٥ دقائق بسرعة ٦٠٠٠ لفة / دقيقة عند ٤م ثم يزال الرائق.
٣. يضاف إلى الراسب ١٠٠ ميكرولتر من المحلول الأول وتعلق به الخلايا باستخدام جهاز الرج vortex.
٤. يضاف ٢٠٠ ميكرولتر من المحلول الثاني المحضر حديثاً ويخلط بالتقليب ثم يحضن في حمام ثلجي لمدة ٣ دقائق. يستدل على التحلل الكامل للخلايا بظهور محلول لزج ورائق من البلازميد الموجود في الرائق.
٥. يضاف ١٥٠ ميكرولتر من المحلول الثالث المبرد بالحمام الثلجي ويحضن الأنبوب في الحمام الثلجي لمدة ٥ دقائق.
٦. يرسب المركب المعقد بالطرد المركزي بسرعة ١٥,٠٠٠ لفة/دقيقة لمدة ٥ دقائق عند ٤م. ثم ينقل الرائق (الذي يحتوي على البلازميدات) بحذر إلى أنبوبة ابندروف معقمة اخرى.
٧. يضاف للرائق حجم مماثل من كحول الأيزوبربانول ثم يخلط ويرسب بسرعة ١٥,٠٠٠ لفة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق عند ٤ م.
٨. يغسل الراسب بمقدار ١ مل من كحول الإيثانول ٧٠% بالطرد المركزي ثم تجفف الراسب ويذاب في ٥٠ ميكرولتر من المحلول المنظم TE Buffer.
٩. يضاف ١٠ ميكرولتر من انزيم RNase ويحضن في حمام مائي عند ٣٧ م لمدة ساعة.
١٠. ثم ينقى باستخدام خليط الكلوروفورم والفينول كالتالي:
   a. يخلط محلول الحمض النووي مع حجم مماثل من الكلوروفورم والفينول ثم يطرد بسرعة ١٠,٠٠٠ لفة/دقيقة لمدة ٥ دقائق.
   b. تنقل الطبقة العليا إلى أنبوبة معقمة ويضاف حجم مماثل من الكلوروفورم ويطرد بسرعة ١٠,٠٠٠ لفة/دقيقة لمدة ٥ دقائق.
   c. ينقل الطبقة العليا إلى أنبوبة معقمة وتخلط مع ١/١٠ من محلول اسيتات الصوديوم 3M NaOAc و 2.5 مل من الإيثانول. وتترك لترسب لمدة ساعة في درجة حرارة -٢٠ م .
   d. تطرد العينة بسرعة ١٠,٠٠٠ لفة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق.
   e. يضاف ١ مل من الإيثانول ٧٠% إلى الراسب ثم يرج بال vortex ويطرد بسرعة ١٠,٠٠٠ لفة/دقيقة لمدة ٥ دقائق.
   f. يترك الراسب ليجف في الهواء ثم يعاد إذابة البلازميد في حجم ملائم (٤٠ ميكرولتر) من المحول المنظم TE Buffer.
١١. يتم فصل ٥ ميكرولتر كمن الحمض النووي البلازميدي في ١% من جل الأجاروز ويفصل بجهار الفصل الكهربي وتفحص القطع تحت الأشعة فوق البنفسجية ويحدد الوزن الجزيئي بالمقارنة مع DNA marker.
١٢. يحتفظ بالعينات المتبقية في درجة حرارة -٢٠ م للإستخدام في التجارب التالية.