خطوات استخلاص الحمض النووي الـ DNA من النبات بطريقة CTAB

و تفاعل البلمرة المتسلسل

الأدوات

عينة بذور	طقم استخلاص DNA	تفاعل البلمرة المتسلسل
هاون و مدقة	نيتروجين سائل	ماصات دقيقة بملحقاتها
أنابيب دقيقة	الإيثانول المطلق (الثلج البارد) 70 ٪ من الإيثانول (الثلج البارد)	أنابيب دقيقة
جهاز طرد مركزي	7.5 ام امونيوم أسيتات(او 7.5 M خلات الصوديوم)	جهاز pcr
حمام مائي 55مْ	كلوروفورم: ايزو اميل الكحول (24: 1)	
ماصات دقيقة عدة أحجام بملحقاتها	الماء معقم	
O.D كيوفيت كرستال اوزجاج	TE puffer	
جهاز قياس الطيف الضوئي	محلول منظم CTAB buffer	
spectrophotometer		

خطوات العمل

1- طحن ٢٠٠ ملغم من البذور النباتية (بوجود النتروجين السائل) ومن ثم إضافة ٥٠٠ ميكرولتر من محلول منظم CTAB.

2-ينقل الخليط لأنبوبة صغيرة ثم يحضن في حمام مائي ٥٥ درجة مئوية لمدة 15 دقيقة

3- بعد التحضين تنقل لطرد المركزي في جهاز الطرد المركزي ١٢٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ٥ دقائق.

4-ينقل الرائق إلى أنابيب طرد مركزي دقيقة ولكل أنبوبة يضاف ٢٥٠ ميكرولتر من خليط الكلوروفورم او (الكلوروفورم : كحول الايزواميل) .

5-يخلط بالتقليب إلى أن يتكون مستحلب, ثم يطرد بالطرد المركزي ١٣٠٠٠ دورة/دقيقه لمدة دقيقه.

6-تنقل الطبقة المائية العليا فقط إلى أنبوبة نظيفة ويضاف لها ٥٠ميكرولتر من خلات الصوديوم و مباشرة ٥٠٠ ميكرولتر من الكحول الاثيلي المطلق المبرد.

7-تقلب الأنابيب عدة مرات بخفه لترسيب الحامض النووي دون تكسيره وعندها يمكن رؤية الراسب الخيطي للحمض النووي. (او يمكن وضع الانابيب لمدة ساعة في ثلج -20مْ بعد إضافة الكحول السابق) لترسيب DNA

8- لغسل الحمض النووي يرسب باستخدام طرد مركزي ثم يتخلص من الطبقة الرائقة ويضاف 500 ميكرولتر من الكحول الاثيلي الثلجي ٧٠٪ وتقلب الأنبوبة بخفه وتعاد هذه الخطوة بالطرد المركزي ١٣٠٠٠ دورة/دقيقه لمدة دقيقه حتى يتكون الراسب ابيض في قاع الأنبوبة.

9-يتم التخلص من الرائق ويترك راسب الحامض النووي ليجف بالهواء (١٥دقيقة تقريبا) تتم العملية في كابينة عزل معقمة, نتخلص بهذه الخطوة من الكحول.

10- يعاد إذابة الحمض النووي في الماء المقطر او TE puffer.

11- في حال توفر إنزيم Rnase (١٠ ميكروغرام/مل) يضاف إلى الماء قبل إذابة محلول الحمض النووي DNA في الماء (١٠ميكرولتر /مل من الماء)

12- يتم تقدير نقاوة الحمض باستخدام spectrophotometer

12- تخزين العينة من الحمض النووي DNAفي تجميد العميق . للأسبوع القادم بحول الله

هناك العديد من الطرق المستعملة لقياس نقاوة DNA في العينة منها:

جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer

تقاس نقاوة الأحماض النووية عند طول موجي 260 و280

= 260 مقسمة على 280 وتسجل القراءة

<u>طريقة العمل:</u>

1) يصفر الجهاز بواسطة المحلول المنظم المستخدم في حفظ محلول الاحماض النووية المرسب بوضع 1 مل منه لوحده في cuvette.

2) تغسل الكيوفيت بالماء المقطر وتوضع 1مل من محلول الاحماض النووية المراد قياسه وتقاس الامتصاصية على 280 ثم تقاس على 260.

3) لمعرفة <u>تقدير نقاوة الـDNA</u> في المحلول تطبق المعادلة :

<u>تقدير نقاوة الـDNA</u>

$$\text{Purity of DNA} = \frac{\text{O.D}_{260}}{\text{O.D}_{280}} \geq 1.8$$

أي تحسب امتصاصية عينة الـDNA عند الطول الموجي 260 نانوميتر ثم تحسب الامتصاصية للعينة نفسها عند الطول الموجي 280 نانوميتر وبعد قسمة الامتصاصية الاولى على الثانية يجب ان يكون الناتج اكبر من او يساوي 1.8 واذا كان <u>اقل</u> فهذا يعني ان العينة غير نقية وتحتاج تنقية او اعادة استخلاص.

التجربة الثانية : تفاعل البلمرة المتسلسل (مضاعفة قطع DNA بجهاز PCR)

مكونات محلول التفاعل PCR : يتم إضافة المكونات التالية في أنبوبة خاصة بجهاز pcr

محلول التفاعل	الكمية بالميكروليتر (x1)
Distiller water ماء مقطر	1.7µl
PCR Buffer محلول منظم	2.5µl
dNTP القواعد النيتروجينية	2 µl
Forward primerالبادئ الأمامي	0.6 µl
Reverse primer البادئ الخلفي	µl0.6
DNA عينة الحمض	2 µl
Taqpolymerse الانزيم القاطع	0.3 µl
Total volume المجموع	µl25

نوع تسلسل البادئ المستخدم Primers

Forward 5-GGTAAGGCTACCACTTGCAT-3

Reverse 5-CTACTAACGCTTGGCTGGCA-3

برنامج التفاعل

استخدام جهاز الثرموسايكلر , وقد طبق البرنامج التالي للـ pcr وهو برنامج مشابه لبرنامج (Nagaraju cl al,2002) مع التعديلات التالية :

STEPS	TM درجة الحرارة	TIME الوقت
1- Initial denaturation step	94c	1min
2-Denaturation step	94c	30 sec
3- Annealing step	48c	40 sec
4-Extension step	72c	40sec
5-Final extension	72c	5min
6-Chilling	4c	

تكرار الخطوات من 35(4-2) دورة , بعد انتهاء ال 35 دورة تتم الخطوتين 6,5 وقبل التحميل على هلام الاجاروز تجرى المعاملة الحرارية في الجهاز كالتالي :

7-Bands dispersal	75	3min
8- Chilling (cooling)	4	2min