Lab 1&2

إستخلاص DNA من بكتريا *Escherichia coli*

Escherichia coli as a Model Organism :

Microbes are tools used in many basic procedure .For example, when scientists want to clone or make copies of genes , they will typically introduce the genes in to lab strains of *Escherichia coli*.

E.coli is the best – known and most useful microbe in the field of Microbial Genetics. The value of E.coli in recombinant DNA makes it a good model organism for students to study the genetic material .

Some reasons for the use of *E.coli* in Microbial Genetics:

1. *E.coli* reproduces rapidly (under optimal situation 0.5 hr/generation) such that results for a number of experiments can be quickly obtained .

2. Using recombinant DNA techniques , *E.coli* can be manipulated in research laboratories and in the classroom to produce any DNA ,RNA or protein

3. *E.coli* is the most highly studied microorganism and an advanced knowledge of its protein expression mechanisms makes it simpler to use for experiments where expression of foreign proteins and selection of recombinants is essential.

4. Ability to Host Foreign DNA. Most gene cloning techniques were developed using this bacterium and are still more successful or effective in *E.coli* than in other microorganisms.

5. *E.coli* is readily transformed with plasmids and other vectors , easily undergoes transduction , and preparation of competent cells (cells that will take up foreign DNA) is not complicated . Transformations with other microorganisms are often less successful.

مراحل عملية الاستخلاص: Basic Steps of DNA Extraction

1- تهيئة الخلايا او العينة Sample or Cell preparation

اذا كانت المستعمرات البكتيرية نامية نامية في وسط لوريا Luria Broth فيتم عمل طرد مركزي لترسيب البكتريا واهمال الرائق واخذ راسب البكتريا المعلق بكمية من LB ومن ثم ينقل الى tube 1.5 ml وعمل طرد مركزي واهمال الرائق.

2- غسل الخلايا Cells Wash

تغسل الخلايا باستخدام محلول Saline – EDTA على الاقل ثلاث مرات ومن ثم نعمل طرد مركزي لإهمال الرائق واخذ الخلايا المترسبة. تمثل هذه الخطوة مع الخطوة السابقة عملية ال cell harvesting

3- تحليل الجدار او الغشاء الحيوي Cell wall and membrane lysis

تعتمد هذه الخطوة على نوع الخلية المراد استخلاص DNA منها حيث تختلف الخلايا الموجبة عن الخلايا السالبة لصبغة غرام , اذ يتم تحليل الجدار الخلوي انزيمياً عند إستخلاص DNA من البكتريا الموجبة لصبغة غرام مثل إستخدام اللايسوزايم Lysozyme .

نتيجة لهذه الخطوة سنحصل على حلالة الخلايا cell lysate الذي يحتوي على كل المكونات الخلوية بضمنها ال DNA .

4- مسخ البروتينات والانزيمات و ازاله الشوائب Protein precipitation

للتخلص من كل المكونات الخلوية عدا DNA يتوجب علينا مسخ البروتينات والتخلص من الدهون. ان مسخ البروتينات وPhospholipids هو فقدان ذائبية هذه المواد وبالتالي يمكن ترسيبها وفصلها وبقاء DNA ذائب في المحلول المائي وبالتالي تسحب الطبقة المائية الحاوية على DNA للخطوات اللاحقة لترسيب DNA.

5- ترسيب الـ DNA باستخدام الكحولات Dehydration

ويتم ذلك من خلال استخدام كحول الايثانول او الايزوبروبانول اوالكحول الايزواميلي والذي يعمل بدوره على عملية سحب الماء Dehydration وترسيب الدنا.

6- غسل جزيئات الحامض النووي Washing

ويتم ذلك من خلال استخدام كحول الايثانول او الايزوبروبانول اوالكحول الايزواميلي والذي يعمل بدوره على عملية سحب الماء Dehydration وبالتالي غسل الدنا.

7- اعادة جزيئات الحامض النووي الى حالتها الذائبة Rehydration

ويتم ذلك من خلال استخدام دارئ TE (pH 8.4) والذي بدوره يحافظ على الدنا بالهيئة الذائبة

طريقة المذيبات العضوية Organic Solvent Method

يستخدم خليط من المذيبات العضوية بعد عمليه تحطيم الخلايا لغرض التخلص من الاملاح والبروتينات التي تنفصل في طبقه المذيبات العضوية ويبقى الحامض النووي في الطبقة المائية , من المحاليل العضوية المستخدمة الفينول والكلوروفورم والكحول الايزواميلي

المواد المستخدمة في هذه الطريقة:

1- دارئ TE :

يحضر بإذابة 10 ملي مولر من Tris-Hcl و 1 ملي مولر من EDTA في كمية من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني الى 8 ثم اكمل الحجم الى لتر واحد بالماء المقطر وعقم بالمؤصدة. يستخدم لإذابة الدنا ويحافظ عليه وممكن ان يحفظ لفترات طويله تحت درجه حراره تراوح من 4 الى - 20 مئوي.

2- محلول SDS بتركيز 25% :

حضر بإذابة 25 غم من مادة SDS في 100 مليلتر من محلول Saline-EDTA وضبط الاس الهيدروجيني إلى8. يستخدم لمسخ البروتينات وتذويب الدهون Lipid Solublization وبالتالي تحطيم الاغشية الخلوية وخروج مكونات الخلية بضمنها الدنا.

3- محلول 5 مولار كلوريد الصوديوم

حضر هذا المحلول بإذابة 282.5غم من كلوريد الصوديوم في لتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة بدرجة 121°م وضغط 15 باوند/انج^2 لمدة 15 دقيقة.

4- خليط المذيبات العضوية Organic Solvent Solution

تم تحضير هذا الخليط انياً بمزج الكلوروفورم والكحول الايزواميلي بنسبة (1:24). يستخدم هذا الخليط لتكون طبقتين معزولتين تماما الطبقة المائية الحاوية على الدنا وطبقة المذيبات العضوية الحاوية على بقية المكونات.

طريقه العمل:

1) تلقيح 10 مل من الـ Lauria Bretani broth (LB) بمستعمرة مفردة نقيه وفتية من بكتريا الـ *E. coli*, وتحضن لمدة 18 ساعة بدرجة حرارة 37 م

2) يتم اجراء طرد مركزي للمزرعة البكتيرية بسرعة 6000 دورة / الدقيقة لمدة نصف ساعة ثم اهمل الراشح وخذ الراسب .

3) يغسل الراسب بـ 2 مل من دارئ TE ثم ينبذ بسرعة 6000 دورة / الدقيقة لمدة 15 دقيقة, تم تكرر عملية الغسل لمرتين او ثلاث مرات .

4) يضاف 600 مايكروليتر من محلول الـ SDS تركيزه 25% واختياريا 2 مايكروليتر من محلول الـ RNase ويوضع في حمام مائي بدرجة 55 م لمده ربع ساعه.

6) يضاف 2 ملليلتر من محلول كلوريد الصوديوم بتركز 5 مولاري ويتم تقليب الانبوبة مرتين او ثلاث مرات ثم تترك الانابيب بدرجة حرارة الغرفة .

7) يضاف (حجم/ حجم) من خليط الكلوروفورم – الكحول الايزواميلي (24: 1) وتقلب الانابيب برفق لمدة نصف ساعة ,ثم تنبيذ الانابيب بالمنبذ المبرد بسرعة 6000 دورة/ الدقيقة لمدة نصف ساعة , تكرر هذه الخطوة 2-3 مرات . كنتيجة لهذه الخطوة ستتكون طبقتين عليا مائية حاويه على الدنا وطبقة المذيبات الى الاسفل منها حاوية على بقية المكونات.

8) يتم سحب الطبقة المائية الحاوية على الدنا بهدوء وتنقل الى انابيب نظيفة ومعقمة ,ثم يضاف لها كحول ايزوبروبانول و تقلب الانابيب بهدوء الى ان تظهر شبكه مرئية بيضاء (DNA).

9) ترفع شبكة الـ DNA المترسبة بواسطة ماصة باستور ذات نهاية معقوفة ومغلقة و تنقل الى انابيب ابندروف معقمة وتغسل بكحول الايثانول تركيزه 70% المبرد الى درجة 5 مئوي لمرتين الى 3 مرات ,ثم تترك الانابيب بدرجة حرارة الغرفة نصف ساعة لغرض تطاير الايثانول .

10) يذاب راسب الـDNA بأضافة 50 مايكروليتر من دارئ الـ TE ثم تحفظ بدرجة (-20 م) لحين الاستعمال.

ملاحظه

- اذا كانت البكتريا موجبه لصبغه غرام يجب استخدام انزيم خاص (lysozyme) لغرض خلخله جدار الخليه قبل اضافه محلول الـSDS وبالتالي سهوله تحطيمه

- يتم استخدام انابيب ابندروف او انابيب خاصه من البولي اثلين ولاتستخدم الانابيب الزجاجيه او انابيب البلاستيك الاعتياديه (لماذا)

- ان ماده الـ EDTA ماده مخلبيه chelating agent فادئتها سحب الذرات الموجبه من جدار الخليه مما يسبب خلخلته وسهوله تحطمه

- ماده الـ SDS ماده منظفه detergent تستخدم لمسخ البروتينات

- يجب ان يكون الاس الهيدروجيني للمحاليل المستخدمه 8 (لماذا)

5- دارئ التحميل (Loading buffer) :

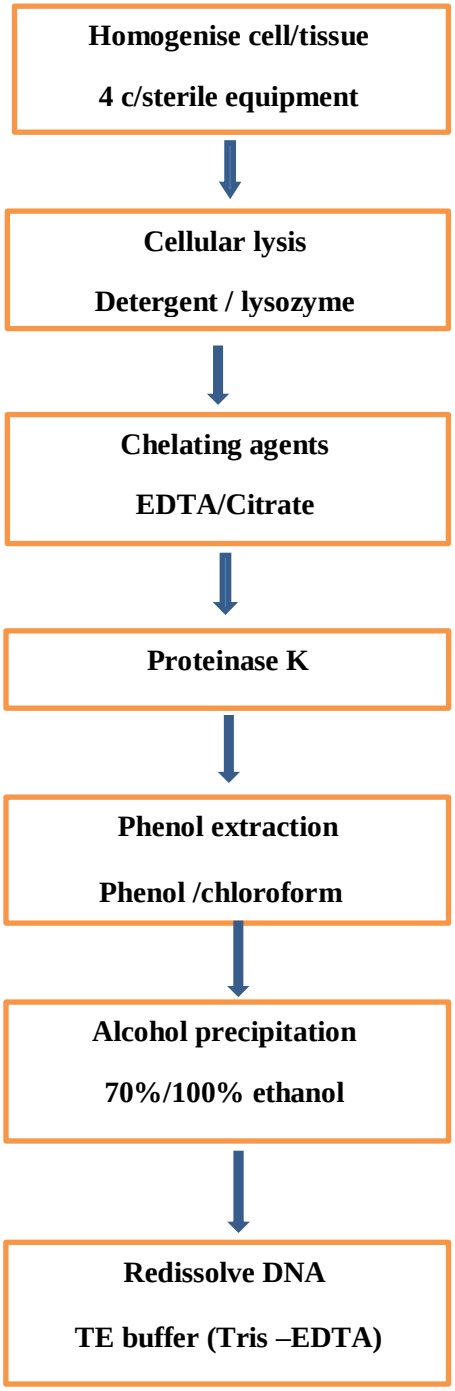
حضر بإذابة 4 غم من مادة السكروز في 10 مل من الماء المقطر واضيفت اليه صبغة بروموفينول الازرق (Bromophenol blue) وحفظ بدرجة حرارة 4 م لحين الاستعمال.

6- دارئ TBE :

حضر بإذابة 0.089 مول من مادة Tris-base و 0.089 مول من حامض البوريك و0.002 مول من EDTA في كمية من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 8 ثم أكمل الحجم إلى 1 لتر وعقم بالموصدة و فيما بعد حفظ بدرجة 4 م لحين الاستعمال

7- الايزوبروبانول يستخدم لترسيب الـ DNA

8- الايثانول يستخدم لغسل الـ DNA



Flow diagram indicating the general steps involved in DNA extraction