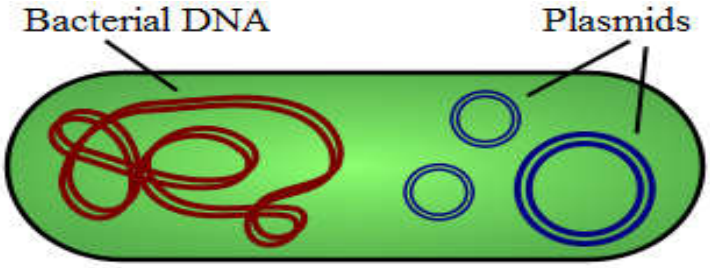
Lab (4): تحضير الدنا البلازميدي من خلايا البكتريا

Isolation of Plasmid DNA

البلازميد : هي عبارة عن دنا يقع خارج جزيئات الدنا الكروموسومية له القابلية على التضاعف بمعزل عن الدنا



الكروموسومي.

هنالك طرق عديدة لعزل الدنا البلازميدي وهي :

١- طريقة التحلل القاعدي Alkaline lysis method

٢- طريقة التحلل بالغليانBoiling lysis method

٣-Phenol method

٤-Ethidium bromide- Caesium chloride density gradient centrifugation method

تحضير الدنا البلازميدي بواسطة طريقة التحلل القاعدي:

١. لقح وسط مكون من (**500 مل من LB broth + 50mg/ml امبيسيلين**) ب مستعمرة مفردة من سلالة بكتريا ***E. coli*** حاوية على بلازميد PBR 322 ثم احضن في حاضنة هزازة على درجة **37 C** حتى تصل الكثافة الضوئية OD 600 للوسط الى 0.6 .

٢. اضف 1.2 ml10% (w/v) من chloramphenicol in ethanol الى الوسط ومن ثم احضن في حاضنة هزازة لمدة يوم كامل ليتحرر البلازميد في الخلية.

٣. احصد الخلايا بواسطة الطرد المركزي (سرعة 6000 دورة/ دقيقة لمدة 1 دقيقة على درجة حرارة ٤ مئوية) ومن ثم اعد تعليق الراسب في 5 ml من محلول واحد (TEG buffer) .

محلول واحد مؤلف من (25 mM of Tris + 10 mM of EDTA + 50 mM of Glucose).

٤. حلل معلق الخلايا باضافة 10 ml من محلول الاثنان و اخلطه بعناية.

محلول اثنان مؤلف من (0.2 M of NaOH + 1% OF SDS (Ph=12.5)) .

٥. اضف 5ml من المحلول الثالث المثلج و قلبه لخمس مرات و من ثم احفضه مثلج لمدة 15 دقيقة .

المحلول الثالث مؤلف من (3M of K-acetate (pH=4.8)).

٦. قم باجراء طرد مركزي للمعلق المستحلببسرعة 1000 دورة/ دقيقة لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة 4 مئوية.

٧. انقل الراشح الرائق المحتوي على البلازميد الى انبوبة جهاز الطرد المركزي اخرى ولاحظ الحجم.

٨. اضف 0.7 حجم من isopropanol المبرد الى الراشح و اخلطه بالتقليب ومن ثم قم باجراء طرد مركزي بسرعة 1000 دورة/ دقيقة لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة 4 مئوية.

٩. تخلص من الراشح و قم بغسل الراسب ب 70% ايثانول لكن لاتعلق الراسب.

١٠. اعد تعليق دنا البلاميد في 1ml من TE buffer و جمده.