

LAB(5)

: تحضير الدنا من خلايا حقيقية النواة

اولا // استخلاص DNA من غدة ثايمس العجل DNA extraction from Calf Thymas Gland المواد و المحاليل:

- محلول 0.85% (وزن/حجم) كلوريد الصوديوم + 0.01 مولاري سترات الصوديوم يحضر باذابة 0.85 غرام من كلوريد الصوديوم و 0.3 غرام من سترات الصوديوم في كمية من الماء المقطر، ويكمل الحجم الى 100 مللتر بالماء المقطر ويعقم بالموصدة لمدة 10 دقائق ، ويحفظ في الثلجة.
- محلول 5% SDS (وزن/حجم) يحضر باذابة 5 غرام من مادة SDS في كمية من محلول 45% (حجم/حجم) ايثانول ويكمل الحجم الى 100 مللتر بالمحلول نفسه.
- ملح كلوريد الصوديوم الصلب
- غدة ثايمس العجل (تجمد قبل عملية الاستخلاص)
- جهاز خلاط مختبري مبرد Blender
- ايثانول 96% مبرد
- ايثانول 70%
- محرك ميكانيكي
- زجاجيات مختلفة

طريقة العمل :

1. يؤخذ 25 غرام من الغدة و تقطع الى قطع صغيرة و توضع في خلاط مبرد و يجري مجانستها لمدة 3 دقائق بعد اضافة 100 مللتر من محلول كلوريد الصوديوم- سترات الصوديوم المبرد . ينبذ المزيج بالمنبذة المبردة بسرعة 3000 دورة بالدقيقة لمدة 15 دقيقة، يهمل الراشح و يعاد مجانسة الراسب مرتين بالاسلوب ذاته.
2. يوضع الراسب في بيكر يحوي على 500 مللتر من محلول 0.85% كلوريد الصوديوم المبرد مع التحريك المستمر باستعمال محرك ميكانيكي، يضاف للمزيج 50 مللتر من محلول SDS 5% ، ويستمر التحريك لمدة ساعة واحدة بدرجة حرارة الغرفة.
3. يضاف للمزيج 27.5 غرام من كلوريد الصوديوم و يستمر التحريك لمدة 15 دقيقة (ضمنان نوبان الملح بصورة تامة) ، ينبذ المزيج بالمنبذة المبردة بسرعة 10000 دورة بالدقيقة لمدة 30 دقيقة . يهمل الراسب البروتيني (الابيض اللون) ويضاف للطافي حجم مساوي من 96% ايثانول مبرد لغرض ترسيب DNA الذائب. يجمع DNA المترسب وذلك بلفه على قضيب زجاجي Spooling ، ثم يغسل ثلاث مرات و يوضع في فرن كهربائي بدرجة حرارة 40 مئوية حتى يجف بصورة تامة .

خطوة اختيارية: لتتقية DNA الكروموسومي الخام المستخلص يجرى الاتي:

- ينوب DNA الخام الجاف في 350 مللتر من الماء المقطر المعقم مع التحريك المستمر لمدة 3-2 ساعات بدرجة حرارة الغرفة ، ثم يضاف للمزيج 32 مللتر من محلول 5% (وزن / حجم) SDS ويستمر التحريك لمدة ساعة واحدة ثم يضاف 22.5 غراما من كلوريد الصوديوم. ينبذ المزيج بالمنبذة

المبردة بسرعة 13000 دورة بالدقيقة لمدة 30 دقيقة ، يهمل الراسب البروتيني . يرسب و يجفف
DNA الذائب كما مبين اعلاه .

ثانيا // استخلاص DNA من الموز

طريقة العمل:

1. يتم تقشير موزتين ثم يضاف اليهما 250 ml من الماء المعقم ثم يتم سحقهما الى ان يصبح المحلول مستحلب (محلول A).
2. يتم مزج (كلا على حدا) ملعقة شاي من الشامبو مع كميتين باطراف الاصابع من ملح الطعام ، ثم تضاف اربعة ملاعق شاي من الماء المقطر ، ويتم مزج الخليط مع تجنب الفقاعات (محلول B) .
3. تضاف ملعقتي شاي من محلول A مع جميع محلول B ، وتمزج لمدة 10 دقائق (محلول C) .
4. يتم تقسيم المحلول الناتج الى قسمين C1 و C2 و يحفظ في مكان بارد.
5. يتم ترشيح محلول C1 خلال طبقتين من المناديل الورقية او عبر قماش في قده صغير ثم يوضع الراشح في انبوبة اختبار و يوضع C2 في انبوبة اختبار اخرى.
6. يضاف كحول ايثيلي بارد برفق و مع ميل الانبوبة (او isopropanol) وبدون رج الى كل الانبوبة.
7. تعاد كل انبوبة الى وضعها الطبيعي العمودي و يلاحظ ظهور DNA بشكل الياف مخاطية بيض اللون بين الطبقتين.
8. سيطفو DNA على الكحول الايثيلي خلال 15 دقيقة وفي الامكان جمعه بواسطة قضيب زجاجي .