

## العمل التطبيقي الأول: عزل DNA

- المزارع: نأخذ كلا من *E. coli B* و *S. marcescens* كلاهما نمت طوال الليل في مرق لوريا المغذي (LB broth) ثم تنقل كمية صغيرة من البكتيريا إلى وسط جديد مرق LB الطازج لتمكينها من النمو والتكاثر.

**LB broth: 10 g bacto-tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl per liter**

- المحاليل الكيميائية:

- ✓ TNE (10 mM Tris, pH 8.0, 10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA), autoclaved
- ✓ TE (10 mM Tris, pH 8.0, 0.1 mM EDTA), autoclaved
- ✓ HTE (50 mM Tris, pH 8.0, 20 mM EDTA). autoclaved
- ✓ %2sarcosyl (N-lauroyl sarcosine) in HTE
- ✓ RNase on ice (pancreatic RNase A, 10 mg/ml, in TE, preheated to 80°C for 10 minutes to inactivate DNases)
- ✓ Pronase on ice (10 mg/ml, in TNE, preheated to 37°C for 15 minutes to inactivate DNases)
- ✓ Phenol, equilibrated with 0.5 mM Tris, pH 8.0
- ✓ Chloroform (chloroform:isoamyl
- ✓ alcohol, 24:1)
- ✓ 3.0 M sodium acetate
- ✓ Isopropanol
- ✓ 70% ethanol
- ✓ Distilled water, autoclaved
- ✓ Restriction enzyme and control reaction mixes

- الوسائل:

- ✓ حاضنة بكتيرية (37 ° م) مع منصة رجّ داخلها .
- ✓ ميكروويف
- ✓ حمام مائي أو كتلة تسخين عند 37 درجة مئوية
- ✓ حمام مائي أو كتلة تسخين عند 50 درجة مئوية
- ✓ مستلزمات متنوعة
- ✓ قلم مخبري
- ✓ قفازات لاتكس (عند التعامل مع الحمض النووي؛ لحمايته من إنزيمات الديوكسي ريبونوكلياز على اليدين)
- ✓ ثلج

- ✓ أنابيب ميكروفيوج
- ✓ ماصّات باستير / لمبة شفط
- ✓ ماصة 1.0 مل / جهاز ماصّ
- ✓ ميكروماصّات / رؤوس ماصّات (1-10 ميكرو لتر، 10-100 ميكرو لتر، 100-1,000 ميكرو لتر)

#### • طريقة العمل:

- 1- نأخذ مزرعة نأخذ كلا من E. coli نمت طوال الليل في 2 مل من مرق لوريا المغذي (LB broth) في الحاضنة مع الرج
- 2- في الصباح تنقل كمية 2 مل من المزرعة إلى 50 مل من مرق LB الطازج ثم تحول إلى دورق سعته 125 مل يحضن بالرج في درجة حرارة 37 ° م.
- 3- نخرج الدورق الذي يحتوي على البكتيريا من الحاضنة المضبوطة على 37 درجة مئوية (من المتوقع أن تكون الثقافة في الطور اللوغاريتمي من النمو)، ثم نسحب 1 مل منها باستخدام ماصة وننقله إلى أنبوب الميكروفيوج. نضع الأنبوبة في جهاز الطرد المركزي الصغير بسرعة قصوى (14,000 دورة في الدقيقة) لمدة 15 ثانية. نسكب الطاف في وعاء نفايات، ثم نترك السائل المتبقي يتصفى على منديل. نتخلص من المنديل في كيس النفايات البيولوجية الخطرة.
- 4- نعد تعليق الحبيبة الخلوية في 0.3 مل من محلول HTE، مع المزج بلطف حتى يتم تفريق الخلايا بالكامل دون وجود تكتلات مرئية.
- 5- نضيف 0.35 مل من محلول 2% ساركوسيل في HTE. نمزج جيداً عن طريق إغلاق الأنبوب وقلبه رأساً على عقب عدة مرات. نلاحظ أن المحلول سيكون عكراً في هذه المرحلة. بمجرد اكتمال عملية التحلل (بعد الخطوة 6)، سيصبح المحلول أقل عكورة.
- 6- نضيف 5 ميكرو لتر من RNase، ثم نحضن العينة عند 37 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة. بعد ذلك، نضيف 35 ميكرو لتر من pronase، ونسخّن العينة عند 50 درجة مئوية حتى يكتمل التحلل، والذي يستغرق حوالي 30 دقيقة.
- 7- أغلق الأنبوب بإحكام، ثم قم بخلط العينة باستخدام جهاز الفورتكس لمدة دقيقتين على أعلى سرعة.
- 8- استخلاص الفينول والكلوروفورم: نضيف حجماً مساوياً (700 ميكرو لتر) من الفينول إلى العينة، ثم نرجّها جيداً ونقوم بعملية الطرد المركزي بأقصى سرعة لمدة 3 دقائق لفصل الطورين. باستخدام ماصة، اسحب الطور العلوي بعناية إلى أنبوب ميكروفيوج جديد، مع تجنب الطبقة البينية الرغوية. تخلص من نفايات الفينول في حاوية مخصصة ومعتمدة.
- 9- كرر الاستخلاص بإضافة حجم مساوٍ من الكلوروفورم، ثم قم بالطرد المركزي لفترة وجيزة لفصل الطورين. احرص دائماً على الاحتفاظ بالطور العلوي وتجنب سحب الطبقة البينية.

- 10- ترسيب الحمض النووي (DNA Precipitation) : نضيف 70 ميكرو لتر من أسيتات الصوديوم M 3 إلى العينة، ثم نمزج جيداً. بعد ذلك، نضيف حجمًا مساويًا (700 ميكرو لتر) من الأيزوبروبانول إلى العينة المخلوطة. نقوم بالمزج جيداً عن طريق الرجّ لضمان توزيع متجانس.
- 11- الطرد المركزي: نقوم بالطرد المركزي للعينة لمدة 5 دقائق بأقصى سرعة. عند إزالة الأنبوب من جهاز الطرد المركزي، نتحقق من وجود الحبيبة (pellet) في القاع. حتى لو لم تكن الحبيبة مرئية، فمن المحتمل أن يكون الحمض النووي موجوداً.
- 12- بواسطة ماصة باستير، نزيل أكبر قدر ممكن من السائل، مع الحرص على عدم إزعاج الحبيبة. إذا لم تتمكن من رؤية الحبيبة، تجنب سحب السائل من الجزء الخلفي السفلي للأنبوب لتقليل خطر فقدان الحمض النووي.
- 13- إعادة تعليق الحبيبة وتخزين العينة: نعيد تعليق الحبيبة الخلوية في 50 ميكرو لتر من الماء المقطر المعقم بالأوتوكلاف، مع المزج بلطف لضمان الذوبان الكامل.
- 14- قم بوضع ملصق على الأنبوب يتضمن: اسمك – التاريخ - اسم سلالة البكتيريا المستخدمة
- 15- تخزين العينة: احتفظ بالعينة في المجمّد لحين الحاجة، أو انتقل إلى الخطوة التالية.
- 16- وضع العلامات على الأنابيب:

- نضع الأحرف الأولى من اسمك على أنبوبين ميكروفيوج.
  - نضع ملصقاً على أحد الأنابيب باسم "EcoRI"، وهو اسم الإنزيم الذي ستستخدمه لهضم الحمض النووي (DNA)
  - نضع ملصقاً على الأنبوب الآخر باسم "Control"، ليكون بمثابة العينة الضابطة.
- 17- إعداد العينات لهضم الحمض النووي:
- ننقل 20 ميكرو لتر من عينة الحمض النووي إلى كل من الأنبوبين (EcoRI و Control)
  - نضيف 10 ميكرو لتر من محلول التقييد (restriction mix) إلى الأنبوب المسمى EcoRI.
  - نضيف 10 ميكرو لتر من محلول التحكم الخالي من الإنزيم (no-enzyme control mix) إلى الأنبوب المسمى "Control".

#### 18- تحضير العينات للهضم الإنزيمي والتخزين:

- نمزج كل عينة جيداً عن طريق الماصة، بسحب السائل وإعادته برفق عدة مرات لضمان تجانس المحلول.
  - نضع كلا الأنبوبين في كتلة حرارية (heat block) أو حمام مائي (water bath) عند 37 °C لمدة ساعة واحدة.
- يمكن أيضاً ترك العينات طوال الليل عند 37 °C لضمان الهضم الكامل.

تخزين العينات: بعد انتهاء فترة الحضانة، قم بتخزين العينات في المجمّد حتى يحين وقت إجراء الهجرة الكهربائية)