استخلاص الحمض النووي DNA من النسيج النباتي:

1. زني 200 mg من النسيج النباتي في انبوبة Eppendorf واضيفي لها 500µL من CTAB buffer ورجي جيدا بجهاز الفورتكس.
2. انقلي المخلوط السابق الى حمام مائي درجة حرارته 55°C لمدة 15 min.
3. تنقل الانابيب من الحمام المائي الى جهاز الطرد المركزي الدقيق Microcenterfuge وتدور فيه عند 12000 rpm لمدة 5 min.
4. يضاف للانابيب بعد ذلك 250µL من محلول Chloroform : Iso Amyl Alcohol (24:1), ورجي جيدا بجهاز الفورتكس.
5. تنقل الانابيب الى جهاز الطرد المركزي الدقيق Microcenterfuge وتدور فيه عند 13000 rpm لمدة 1 min.(ستفصل هذه الخطوة المخلوط الى طبقتين علوية وسفلية, الطبقة العلوية هي المطلوبة)
6. تنقل الطبقة العلوية (المحتوية عبى DNA) التي فصلت في الخطوة السابقة الى انبوبة Eppendorf جديدة.
7. يضاف لكل انبوبة 50µl of 7.5 M Ammonium Acetate, تتبع باضافة 500 µl of ice cold absolute ethanol.
8. تقلب الانابيب رأسا على عقب حتى يترسب DNA وللاسراع في ذلك تحضن في حمام مائي درجة حرارته 20°C لمدة ساعة.
9. بعد ترسيب DNA, تنقل الانابيب الى حمام ثلجي وتدور باليد فيه حتى يتبين لنا الراسب على شكل كتلة مرئية.
10. لغسل DNA نتخلص من الجزء العلوي من الانبوبة , وينقل الراسب (الحمض النووي) الى انبوبة نظيفة تحتوي على 500 µl of ice cold 70% ethanol. تقلب الانابيب رأسا على عقب.
11. تنقل الانابيب الى جهاز الطرد المركزي الدقيق Microcenterfuge وتدور فيه عند 13000 rpm لمدة 1 min (هنا راح تتشكل مثل الكرة في الانبوبة).
12. تزال المواد العالقة ويضاف تغييرين من 500 µl of ice cold 70% ethanol.
13. تترك الانابيب المحتوية على DNA لمدة 15 دقيقة.

14. يضاف لكل انبوبة مقدار 500 µl ماء مقطر معقم, ويضاف بعد ذلك 4 µl انزيم RNAse. للتخلص من اي عوالق من حمض RNA.

(لو كان الانزيم باودر يمكن حل 10/ µg 1ml ماء مقطر معقم)

15. تنقل الانابيب الى حمام مائي درجة حرارته 65°C لمدة 20 min. للقضاء على اي انزيم يمكن ان يحطم DNA. ثم تخزن في البراد على درجة حرارة 4°C.

16. للتأكد من الحصول على DNA يتم قياس تركيزه ونقاوته بجهاز Spectrophotometr او جهاز Nanodrop. كما يجرى على Agarose gel electrophoresis للتأكد من سلامته.

- **تحضير Agarose gel:**

بعد تحضير العديد من التجارب على النبات وجد ان تركيز 2% اجاروز افضل تركيز لتجربة العينات, نذوب 2 جرام اجاروز في 100 مل من TBA 0.5x, تذوب في ميكروويف (1.30- 2.00 min), يضاف اليها بعد ذلك بحذر شديد مادة ethidium bromide 2.5 µl. تخلط جيدا ثم تصب بحذر شديد في وعاء الصب وتزال اي فقاقيع بهدوء ثم يغرس المشط بحذر في طرف الاجاروز ويترك لتصلب, بعد ان يتصلب ينزع المشط بهدوء وبذلك تتشكل ابار صغيرة لنحقن فيها الحمض النووي.

- **تحميل العينات داخل الجل Loading DNA Agarose gel in:**

1. نحقن الحفرة الاولى بـ 10µL 1kb ladder. (ممكن نستغني عن هذي الخطوة)
2. نبدأ بحقن الحفر التالية بعينات DNA المستخلصة من النباتات. (4µL DNA + µL Loadind 4 day)
3. يغمر الجل بمحلول التحميل Loading Buffer.
4. يتم توصيل الكهرباء للبدء في عملية فصل DNA,لمدة 30 min على قوة 100 V. (يرجى ملاحظة عملية الفصل باهتمام).
5. يتم فحص حزم DNA المفصولة على الجل باستخدام الاشعة فوق البنفسجية. كلما كانت الحزم منفصلة وواضحة دل على جودة الاستخلاص.