الجزء العملي

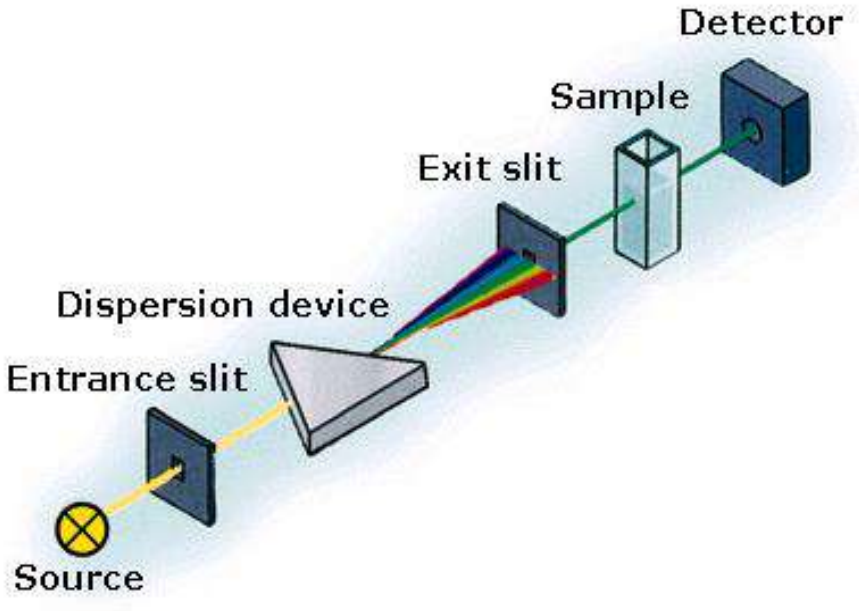
المختبر الأول

التعرف على الأجهزة المستخدمة في مختبر تقانات حيوية

أولا : جهـاز المطيـاف الضـوئي Spectrophotometer .. التسـمية تتكـون مـن مقطعـين الأول spectrometer الذي يعني لانتاج ضوء لأي لون مختار من طول الموجة الضوئية ، الثاني وهو photometer الذي يعني قياس كثافة الضوء ، يستخدم الجهاز لقياس مقدار الضوء الممتص من قبل العينة Sample ،اذ يقوم الجهاز بفصل الضوء على حزم ضوئية قسم من هذه الحزم تخترق العينة وتعبر من خلالها وبها يقاس ضمن طول موجي معين ويحتسب عندها كمية الضوء الممتص ونوع الضوء الامتصاص .

Photometer (some times known as colorimeter) , and spectrophotometer are the instruments that use light in measurement

وأحيانا يسمى بادئ المطياف Principles of spectrophotometer كما في الشكل رقم (١)



شكل (١)

هنالك نوعين من هذا الجهاز There are two class of spectrophotometer

أ) مطياف ذي الشعاع الوحيد Single beam الذي يعبر كل الضوء خلال العينة All light pass through sample

ب) مطياف ذي الشعاع المضاعف Double beam تعبر اشارة العينة Reference pass through sample . شكل رقم (٢)

شكل (٢)

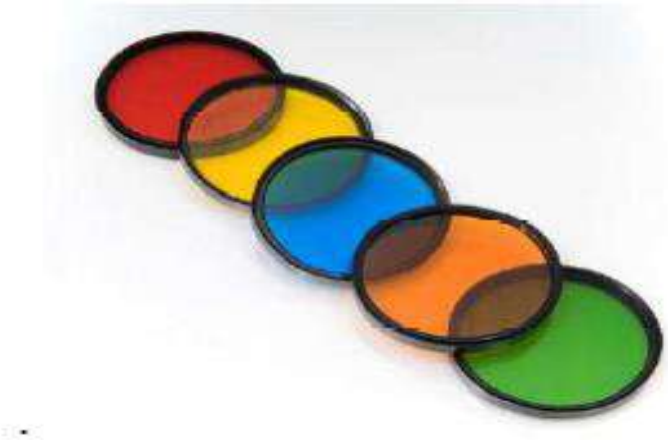
كيف يعمل الجهاز (أساس المكونات)Basic of components

١- مصدر الضوء Light source : وهو المصدر الذي يبعث الطاقة المتالقة لتحديد الضوء ونوعيته في الـ Photometer وتستعمل بصورة عامة لمبة (مصباح) تنجستن (Tungsten lamb) الذي يبعث طيف مستمر من الضوء ضمن المدى المرئي (٤٠٠ – ٧٦٠) نانوميتر .

ومن مساوئ هذا النوع هو قد لا يجهز طاقة متالقة كافية للمقياس تحت ٤٠٠ (nm) نانوميتر ، لذلك لا يوجد مقياس الذي يمكن أن يعمل في الـ Photometer ، أما في الـ

Spectrophotometer فتستعمل عادة مصباح الهلوجين أو Deuterium الذان يبعثان الطيف مستمر من الضوء في مدى المرئي وهو (١٩٨ – ١٠٠٠ نانوميتر)

٢- شق المدخل Entrance silt : يستعمل هذا الجزء في مرور الشعاع الضوئي الرفيع جدا ويعبرة إلى Monochromator الذي هو موشور وهو يستعمل لعزل طول الموجة المعين من مصدر الضوء في الـ Photometer وتستعمل مرشحات زجاج بصرية لاعطاء الاحادية في لون الضوء شكل رقم (٣)



شكل رقم (٣)

٣) المرشحات Filter : هذه المرشحات تقوم بعملية امتصاص بعض أطوال الموجة وتسمح لتشكيلة واسعة نسبيا من الأطوال الموجية بالمرور ... **ملاحظة** : لون المرشحة يكون عادة مكمل إلى لون السائل العابر .

في الـ Spectrophotometer الموشور يستعمل لإعطاء الضوء الأحادي اللون من طول موجة معرف واحد طول موجة .

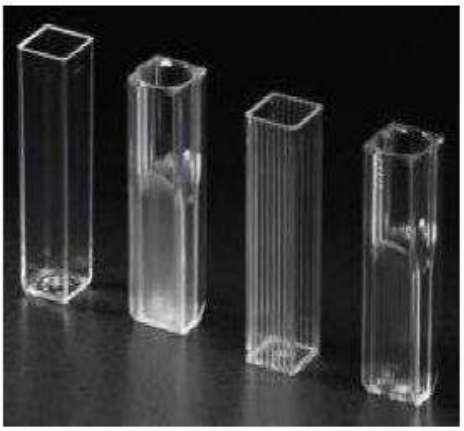
٤) موشورات Prisms : أن أي موشور يمكن أن ستخدم بغية الحصول على أحادي اللون (لون واحد) من الضوء حيث يستخدم شق ذي فتحة ضيقة تسمح فقط لكمية صغيرة من الطيف بالعبور ويحسن نقاوته اللونية ، هذه تستعمل بعزل شعاع الضوء

ثانيا :خلية الامتصاص (Absorption cell (cuvets : هذه عبارة عن نوع من زجاج المختبر وهي عبارة عن أنبوب صغير ذات مقطع العرضي الدائري أو المربع وصممت لحمل العينات لتجارب الـ Spectrophotometer ، وهذه الزجاجيات موصى بها للعمل الأكثر دقة لان

السطح المستوي لا يسمح لمرور أي نوع من الضوء (أسم من الضوء) .. وهنالك ثلاث أنواع من هذه الخلايا الزجاجية Cuvets : التي تكون صالحة للاستعمال المختلف

* Glass : with a wavelength from ٣٨٠ to ٧٨٠ nm (Visible spectrum)
* Plastic , with a wavelength from ٣٨٠ to ٧٨٠ nm (Visible spectrum)
* Quartz , with a wavelength below ٣٨٠ nm (Ultraviolet spectrum)

شكل رقم (٤)



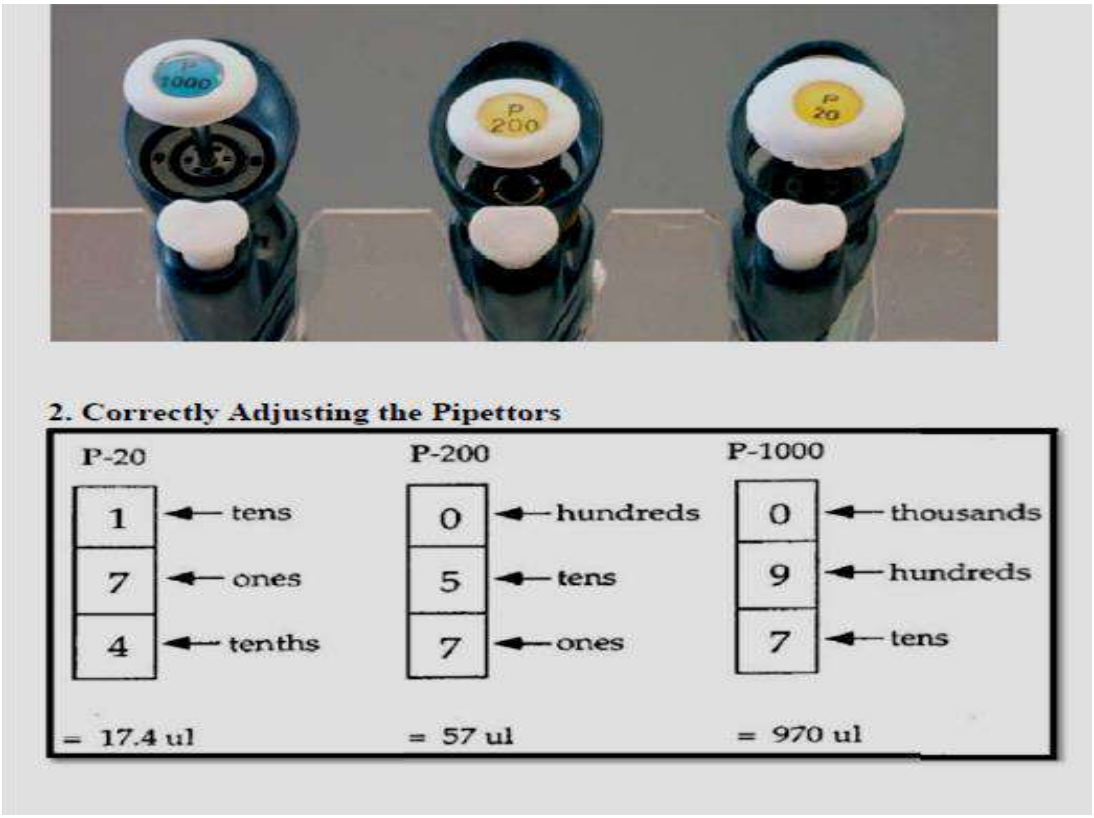
شكل (٤)

ملاحظة : إن طول موجة الضوء في الأشعة فوق البنفسجية من ٣٨٠ نانوميتر أو أقل فانه لا يسمح بمرور الضوء بالكاد من خلال الخلية الزجاجية ، لذلك لا يمكن أن يعمل لقياس مدى UV

ثالثا: الماصات ومهارات السحب بالماصة Micropipettors and Pipetting skills

الشخص العامل في مثل هذه المختبرات يجب أن تكون له مهارة خاصة ودقيقة وتعد هذه المهارات الأكثر أهمية في علم الأحياء الجزيئي أو في مختبرات Biotechnology لأنه يجب أن نقيس كميات صغيرة جدا من المحلول وبدقة في اغلب الأحيان ، لذلك الاستعمال الصحيح للـ Micropipettors هي احد أهم المهارات يجب ان يتعلمها الشخص العامل في هذه المختبرات ،، وهذه الماصات لها مصادر مختلفة من المنتجات أو الشركات لذا لا تبدو متشابهة . على كل حال ، فلو تعلمنا كيف نستخدم واحدة منها بشكل صحيح ودقيق من السهولة فهم استخدام باقي الأنواع الأخرى ، لأنها تعمل على نفس المبدأ ، وهنالك الكثير من نماذج هذه pipettor .

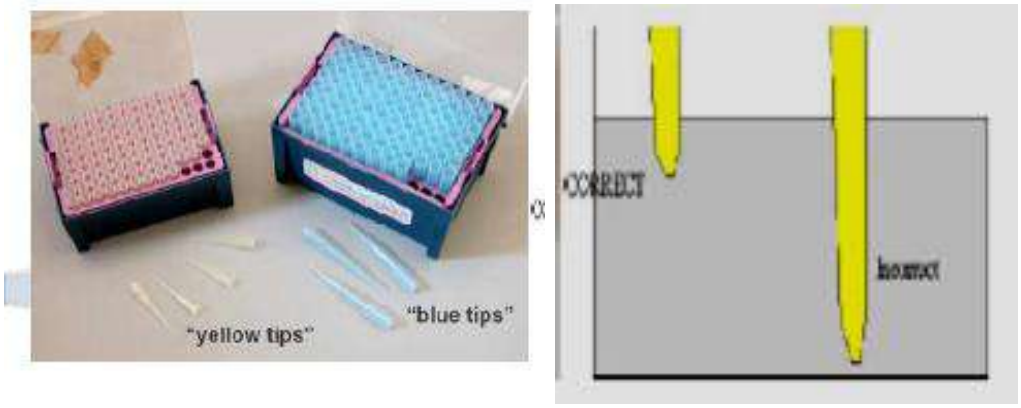
وبصورة عامة يوجد على رأس الماصة حجم الكمية التي يمكن سحبها من العينة ، حيث لكل ماصة مدى معين من الحجم المسموح للسحب وهو رقم يكون حرج Critical فيوجد P–number وهو يشير إلى أقصى حجم من Ul ممكن سحبة بهذه الماصة مثل (P٢٠٠ uL–٢٠uL) أي يمكن سحب بهذا النوع من ٢٠ ماكرو ليتر إلى ٢٠٠ ماكروليتر ، ولا يجو سحب لا اقل ولا اكثر من هذه الرقم هذه للماصات المتحركة ، أما الماصات الثابتة يوج عليها رقم مثل P–١٠٠٠ هذه فقط لسحب ١٠٠٠ مايكروليتر .شكل رقم (٥)



شكل (٥)

هنالك أنواع ماصات ولها الألوان للرأس The type of tip of pipette

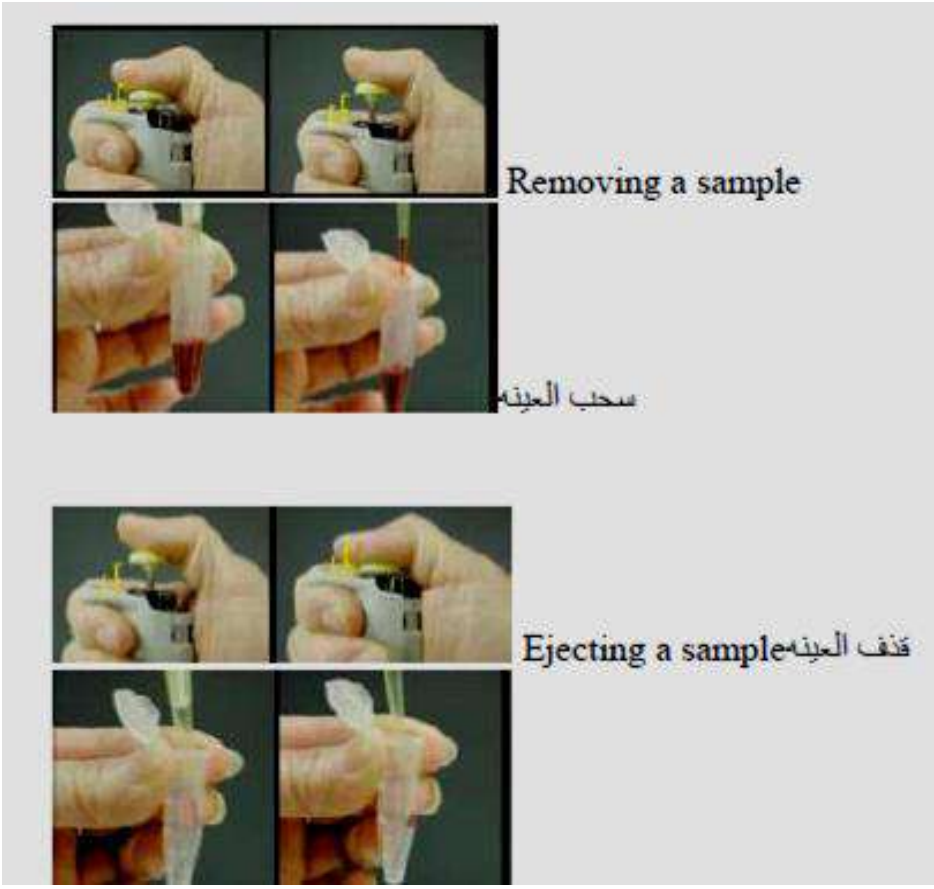
- اللون الأصفر Yellow tip : هذه تستخدم فقط لسحب P–٢٠ to P–٢٠٠
- اللون الأزرق Blue tip : تستخدم لسحب فقط P–٢٠٠
- اللون الأبيض White tip : تستخدم لسحب اقل من P– ٢٠ شكل رقم (٦)



شكل (٦)

كيفية سحب العينة بالماصة وقذفها في الأنابيب (شكل رقم (٧)

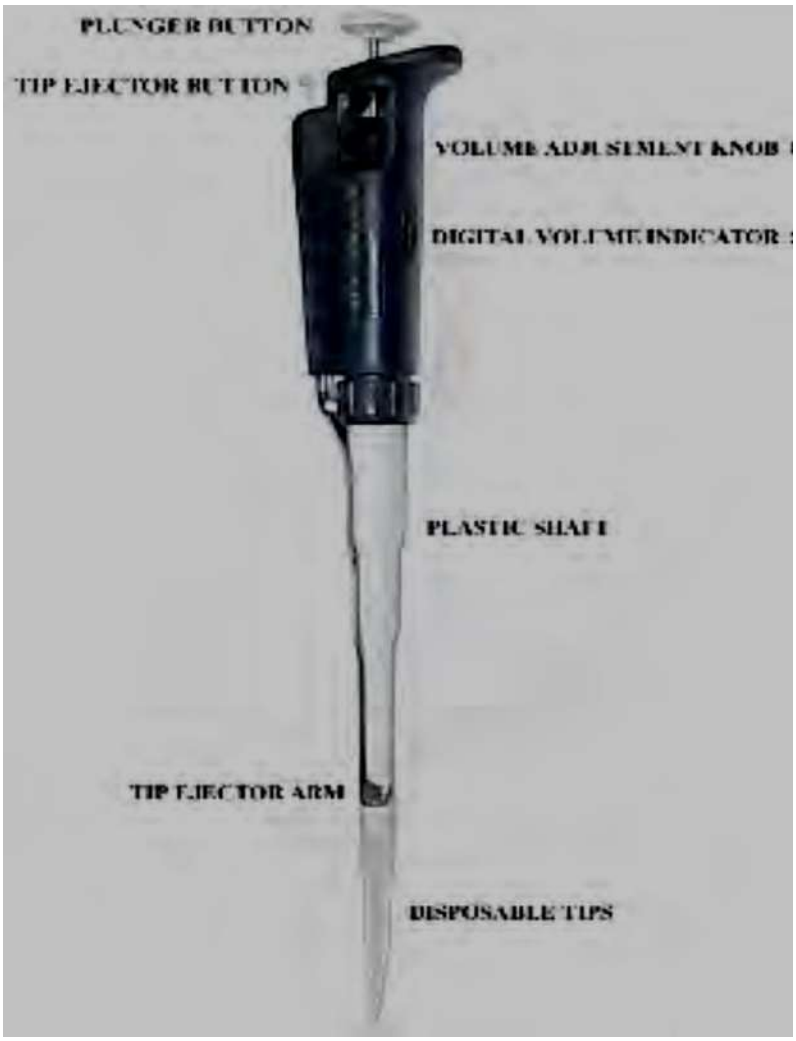
How to removal and ejection a sample

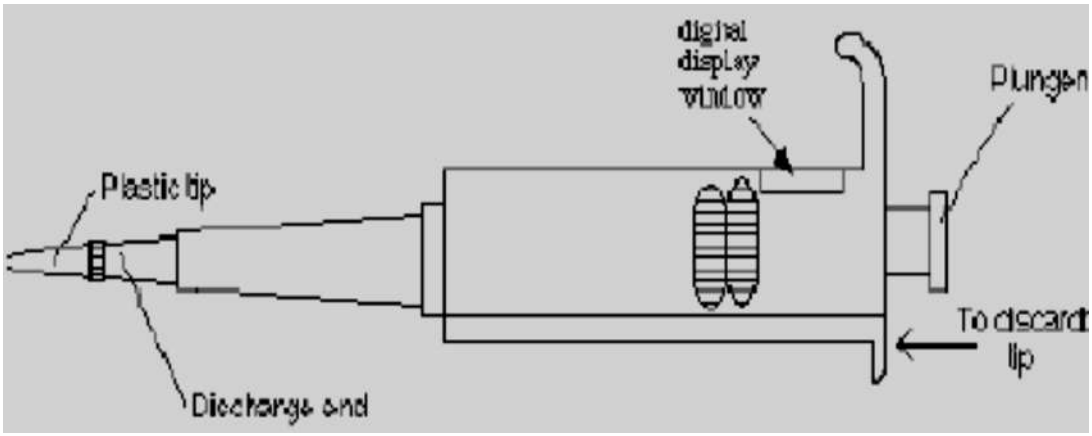


شكل (٧) (عن Aimee ،٢٠٠٧)

تتكون االماصات من نوع الاوتوماتيكية المفردة من الأجزاء التالية :

١) الدافع : وهو الجزء الأعلى من الماصة ويستخدم في دفع السائل إلى خارج القمع البلاستيكي
٢) العداد الرقمي : وظيفة هذا الجزء هو أظهار ضبط الحجم الذي يراد نقله من السائل أو العينة
٣) قبضة ضبط الحجم : هذه تكون عادة خلف العداد الرقمي وتستخدم في ضبط حجم السائل المراد نقله
٤) الطرف المطلق : وهو الجزء الأسفل من الماصة ويستخدم في إطلاق السائل إلى الخارج ، أو إطلاق عمود الهواء بقدر الحجم المضغوط لسحب السائل ويتم إلحاق القمع البلاستيكي بهذا الطرف قبل كل استخدام
٥) الطارد : وظيفته هو دفع القمع البلاستيكي خارج الماصة بعد الاستخدام





شكل (٨) أجزاء الماصة الأوتوماتيكية

خطوات استخدام الماصات الأوتوماتيكية :

١) قم بضبط الحجم المراد نقله من السائل من خلال لف قبضة ضبط الحجم حتى يشير العداد الرقمي إلى الحجم المطلوب كما في الشكل التالي

شكل (٩)

٢) قم بتركيب القمع البلاستيكي الذي يتناسب حجمه مع حجم الماصة المستعملة إلى الطرف المطلق بإحكام بحيث لا يسمح بتسريب الهواء كما في الشكل

شكل (١٠)

٣) قم بضبط الدافع ببطء بواسطة أصبع الإبهام حتى يصل إلى الوقفة الأولى ،عندئذ يكون قد تم ضغط عمود الهواء بمقدار الحجم المضبوط والمرئي على العداد الرقمي كما في الشكل

شكل (١١)

٤) اغمس القمع البلاستيكي داخل السائل المراد نقله ثم اسمح للدافع بالارتداد لأعلى ببطء حتى يصل إلى أخر مداه لسحب الحجم المضبوط من السائل كما في الشكل (١٢)

شكل (١٢)

٥) انتظر بضع ثوان حتى تضمن سحب الحجم المضبوط بالكامل ثم انزع الماصة من داخل السائل

٦) بغية إنزال السائل في الإناء المراد قم بإدخال القمع البلاستيكي داخل الإناء ثم اضغط على الدافع ببطء حتى يصل إلى الوقفة الأولى فيتم تفريغ الحجم المضبوط من السائل ثم اضغط على الدافع ثانية حتى يصل إلى الوقفة الثانية للتأكد من خروج أي سائل عالق بالقمع البلاستيكي من الداخل كما في الشكل (١٣)

شكل (١٣)

٧) مع الحفاظ على وضع الدافع في وضع الانضغاط الكامل حتى الوقفة الثانية انزع الماصة من الداخل الإناء مع ملامسة الإناء من الداخل حتى الخروج ثم اسمح للدافع بالارتداد لأعلى ببطء حتى يصل إلى وضعه الأصلي ثم قم بطرد القمع البلاستيكي بواسطة الطارد كما في الشكل أدناه

شكل (١٤)

رابعا: جهاز الطرد المركزي Centrifuge : عبارة عن جهاز يستخدم لفصل الجزيئات من السائل طبقا للحجم ، شكل ، كثافة ، لزوجة ، وهذه الأجهزة لها سرعة دوران سريعة و وسطية ،حيث أن الجزيئات ذي الكثافة أعلى من تلك أي من كثافة السائل سوف تصير بشكل راسب في أسفل الأنابيب المستخدمة في الجهاز Sink sediment والجزيئات التي اخف منها سوف تكون في أعلى الأنبوب آو المحلول Float هذا الاختلاف في الكثافة يؤدي إلى فصل الجزيئات المختلفة في العينة حيث الجاذبية هذه ممكن أن تستبدل بقوة الطرد المركزية القوية الأكثر بكثير التي زودت من طارد مركزي كما في الشكل رقم (١٥) Gravity can be replaced with the much more powerful (centrifugal force) provided by a centrifuge

صورة رقم (١٥) (عن William ، ٢٠١٢)

مكونات جهاز طرد المركزي :

- Motor
- Drive shift
- Rotor

أسس عمل جهاز الطرد المركزي في عملية الفصل Basis of centrifugal separation

هذه تعتمد على عدة خصائص حسب نوع الجهاز وهي :

- الحجم Size
- الشكل Shape
- الكثافة Density

تقسيم أجهزة الطرد المركزي بالاعتماد على: Classification of centrifuge depended on

١) الحجم Size

أ- كبير Larger أو يسمى (Simply centrifuge)

ب- صغير Smaller يسمى (Micro centrifuge)

٢) الشكل Shape

٣) اعتماد على السرعة Depended on speed

أ- ذات سرعة قليلة RCF٣٠٠٠xg (٤٠٠٠ – ٥٠٠٠) Low speed centrifuge

ب- ذات سرعة عالية -١١٠٠٠ ,rpm ١٥٠٠٠-١٢٠٠٠) High speed centrifuge
١٢٠٠٠) xg

ج- ذات سرعة عالية جدا xg (١٠٠٠٠٠ rpm- ٥٤٠٠٠) Ultra centrifuge

خامسا : أنابيب جهاز الطرد المركزي Eppendorf tube or micro centrifuge tube

وهي عبارة عن أنابيب أو حاويات أسطوانية صغيرة مخروطية قد تكون بلاستيكية أو زجاجية ، ذات غطاء سريعة ومتكاملة ، وهذه تستعمل لحفظ وخزن كميات صغيرة من العينات أو السائل ، وهي ذات استعمال لمرة واحدة و تهمل بعد الاستعمال مباشرة ، وهي رخيصة الثمن ، هذه تستعمل من قبل الكثير من الصيادلة ولعاملين في مجال Biotechnology أو في الأحياء الجزيئي إذ تستعمل لتعبئة حفظ العينة وهي مفيدة جدا عندما يكون هناك استعمال وحيد لكمية صغيرة من المحلول أو السائل ، لان الـ micro centrifuge tube ليست مصنوعة من polypropylene إذ يمكن ان تستعمل في درجة الحرارة المنخفضة جدا إلى (- ٨٠) درجة مئوية أي إلى درجة حرارة النتروجين السائل.. Liquid nitrogen أو مع سوائل عضوية مثل الكلوروفورم ، وهي ذات أحجام مختلفة ، تتراوح عموما من ٢ إلى ٢٥٠ مليلتر ، وأن الحجم الأكثر شيوعا هو ١.٥ مليلتر وهي تتحمل عملية التعقيم (١٢٠ درجة مئوية atm ، لمدة ٢٠ دقيقة) . شكل رقم (١٦)

صورة رقم (١٦) أنابيب الطرد المركزي

ملاحظة : بسبب تكلفتها المنخفضة والصعوبة في تنظيف السطح البلاستيكي ، فبذلك تهمل بصورة عامة بعد كل استعمال .

قوة طرد المركزية النسبية Relative centrifugal force (RCF)

عبارة عن مقياس لقوة التي تضاف إلى العينة ضمن جهاز الطرد المركزي

It is the measurement of the force applied to sample within a centrifuge ,its calculated from the speed (rpm) and the rotational radiu (cm) using the following calculation

$G= rcf=(١.١١٨ \times ١٠^{-٥}) \times rpm^{٢} \times R$

حيث أن

G= relative centrifuge force = قوة الطرد المركزي النسبية

R= rotational radius (cm) = نصف قطر الدوار (سم)

rpm= rotating speed (r/ min) = عدد الدورات في الدقيقة

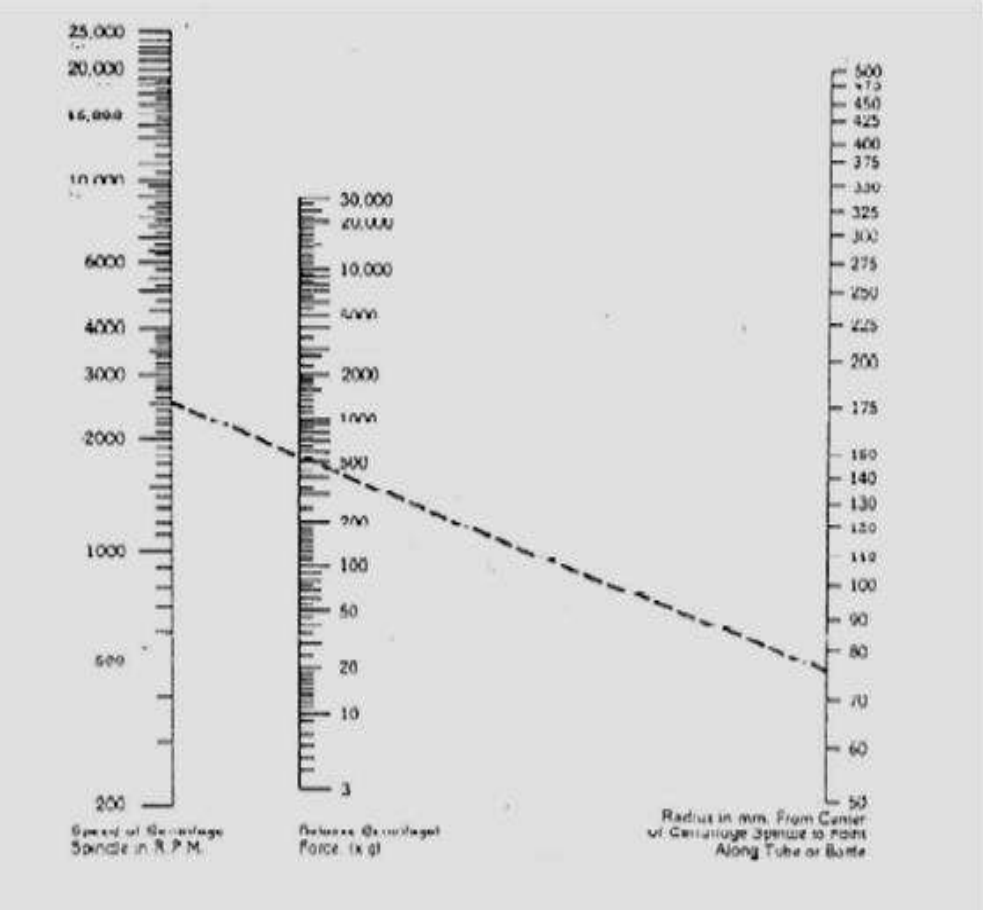
Nomo gram

رسم تخطيطي يشير إلى العلاقة بين كل من (g , radus , rpm) اذا تم معرفة قيمتين فيمكن معرفة القيم للثالث من خط مستقيم يربط بين ثلاث القيم

Is agraphical refer to the relationship between the rpm , g force and rotor radus(If we know two values the third can determined by straightedge)

اذا تم معرفة قيمتين ، فنحسب خط مستقيم بين القيمتين المعروفة ونسقطها على القيمة المجهولة ، فبذلك نستطيع التعرف على القيم المجهولة (شكل رقم ١٧) على سبيل المثال

For example :Spinning a sample at ٢٥٠٠ rpm in a rotor with a ٧.٧ cm radius results in a RCF of ٥٥٠ x g ?



شكل رقم (١٧)

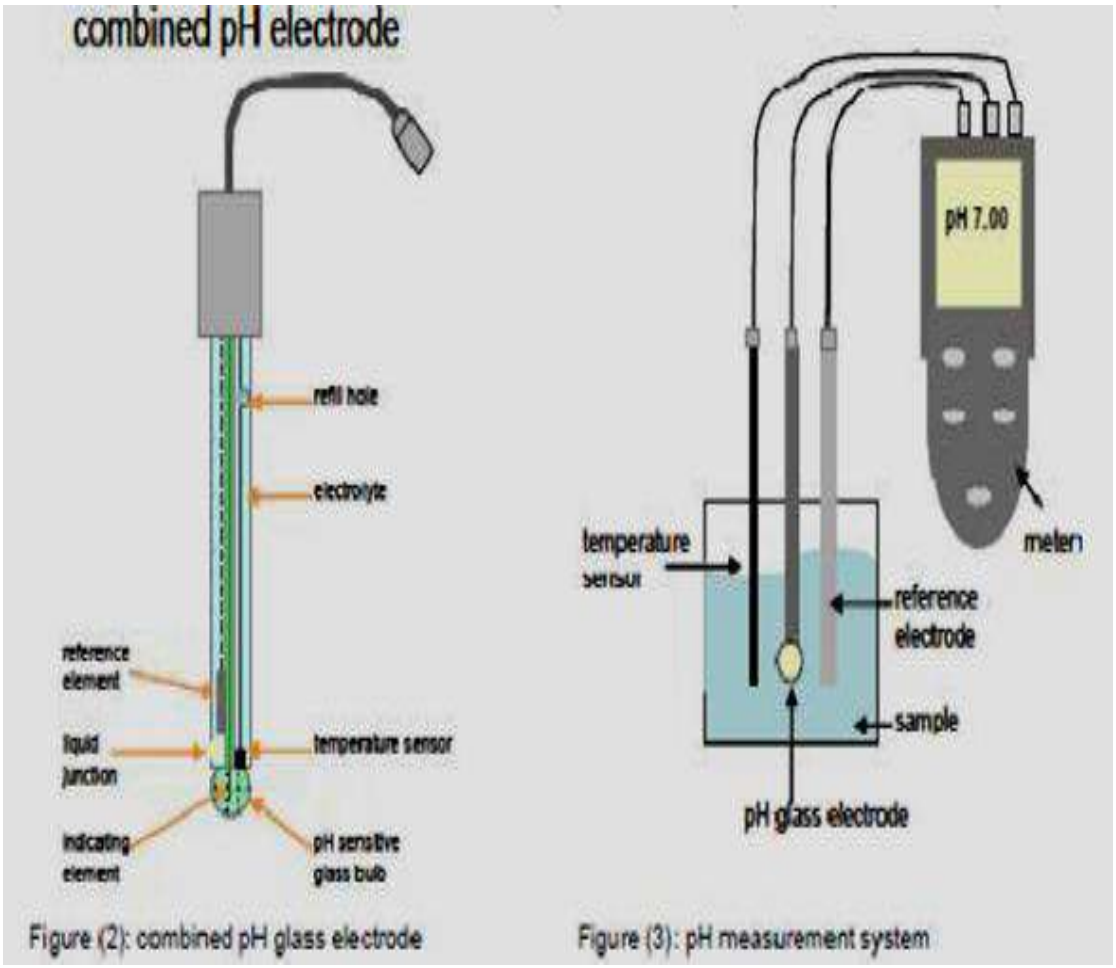
سادسا: جهاز قياس الحموضة PH meter

إن عملية ثبات الـ PH الحموضة إثناء التجارب هو إحدى العوامل الحاسمة في اغلب الأحيان في الحصول على النتائج الدقيقة لمكونات محلول Buffer هي التي تبقي الحموضة ثابتة بقية معروفة ، وان بقاء الحموضة ثابت بسبب التعادل بين الحوامض والقواعد الضعيفة.

صورة رقم (١٨) (عن Taylor ،١٩٩٥)

سابعا : مكونات الألكترودال Combined PH electrode

أن قلب القطب الكهربائي مكون من بصلة رقيقة ومكونة من زجاج حساس للـ PH الذي يكون من فوق في نهاية أنبوب الزجاج ، الزجاج الحساس للـ ph عبارة عن غشاء زجاجي ينتهي إلى القطب الكهربائي يحتوي على سائل من كلوريد البوتاسيوم يكون الـ PH = ٧ ، كما هنالك سلك فضي مطلي بكلوريد الفضة يتصلب السائل ، كما هناك تركيب من الـ AgCIAg يكون باتصال مع السائل المرجعي ، إذ يعطي إشارة مرجعية ، تعتمد هذه الإمكانية على تركيز الكلوريد في السائل المرجعي ، وطالما هذا التركيز ثابت فبذلك تكون أمكانية القطب الكهربائي ثابتة شكل رقم (١٩)



شكل (١٩) مكونات الألكترودال

ثامنا : جهاز كشف الأشعة الفوق البنفسجية UV– Transilluminator

يستعمل هذا الجهاز لكشف عن أماكن تواجد حزم الـ DNA المتالقة (البراقة) بسبب وجود صبغة الاثيديوم بروماید أو الصبغة الحمراء يتكون الجهاز من :

- uv –tube (wave length ٣١٢/٣٦٥ nm)
- Filter
- Polaroid camera

ملاحظة : الجهاز عبارة عن مصدر قوة من الأشعة فوق البنفسجية Sours of UV force التي تسبب الضرر للعين والجلد الغير محميين ، كما قبل تشغيل الجهاز أي جزء منه يجب التاكد من ان

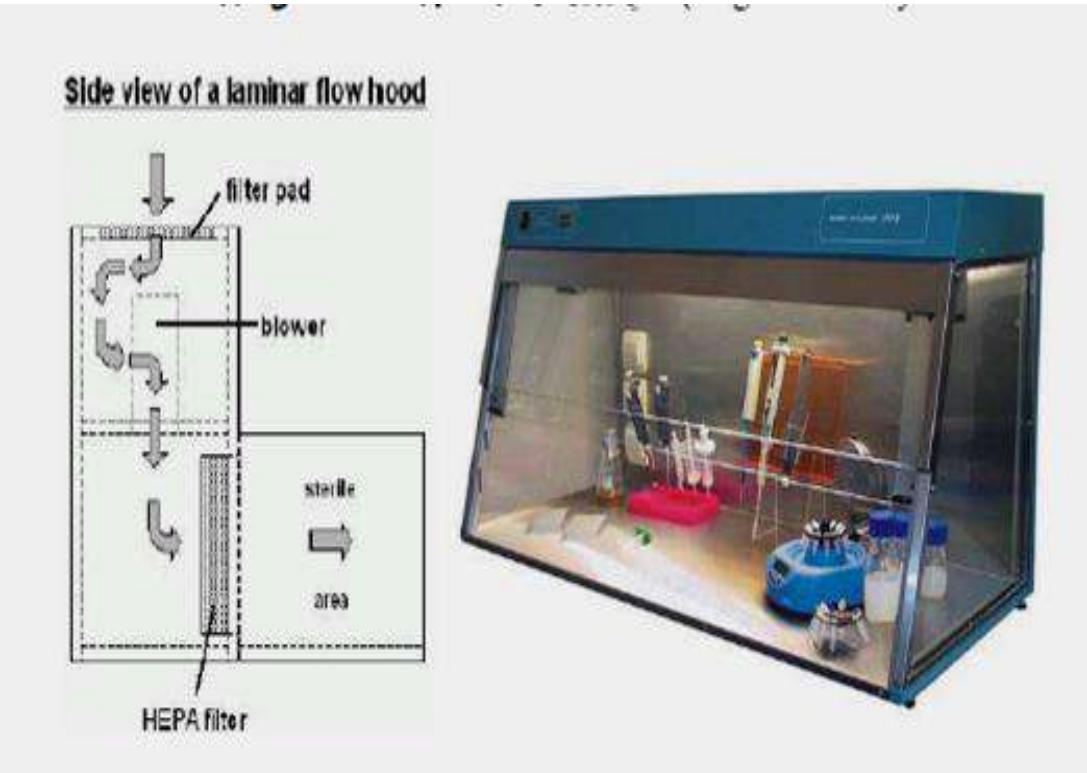
جميع الموظفين أو العاملين في المختبر هم في منطقة محمية وينبغي ارتداد نظارات خاصة تحجب الأشعة UV كما في الشكل رقم (٢٠)

شكل (٢٠)

تاسعا : هود Laminar flow hood heap

يتم تمرير هواء من خلال فلتر ذي كفاءة عالية لجسيمات الهواء الذي يزيل كل تلوث الهواء للحفاظ على ظروف معقمة لكافة المواد المستخدمة في العمل المختبري شكل رقم (٢١)

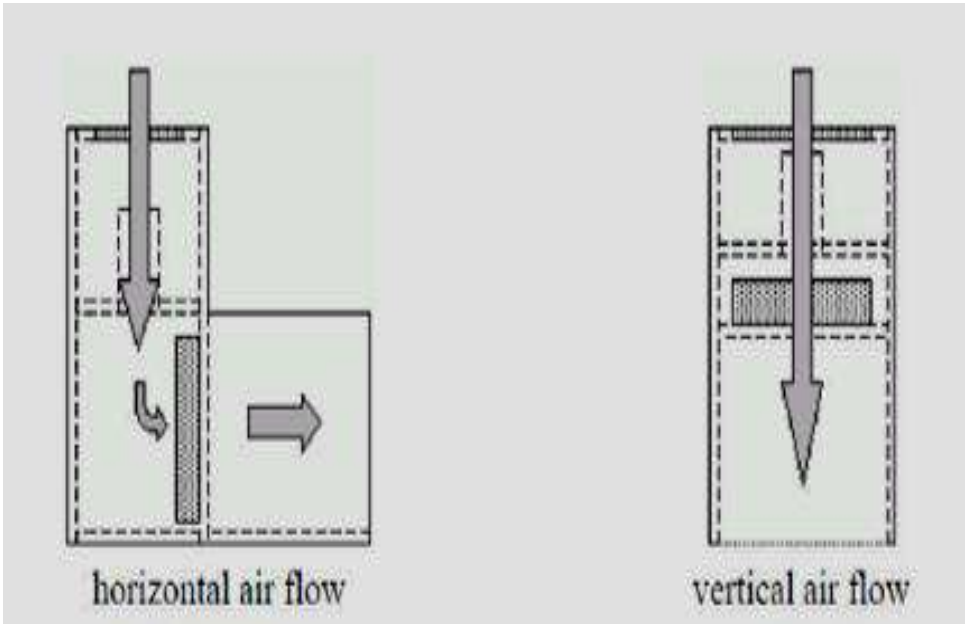
High efficiency particulates air



صورة (٢١) جهاز الهود

يوجد نوعين من الفلاتر (الهود) عمودي وافقي كما في الشكل (٢٢)

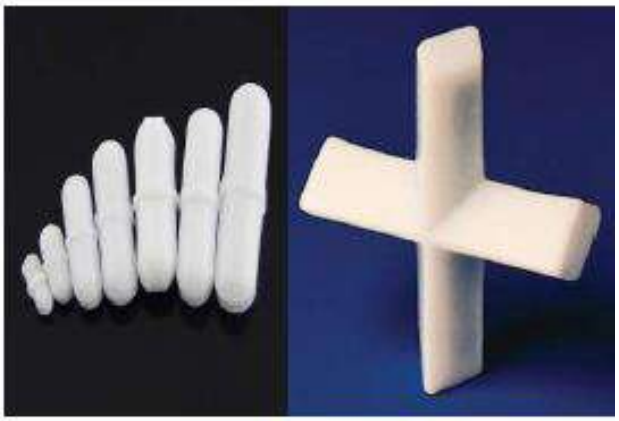
Two type of hood are vertical and horizontal



شكل رقم (٢٢)

عاشرا : محرك مغناطيسي Magnetic stirrers

يسمى أيضا بلوحات تحريك مغناطيسي هذه شائعة جدا في مختبرات الكيمياء والبايولوجي التجريبية وزراعة الأنسجة وتقانات حيوية وهي تستخدم لمزج المكونات (الصلبة والسائلة) عند تسخينها للحصول على مخاليط متجانسة للمحلول المراد استخدامه في التجارب ، وتشمل هذه المحاليل وسائط النمو وعزل البكتيريا شكل رقم (٢٣)



شكل (٢٣)

وميكانيكية عملها هو خلط السائل الذي يستخدم باستخدام المجال المغناطيسي الخارجي الذي يدور الشريط الصغير المغناطيسي التي توضع في المزيج

حادي عشر : الحاضنة Incubator

في مختبرات البيولوجيا الجزيية أو التقانة الحيوية أو زراعة الأنسجة أو في علم الأحياء جهاز يستخدم لتنمية والحفاظ على المزارع المايكروبيولوجية أو مزارع الخلايا ، تحفظ الحاضنة على درجة الحرارة المثلى والرطوبة والظروف الأخرى من الغازات مثل ثاني أوكسيد الكاربون ، ومحتو الاوكسجين في الغلاف الجوي في داخل الحاضنة ، تعد هذه الحاضنات ضرورية لكثير من الإعمال التجريبية في بيولوجيا الخلية والأحياء المجهرية والأحياء الجزيئي كما تستخدم لزراعة كل من البكتيريا وكذلك خلايا حقيقية النواة ، كما تستخدم في صناعة الدواجن كبديل عن الدجاج ، هذا غالبا ما يؤدي إلى ارتفاع معدلات التفقيس بسبب قدرة على السيطرة على درجة الحرارة والرطوبة ، وان ابسط الحاضنات تحتوي على الصناديق المعزولة مع سخان لتعديل وعادة ما تصل درجة الحرارة إلى ٦٠ – ٦٥ درجة مئوية ، كما في الشكل رقم (٢٤)

شكل (٢٤)

ثاني عشر : خلاطات Vortex

عبارة عن جهاز بسيط يستخدم في مختبرات لخلط كمية صغيرة من السائل وهو يتألف من محرك كهربائي مع محرك رمح موجه عموديا وتوضع قطعة المطاط المقعر قليلا خارج المركز ، وان المحرك يدير قطعة المطاط تذبذب سرعة فيحركه بصورة دائرية ، عند الضغط على انبوب الاختبار او غيرها من الحاويات المناسبة في كاس المطاط ، وان معظم الخلاطات الدوامة لديها اعدادات متغيرة السرعة ويمكن وضعه على تشغيل بشكل مستمر أو لتشغيل فقط عندما يتم الضغط النازل على قطعة المطاط ، يستخدم هذا الجهاز في مرحلة استخلاص الحامض النووي كوظيفة ميكانيكية تساعد في تحلل جدر الخلايا وجدر الانوية بغية تحرير الحامض النووي ، شكل رقم (٢٥)

شكل (٢٥) جهاز المازج

ثالث عشر : جهاز التعقيم Autoclave

يستخدم هذا الجهاز في تقانات تعقيم الأدوات والتجهيزات المعدنية والزجاجية عن طريق تعريضها للبخار المشبع بالضغط العالي عند درجة حرارة ١٢١ درجة مئوية لفترة مابين ١٥- ٢٠ دقيقة حسب حجم ومحتوى الأدوات المراد تعقيمها من اجل التاكد من خلوها من الجراثيم وتكسير أي حوامض نووية قد يحتمل وجودها وابطال نشاط الانزيمات Nucleases (Seymour ، ٢٠٠١) كما في الشكل (٢٦) .

شكل (٢٦) جهاز التعقيم

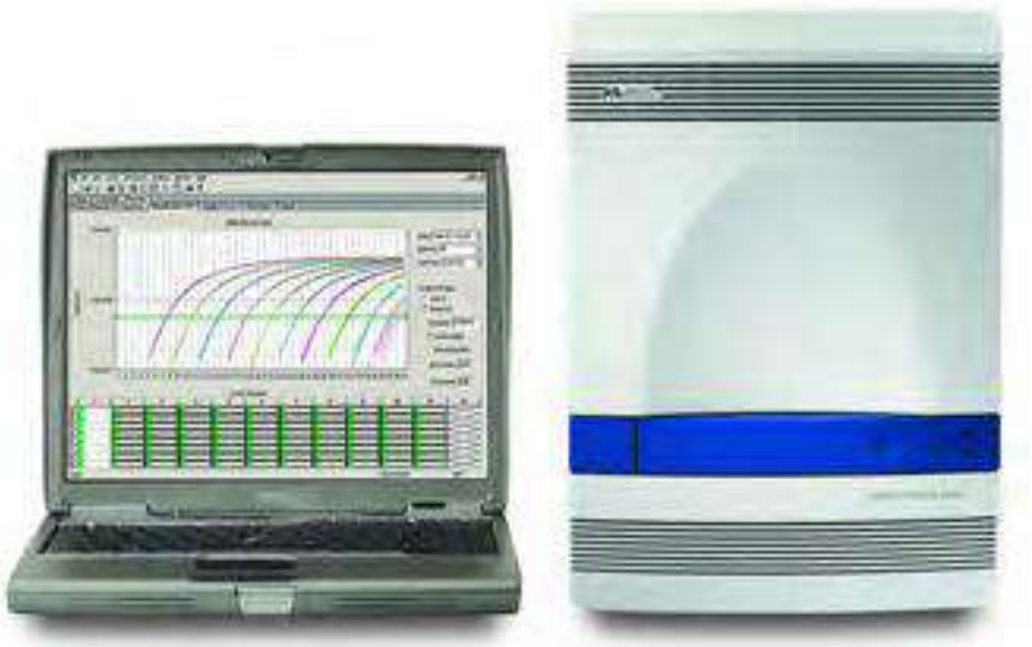
رابع عشر : فريزر الحفظ المختبري (المعملي) Laboratory freezer

هنالك نوعان من الفريز المختبري ،النوع الأول هو الفريزر ذو الاستخدامات المختبرية العامة General purpose lab freezer وغالبا ما يكون درجة تبريدة بين (– ١٢ إلى – ٢٠ درجة مئوية ويستخدم في حفظ الكواشف المعملية (المختبرية) التي ينصح بحفظها عند درجة حرارة تبريد عالية (– ٢٠ درجة مئوية) إلى جانب حفظ العينات البيولوجية على سبيل المثال عينات الحامض النووي المستخلص وعينات الحامض النووي بعد التكثير والتي يراد حفظها لفترات زمنية تتراوح فيما بين ٣ أسابيع إلى عدة شهور أما النوع الثاني هو الفريزر فائق التبريد Ultra low temp. lab freezer ويكون مدى تبريدة من (– ٤٠ الى – ٨٦ درجة مئوية ويستخدم في حفظ عينات البلازما الدم والامصال وبعض المواد الحيوية الطبية الاخرى الى جانب حفظ عينات الحامض النووي لفترات زمنية طويلة قد تصل الى عدة سنين كما في الشكل (٢٧)

شكل (٢٧) فريزر الحفظ المختبري (عن رفعت ،٢٠١٤)

خامس عشر : جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل الآني Real- time PCR

يقوم هذا الجهاز بتقدير كمية وتركيز الحامض النووي بعد استخلاصه كما يقوم بتقدير جودة الحامض النووي المستخلص وتحديد ما اذا كان بشري أو غير بشري ، وهو ذو أهمية فريدة في فحوصات البصمة الوراثية التي تعتمد على العينات الجنائية لما لهذه العينات من طبيعة متغيرة بحسب البيئة المرفوعة منها العينة يساعد هذا الجهاز على الوقوف على حالة الحامض النووي بعد عملية الاستخلاص ومن ثم إمكانية ضبط كمية الحامض النووي الصالحة للإكثار في الخطوات اللاحقة كما في الشكل (٢٨)



شكل (٢٨) جهاز تفاعل الـ PCR الآني من شركة Applied biosystems model ٧٥٠٠

(عن رفعت، ٢٠١٤)

المختبر الثاني

تكملة الشرح وعمل الأجهزة المختبرية في مختبرات تقانة حيوية

سادس عشر : جهاز الوصتنة Sonicator

الصوتنة هو عبارة عن إدخال مسبار مباشرة في وعاء العينة وهي الطريقة الأكثر شيوعا لمعالجة العينة ، اذ يتم نقل الطاقة مباشرة فيعينه ذات كثافة عالية وتتم معالجة العينة بسرعة ، قطر من طرف المسبار يحدد حجم السوائل التي يمكن معالجتها بشكل فعال ، كلما كبر حجم المسبار قلت كفاءته في معالجة العينة لان الحجم الصغير يكون أكثر تركيزا على العينة ، يمكن أقطار طرف الاصغر (Microtip) من المسبار تسليم كثافة عالية للصوتنة ويركز على الطاقة صغيرة بداخلة وتتركز أقطار طرف معالجة كميات أكبر لكب بأقل كثافة. شكل رقم (٢٩)

شكل رقم (٢٩)

سابع عشر :جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل(Polymerase chain reaction (PCR

يعد من الأجهزة المهمة والأساسية في عملية تضخيم المادة الوراثية وإكثارها (DNA) وهنالك عدة نماذج من هذا الجهاز كما في الشكل رقم (٣٠)

تكون تقنية العمل للجهاز من خلال وضع أنابيب العينات لـ DNA بعد إضافة أيضا تسلسل من الـ DNA يسمى البادئ (Primer) إلى الـ Sample التجربة. كما الجدول (١)

جدول (١) يوضح Primers (عن أيشو ،٢٠١٢)

الجدول (٣) الـ Primers التي استخدمت في دراسة الـ DNA*

Revers 5-3	Forward 5-3	Primers	الرقم
CATCCCATGTACATATTCACCTTT (24)	ATGGAGGTTGCTATTGAATTAGATG (25)	PEA-sP446	١
GCATGCAAAAGAACGAAACAGG (22)	GAACTAGAGCTGATAGCATGT (21)	PEA-PSBOX13.1	٢
GGTTCTGTTCTCAATACAAG (20)	GACATTGTTGCCAATAACTGG (21)	PEA-PSGAPA 1	٣
CAGTCACACACTACAAGAGATC (22)	GATGTGATAGGCCTAGAACAAGC (23)	PEA-PSADH 1	٤
CGAATCTTGGCCATGAGAGTTGC (23)	CACTCATAACATCAACTATCTTTC (24)	PEA-AF016458	٥
CGTTTTGGTTACGATCGAGCTA (22)	CTGGAATTCTTGCGGTTTAAC (21)	PEA-AA430902	٦
CAGCTTTTAACTCATCTGACACA (23)	GTAAAGCATAAGGGGATTCTCAT (23)	PEA-PSMPA5	٧
CCAACTCATAATAAAGATTCAAA (23)	CTTAAGAGAGATTAAATGGACAA (23)	PEA-PSMPA6	٨
GTGAACACTCTTTGTTTTACCA (22)	CTTGAAATACTAAGGCACCATA (22)	PEA-PSMPA7	٩
CCCACATATATTTGGTTGGTCA (22)	GTGCAGAAGCATTTGTTCAGAT (22)	PEA-PSMPA9	١٠
CCAATTACGGACAATGTTTGATCA (24)	GCATTTGTGCAGTTTCAATTTCG (23)	PEA-PSMPB16	١١
CACTCTGTTCTGCTTCATCATC (22)	GAGTTCTCCGTAATAGAAGGCT (22)	PEA-PSMPC20	١٢

* Eurofins MWG O PERON AnzingerstraBe7a D- 85560 Ebersberg

ويتكون من عدد من العيون الخاصة يكون عددها حسب نوع وحجم جهاز PCR . وان اليه عمل الجهاز هي من خلال ادخال برنامج معين حسب نوع العينة المستخدمة يتضمن هذا البرنامج عدد الدورات والمراحل التي يمر بها الشريط الوراثي لـ DNA تتألف تقنية الجهاز من ثلاث مراحل في دورة واحدة وهي :

١) مرحلة المسخ الحراري Thermal deneturation

هذه المرحلة تعمل على فصل شريط لجزئ الـ DNA المراد دراسته أي فصل الشريط المزدوج ويكون شريطين منفصلين ويتتم تلك العملية من خلال تحطيم الاواصر الهديروجينة التي تربط بين القواعد النتروجينية بين الشريطين وتتم هذه المرحلة عند درجة الحرارة ٩٤ درجة مئوية

شكل رقم (٣٠)

٢) مرحلة اللصق (الربط) Primers annealing

أي ارتباط البادئ primer مع الشريطين المنفصلين عند درجة الحرارة ٥٥ درجة مئوية

٣) مرحلة الاستطالة Annealed primers extension

تتم هذه المرحلة بمساعدة انزيم Taq polymerase وذلك باضافة محلول dNTPS ابتداء من primer باتجاه ٣-٥ وتتم هذه المرحلة عند درجة الحرارة ٧٢ درجة مئوية . تعاد هذه الدورات ذات المراحل الثلاث عدة مرات مما يؤدي إلى زيادة جزيئات الـ DNA بشكل اسي

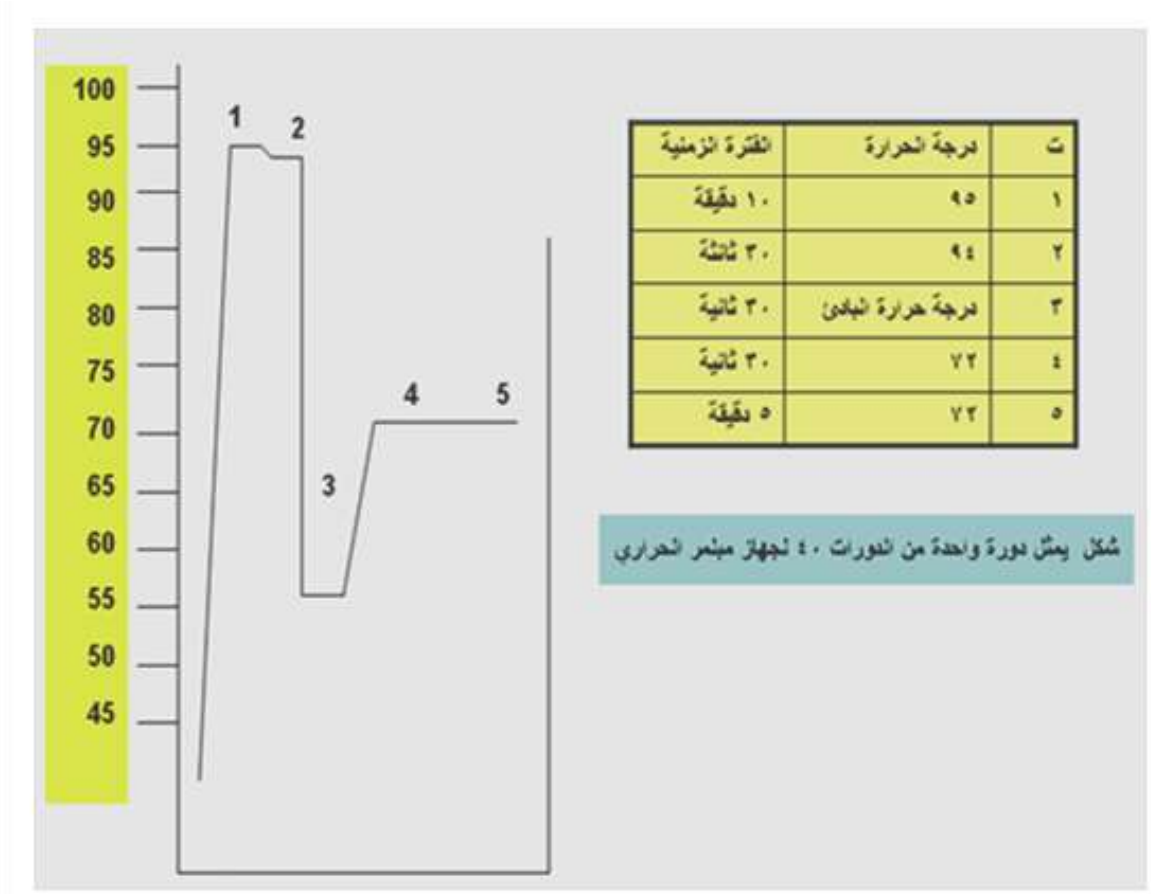
برنامج عمل الجهاز : يتم إدخال البيانات إلى داخل الجهاز (برمجة بيانات) كما في الجدول (٢)

جدول (٢) نظام برمجة جهاز PCR

رقم الخطوة	الخطوات	درجة الحرارة (م)	الفترة الزمنية	عدد الدورات
١	أ- Denaturation	٩٤	٥ دقيقة	١
٢	ب – Denaturation	٩٤	١ دقيقة	٣٠
٣	annealing	٥٥	٣٠ ثانية	

٤	أ- Extension	٧٢	٤٥	
٥	ب – Extension	٧٢	٥ دقيقة	

الجدول أعلاه يمثل الظروف المعتمدة في تضخيم الجين (المادة الوراثية) المسؤول عنة إنتاج البديوسين في بكتيريا P. acidilactici والتي يتم برمجتها في جهاز الـ PCR



ت	درجة الحرارة	الفترة الزمنية
١	٩٥	١٠ دقيقة
٢	٩٤	٣٠ ثانية
٣	درجة حرارة الهادئ	٣٠ ثانية
٤	٧٢	٣٠ ثانية
٥	٧٢	٥ دقيقة

شكل يمثل دورة واحدة من الدورات ٤٠ لجهاز مبثر الحراري

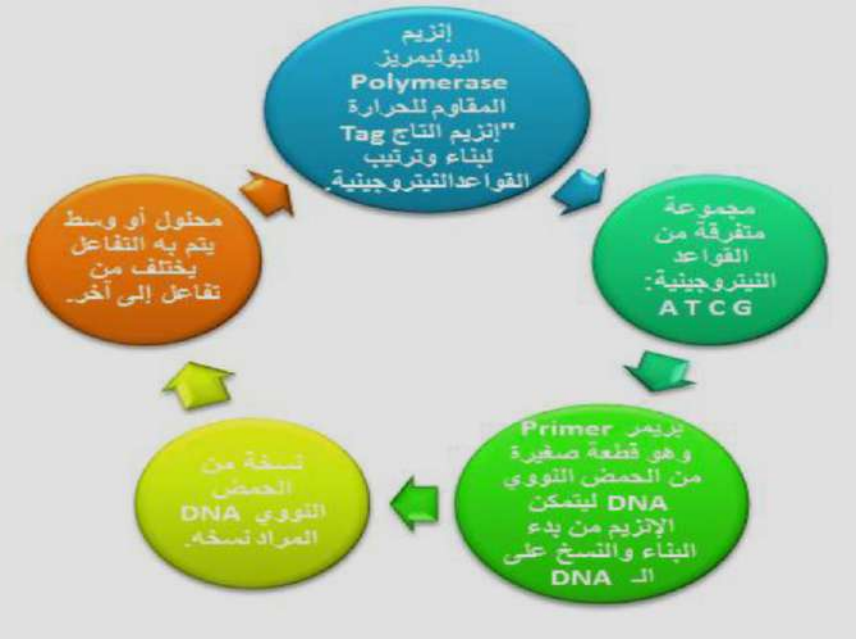
مخطط لدورة الواحدة في جهاز الـ PCR عن (أيشو 2012)

تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction(PCR)

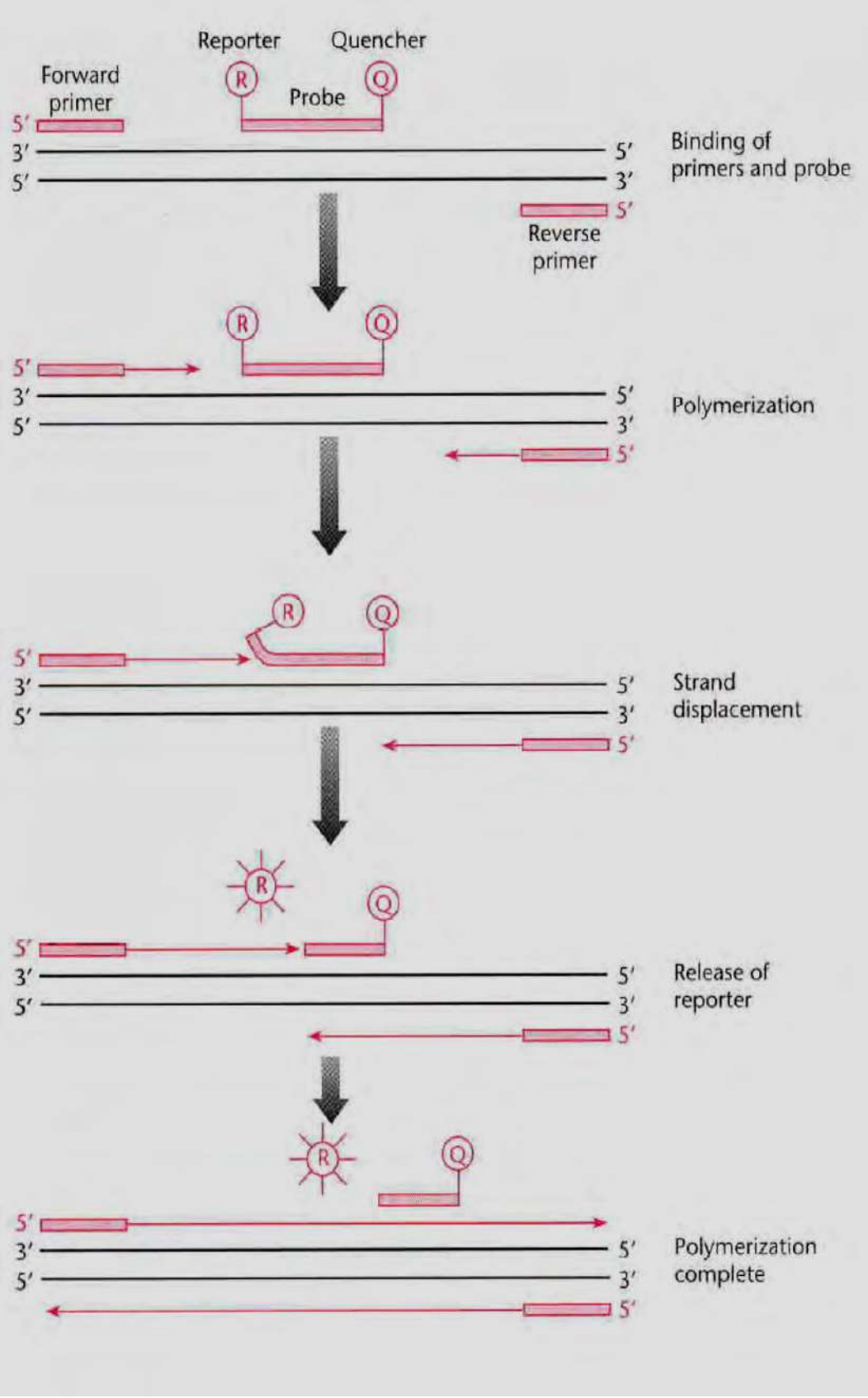
لقد وضعت هذه الطريقة في عام ١٩٨٣ من قبل كاري موليس وهي ألان تعد تقنية مهمة وأساسية ولا يمكن الاستغناء عنها في الكثير من الأحيان وتتم استخدامها في مختبرات البحوث الطبية والتقانات الحيوية والبصمة الوراثية وفي مكافحة الجرائم والمختبرات البيولوجية لمجموعة من التطبيقات وتشمل على استنساخ الـ DNA المتسلسل المعتمدة على الحامض النووي وعلى علم

الوراثة العرقي أو التحليل الوظيفي من الجينات ، وكشف وتشخيص الأمراض المعدية ، الأمراض الوراثية واختيار الأبوة .

ويقصد بالـ PCR لغويا تفاعل التضخيم السلسلي وهو تقنية مختبرية كما ذكرنا اكتشفت عام ١٩٨٣ وهي تقوم لإكثار ونسخ حامض النووي DNA خارج نظام خلية الكائن الحي .. وهي تحاكي عمل الخلية في الكائن الحي أي أنها طريقة لنسخ الحامض النووي في المختبر فبذلك تعد تقنية حيوية لاستنساخ قطعة محددة من حامض نووي ومضاعفة إنتاجها لكي يتسنى أجراء علية الاختبارات وفحوصات أضافية أخرى . كما تهدف هذه التقنية إلى تضخيم جزئيات قليلة من الحامض DNA بعد استخلاصه من خلايا أو سوائل الجسم لكائن الحي ، وثم الحصول على كميات كبيرة منه وإجراء التحليل عليه ، ويمكن اعتبار تقنية الـ PCR ترجمة مبسطة لعملية استنساخ الحامض النووي DNA أثناء انقسام الخلية ولإتمام هذه التقنية والحصول على نتائج جدية نحتاج إلى المواد التالية كما في الشكل (٣١)



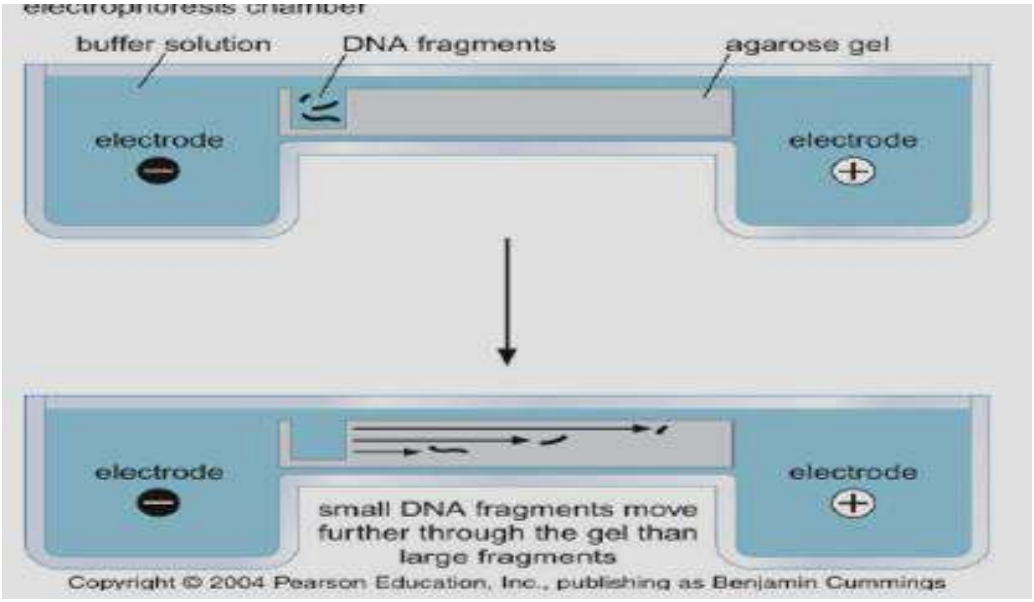
شكل (٣١)

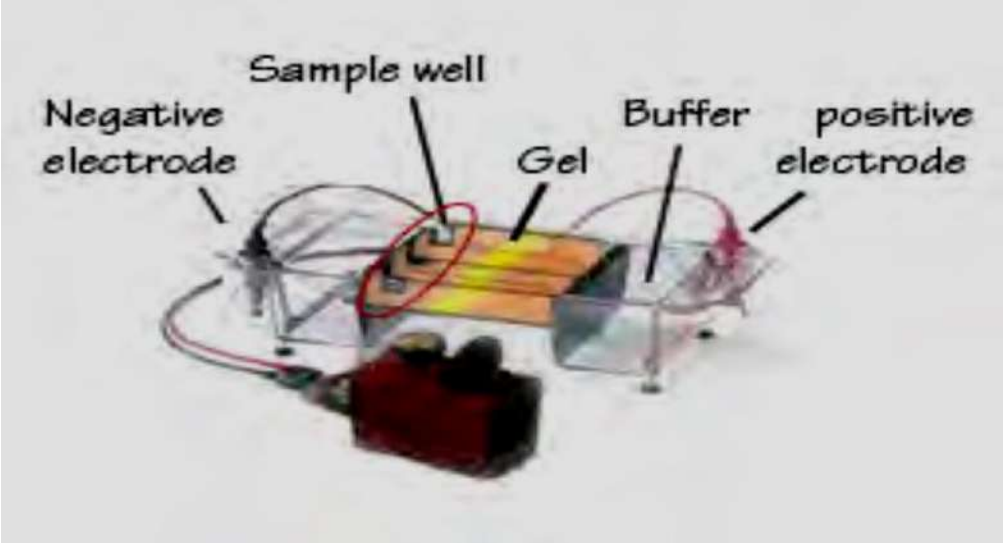

Reporter
Quencher
Forward primer
Probe
Reverse primer
Binding of primers and probe
Polymerization
Strand displacement
Release of reporter
Polymerization complete

شكل (٣٢) خطوات تفاعل الـ PCR

ثامن عشر : جهاز (الهجرة) أو الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis

بعد اتمام العمليات في جهاز الـ PCR يتم ترحيل العينة إلى جهاز الترحيل الكهربائي .. يقصد بالترحيل الكهربائي هو حركة الجسيمات المشحونة في المحلول تحت تأثير المجال الكهربائي ، اذ تهاجر الايونات المختلفة وبسرع مختلفة فبذلك يمكن فصلها عن بعضها البعض ، ويستعمل في هذا الجهاز مادة الاكاروز وهي مادة مأخوذة من نباتات بحرية إذ يتم تحضيرها أي عمل شريحة الاكاروز عن طريق إذابة المادة في محلول منظم وتسخينة على هيتر مع المحرك المغناطيسي حتى يصبح المحلول صافيا بشكل تام ، ومن ثم يتم صبه في إناء يحتوي على مشرط أي يكون فتحات حسب عدد العينات تسمى (PIT). شكل رقم (٣٣) .





شكل رقم (٣٣)

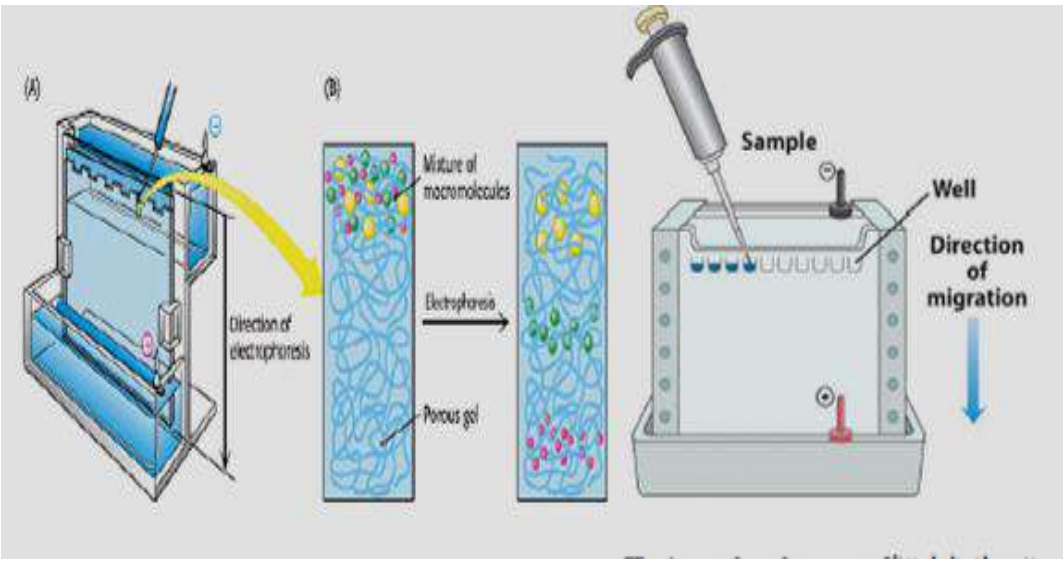
والتي توضع فيها عينات الـ DNA التي تم تحضيرها من جهاز الـ PCR ، تضاف هذه المادة الجلاتينية في جهاز الهجرة الكهربائية حتى يبرد مما ينتج عنه مادة جيلاتينة مرنة يتم استخدامها في عملية الفصل ، الوعاء الذي توضع فيه هذه المادة الجلاتينية يحتوي على محلول منظم وفيه قطبان موجب وسالب ، يتم تحليل الحامض النووي عن طريق وضعه في فتحات خاصة في الجل ومن ثم دفعه إلى الأمام بواسطة فرق جهد كهربائي ، فبذلك يبدأ الحامض النووي بالانتقال إلى القطب **الموجب** من القطب **السالب** وهذه العملية تحت عدة عوامل منها

- قوة فرق الجهد
- تركيز الاكاروز
- حجم قطعة الحمض النووي ، فكلما كان الحجم صغير كلما كانت أسرع

وبصورة عامة تستخدم وحدة ترحيل الأفقية لهلام الاكاروز ، والحامض النووي هو غير مرئي في الهلام ، فبذلك يتم صبغة بمادة ترتبط به قبل وضع العينات في الجل ومن أمثلة هذه المادة (مادة الاثيديوم بروماید) التي تتألق عند وضع المادة الجيلاتنية المأخوذة من جهاز الهجرة الكهربائية على جهاز للأشعة فوق البنفسجية .

وهناك عدة أنواع من أجهزة الترحيل الكهربائي: Types of gel of electrophoresis

١) جهاز بنظام الجل العمودي Vertical gel system : هذا النظام ينقسم إلى نوعين (جل بلاطة و جل انبوبي (Sub divided to * slab gel , and *tube gel) كما في الشكل (٣٤)



شكل (٣٤)

٢) نظام جل الأفقي Horizontals gel system كما في الشكل رقم (٣٥)

شكل (٣٥)

المواد المستعملة في الترحيل الكهربائي

١) TEB

٢) Loading buffer يتكون هذا المحلول من ٤٠% من (وزن/ حجم) سكروز ، ٠.٢٥ % (وزن/حجم) صبغة بروموفينول الازرق)

٣) Ethidium bromide ، صبغة الاثيديوم بروميد تحضر بتركيز ٥ مل غرام/مللتر باذابة ٠.٠٥ غرام من الصبغة في ١٠ مللتر ماء مقطر داخل قنينة معتمة ذات سداد محكم

٤) Agarose gel هلام الاكاروز. يحضر هلام الاكاروز بتركيز ٠.٨ % وذلك بإذابة ٠.٤ غرام من مسحوق الاكاروز في ٥٠ مللتر من دارئ TBE (*١) ويسخن في فرن المايكروويف ثم يترك ليبرد لدرجة حرارة ٥٠ درجة مئوية ويضاف إليه ٥ مايكروليتر من صبغة الاثيديوم بروميد .

ملاحظة : هذه الصبغة من المطفرات القوية والمسرطنة)

خطوات العمل الجل

- يصب الهلام في قالب الصب Tray يحاط جانبا القالب المفتوح بشريط لاصق tap أو تستخدم قاعدة صب خاصة بعد تثبيت مشط لتكوين الحفر comb former well قرب احى نهاياته لعمل الحفر well أو النقر pit ثم يترك لكي يتصلب نوعا ما بشكل حليبي لمدة ٣٠ دقيقة في جو المختبر .
- يرفع المشط الذي يكون الحفر well بعناية وبهدوء وينقل الهلام (الجل) المتصلب إلى حوض الترحيل Tank ثم يملا الحوض بدارئ TBE (*١) بحث يغمر في المحلول جميع سطح الجل وبارتفاع ٢- ٣ سم تقريبا
- يؤخذ ١٠ مايكروليتر من نموذج الـ DNA المستخلص من التجارب ويمزج مع ٢ مايكروليتر من دارئ التحميل وينقل إلى احدى الحفر في جل الاكاروز وباستعمال ماصات خاصة دقيقة
- ترحل العينات على فولتية ٤٠ فولت لمدة ١- ٢ ساعة .

تاسع عشر : جهاز التحليل الوراثي Genetic analyzer

يقوم هذا الجهاز بإجراء عملية الهجرة الكهربائية الشعرية capillary electrophorsis لمقاطع الحامض النووي بعد إكثارها بغية فصلها حسب :

١) -طول كل مقطع ،

٢) والوزن الجزيئي الخاص به

٣) وتحديد أنواع الأليلات Alleles المكونة للسمات الوراثية لكل موقع وراثي في كل عينة كما في الشكل (٣٦)

شكل (٣٦) جهاز تحليل الوراثي (شركة ٣١٣٠ Applied biosystemes model)
(عن رفعت ،٢٠١٤)

المختبر الثالث

طرق تحضير المحاليل وأنواع المحاليل المنظمة والتي

تستعمل في مختبر تقانة حيوية Biotechnology

المحلول : Solution

هو خليط متجانس من المذيب والمذاب ، المذيب يكون المكون الأكبر للمحلول بينما المذيب هو المكون الأصغر .

طرق التعبير عن تركيز المحاليل

هنالك عدة طرق للتعبير عن تركيز المحاليل وهي

١- النسبة المئوية الوزنية Concentration solute (w/v)

٢- النسبة المئوية الحجمية Concentration solute (v/v)

٣- المولارية Mlarity

٤- المولالية Molality

٥- العيارية Normality

٦- الجزء بالمليون part per million (ppm) , or part per billion (ppb)

١) النسبة المئوية الوزنية (w/v)

هي عبارة عن كتلة المذاب (غرام) في ١٠٠ مللتر من المحلول المذيب

Concentration solute (w/v%) = mass of sulte /volume of solution x 100

فلو فرضنا ان محلول مائي لكلوريد الصوديوم يبلغ تركيزه (٥٠%) هذا يعني ان كل ١٠٠ مل من محلول مذيب يحتوي على ٥ مل من ملح كلوريد الصوديوم (المذاب)

مثال example

تم اذابة ١.٢ غرام من NaCl في كمية كافية من الماء بحيث اصبح حجم المحلول ١٦٠ مللتر ، احسب النسبة المئوية الوزنية (تركيز المحلول % وزنا)

الحل :

NaCl (w/v%) = (w NaCl g) /(v solution ml) x 100

= 1.2 g /160ml x 100 =0.75 % g /ml

٢) النسبة المئوية الحجمية : (% V/V)

هي عبارة عن حجم المذاب الموجود في ١٠٠ مللتر من المحلول المذيب

Concentration (v/v%) = (v solute (ml) / total volume of solution (ml) x100

أي إن المحلول البالغ تركيزه ٢% حجما يعني أن كل ٢ مللتر (وحدة حجميه) في المذاب موجودة في ١٠٠ مللتر (وحدة حجميه مثالية) من محلول المذيب .

مثال

احسب تركيز محلول يتألف من ١٢ مللتر من الايثانول في ١٠٠ مللتر من المحلول

12 ml ethanol /100 ml x100= 12% v/v

٣) المولارية Molarity

هي عدد ملات المذاب الموجودة في لتر واحد (١٠٠٠مللتر) من محلول المذيب

Molarity M= moles of sulte /liter of solution

المولارية = عدد المولات / لتر واحد (١٠٠٠ مل)

عدد المولات = الوزن (weight) / الوزن الجزيئي (Mw)

الوزن weight = (المولارية المطلوبة x الوزن الجزيئي للمادة x الحجم المطلوب) / ١٠٠

الوزن الجزيئي (Mw) = مجموع الأوزان الذرية للمادة المراد تحضيرها .

مثال example

تم إذابة ٢٣ غرام من كلوريد الامونيوم (NH_4Cl) في كمية كافية من الماء ليصبح حجم المحلول ١٥٤ مللتر ، احسب مولارية المحلول ، علما بان الوزن الجزيئي لـ (NH_4Cl) هو ٥٣.٥

الحل :

١- نحسب عدد مولات كلوريد الامونيوم = ٢٣ /٥٣.٥ = ٠.٤٣ مول

٢- حجم المحلول = ١٥٤ مل / ١٠٠٠ =٠.١٥٤ لتر

٣- المولارية = ٠.٤٣ /٠.١٥٤ = ٢.٧٩ M ((NH_4Cl))

٤) المولالية Molality

هي عبارة عن عدد مولات المذاب في ١٠٠٠ غم من المذيب ، وهي طريقة غير شائعة كثيرا للتعبير عن تراكيز المحاليل في الوقت الحالي ولكنها مفيدة في موضوع تحديد الاوزان الجزيئية للمواد بالطرق العلمية التقليدية.

المولالية = عدد مولات المذاب / وزن المذيب بالكغم

أو المولالية = (عدد مولات المذاب x ١٠٠٠) / وزن المذيب بالغرام

مثال : Example

احسب مولالية محلول محضر من اذابة كلوريد الصوديوم في ٥٠٠ غم من الماء

الحل

١- عدد مولات الملح = الوزن بالغرام / الوزن الجزيئي = ٥.٨٥/ ٥٨.٥ = ٠.١ مول

٢- المولالية = ١٠٠٠ x ٠.١ / ٥٠٠ = ٠.٢ مولال

٥) العيارية Normality

هي عدد المكافئات الغرامية من المذاب الموجودة في لتر واحد من المحلول

العيارية N = عدد المكافئات الغرامية للمذاب / حجم المحلول باللتر

العيارية هي من الطرق للتعبير عن تراكيز المحاليل وهي تعتمد على ما يعرف بالمكافئ الغرامي

المكافئ الغرامي : هو كمية من المادة ذات العلاقة بالمول تم إصلاحه بالأساس لغرض عمليات التعادل بين الأحماض والقواعد ثم شمل بعد ذلك غيره من التفاعلات

المكافئ الغرامي = عدد المولات / درجة الحامض أو القاعدة

مثال : Example

احسب عيارية محلول محضر من إذابة ٩.٨ غم من حامض الكبريتيك في كمية من الماء بحيث أصبح حجم المحلول ٨٠٠ مل

الحل :

عدد مولات الحامض = الوزن/ الوزن الجزيئي = ٩.٨ / ٩٨= ٠.١ مول

درجة حموضة حامض الكبريتيك = ٢

عدد مكافئات الحامض = ٠.١ / ٢ = ٠.٠٥ مكافئ غرامي

العيارية N = ٠.٠٥/ ٠.٨ =٠.٠٦٢٥ عياري

٦) الجزء بالمليون أو بالبليون Part per million or billion

هي أحد طرق التعبير عن تراكيز المحاليل المعتمدة على كتلة المادة وتستخدم لتقدير تراكيز الصغيرة جدا ، فعندما نقول محلول تركيزه واحد بالمليون ، هذا يعني ان كل مليون غرام من المحلول مثلا تحتوي على غرام واحد من المذاب

Cncetration (ppm)= (mass of solute / mass solution) x 10^6

Cncetration (ppmb)= (mass of solute / mass solution) x 10^9

مثال : Example

عينة لمحلول مائي تزن ١٥٥.٣ غرام ، وجد أنها تحتوي على ١.٧ x ١٠^٤ ملغم من الفوسفات ، ما هو تركيز الفوسفات بالجزء بالمليون

الحل :

تركيز الفوسفات = $(1.7x10^4/1.553x10^2)$ x 106 = 1.1 ppm

قانون التخفيف :

Percentage (%) you have x unknown volume (ml) = percentage (%) you want x volume (ml) wanted

مثال :

حضر محلول ١٠٠٠ مل من ايثانول تركيزه ٧٠% من محلول ايثانول تركيزه ٩٥%

الحل

١- يجب معرفة حجم المحلول بتركيز ٩٥% من خلال تطبيق قانون التخفيف

٢- 95 x X = 70 x 1000 = 7000

٣- X = 7000/95 = 736.8 ml of 95% ethanol

٧) المحاليل الدارئة Buffers

وهي عبارة عن محلول مكون من حامض أو قاعدة ضعيفة مع ملح ذلك الحامض أو القاعدة يكون له القابلية على مقاومة التغيير في قيمة الـ pH عند إضافة كميات قليلة من حامض قوي أو قاعدة قوية مثل (Tirs buffer , or phosphate buffer)

صفات محلول الدارئ Traits of buffer liquid

*أن تكون له قيمة pH معروفة

*لا تتغير قيمةpH للمحلول الدرائ عند مرور فترة زمنية طويلة عليه أو عند تخفيفه

* تبقى قيمة pH للمحلول الدارئ ثابتة عند اضافة كميات قليلة من حامض قوي أو قاعدة قوية اليه بعض أنواع الـ Buffers المستعملة في مختبرات التقانة الحيوية (Biotechnology) أو البايولوجية الجزيئية :

١) TBE BUFFER : يتكون من Tris–borate + EDTA

٢) TSE BUFFER : يتألف من Tris – sucrose + EDTA

٣) STET BUFFER : يتكون من Tris –sucrose + EDTA +Triton x –100

المحاليل الدارئة يستفاد منها في تجارب تنقية الـ DNA والبايولوجي الجزيئي فمثلا تستخدم كمولدة للشحنات

Tris – acid عبارة عن محاليل دارئه فعالة في توفير ظروف أساسية جيدة في المحافظة على جزيئة الـ DNA من التحطم والذوبان في الماء

EDTA = عبارة عن مادة تعتبر عامل مخلبي Chelator agent ثنائي التكافئ شبيه بأيون المغنيسيوم Mg^{+2} يعمل كعامل مساعد في حماية جزيئة الـ DNA من الأنزيمات المحطمة لها

Tris x –100 = عبارة عن منظفات وهو منظف لا أيوني ولا يمتلك شحنة في تركيبه الكيميائي وهي مفيدة في كسر الاواصر غير المحبب للماء ويتميز بقدرته على إذابة الدهون والأغشية السايتوبلازمية دون مسخ البروتين

Sodium dodecyl sulfate(SDS) = هي أيضا من المنظفات الأيونية التي تمتلك شحنة وهي قوية في تأثيرها حيث باستطاعتها كسر الكثير من الأواصر غير المحبة للماء وتؤدي إلى فتح أنطواءات البروتينات إلى تركيب شبية بالقضيب .

**** محلول EDTA– saline (pH=8) 0.1 M EDTA + 0.15 M NaCl)**

يحضر هذا المحلول بإذابة ٢.٩٢ غرام من مادة EDTA و ٠.٨٦ غرام من NaCl في ٩٠ مللتر ماء المقطر ثم يعدل الرقم الهيدروجيني إلى ٨ و يكمل الحجم إلى ١٠٠ مللتر ماء مقطر

**** محلول TE buffer ph=8 (0.01 M Tris – HCl + 0.001M EDTA)**

يحضر هذا المحلول باذابة ٠.٠٩٢ غرام من مادة EDTA و ٠.١٥ غرام من Tris–HCl في ٩٠ مللتر من الماء المقطر ثم يعدل الرقم الهيدروجيني إلى ٨ ويكمل الحجم إلى ١٠٠ مللتر ماء مقطر

** محلول SDS 25%

يحضر باذابة ٢.٥ غرام من مادة SDS في كمية من الماء المقطر ويكمل الحجم إلى ١٠٠ مللتر من الماء المقطر .

المختبر الرابع

بروتوكول استخلاص الـ DNA

Extraction of DNA

تتطلب معظم فعاليات مختبرات الـ Biotechnology أو Molecular أو الـ Biology أو Genetic التعامل المباشر مع المادة الوراثية الـ DNA وذلك تمارس عملية وطرق استخلاص الـ DNA بشكل روتيني ومن مصادر حيوية مختلفة ويمكن أدراج عدد من الفوائد التي يمكن تحقيقها من خلال استخلاص الـ DNA منها :

١) يجري استخلاص الـ DNA كجزء من الاختبارات الوراثية Genetic testing أو الفحوص الطبية والنسب وفي الجرائم وفي البصمات الوراثية وفي التقارب والتباعد بين الأنواع في الكائنات الحية وفي معالجة بعض الأمراض المستعصية .

٢) تتطلب إجراء البحوث في مجال تقنيات الهندسة الوراثية Genetic engineering technological استخدام عينات من الـ DNA من مصادر مختلفة

كما تهدف عملية الاستخلاص هذه تنقيته من البروتينات وبقية مكونات الخلية ، وتبدأ عملية الاستخلاص بالحصول على خلايا الكائن الحي ، التي يتواجد الـ DNA في نواة الخلية وتتضمن هذه العملية عدد من الخطوات العامة سواءا كان المصدر خلايا نباتية أو حيوانية وهي :

أ- توفير خلايا التي تمثل مصدر للـ DNA

ب-استخدام تقنية المناسبة لتحطيم الخلايا وإطلاق الـ DNA من نواة الخلية

ت-فصل الـ DNA عن البروتينات وبقية مكونات الخلية

ث-تنقية الـ DNA وتركيزه

ويمكن الحصول على الـ DNA من أنواع الكائنات الحية المختلفة مثل البكتيريا أو العاثيات والنباتات والحيوانات ، ويجب مراعاة فيها خطوات الرئيسية العامة مع وجود بعض التباينات والخصوصيات لكل نوع .

تعد عملية الاستخلاص والتقنية للأحماض النووية الخطوة الأولى في معظم تقنيات الحيوية ، والهندسة الوراثية وتقانات البيولوجية ، وللحصول على الـ DNA بصورة نقية وخالي من أي تلوث او شوائب بالمثبطات ويجب اختيار طريقة الاستخلاص المناسبة ، اذ يجب الانتباه إلى وجود عدد من المثبطات التي تعيق العمل في تقنية الـ PCR (**سوف تشرح لاحقا**) وتؤدي إلى الحصول على نتائج غير صحيحة وغير دقيقة نتيجة وجود مثبطات تقنية الـ PCR وكما موضحة في الجدول التالي :

جدول (٣) يوضح مثبطات الـ DNA

المثبط	درجة تركيزه
SDS (Sodium dedecyl sulphate	%٠.٠٠٥
Phenol	% ٠.٢
Ethanol	%١
Isopropanol	%١
Sodium acetate	5 mM
Sodium chloride	25 mM
EDTA	0.5 mM
Hemoglobin	1 mg/ml
Heparin	0.15 I.u/ml
Uria	20 mM
Reaction mixture	% ١٥

طرق أو خطوات استخلاص الـ DNA

أن عملية استخلاص الـ DNA من المواد البايولوجية يتطلب عملية تحلل خلوي Cell lysis ، ويجب مراعاة أن تكون هذه العملية دقيقة تستخدم فيها القوة اللازمة لتحطيم الخلايا أو الأنسجة الكائنات الحية وفي نفس الوقت يجب مراعاة المحافظة على سلامة الـ DNA المستخلص من حصول تدمير له .وتستخدم لهذا الغرض العديد من الطرائق منها :

أولا: تحطيم الخلايا ميكانيكيا مثل الطحن Grinding أو التحلل بالازموزية

ثانيا : تحطيم الخلايا باستخدام المعاملات الكيميائية مثل استخدام المنظفات Detergents أو استخدام مادة Thiol reduction ، أو استخدام Ethylene diamine tetra acetate (EDTA) الذي يعمل على ازالة أيونات المغنيسيوم التي تعتبر ضرورية للحفاظ على تركيب الغشاء الخلوي ، أو استخدام Sodium dodecyl sulphate (SDS) الذي يساعد على تحطيم الأغشية الخلوية عن طريق إزالة الدهون من غشاء الخلية .

ثالثا : تحطيم الخلايا والأنسجة بعملية الهضم الانزيمي مثل إنزيم Protease

ويجب ان تتضمن العملية تحطيم الغشاء الخلوي وتعطيل الأنزيمات التي تحطم الـ DNA ضمن نفس العملية وذلك باستخدام المنظفات لتدمير الغشاء الخلوي واستخدام Chaotropic agents

لتعطيل الأنزيمات المحطمة للـ DNA الناتجة من داخل الخلية وبعد ذلك يجرئ ازالة مخلفات حطام الخلايا عن طريق التنقية أو التصفية أو الترسيب عن طريق الطرد المركزي

طرائق تنقية الـ DNA DNA Purification methods

يستخدم لتنقية الـ DNA من بقية المستخلصات الخلوية التقنيات المتاحة التالية

١) تقنية تنقية الاستخلاص والترسيب
٢) تقنية الكروماتوكرافي
٣) الطرد المركزي الفائق
٤) تقنية الفصل بالجذب والألفة

والتقنية الأكثر استخداما هي تقنية الاستخلاص والترسيب

تقنية الاستخلاص والترسيب Technological extraction and precipitation

تستعمل لهذا الهدف مذيبات الاستخلاص لإزالة الملوثات عن الـ DNA التي تشمل البروتينات وجزيئات الـ RNA ، حيث تستخدم عادة الـ Phenol و الـ Chloroform وذلك لإزالة البروتينات بالاعتماد على قدرة الفينول والكلوروفورم على مسخ البروتينات الموجودة في العينة sample وإمكانية استبعادها فضلا عن قدرتها على تثبيط عمل الأنزيمات المحطمة للـ DNA اذ تعمل المذيبات العضوية على ترسيب البروتين تاركة الـ DNA بحالة ذائبة ، وتتلخص هذه الطريقة :

- إضافة حجم مساوئ من الفينول مع محلول الخلايا المحطمة
- يمزج المحلول بصورة جيدة وبهدوء ثم توضع الانبوبة في حمام مائي على درجة حرارة ٦٥ درجة مئوية ولمدة ثلاث دقائق
- يعاد مزج الخليط لاربع مرات ثم يستخدم الطرد المركزي بقوة ٥٠٠٠ دورة / دقيقة ولمدة خمس دقائق إذ ينتج عن هذه الخطوة انفصال المزيج إلى ثلاث طبقات (**السفلى تمثل طبقة الفينول ، ثم طبقة وسطية تكون سميكة بيضاء لزجة تمثل بروتينات الخلية ، والطبقة العليا تحتوي على الـ DNA)**
- يسحب الـ DNA بعناية باستخدام ماصات رقمية (باستور) وتنقل إلى انبوبة معقمة .
- يضاف اليه مزيج من الكلوروفوروم : أيزوأميل بنسبة ١:٢٤ ، ثم تمزج جيدا
- يتم فصل الـ DNA بطريقة الطرد المركزي وينقل إلى انبوبة ثانية معقمة
- يضاف ١٠ مايكروليتر من محلول كلوريد الصوديوم ذي العيارية ٢.٥ ملاري
- ثم اجراء عملية ترسيب (الفيصل ، ١٩٩٩ ب)

ترسيب الـ DNA

تتم عملية ترسيب الـ DNA باستخدام Isopropanol أو Absolute ethanol بغية تركيز وترسيب الـ DNA اذ يظهر الـ DNA كخيوط بيضاء .. ثم يترك لمدة ساعتين بدرجة (- ٢٠) درجة مئوية ثم يستخدم الطرد المركزي بقوة ٥٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة خمس دقائق لترسيب خيوط الـ DNA ويستبعد الكحول في الاعلى ثم يخفف الـ DNA بمحلول TE ويخزن بدرجة (- ٢٠) درجة مئوية .

تنقية الـ DNA

تجرى عملية تنقية الـ DNA المستخلص من التلوث بالحامض النووي الرايبوزي RNA وذلك باستخدام أنزيم تحلل لـ (RNase) RNA ثم يعاد استخلاصه ثانية حسب الخطوات التي وصفت أعلاه وبالرغم من أن الـ DNA الملوث بالـ RNA يمكن استخدامه في العديد من التقانات الجزيئية دون تأثير .. لكن تنقيته من الـ RNA تعد ضرورية عند استخدامه في مجال الهندسة الوراثية والبصمة الوراثية Fingerprint(**راجع مادة النظري)**

ولإجراء عملية استخلاص الـ DNA نحتاج إلى الجهزة والعدد المختبرية وهي

- حمام مائي
- جهاز طرد مركزي
- أدوات قياس حجمية Micropipetors
- عدد من محاليل منها (محلول تحلل خلايا Lysis solution ، محلول محلي مركز Resuspension buffer ، كحول الاثانول أو كحول أيزوبروبيل Isopropyl)

المختبر الخامس

بروتوكول استخلاص الـ DNA من المصادر الحيوانية

Extraction DNA from animals sources

يمكن استخلاص الـ DNA من عدد مصادر للخلايا الحيوانية مثل الدم ، اللعاب، الأنسجة ، وخلايا المني ، فعلى سبيل المثال (استخلاص الـ DNA من الخلايا الموجودة في اللعاب)

خطوات الاستخلاص :

١- يتم وضع عينة الخلايا في أنبوبة اختبار ويضاف إليها محلول تحلل الخلايا

٢- توضع في حمام مائي لمدة ١٠ دقائق ويحتوي المحلول على مواد كيميائية ، (المنظفات Detergent وانزيمات تحلل البروتين protease) ، يعمل هذا المحلول على تحطيم جدار الخلية والغشاء النووي بتاثير المواد المنظفة ، بينما تعمل أنزيمات تحلل البروتين على تحطيم الهستونات وتحرير الـ DNA من الخلية

٣- يضاف المحلول الملحي المركز ليعمل على تجميع البروتينات وبقية مكونات الخلية مع بعضها

٤- توضع الأنبوبة في جهاز الطرد المركزي بسرعة ٨٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٠ دقائق .

٥- بعد ذلك يستبعد الراسب (الذي يكون طبقة سفلية.. مكونة من البروتينات وبقية مكونات الخلية)

٦- تحفظ الطبقة العليا التي تحتوي على الـ DNA في انبوبة ثانية معقمة

٧- يتم بعد ذلك ترسيب الـ DNA باستخدام الكحول اذ يضاف الكحول الاثيلي أو كحول ايزوبروبيل . ترج الأنبوبة برفق وبهدوء بغية مزج أو خلط الكحول مع المحلول . وبما أن الـ DNA لا يذوب في الكحول لذلك يبدأ بالظهور على شكل خيوط بيضاء وتسمى هذه الخطوة بترسيب الـ DNA

٨- بعد الترسيب توضع أنبوبة الاختبار في جهاز الطرد المركزي حيث يمثل الراسب الـ DNA ويستبعد المحلول في أعلى الأنبوبة .

بروتوكول استخلاص الـ DNA من مصادر نباتية

Extraction DNA from plants sources

تختلف الخلية النباتية عن الخلية الحيوانية في امتلاكها للجدار الخلوي ، لكن تبقى الخطوات الأساسية للاستخلاص الـ DNA متشابه

على سبيل المثال استخلاص الـ DNA من بذور البزاليا فنتبع الخطوات التالية :

خطوات الاستخلاص

١) نأخذ نصف كوب من بذور البزاليا الخضراء ونضعها في خلاط Blender

٢) نضيف إليها كمية قليلة من ملح الطعام (٨/١ ملعقة شاي) ويضاف للخليط ٢٠٠ مل ماء معقم بارد لتقليل درجة الحرارة الناتجة عن الاحتكاك عند تشغيل الخلاط ويتم التشغيل لمدة ١٥ ثانية ، هذه العملية تؤدي إلى تكسير البذور وفصل الخلايا عن بعضها

٣) يتم فصل المحلول بعد ذلك الذي يحتوي على خلايا العالقة عن بقية مكونات البذور الصلبة باستخدام مصفاة دقيقة أو قطعة قماش بيضاء معقمة

٤) يضاف إلى المحلول بعد التصفية ٣٠ مل من محلول منظف detergent و يتم خلط ومزجه بالمحلول ثم يترك لمدة ١٠ دقائق

٥) ينقل الخليط بعد ذلك إلى أنابيب اختبار بحيث يوضع في كل أنبوبة مقدار ثلث الأنبوبة ، ويتم ترقيم الأنابيب بحيث يكون رمز للعينة لكي لا تختلط ع عينات أخرى .

٦) يضاف قليل من أنزيم تحلل البروتين protease إلى الأنبوبة الموجودة في meattenderize أو في عصير الاناناس pine apple juice ويعمل الأنزيم على تحطيم البروتينات الهستونية وتحرير جزيئة الـ DNA

٧) تمسك الأنبوبة الاختبار بصورة مائلة، ثم يضاف إليها كحول ايزوبروبيل Isopropyl ذي التركيز (٧٠ –٩٥ %) بشكل تدريجي على جدار الأنبوبة لتكوين طبقة من الكحول في أعلى خليط الخلايا وبنفس حجم الخليط .

بما أن الكحول هو أقل كثافة من الماء لذلك يكون في الأعلى ، وان جزيئات الـ DNA لا تذوب في الكحول لذلك تبدأ بالظهور على شكل خيوط بيضاء متشابكة في منطقة اتصال الكحول مع الخليط ثم تبدأ تدريجيا تتجمع في طبقة الكحول .

٨) يتم سحب طبقة الكحول مع الـ DNA الذي تحتويه إلى أنبوبة أخرى ويعزل عنها الـ DNA باستخدام الطرد المركزي .

المختبر السادس

بروتوكول استخلاص الـ DNA باستخدام عدة الاستخلاص الجاهزة

Extraction DNA by using qiagen blood kit

تعمل العديد من شركات التقنيات الحيوية على توفير عدد متنوعة لاستخلاص الـ DNA من مصادر مختلفة مثل (Qiagen blood kit) التي تستخدم لاستخلاص الـ DNA من عينة الدم وذلك باتباع الخطوات التالية :

١) يوضع ٢٠ مايكروليتر من أنزيم Protease في أنبوبة أختبار بلاستيكية تحتوي على غطاء سعتها ١.٥ مل والتي تستخدم في جهاز الطرد المركزي Microcentrifuge

٢) يضاف إلى الأنبوبة ٢٠٠ مايكروليتر من عينة الدم Blood sample المراد استخلاص الـ DNA منها

٣) يضاف ٢٠٠ مايكروليتر من المحلول المنظم Buffer AL إلى الانبوبة وتخلط باستخدام جهاز Vortex لمدة ١٥ ثانية .ويتم حضنها على درجة ٥٦ درجة مئوية لمدة ١٠ دقائق في حمام مائي باستخدام حاملة أنابيب طافية

٤) يضاف ٢٠٠ مايكروليتر من كحول الايثانول (٩٠ – ١٠٠) % إلى العينة ويمزج بشكل جدي باستخدام جهاز الرج لمدة ١٥ ثانية

٥) يستخدم الخليط من الخطوة السابقة بهدوؤ وعناية خاصة مع عمود التدوير المجهز من الشرك QIA-amp spin column (صورة) ويركب مع أنبوبة تجميع سعو ٢ مل ويتم غلق الانبوبة

٦) يتم وضع الانبوبة في جهاز الطرد المركزي ٨٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة

٧) بعدها تنقل انبوبة التدوير QIA-amp spin column إلى أنبوبة جمع جديدة ونظيفة سعة ٢ مل وتستبعد الانبوبة الذي تحتوي على الراشح

٨) يفتح عمود التدوير QIA-amp spin column بعناية ويضاف ٥٠٠ مايكروليتر من محلول الغسيل الاول AW1 .

٩) توضع بعد ذلك في جهاز الطرد المركزي ٨٠٠٠ دورة / دقيقة ولمدة دقيقة واحدة

١٠) ثم مرة ثانية ينقل عمود التدوير QIA-amp spin column إلى انبوبة جمع نظيفة سعة ٢ مل وتستبعد الانبوبة التي تحتوي على الراشح

١١) يفتح عمود التدوير QIA-amp spin column بعناية ويضاف ٥٠٠ مايكروليتر من محلول الغسيل الثاني AW2 ويوضع في جهاز الطرد المركزي وعلى سرعة ١٤٠٠٠ دورة/ دقيقة ولمدة ٣ دقائق

١٢) ينقل عمود التدوير QIA–amp spin column إلى انبوبة خاصة لجهاز الطرد المركزي سعة ١.٥ مايكروليتر ويتبعد الراشح وانبوبة الجمع السابقة

١٣) فتح عمود التدوير QIA–amp spin column بعناية ويضاف ٢٠٠ مايكروليتر من محلول منظم AE لازالة الـ DNA ويوضع في جهاز الطرد المركزي ٨٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة

١٤) يوضع الـ DNA المستخلص بدرجة حرارة (– ٨٠) درجة مئوية ويخزن لفترة طويلة تمتد إلى سنوات ، أو يخزن ويحفظ في محلول TE بدرجو الحرارة (–٤) درجة مئوية لعدة شهور ، بينما يمكن خزن الـ DNA في الثلاجة بدرجة (٤) درجة مئوية لفترة قصيرة بغية الاستخدام .

أولا: استخلاص الـ DNA

هنالك عدة طرق مختلفة لاستخلاص الـ DNA من الخلايا الحية وهذه تعتمد بالأساس على تمزيق جدران الخلايا ومن ثم التخلص من البروتينات ومن الـ RNA ومن ثم الحصول على الـ DNA

خطوات العمل :

١- يؤخذ ٥ غرام من نسيج الكائن الحي خصوصا النباتات أو الحيوانات

٢- يهضم في محلول النتروجين السائل Liquid nitrogen لتحطيم جدر الخلايا

٣- ثم تضاف إليها بعض المواد وتوضع في حمام مائي لمدة ١٥ دقيقة

٤- يعمل فصل لها بواسطة جهاز الطرد المركزي لمدة ١٥ دقيقة ١٢٠٠ – ٣٠٠٠ rpm

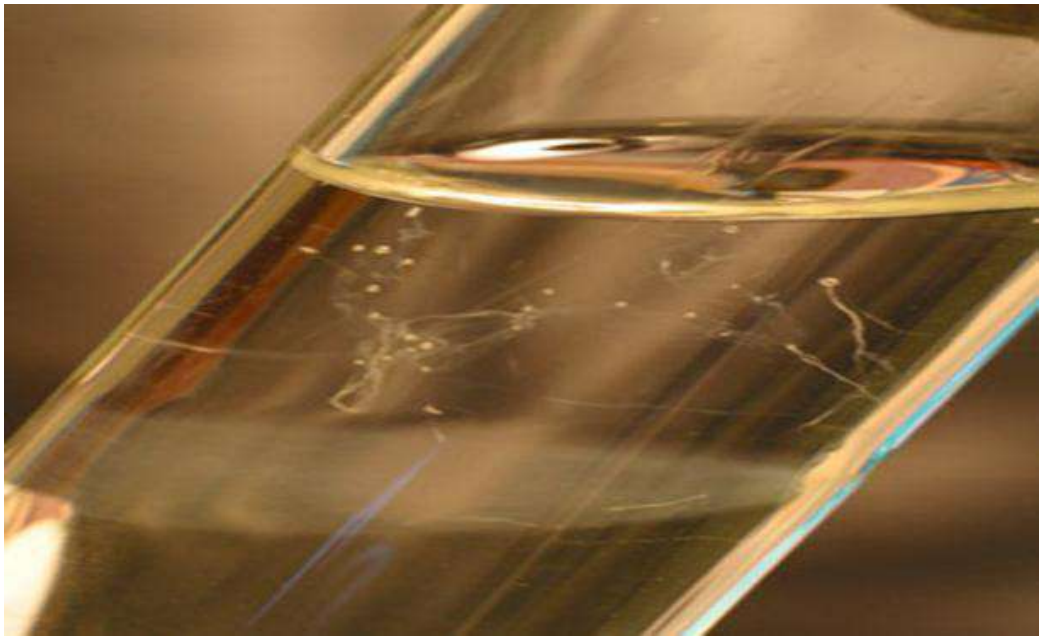
٥- يضاف اليها محلول لكسر وتحليل الخلايا (Lysis solution)

٦- توضع العينات على جهاز هزاز(Shaker) لمدة ١٠ دقائق

٧- نسكب الرائق ونحتفظ بالراسب مع قليل من الرائق ثم نعمل لها رج (Vortex) خلط لمدة ٤٠ ثانية

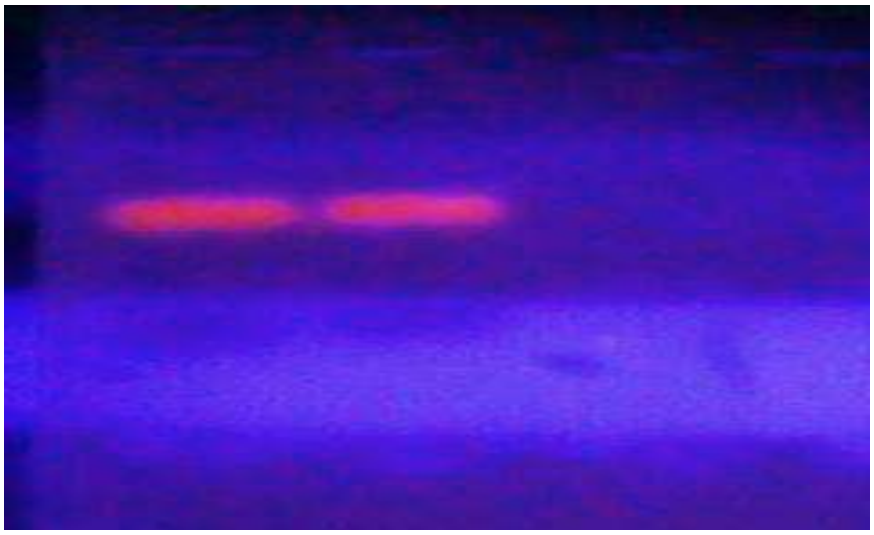
٨- نضيف محلول تكسير محتويات الخلية (Cell lysis solution) مع أنزيم RANase الذي يحلل الحامض النووي

٩- نضيف كحول الايزوبروبانول مع الرج يدويا يظهر الـ DNA على شكل خيوط ثم يضاف الايثانول بتركيز ٧٠% ويحفظ به



شكل (٣٧) DNA مستخلص من خلايا ومحفوظ في الايثانول

١٠ –يتم الكشف عن الـ DNA باستعمال الترحيل (الهجرة) الكهربائية على هلام (Agarose gel) تركيزه ٠.٨ %



شكل (٣٨) الترحيل الكهربائي للحامض النووي DNA على Agarose gel
(عن ايشو ،٢٠١٢)

ثانيا :البادئات لـ DNA (Primers)

عبارة عن تسلسل من الـ DNA يستخدم كنقطة البداية لعملية النسخ لـ DNA وذلك لعدم قدرة أنزيمات Polymerase على بناء سلسلة جديدة من الـ DNA من العدم . تستخدم Primers في أزواج (للأمام Forward ، وبالعكس Reverse)

ويجب مراعاة شروط التالية لتصميم Primers الذي يستعمل في تقنية PCR :

١) يجب أن يكون طول primer بين ١٨ – ٣٠ نيوكليوتيد

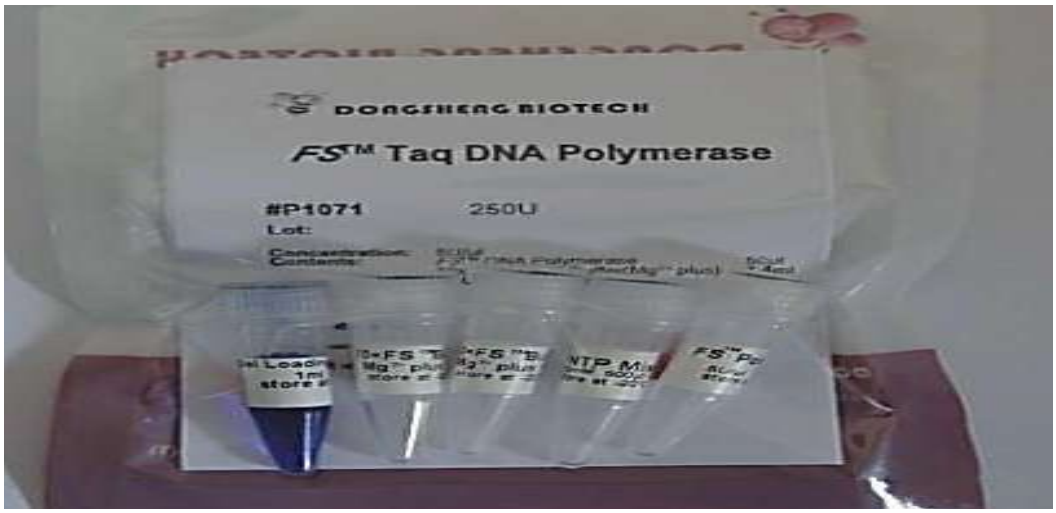
٢) محتوى G , C من كل primer يجب أن يكون في مجال (٤٠– ٦٠)% من اجل الفعالية القصوى له كما في الجدول (٤)

Primer set	Gene	Primer name	Nucleotide sequence (5' - 3')	Amplicon size (bp)	Annealing temperature (°C)	Gen bank accession #
1	26S rRNA	Forward Primer 26SF	CACAATGATAGGAGGAGCCGAC	534	60°C	AY283368
		Reverse Primer 26SR	CAAGGGAACGGGCTTGGCAGAATC			
2	actin11 (for rice)	Forward Primer Act1F	CAGCCACACTGTCCCCATCTA	67	60°C	AK100267
		Reverse Primer Act1R	AGCAAGGTCGAGACGAAGGA			
3	β-tubulin (for sugarcane)	Forward Primer TubF	CCAAGTTCTGGGAGGTGATCTG	103	60°C	CA222437
		Reverse Primer TubR	TTGTAGTAGACGTTGATGCGCTC			

ثالثا: أنزيم Taq polymerase

هو أنزيم يعود إلى مجموعة الـ DNA البلمرة Polymerase of DNA يعزل من بكتيريا Thermusaquaticus

Taq's optimum temperature for activity is 75–80°C , with a half –life of greater than 2 hours at 92.5°C , 40 minutes at 90°C and 9 minutes at 97.5°C , and can replicate at 1000 base pair strand of DNA in less than 10 seconds at 72°C



شكل (٣٩) أنزيم Taq polymerase

رابعا: كميات وافرة من النيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات منقوصة الاوكسجين

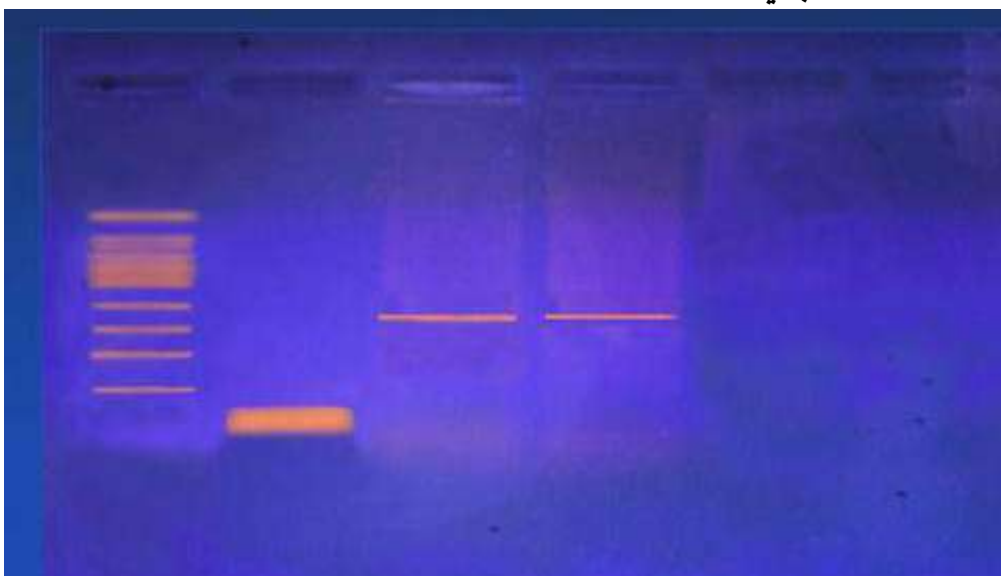
(Deoxynucleoside triphosphates , dATP , dCTP, dGTP , dTTP) (dNTPs)

خامسا : أيونات فلزية مناسبة أهمها أيونات المغنيسيوم Mg^{+2} التي تعتبر كعامل مساعد Cofactor في تفاعل الـ PCR

سادسا: زيت معدني يضاف إلى خليط التفاعل من اجل منع التبخر يضاف على سطح الخليط

شكل(٤٠) خليط تفاعل لمواد تقنية PCR

سابعا : الترحيل الكهربائي للعينات على AGAROSE GEL ٢%



شكل (٤١) ترحيل كهربائي لنواتج تقنية PCR على Agarose gel ٢% (ايشو ،٢٠١٢)

المختبر السابع

بروتوكول استخلاص الـ DNA من نبات البزاليا

DNA Extraction from peas plant

١-قبل إجراء أي مرحلة يجب تحضير المحاليل الخاصة بذلك وتكون كافة الأدوات التي تستعمل قد تم تعقيمها بصورة جيدة في جهاز اوتوكليف (جميع الصور عن أيشو ، ٢٠١٢)

٢- غسل العينة بماء الحنفية كما في الشكل (٤٢)

٣-غسل العينة بماء مقطر لمدة عشرة دقائق

٤-تجفيف العينة على ورق ترشيح كما في الشكل(٤٣)

٥- تقطيع العينة إلى أجزاء صغيرة بطول ٣-٤ ملم واخذ وزن (٤) غرام من العينة ثم وضعها في جفنه فخارية وإجراء عملية الهضم للعينة باستخدام نتروجين سائل حتى تصبح العينة بصورة باودر كما في الشكل (٤٤)

٦-توضع العينة بعد الهضم مباشرة في بيكرات او قناني زجاجية معقمة يضاف على العينة محلول CTAB بمقدار (١٠) مل كما في الشكل (٤٥)

١- توضع العينة في حمام مائي هزاز على درجة حرارة ٦٦ درجة مئوية ولمدة ساعة كما في الشكل رقم (٤٦)

٨-يضاف محلول ١٠ مل من Chlorophorm /Isoamyle 24:1)alcohol)

كما في الشكل (٤٧)

٩ – توضع العينة على هزاز لمدة ١٥ دقيقة كما في الشكل (٤٨)

١– تنقل العينة إلى أنابيب اختبار tube test و توضع في جهاز centrifugated على ٤٠٠٠ / دقيقة لمدة نصف ساعة كما في الشكل (٤٩)

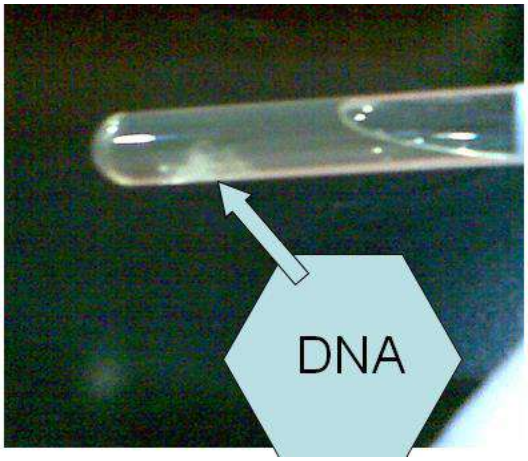
١١- في هذه المرحلة سوف تتكون ثلاث طبقات في أنبوبة اختبار كما في الشكل (٥٠)

١٢- وتسحب الطبقة العليا لأنها تحتوي على الأحماض النووية DNA وتنقل إلى أنبوبة اختبار جديدة ويضاف إليها ٥ مل من محلول أما الطبقة الوسطى والسفلى تهمل كما في الشكل(٥١)

١٣- سحب مستخلص الـ DNA بواسطة خطاف كما في الشكل (٥٢)

١٤-وضع الـ DNA بعد الاستخلاص في انابيب بغية وضعها في الحاضنة الباردة (المجمدة)

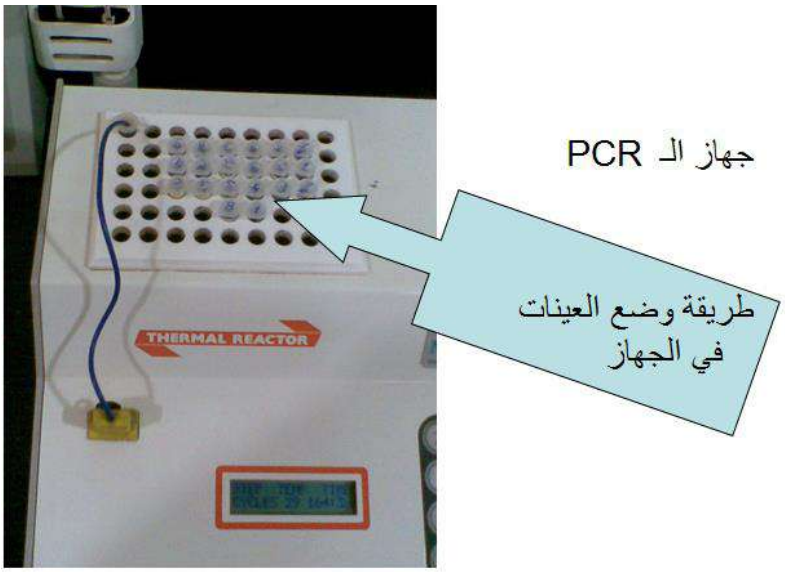
كما في الشكل (٥٣)



(عن يشو ، ٢٠١٢)

١٥ – عملية تجفيف الـ DNA كما في الشكل (٥٤)

شكل (٥٥)تمثل جهاز PCR الذي استخدم عند تحضيري لدراسة DNA لنبات البزاليا مع جهاز الترحيل الكهربائي المستخدم(عن أيشو ، ٢٠١٢)



شكل (٥٦) تمثل وضع العينات SAMPLES في جهاز الـ PCR مع البرمجة (عن أيشو ، ٢٠١٢)

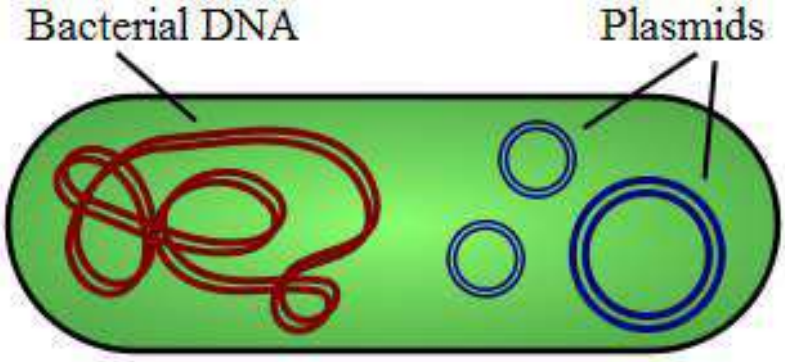
شكل(٥٧) لبعض الأجهزة التي تم استخدامها (عن أيشو ، ٢٠١٢)

المختبر الثامن

بروتوكول تحضير (استخلاص) الـ DNA البلازميدي من خلايا البكيتريا

Isolation of plasmid DNA

PLASMID : هي عبارة عن الـ DNA يقع في جزيئات الـ DNA الكروموسومية لـه القابلية على التضاعف بمعزل عن الـ DNA الكروموسومي كما في الشكل (٥٨)



شكل (٥٨) PLASMID

هنالك عدة طرق لعزل الـ DNA البلازميدي وهي :

١) طريقة التحليل القاعدي Alkaline lysis method

٢) طريقة التحليل بالغليان Boiling lysis method

٣) طريقة الفينول Phenol method

٤) طريقة الاثيديوم بروماید

Ethidium bromide –caesium chloride density gradient centrifugation method

استخلاص الـ DNA البلازميدي بطريقة التحلل القاعدي

١- لقح وسط مكون من (LBbroth500ml +50 mlg/ml امبيسيلين)

٢- مستعمرة مفردة من سلالة بكتيريا E. coli حاوية على بلازميد PBR 322 ثم يتم حضن في حاضنة هزازة على درجة الحرارة ٣٧ درجة مئوية لحين ان تصل الكثافة الضوئية OD 600 للوسط إلى ٠.٦

٣- أضف 1.2 ml 10% (W/V) من Chloramphenicol in ethanol إلى الوسط ومن ثم احضن في حاضنة هزازة لمدة يوم كامل ليتحرر البلازميد في الخلية

٤- اعزل أو أحصد الخلايا بواسطة جهاز الطرد المركزي على سرعة ٦٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١ دقيقة على درجة حرارة ٤ درجة مئوية ، ثم بعد ذلك اعد تعليق الراسب في ٥

مل من **محلول TEG buffer (يتكون هذا المحلول من 10 + 25 mM of Tris + 50 Mm of glucose mM of EDTA)**

٥- حلل معلق الخلايا بإضافة ١٠ مل من محلول اثنان واخلطه بصورة جيدة

يتكون محلول أثنان من (pH= 12.5) 1% of SDS + 0.2 M of NaOH)

٦- أضف ٥ مل من المحلول الثالث المثلج وقلبه لخمسة مرات ومن ثم يحفظ بصورة مثلج لمدة ١٥ دقيقة

المحلول الثالث يتكون من (pH =4.5) 3M of K-acetate)

٧- قم بإجراء الطرد المركزي للمعلق الخلوي المستحلب على سرعة ١٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة على درجة حرارة ٤ درجة مئوية

٨- قم بنقل الراشح الرائق الذي يحتوي على البلازميد إلى أنبوبة جهاز الطرد المركزي ثانية ثم لاحظ الحجم

٩- أضف ٠.٧ حجم من محلول Isopropanol المبرد إلى الراشح وأمزجة بعملية التقليب ومن ثم قم بإجراء طرد المركزي على سرعة ١٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة على درجة الحرارة ٤ درجة ممئوية

١٠- تخلص من الراشح ثم قم بعملية غسل ب ٧٠% من محلول ايثانول لكب يجب عدم تعليق الراسب

١١- اعد تعليق الـ DNA البلازميد في ١ مل من TE buffer ثم يوضع في المجمدة لكي يجمد .

المختبر التاسع

بروتوكول استخلاص الـ RNA من خلايا حقيقية النواة

Extraction of RNA

أنواع الـ RNA :

١) mRNA يقوم هذا الحامض بعملية نقل المعلومات الوراثية من الـ DNA إلى مكان صناعة البروتين في السايتوبلازم وهو الرايبوسوم

٢) tRNA هذا النوع موجود في السايتوبلازم يحمل الأحماض الامينية لترتيبها على شريط mRNA ، يوجد ٢٠ من tRNA في الخلية الواحدة

٣) rRNA يسمى هذا النوع بالـ RNA الرايبوسي لأنه يدخل في تركيب الرايبوسومات ، وله دور في عملية صناعة البروتين في السايتوبلازم

خطوات عزل جزيئات الـ RNA في خلايا حقيقية النواة

أولا: تحلل الخلية Lysis of the cell

١) اخلط مع معلق خلايا E.coli (0.5 O.D at 600 nm) حجم مساوئ من Diethyl pyrocarbonate (DEPC) الذي يعمل كمثبط للانزيمات الهاضمة للـ RNA ، كما يجب العمل على مجانسة الخليط ومن ثم العمل على حضنه على درجة الحرارة ٤ درجة مئوية

٢) أضف 0.4 ml من SDS ٥% ، إلى معلق خلايا SDS يعمل على اذابة الغشاء الدهني في جدار الخلايا ليسمح لانزيمات المحللة Lysozyme من الوصول إلى طبقة الببتيدو كلايكات لتحطم جدار الخلية كذلك يعمل الـ SDS كمثبط لأنزيمات الهاضمة للـ RNA (RNase)

٣) استخدم 2ml من محلول Buffer الذي يحتوي على أنزيم (Lysozome) (400 ug/ml) لكل 10 ml من خليط خلايا E. coli ثم جانس الخليط وقم بعملية حضن المحلول على درجة حرارة الغرفة لمدة ٥- ٢٠ دقيقة

ثانيا: تنقية الـ RNA Purification—

١) قم بعملية الطرد المركزي لمعلق الخلايا المتحللة على سرعة ٣٠٠٠ دورة / دقيقة ولمدة ١٠ دقائق

٢) علق الراسب مع حجم مساوئ من Guanidinium التي تعمل على تقوية مثبطات الأنزيمات الهاضمة للـ RNA وكذلك يمسخ البروتين ، ويجب ان تكون الـ pH غير قاعدية هذا يؤدي إلى تعليم الـ RNA

٣) يجب إزالة جزيئات الـ DNA وذلك باستخدام أنزيم DNase للتخلص من الحد الأدنى للتلوث الـ DNA الجينومي .

٤) تزال البروتينات الملوثة بإضافة خليط من (Phenol: Chloroform : Isoamyl alcohol) بتركيز (٢٥:٢٤:١) وتعاد هذه الخطوة مرات عديدة

٥) قم بعملي نقل الطبقة العليا من المحلول (الخليط) إلى أنبوبة أخرى وأضف حجم واحد من Isopropanol المطلق الثلج بغية ترسيب الـ RNA

٦) قم بعملية الطرد المركزي على سرعة ١٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة بدرجة حرارة ٤ درجة مئوية

٧) أهمل الراشح واغسل الراسب ب Ethanol بتركيز (٧٠%)

٨) قم بإجراء طرد المركزي على سرعة ١٠٠٠ دورة /دقيقة ولمدة ٥ دقيقة بدرجة ٤ درجة مئوية

٩) اعد تعليق الـ RNA الذي تم عزلة بالخطوات السابقة في 100 ul من TE Buffer ثم قم بعملية تجميد المعلق

حساب تركيز الـ Calculate the concentration of(RNA) RNA

الطريقة :

Concentrationof RNA (ug/ml)= O.D 260 nm x 40 x dilution factor

1 (O.D 260 nm) = 40 (ug/ml) of RNA

نقاوة RNA Purity of RNA

O.D 260 nm /O.D 280 nm = should be 2

المختبر العاشر

بروتوكول استخلاص DNA من غدة ثايمس العجل

Extraction DNA from calf thymas gland

تحضير المواد والمحاليل

١) محلول ٠.٨٥% (وزن/ حجم) من كلوريد الصوديوم + ٠.٠١ مولاري من سترات الصوديوم

يحضر هذا المحلول بإذابة ٠.٨٥ غرام من كلوريد الصوديوم و ٠.٣ غرام من سترات الصوديوم في كمية من الماء المقطر ، ثم يكمل الحجم إلى ١٠٠ مللتر بالماء المقطر ويعقم بجهاز (الموصدة) أتوكليف لمدة ١٠ دقائق ثم يحفظ في الثلاجة .

٢) محلول SDS5% (وزن / حجم)

يحضر هذا المحلول بإذابة ٥ غرام من مادة SDS في كمية من محلول ٤٥% (حجم/حجم) من ايثانول ثم يكمل الحجم إلى ١٠٠ مللتر بالمحلول نفسه

٢) ملح كلوريد الصوديوم الصلب

٣) غدو ثايمس العجل (يجب تجميدها قبل عملية الاستخلاص)

٤) جهاز خلاط مختبري مبرد Blender

٥) Ethanol ٩٠% مبرد

٦) Ethanol ٧٠%

٧) محرك ميكانيكي

٨) زجاجيات مختلفة ومعقمة في الاوتوكليف

خطوات العمل (طريقة الاستخلاص) Method of extraction

١) يؤخذ ٢٥ غرام من الغدة وتقطع إلى قطع صغيرة وتوضع في خلاط مبرد وتجرى عملية تجانس لها لمدة ٣ دقائق وذلك بعد إضافة ١٠٠مللتر من محلول كلوريد الصوديوم+ سترات الصوديوم المبرد . قم بعملية الطرد المركزي بالجهاز الطرد المبرد بسرعة ٣٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٥ دقيقة ، ثم قم بإهمال الراشح ، واعد عملية التجانس الراسب مرتين بنفس الطريقة

٢) قم بوضع الراشح في بيكر يحوي على ٥٠٠ مللتر من محلول ٠.٨٥ % كلوريد الصوديوم المبرد مع التحريك المستمر باستعمال محرك ميكانيكي ، ثم قم بإضافة ٥٠ مللتر من محلول SDS 5% للمزيج وتستمر عملية التحريك لمدة ساعة واحدة بدرجة حرارة الغرفة

٣) يضاف للمزيج ٢٧.٥ غرام من كلوريد الصوديوم ويستمر التحريك لمدة ١٥ دقيقة ،ذلك لضمان ذوبان الملح بصورة تامة ..

د.إسراء عبدالحسين جاسم

٤) ثم قم بإجراء عملية الطرد المركزي بسرعة ١٠٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٣٠ دقيقة ، قم بإهمال الراسب البروتيني **(ذات اللون الأبيض)** ،

٥) ثم يضاف للمحلول الطافي حجم مساوئ من ٩٦% من Ethanol مبرد لغرض ترسيب الـ DNA الذائب ،

٦) يجمع الـ DNA المترسب وذلك بلفه على قضيب زجاجي Spooling ثم يغسل ثلاث مرات ويوضع في فرن كهربائي على درجة حرارة ٤٠ درجة مئوية لحين الجفاف التام .

خطوة اختيارية : تنقية الـ DNA الكروموسومي الخام الذي تم استخلاصه وبالخطوات التالية

١) إذابة الـ DNA الخام الجاف من الخطوات السابقة في ٣٥٠ مللتر من ماء المقطر المعقم مع التحريك المستمر لمدة ٢-٣ ساعة على درجة حرارة الغرفة .

٢) أضف للمزيج ٣٢ مللتر من محلول ٥% (وزن/حجم) SDS مع الاستمرار بالتحريك لمدة ساعة واحدة ثم يضاف ٢٢.٥ غرام من كلوريد الصوديوم

٣) قم بعد ذلك بعملية الطرد المركزي المبرد بسرعة ١٣٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٣٠ دقيقة .

٤) أهمل الراسب البروتيني ، ثم يرسب الـ DNA ويجفف كما مبين أعلاه

استخلاص DNA من الموز

خطوات الاستخلاص

١) يتم تقشير موزتين ثم يضاف إليهما ٢٥٠ مل من ماء المقطر المعقم ثم يتم سحقهما إلى ان يصبح المحلول مستحلب (محلول A)

٢) يتم مزج (كل على انفراد) ملعقة شاي من الشامبو ، مع كميتين بإطراف الأصابع من ملح الطعام ،ثم إضافة أربعة ملاعق شاي من ماء المقطر ، يتم حفظ الخليط مع تجنب حصول فقاعات (محلول B)

٣) تضاف ملعقتي شاي من محلول A مع جميع محلول B وتمزج بصورة جيدة لمدة ١٠ دقائق (محلول C)

٤) يتم تقسيم المحلول (C) إلى قسمين (C1) و (C2) ويحفظ في مكان بارد (ثلاجة)

٥) يتم ترشيح محلول C1 خلال طبقتين من المناديل الورقية (ورق ترشيح معقم) أو عبر قماش في بيكر صغير ثم يوضع الراشح في أنبوبة اختبار ، ويوضع محلول (C2) في أنبوبة اختبار أخر .. Test tube

٦) يضاف كحول اثيلي بارد برفق مع ميل الأنبوبة (أو يضاف Isopropanol) إلى كل الأنبوبة ، وعدم إجراء عملية رجع للانبوبة

٧) تعاد كل أنبوبة إلى مكانها الطبيعي بصورة عمودية ويلاحظ ظهور الـ DNA بشكل الياف مخاطية بيضاء اللون بين الطبقتين

٨) سوف يطفو ال DNA على الكحول الاثيلي خلال ١٥ دقيقة

٩) يمكن جمع الـ DNA بواسطة كلاب معقم أو قضيب زجاجي

١٠) يحفظ في مجمدة لحين الاستعمالات الأخرى من الدراسة

المختبر الحادي عشر

تقدير عدد مولات(السايتوسين والكوانين)% ، ودرج الاذابة

Determination of mol G+C % ratio and melting point

أن نسبة الـ G , C, T, A تكون ثابتة في الـ DNA في الكائنات الحية ، ويمكن اعتبار أن نسبة محتوى C G أو النسبة المئوية للـ C G تكون ثابتة في الـ DNA إلى الأخر . تعد هذه الصفة مهمة لتحديد التشابه الجيني Genetic similarity بين الكائنات وتقدير التباعد الجيني بينهما Genetic distance بين نوعين اثنين أو صنفين ومن امثلة طرق التقدير هي لهذه النسب هي (PCR , DNA / DNA , DNA /RNA) .

يمكن اعتبار جزئية الـ DNA هي جزيئة ثابتة بالحرارة Thermo stable molecule لحد ٧٠ درجة مئوية وذلك لعدة عوامل

١- عند تسخين سائل الـ DNA بصورة كافية لكسر الآصرة الهيدروجينية التي تربط الشريطين مع بعضهما (عند هذه الدرجة تضعف هذه الأواصر ويتم كسرها)

٢- عند حدوث ذلك سوف ينفصل الشريطين بعملية يطلق علها تشوه الـ DNA (DNA Denaturation) أو إذابة الـ DNA (DNA melting)

فدرجة الحرارة التي عنده يكون شريطين الـ DNA منفصلين تكون نصف مشوه تسمى درجة الحرارة الإذابة **(T*m*) (Temperature malting)** وتعرف هذه الدرجة بأنها الدرجة التي يكون عندها ٥٠% من شرائط الـ DNA مزدوجة Double strand و ٥٠% من الشرائط تكون منفردة Single strand **وهذه الدرجة(T*m*) تعتمد على عدة عوامل منها :**

١) الأواصر الهيدروجينية ضمن الهيكل في العينة

٢) نسبة أزواج الـ GC ، لان الآصرة الثلاثية بين الأزواج G=C تكون أكثر ثباتا من الآصرة المزدوجة بين أزواج A=T

نقطة الإذابة لعينة الـ DNA ترفع من كمية المعلومات عن مكونات العينة من القواعد composition (G/C content)

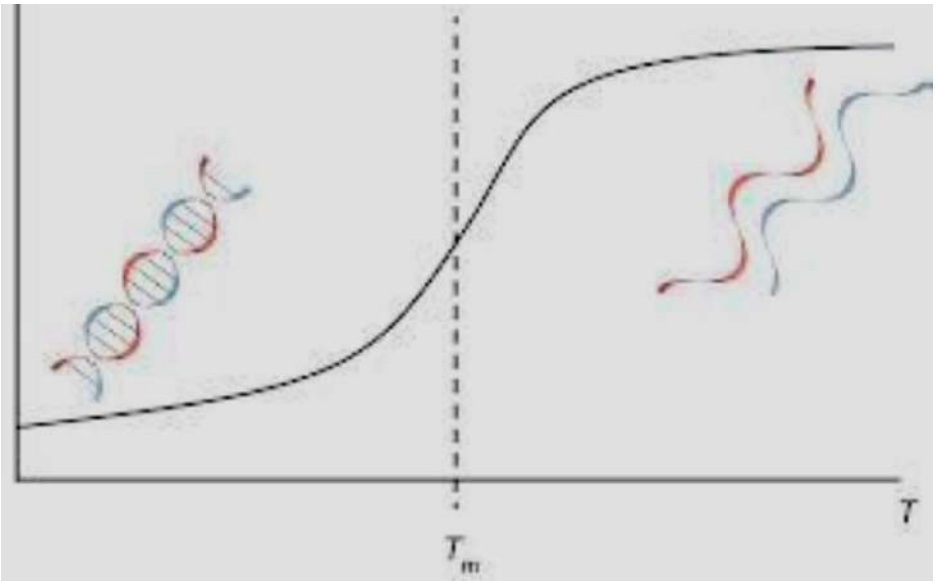
الشريط المزدوج للـ DNA تكون قواعد النيوكليوتيدات مكملة لبعضها البعض وبعبارة أخرى , G=C A=T لذلك نتبع القانون التالي

AT% + GC% = 100%

1= (T+C) /(A+G)

قياس نسبة الـ DNA بواسطة تحليل منحنى الذوبان

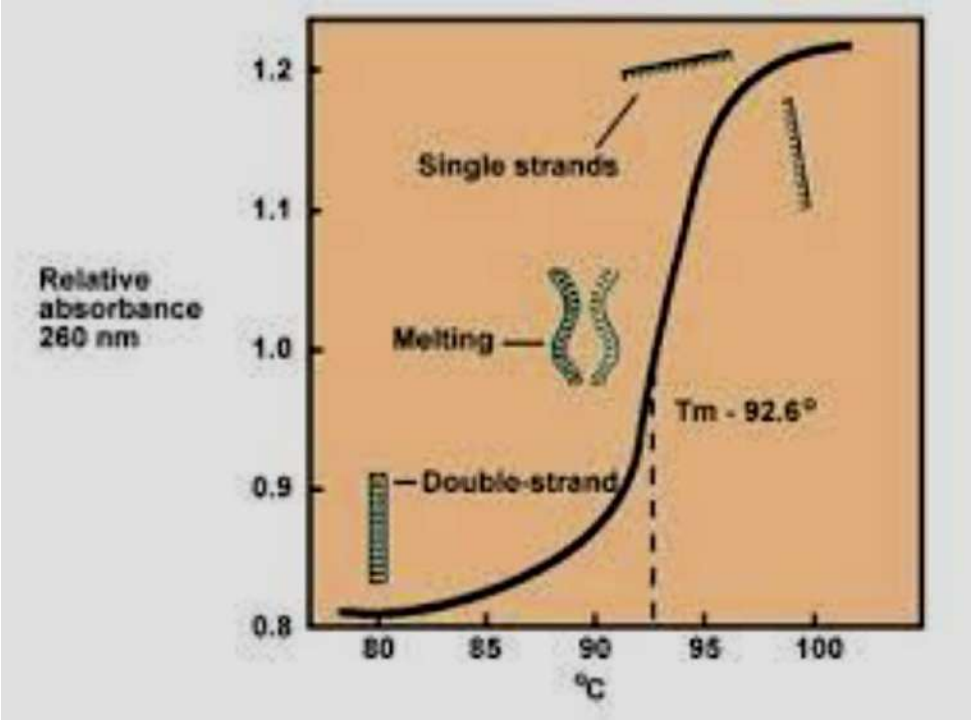
Measurement of DNA (G–C)% ratio by melting curve analysis



شكل (٥٩) منحنى الذوبان

قيمة درجة الذوبان (T*m*– value) للـ DNA يمكن تعينها وحسابها من خلال قياس الامتصاصية عند 260 nm ، تباعد أو تفارق أزواج القواعد النتروجينية تجلب أو تؤدي إلى زيادة في الامتصاصية ، ويطلق على ذلك تأثير اللوني المفرط Hyper chromatic effect .

التغيير في التركيب الثانوي للـ DNA يحدث نتيجة لرفع درجة الحرارة ، وهذا يغيير من امتصاص الضوء ، مثال على ذلك إذا كان سائل الـ DNA ذي الشريط المزدوج فن معدل الامتصاص له عند 260 nm = 1.00 ،فالسائل الـ DNA ذي الشريط المفرد (الواحد) يكون معدل الامتصاص له عند نفس التركيز 260 nm = 1.37 .... هذه العلاقة توصف في اغلب الأحيان بان السائل ذي الـ DNA المزدوج أصبح فائق اللونية Hyperchromatic ، عند التسخين ، هذا الاختلاف يتعلق بأن لولب (حلزون) الـ DNA يكون مكدس وعندما يتم تبريد اشرطة الـ DNA المنفصلة تدريجيا تعود إلى طبيعتها Renaturated ، فبذلك فان الامتصاصية للعينة سوف تقل بسبب Hyperchromatic سوف ينخفض وحتى نحدد الـ (T*m*– value) نجعل قيم الامتصاصية مخططة ضد درجة الحرارة المطابقة كما في الشكل (٦٠)



شكل (٦٠)

طريقة العمل The method

١) علق عينة الـ DNA ب TE-Buffer حتى نحصل على تركيز عمل ٢٠ مايكروغرام / مل

٢) يجب تصفير جهاز المطياف عند Blank بـ TE-Buffer

٣) سخن عينـة الـ DNA بصـورة تدريجيـة فـي حمـام مـائي water Path وقـم بقيـاس الامتصاصية عند درجات الحرارة ٥٠ و ٦٠ و ٧٠ و ٨٠ و ٩٠ و ١٠٠

٤) ارسم منحنى الإذابة لـ DNA (DNA melting curve) وذلك بوضع قيم الامتصاص ضد قيم الحرارة المطابقة لها ..فان نقطة الالتواء للمنحنى هي تمثل نقطة الإذابة لعينة الـ DNA تحت الدراسة

٥) احسب مولات الـ G-C% باستعمال المعادلة التالية :

$$Tm = 70+(0.47x\ G+C\%) \qquad .1$$

$$G-C\%\ OF\ DNA\ Samle = (Tm-70) \times 2.5$$

ولتقدير درجة الحرارة Temp. renaturation (TOR) نستعمل المعادلة التالية :

$$TOR = 52 + (0.47\ X\ G+C\%) \qquad -2$$

ومن المعادلتين ١ و ٢ نشتق المعادل رقم ٣

$$Tm = TOR + 18 \qquad -٣$$

المختبر الثاني عشر

التقدير الكمي لتركيز الـ DNA

Quantitative concentration of DNA

يمكن تقدير تركيز الـ DNA بشكل تقريبي وحالة جزيئة الـ DNA عن طريق ترحيل العينة على هلام الاكاوز Agar's gel وهذه التقديرات تكون غير دقيقة لان الترحيل في الكثير من الحالات يتضمن العديد من الحزم أو الانتشار على شكل مسحة على الهلام ، فضلا عن احتياج العملية إلى الوقت الطويل ، ولذلك لغرض التقدير الكمي لتركيز الـ DNA في العينة يستخدم جهاز المطياف الضوئي باستخدام أشعة فوق البنفسجية UV Spetrophotometer ويجري قياس الامتصاص عند الطول الموجي ٢٦٠ نانوميتر (nm) والذي يمثل اعلى قيمة الامتصاص للـ DNA شكل (٦١) .

مع ذلك فان قيمة الامتصاص تختلف من جزيئة DNA إلى الاخرى وذلك حسب تركيبها من القواعد النتروجينية ، أذ أن كل قاعجة نتروجينية تختلف في قابلية الامتصاص عن القواعد الاخرى ، وبصورة عامة يكون أمتصاص الحلزون المزدوج للـ DNA وفق المعادلة التالية

1 OD_{260} unit = 50 ug/ml

وبصورة تطبيقية :

١) نقوم باضافة ١٥ مايكروليتر من عينة الـ DNA إلى ٧٣٥ مايكروليتر من محلول المنظم TE **ملاحظة مهمة** (لا يستخدم ماء مقطر في هذه الحالة لتجنب مسخ الـ DNA وتحولة إلى خيوط مفردة)

٢) يخلط المحلول جيدا وتتم قراءة للكثافة الضوئية Optical density (OD) عن الطول الموجي ٢٦٠ و ٢٨٠ نانوميتر (nm) ... تستخدم النسبة بينهما لتحديد النقاوة ، ويجرى حساب تركيز الـ DNA في العينة وفق المعادلة التالية :

OD_{260} of sample x dilution factor x 50 ug/ml(1OD) =ug/ml DNA

حيث أن :

OD_{260} تمثل الكثافة الضوئية لامتصاص الحامض النووي DNA عند طول الموجة (٢٦٠ نانميتر)

Dilution factor يمثل عامل التخفيف

٥٠ يمثل رقم ثابت (تمثل كمية الـ DNA ٥٠ مايكروغرام / مل والتي تمتص وحدة واحدة من OD)

مثال :

توفرت لدينا عينة من الـ DNA مستخلصة ٥ مايكروليتر في ١ مل ، وأعطت قراءة في جهاز المطياف الضوئي عند OD_{260} = 0.14 ، وكان معامل التخفيف ٥/ ١٠٠٠ = ٢٠٠ ، احسب تركيز الـ DNA

الحل :

المعادلة هي

OD_{260} of sample x dilution factor x 50 ug/ml(1OD) =ug/ml DNA

فبذلك نطبق المعلومات أعلاه فيكون الناتج

0.14 X200X 50 =1400 ug/ml =1.4 mg/ml

ثم بعد ذلك أي بعد تقداير الكمي نقوم بتعديل لعينة الـ DNA إلى ٠.٣ مايكروغرام / مايكروليتر أو إلى التركيز المرغوب من قبل الشخص العامل أو(الباحث) باستخدام المحلول المنظم TE ثم يخزن عند درجة ٤ درجة مئوية لفترة قصيرة أو يجمد لفترة طويلة .

تختلف قراءة جهاز المطياف الضوئي للكثافة الضوئية حسب طبيعة الـ DNA الموجودة في العينة حيث وجدت القراءات الآتية لجزيئات الأحماض النووية كما في الجدول (٥)

جدول (٥) قراءة الأحماض النووية

الحامض النووي Nucleic acid	التركيز مقابل كل وحدة كثافة ضوئية Concentration (ug/ml)per A260 unit
ds DNA حلزون مزدوج	٥٠
ss DNA خيوط مفردة	٣٣
ss RNA حامض نووي RNA	٤٠

لقد أشار Clark و Christopher (٢٠٠٠) إلى أن البروتينات أيضا تمتص الأشعة الفوق البنفسجية ويمكن بموجب ذلك إجراء التقدير الكمي لتركيزها في العينة .. كما يمكن ملاحظة أن البروتينات تمتلك قمتين للامتصاص في الشكل السابق ().

الأولى :تكون عند طول الموجة ٢٣٠ نانوميتر وهي ناتجة عن امتصاص الأواصر الببتيدية

والثانية : تكون عند طول الموجة ٢٨٠ نانوميتر وهي ناتجة عن الامتصاص بواسطة الحلقات الاروماتية للأحماض الامينية (التربتوفان ، التايروسين ، وفينيل الانين) وتستخدم لامتصاص عند طول الموجي ٢٨٠ نانوميتر عادة في تحديد تركيز البروتينات .

وتختلف قابلية الامتصاص من بروتين إلى الاخر حسب نسبة الاحماض الاروماتية في البروتين وتكون قيمة الامتصاص للبروتينات كما يلي

$1\ OD_{260}\ unit = 1\ mg/ml\ protein$

يستخدم في جهاز المطياف الضوئي وعاء الكوارتز Quartz cuvettes (شرائح أو خلايا) لوضع العينة في الجهاز لان الكوارتز لا يمتص الأشعة فوق البنفسجية بينما يمتص الزجاج والبلاستيك هذه الأشعة ويتداخل في القراءات .

ويستخدم المحلول المنظم TE لتصفير الجهاز وتخفيف العينات وتكون قراءة الجهاز لعينة الـ DNA عند طول موجة ٢٦٠ نانوميتر هي ٠.١٥ .

كما يستخدم جهاز المطياف الضوئي لتحديد نقاوة محلول الـ DNA عن طريق مقارنة قيم الكثافة الضوئية للمحلول عند أطوال موجية مختلفة .

وعادة تجرى قراءة محاليل الـ DNA عند الأطوال الموجية ٢٣٠ و ٢٦٠ و ٢٨٠ نانوميتر

كما يجب تصفير الجهاز باستخدام محلول المنظم TE باعتباره محلول بلانك BLANK مع كل طول موجة ، وتستخدم النسبة لقراءة الامتصاص ٢٦٠/ ٢٨٠ لتحديد نقاوة الـ DNA .. وتكون نقاوة الـ DNA ١.٨ ، وعند ارتفاع النسبة تشير إلى وجود شوائب RNA في المحلول ..أما إذا كانت النسبة اقل من ١.٨ فذلك يعطي إشارة إلى وجود التلوث بالبروتين والفينول .

كما هنالك طريقة بديلة لكشف التلوث بالبروتينات والفينول باستخدام النسبة للامتصاص ٢٦٠/٢٣٠ وتكون النسبة أكبر من ٠.٥ دلالة على التلوث .

المختبر الثالث عشر

استحداث نباتات محورة وراثية GM Plants

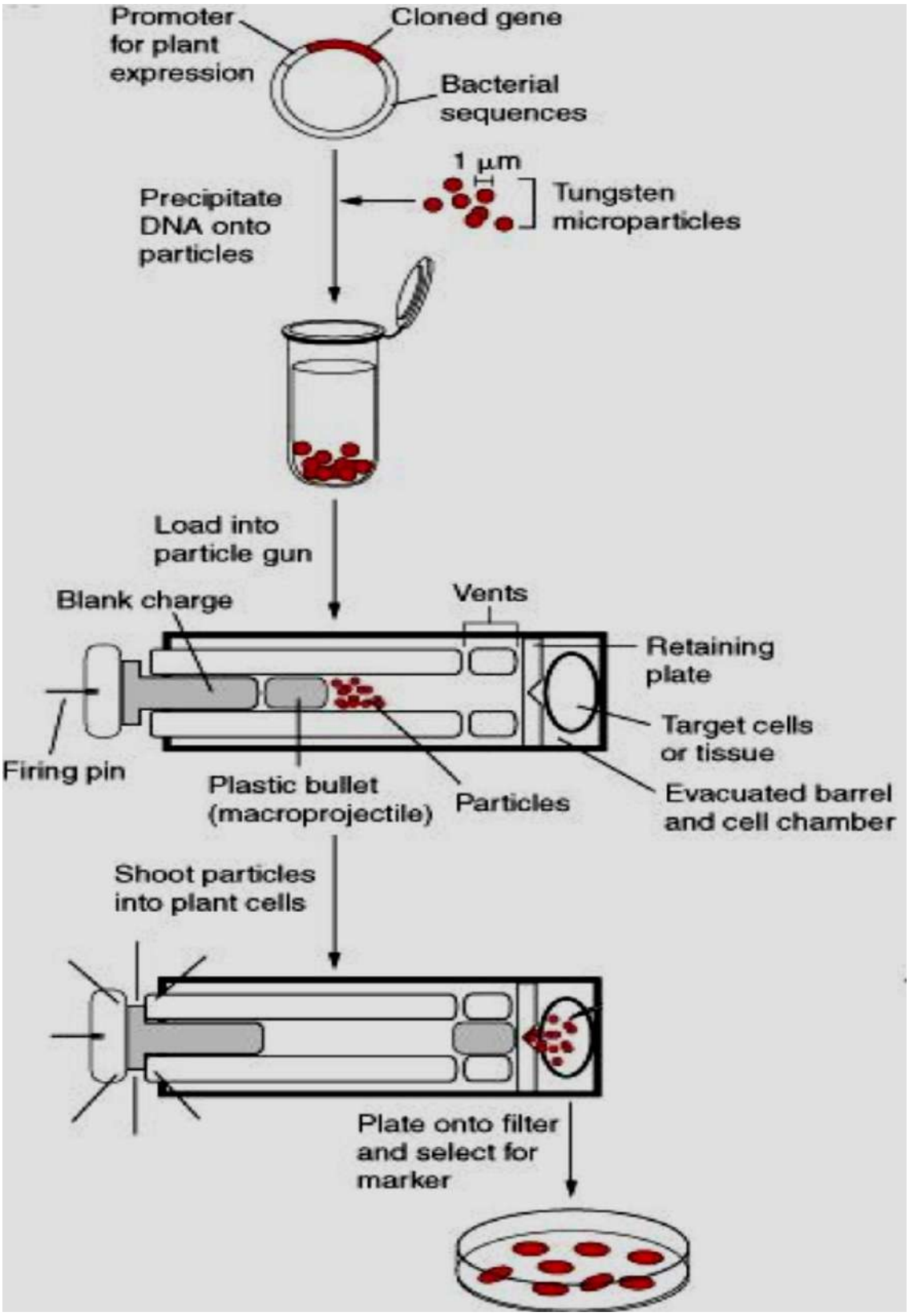
لقد تم شرح تقانة الاكروباكتيريم في مادة النظري ، حيث يمكن استخدام هذه التقانة في النباتات ذات الفلقتين ، لكنها لا يمكن استخدامها في نباتات ذات الفلقة الواحدة كما في الحنطة والشعير والبصل والثوم والاذرة والرز، فبذلك تستخدم في هذه المجموعة تقانات مختلفة تعتمد على تقانة النقل المباشر Direct transfer ومن هذه التقانات طريقة إطلاق الدقائق Bombardment وفي هذه التقانة يتم قذف الخلايا النباتية المراد تحويرها وراثيا بحبيبات من التنكستين Tungesten أو الذهب Gold قطرها حوالي ١ ميكروميتر ومغلفة بالحامض النووي DNA المطلوب نقله النبات كما في الخطوات التالية : –

١) توضع الحبيبات في الطرف الأمامي (المقدمة) لطلقة بلاستيكية Microprojectile داخل ماسورة جهاز الاطلاق التي تفرغ من الهواء حتى لا تقل سرعة القذيفة بفعل مقاومة الهواء

٢) يتم إطلاق القذيفة باستخدام مدفع إطلاق الدقائق Biolistic gun أو Particle gun بسرعة حوالي ٤٠٠ م/ ثانية (حوالي ١٤٠٠ كم/ ساعة) وتتوقف الطلقة البلاستيكية عند حاجز أمامي Retaining plate في مقدمة الماسورة بينما تندفع الدقائق المغلفة بـ DNA إلى داخل الخلايا كما في الشكل (٦٢)

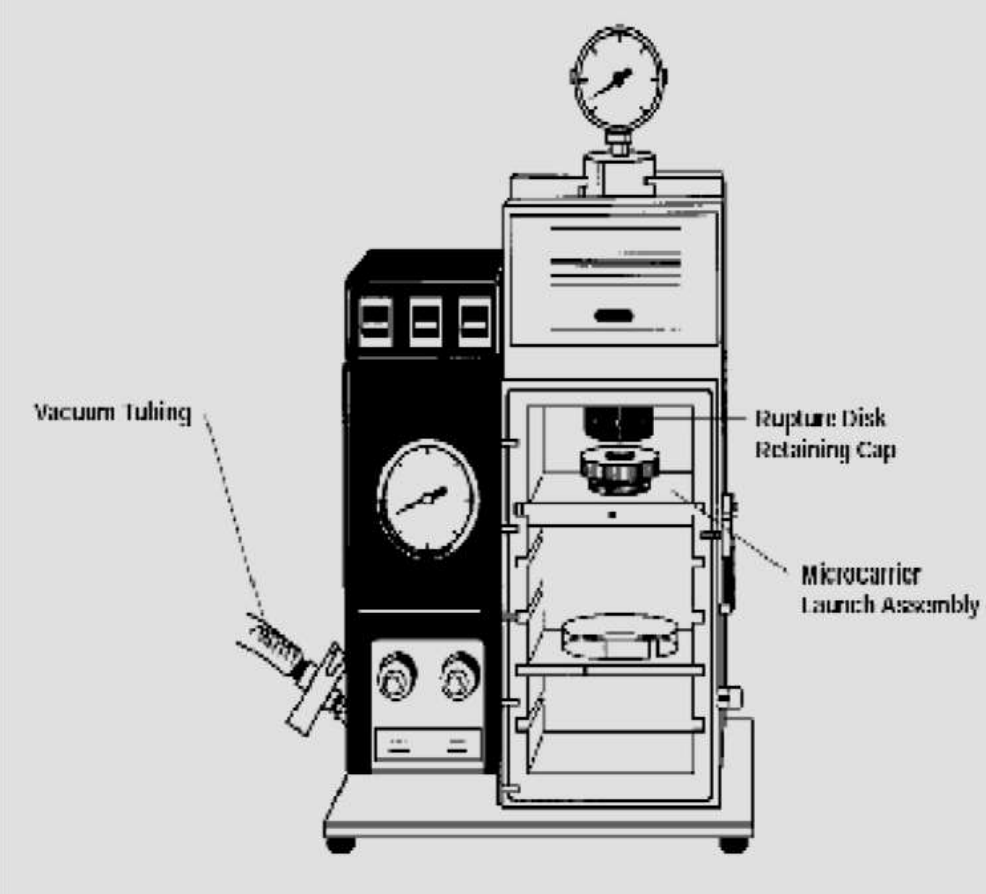
٣) يكون الهدف عبارة عن خلايا أو أنسجة نباتية مزروعة في أطباق أو أقراص أوراق نباتية أو غير ذلك ويوضع الهدف في منطقة مفرغة من الهواء قريبة من فوهة ماسورة جهاز الإطلاق

٤) بعد عملية Bombardment تنقل الخلايا إلى بيئات زراعية انتخابية ويتم استيلاد (توالد) Regeneration النبات الكامل .



شكل (٦٢) جهاز إطلاق الدقائق Bomberdment

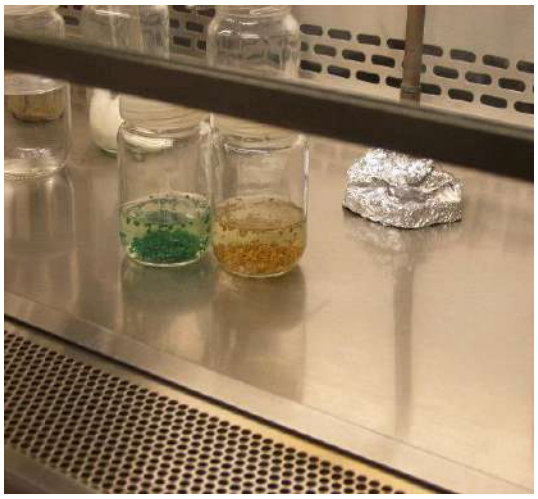
وهنالك نوع أخر من أنظمة تقانة إطلاق القذائف Particle delivery، آذ تكون فيه الدقائق المعدنية المغلفة بالحامض الـ DNA تسمى (Microprojedtiles) ملتصقة على سطح قرص حامل الدقائق Macrocarrier ويتسخدم فيه غاز الهليوم المضغوط والموجود خلف قرص التمزق Rupture disk لدفع قرص الحامل للدقائق Macrocarrier بما عليه من دقائق معدنية مغلفة بالحامض DNA فيتحرك هذا القرص بسرعة ويصطدم بشبكة من السلك ،تسمى شبكة التوقف Stopping screen فيتوقف القرص بينما تندفع الدقائق المعدنية المغلفة بالحامض النووي DNA لتصيب الهدف من الخلايا أو الأنسجة النباتية ، وتتطلب هذه الطريقة أن تكون غرفة (الحجرة) التي توضع فيها الخلايا أو الأنسجة مفرغة من الهواء وذلك لكي لا تقل سرعة القذيفة بفعل مقاومة الهواء كما في الشكل (٦٣)



شكل (٦٣) جهاز قذف الدقائق يعمل بغاز الهليوم

BIO-RAD

شكل (٦٤) جهاز قذف الجين العامل بغاز الهليوم المستخدم في مختبرات التقانة الحيوية



يتبع

يتبع

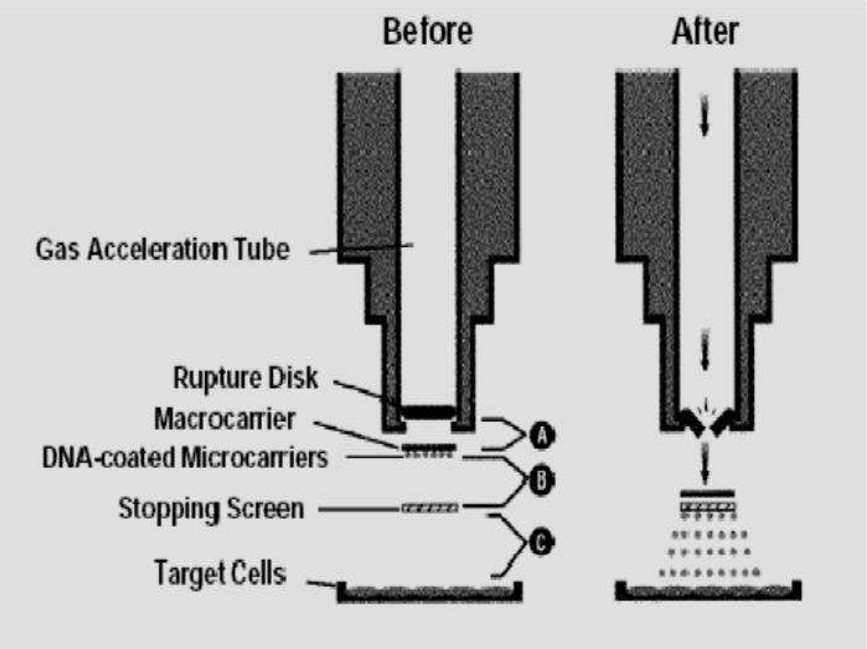
شكل (٦٥) خطوات استخدام جهاز قذف الجينات العامل بغاز الهليوم

الشكل (٦٦) أدناه يبين بعض المواصفات لجهاز ، حيث يلاحظ هنالك عدة أجزاء منه وهي

A= المسافة بين قرص التمزق Rupture disk إلى القرص حامل الدقائق Macrocarrier

B= المسافة التي يندفع فيها القرص الحامل للدقائق بما عليه من دقائق معدنية مغلفة بالحامض DNA وحتى يصطدم بشبكة التوقف Stopping screen

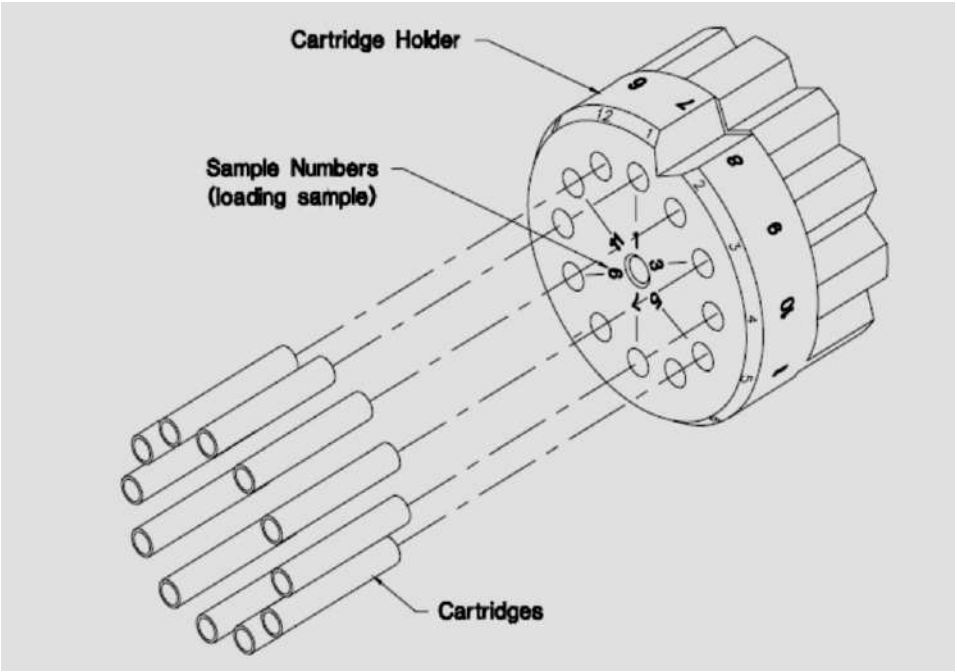
C= المسافة من شبكة التوقف Stopping screen وحتى الخلايا النباتية التي هي الهدف



شكل (٦٤) وصف جهاز أطلاق الدقائق

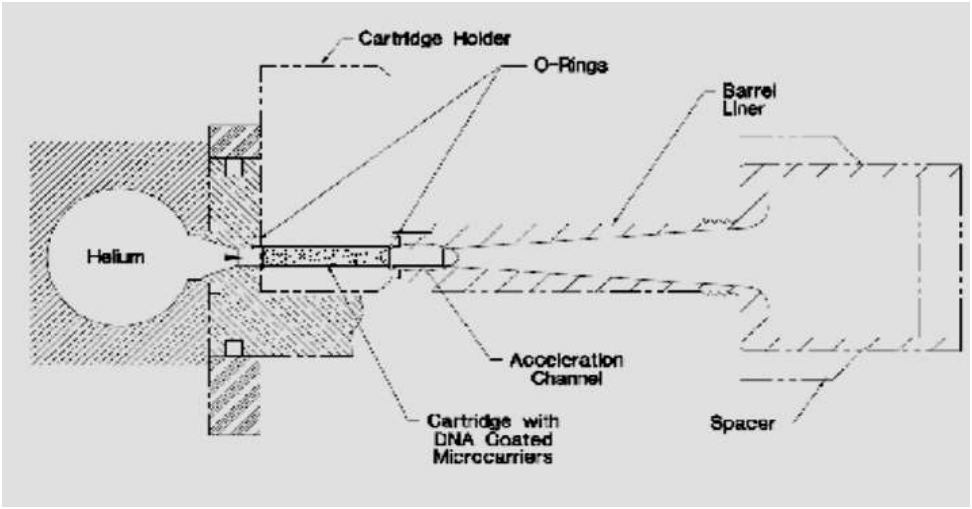
كما هنالك نوع أخر من أجهزة تقانة أطلاق الدقائق وهي كنظام عمل المسدس ، تسمى مسدس الجينات ، هذه لا تحتاج إلى تفريغ الهواء ويمن استعمالها على الخلايا والأنسجة المختلفة In vitro أو مع كائن حي كامل In vivo كفئران التجارب وغيرها . وفي هذه الطريقة يتم قذف الخلايا المراد تحويرها وراثيا بحبيبات من الذهب مغلفة بالحامض DNA وذلك باستخدام غاز الهليوم المضغوط وفي هذه التقانة يتم لصق حبيبات الذهب المغلفة بالحامض النووي DNA على السطح الخارجي لأنابيب بلاستيكية خاصة ثم قطعها على هيئة Cartridges طولها نصف بوصة (أنج) وتعبئتها في المسدس كما في الشكل التالي (٦٧)

شكل (٦٧) مسدس الجينات Gene gun



شكل (٦٨) مخطط لمسدس الجينات

شكل (٦٩) طريقة استخدام مسدس الجينات على النبات

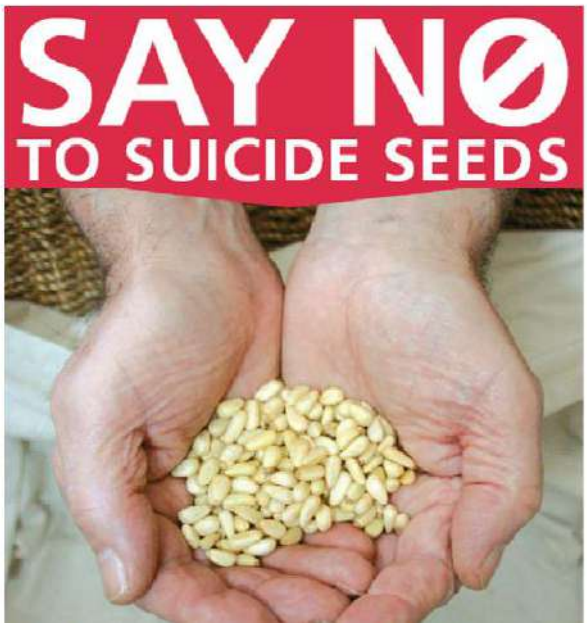


شكل (٧٠) رسم تخطيطي لمسدس الجينات

البذور الانتحارية Suicide seeds

تهدف الأبحاث والدراسات في شركات التقانة الحيوية والتي تنتج نباتات محورة وراثيا GM PLANTS إلى حماية المنتج باستخدام تقانة تعرف باسم تقانة الإنهاء(Terminator technology) ، وتعتمد هذه التقانة على إحدى الطريقتين :-

الأولى : حماية صنف النباتي Variety productive ،إذ تكون البذور الناتجة على النبات المحور وراثيا GM Plants بذور عقيمة فبذلك تسمى هذه التقانة بتقانة البذور الانتحارية Suicide seeds حيث لا يمكن للمزارع إن يجمع البذور من هذه النباتات لأجل زراعتها في المستقبل ولا بد من شراء بذور جديدة من شركات التقانة الحيوية التي تنتج النبات المحور وراثيا عند كل موسم زراعة .



شكل (٧١) تعبر عن رفض للبذور الانتحارية

تواجه تقانة البذور الانتحارية معارضة شديدة من منظمات إنسانية عديدة لان هذه التقانة سوف تجعل ملايين المزارعين الفقراء في الدول الفقيرة والنامية مضطرين إلى الاعتماد على شركات التقانات الحيوية في الدول المتقدمة والمنتجة لنباتات المحورة وراثيا بغية شراء البذور سنويا .

الثانية : حماية الصفة Trait productive: الجينات التي تم نقلها إلى النبات لا تعمل (أي لا تظهر الصفة المحسنة على النبات) إلا بعد معاملة النبات بمادة كيميائية تسمى المنشط Activator وفي هذه الطريقة تكون البذور الناتجة على النبات ناضجة فسيولوجيا أي غير عقيمة وبالتالي يمكن للمزارع أن يجمع هذه البذور من المحصول الناتج لزراعتها في المستقبل ، لكن كما

سبق توضيحه لا يحصل المزارع على الصفة المحسنة في النبات إلا إذا قام بمعاملة النبات بالمادة المنشطة التي يتم شراؤها من الشركة المنتجة لنبات المحور وراثيا وذلك عن كل زراعة .
وفكرة الطريقة هذه تشبه إلى حد ما لفكرة كارتات الشحن المستخدمة في مجال الاتصالات ، فبذلك المادة المنشطة تلزم لشحن (تشغيل) الجينات أو لشحن (ظهور) الصفات المرغوبة على النبات المحور وراثيا.