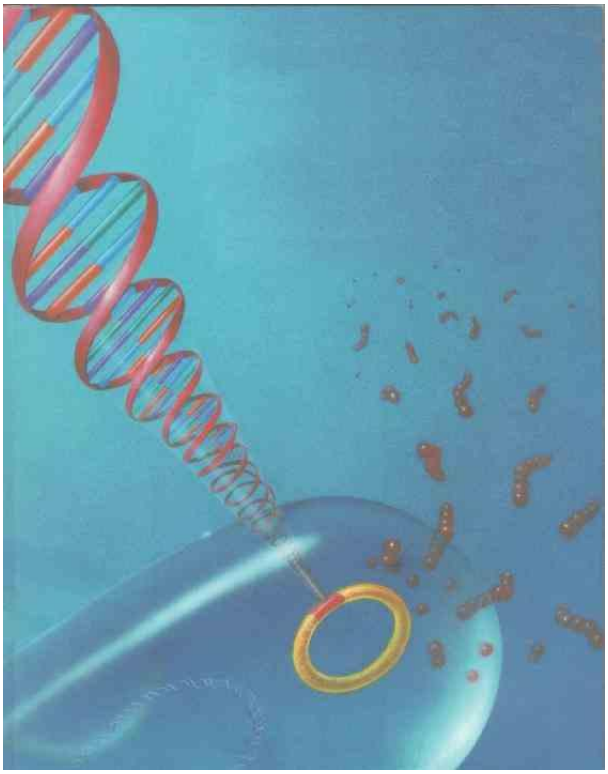
مختبر في الهندسة الوراثية

القسم العملي

Genetic Engineering Laboratory
Experimental Part



مختبر في الهندسة الوراثية

Genetic Engineering Laboratory

القسم العملي

Experimental part

Contents **المحتوى**

أسس الوقاية بالمختبر

Introduction – **المقدمة**

Working steps in the Laboratory – خطوات العمل في المختبر

Procedure – سياق التجارب

Part One: DNA Extraction **القسم الأول:** استخلاص الـDNA

رسم تخطيطي لمجرى استخلاص الـDNA

Step A خطوة أ : ترسيب الخلايا

Step B خطوة ب: تفجير بسيط للخلايا وتفكيك جزيئات RNA

Step C خطوة ج : تنظيف المحلول المعلق من الخلايا المفككة

Step D خطوة د : ربط الـDNA لعمود الفصل

Step E خطوة هـ: غسل الـDNA البلازميدي

Step F خطوة و : فصل الـ DNA البلازميدي من عمود الفصل

Part Two: Gel electrophoresis **القسم الثاني:** جل الكتروفوريزة(الهجرة الكهربائية للدقائق المعلقة بالجل)

Step A خطوة أ : قطع البلازميد

Step B خطوة ب: تحضير العينات من أجل فحصها بالجل

Step C خطوة ج : شحن العينات فوق الجل

Part Three **القسم الثالث** : تحويل البكتيريا المؤهلة

رسم تخطيطي لمجرى تحويل البكتيريا المؤهلة

Step A خطوة أ : إضافة الـDNA البلازميدي للخلايا المؤهلة

Step B خطوة ب: إدخال الـ DNA للخلايا

Step C خطوة ج: زرع البكتيريا فوق وسط انتقاء

إعداد النتائج

Transformation and Selection تحويل النتائج

Gel electrophoresis جل الكتروفوريزة(الهجرة الكهربائية للدقائق المعلقة بالجل)

أسس الوقاية في المختبر Safety in the Laboratory

اقرأ بتمعن شديد وتصرف حسب هذه الإرشادات :

1. قبل القدوم إلى المختبر ،اقرأ جيداً المقدمة للمختبر وكذلك تعليمات التنفيذ ، إستفسر من المعلم الأمور الغامضة قبل المختبر. في المختبر، قبل تنفيذ أي بند ، اقرأ التعليمات جيداً وتأكد من أنك تعرف ما ينبغي عمله بالضبط. وفي حالة وجود أسئلة لا تتردد في التوجه إلى طاقم المرشدين.
2. لا تقوم بعمل أي شيء لم يطلب منك عمله بشكل واضح في التعليمات أو عن طريق المعلم، مرشد أو فني المختبر. نشكرك على التعاون، ولكن أولاً يجب استشارة أعضاء الهيئة التدريسية الموجودون تحت تصرفك في كل سؤال ومشكلة وكل موضوع.لا مكان للعب والاستهتار في المختبر، انك تعمل مع أجهزة غالية جداً ومواد خطرة .

   إن عدم الإنصياع للتعليمات و/أو تصرف غير ملائم من الممكن ان يؤدي إلى كارثة!!
3. لا تستخدم الفم ولا بأي حال من الأحوال لضخ السوائل بالماصة، استخدم فقط ماصة اتوماتيكية أو مضخة خضراء. انتبه، خلال إدخال الماصة إلى المضخة الخضراء، أمسك الماصة من الجزء العلوي، لا تستخدم قوة زائدة في إدخال الماصة لئلا تتكسر وتجرحك.
4. لا يجوز الشرب/ الأكل / التدخين في المختبر!
5. معالجة الأدوات المستخدمة والنفايات:

- كل النفايات التي تتلامس مع مادة بكتيرية– ادخلها إلى كيس مكتوب عليه" نفايات بكتيرية للإبادة" .
- كل أداة تتلامس مع مادة بكتيرية أدخلها إلى الوعاء الموضوع بجانب المغسلة, هذه الأدوات سوف يتم غسلها وتعقيمها.
- كل النفايات التي لم تتلامس مع مادة بكتيرية– ادخلها إلى صندوق القمامة العلم الأوعية التي لم تتلامس مع مادة بكتيرية– اتركها فوق الصينية بصورة مرتبة.

6. احرص على غسل يديك بالماء والصابون بنهاية المختبر.
7. في حالة أي عطل بما في ذلك عدم انتظام الجهاز, استدع أي شخص من الأعضاء المرشدين فـــــوراً.

المقدمة : (Introduction)

اقرأ قبل قدوم ك للمختبر المقدمة في "من الجين إلى البروتين" وتأكد من أنك تعرف كل المصطلحات المهمة. في هذا المختبر سنتعلم ونتعرف على قسم من طرق العمل في الهندسة الوراثية – استخلاص DNA بلازميدي من البكتيريا وتحويل (Transformation) البكتيريا بمساعدة DNA بلازميدي.

استخ لاص DNA بلازميدي :الـ DNA البلازميدي يستخدم كحامل (Carier)، بحيث يتم إدخال مقطع الـ DNA الذي نود أستنساخه ألى داخله. من أجل ذلك يجب استخلاص الـ DNA البلازميدي. في هذه التجربة سيتم استخلاص DNA بلازميدي من البكتيريا E.coli من نوع $DH_5\alpha$ وبعد ذلك سنقوم بتنفيذ عملية التحويل.

تحويل (Transformation) البكتيريا بمساعدة DNA بلازميدي : عملية التحويل هي عملية إدخال DNA غريب لخلية مضيفة وتغيير الخلية نفسها على أثر إدخال وبروز فعالية الـ DNA الغريب.

البلازميد الذي نقل إلى داخل الخلية المضيفة يمكنه أن ينقسم بشكل ذاتي دون أن يكون متعلقاً بالخلية حيث في كل خلية يتم الحصول على كمية كبيرة من البلازميد.

خطوات العمل في المختبر : Working Steps in the Laboratory (procedure)

قسم I : استخلاص DNA بلازميدي :

في هذا القسم من المختبر سوف نقوم باستخلاص DNA بلازميدي من زراعة بكتيريا E.coli من نوع $DH_5\alpha$ التي تحمل البلازميد pUC 19. هذا البلازميد يحمل جينين، الأول يمنح القدرة لمقاومة مضادا حيويا والثاني مسؤول عن الانزيم B-galactosidase، هذا الانزيم يفكك اللكتوز الى جلوكوز وجلكتوز.

قسم II: تحليل DNA بواسطة جل الكتروفوريزة (الهجرة الكهربائية للدقائق المعلقة بالجل):

في هذا القسم سوف نقوم بتحليل DNA الذي تم استخ لاصه، وذلك بواسطة تركيضه فوق الجل، ثم سنقارن بين الـ DNA الذي تم استخلاصه في المختبر وبين DNA مشابهه يتم الحصول عليه تجارياً.

قسم III: تحويل البكتيريا المؤهلة (Competent) :

الـDNA الذي يتم استخلاصه في القسم الأول سوف يستخدم لتحويل لبكتيريا E.coli المؤهلة، وبالمقابل سنقوم بعملية فحص سلبي (Negative Control) وفحص إيجابي (positive Control). الفحص الإيجابي سوف يكون تحويل بواسطة DNA بلازميدي تجاري. الفحص سلبي سوف يكون تحويل البكتيريا بدون DNA بلازميدي.

سياق التجارب (Procedure)

القسم الأول : استخلاص الـ DNA Part One DNA Extraction:

محلول بكتيريا معلق

سكب السائل العلوي ← ف راز (Centrifugation) بالقوة الطاردة من المركز لمدة خمس دقائق بسرعة 14000 دورة /دقيقة

راسب

إضافة محاليل ا ، 2 ، 3، 4

فصل بالقوة الطاردة من المركز لمدة 10 دقائق بسرعة 14000 دورة /دقيقة ← ارمي الراسب

سائل علوي

تمرير من خلال عمود فصل (Colona)

غسل مرتين بواسطة سائل الغسل

تحرير الـ DNA من عمود الفصل

فصل بالقوة الطاردة من المركز لمدة دقيقتين بسرعة 14000 دورة /دقيقة

سائل يحتوي على DNA بلازميدي

الجزء 1: استخلاص DNA- سياق العمل

في أنبوب الاختبار (قارورة) الموجود داخل سلة الثلج و المعلم بالحرف **R** يوجد مستنبت بكتيريا E.coli من نوع DH5α التي تحمل البلازميد pUC19. هذا البلازميد يحتوي على جين والذي يمنح صفة المقاومة ضد المضاد الحيوي امبسلين وكذلك جين يحمل شيفرة الأنزيم بيتا- جلاكتوزيداز . نمت البكتيريا طوال الليلة في وسط نمو سائل **LB** الذي يحتوى على امبسلين. من هذ ا المستنبت سوف نفصل الـ **DNA** البلازميدي.

خطوة أ : ترسيب الخلايا **StepA**

تابع التعليمات خطوة بعد خطوة **وضع علامة** بجانب كل بند قمت بتنفيذه . اختصار الطرق قد يؤدي إلى عدم نجاح التجربة.

في هذه المرحلة نقوم بترسيب البكتيريا وكذلك الفصل بينها وبين الوسط التي نمت به

1. **ترقيم أنابيب الاختبار (قارورة)**
   - بواسطة قلم ترقيم، قم بترقيم أنبوبي اختبار افيندورف **كبيرين** بالأرقام 1، 2.
     انتبه للون أنابيب اختبار مجموعتك حيث أن أنابيب الاختبار هذه سوف تدخل إلى داخل آلة الطرد عن المركز مع أنابيب اختبار المجموعات الأخرى.
2. **ضبط الماصة الأتوماتيكية (تحديد الحجم)**
   - قم بضبط الماصة ذات حجم 1000 ميكروليتر إلى 900 ميكروليتر (استعن بالمرشد عند الحاجة) وضع غطاء بلاستيكي (تيب Tip) أزرقا.
3. **توزيع مستنبت (Culture) البكتيريا الى أنابيب الاختبار**
   - بمساعدة الماصة التي ضبطها في الخطوة السابقة، انقل مرتين لكل واحد من أنابيب الاختبار التي علمتها، 900 ميكروليتر من مستنبت البكتيريا من اجل الحصول على حجم نهائي يساوي 1800 ميكروليتر (1.8 ملليتر).

أنتبه : أنبوب الاختبار سوف يمتلئ تماماً تقريباً ، لذلك حتى لا تنسكب المادة امتنع عن إدخال الغطاء البلاستيكي (تيب) عميقاً لداخل السائل الموجود في أنبوب اختبار افيندروف.

   - ارمي الغطاء البلاستيكي (تيب) إلى كيس النفايات البكتيرية " اغلق الأنابيب جيداً .
4. **ترسيب البكتيريا (استعن بالمرشد)**
   - ادخل الأنابيب إلى آلة الطرد عن المركز ورتبها بطريقة بحيث أن المحور الظاهر للغطاء يتجه إلى الخارج. إحرص على توازن الأنابيب داخل آلة الطرد عن المركز (تقسيم متماثل لأنابيب الاختبار في خلايا آلة الطرد عن المركز).
   - فراز (Centrifugation) بآلة الطاردة عن المركز لمدة خمس دقائق في درجة حرارة الغرفة بسرعة 14000 دورة/دقيقة.

5. **<u>عزل الراسب عن السائل العلوي (احذر من أن تضر أو تصيب الراسب !):</u>**

- اسكب بحذر السائل العلوي إلى داخل وعاء النفايات البكتيرية وذلك عن طريق مسك الأنبوب مقلوبا، بحيث أن فتحته تتجه الى الأسفل، وتحريكها ببطء فوق وعاء النفايات البكتيرية.
- بعد ذلك ضع الأنبوبة وهي مقلوبة على قطعة ورق ماص لكي تتخلص مما بقي من السائل بداخل الانبوب

إنتبه : اذا كان الراسب البكتيري غير كبير، اعد عمل المراحل 3 و 4 وذلك من أجل زيادة عدد البكتيريا. إستعن بالمرشد لفعل ذلك.

- نفذ الخطوات السابقة كما ذكرنا أعلاه بالنسبة لأنبوب الاختبار الثاني .

<u>خطوة ب : تفجير دقيق للخلايا وتفكيك جزيئات RNA</u> **Step B**

تشمل هذه الخطوة على إضافة 4 محاليل مختلفة :

<u>محلول رقم 1</u> (Cell Resuspension Solution) : يحتوي على محلول منظم **Tris-HCL** و **EDTA** وظيفته توفير وسط ملائم لتفكك دقيق للخلايا. اضافة لذلك، فإن المحلول يحتوي على انزيم **RNase** الذي يفكك جزيئات الـ**RNA**.

<u>محلول رقم 2</u> (Cell Lysis Solution) : يحتوي على **SDS** و **NaOH** ويؤدي إلى تفكك اغشية الخلية.

<u>محلول رقم 3</u> (Alkaline Protease Solution): يحتوي على انزيم يقوم بتفكيك البروتينات والانزيمات الموجودة في الخلية والتي من الممكن أن تؤثر على نجاعة عملية إستخراج البلاسميد، ولذلك فانه يوقف عملها.

<u>محلول رقم 4 (Neutralization Solution)</u>: يحتوي على Guanidine HCl و اسيتات البوتاسيوم Potassium acetate وظيفتهم هو المساعدة بفصل الـDNA البلازميدي عن بقية مكونات المحلول.

أزرقا.

7. **<u>إضافة محلول رقم 1 وتعليق الراسب.</u>**

- أضف 200 ميكروليتر من "محلول رقم 1".
- علق الراسب بواسطة رفع وانزال السائل بواسطة الماصة (استعن بالمرشد) . حاول إبقاء التيب داخل السائل عند قيامك بعملية التعليق، وذلك لكي تمنع تكون رغوة، ارفع وانزل السائل عدة مرات إلى أن لا ترى تكتلات بكتيرية في السائل.

- بدل الغطاء البلاستيكي (التيب) وقم بتنفيذ نفس الخطوات المذكورة أعلاه لأنبوب الثاني.

8. <u>إضافة محلول رقم 2</u>

- ضع الغطاء البلاستيكي (التيب) الأزرق واضف 200 ميكروليتر من محلول رقم 2 (Cell Lysis Solution) لكل واحد من أنابيب الاختبار.
- أخلط أنابيب الاختبار بلطف بواسطة قلبها 4–6 مرات.
- ضع الأنابيب في المكان المخصص على حامل الأنابيب لمدة دقيقتين.

9. <u>إضافة محلول رقم 3</u>

- أضبط الماصة ذات حجم 1000 إلى 300 ميكروليتر وضع غطاء بلاستيكي ا(التيب) أزرقا.
- أضف 300 ميكروليتر من "محلول رقم 3" (Neutralization Solution) لكل واحد من الأنابيب.
- إخلط الانابيب بلطف بواسطة قلبها 4-6 مرات.

بعد تنفيذ هذه الخطوة فإن المحلول يحتوي على خلايا مفككة – يمكن ان تلاحظ عملية انتاج نسيج جل. الـ DNA البلازميدي معلق في المحلول.

<u>خطوة ج : تنظيف المحلول المعلق من الخلايا المفككة</u> Step C

في هذه الخطوة سوف نقوم ب إبعاد جزيئات كبيرة (**بما في ذلك DNA كروموزومالي**) من محلول الخلايا المعلق.

11. <u>ترسيب جزئيات كبيرة موجودة في</u> محلول الخلايا المعلق.

- قم بعملية فراز (Centrifugation) لأنابيب الإختبار في آلة الطاردة عن المركز لمدة 3 دقائق في درجة حرارة الغرفة بسرعة 13000 دورة/دقيقة.

بعد تنفيذ هذه الخطوة فإن الـDNA البلازميدي سيكون مذاباً في السائل العلوي.

<u>خطوة د: ربط الـDNA البلازميدي لغشاء عمود الفصل (Colona)</u> Step D

في هذه الخطوة سنمرر المحلول خلال عمود الفصل. الـDNA البلازميدي سوف بالغشاء الموجود في عمود الفصل. أما باقي مركبات المحلول فسوف تكون حرة داخل المحلول. محلول الغسل سوف يستخدم من أجل إبعاد المواد التي لم ترتبط مع عمود الفصل، ولذلك فإن باقي مركبات المحلول (DNA كروموزومالي، بروتينات---------إلخ) سوف تكون حرة داخل المحلول.

إنتبه: على الطاولة امامك يوجد نوعان من أنابيب الإبندروف، بدون غطاء وأخرى مع غطاء. الأنابيب بدون غطاء شفافة، وذات لون متشابه لجميع المجموعات. عندما يطلب منك إستعمال انابيب بدون غطاء يجب عليك، بالإضافة لتعليم الانابيب بالأرقام 1 و2، كتابة إسم مجموعتك على الانابيب وذلك حتى تميز الأنابيب الخاصة بك عن انابيب باقي المجموعة.

12. ترقيم الانابيب.

- رقم أنوبي اختبار (افيندورف) كبيرتين وشفافتين بدون غطاء بالارقام 1 ،2. أكتب اسم مجموعتك عليها.

13. أدخل عمودة فصل لكل واحد من الأنابيب.

14. ضبط الماصة الأتوماتيكية

- أضبط الماصة ذات حجم 1000 إلى 650 ميكروليتر وضع غطاء بلاستيكي ا(التيب) أزرقا.

15. تمريرالمحلول من خلال عمود الفصل

- إسحب بحذر السائل العلوي دون المس بالراسب. **لاتسكب السائل لأن الـ DNA البلاسميدي موجود بداخله!!.**
- أسكب السائل لداخل عمود الفصل الموجود داخل أنبوبة الإبندروف التي قمت بتعليمها. غير التيب وقم بنفس الخطوة للأنبوبة الأخرى.
- إرم أنابيب الإختبار مع الراسب إلى سلة النفايات البكتيرية.

16. ترسيب الجزيئات الكبيرة الموجودة داخل المحلول الخلوي

- قم بعملية فراز (Centrifugation) لأنابيب الإختبار في آلة الطاردة عن المركز لمدة 30 ثانية في درجة حرارة الغرفة بسرعة 8000 دورة/دقيقة.

تذكر ان الـDNA البلازميدي قد ارتبط باغشاء الموجود داخل عمود الفصل.

17. رمي السائل من الانابيب

- افصل بين الأنابيب واعمدة الفصل، واسكب السائل الموجود داخل الانابيب إلى وعاء النفايات البكتيرية.
- بعد ذلك ادخل اعمدة الفصل مرة اخرى الى الأنابيب وضع الانابيب في المكان المخصص على حامل الانابيب.

خطوة هـ: غسل الـDNA البلازميدي Step E

في هذه المرحلة سوف نقوم بغسل الـDNA من الأملاح المتبقية والعالقة. وذلك لان هذه الاملاح ممكن ان تؤثر على عمل الإنزيم الذي سوف نستعمله بالمراحل المقبلة من المختبر. محلول الغسل يحتوي على : إيثانول، محلول منظم Tris-HCl (Buffer) و- Potassium acetate.

18. ضبط الماصة الأتوماتيكية

- أضبط الماصة ذات حجم 1000 إلى 400 ميكروليتر وضع غطاء بلاستيكي ا(التيب) أزرقا.

19. <u>إضافة محلول الغسل</u>

- اضف 400 ميكروليتر من محلول الغسل (محلول رقم 4) الى مركز الغشاء الموجود داخل عمود الفصل.

20. <u>غسل الـDNA</u>

- قم بعملية فراز (Centrifugation) لأنابيب الإختبار في آلة الطاردة عن المركز ، بمساعدة المرشد، لمدة 30 ثانية بدرجة حرارة الغرفة بسرعة 8000 دورة/دقيقة.

21. <u>التخلص من سائل الغسل</u>

- اخرج اعمدة الفصل من الانابيب. ثم فرغ محتوى الانابيب الى داخل وعاء النفايات البكتيرية.
- ارجع اعمدة الفصل الى الانابيب.

22. <u>ضبط الماصة الأتوماتيكية</u>

- أضبط الماصة ذات حجم 1000 إلى 600 ميكروليتر وضع غطاء بلاستيكي ا(التيب) أزرقا.

23. <u>إضافة محلول الغسل</u>

- اضف 600 ميكروليتر من محلول الغسل (محلول رقم 5) الى مركز الغشاء الموجود داخل عمود الفصل.

24. <u>غسل الـDNA</u>

- قم بعملية فراز (Centrifugation) لأنابيب الإختبار في آلة الطاردة عن المركز ، بمساعدة المرشد، لمدة 30 ثانية بدرجة حرارة الغرفة بسرعة 8000 دورة/دقيقة.

25. <u>التخلص من سائل الغسل</u>

- اخرج اعمدة الفصل من الانابيب. ثم فرغ محتوى الانابيب الى داخل وعاء النفايات البكتيرية.
- ارجع اعمدة الفصل الى الانابيب.

<u>26.قم بعملية الفرز في آلة الطاردة عن المركز لمدة دقيقتين بسرعة 13000 دورة/دقيقة.</u>

<u>27. تفريغ محتوى الأنابيب.</u>

<u>خطوة و : فصل الـ DNA البلازميدي من عمود الفصل</u> **Step F**

في هذه الخطوة سوف نضيف ماء إلى اعمدة الفصل. إن الماء سوف يؤدي إلى تقلي ل التجاذب بين المادة الموجودة في غشاء عمود الفصل و الـ **DNA** البلازميدي وبالتالي سيتم تحرير الـ **DNA** البلازميدي.

26. **ترقيم أنابيب الاختبار** : قم بترقيم أنبوبي اختبار افيندورف صغيرين بالارقام 1، 2.

نقل أعمدة الفصل : .

27. **نقل اعمدة الفصل:** أنقل أعمدة الفصل إلى أنابيب الاختبار الجديدة والتي قمت بترقيمها وارم انابيب القديمة إلى وعاء النفايات البكتيرية.

28. **إضافة ماء:**

- أضبط الماصة ذات حجم 100 إلى 50 ميكروليتر وضع غطاء بلاستيكي(التيب) أبيض.
- أضف بحذر إلى **مركز** فتحة عمود الفصل 50 ميكروليتر ماء–ddw (محلول رقم 6).
- اذا بقي الماء على جدران عمود الفصل قم بإنزالها بواسطة طرقة بسيطة ل لانبوب فوق سطح الطاولة .
- قم بتنفيذ نفس الخطوات المذكورة اعلاه لأنبوب الاختبار الثاني .

29. **الفراز بالقوة الطاردة عن المركز (Centrifugation):**

- قم بعملية فراز (Centrifugation) في آلة الطاردة عن المركز، بمساعدة المرشد، لمدة دقيقتين بدرجة حرارة الغرفة بسرعة 13000 دورة/دقيقة.

إن المحلول الناتج يحتوى على DNA بلازميدي وسوف يتم استخدامه من أجل التحليل باستخدام جل الكتروفويزة (الهجرة الكهربائية للدقائق المعلقة بالجل) (جزء 2) وكذلك من أجل تحويل البكتيريا المؤهلة (جزء 3).

30. **فصل اعمدة الفصل:**

- افصل بحذر اعمدة الفصل عن أنابيب الاختبار وانقل ا نابيب الاختبار إلى حاملة أنابيب الاختبار. ارم اعمدة الفصل إلى سلة النفايات.

31. **توحيد الـDNA:**

- أضبط الماصة ذات حجم 100 إلى 50 ميكروليتر وضع غطاء بلاستيكي(التيب) أبيضا.
- انقل السائل مع الـ DNA الموجود في أنبوب اختبار رقم 1 إلى أنبوب اختبار رقم 2.
- ارمي أنبوب اختبار رقم 1.

32. **ترقيم أنابيب الاختبار**

- رقم أنبوبي اختبار افيندورف صغيرين بـ A و B. أنابيب

الاختبار هذه سوف نستخدمها في القسم الثاني من التجربة – جل الكتروفوريزة (الهجرة الكهربائية للدقائق المعلقة بالجل).

33. توزيع الـ DNA :

- اضبط ماصة ذات حجم 20 إلى15 ميكروليتر.
- انقل 15 ميكروليتر من أنبوب اختبار رقم 2 إلى A.
- انقل 15 ميكروليتر من أنبوب اختبار رقم 2 إلى B.
- اضبط الماصة 20 ل–6.5 ميكروليتر.
- اضف 6.5 ميكروليتر ماء لأنبوبةAِ.
- اضبط الماصة 20 ل–5.5 ميكروليتر.
- اضف 5.5 ميكروليتر ماء لأنبوبة B .
- ادخل أنابيب الاختبار A و B إلى سلة الثلج.

34. ترقيم أنبوب اختبار :

- رقم أنبوب اختبار افيندورف صغيرة بـ DNA I ، أنبوب الاختبار هذا سوف يتم استخدامه في الجزء الثالث من المختبر– تحويل (Transformation) .

35. توزيع الـ DNA :

- اضبط ماصة ذات حجم 20 إلى 15 ميكروليتر.
- انقل 15 ميكروليتر من أنبوب رقم 2 إلى أنبوب DNA I، ثم ادخل أنبوب إلى سلة الثلج.
- ادخل الأنبوب رقم 2 إلى سلة الثلج.

الجزء الثاني : جل الكتروفوزيرة (الهجرة الكهربائية للدقائق المعلقة بالجل)

Part Two: Gel electrophoresis

خطوة أ : قطع البلازميد **Step A**

في هذا القسم سوف نقوم بعملية تحليل الـ **DNA** الذي تم استخلاصه ، بواسطة تركيضه على الجل. كما اننا سنقوم بمقارنة بين الـ **DNA** الذي تم استخ لاصه الان وبين **DNA** مشابه هتم استخلاصه بطرق اخرى. إن الـ **DNA** البلازميدي يمكن أن يكون م نتظما باشكال فراغية مختلفة. إن انتظام البلازميد في الفراغ (شكله) يؤثر على سرعة حركته وفحصه بالجل – كلما كان البلازميد مضغوط اكثر كلما تحرك بسرعة اكبر والعكس صحيح. كما ان درجة نظافة البلازميد تؤثر على سرعة حركته بالجل. إن بلازميد ذو درجة نظافة منخفضة يحتوى ايضا على جزيئات مختلفة لم يتم ازالتها كما يجب خلال عملية الاستخلاص، بلازميد كهذا سوف يتحرك ببطء بالجل.

1. **إضافة انزيم المقطع (الحصر) EcoRI للأنبوب المعلم بـ A (DNA الذي إستخلصته)**

أضف بمساعدة المرشد إلى الأنبوب A المواد التالية (موجودة عند المرشد):

- 1 ميكروليتر من انزيم الحصر EcoRI.
- 2.5 ميكروليتر من المحلول المنظم (Buffer) . اخلط بخفة بمساعدة الماصة.

2. **أضافة انزيم مقطع للأنبوب المعلم ب B**

- 1ميكروليترمن انزيم الحصر **EcoRI**
- 1 ميكروليتر من **ScaI**
- 2.5 من المحلول المنظم (**buffer**).اخلط بخفة بمساعدة الماصة.

3. **انزال المحلول إل قعر أنبوب الاختبار :**

- ادخل الأنبوب إلى آلة الطرد عن المركز لمدة 5 ثواني بسرعة 14000 دورة / دقيقة.

4. **حضانة (Incubation) بـ 37 درجة مئوية:**

- ادخل أنبوب الاختبار إلى الحاملة التي تشبه القارب وضعه لمدة لا تقل عن 30 دقيقة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية (سجل لنفسك زمن بدء الحضانة).

أثناء فترة الانتظار قم بتنفيذ الجزء 3– تحويل (Transformation)

خطوة ب: تحضير العينات من أجل تركيضها بالجل : **Step B**

بالجل اللكتروفوريزة سوف نقوم بتوكيض عدة عينات :

أ. عينة 1– البلازميد **pUC19** الذي تم استخلاصه من البكتيريا على ايدينا (**A**) مع EcoRI.

ب. عينة 2– البلازميد **pUC19** الذي تم استخلاصه من البكتيريا على ايدينا ومن ثم قطع بواسطة

انزيم الحصر **EcoRI+ScaI (B)**.

ج. عينة 3- البلازميد **pUC19** بلازميد الذي تم شرائه واستخلص بطريقة اخرى مع EcoRI.

د. عينة 4- البلازميد **pUC19** الذي تم استخلاصه بطريقة اخرى وقطع بواسطة انزيم ال حصر **EcoRI+ScaI**.

هـ. عينة 5-مؤشر يستخدم لتحديد الوزن الجزيئي.المؤشر مركب من **DNA** لبكتيريوفاج لامبدا وبلازميد، قطعوا بواسطة انزيمات حصر مختلفة.**(Lambda-pUC Mix Maker)**

تحضير عينة رقمA (الـDNA الذي استخلصته)

- اضبط الماصة ذات حجم 20 إلى 3 ميكروليتر.
- انقل 3 ميكروليتر محلول لون جليتسيرول إلى الأنبوب A اخلط بلطف
- باستخدام جهاز الـ (Vortex) .
- انزل جميع المادة إلى قاع الأنبوب الاختبار بواسطة طربة خفيفة على الطاولة.

تحضير عينة رقم B(DNA استخرجته وقطعته)

- أضف إلى الأنبوب A(أنبوب الاختبار الذي تم حضانته بدرجة 37 درجة مئوية) 3 ميكروليتر من محلول لون جليتسيرول. اخلط بلطف باستخدام جهاز الـ (Vortex).
- انزل جميع المادة إلى قاع الأنبوب الاختبار بواسطة طربة خفيفة على الطاولة.

معالجة العينات رقم 3،4،5 :

احصل على هذه العينات جاهزة من المرشد. إذا كانت مجمدة، قم بصهرها عن طريق حكها بين كفوف يديك.

خطوة ج :شحن العينات فوق الجل : **StepC**

لا تلمس الجل بأيدي مكشوفة – الجل يحتوى على مادة تسبب السرطان !!!.

ضبط الماصة الأتوماتيكية

- اضبط ماصة أتوماتيكية ذات حجم 20 إلى 20 ميكروليتر وضع غطاء بلاستيكي (تيب) صغير.

فتح الجل :

بمساعدة المرشد افتح غلاف الجل الجاف وضعه في جهاز الجل.

الجهة اليمنى للكاسيت تدخل أولاً. يجب فتح غلاف الجل بفترة زمنية قريبة جداً من فترة الشحن وذلك لمنعه من الجفاف.

تنفيذ prerun

- قم بتنفيذ prerun (للكاسيت ذو مشط على وجهه) بواسطة الضغط المستمر على ال زر لمدة ثانيتين. صفير قصير وضوء اخضر متردد دليل على أن العملية سليمة.
- بعد مرور دقيقتين فإن الضوء يتحول إلى احمر متردد ويسمع صفير متقطع. يجب الضغط على الزر حتى ظهور ضوء احمر ثابت.

تحميل العينات :

اخرج المشط وقم بتحميل الخمس عينات التي تخصك. عينة رقم 5 قم بتحميلها في الحفرة التي في الطرف الاقصى للجل. لا تنسى ان تقوم بتغيير الغطاء الهلاستيكي (تيب) بين العينة والاخرى، سجل أي عينة قمت بتحميلها في كل حفرة.

بدء فحص وتشغيل الجل:

من اجل بداية الحركة، اضغط ضغطة قصيرة على الزر. ضوء اخضر ثابت دليل على عملية صحيحة. اترك الجل يتحرك ما بين 15 إلى 30 دقيقة. أمعن النظر بتحرك اللون، ولكن لا تلمس الجهاز.

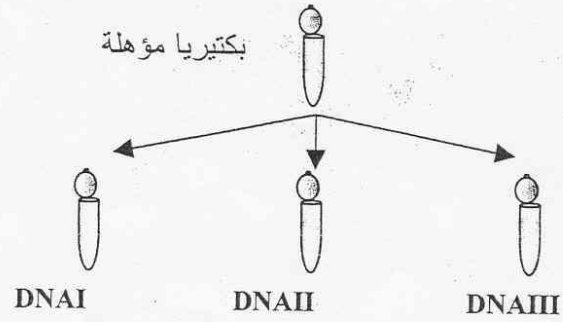
انتهاء التركيض:

في نهاية الحركة، الضوء الأخضر يتحول إلى احمر ويسمع صفير متقطع.

تصوير الجل :

سيخرج المرشد الجل من جهاز التركيض وينقله إلى طاولة الـUV. بعد الحصول على صورة جيدة ، يقوم المرشد بتصوير الجل.

الجزء الثالث : تحويل (Transformation) البكتيريا المؤهلة : Part Three



إدخال الـ DNA إلى الخلايا

حضانة الخلايا

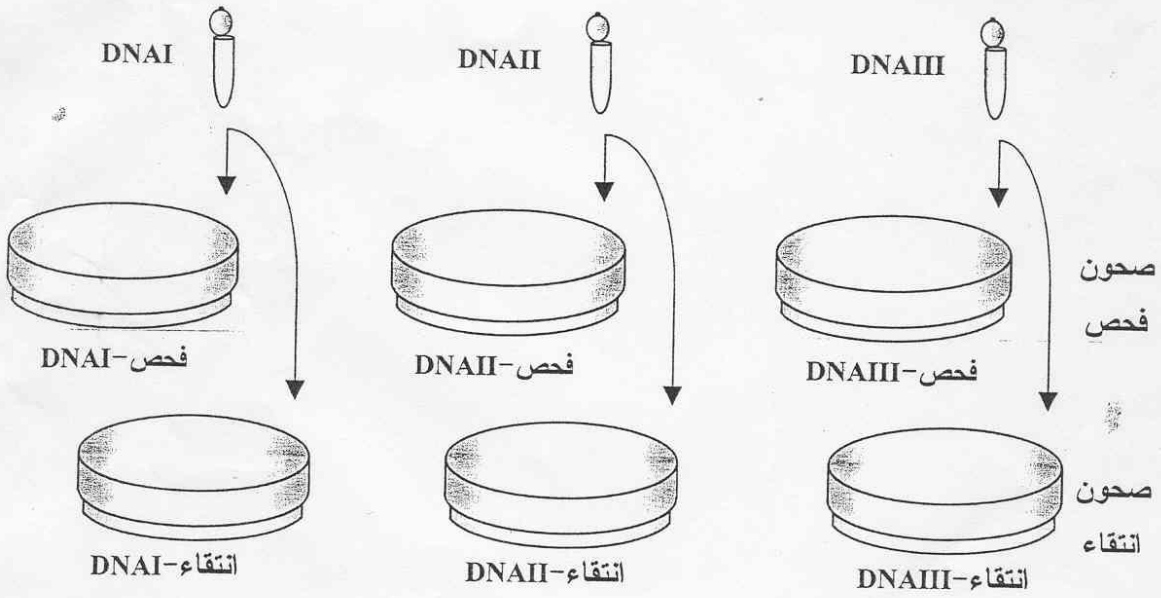
صدمة حرارية (تسخين)

برودة (تبريد)

إضافة وسط نمو

حضانة الخلايا

زراعة البكتيريا فوق وسط نمو صلب :



الجزء الثالث: تحويل (Transformation) البكتيريا المؤهلة: Part Three

هذا العمل يتم تنفيذه في ظروف معقمة. عليك العمل بجانب نار مكشوفة احذر جيداً! . ابعد المواد قابلة للإشتعال عن النار، بما في ذلك الاوراق. طلاب ذوي شعر طويل عليهم بجمع وربط شعورهم .
التحويل سيتم تنفيذه مع نوعين من الـ **DNA** بلازميدي:

أ. **DNA** بلازميدي والذي تم استخلاصه على أيديكم حسب الطريقة التي تم وصفها سابقاً وتم ترقيمه بـ **DNAI**.

ب. **DNA** بلازميدي مشابه تم استخلاصه بطريقة اخرى وتم ترقيمه بـ +. إضافة إلى ذلك نقوم بعملية تحويل بدون بلازميد (فحص سلبي) . أنبوب اختبار كهذا يتم ترقيمه ب **0.**

فكر ما الهدف من عملية التحويل بـ**DNA** التجاري ومحلول بدون **DNA** . بمساعدة المرشد ركز على الفوارق بين فحص سلبي وفحص ايجابي.

خطوة أ : إضافة الـ DNA البلازميدي للخلايا المؤهلة Step A

1. **تحضير الخلايا المؤهلة للقيام بعملية التحويل :**

في داخل سلة الثلج يوجد أنبوب اختبار وبه خلايا مؤهلة (علم بالحرف C). افحص بأن السائل داخل أنبوب الاختبار قد صهر. إذا لم يصهر، اخرج أنبوب الاختبار من سلة الثلج لمدة قصيرة جداً قدر الإمكان.

2. **تحضير أنابيب الاختبار :** تحت تصرفك أنبوبي اختبار يحتويان على DNA بلازميدي:

⟵ أنبوب الاختبار الأول الذي تم ترقيمه بـ DNAI والذي تم تحضيره في القسم الأول من التجربة.

⟵ أنبوب الاختبار الثاني الذي تم ترقيمه بـ + . أنبوب الاختبار هذا يحتوي على DNA بلازميدي مشابه للذي تم استخلاصه في القسم الأول من التجربة والذي تم شراءه من شركة تجارية.

إن الأنابيب موجودة داخل سلة الثلج. انقلها إلى حامل الأنابيب.

3. **تحضير أنبوب اختبار بدون DNA (0)**

- قم بترقيم أنبوب اختبار افيندورف إضافي بـ 0 وضعه في حامل الأنابيب . هذا الأنبوب سوف يمر بعملية مشابهة لأربوبين الاختبار DNAI و+ ولكن **بدون DNA.**

4. **إضافة محلول منظم ماء DDW:**

- اضبط الماصة الأتوماتيكية ذات حجم 20 إلى 15 ميكروليتر وضع غطاء بلاستيكي ا أبيضا.
- أضف إلى أنبوب الاختبار ال مءلم بـ 0، 15 ميكروليتر من محلول رقم 8 (محلول DDW-ماء مقطر) .
- اضبط الماصة الأتوماتيكية ذات حجم 20 إلى 10 ميكروليتر وضع غطاء بلاستيكي ا أبيضا.

- أضف إلى أنبوب الاختبار المعلم بـ + ,10 ميكروليتر من محلول رقم 8 (محلول ماء DDW) .
- اضبط الماصة الأتوماتيكية ذات حجم 20 إلى 5 ميكروليتر وضع غطاء بلاستيكي ا أبيضا.
- أضف إلى أنبوب الاختبار المعلم بـ DNAI، 5 ميكروليتر من محلول رق م 8 (محلول منظم TE).

ملاحظة :كمية المحلول المنظم غير متساوية في أنابيب الاختبار الثلاث ة والسبب في ذلك هو إن الحجم النهائي لكل محلول يجب أن يكون متساوي ا (20ميكروليتر) وكمية الـ DNA المضافة لكل أنبوب مختلفة .

السبب في الاختلاف في كميات الـ DNA التي نضيفها إلى الأنابيب + وDNAI هو تركيز الـDNA. إن الـDNA الذي تم شراءه اكثر تركيزا من الـ DNA الذي نستخلصه لذلك فإننا نخفف تركيزه باستخدام المحلول ماءDDW .

5. **إضافة الخلايا إلى الـDNA :**

- اضبط الماصة الأتوماتيكية ذات حجم 100 إلى 60 ميكروليتر وضع غطاء بلاستيكي أبيض.
- ضع بطريقة معقمة لكل واحد من الأنابيب الثلاثة (0 ,+DNAI ,) 60 ميكروليتر من الخلايا المؤهلة (Competent cells).
- إخلط الأنابيب الثلاثة بلطف عن طريق نقر ها بالإصبع. احذر من تكون فقاعات او انتشار الخليط على جدران الأنابيب.

خطوة ب:إدخال الـDNA للخلايا **Step B**

6. **حضانة الخلايا في الثلج**

- ضع الأنابيب في حاملة دائرية تشبه القارب، وضع الأنابيب في الثلج لمدة 20 دقيقة.

في فترة الحضانة استمر قدر الإمكان في تنفيذ القسم 2- تحضير عينات من اجل تركيضها على الجل.

7. **صدمة حرارية (Heat Shock):**

- قرب سلة الثلج التي تحتوي على أنابيب الاختبار إلى حمام مائي بدرجة 42C درجة مئوية، وادخل أنابيب الاختبار إلى الحمام لمدة 90 ثانية بالضبط.

8. **تبريد (Cold Shock) :**

- انقل **حالا** القارب الذي يحتوي على الأنابيب إلى الثلج وابقها لمدة 60 ثانية بالضبط.

9. **توجيه الماصة الأتوماتيكية**

- اضبط الماصة الأتوماتيكية ذات حجم 1000 إلى 400 ميكروليتر وضع غطاء بلاستيكي أزرقا.

10. <u>تعليق الخلايا في وسط النمو</u>

- أضف بصورة معقمة بجانب النار، 400 ميكروليتر من محلول رقم 9 (وسط نمو LB) لكل أنابيب الاختبار.
- اخلط بلطف بواسطة النقر بالإصبع على جدار أنبوب الاختبار. ارمي الغطاء البلاستيكي (التيب) إلى كيس النفايات البكتيرية.

4. <u>نشاط الجين الذي يمنح صفة المقاومة ضد المضاد الحيوي امبسلين:</u>

- ادخل أنابيب الاختبار إلى "قارب". ثبت القارب بداخل لاقط دورق في حمام بدرجة 37°C درجة مئوية.
- ابقها بالداخل هز بسيط لمدة 30–15 دقيقة.

ارجع إلى الجزء 2 لإتمام العمل.

<u>خطوة ج: زراعة البكتيريا فوق وسط إنتقاء :</u> **Step C**

تتم عملية الزراعة عن طريق نقل حجم معين من مستنبت البكتيريا التي مرت بعملية تحويل إلى وسط نمو صلب موجود في الصحون. هذا الوسط يحتوي على اجار بالإضافة إلى المضاد الحيوي امبسلين المستخدم لانتقاء الخلايا التي مرت بعملية تحويل. كذلك يحتوي الوسط على مادة حليلة substract (X-gal) .إن المادة الحليلة تتفكك بواسطة الأنزيم بيتا–جلاكتوزيداز وناتج التفكك الذي يتم الحصول عليه سيكون ازرق اللون.

أمامك ست صحون "بتري" والتي تحتوي على وسط نمو صلب بحيث أن ثلاث صحون من الستة مغلفة بورق فضي. هذه الصحون تحتوي في وسط النمو على المواد : امبسلين و X-gal. المادة الحليلة (X-gal) والذي ناتج تفككه ازرق، حساس للضوء ولذلك يجب المحافظة عليه **دائما** بمساعدة ورق فضي. الثلاثة صحون الاخرى، والتي تستخدم كصحون للفحص (Control)، **لا** تحتوي على امبسلين و X-gal.

5. <u>ترقيم و تعليم الصحون :</u>

- رقم الصحون المغلفة بورق فضي من الجهة السفلى للصحن كالتالي : DNAI – وسط إنتقاء، + – وسط إنتقاء، 0 وسط إنتقاء، أضف اسمك والتاريخ .
- رقم صحون الفحص (الغير مغلفة بورق فضي) من أسفل كالتالي : DNAI –وسط فحص، + وسط فحص، 0– وسط فحص ، أضف اسمك والتاريخ لكل واحد من الصحون.

13. <u>توجيه الماصة الأتوماتيكية</u>

- اضبط الماصة الأتوماتيكية ذات حجم 100 إلى 50 ميكروليتر وضع غطاء بلاستيكي ا أبيضا.

14. <u>الزراعة على الصحون: تتم الزراعة بصورة معقمة، بجانب النار، بخطوتين :</u>

أ. نقل البكتيريا إلى الصحون :

- انقل بصورة معقمة 50 مكيروليتر بكتيريا من الأنبوب المعلم بـ DNAI إلى داخل مركز الصحن " DNAI– وسط فحص".
- بمساعدة نفس الماصة الأتوماتيكية ، انقل 50 ميكروليتر إضافية للصحن " DNAI– وسط إنتقاء "

وارم الغطاء البلاستيكي (التيب).

ب. توزيع البكتيريا في الصحن :

- اخرج بجانب النار عصا ملتوية (عصا درجلسكي) وبواسطتها ادهن جيداً البكتيريا التي زرعتها في " DNAI– وسط فحص" . اغلق الصحن .
- ادهن بواسطة **نفس** العصا صحن " DNAI– وسط إنتقاء ".
- ضع العصا المستخدم في داخل الوعاء البلاستيكي الكبير.

كرر الخطوتين السابقتين للصحون الأخرى . لا تنس أن تغير الغطاء البلاستيكي(التيب) وعصا درجلسكي في فترة الانتقال بين عينات الـ DNA المختلفة.

- ألصق كل الصحون بواسطة شريط لاسق. **لا تلصق** الصحون من الجوانب.
- احضن الصحون في 37˚C درجة مئوية لمدة 24 ساعة وراقب ظهور مستعمرات البكتيري ا.

لا تنسى أن تغطي مرة أخرى الصحون التي كانت مغط اة بورق فضي.

إعداد النتائج

تحويل وإنتقاء Transformation and Selection

أ. **تقدير (تخمين) عدد الخلايا الحية في العينة التي تم زرعها :**

قم بتقدير عدد المستعمرات التي تظهر في صحن LB. افعل ذلك للصحن الذي تم به زراعة بكتيريا والتي حولت بمساعدة الـ DNA الذي تم استخلاصه ، وكذلك بالنسبة للصحن الذي تم به زراعة بكتيريا والتي حولت بمساعدة DNA بلازميدي وتم استخراجه تجاريا بطريقة أخرى.

ب. **تحديد نسبة الخلايا التي تحولت والتي تظهر القدرة على مقاومة امبسلين :**

قم بتقدير عدد المستعمرات التي تظهر في الصحون التي تحتوي على امبسلين و X-gal . قم بعد المستعمرات الزرقاء وكذلك المستعمرات البيضاء. افعل ذلك للصحن الذي تم به زراعة بكتيريا والتي حولت بواسطة DNA الذي استخلصته وكذلك للصحن الذي تم به زراعة بكتيريا والتي حولت بواسطة DNA بلازميدي والذي تم استخلاصه بطريقة أخرى تجاريا. النسبة بين عدد المستعمرات في البند ب إلى عدد المستعمرات في البند أ، مضروبة في مئة يعطي النسبة المئوية للخلايا التي حولت والتي تظهر القدرة على مقاومة الامبسلين.

ج. **تحديد نسبة الخلايا التي تحولت والتي تظهر نشاط الأنزيم بتيا- جلاكتوزيداز.**

قم بتقدير عدد المستعمرات التي تظهر على الصحون التي تحتوي على امبسلين و X-gal. افعل ذلك للصحن الذي تم به زراعة بكتيريا والتي حولت بواسطة DNA الذي استخلصته ، وكذلك للصحن الذي تم به زراعة بكتيريا والتي حولت بواسطة DNA بلازميدي تم شراءه. النسبة بين عدد المستعمرات في البند ج إلى عدد المستعمرات في البند أ، مضروبة في مئة يعطي النسبة المئوية للخلايا التي تحولت والتي تظهر نشاط الانزيم بتيا- جلاكتوزيداز .

قم ببناء جدول تلخيصي.

أسئلة : Questions

1) كيف تفسر الاختلاف في عدد مستعمرات البكتيريا في الصحون الثلاثة ؟

قارن بين سلسلة الصحون التي تم زراعتها بواسطة بكتيريا والتي تحولت بواسطة DNA استخلصته وبين بكتيريا تحولت بواسطة DNA تم شراءه.

2) أي عوامل قد تؤثر على فعالية عملية التحويل ؟

3) بشكل عام نفحص الـ DNA الذي تم استخلاصه بواسطة جل الكتروفوريزة (الهجرة الكهربائية للدقائق المعلقة بالجل) **قبل** القيام بعملية التحويل . فسر لماذا ؟

<u>جل الكتروفوريزة (الهجرة الكهربائية للدقائق المعلقة بالجل) Gel electrophoresis</u>

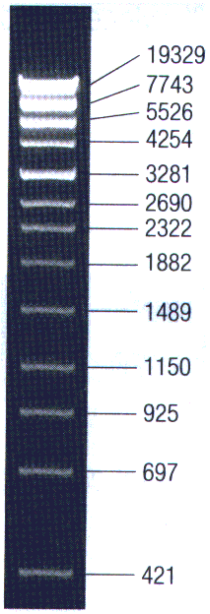
1) قارن بين عينة الـ DNA الذي استخلصته (DNA1) وبين الـ DNA الذي تم شراءه (DNA3) . هل يوجد فروق في اماكن كل منها على سطح الجل ؟ علل.

2) قارن بين عينة الـ DNA الذي استخلصته (DNA1) وبين عينة الـ DNA الذي استخلصته وقطعته بمساعدة إنزيم ال حصر HindIII (DNA2). لماذا تم الحصول على مجموعتين (two bands) في تركيبض DNA1؟

ماذا يدل تمركز الـDNA1 على الجل مقارنة مع تمركز DNA2 ؟

3) (اختياري) استعن بالمقدمة في وحدة التعليم " من الجين إلى البروتين " وصمم رسم بياني يمثل الصلة بين مسافات الذبذبات لقطع الـ DNA المختلفة والتي تم الحصول عليها من فحص المؤشر وبين لوغريتم Log حجمها .

المؤشر الذي نعمل به ، تم الحصول عليه بعد قطع الـ DNA الذي يلخص بكتيريوفاج لامبدا وكذلك البلازميد pUC19 بواسطة انزيمات تحديد مختلفة في الصورة. بالجهة اليسرى يمكن أن نرى نتائج فحص هذا المؤشر على الجل . كبر قطع الـ DNA المختلفة معطى بالصورة بوحدات عدة قواعد . بعد قيامك بقياس مسافة الذبذبة للبلازميد المقطوع ، تستطيع تحديد كبر البلازميد حسب المنحنى المعياري .



انتبه ! ان المعطيات للمنحنى المعياري(مسافة الذبذبة لقطع الـ DNA للمؤشر) التي سوف تستعملها ، عليك أخذها من صورة الجل التي فحصتها ومنها فقط !

من أجل تحديد كبر البلازميد الذي استخلصته يجب عليك ان تقوم بعمل منحنى معياري باعتمادك على معطيات المؤشر الذي تم فحصه على **نفس** الجل المستخدم لفحص البلازميد . إن حركة الـ DNA داخل الجل تتغير بكل فحص،وحتى عند التحدث على نفس مقطع الـ DNA، والسبب لأنها تعتمد علىعوامل كثيرة وهي اكبر من قدرتنا على المراقبة . ان كل تغيير صغير في تركيز الجل أو الجهد الكهربائي تؤدي إلى نفس الفحص يرى بشكل آخر . لذلك فإن فحص المؤشر له دلالة فقط بالنسبة لفحص مقابل للبلازميد