تقنية التحزيم أو التشريط

Banding Technique

إعداد الأستاذ

مخلد بن حامد المطيري

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

تقنية التحزيم أو التشريط

التحضيرات اللازمة للعمل:

- **طريقة تحضير محلول الـــ PBS: Phosphate Buffer Solution**

1- 8 gm Nacl
2- 0.2 gm Kcl
3- 2.17 gm $Na_2Hpo_4.H_2O$ فوسفات الصوديوم الأحادية

OR:
1.93 gm Na_2Hpo_4 فوسفات الصوديوم اللامائية

OR:
2.41 gm $Na_2Hpo_4.2H_2O$ فوسفات الصوديوم الثنائية

4- 0.2 gm KH_2po_4

ويستخدم هذا المحلول في ضبط PH الصبغة بالإضافة إلى المحافظة على حيوية الخلايا.

- **طريقة تحضير صبغة جيمسا:**

١- تزن ٥ جرام جيمسا (بودرة) وتوضع في زجاجة لونها غامق لتجنب الضوء.
٢- يضاف إليها ٣٣٠ مل من الجلسرين وتخلط جيداً وبشدة.
٣- توضع الزجاجة في الفرن عند درجة حرارة ٦٠م لمدة ساعتين ، مع رج الزجاجة كل نصف ساعة.
٤- تبرد الزجاجة إلى درجة حرارة الغرفة.
٥- يضاف إليها ٣٣٠ مل من الميثانول وتخلط جيداً وبشدة.
٦- تترك الزجاجة لمدة ٢٤ ساعة (اليوم التالي).
٧- ترج الزجاجة ثم ترشح الصبغة باستخدام ورق ترشيح في زجاجة لونها غامق ونظيفة.
٨- تترك لمدة أسبوع قبل الاستخدام.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

هناك عدة تقنيات للتحزيم أو التشريط الكروموسومي ومن أهم هذه التقنيات ما يلي:

أولاً: تقنية التحزيم ــ G: G – banding technique

تستخدم هذه التقنية صبغة جيمسا Giemsa stain حيث أن هذه الصبغة تؤدي إلى صبغ الكروموسومات بلون أزرق متساو فإذا ما تعرضت الكروموسومات إلى معاملة معينة قبل الصبغ فإن التقنية ستؤدي إلى صبغ مناطق محددة من الكروموسوم ، وبناء على ذلك ستظهر على كل فرد كروموسومي نماذج مميزة له حيث تؤدي المعاملة قبل الصبغ إلى ظهور حزم bands مستعرضة على طول كل كروموسوم ويختلف ترتيب هذه الحزم باختلاف الكروموسوم ومن هنا يمكن تمييزه عن غيرة.

وظهر جدل كبير حول هذه التقنية مفاده فيما إذا كانت هذه الحزم موجودة أصلاً على الكروموسوم أو أن التقنية هي المسؤول عن تكوين هذه الحزم .

أهم المواد المستخدمة لهذه التقنية:

١- محلول الـ PBS.

٢- صبغة الجيمسا.

٣- التربسين Trypsin

ملاحظة:

كان يعتقد أن هذه التقنية تعمل على مسخ DNA وتحويله إلى خيوط منفردة ثم إعادة المسخ والارتباط ، ولكن اثبت الباحثون أن هذه التقنية ليست مسخا للحامض النووي DNA وإعادة ارتباط ولكن التحزم الموجود على طول الكروموسوم قد يمثل أماكن الكروموميرات.

أهم المتغيرات التي يجب مراعاتها في هذه التقنية:

١- تركيز إنزيم التربسين المستعمل.

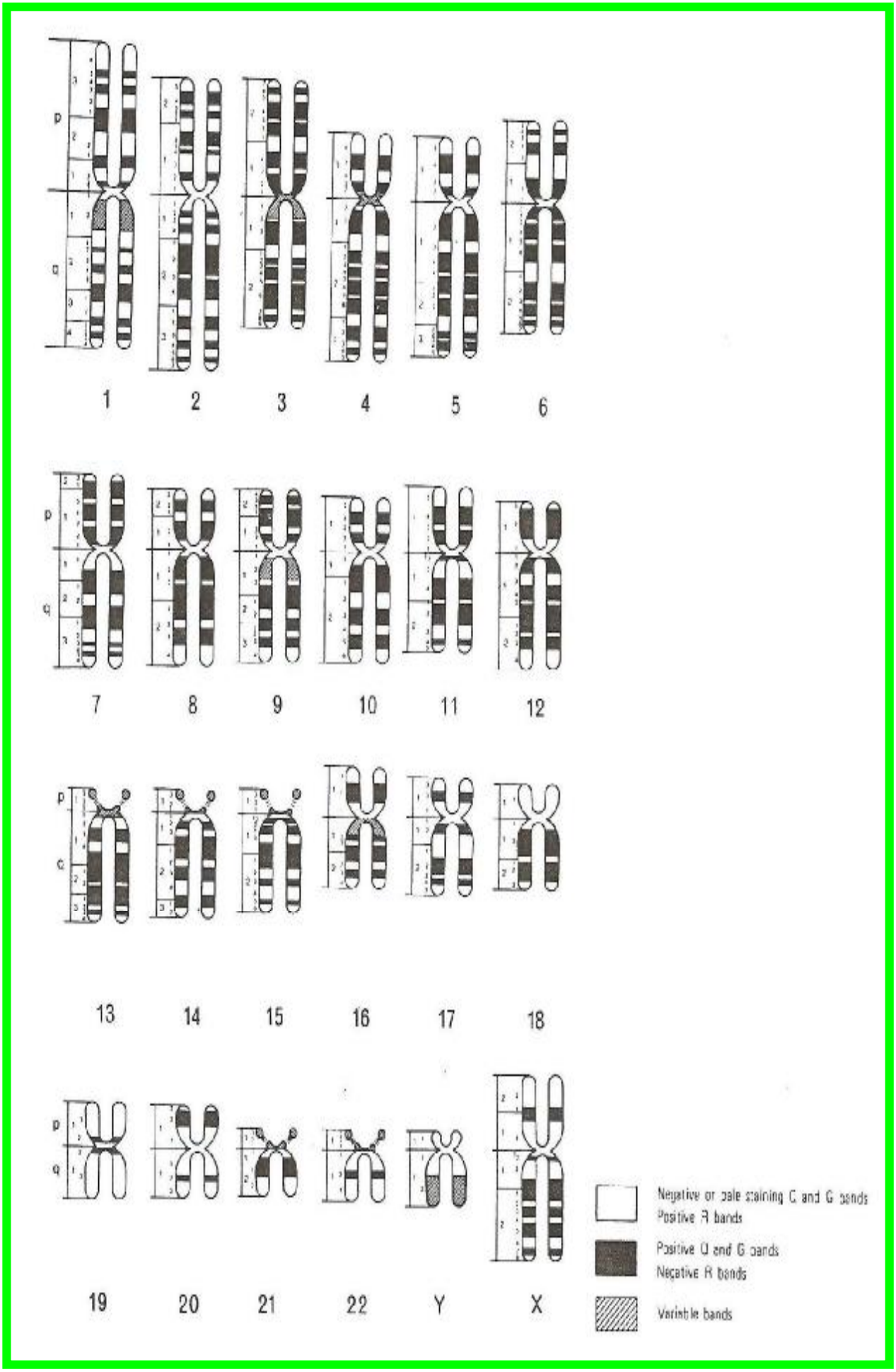
٢- نوع إنزيم التربسين المستعمل فيما إذا كان صلباً أم سائلاً.

٣- فترة تعريض الشرائح للتربسين.

٤- طريقة تحضير الشرائح.

٥- تركيز صبغة جيمسا.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com



PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

خطوات هذه التقنية : (ياسين وماكينا 1982 ، 1983)

١ــ تترك الشرائح بعد التحضير لمدة خمسة أيام قبل عمل التشريط حتى تجف تماماً.

٢ــ توضع الشرائح في الفرن عند درجة حرارة ٦٠م لمدة ساعة ونصف إلى ساعتين.

٣ــ يحضر محلول التربسين (يحلل البروتينات الموجودة) حديثاً وذلك بإذابة 0.25 جراماً من التربسين الصلب في 100 مل من PBS وضبط PH عند 7 ــ 9.

٤ــ يوضع المحلول في وعاء (جار) ثم يوضع في حمام مائي عند درجة 37م ويبقى فيها حتى يكتسب المحلول حرارة الحمام المائي.

٥ــ تؤخذ كمية مناسبة من محلول PBS في جار وتوضع في الفريزر.

٦ــ توضع الشرائح في الوعاء المحتوي على محلول التربسين الدافئ ضمن فترات مختلفة ابتداءً من 5 ثوان ــ 30 ثانية. (فترة كافية لعمل التربسين تختلف باختلاف الخلايا).

٧ــ تغسل (تغمس) الشرائح مباشرة في محلول PBS البارد لإيقاف عمل إنزيم التربسين.

٨ ــ تصبغ الشرائح بصبغة جيمسا (5 %) لمدة من ٥ ــ ١٠ دقائق.

٩ــ تغسل بالماء العادي وتجفف.

١٠ــ تغطى الشرائح بمادة (D P X) ثم تفحص.

ثانياً: تقنية التحزيم C: C - banding technique

سميت هذه التقنية بهذا الاسم لأنها تمثل أنواعاً معينه من الكروماتين المغاير التكويني Constitutive heterochromatin. وتتميز هذه التقنية بأنها تقع في المناطق المركزية الكروموسومات فقط وعلى الذراع الطويل الكروموسوم y بعيداً عن منطقة الجزء المركزي وليس على طول الكروموسومات لذلك لا يمكن مقارنتها مع تقنيات التحزم ــ G أو التحزم ــ R وأثير جدل كبير حول تفسير هذه التقنية حيث كان العلماء يعتقدون أن الصبغة الغامقة التي تظهر في منطقة الجزء المركزي تكون نتيجة إعادة الارتباط السريع لحمض DNA في منطقة الجزء المركزي بينما يكون إعادة الارتباط في الأذرع الكروم وسوميه بطيئة لذلك تكون الصبغة الغامقة في المركز وتكون غير غامقة في الأذرع .

ولكن اثبت العلماء أن السبب في ظهور الصبغة الغامقة هو الاشتراك القوي بين حمض DNA والبروتينات اللاهستونية ويقلل هذا الاشتراك فقدان الحامض DNA لذلك تكون الصبغة غامقة.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

أهم المواد المستخدمة لهذه التقنية:

١- هيدروكسيد الصوديوم.

٢- حامض الهيدروكلوريك Hcl

٣- كلوريد الصوديوم.

٤- سترات ثلاثي الصوديوم.

٥- إنزيم التربسين Trypsin

٦- الإيثانول.

إذا كانت المعاملة شديدة فإن منطقة الجزء المركزي هي التي تصبغ بصبغة جيمسا وبشكل كثيف بالمقارنة مع الأذرع الكروموسومية ، أما إذا استعملت هذه المواد بتركيز أقل فسيظهر في الكروموسوم تحزمات مستعرضة على طول كل فرد كروموسومي.

خطوات هذه التقنية:

١ــ تعامل الشرائح بحامض HCL تركيز (0.2) لمدة ١٥ دقيقه عند درجة حرارة الغرفة ، ثم تغمر بالماء المقطر ثلاث مرات متتالية .

٢ــ تعامل الشرائح بمحلول NaoH تركيز (0.07) لمدة دقيقتين ، ثم تغمر الشرائح بكحول الإيثانول تركيز (70 %) ثلاث مرات مدة خمس دقائق لكل مره ، ثم تنقل الشرائح إلى الإيثانول تركيز (95 %) ثلاث مرات لنفس المدة السابقة.

٣ــ توضع الشرائح أفقياً في مكان رطب.

٤ــ يضاف مادة (X2SSC) مزيج من كلوريد الصوديوم وسترات ثلاثي الصوديوم على الشريحة.

٥ــ تحضن الشرائح في مكان رطب عند 60 ــ 65 م لمدة 16 ــ 20 ساعة.

٦ــ تغمر الشرائح بمحلول (X2SSC) ثلاث مرات لمدة خمس دقائق في كل مره.

٧ــ تغمر الشرائح في كحول ايثيلي تركيز 70 % ثلاث مرات لمدة خمس دقائق في كل مره ثم كحول إيثيلي 95 % ثلاث مرات لمدة خمس دقائق في كل مره.

٨ــ تجفف الشرائح.

٩ــ تصبغ بصبغة جيمسا تركيز (2 ــ 10 %) لمدة 25 ــ 30 دقيقه.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

ثالثاً: تقنية التحزيم R: R – Reverse banding

تسمى تقنية التحزيم العكسية لأنها تؤدي إلى ظهور نماذج تحزم كروموسوميه معاكسه في كثافة الصبغة لتلك التي تظهر من جراء استخدام تقنيه التحزم C ــ وتستخدم بكثرة في حالة الحاجة لملاحظة نهايات الكروموسومات لأنها تكون بهذه التقنية مصبوغة.

خطوات هذه التقنية:

١ــ تحضن الشرائح في محلول مكون من فوسفات الصوديوم Na_2HPO_4 تركيــز ١ مــول و pH من 4 ــ 4.5 ودرجة حرارة 88 م لمدة عشر دقائق.

٢ــ تغمر الشرائح في وعاء يحتوي على ماء عادي.

٣ــ تصبغ الشرائح لمدة عشر دقائق بصبغة جيمسا (تركيز 4 ــ 6 %).

٤ــ تغسل الشرائح وتجفف ثم تفحص.

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com