

9 الكشف عن وجود الطفرة بطريقة الزرع المتكرر

REPLICA PLATING METHOD FOR SCREENING OF MUTATION

الزرع المتكرر RIPLCA PLATE

المبدأ Principle:

عمل روتيني متكرر في معمل البكتيريا ويتم بنقل العزلات التي تنمو في وجود مادة غذائية رئيسية لنمو النوع البكتيري المستخدم إلى وسط آخر انتقائي أو كاشف للطفرات التي قد تظهر. تستخدم لتحديد الأنماط الجينية للكائنات الدقيقة (GENOTYPES) لعدد من المستعمرات باستخدام أوساط غذائية إنتقائية "Selective media".

الغرض The purpose:

التمكن من التمييز والمقارنة بين الطبق الرئيسي Master plate والأطباق الثانوية لإجراء مسح كاشفي عن طراز جيني genotype أو طراز شكلي phenotype معين للسلسلة الميكروبية.

The definition

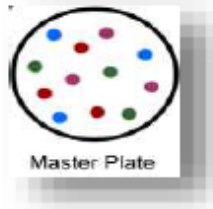
هي تقنية يتم خلالها تلقيح طبق رئيسي أو أكثر Master plate و عدة أطباق ثانوية secondary plate تحتوي على أوساط غذائية صلبة (الأجار) إنتقائية (قد تفتقر إلى مغذيات ضرورية أو تحتوي على مواد كيميائية متبطة للنمو مثل المضادات الحيوية) وتلقح جميعا بنقص المستعمرات للسلسلة الميكروبية المنقولة من طبق أولي primary plate بطريقة تسمح بنسخ النمط المكاني الأصلي للمستعمرات عليه. تعتمد التقنية على ضغط قرص مغطى بقماش القطنية (له قطر 8 سم) تم تطبع على الأطباق الثانوية بخلايا المستعمرات التي نقلت من الطبق الأصلي. بشكل عام يتم نقل عدد كبير من المستعمرات (حوالي 30-300) يتم تكرار زرعها بالطباعة بسبب صعوبة تخطيط كل منها على حده في طبق منفصل.

الخطوة الأولى First Step

1. إعداد الطبق الرئيسي Master Plate

يحتوي على الأجار الكامل Complete Media Agar. حيث يحتوي على الأحماض الأمينية، الفيتامينات، و المرافقات الإنزيمية للحصول على نمو لكل الطرز الجينية للبكتيريا المستخدمة.

To Allow all bacteria to grow



الخطوة الثانية Second Step

2. إعداد الأطباق الثانوية Secondary plate

هذا الطبق انتقائي يحتوي على الأجار الكامل وينزع منه مادة مغذية تشخيصية واحدة. حيث يسمح بنمو البكتيريا المستهدفة فقط Targeted bacteria.

Only the targeted bacteria to grow



الخطوة الأخيرة Last one

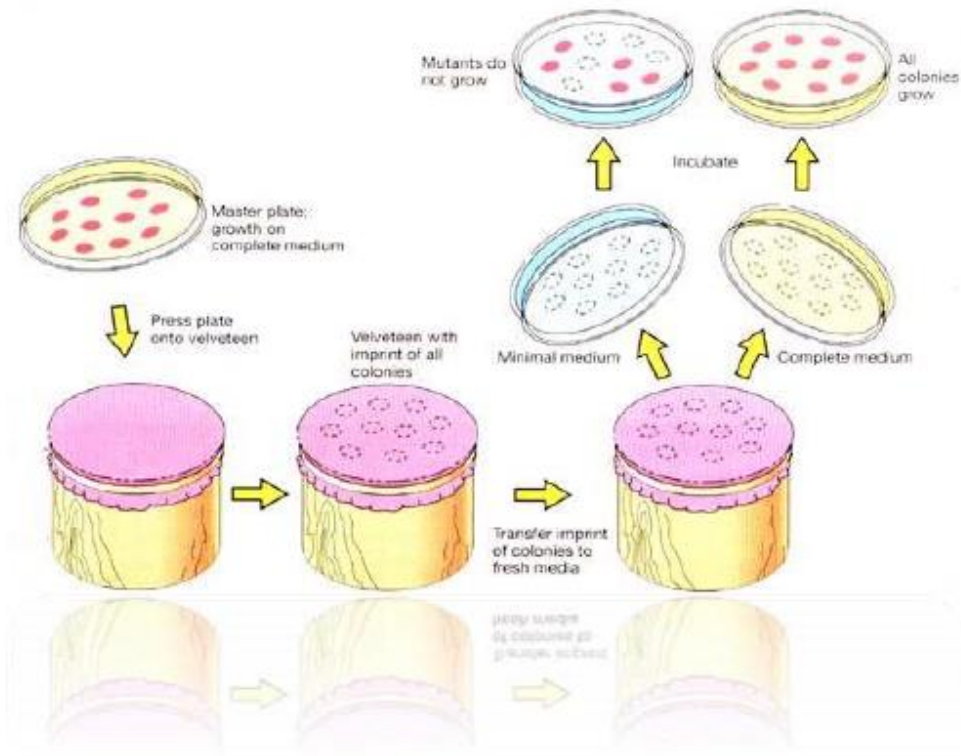
يحضن الطبق الرئيسي بعد إعداده ثم يطبع Stamped على الأجار الإنتقائي.



طريقة العمل Procedure

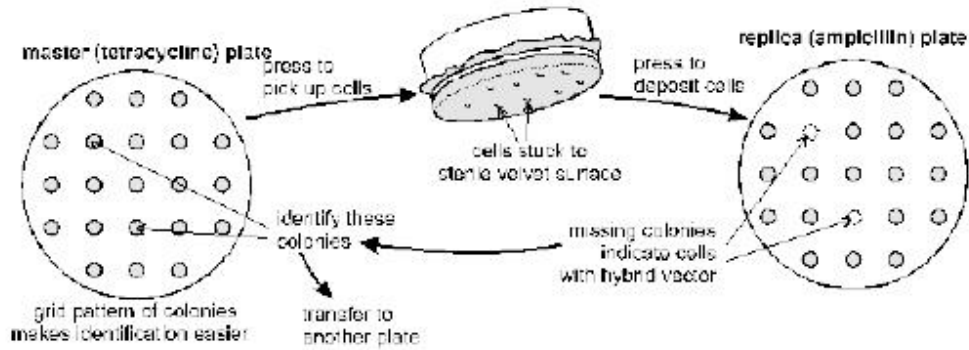
مثال : الكشف عن وجود الطفرات باستخدام وسط انتقائي يحتوي على مادة متبيلة مثل المضاد الحيوي (أميسلين Ampicillin)

Antibiotic Resistance clones detection by replica plating method



النتائج:

Antibiotic Resistance clones detection by replica plating method



البيلازميد pUC18 (المفصول من التجربة السابقة).
 (1% Bacto Tryptone, 0.5% Bacto Yeast Extract, 0.5% NaCl, pH 7.0-7.2) "