مقرر وراثة الأحياء الدقيقة (351 حدق)

Microbial Genetics Course Syllabus (351 MIC)

1 LAB. TITLES:

Week No.	- مقدمة عن المادة الوراثية في الأحياء الدقيقة : " بدائيات النواه كالبكتيريا – حقيقيات النواه والفيروسات ...." - احتياطات السلامة في المختبر
2	- رسم منحنى النمو للكائنات الدقيقة مثل بكتيريا القولون *Escherichia coli*
3	- قياسات هامة في تحضير المحاليل الخاصة بمعمل وراثة الأحياء الدقيقة -التدريب على استخدام الماصة الدقيقة
4	- تحضير المحاليل
5	- استخلاص الحمض النووي البلازميدي ومقارنة بينه وبين الحمض النووي الكروموسومي Extraction of Bacterial Plasmid DNA from *Escherichia coli*
6	- قياس درجة نقوة وتركيز البلازميد المفصول - إعداد تفاعل إنزيم البلمرة التسلسلي PCR
7	- هضم الحمض النووي الكروموسومي والبلازميدي - فحص النواتج بالفصل الكهربي على جل الأجاروز
8	التحول الوراثي Transformation: أولاً : تحضير الخلايا المستقبلة Competent cell preparation
9	ثانياً: إجراء التحول الوراثي بالتحضين مع البلازميد المعزول
	النقل الوراثي بالفاج Transduction
10	الطفرة وأنواعها وتجربة تعيين الطرز الجينية المختلفة للبكتيريا بطريقة الزرع المتكرر Replica plating
11	الطفره المستحدثة عن طريق العوامل المطفرة مثل المواد الكيميائية
12	رسم منحنى النمو لبكتيريا القولون وتأثير تعرض المزرعه للأشعة فوق البنفسجية (كعامل مطفر mutagenic agent) على زمن التضاعف

2 INTRODUCTION

الوراثة في البكتريا

يعتبر علم وراثة البكتريا من احدث ميادين الدراسة في العلوم البيولوجية حيث لم يتعد الخمسين عاما ويعود هذا التاخير الى عدم توافر التجهيزات العلمية التي تمكن العلماء من مشاهدة التراكيب النووية للخلية البكتيرية.

في النصف الأول من القرن العشرين، قسم علم الأحياء إلى عدد من التخصصات.
تهدف منفردة أو مجتمعة إلى تحليل و دراسة جانب من جوانب الحياة في هذا العالم ، الذي يحوي آلاف الأنواع من الكائنات (نباتية و حيوانية و دقيقة)
جميع الكائنات على إختلافها، تتشابه في أنها جميعا تحتوي على " كروموسومات" جزيئات من حمض يدعى DNA لها القدرة على ان تتكاثر و بالتالي تستطيع الكائنات ان تتكاثر و تحافظ على نوعها من الانقراض .
كل نوع من الكائنات يتميز بأن له جزيئات ذات تسلسل DNA خاص به و يختلف عن غيرة .
يعمل جزيء DNA بنفس الكيفية في سائر أنواع الكائنات الحية، و بالتالي ما نتعلمه عن كائن يمكن تطبيقه على كائن آخر، لذا أعتمد علماء الأحياء مبدأ إجراء التجارب على كائنات معينة مثل البكتيريا و الفطريات و من ثم طبيق النتائج المفيدة على الإنسان.

انتقال الصفات الوراثية فى البكتريا

قبل عملية انقسام النهائي للخلية البكتيرية يتضاعف كروموسوم الخلية إلى نسختين متماثلتين ويذهب كل كروموسوم الى خلية بنوية جديدة ويختلف حجم هذا الكر وموسوم حسب نوع الخلية البكتيرية حيث تمتلك بكتريا Escherichia coli كروموسوما له القدرة على تخليق 4000 مركب تقريبا إضافة الى الكر وموسوم فان بعض انواع البكتريا تمتلك اجزاء دائرية من الحامض النووي DNA تستطيع تكرار نفسها بصورة منفصلة من الكر وموسوم وهي ليس لها اي دور في تضاعف وتكاثر البكتريا الاانها تكسب البكتريا صفات هامة كالمقاومة للمضادات الحيوية وإكساب البكتريا القدرة على تكوين الاسواط ولاوبار .

انتقال المادة الوراثية من خلية بكتيرية الى خلية اخرى

1- ظاهرة التحويل transformation:
انتقال حامض نووي يمتلك صفات وراثية الى خلية اخرى محدثا تغيرات وراثية في الخلية الجديدة

2- ظاهرة التوصيل transduction
تشبه سابقتها غير انها تحصل بواسطة عامل مساعد قد يكون فيروسا

3- ظاهرة الاقتران conjugation
وفيها تلتصق خليتان بكتيريتان مع بعضهما وتنتقل المادة الوراثية وذلك بمساعدة بلازميدات خاصة

classification of bacteria تقسيم البكتريا

تقسم الكائنات الحية بصورة عامة لتسهيل مهمة دراستها من الناحية الاكاديمية ولتحديد وتعريف الانواع المختلفة ذات في المجالات التطبيقية ، علما ان تقسيم البكتريا بدا منذ حوالى 200 سنة مضت واختلفت وتعددت الاسس التي بني عليها هذا التقسيم وتطورت بتطور وسائل البحث العلمي وبالذات في المجال الوراثي والكيموحيوي ومن اكثر الانظمة شيوعا للتقسيم

1- النظام التقليدي الاشمل والمعروف بنظام بيرجي Bergy's manual of determinative bacteriology يتبع باستمرار مع التحديث منذ عام 1923

2- النظام المبني على مقارنة ترتيب القواعد النتروجينية للحامض النوويRNA

3- النظام المبني على مقارنة بعض الصفات المورفولوجية والفسيولوجية لتعريف العوائل البكتيرية

تقسم مملكة البدائيات الى اربعة اقسام division رئيسية

Div.1: Gracilicutes ويشمل الخلايا البكتيرية السالبة لصبغة غرام
Div,2-: Firmicutes ويشمل البكتريا الموجبة لصبغة غرام
Div.3: Tenericutes ويشمل البكتريا عديمة الجدار
Div.4:Medosicutes ويشمل انواع البكتريا ذات التغذية غير العادية

تنتمي البكتريا الى صنف Schizomycetes والذي يظم بدورة عشرة رتب

Order 1 : Pseudomonadales
Order 2: Chlamydobacteriales
Order 3: Hyphomycrobiales
Order 4: Eubacteriales
Order 5: Caryophanales
Order 6: Actinomycetales
Order 7:Biggiatoales
Order 8: Myxobacteriales
Order 9: Spirochetales
Order 10: Mycoblamatales

وتعود معظم البكتريا المهمة من الناحية التطبيقية في حياة الإنسان الى رتبة Eubacteriales ٗ

الشفرة الوراثية GENETIC CODE

في أواسط الستينات، اكتشف عالم الفلك " جورج كامو " أن المعلومات الوراثية تكون مرتبة بشكل منظم سمي "شفرة وراثية GENETIC CODE" ونال كذلك جائزة نوبل "*

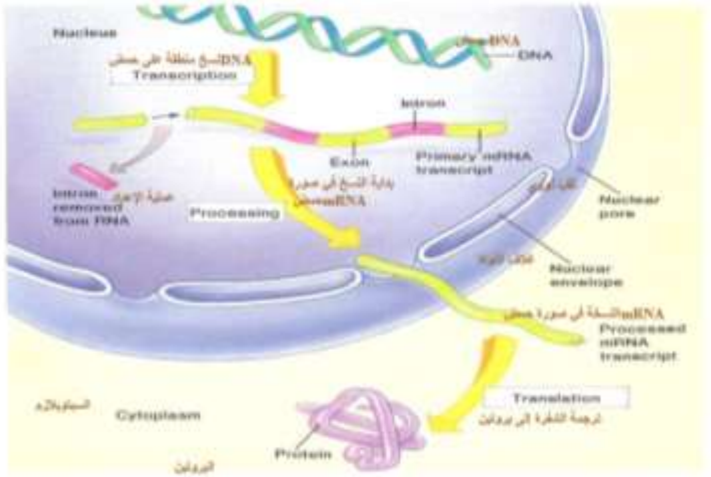
- عرفنا سابقا ان جزيء DNA مكون من جينات تتكون من نيوكليوتيدات مرتبة في أزواج، و بهذا تعتبر الجينات مستودع للشفرة الوراثية.

قاموس الشفرة الوراثية GENETIC CODE DICTIONARY:

تحت ظروف خاصة، عند وضع حمض **RNA يحتوي على القاعدة النيتروجينية U فقط** (يسمى Poly Uracil) في انبوبة إختبار و **إضافة خليط من (احماض أمينيه و إنزيمات و ريبوزومات)**، يتكون نوع واحد من البروتينات هو سلسلة من الحمض الأميني "فينيل آلانين Phenyl alanine".

وعند وضع **حمض RNA يحتوي على القاعدة النيتروجينية A + U** في انبوبة إختبار و **إضافة خليط من (احماض أمينيه و إنزيمات و ريبوزومات)**، يتكون بروتين هو خليط متسلسلة من عدد من الأحماض الأمينية "فينيل آلانين و ليوسين و ايزوليوسين و تيروسين" و تختلف كمية كل منها بحسب مرات تكرار الكودون المحدد لكل حمض أميني منها.

و بتكرار ما سبق من تجارب، أمكن التعرف على الكودونات التي يحدد كل منها أحد الأحماض الأمينية، فوجد ان عددها 64 كودون(أي 64 شفرة لتكوين الأنواع المختلفة من البروتينات).



Gene Processing

تنظيم عمل الجين Gene Regulation:

- تستخدم الخلية خلال نشاطاتها عدداً محدوداً من الجينات الموجود على سلسلة DNA بأن تنسخها إلى mRNA ، بينما تبقى الجينات الأخرى غير فاعلة حيث لا تستنسخ إلى mRNA . هل يعني هذا أن عدد الجينات في الخلية أكثر مما تحتاجه؟
- من العديد من الدراسات استنتج العلماء ان هناك آلية تتحكم في بدء عمل الجين و توقفه! ، و من اشهر النظريات:
- نظرية العالمين الفرنسيين " جاكوب و مونر " :
- (بعد دراسات على بكتيريا *E. coli* التي تنتج عدد محدود من الإنزيمات عند زراعتها في بيئة بها لاكتوز، و لا تنتج هذه الخمائر في غياب اللاكتوز من بيئة التنمية):
- [مجموعة الجينات التي تقوم بالسيطرة على تكوين بروتينات معينة تسمى "جينات تركيبية genes Structural"
- و هي تقع تحت سيطرة جين آخر يقع على احد جوانبها ، ينظم عملها و يسمى "جين منظم Regulating genes"].

ملاحظة:

- بنيت نظرية "جاكوب و مونر" على دراسة للأحياء الدقيقة،و هناك أدلة تؤيد وجود ذات النظام في جينات الأحياء المعقدة مثل:

1- وجود 3 مجموعات رئيسية من الجينات في خلايا الكبد (واحدة لبناء الجلوكوز و أخرى لتفكيك الجلايكوجين و ثالثة مختلطة) تكون كل منها هرمونات ينخفض تركيزها عند الجوع ، و يرتفع تركيزها عند وجود الأنسولين (داء السكري) مما يدل على وجود فاعلية مشتركة بين لمجموعات الثلاثة.

2- أن خلايا الكائن البالغ تكون مخصصة للقيام بوظائف محددة (و جميعها تملك نفس عدد الكروموسومات)، و هذا يعنى ان جينات معينة تكون في حالة فعالة بينما الجينات الباقية تكون في حالة سكون.

3- عند إستبدال نواة خلية فأر بنواة خلية بشرية، وجد ان النواة استجابت لحاجة سيتوبلازم خلية الفأر و كونت mRNA و بالتالي بروتينات جديدة. وهذا يعني ان محفزات السيتوبلازم ليس لها خصوصية لنواة معينة بل يمكنها ان تحفز جينات أي نواة حتى ولو كانت منقولة إليها.

وراثة الأحياء الدقيقة ـ الإنقسام الخلوي

بعد تضاعف المادة الوراثية داخل خلية الكائن الدقيق After the genetic، تنقسم الخلية بدائية النواة في عملية تسمى الإنشاطار الثنائي إلى خليتين بنويتين متطابقتين من الخلية الأم.

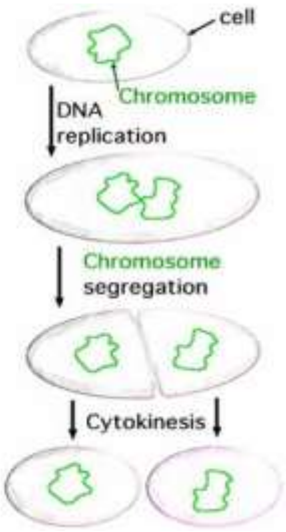


Figure1 : From the Virtual Microbiology Classroom on ScienceProfOnline.com

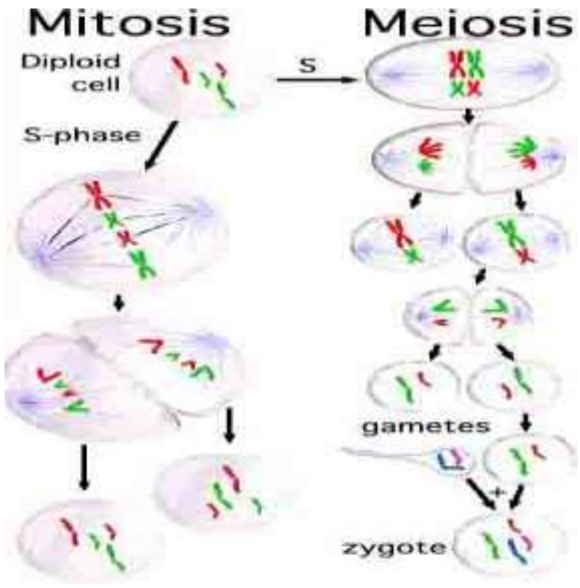
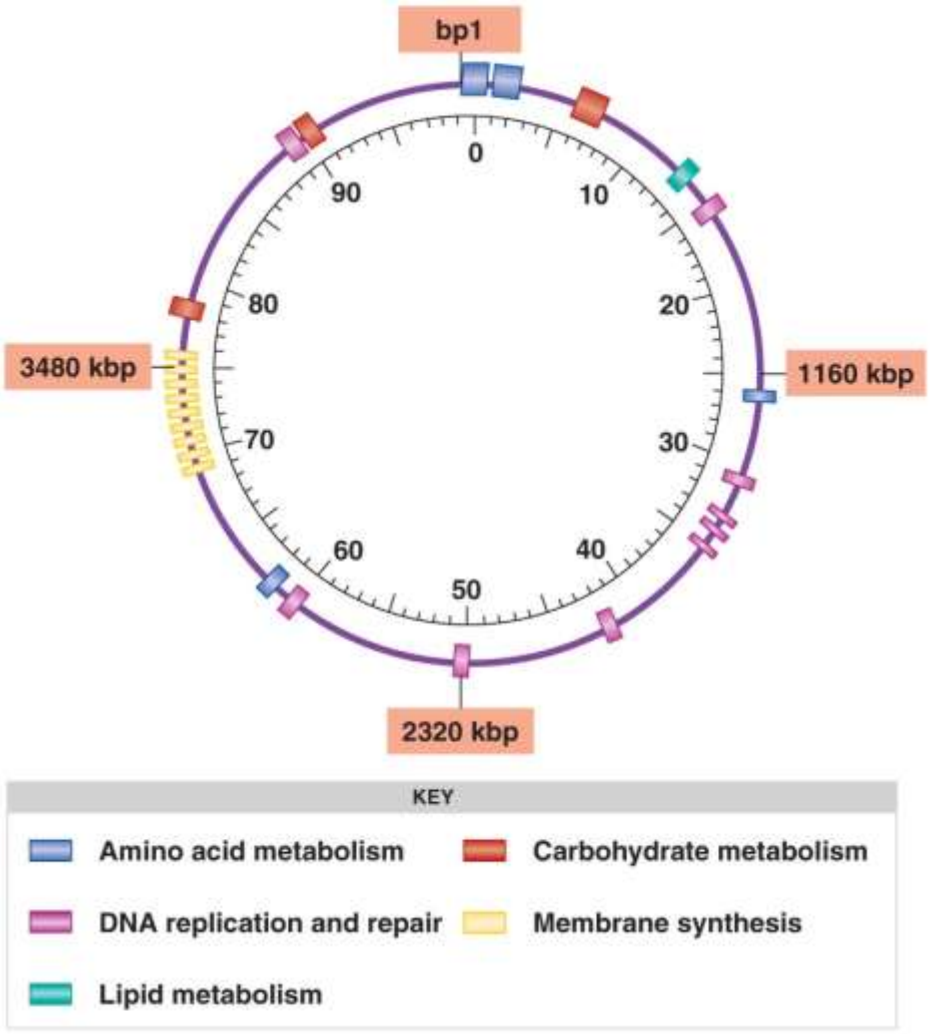


Figure2 : Image: Types of Cell Division, Saperaud Wiki

From the Virtual Cell Biology Classroom on ScienceProfOnline.com

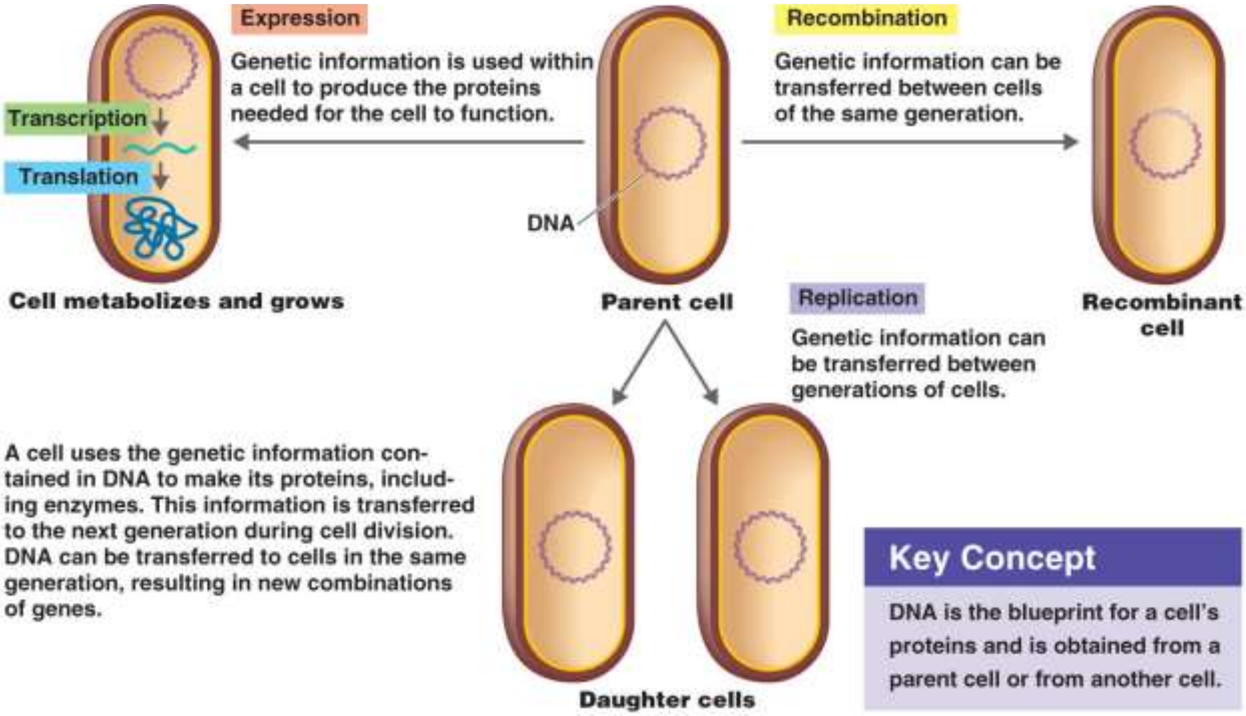
الخريطة الوراثية لكروموسوم بكتيريا القولون

Genetic Map of the Chromosome of *Escherichia coli*

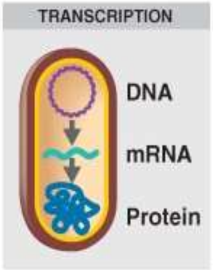


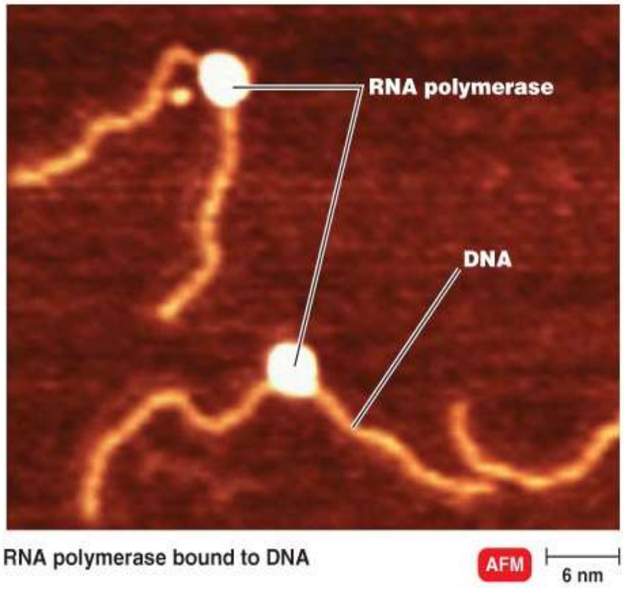
(b) A genetic map of the chromosome of *E. coli*. The numbers inside the circle indicate the number of minutes it takes to transfer the genes during mating between two cells; the numbers in colored boxes indicate the number of base pairs.

انتقال المعلومات الوراثية في الكائنات الدقيقة بدائية النواة
The Flow of Genetic Information



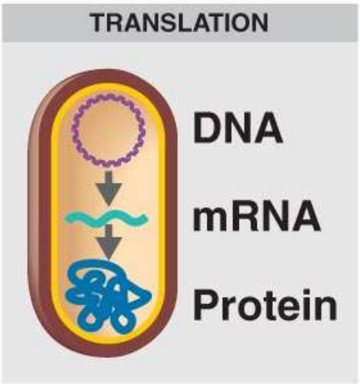
نسخ المعلومات الوراثية Transcription –
صورة الكتروميكروسكوبية

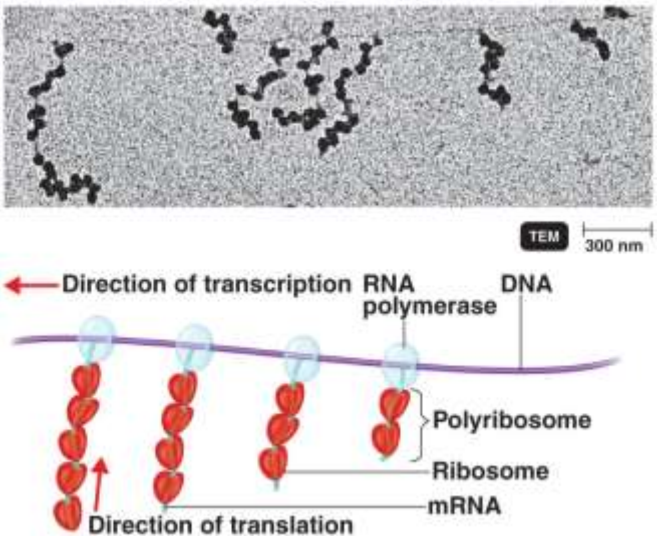




RNA polymerase bound to DNA

ترجمة المعلومات الوراثية
Simultaneous Transcription & Translation–
صورة الكتروميكروسكوبية

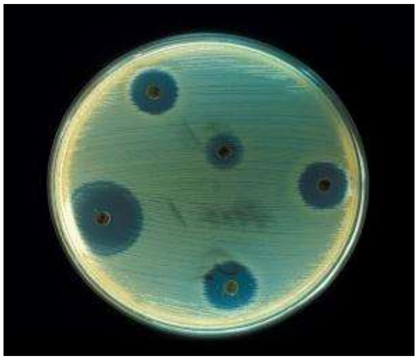




من تطبيقات وراثة الكائنات الدقيقة
استخدام التعبير الجيني لمقاومة الأمراض
USING GENE EXPRESSION TO CONTROL DISEASE

مثال: بكتيريا *STAPHYLOCOCCUS* ومقاومتها للمضادات الحيوية
STAPHYLOCOCCUS & ANTIBIOTIC RESISTANCE

- كثير من السلالات الحالية لبكتيريا STAPHYLOCOCCUS مقاومة للمضاد الحيوي البنسلين.
- أحد البروتينات البكتيرية التي تتداخل مع مقاومة البنسلين يسمى .... (الإنزيم الذي يكسر ويوقف عمل البنسلين).
- يتم التعبير الجيني للجين الخاص بإنزيم BETA-LACTAMASE فقط عند وجود البنسلين في الوسط.
- عند عدم تعرض البكتيريا للبنسلين يقفل هذا الجين ولا يتم تصنيع إنزيم BETA-LACTAMASE.
- فهم كيفية قفل وفتح الجين قد يساعدنا في تصنيع البنسلين بطريقة أكثر فعالية قادرة على تعطيل التعبير الجيني بحيث تصبح السلالات المقاومة للبنسلين غير قادرة على مقاومته بإنزيماتها.



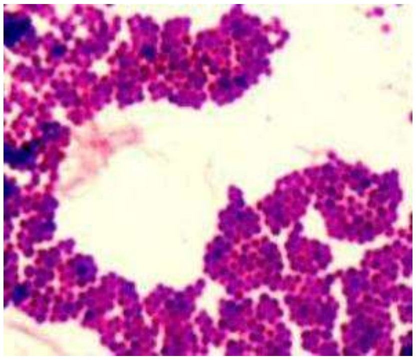


Figure 3 :Images: Gram stain of Staphylococcus, T.Port; Enzyme Beta-lactamase, J. Swaminathan & MSD staff, European Bioinformatics Institute; Staphylococcus aureus on antibiotic test plate, PHIL #2641

3 التنوع الميكروبي GENETIC DIVERSITY IN PROKARYOTES:

ينتج عن الإنشطار الثنائي خليتين متطابقتين

Binary Fissionإذن لماذا ؟؟

لا يظهر شكل واحد للبكتيريا؟

تختلف البكتيريا في الجنس الواحد لقدرة بعض السلالات على مقاومة المضادات الحيوية دون غيرها؟

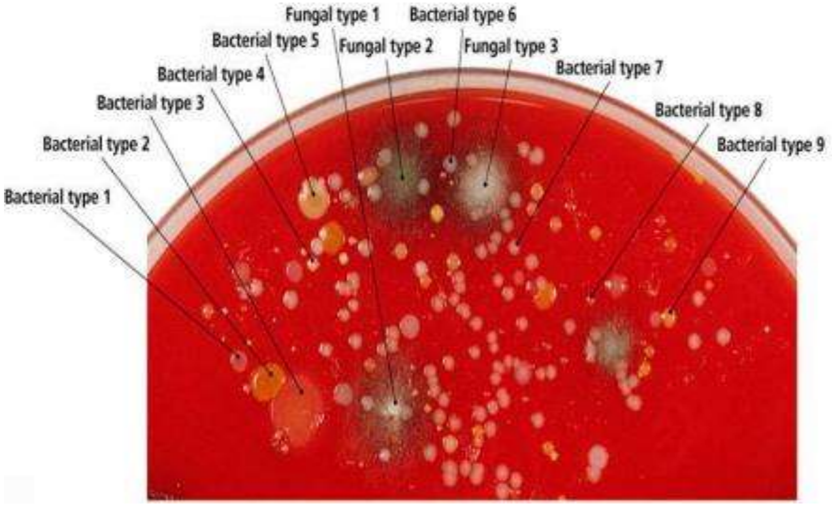


Figure :4 From the Virtual Microbiology Classroom on ScienceProfOnline.com

النوع الأول: انتقال الجينات عمودياً **Vertical** gene transfer

تضاعف الكائنات الدقيقة مادتها الوراثية وتنقلها إلى الأجيال القادمة.

النوع الثاني: إنتقال الجينات أفقياً **Horizontal gene transfer**

تعطي بعض الكائنات جزء من مادتها الوراثية لخلايا مستقبلة (غير الخلايا البنوية)

وهذه تشمل ثلاث طرق:

1- التحول الوراثي Transformation .

2- النقل بالفاج Transduction.

2- الإقتران البكتيري Bacterial Conjugation.

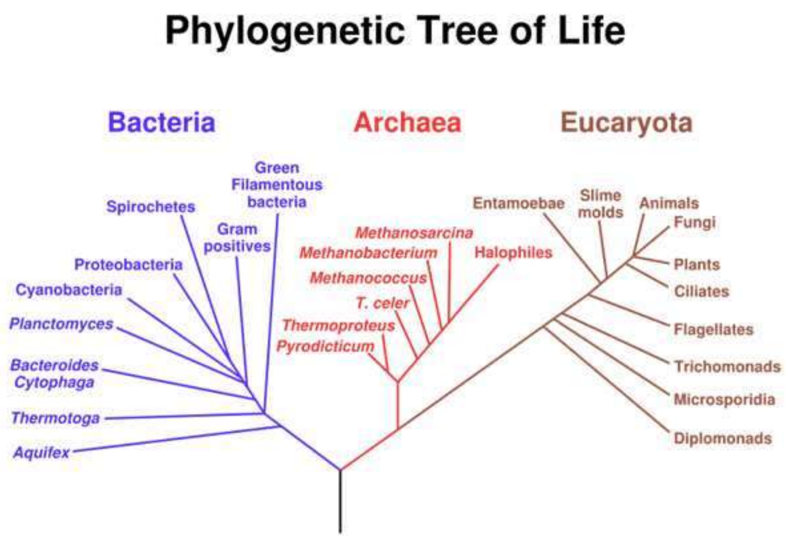


Figure:5 Phylogenetic Tree, Eric Gaba, NASA Astrobiology institute.

4 تجربة رسم منحنى النمو لبكتيريا مثل القولون وحساب زمن التضاعف

GROWTH CURVE AND GENERATION TIME

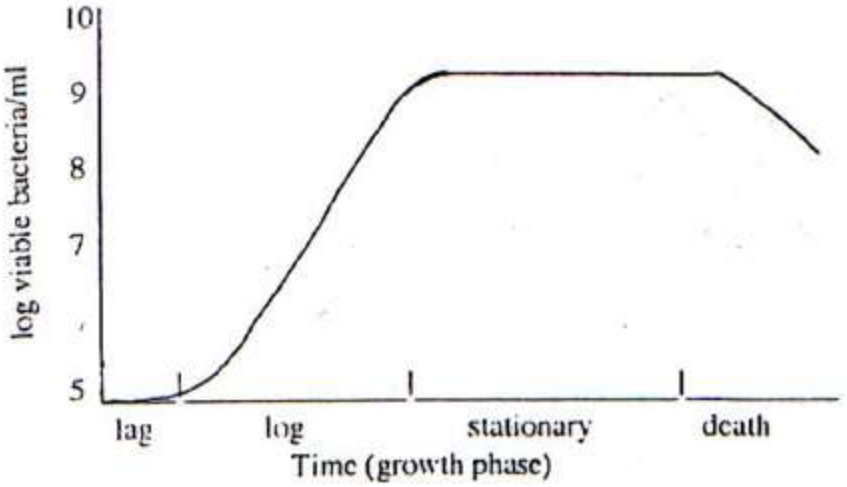
مقدمة

- عند محاولة دراسة العمليات الأساسية للحياة، غالبا يلجأ علماء الأحياء إلى الكائنات الحية الأكثر (بساطة) لتدوين ملاحظاتهم وتطوير نظريات العمل.
- ثم طبقت هذه الماحظات على النظم البيولوجية الأكثر تعقيدا لتحديد ما إذا كان الحصول على المعلومات
- من أبسط الكائنات الحية يمكن استقراءه إلى أشكال أكثر تطوراً.
- في هذا المختبر سوف نستخدم الكائنات الحية بدائية النواة، كالبكتيريا، لدراسة عملية النمو.

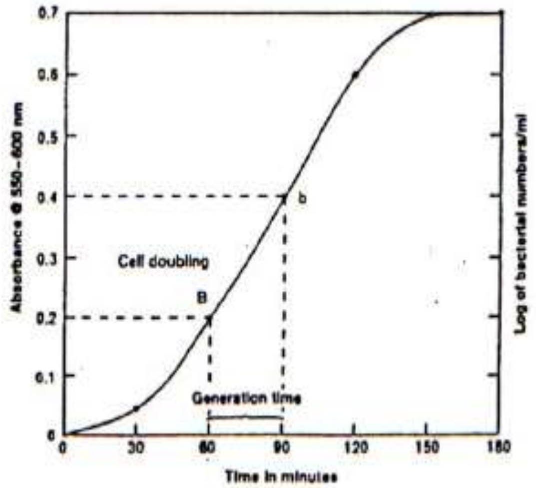
منحنى النمو Bacteria Growth

- البكتيريا هي مجموعة متنوعة من الكائنات الصغيرة ، وحيدة الخلية في المملكتين Eubacteria و Archaebacteria. وجدت تقريبا في كل البيئات حتى الظروف القاسية منها ، فاقد وجدت على الأرض منذ وقت طويل وانتشرت في نطاق يضاهي أي من الكائنات الحية الأخرى.
- تنتظم المواد الجينية للبكتيريا في جزيء DNA دائري أن ليس يحيط بها الغشاء النووي . يجري الاستنساخ هو عن طريق الانشطار الثنائي مع تشكيل من اثنين يساوي حجم الخلية الأم.

- . أثناء نمو البكتيريا النشطة يتضاعف حجم السكان باستمرار ،
- فالخلية الواحدة تصبح 2 ،و 2 تصبح 4 ، وما إلى ذلك في متوالية هندسية .
- عندما يتم تلقيح البكتيريا وسط جديد ، تسلك المزرعة ما يسمى بمنحنى النمو ويتميز إلى أربعة مراحل (الشكل 1).



- **<u>وقت الجيل Generation Time:</u>** هو الوقت اللازم لتضاعف عدد الخلايا . ويختلف بين الكائنات الحية و تحت الظروف البيئية المختلفة .
- يمكن تحديد هذه المراحل بتوضيح العلاقة بين الزمن وكثافة النمو (الشكل2).



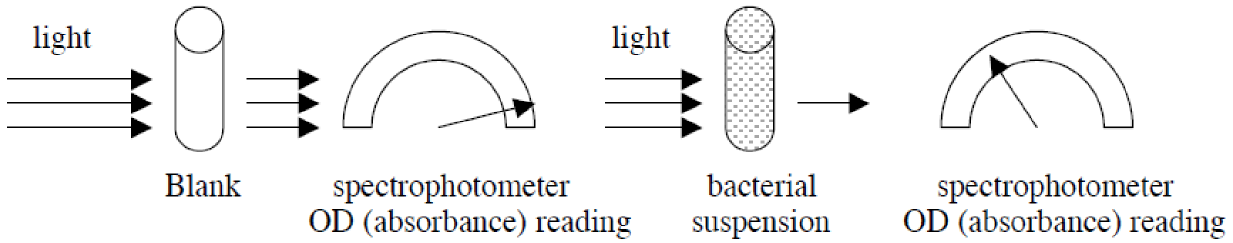
- عندما تتكاثر البكتيريا ، يتم استنفاد المواد المغذية و تتراكم المنتجات النهائية الأيضية المثبطة. هذه الظروف تؤدي إلى دخول المزرعة في حالة الثبات Stationary phase التي تمثل عدم وجود أي زيادة في أعداد خلايا المزرعة (يتساوى معدل نمو مع معدل الموت) .

- في نهاية المطاف سيكون هناك انخفاض في الخلية عندما تصل المزرعة إلى مرحلة الموت Decline phase .

الهدف من التجربة

- تقدير عدد الخلايا بأكثر الطرق شيوعاً: العد الحيوي للأطباق viable plate count و تقدير كثافة النمو turbidity في المزرعة السائلة (تحليل الطيف الضوئي analysis Spectrophotometer).
- تظهر المزرعة السائلة أكثر تعكيراً بزيادة عدد الخلايا البكتيرية نتيجة الإنقسام والتضاعف.
- داخل انبوبة المزرعة السائلة، تعكس الخلايا البكتيرية أي ضوء يسقط عليها وتقلل كمية الضوء المار خلال المزرعة.
- يقيس جهاز تحليل الطيف الضوئي Spectrophotometer الأشعة الضوئية التي تنفذ خلال الأنبوبة أو على العكس الأشعة الضوئية التي تمتصها المزرعة.
- يعد كل من قياس درجة التعكير turbidity (الكثافة الضوئية OD (Optical density، من طرق القياس الغير مباشرة للكتلة الحيوية biomass فهي تشمل الخلايا الحية والميتة.

مبدأ عمل جهاز تحليل الطيف الضوئي Spectrophotometer



- إذا قمنا بتتبع النمو والزيادة في التعكير، أي تتابع القراءة للكثافة الضوئية في نفس المزرعة مع مرور الزمن سوف يزيد امتصاص الأشعة الضوئية بزيادة عدد الخلايا.
- يمكن تمثيل ذلك بيانياً لتوضيح المراحل المختلفة للنمو في الظروف المختلفة.
- لكي نصل لإلى منحنى به الثلاث مراحل الأولى فسيستغرق وقتاً طويلاً وهو من عيوي هذه الطريقة.
- وكذلك فإن العلاقة بين الكثافة الضوئية OD وعدد الخلايا سوف ينحرف بشده في الطور اللوغاريتمي فيصعب تمثيله إذا لم نستخدم ورق رسم بياني خاص او معاملة خاصة للأعداد حيث ترفع للرقم اللوغاريتمي ليسهل تمثيلها.
- سوف نستخدم بكيتيريا القولون Escherichia coli كمثال لمنحنى النمو، فهي أكثر الأنواع دراسة لسهولة توفير الظروف المثلى لنموها وسرعة معدل النمو الخاص بها مما يسهل دراسته في معمل واحد.

طريقة العمل Procedure

طريقة التخفيف

Dilution Technique

1. كل مجموعة من الطالبات سوف تأخذ 5 أنابيب بها 5 مل (دورق 125 مل به 50 مل) من مرق مغذي.
2. ثم ينقل الأستاذ 1 مل من مزرعه حديثة من بكتيريا القولون *E. coli* في الطور اللوغاريتمي إلى مرق مغذي (37ºم ..لماذا؟) إلى كل أنبوبة.
3. تحرك الأنابيب ليتم توزيع البكتيريا في المرق بشكل متساوٍ. ثم ينقل 3 مل من هذا الدورق إلى أنابيب جهازالطيف الضوئي Quartz cuvette. وتعد هذه نقطة البداية حيث الزمن = صفر(لذلك لا بد من تسجيل الوقت).
4. يتم حساب العد الحيوي على الأطباق بطريقة التخفيف للمزرعة من الفترة الزمنية الأولى 5 تخفيفات متتالية ثم يلقح بمقدار 0.1 مل من الثلاث التخفيفات الأخيرة وتعد الأطباق التي يظهر بها 30 -300 مستعمرة ثم يحسب عدد الخلايا (وحدات تكوين المستعمرات)/ مل من المزرعة.
5. تترك بقية الأنابيب بالحضان عند 37ºم، ويفضل إستخدام حضان الرج للتهوية الجيدة وخلط الخلايا.
6. تقاس الأشعة الضوئية الممتصة Absorbance عند الزمن صفر كالتالي:

a. يضبط الطول الموجي 600 نانومتر(600 nm)

b. يصفر الجهاز باستخدام أنبوبة (Blank) تحتوي على المرق المغذي بدون تلقيح بالمزرعة البكتيرية.(لماذا...؟)

c. تُقرأ درجة إمتصاص المزرعة للأشعة الضوئية بطول 600 نانومتر ثم تسجل في الجدول الخاص بها. ثم يتم التخلص من المزرعة في المكان المناسب.

7. يتم تكرار الخطوة 5 لعدة مرات (4 على الأقل)، للحصول على منحنى واضح للنمو، كل 20 دقيقة مثلاً.

8. يمكن استخدام أنبوبة او دورق واحد لكل مجموعة في الخطوة الأولى لتفادي التأثير على النمو وتثبيطه نتيجة للتعرض للبرودة عند القياس في كل مره فيتعطل النمو.

النتائج
Results

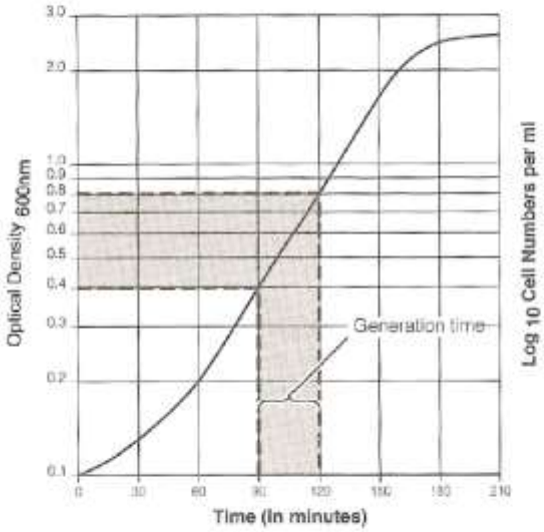
- يرسم منحنى حيث المحور السيني هو الوقت (دقائق) و الكثافة الضوئية .O.D أو لوغاريتم عدد الخلايا (CFU/ml) ويستخدم ورق الرسم البياني الخاص يسمى semi-log او يمكن استخدام برامج الحسب الالي مثل الإكسل.
- لحساب وقت الجيل GT يمكن التعويض في المعادلة التالية:

وقت الجيل = الوقت (O.D. 0.4) - الوقت (O.D. 0.2)

أو وقت الجيل = $\frac{\log 2 \times \text{الوقت بين النقطتين (B و b)}}{(\log b - \log B)}$ ، حيث :

B هو عدد الخلايا (CFU) في نقطة ما خلال مرحلة النمو اللوغاريتمي

b هو عدد الخلايا عند نقطة اخرى تالية للأولى خلال مرحلة النمو اللوغاريتمي.



لوغاريتم التركيز Log (CFU/ml)	تركيز الخلايا (CFU/ml)	الكثافة الضوئية Optical Density (O.D. 600 nm)	الوقت (دقائق)
		Blank	0
8.230	$170 * 10^{6}$	0.036	15
7.900	$93* 10^{6}$	0.050	20
8.025	$106*10^{6}$	0.080	30
7.459	$*10^{5}288$	0.100	45
7.301	$200*10^{5}$	0.09	60
7.079	$120*10^{5}$	0.070	90
6.845	$*10^{5}70$	0.024	120

التجارب التالية الهامة في وراثة الأحياء الدقيقة

1. يمكن دراسة تأثير بعض العوامل الفيزيائية أو الكيميائية على معدل النمو للكائن الحي وكمثال سوف ندرس تأثير هذه العوامل داخل المعمل على الكائن الدقيق، البكتيريا. مثل الأشعة فوق البنفسجية، المواد الكيميائية كالمنظفات والمطهرات، المضادات الحيوية. وهي ايضا ذات فائدة في تحديد الوسط الغذائي الأنسب للكائن الدقيق.
2. بعد ذلك يتم استخلاص الحمض النووي ونختبر التغير في الحمض النووي بعد نمو الكائن الدقيق وتكاثره في وجو هذه العوامل؟
3. يمكن استخدام اطوال موجية مختلفة من الأشعة فوق البنفسجية وأوقات مختلفة للتعرض لها وايضا يمكن استخدام مواد مطهره مختلفة وبتركيزات مختلفة وكذلك يمكن اختبار تغير الحمض النووي بعد النمو في وجود مضادات حيوية

الواجب: صممي تجربة لتوضيح تأثير الأشعة فوق البنفسجية على معدل نمو بكتيريا القولون؟؟؟

5 التدريب على استخدام الماصة الدقيقة MICROPIPETTE CALIBRATION

1. لمعايرة الماصات الدقيقه التاليه P20 ، P200 ، P1000 ، ترقم 6 أنابيب دقيقه microfuge (6 - 1) ثم توزن باستخدام الميزان الالكتروني وتسجل النتائج في الجدول.
2. مستعينه بالجدول التالي، تستخدم المتصه المحدده لنقل الحجم المحدد من الماء المقطر إلى الانابيب المرقمه معلومة الأوزان ثم توزن الانابيب مرة أخرى وتسجل النتائج في الجدول.
3. يحسب وزن الماء بالجرام بطرح الوزن الجاف للأنابيب من وزنها بعد ملئها بالماء، حيث 1000 ميكرولتر من الماء يجب أن يقابلها تماماً وزن 1 جم في درجة حرارة الغرفه.
4. يجب أن يساوي وزن الماء في كل أنبوبه 1 جم، وفي حالة الزياده او النقص يجب إعادة الخطوات في تلك الأنابيب.
5. يجب التأكد من جوده تقنيه إستخدام الماصه حيث يجب تجنب حملها في اليد لوقت طويل. والسحب بزاويه 45 درجه على بعد ملائم من سطح السائل المسحوب وقاع الأنبوبة.

حجم الماء بالجرام	الحجم بالميكرولتر باستخدام ماصه p1000	الحجم بالميكرولتر باستخدام ماصه p100	الحجم بالميكرولتر باستخدام ماصه p20	الوزن الابتدائي	رقم الأنبوبه
	990	0	10		1
	900	100	0		2
	805	175	20		3
	910	88	2		4
	0	1000	0		5
	900	0	100		6

6 «طرق القياس في مختبر الأحياء الجزيئية»

أولا: الوحدات المستخدمة:

ثانياً: المصطلحات الهامة في البيولوجيا الجزيئية:

لحساب الوزن الجزيئي نحتاج:
الجدول الدوري للعناصرالكيميائية-آله حاسبه

1- الحصول على الجدول الدوري للعناصر الكيميائيه.

2- التعرف على العناصر المكونه للمركب.

مثل حمض الكبريتيك sulfuric acid صيغته البنائيه H_2SO_4

توضح عدد ونوع الذرات في المركب، وفيه 2 ذرة هيدروجين وذرة كبريت و4 ذرات أكسجين.

3-تحديد وتسجيل الوزن الذري لكل ذرة،الوزن الذري للهيدروجين= 1.0079 ولذرة الكبريت=32.6 ولذرة الأكسجين=15.9994.

4- يحسب الوزن الجزيئي لحمض الكبريتيك بضرب عدد ذرات الجزيء في الوزن الذري لكل ذره.

2*(1.0079)+1*(32.06)+4*(15.9994)= 49.8 وحدة كتلة ذريه

تختلف القيمه لكل مركب.

المول (mol): وزن المادة المذابة بالجرام (weight in grams) «مقسوم على الوزن الجزيئي (MW) للمادة.

$$\textbf{Mole} = \frac{Weight\ in\ grams}{Molecular\ Weight\ (MW)}$$

إذن : الوزن بالجرام = عدد المولات × الوزن الجزيئي

<u>مثال 2:</u> الصيغة البنائية او الكيميائية Formula weight لكلوريد البوتاسيوم هي KCl

الوزن الجزيئي لـ KCl = 39. 1 + 35. 45 = 74.55 (amu)

- هو خليط متجانس من المركبات حيث تظهر كل الجسيمات كجزيئات أو أيونات مفرده(مذيب+مذاب).

يمكن التعبير عن تركيز المحلول بعدة طرق، مثل:

- **1- المولارية (M) Molarity :**
- **2- المولالية (m) Molality:**
- **3- العيارية (N) Normality:**
- عللي:

يستخدم الماء المقطر Distilled water عادة في تحضير المحاليل؟

يجب استخدام المحاليل المنظمة Buffers في جميع اختبارات الأحياء الجزيئية؟

المولارية هي عدد مولات المذاب في لتر من المحلول.

المولار= عدد المولات/حجم المحلول باللتر.

الوحدة= مولار (M) = مول / لتر

$$\text{Molar(mol/L)} = \frac{No.of\ Moles\ (mol)}{Liters\ (L)}$$

<u>مثال:</u> المحلول ذو المولارية 1 مولار يحتوي على 1 مول من المادة المذابة في الحجم النهائي للمحلول.

لتحضير محلول 1 مولار من كلوريد البوتاسيوم KCl يوزن 74.55 جم ويذاب في 1 لتر من الماء المقطر DDW.

أي 74.55 جم من الملح في لتر من المحلول النهائي. أي أن الوزن المحسوب يذاب في حجم صغير من الماء ثم يكمل الحجم الكلي للمحلول إلى 1 لتر.

وهذا يختلف عن إضافة 74.55 جم إلى لتر من الماء.

- **أمثلة على المولارية:**

1- ماهي مولارية 0.75مول من المذاب في 2.5لتر من المذيب؟

Molarity= 0.75 mol / 2.5=0.3 M

2- ماهي المولاريه لـ 40جم من هيدروكسيد الصوديوم NaOH المذابه في 2لتر من المذيب؟

المعلوم: الوزن بالجرام و حجم المحلول النهائي

1- نحول الجرامات إلى مولات. يحسب الوزن الجزيئي للمركب أولاً ثم نحسب المول .

الوزن الجزيئي للماده = 40جم /مول

إذن المول (mol)= عدد الجرامات / الوزن الجزيئي = 40جم / 40جم/مول = 1مول

2- نقسم عدد المولات / عدد اللترات.

المولارية = ½ مول / لتر = 0.5 مولار.

- **3- المولالية Molality (m):**

هي عدد المولات من المذاب في الكيلوجرام الواحد من المذيب.

المولالية = عدد مولات المادة المذابة/ كتلة المذيب بالكيلوجرام.

الوحده=مول/ كجم

مثال: 1 مولال (1m) من محلول كلوريد الصوديوم NaCl يحتوي 1 مول من NaCl في الكيلوجرام الواحد من الماء.

أي الوزن بالجرام = المول × الوزن الجزيئي= 1× 58.44 = 58.44 جم

يضاف إلى 1000 مل من الماء المقطر DDW.

أهم الطرق للتعبير عن تركيز المحلول، وتُستخدم عادة للأحماض Acids والقواعد Bases .

للربط بين كمية المذاب إلى الحجم الكلي للمحلول.

النورمالية N= عدد المكافآت الجرامية n / حجم المحلول باللتر.

فالمحلول الذي يبلغ تركيزه 1 عياري يعني أنّ كل واحد لتر من المحلول يحوي مكافيء جرامي واحد من المذاب

حيث n= للأحماض = عدد أيونات الهيدروجين H^+ في الصيغة البنائية للحمض.

أما للقواعد n= عدد أيونات الهيدروكسيل OH^- في الصيغة البنائية للقاعدة.

هناك علاقة بين النورمالية (المعياريه) والمولالية والمولارية

النورمالية= المولارية × n

مثال: 3 مولار من H_2SO4 هو نفسه محلول 6معياري من الحمض نفسه.

مثال: محلول 1 مولار من $Ca(OH)_2$ هو نفسه 2 معياري من القاعدة نفسها.

- أمثلة الجرام المكافيء (e.q)أو n:
- مثال على العيارية:

لتحضير محلول 1 عياري من هيدروكسيد الكالسيوم $Ca(OH)_2$.

المعلوم: الوزن الجزيئي = 74.09 وقيمة العيارية = 1 عياري

بالتعويض في : المعيارية = المولارية × n

المولارية = المعيارية/ n= ½ مول /لتر

الوزن بالجرام = المول × الوزن الجزيئي = ½ × 74.09 = 37.05 جم / لتر.

هكذا يضاف ½ مول الى لتر المذيب للحصول على 1 عياري من هيدروكسيد الكالسيوم $Ca(OH)_2$

يحضر المحلول الأساسي عادة ويجب تخفيفه للحصول على التركيز النهائي المطلوب للعمل.

<u>تعريف:</u>هو المحلول المركز (له تركيز عالي) الذي يتم تخفيفه عادة إلى تركيزات أقل للحصول على محلول العمل الذي يتم استخدامه في الاختبارات.

- يرمز لها عادة بـ nX وn= 3،2،1،...
- مثل: 5X يماثل خمس مرات من قوة تركيز محلول العمل؛ ويخفف بنقل 1 جزء من المحلول المخزن إلى 5 أجزاء من المحلول النهائي.
- مثال: يخلط 100 مل من محلول مخزن 5X و 400مل من ماء مزدوج التقطير (DDW) Double Distilled Water. يعطي محلول 1X.

ماهو محلول 10X solution؟

هو محلول مخزن بتركيز 10مرات أعلى من محلول العمل.

لعمل محلول 1X من محلول مخزن 10X، يتم التخفيف لعشر مرات 10-fold dilution.

مثال: محلول 1X (TE) Tris-EDTA (Ethylene-diamine tetra-acetic acid)من محلول مخزن 10X TE يساوي 100مل من الأخير يخفف في حجم نهائي 1لترمن الماء.

- **العمليات الحسابية التي تتم على المحلول الأساس Stock Solution**

تصف المعادلة التالية المحددات المختلفة:

C1*V1 = C2*V2

$$\frac{C2}{C1} = \frac{V1}{V2}$$

حيث:

C1: تركيز المحلول الأساسي (قبل التخفيف) مولار

V1: حجم المحلول الأساسي بالملل

C2: تركيز المحلول النهائي (بعد التخفيف) مولار

V2: حجم المحلول النهائي بالملل

عادة يكون حجم المحلول الأساسي V1 (المطلوب للوصول إلى تركيز نهائي محدد بإضافة الماء DDW) هو المجهول لذلك نعوض بالمعادلة التالية:

$$V1 = \frac{C2 * V2}{C1}$$

V1= [V2 X C2]/C1

تحضير التخفيفات من المحلول الأساس
:Making Dilutions from Stock solution

إذا كان لديك محلول سكروز،وكان المذيب هو الماء .

بحجم V1 وتركيز C1

فإن كمية السكروز(الكتلة) = الحجم * التركيز= V1*C1

مثلا: الحجم 0.2 لتر والتركيز (50%)50 جم /لتر

V1*C1= 0.2 لتر* 50جم/لتر = 10جم من السكروز.

إذا أردنا تخفيف هذا المحلول إلى تركيز أقل بإضافة كمية أكبر من الماء وبالتالي الوصول إلى حجم أكبر من المحلول V2، فما هي كمية السكروز الموجودة في المحلول؟

C2*V1=C1*V2

C1*V2/V1 =C2

C2= 10/2 = 5% (جم/لتر)

- عند تحضير المحاليل لا بد من توحيد الوحدة المستخدمه لكل من :الحجم والوزن والتركيز في نفس المعادلة.
- مثال: من الخطأ كتابة المعادلة في الصورة التاليه:

V1(160مل)* C1(160ملجم/لتر)= V1(المجهول)*C2(المطلوب 3جم/لتر))

الصورة الصحيحة:

V1(160مل)* C1(160ملجم/مل× 1000)= V1(المجهول)*C2(المطلوب 3جم× 1000/لتر× 1000))

توحيد وحدات الحجم والوزن والتركيز في المحاليل

- **المحاليل والتخفيفات**
  Solutions and Dilutions
- ماهو الفرق بين المحلولين كل منهما 1% (حجم/حجم) (v/v) و (وزن/حجم) (w/v)؟
- المحلول الأول (حجم/حجم) 1% : أي ان نسبة المادة الكيميائية السائلة هي 1% من حجم المحلول الكلي.
- مثال: محلول الجليسرول 1% سيحتوي 1 مل من الجليسرول في حجم نهائي 100مل.
- المحلول الثاني (وزن/حجم) 1%: أي أن المادة الكيميائية تكون في صورة صلبة حيث يعني محلول 1% منها ؛إضافة ا جم من المادة في 100مل.
- مثال:محلول Sodium Dodecyl Sulphate(SDS) 1% سيتكون من 1 جم من SDS في حجم نهائي 100 مل.
- **«أسئــــلة»**
- ماهو الميكرولتر Microliter؟

يرمز له (ul) ويماثل 1/1000000 لتر أو 1/1000 مل.

لديك 200 ul من محلول عينة الحمض النووي DNA ومحلول 3 مولار من محلول أسيتات الصوديوم NaOAc وترغبين في تحضير محلول من الحمض النووي DNA إلى 0.3 مولار من NaOAc لكن بإضافة العينة إلى الأخير سيتأثر الحجم الكلي للمحلول.

X هو كمية محلول أسيتات الصوديوم اللازم إضافتها= d[V1 + X]

d= عامل التخفيف (مثلا التحويل من 3مولار إلى 0.3 مولار فالتخفيف هو 10/1).

V= الحجم الابتدائي للمحلول.

X= كمية المحلول المركز التي سيتم إضافتها.

- **«أسـئلــة»**
- نسبة المحلول Percent solution:

قد يتكون المحلول من نسبة (وزن/وزن) أو نسبة (وزن/حجم).

المحلول النسبي إما أن يتكون من «x» عدد الجرامات من المركب في 100 جرام من المذاب solute؛ أو «x»عدد جرامات المركب في 100 مل من المذاب، على التوالي.

Specific Gravity = wt/vol

- **«أسـئلة الواجب»**

أجيبي عن السؤال التالي:

- **محلول مائي من كرومات البوتاسيوم $K_2Cr_2O_7$ تركيزه 0.25 مولار.**
- **احسب الحجم اللازم أخذه من المحلول المركز للحصول على 250 ملل من المحلول ذو تركيز 0.01 مولار ؟؟**
- **«اسئلة الواجب»**
- احسبي كمية [Tris [Tris(Hydroxymethyl)Aminomethane المطلوبة لتحضير 500مل من 1مولار من المحلول المخزن. علماً بأن الوزن الجزيئي= 121.14 (amu).
- احسبي كمية (EDTA (Ethylene-diamine tetra-acetic acid المطلوبة لتحضير 500مل من محلول مخزن 0.5مولار. وزن الصيغة البنائية FW= 372.2
- ملاحظة: عادة تضاف الـ EDTA إلى الماء مزدوج التقطير ويضبط الـ pH عند 8 عادة باستخدام هيدروكسيد الصوديوم NaOH pellets 10جم ثم ترشح وتعقم بالأوتوكلاف.
- **«أمثلــه»**
- احسبي كمية b-mercaptophenol المطلوبة في 15مل من محلول الاستخلاص للحصول على تركيز 10mM .

تتوفر هذا الماده في صورة صلبة بتركيز 98% (وزن/وزن).

FW= 78.13.

- احسبي الحجم الكلي للمحلول المطلوب للوصول إلى محلول بتركيز 80% من 100مل من تركيز 95% من الإيثانول ETOH .

- لديك 300 ulمن الحمض النووي DNA في محلول منظم TE Buffer. ترغبين في إضافة ملح إليه ليترسب وينفصل عن الشوائب ولديك محلول 3مولار من أسيتات الصوديوم. عليك أن تحصلي على محلول 0.3مولار من الأسيتات مع الحمض النووي.

7 معمل تحضير المحاليل BUFFERS PREPARATION

المحلول المنظمBuffers	المواد المكونه	التركيز	الوزن (جم)	الحجم (مل)
ALS-I	Glucose	0.05 M	0.9 gm	-
	TrisHCl (M.W.=121.14 g/mol)	1 M	……………	2.5 ml
	EDTA (M.W.= 374.24g/mol)	0.5 M	……………	2 ml
	Add to 100 ml using DDW			
ALS-II	NaOH (M.W= 39.99711 g/mol)	0.2 M	0.8 gm	-
	SDS (M.W= 288.372 g/mol)	1%	…………….	
	Add to 100 ml using DDW			
ALS-III	Potassium acetate (M.W= 98.14232 g/mol.)	3 M	29.5 gm	-
	Glacial acetic acid	11.5%	……………	11.5 ml
	Add to 100 ml using DDW			
TER	TrisHCl (M.W= 121.14 g/mol)	1 M	………….	10 ul
	EDTA (M.W= 374.24g/mol)	0.5 M	………….	2 ul
	RNase A (M.W=)	0.2lml	………….	2 ul
	To 1 ml using DDW			
CTAB Buffer	CTAB (M.W= 364.46 g/mol)		2 gm	-
	Tris (M.W= 121.14 g/mol)	1 M	…………….	10 ml
	EDTA	0.5 M	……………	4 ml

	(M.W= 374.24g/mol)			
	NaCl (M.W= 58.44277 g/mol)	5 M	……………	28 ml
	PVP	-	1 gm	-
	HCl	pH=5	-	-
	Make up to 100 ml using DDW			
TBE Buffer 5X	Tris Base (M.W= 121.14 g/mol)		54 gm	-
	Boric acid (M.W= 61.83302 g/mol)		27.5 gm	-
	EDTA (M.W= 374.24g/mol)	0.5 M	…………….	20 ml
	Make up to 1 L DDW			
Agarose gel	Agarose	-	1 gm	
	TBE	1X	-	100 ml

8 تجربة عـــزل البـــلازميـــــــــد PLASMID DNA FROM *ESCHERICHIA COLI* EXPERIMENT: PLASMID ISOLATION EXTRACTION OF BACTERIAL

1- يتم عن طريق البلازميد وهو كروموسوم (حمض نووي DNA) خارجي يتواجد في معظم الخلايا البكتيرية وبعض الخمائر.

*معظم البلازميدات Plasmids حلقية الشكل circular وتختلف في الحجم والعدد داخل الخلية الواحدة.

2- يتم تطويعها modified لاستخدمها كنواقل vectors للحمض النووي المعاد تكوينه recombinant DNA (rDNA) الهام في تطبيقات الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية.

3- إن عملية تغيير الطراز الجيني genotype للخلايا أو الكائن الحي بنقل حمض نووي غريب foreign DNA تسمى بالتحول الوراثي Transformation.

4- الحمض النووي المنقول قد يظل داخل الخلية كعنصر خارج الكروموسوم extra-chromosomal elements أو يتداخل مع الجينوم الخلوي Integrated .

الهدف
:Aim

عزل الحمض النووي منقوص الأكسجين البلازميدي plasmid DNA من خلايا بكتيريا القولون. يحتوي هذا البلازميد على جين المقاومة للمضاد الحيوي Ampicillin مثل البلازميد pUC 18.

أمثلة على البلازميدات: bacteriophage lambda, pBR322, and pUC19 plasmid DNA

يحتوي البلازميد pUC18 على تتابع لجين Lac Z الذي يشفر إنزيم الجالاكتوسيداز b-galactosidase.

مبدأ العمل
:Principle

1. يتم فصل البلازميد pUC18 من مزرعة نقية لخلايا بكتيريا القولون Escherichia coli بطريقة النحلل الخلوي بالمواد عالية القلوية Alkaline Lysis Method.
2. تعتمد على تعريض معلق الخلايا البكتيرية إلى منظف عالي القطبية في وسط عالي القلوية مما يساعد على تحلل الجدار الخلوي وتشويه الحمض النووي الكرموسومي DNA والبروتينات المختلفة بينما ينطلق البلازميد سابحاً في الرائق supernatant.
3. بالرغم من تعرض الحمض النووي الكروموسومي للتشوه denature نتيجة لوجود المحلول القلوي لا تتمكن البلازميدات الحلقية من الانفصال عن بعضها لأنها متداخلة ومتطابقة في الشكل.
4. خلال عملية التحلل، يبقى كل من الحمض النووي الكروموسومي المشوه والبروتينات البكتيرية وبقايا الجدار الخلوي مشتركة في معقدات كبيرة مغلفة داخل المادة المنظفة من SDS. يتم ترسيب هذه المركبات جيداً عند استبدال أيونات البوتاسيوم بأيونات الصوديوم

في محلول ترسيب البروتينات. بعد التخلص من المواد المشوهة بالترسيب والطرد المركزي يمكن ترسيب الحمض النووي البلازميدي plasmid DNA النقي من الرائق.

5. يمكن استخدام طريقة المحلول القلوي بكفاء عند فصل البلازميد منكل سلالات بكتيريا القولون او حجم من المزرعة يتراوح بين 1 مل حتى 500 مل. حيث يكون البلازميد المفصول بهذه الطريقة خالي من الحمض النووي الكروموسومي.

الأدوات Material & Reagents:

مزارع نقية من Lauria Bertani لبكتيريا القولون.
أنابيب طرد مركزي سعة 1.5 مل
أنابيب مرق LB بها 100 ملجم/مل من المضاد الحيوي البنسلين Ampicillin.

المحلول الأول Solution I
50mM Glucose
25mM Tris HCl
10mM EDTA

المحلول الثاني Solution II
1% SDS
0.2 N NaOH (pH 12.0)

المحلول الثالث Solution III
3M Sodium Acetate (pH 5.0)

المحلول المنظم TE Buffer
10mM Tris-HCl
10 mM EDTA

RNase (1mg/ml)

Phenol: Cholorophorm: Isoamyl alcohol (25:24:1)

Absolute Ethanol
70% Ethanol
1% agarose gel & an electrophoresis apparatus

طريقة العمل Procedure:

1- يلقح ملىء عقدة من مزرعة حديثة لبكتيريا القولون في حجم 5 مل من مرق LB يحتوي على 100 ملجم/مل من المضاد الحيوي أمبسيللين Ampicillin وتحضن عند 37 م في حضان الهزاز لمدة 16 ساعه.
2- ثم ينقل 1.5 مل من المزرعة إلى أنبوبة طرد مركزي ويطرد لمدة 5 دقائق بسرعة 6000 لفة / دقيقة عند 4م ثم يزال الرائق.
3- يضاف إلى الراسب 100 ميكرولتر من المحلول الأول وتعلق به الخلايا باستخدام جهاز الرج vortex.
4- يضاف 200 ميكرولتر من المحلول الثاني المحضر حديثاً ويخلط بالتقليب ثم يحضن في حمام ثلجي لمدة 3 دقائق. يستدل على التحلل الكامل للخلايا بظهور محلول لزج ورائق من البلازميد الموجود في الرائق.
5- يضاف 150 ميكرولتر من المحلول الثالث المبرد بالحمام الثلجي ويحضن الأنبوب في الحمام الثلجي لمدة 5 دقائق.
6- يرسب المركب المعقد بالطرد المركزي بسرعة 15,000 لفة/دقيقة لمدة 5 دقائق عند 4م. ثم ينقل الرائق (الذي يحتوي على البلازميدات) بحذر إلى أنبوبة ابندروف معقمة اخرى.
7- يضاف للرائق حجم مماثل من كحول الأيزوبربانول ثم يخلط ويرسب بسرعة 15.000 لفة/دقيقة لمدة 10 دقائق عند 4 م.
8- يغسل الراسب بمقدار 1 مل من كحول الإيثانول 70% بالطرد المركزي ثم تجفف الراسب ويذاب في 50 ميكرولتر من المحلول المنظم TE Buffer.
9- يضاف 10 ميكرولتر من انزيم RNase ويحضن في حمام مائي عند 37 م لمدة ساعة.
10- ثم ينقى باستخدام خليط الكلوروفورم والفينول كالتالي:
   a. يخلط محلول الحمض النووي مع حجم مماثل من الكلوروفورم والفينول ثم يطرد بسرعة 10.000 لفة/دقيقة لمدة 5 دقائق.
   b. تنقل الطبقة العليا إلى أنبوبة معقمة ويضاف حجم مماثل من الكلوروفورم ويطرد بسرعة 10.000 لفة/دقيقة لمدة 5 دقائق.
   c. ينقل الطبقة العليا إلى أنبوبة معقمة وتخلط مع 10/1 من محلول اسيتات الصوديوم 3M NaOAc و 2.5 مل من الإيثانول. وتترك لتترسب لمدة ساعة في درجة حرارة -20 م .
   d. تطرد العينة بسرعة 10.000 لفة/دقيقة لمدة 10 دقائق.
   e. يضاف 1 مل من الإيثانول 70% إلى الراسب ثم يرج بالـ vortex ويطرد بسرعة 10.000 لفة/دقيقة لمدة 5 دقائق.
   f. يترك الراسب ليجف في الهواء ثم يعاد إذابة البلازميد في حجم ملائم (40 ميكرولتر) من المحول المنظم TE Buffer.
11- يتم فصل 5 ميكرولتر من الحمض النووي البلازميدي في 1% من جل الأجاروز ويفصل بجهار الفصل الكهربي وتفحص القطع تحت الأشعة فوق البنفسجية ويحدد الوزن الجزيئي بالمقارنة مع DNA marker.
12- يحتفظ بالعينات المتبقية في درجة حرارة -20 م للإستخدام في التجارب التالية.

ثانياً: تجربة تحضير الخلايا القابلة لاستقبال البلازميد

Experiment: PREPARATION OF COMPETENT CELLS

الهدف
:Aim

تحضير الخلايا المستقبلة*[i] TOP 10 Competent cells بطريقة كلوريد الكالسيوم Calcium chloride.

المبدأ
:Principle

بالرغم من إمكانية حدوث التحول الوراثي طبيعياً إلا أن خلايا بكتيريا القولون يجب معالجتها كيميائياً للتحول إلى خلايا قابلة لاستقبال الحمض النووي الغريب.
تعرف الخلايا المستقبلة Competent بقابلية الخلية لاستقبال حمض نووي خارجي من الوسط الذي تنمو فيه هذه الخلية. يمكن حث هذه القابلية صناعياً بمعالجة الخلايا بمحلول من كلوريد الكالسيوم قبل إضافة الحمض النووي DNA للوسط.
يقلل الكالسيوم من ثبات الغشاء الخلوي ويلتصق بسطح الجدار الخلوي مما يكون ثقوب تسمح بدخول الحمض النووي الغريب foreign DNA.
تتم بزرع خلايا في مرحلة الطور اللوغاريتمي وتعريضها لكلوريد الكالسيوم في الحمام الثلجي.

الأدوات
:Materials

1- أطباق مزارع نقية من LB[ii] حديثة لبكتيريا القولون TOP 10 cells.
2- مرق وأطباق من بيئةLB.
3- محلول $0.1\ M\ CaCl_2$.
4- أنابيب ابندورف (سعة 1.5 مل).
5- جهاز تحليل الطيف الضوئي Spectrophotometer.

طريقة العمل
:Procedure

1- يُلقح مقدار 2 مل من مرق LB بمستعمرة مفردة من خلايا TOP10 Cells وتحضن عند 37 م لمدة 12- 18 ساعه في حضان هزاز بسرعة 150 -200 لفة/دقيقة.
2- يُنقل 0.4 مل من المزرعة الحديثة السابقةلتلقيح 40 مل من مرق LB (التخفيف 1:50) وتحضن عند 37 م في حضان هزاز بسرعة 150 -200 لفة /دقيقة حتى نصل إلى تركيز من الخلايا ($3\text{-}5\times10^8$

خلية/مل) يعادل قراءة 0.4 to 0.5 O.D. عند طول موجي 600 نانومتر (نحتاج إلى60 -90 دقيقة وتزيد إذا لم تكن الخلايا الملقح بها حديثة العمر لمرورها بمرحلة السكون).

3- ينقل مقدار 1.5 مل من المزرعة إلى أنبوبة طرد مركزي وترسب الخلايا بالطرد المركزي بسرعة 6000 لفة/دقيقة لمدة 5 دقائق عند 4م.
4- نتخلص من الرائق ويعلق الراسب في 1 مل من محلول كلوريد الكالسيوم المبرد 0.1 M $CaCl_2$ وتحضن في حمام ثلجي لمدة 30 دقيقة.
5- ثم ترسب الخلايا مرة أخرى بالطرد بسرعة 6000 لفة/دقيقة لمدة 5 دقائق عند 4م.
6- نتخلص من الرائق ويُذاب الراسب في 120 ميكرولتر من محلول كلوريد الكالسيوم المبرد 0.1 M $CaCl_2$ و 80 ميكرولتر من الجليسرول 50%
7- للتأكد من حيوية الخلايا في المعلق السابق يتم تخطيط ملىء عقدة على أطباق من بيئة LB وتحضن لمدة 18-24 ساعه عند 37 م.
8- يتم نقل وحفظ المعلق الخلوي المتبقي مباشرة في درجة حرارة -80 م للإستخدام في التجارب التالية حيث توزع على أنابيب معقمة بمقدار 200 ميكرولتر.
9- يمكن مضاعفة الاحجام للحصول على تركيز اكبر من الخلايا القابلة لاستقبال الحمض النووي ولكن يجب التنبه إلى استخدام انابيب او دوراق لها سطح معرض للهواء بشكل أكبر لضمان حيوية الخلايا.

ثالثاً: تجربـــة : التحـــــــــــول الوراثـــــــــــي
EXPERIMENT: TRANSFORMATION

الجنس وانتقال الصفات الوراثية في البكتريا

قبل عملية انقسام النهائي للخلية البكتيرية يتضاعف كروموسوم الخلية إلى نسختين متماثلتين ويذهب كل كروموسوم الى خلية بنوية جديدة ويختلف حجم هذا الكروموسوم حسب نوع الخلية البكتيرية حيث تمتلك بكتريا *Escherichia coli* كروموسوما له القدرة على تخليق 4000 مركب تقريبا إضافة الى الكر وموسوم فان بعض انواع البكتريا تمتلك اجزاء حلقية منفصلة من الحامض النووي DNA تستطيع تكرار نفسها بصورة منفصلة من الكر وموسوم وهي ليس لها اي دور في تضاعف وتكاثر البكتريا الاانها تكسب البكتريا صفات هامة كالمقاومة للمضادات الحيوية وإكساب البكتريا القدرة على تكوين الاسواط ولاوبار .

انتقال المادة الوراثية من خلية بكتيرية الى خلية اخرى

1- ظاهرة التحويل transformation : انتقال حامض نووي يمتلك صفات وراثية الى خلية اخرى محدثا تغيرات وراثية في الخلية الجديدة. فينشأ عن ذلك تغيير الطراز الجيني للخلية أو الكائن الحي بنقل حمض نووي غريب Foreign DNA.
2- ظاهرة التوصيل transduction : تشبه سابقتها غير انها تحصل بواسطة عامل مساعد قد يكون فيروسا
3- ظاهرة الاقتران conjugation: وفيها تلتصق خليتان بكتيريتان مع بعضهما وتنتقل المادة الوراثية وذلك بمساعدة بلازميدات خاصة

الهدف
:Aim

تحويل (تعديل او تغيير) المادة الوراثية في الخلايا المستقبلة Competent cell مثل المحضرة مسبقاً (او TOP 10 cells) مع البلازميد المفصول ligated product of extracted plasmid (pUC18-λDNA ligated product).

المبدأ
:Principle

الحمض النووي DNA المنقول قد يظل منفصلاً عن الحمض النووي DNA الكروموسوم extra-chromosomal elements للبكتيريا المستقبلة competent cell أو يندمج integrated كجزء داخل الجينوم.
في هذه التجربة، سوف يتحول الطراز الجيني للبكتيريا الحساسة للمضاد الحيوي الأمبسلين (*E.coli* strain TOP10) إلى طراز جيني مقاوم للأمبسلين عن طريق نقل البلازميد الحامل لجين صفة المقاومة للمضاد الحيوي الأمبسلين (pUC18 plasmid). يتم انتخاب الخلايا البكتيرية التي يجري عليها التحويل الوراثي بزرع الخلايا على بيئة انتقائية selective تحتوي على المضاد الحيوي البنسلين.
النواقل من نوع البلازميد pUC18 بها قطعة قصيرة من الحمض النووي DNA الخاص ببكتيريا القولون *E. coli* ، تحتوي على التتابع المشفر والمنظم لجين Lac Z الذي يشفر انزيم β-galactosidase.
كما تُستخدم مادة Isopropyl thiogalactoside (IPTG) كعامل محفز للتعبير الجيني لهذا الجين.
يتفاعل إنزيم مع مادة التفاعل الصبغية 5-bromo-4-chloro- β-D-Galactoside (X-gal) وتعطي منتج أزرق اللون.
يتشكل موقع للنسخ المتعدد MCS (multiple cloning site) داخل منطقة التشفير للجين Lac Z. تكون هذا الموقع لا يؤدي إلى تعطيل إطار قراءة التعبير الجيني reading frame وينتج عنه مجرد إدخال عدد من الأحماض الأمينية الإضافية في القطعة الطرفية للأحماض الأمينية للإنزيم β-galactosidase.
وبالتالي، تظهر المستعمرات بلون أزرق في وجود مادة التفاعل الصبغية IPTG و X-gal.

عند إدخال جين جديد لمنطقة النسخ المتعدد MCS فيصبح إدخال ضار للخواص الوظيفية للإنزيم -β galactosidase ولا يمكنه التفاعل مع X-gal وهكذا تظهر المستعمرات باللون الأبيض. ويعد هذا التفاعل اللوني البسيط يمكن استخدامه لمسح آلاف المستعمرات لتعريف الخلايا التي انتقل اليها البلازميد أو الحمض النووي الغريب فأصبح الحمض النووي بها معاد تركيبه Recombinant DNA.

الأدوات
:Materials

1- الخلايا المستقبلة (المجهزة في التجربة السابقة Competent TOP10 cells (Cells prepared from EXP 5)
2- الحمض النووي الغريب Forign DNA (البلازميد)
3- وسط غذائي LB
4- أطباق وسط غذائي من نوع LB تحتوي على تركيز 100 ملجم/لتر من الأمبسلين.
5- حمام مائي عند درجة 42 ^{o}م.
6- مادة Isopropyl thiogalactoside (IPTG) معقمة بالترشيح (100 ملم).
7- مادة X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) بتركيز 20 ملجم/مل مذابة في DMSO.

طريقة العمل
:Procedure

1- بعد التأكد من حيوية الخلايا المستقبلة المعدة في المعمل السابق.
2- تنقل الخلايا المستقبلة (TOP10 cells) من درجة حرارة 80 درجة مئوية تحت الصفر (-80 ^{o}م) لتذاب في حمام ثلجي.
3- يخلط حجم 5 ميكرولتر من البلازميد المجزأ والممتد ligated product (ligated pUC18) مع الخلايا المستقبلة ثم يحضن في الحمام الثلجي لمدة 30 دقيقة.
4- ثم يعرض الخليط إلى صدمة حرارية بالتحضين في حمام مائي عند 42 م لمدة 45 ثانية.
5- في ظروف التعقيم، يضاف إلى الخليط السابق 500 ميكرولتر من LB ثم يحضن في الحضان الهزاز عند 37^{o}م لمدة ساعه.
6- في هذه الأثناء، يضاف 40 ميكرولتر من كل من ما دتي IPTG و X-gal وينشر على سطح الأطباق LB AMP المضاف لها مضاد الأمبسلين ثم تترك لتتشرب المحلول.
7- تلقح هذه الأطباق (LB AMP plates containing and IPTG / X-gal) بمقدار 100 ميكرولتر من اللقاح المعد في الخطوة 5، ثم تحضن لمدة 16 ساعه عند 37^{o}م.
8- يلقح 100 ميكرولتر من الخلايا الغير متحولة وراثيا untransformed TOP10 cells على أطباق (LB AMP plates containing and IPTG / X-gal) وتحضن لتصبح كونترول سالب.

Mycoplasma and Rickettsia المايكوبلازما والركتسيا

وهي كائنات وسطا بين البكتريا والفيروسات تمثل حلقة الوصل بين المجموعتين بحيث تتمتع ببعض الصفات المشتركة لهما .

Mycoplasma الميكوبلازما

هي مجموعة من الكائنات تتمتع ببعض الصفات الفيروسات وبعض صفات البكتريا يتراوح قطرها بين 125-150 مليمايكرون وتستطيع النفاذ من المرشحات البكتيرية غير انها تختلف عن الفيروسات بامكانية تنميتها على البيئات الصناعية داخل المختبر, فاقدة للجدار الخلوي لكنها تمتلك غشاء خلوي مرن رقيق شبه منفذ وبالتالي فهي غير ثابتة الشكل .

وتعد من المسببات المرضية الخطرة للانسان والحيوان وتوضع ضمن رتبة منفصلة تسمى Mycoplasmatales

Rickettsia الركتسيا

احدى الكائنت الحية المتناهية الصغر التي تم اكتشافها عام 1909 من قبل العالم Taylor Rickett عند فحصه لدم حشرات القمل المتغذي على جسم انسان مصاب بمرض التيفوس , تقع هذه الكائنات في منطقة الوسط بين الفيروسات والبكتريا فهي تتمتاز ببعض الصفات التركيبية كما البكتريا وتتكاثر بالانشطار البسيط ويمكن صبغها ودراستها بالمجهر الضوئي العادي حيث تاخذ صبغة غرام السالبة وتتخذ اشكالا عدة منها الكروي والعصوي من جهة ومن جهة اخرى فهي تتمتع بصفات الفيروسات من حيث قابليتها على المرور من خلال المرشحات البكتيرية (يبلغ قطرها 0.5 مايكرون) وهي اجبارية التطفل حيث لايمكن تنميتها الاداخل خلايا حية

وتكتسب اهميتها من خلال قدرتها على التطفل على الانسان واحداث العديد من الامراض المعدية الخطيرة التي تنتقل بواسطة بعض انواع الحشرات ومن اهم الامراض التي تسببها الركتسيا للانسان

1- حمى التيفوس 2- حمى الجبال الصخرية 3- حمى الخنادق

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 أخر 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 كشفي عن طراز جيني genotype أو طراز شكلي phenotype معين للسلالة الميكروبية.

التعريف The definition

هي تقنية يتم خلالها تلقيح طبق رئيسي أو أكثر Master plate و عدة أطباق ثانوية secondary plate تحتوي على أوساط غذائية صلبة (الآجار) إنتقائية (قد تفتقر إلى مغذيات ضرورية أو تحتوي على مواد كيميائية مثبطة للنمو مثل المضادات الحيوية) وتلقح جميعا بنفس المستعمرات للسلالة الميكروبية المنقولة من طبق أولي primary plate بطريقة تسمح بنسخ النمط المكاني الأصلي للمستعمرات عليه.

تعتمد التقنية على ضغط قرص مغطى بقماش القطيفة (له قطر 8 سم) ثم تطبع على الأطباق الثانوية بخلايا المستعمرات التي نقلت من الطبق الأصلي.

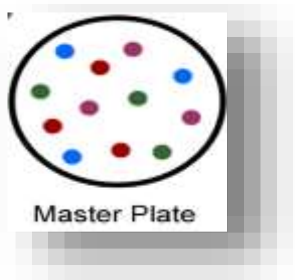
بشكل عام يتم نقل عدد كبير من المستعمرات (حوالي 30-300) يتم تكرار زرعها بالطباعه بسبب صعوبة تخطيط كل منها على حده في طبق منفصل.

الخطوة الأولى First Step

1. إعداد الطبق الرئيسي Master Plate

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

To Allow all bacteria to grow



الخطوة الثانية Second Step

2. إعداد الأطباق الثانوية Secondary plate

هذا الطبق انتقائي يحتوي على الآجار الكامل وينزع منه مادة مغذية تشخيصية واحدة.

حيث يسمح بنمو البكتيريا المستهدفة فقط Targeted bacteria.

Only the targeted bacteria to grow

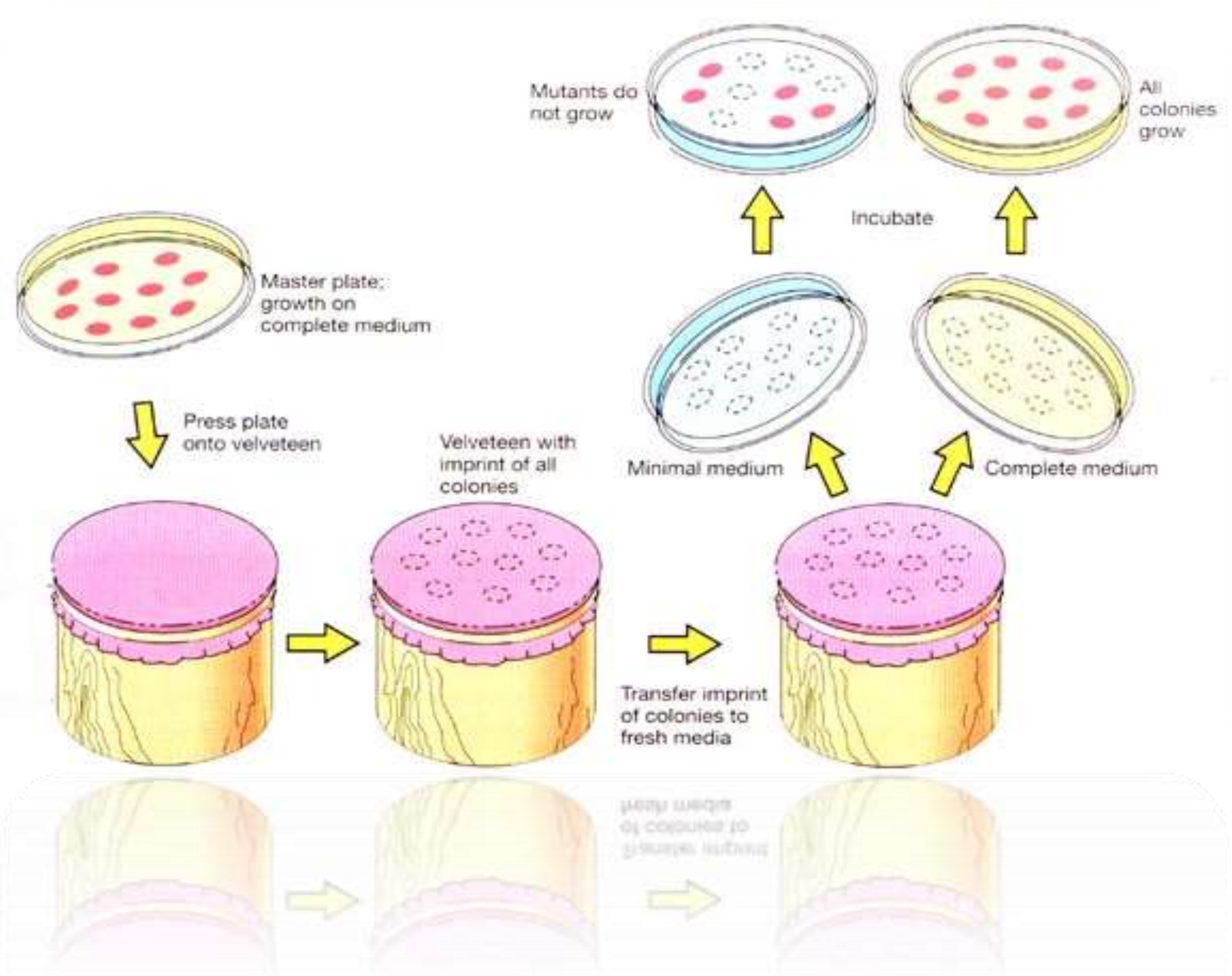
الخطوة الأخيرة Last one

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

طريقة العمل Procedure

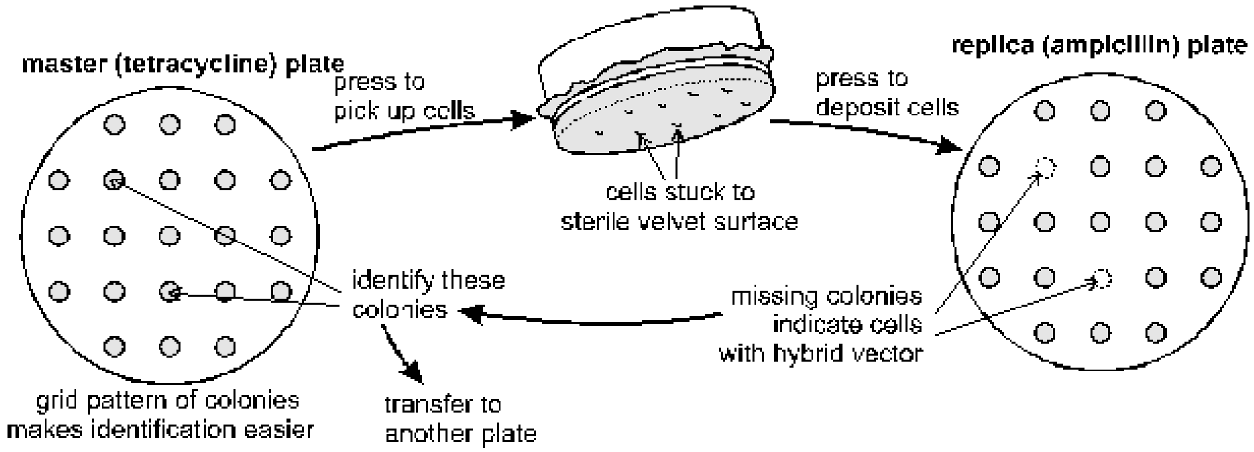
مثال : الكشف عن وجود الطفرات باستخدام وسط انتقائي يحتوي على مادة مثبطة مثل المضاد الحيوي (Ampicillin أمبسلين)

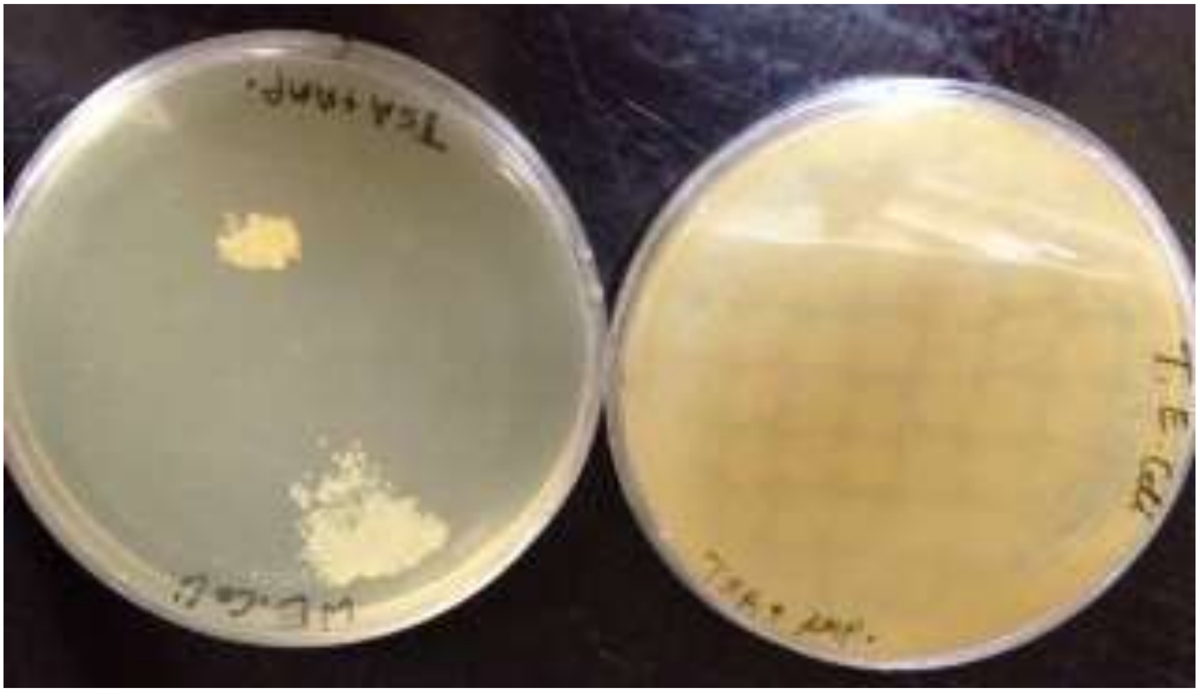
Antibiotic Resistance clones detection by replica plating method



النتائج:

Antibiotic Resistance clones detection by replica plating method





---

[i] للبلازميد pUC18 (المفصول من التجربة السابقة).

[ii] (1% Bacto Tryptone, 0.5% Bacto Yeast Extract, 0.5% NaCl, pH 7.0-7.2).