مضادات حيوية، الأقراص السحرية؟

تجربة: حل لغز بواسطة PCR والفصل الكهربائي الهلامي (אלקטרופוריזה) للطالب

مقدمة

في نهاية القرن التاسع عشر خرجت بعثة لاستكشاف القطب الشمالي. البعثة لم تصل إلى هدفها وبعد ثلاث سنوات لم ينج أي من أعضائها. في سنة 1988 وجدوا جثتي اثنين من أعضاء البعثة.

انضممتم لفرقة من العلماء قرروا أن يبحثوا هل يوجد بين البكتيريا الميتة التي وُجِدت في جثتي عضوي الفرقة يوجد أيضا بكتيريا تحمل جين الصمود أمام دواء المضاد الحيوي امفيتسيلين.

بعد أن تنفذوا كل مراحل التجربة وتلخصوا النتائج تستطيعون أن تحلوا اللغز.

لكي تستطيعوا تنفيذ التجربة عليكم التعرف واستعمال:

- طريقة المضاعفة، عملية انتاج DNA بواسطة جهازPCR .
- طريقة فصل مقاطع DNA وتعيين أطوالها بواسطة الفصل الكهربائي الهلامي.
- سُلّم DNA (DNA Ladder) بسريان مقاطع DNA في جيل أجروز.

أسئلة تحضير للتجربة

أجيبوا عن الأسئلة 1 – 3:

1. أ. اذكروا ما هي المواد المطلوبة لتنفيذ PCR.

ب. سجّلوا المراحل الثلاث لتفاعل PCR وصفوا ماذا يحدث في كل مرحلة.

جـ. صيغوا المبادئ للمقارنة بين عملية انتاج DNA بجهاز ال PCR وبين مضاعفة ال DNA في الخلية. لخصوا في جدول المقارنة بين العمليات.

2. فسّروا المبدأ الذي يمكن حركة مقاطع DNA في الجل في جهاز الفصل الكهربائي الهلامي. استعينوا بالمعلومات من التدريب في استعمال " تمرين الفصل الكهربائي الهلامي".

3. صفوا آليتين تمكّن خلايا البكتيريا الصامدة من البقاء والتكاثر بوجود المضاد الحيوي. (تطرقوا في اجابتكم إلى المصطلحات: جين، زلال، صفة).

خلفية للتجربة

في التجربة ستتعرفون على جهاز PCR الذي بمساعدته يمكن الحصول من كمية قليلة من مقاطع DNA خاصة على عدد كبير من نسخ لهذه القطع. في التجربة ستضاعفون جين الصمود أمام الأمفيتسيلين (amp^R).

خلال التجربة، ستستعملون طريقة الفصل الكهربائي الهلامي (אלקטרופוריזה בג'ל) التي تمكن تعيين وجود مقاطع DNA المشابهة في أطوالها لمقاطع DNA معروف أطوالها.

العوامل الأساسية التي تؤثر على سرعة حركة هذه المقاطع هي طول المقاطع وشحنتها الكهربائية.

مقاطع DNA تتحرك داخل جيل أجروز مغمور في محلول بوفر TAE الموصل للتيار الكهربائي. المقاطع هي ذوات شحنة كهربائية سالبة ولذلك ستتحرك نحو الالكترودا الموجبة. تعيين طول مقاطع ال DNA (بوحدات أزواج قواعد نيتروجينية – bp)يتم عن طريق مقارنتها مع سلم DNA (DNA Ladder)

تحت تصرفكم انبوبتي ابندورف:

- انبوبة مشار إليها +A وفيها بلاسميد **معلوم** أنه يحتوي على جين صمود أمام المضاد الحيوي أمفيتسيلين الذي طوله 700bp.
- انبوبة مشار اليها R وفيها بلاسميد من بكتيريا تم استخلاصه من أجسام أعضاء البعثة، **وغير معلوم** إذا كان فيه الجين الذي يحمل صفة الصمود أمام المضاد الحيوي امفيتسيلين.

الجدول1: التعرف على المواد والأدوات المطلوبة للتجربة

قبل البدء في العمل استعينوا بالقائمة التي في الجدول وافحصوا الأغراض التي تحت تصرفكم.

على طاولة الطلاب	على طاولة المعلم
• ميكروبيبيت 20- 200µL • ميكروبيبيت 2 – 20µL • وعاء فيه تيبات للميكروبيبيت. • قلم للتأشير على الزجاج ذو خط رفيع. • حوض ماء. • 3 أنابيب PCR لها جدران دقيقة + حامل أنابيب مناسب. • انبوبة ابندورف مشار اليها **ماء** وفيها 100µL ماء مرّت بتعقيم وتصفية. • انبوبة ابندورف مشار اليها **A+** وفيها 5µL بلاسميدات. • انبوبة ابندورف مشار اليها **R** وفيها 5µL بلاسميدات. • انبوبة ابندورف وفيها خليط من البرايميرات للجين الذي يكسب صمود أمام الأمفيتسيلين مشار اليها **MIX PRIMER** • انبوبة ابندورف وفيها الانزيم DNA بوليميراز، خليط نيوكلوتيدات في بوفر مشار اليها **MIX TAQ** • انبوبة ابندورف وفيها 12µL سُلّم DNA (DNA Ladder) بلون بنفسجي ومشار اليها سُلّم **DNA Ladder** • وعاء للنفايات البيولوجية.	• جهاز PCR (مرحلة ب) • تابلت (مرحلة ب) • جهاز طرد مركزي صغير (ليس الزاميا). • محلول بوفرTAE (لعملية الفصل الكهربائي مرحلة جـ) • جل أجروز مع لون ل DNA • جهاز الفصل الكهربائي الهلامي (مرحلة جـ)

انتبهوا !!!

طوال كل فترة التجربة يجب حفظ كل أنابيب الابندورف في حوض فيه مكعبات جليد:

التي مع ال DNA (R, A+, DNA Ladder) ، MIX PRIMER ، MIX TAQ والماء.

أخلوا مسطح العمل الذي أمامكم ونظفوه بمساعدة إيثانول 70%.

مراحل العمل مرحلة أ: تحضير أنابيب PCR للتجربة

في هذه المرحة ستدخلون كل المركبات الضرورية لإنتاج كميات كبيرة من مقطع DNA إلى انبوبة تجربة وللمجموعة الضابطة.

أ. سجّلوا على ثلاث أنابيب PCR الأحرف الأولى من أسمائكم.

- على واحدة من الأنابيب سجّلوا أيضًا +A على الثانية -A، وعلى الثالثة –R.

أعيدوا الأنابيب إلى حامل الأنابيب.

مهم جدا! عليكم التسجيل في الطرف العلوي للأنابيب وأيضًا على جوانبها (في حال اختفاء إحدى العلامات).

ب. اقرأوا المعلومات في الجدول 2 وانقلوا بواسطة ميكروبيبيت ملائم وفيه تيب نظيف الكميات المطلوبة من الماء لكل واحدة من أنابيب PCR (R, +A, -A).

انتبهوا: عليكم تبديل التيب بعد كل عملية نقل ماء لكل واحدة من الأنابيب.

- تأكدوا أن كل السائل تحرر من التيب إلى قاع الأنبوبة.
- أغلقوا أنبوبة الابندورف وانقلوا التيب إلى وعاء النفايات.
- في الجدول 2 أشيروا ب √ في سطر الماء.

جـ. بدّلوا التيب وأعيدوا تنفيذ تعليمات بند ب مع خليط MIX TAQ.

د. بدّلوا الميكروبايبيت ونفّذوا التعليمات في البند ب مع الخليط MIX PRIMER.

الجدول 2: تحضيرات مطلوبة لتفاعل PCR

المواد في أنبوبة الابندورف	أنابيب PCR		
	-A (بدون بلاسميدات)	**+A (بلاسميدات فيها جين الصمود امام الأمفيتسيلين (amp^R)**	**R (بلاسميدات من بكتيريا تم عزلها من أجسام أعضاء البعثة)**
ماء	21 µl	19 µl	19 µl
DNA بوليميراز، بوفر ونيوكلؤتيدات(dNTPS)من الأنبوبة المشار اليها ب **MIX TAQ**	25 µl	25 µl	25 µl
خليط برايمرات من الأنبوبة المشار اليها **MIX PRIMER**	4 µl	4 µl	4 µl
محلول وفيه بلاسميدات	**بدون**	**2 µl**	**2 µl**
الحجم الكلي في الأنبوبة	50 µl	50 µl	50 µl

هـ. بدّلوا التيب وانقلوا 1 µl محلول وفيه بلاسميدات من انبوبه **ابندورف مشار اليها +A** لأنبوبه **PCR مشار اليها +A .**

- يجب التأكد ان كل السائل تحرر من التيب الى قاع انبوبه PCR .
- انقلوا التيب الى وعاء النفايات .

و. بدّلوا تيب وانقلوا 2µl محلول فيه بلاسميدات من انبوبة **ابندورف مشار إليها R** إلى أنبوبة **PCR مشار اليها R.**

- يجب التأكد أن كل السائل تحرر من التيب إلى قاع أنبوبة PCR.
- انقلوا التيب إلى وعاء النفايات.

ز. سدّوا انبوبة PCR، سلّموها لعامل المختبر واطلبوا أن يدخلها إلى جهاز قوى طاردة عن المركز مصغّر (מיני צינטרפוגה).

- إذا لم يكن لديكم الجهاز أمسكوا العلوي للأنبوبة بلطف واضربوا بلطف على قاع الانبوبة، هذه العملية تؤدي إلى تجميع السوائل في قاع الأنبوبة.

نقطة مراقبة

افحصوا مع المعلم تقدمكم في مراحل التجربة حتى الآن.

أكملوا التجربة فقط بعد موافقة المعلم.

مرحلة ب: مكاثرة (הגברה) في PCR.

أدخلوا أنابيب PCR الثلاثة في جهاز PCR. سيبرمج المعلم او عامل المختبر الجهاز حسب التفصيل في الجدول 3 ويشغلون الجهاز.

الجدول 3: برمجة جهاز ال PCR

عدد الدورات	درجة الحرارة م	الزمن (ثواني)
1	94	60
20	94	15
	58	15
	68	30
1	68	120

بعد مرور حوالي 40 دقيقة، عندما ينتهي برنامج PCR أخرجوا أنابيبكم من الجهاز وضعوها في حامل مناسب.

انتبهوا !

افحصوا العلامات التي سجلتم على الانابيب. اذا لزم الامر سجلوها ثانية .

المرحلة جـ: التحميل بالجل

تحت تصرفكم جل أجروز فيه 9 ابار. الجل موجود في جهاز الفصل الكهربائي الهلامي ومغمور فيه محلول بوفر(TAE) الموصل للتيار الكهربائي . في هذه المرحلة ستحملون في الجل عينة من سائل من كل واحد من الانابيب الثلاثة (R, A-,A+).

للتذكير, تدربتم في تحميل محاليل لجهاز الفصل الكهربائي الهلامي في تمرين استعمال الفصل الكهربائي الهلامي.

لكي نستطيع التعرف على ال DNA في الجيل تلزم كميات كبيرة من DNA ومادة تصبغه تُسمّى SMART GLOW. أضاف عامل المختبر هذه المادة أثناء تحضير الجل وقد ارتبط بين جديلتي ال DNA

نلفت انتباهكم:

في البنود ي ب – ي د يحمل طلاب من مجموعتين يحمّلوا في جيل واحد.

احدكم يحمل في الجيل وينفذ المراحل ط – ي أ (تحميل DNA LADDER 10 µl) .

باقي الطلاب سيبدؤون بالعمل من البنود ي د: طلاب من احدى المجموعات يحمّلوا في الابار 2-4 . والطلاب من المجموعة الأخرى يحملوا في الابار 6-8.

ط. اضبطوا الميكروبيبيت ملائم لحجم 10µl وضعوا تيب ملائم.

صورة 3: طريقة مسك الميكروبيبيت أثناء تحميل الآبار بمحلول الأصباغ.

ي. شغلوا مصباح التحميل في جهاز الفصل الكهربائي الهلامي.

ي أ. بواسطة الميكروبيبيت امتصوا DNA LADDER 10µl (موجود على طاولة المعلم)

- أمسكوا الميكروبيبيت فوق البئر "1" (الأولى من اليسار)

- ادخلوا التيب الى البئر بلطف وفرغوا السائل الى داخل البئر. انقلوا التيب الى وعاء النفايات.

ي ب. بواسطة الميكروبيبيت انقلوا 10µl من انبوبة PCR المشار اليها -A, نفذوا ذلك كالتالي:

- امسكوا الميكروبيبيت فوق البئر "2" (الثانية من اليسار)

- ادخلوا التيب الى البئر بلطف وفرغوا السائل الى داخل البئر. انقلوا التيب الى وعاء النفايات.

ي ج. أعيدوا تنفيذ تعليمات بند ي ب مع انبوبة PCR المشار اليها +A وفرغوا السائل في البئر "3".

ي د. أعيدوا تنفيذ تعليمات بند ي ب مع انبوبة PCR المشار اليها R وفرغوا السائل في البئر "4".

ط و. أكملوا المعلومات الناقصة في الجدول 4 الخاصة بالآبار 4,3,2.

جدول 4 – الترتيب الذي تمّ به تحميل العينات من انابيب PCR

البئر	8	7	6	5	4	3	2	1
نوع السائل المحمّل				-----				DNA Ladder

انتبهوا

أعيدوا تنفيذ تعليمات البنود ي ب – ط و , لكن حمّلوا الابار 6,7,8 بدلا من الابار 2,3,4.

ط ز - في نهاية التحميل أطفئوا مصباح الشحن غطوا جهاز الحبل بغطاء البلاستيك البرتقالي . وبعد أن أخذتم موافقة المعلم شغلوا الجهاز بواسطة الضغط على زر التشغيل.

يمنع فتح علبة الجهاز مادام الجهاز يعمل ويمر به تيار كهربائي

مصباح مشاهدة النتائج يمكن تشغيله لفترة قصيرة فقط

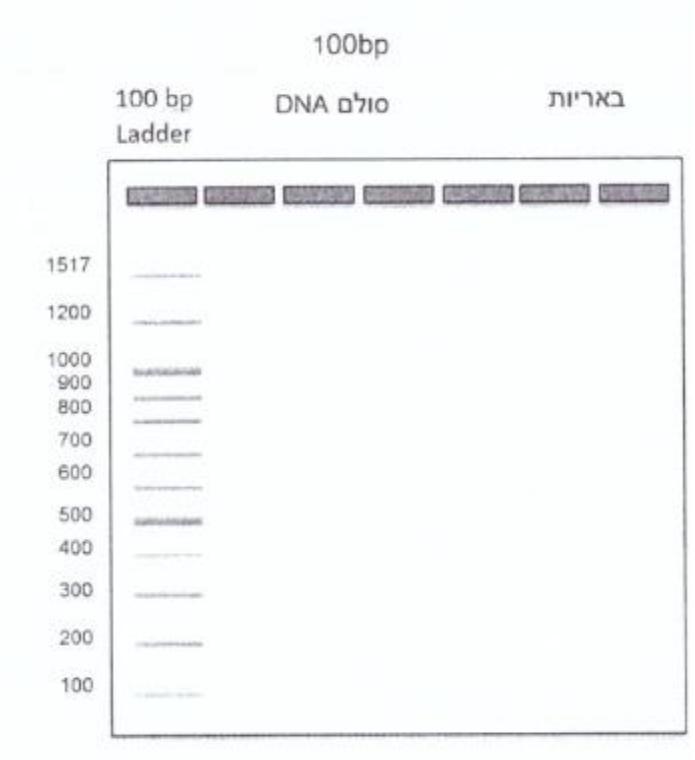
ي ز- بعد أن اشتغل الجهاز لمدة 10 دقائق نادوا المعلم واعملوا حسب تعليماته.

ي ح- في نهاية تسيير العينات في الجيل اضغطوا على زر إطفاء الجهاز. افصلوا الجهاز من الكهرباء وافحصوا نتائجكم.

صوروا الجل وارسموا النتائج التي حصلتم عليها في الجدول المصور في صفحة تجميع النتائج.

صفحة جمع النتائج

تعليمات: بعد تنفيذ التجربة في كل مراحلها ضعوا علامة النتائج التي حصلتم عليها في الجيل



الكترودا سالبة -

الكترودا موجبة +

تحليل نتائج التجربة

اعتمدوا على النتائج التي حصلتم عليها في الجل واجيبوا عن الأسئلة

1. أ- ماذا تمثل الخطوط التي تظهر على ظهر الجبل؟

   ب- لماذا من المهم شمل الانبوبة -A في التجربة؟

   هل توقعتم رؤية خط في العامود -A ؟ فسروا اجابتكم.

   جـ- لماذا من المهم شمل الأنبوبة +A في التجربة؟

   هل توقعتم رؤية خط في العامود +A ؟ فسروا اجابتكم.

   د- أي جين تمّت مكاثرته (زيادة انتاجه) في ال PCR ؟

2. هل يتغير تفسير نتائج التجربة اذا تم الحصول على خط DNA في العامود -A ؟
3. هل يتغير تفسير نتائج التجربة اذا لم نر خط في العامود +A ؟
4. اعتمدوا على كل نتائج التجربة وحدّدوا هل البكتيريا في جسم أعضاء البعثة تحتوي على جين مقاومة أمام الأمفتسلين . علّلوا اجابتكم.
5. في التسيير في الجل لعينات DNA من بكتيريا كانت في جثث أعضاء البعثة، وجد قليل من بكتيريا تحمل الجين amp^R . اقترحوا تفسيرا ممكنا لهذا الاكتشاف مع الأخذ بعين الاعتبار ان أعضاء البعثة خرجوا في رحلة بحثهم قبل البدء باستعمال المضادات الحيوية في الطب.

لمعلوماتكم

قائمة المصطلحات الأساسية وتفسيرها لكل واحدة من المواد لتساعدكم خلال التجربة

أ. قالب DNA

مقطع DNA الذي نريد مضاعفته وتربط بهذا المقطع البرايميرات

ب. خليط نيوكلوتيدات dNTPS

خليط من أربع نيوكلوتيدات تستعمل لبناء جدائل ال DNA المكمل.

جـ. DNA بوليميراز (TAQ).

DNA بوليميراز (TAQ)، هو إنزيم يحفز مضاعفة ال DNA الذي مصدره من البكتيريا التي تعيش في المجمعات المائية الحارة، والذي ليس كباقي الإنزيمات، يتوقف نشاطه في درجات حرارة عالية، إنما درجة الحرارة المثلى لهذا ال DNA بوليميراز هي في المجال 70 - 80 م. هذه الصفة تمكنه من العمل بنجاعة أيضا في درجات حرارة عالية كما هو الحال في جهاز PCR.

د. برايميرات (بوادئ)F و R.

برايمر (بادئ) هو مقطع قصير من DNA (20 نيوكلوتيد) يساعد في عملية مضاعفة DNA في الأنبوبة.

تسلسل القواعد النيتروجينية في البرايمر يلائم تسلس قصير موجود في بداية الجين الذي نريد مضاعفته (الطرف 3). برايمر آخر يلائم تسلسل قواعد نيتروجينية موجود فينهاية هذا الجين (طرف 5).

لكل أنبوبة PCR يتم اضافة خليط من برايمرين تمّ اعدادهما خصيصاً لمضاعفة جين amp^R .

البرايمر الذي يلتصق بالطرف 3 يسمى برايمر أمامي (-F).

البرايمر الذي يلتصق بالطرف 5 يُسمّى برايمر خلفي (-R).

البرايمر يُستعمل كموقع لبدء المضاعفة.

الإنزيم DNA بوليميراز (TAQ) يبدأ المضاعفة في مكان ارتباط البرايمر بجديلة ال DNA، وينتج عن عمله قالب DNA.

في أنبوبة PCR (انظروا بند "و" – مرحلة أولى) بتأأثير درجة الحرارة العالية، الأربطة بين جديلتي قالب ال DNA تتفكك والبرايمرات تلتصق بأطراف جدائل DNA بالتلاؤم (الأمامي بالطرف 3 والخلفي بالطرف 5).

فقط بعد التصاق البرايمرات، ينشط الإنزيم الموجود في الخليط والذي يضاعف ال DNA حيث ينشط ربط نيوكلوتيد ملائم. (A مقابل T و G مقابل C).

هكذا تتكون جديلة جديدة مكملة للجديلة الأصلية، وفي نهاية العملية يتكون جزيء ال DNA المطلوب قالب DNA الذي هو **قالب DNA**.

هـ. جهاز PCR

دورة PCR وحيدة تشمل ثلاث مراحل:

مرحلة أولى هي **مرحلة الفصل (דנטורציה)** والتي تتم في درجة حرارة 94 م، درجة الحرارة المرتفعة تؤدي إلى فصل جديلتي ال DNA عن بعضهما وهكذا تتكون جديلتان منفردتان، كل واحدة منهما تُشكل قالبًا لبناء جديلة مكملة.

مرحلة ثانية: هي **مرحلة ربط البرايميرات** والتي تتم بدرجة حرارة بين 50 – 70 م. هذا المجال يتم تحديده حسب طول وتسلسل البرايمر وهدفها جعل ارتباط البرايميرات لقالب ال DNA أكثر نجاعة.

مرحلة ثالثة: **مرحلة المكاثرة (الاستطالة)** والتي تتم بدرجة حرارة 68 م، هذه الدرجة هي الأمثل لنشاط إنزيم DNA بوليميراز (TAQ). لإتمام هذه المرحلة ينبغي وجود النيوكلوتيدات وأيونات الماغنيسيوم والتي تستعمل كمساعد إنزيم وموجودة في بوفر ال TAQ. تركيز عال للإنزيم يساعد في مضاعفة قوالب ال DNA في الإنبوبة.

و. سُلّم DNA (DNA Ladder)

خليط من مقاطع DNA بأطوال معروفة يتم تحميلها في آبار جهاز الفصل الكهربائي الهلامي (אלקטרופוריזה). يُساهم الخليط في تحديد طول مقاطع DNA غير معروفة. طول المقطع يُعبّر عنه بعدد أزواج نيوكلوتيدات (الوحدات bp).