تشخيص مرض التليف الكيسي cystic fibrosis بواسطة تفاعل ال PCR وأنزيمات الأقتطاع

(Restriction enzymes)

كتب بيدي: يائير كليجر و ميخال مندلوفيتش (محتلن لسنة 2008)

في هذه التجربة ستقوم بأجراء تفاعل PCR على عينات من الحمض النووي لأربعة أفراد الأسرة:

1. أب.
2. أم.
3. أبن مريض بالتليف الكيسي.
4. جنين.

بما ان تفاعل الPCR يستغرق حوالي ساعة، نبدأ مباشرة بالتحضير له, وبينما الجهاز يعمل انتقلوا الى الفعالية المحوسبة التي تبحث الخلفية البيولوجية للتجربة.

قوانين العمل:

فاعلية تقنية ال PCR تكمن في قدرتها على انتاج المليارات من النسخ من مقطع DNA واحد. ومع ذلك، هذه القدرة هي أيضا نقطة ضعف، لأن كل جزيء DNA "غريب" يدخل لأنبوب التفاعل ويناسب لربط جزيئات البرايمر قد يتم نسخه وينتج مليار جزئ DNA "الغريب" - ناتج لا يمت بصلة لمكونات التفاعل الأصلي- بدل DNA "الهدف". ومثل هذه النتيجة ستؤدي لتحليل خاطئ لنتائج التجربة.

جزيء DNA "غريب" كهذا يمكن أن يأتي من اماكن عديدة مثل بقايا الحمض النووي الموجودة على ألأيدي، من دخول بكتيريا في أنابيب الاختبار وما الى ذلك.

لذلك فمن المهم التقيد في المختبر بالقواعد التالية:

1. اعمل بصورة منظمة ونظيفة.
2. ارتدي القفازات وتجنب لمس اي جسم في جميع أوقات العمل
3. استعمل أدوات معقمة فقط.
4. ينبغي إعداد **أنبوب مراقبة**, والذي يحتوي على جميع مكونات تفاعل PCR **عدا الDNA** .لا ينبغي وجود ناتج في انبوب المراقبة.اذا حصلت على ناتج في هذا الانبوب عندها لا يمكنك استنتاج أي شيء من النتائج في انابيب الاختبار الأخرى.

مكونات تفاعل الPCR:

1. عينات ال DNA:
   - A – عينة ال DNA من الاب.
   - B – – عينة ال DNA من الام.
   - C - – عينة ال DNA من الابن المريض.
   - D – – عينة ال DNA من الجنين.
2. ماء (انبوب اختبار مكتوب عليه - H_2O)
3. محلول المغنيسيوم (انبوب اختبار مكتوب عليه **Mg**)
4. محلول البوفر(انبوب مكتوب عليه - **Taq buf**.)
5. نوكلئوتيدات (انبوب مكتوب عليه - **dNTPs**)
6. برايمر 1 + برايمر 2 (انبوب مكتوب عليه - **P1/P2**)
7. انزيم – **Taq DNA polymerase** (انبوب موجود عند المرشد)

يرجى ملاحظة أن جميع مكونات التفاعل ما عدا عينة الحمض النووي، هي نفسها في جميع الاختبارات. للعمل بفاعلية ودقة عليكم إعداد مزيج يحتوي على جميع المكونات (بدون DNA)، ومن ثم قوموا بتوزيع المزيج على الانابيب المختلفة.

سير العمل:

في حامل الانابيب الموجود في الثلج هناك 5 انابيب تحتوي على عينات DNA كالاتي:

A – اب

B – ام

C – الابن المريض

D – الجنين

E – ماء (=مراقبة, اي بدون DNA)

إعداد مزيج التفاعل:

1. اكتب على انبوب ابندورف صغير الحرف "خ".في هذا الانبوب ستقوم بتحضير خليط التفاعل.

ضع انبوب "خ". في الثلج.

تأكد من وضع المكونات حسب الترتيب المسرود أدناه, واستخدم Tips (**مع فيلتر**)مناسب للماصة التي تستعملها, **تأكد من تبديل ال Tip بعد اضافة كل مركب**.

2. استخدم ماصة بحجم 100 ميكروليتر (P 100) ووجهها ل87 ميكروليتر [087] وضع عليها Tip مناسب لماصة بحجم 100 ميكروليتر.
3. ضع في انبوب "خ" 87 ميكروليتر ماء - **H_2O** .
4. استخدم ماصة بحجم 20 ميكروليتر (P 20) ووجهها ل15 ميكروليتر [150] وضع عليها Tip جديد مناسب لماصة بحجم 20 ميكروليتر.
5. اضف لانبوب "خ" 15 ميكروليتر **Taq buffer**.
6. استخدم ماصة بحجم 20 ميكروليتر (P 20) ووجهها ل6 ميكروليتر [060] وضع عليها Tip جديد.
7. اضف لانبوب "خ" 6 ميكروليتر من محلول المغنيسيوم (**Mg**)
8. استخدم ماصة بحجم 20 ميكروليتر (P 20) ووجهها ل3 ميكروليتر [030] وضع عليها Tip جديد.
9. اضف لانبوب "خ" 3 ميكروليتر من محلول النوكلئوتيدات(= **dNTP's**).
10. قم بتبديل الTip.
11. اضف لانبوب "خ" 3 ميكروليتر من البرايمر الاول (= **P1**).

12. قم بتبديل الTip_.

13. اضف لانبوب "خ" 3 ميكروليتر من البرايمر الثاني (**P2=**).

14. اطلب من المرشد ان يضيف لانبوب "خ" 3.0 ميكروليتر من الانزيم **Taq DNA polymerase** .

15. أغلق الأنبوب وامزج محتوياته جيدا بواسطة النقر بإصبعك على جانب الأنبوب ومن ثم ادخله لجهاز جهازالطرد المركزي(سنتريفوغه) لفترة قصيرة من الزمن.

<u>تحضير انابيب الاختبار للتفاعل:</u>

يستحسن العمل بسرعة ودقة وعدم ترك الانابيب لفترة طويلة خارج الثلج.

16. استخدم ماصة بحجم 20 ميكروليتر (P 20) ووجهها ل20 ميكروليتر [2 0 0] وضع عليها Tip.

17. ضع في كل انبوب A , B ,C ,D ا- E, 20 ميكروليتر من المزيج في انبوب "خ" .تذكر انه عليك استخدام Tip جديد بين كل انبوب وانبوب.

<u>تنفيذ تفاعل PCR:</u>

18. ادخل الانابيب بمساعدة المرشد الى جهاز الPCR (تذكر لون انابيب فريقك!).

يتميزجهاز ال PCR بقدرته على تسخين وتبريد الأنابيب التي بداخله بصورة اوتوماتيكية وبسرعة.

سوف يقوم المرشد ببرمجة الجهاز حسب الظروف التالية:

الخطوة الأولى - فصل جديلتي الDNA عن بعضها البعض - دقيقة بدرجة حرارة 94 ^{o}C.

الخطوة الثانية – ارتباط البرايمر – دقيقة بدرجة حرارة 55^{o}C .

الخطوة الثالثة – بناء الجديلة التكميلية – دقيقة بدرجة حرارة 72^{o}C .

الجهاز يكرر هذه الخطوات الثلاث 30 مرة.

بعدها تبقى درجة الحرارة 72^{o}C لمدة 10 دقائق من اجل تمكين الانزيم من ان يكمل نسخ مقطع DNA "الهدف".

في نهاية التفاعل يقوم الجهاز بتبريد الأنابيب لدرجة حرارة 7^{o}C. سيقوم الجهاز بالحفاظ على هذه الحرارة إلى ان نطفئ الجهاز ونخرج الأنابيب. (هذا يحافظ على نواتج DNAال).

أثناء عمل الجهاز انتقل الى الفعالية المحوسبة التي تبحث الخلفية البيولوجية للتجربة.

19. عندما ينهي الجهاز عمله اخرج الانابيب بمساعدة المرشد وضعهم في حامل الانابيب.

<u>قطع نواتج الPCR:</u>

20. اكتب على 4 انابيب ابندورف: **A1, B1, C1, D1.**

21. استخدم ماصة بحجم 20 ميكروليتر (P 20) ووجهها ل15 ميكروليتر [1 5 0] وضع عليها Tip

22. اضف الى الانبوب A1 15 ميكروليتر من ناتج DNA من الانبوب A.

23. اضف الى الانبوب B1 15 ميكروليتر من ناتج DNA من الانبوبB.

24. اضف الى الانبوب C1 15 ميكروليتر من ناتج DNA من الانبوبC

25. اضف الى الانبوب D1 ميكروليتر من ناتج DNA من الانبوب D.

26. استخدم ماصة بحجم 20 ميكروليتر (P 20) ووجهها ل11 ميكروليتر [1 1 0] وضع عليها Tipجديد.

27. اضف لكل واحدة من الانابيب A1, 1B, C1, D1, 11 ميكروليتر ماء.

28. استخدم ماصة بحجم 20 ميكروليتر (P 20) ووجهها ل3 ميكروليتر [0 3 0] وضع Tip جديد.

29. اضف لكل واحدة من الانابيب A1, 1B, C1 D1, 3 ميكروليتر **بوفر قطع (cut buf)**. من المهم **تبديل ال**Tip بين العينات المختلفة!

30. اطلب من المرشد ان يضيف 1 ميكروليتر انزيم اقتطاع لكل واحدة من الانابيب A1-D1.

31. انقل الأنابيب الى حوض ماء بدرجة $37^{o}C$ لمدة نصف ساعة على الأقل.

في هذه الاثناء اكمل الفعالية المحوسبة.

32. بعد مرور نصف ساعة على الأقل, استخدم ماصة بحجم 20 ميكروليتر (P 20) ووجهها ل6 ميكروليتر [0 6 0] ضع Tip جديد.

33. امزج جيدا انبوبة محلول الصبغ بمساعدة الفورتكس ثم أضف إلى كل انبوب من الانابيب A1, 1B, C1, D1, 6 ميكروليتر من محلول الصبغ.كذلك اضف 6 ميكروليتر من محلول الصبغ الى الانبوبة E .

شحن نواتج ال PCR في جل الكتروفوريزا (كهربائي):

احذر! لا تقم بلمس الجل باليد المجردة - الجل يحتوي على مادة مسرطنة!

فتح الجل:

سيقوم المرشد بفتح غطاء الجل الجاف وسيضعه في وعاء خاص. الجانب الايمن من الوعاء يدخل اولا. افتح غطاء الجل في أقرب وقت ممكن من الشحن - لمنع جفاف الجل.

تنفيذ prerun(شحن مسبق) :

- قم بعمل prerun (للوعاء الذي يحوي مشط بداخله) بواسطة الضغط على الزر لمدة ثانيتين.
- صفير قصير وومضات باللون الاخضر يشيرون الى تشغيل سليم للجهاز.
- بعد مرور دقيقتين، سوف يتحول الوميض للضوء الأحمر ويسمع صفير متقطع. اضغط على الزر الى ان يظهر لون احمر ثابت.

تحميل مؤشر الحجم:

سيقوم المرشد باخراج المشط وبتحميل مؤشر الحجم.

تحميل العينات:

حمل 20 ميكروليتر من 5 العينات التابعة لفرقتك: انابيب A1-D1 و E. لا تنس ان تستبدل الTip بين كل عينة و عينة.اكتب ماذا وضعت في كل "بئر" في الجل بالترتيب.

تشغيل الجل:

للبدء اضغط ضغطة وجيزة على الزر. ضوء اخضر ثابت يشير الى تشغيل سليم. اترك الجل يعمل لمدة تتراوح بين 15-30 دقيقة. تمعن بالوان العينات ولكن لا تقم بلمس الجهاز.

انهاء شحن الجل: في نهاية الشحن, الضوء الاخضر يتحول الى احمر ويسمع صفير متقطع.

تصوير الجل: سيقوم المرشد بأخراج الجل من الوعاء وسيضعه فوق طاولة UV لتفحصه ولتصويره.