العمل التطبيقي الثاني: الفصل الكهربائي لهلام الأغاروز، التلوين، والنقل الجنوبي

- **المحاليل:**

✓ %0.8agarose gel prepared with TBE: Tris-Borate-EDTA (108 g Tris-base, 55 g boric acid, 40 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0, per liter)

✓ DNA standard, lambda-HindIII, 1 µg per 30 µl

✓ TBE: one per gel

DNA sample loading buffer (tracking dyes):

✓ %0.25bromphenol blue, 0.25% xylene

✓ cyanol. 30% glycerol in distilled water

✓ DNA Blue InstaStain™™

✓ Denaturing solution (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl)

✓ Neutralization solution (0.5 M Tris, pH 7.5, 1.5 M NaCl)

✓ 20x SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate). diluted to 10x SSC

- **المعدات والأدوات المستخدمة:**

1. نظام الرحلان الكهربائي للهلام الأفقي مع مصدر طاقة مناسب.
2. إسفنجة ماصة (إسفنجة مطبخ واحدة لكل هلام) لاستخدامها في تقنية النقل الجنوبي.(Southern Blot)

- **اللوازم المخبرية:**

3. ماصات دقيقة مع رؤوس قابلة للاستبدال (نطاقات 1-10 ميكرولتر و 10-100 ميكرولتر).
4. دورق إرلنماير بسعة 125 مل.
5. أقلام تعليم مخبرية لتحديد العينات والمكونات.
6. قفازات لاتكس لاستخدامها أثناء التعامل مع عينات الحمض النووي لضمان بيئة معقمة وتقليل التلوث.
7. أنابيب طرد مركزي دقيقة (حجم 1.0 مل) لتخزين ومعالجة العينات البيولوجية.
8. أوعية وزن أو أطباق ضحلة مخصصة لعمليات التلوين والتظهير.
9. أغشية نيتروسليلوز مدعمة (Optitran BA-S) للاستخدام في عمليات النقل الجزيئي.
10. ورق كروماتوغرافي 3 MMلدعم عمليات النقل والامتصاص في التجارب البيوكيميائية

- **البروتوكول:**

01. بالتعاون مع مجموعة أو مجموعتين أخريين، حضّروا هلامًا واحدًا:
    - ✓ زن 0.4 جرام من الأغاروز وضعها في دورق إرلنماير سعة 125 مل,
    - ✓ أضف 50 مل من محلول TBE إلى الدورق وحرّكه برفق.
    - ✓ باستخدام قلم تحديد مخبري، ارسم خطًا على جانب الدورق لتحديد مستوى السائل.
02. ضع المزيج في الميكروويف لمدة دقيقة واحدة تقريبًا، مع الانتباه لئلا يغلي ويفور. باستخدام قفاز واقٍ من الحرارة،
    - ✓ دوّر الدورق برفق ثم أعده إلى الميكروويف.
    - ✓ سخّن لمدة 15 ثانية، وكرر هذه العملية حتى تختفي جميع جزيئات الأغاروز العالقة في الدورق. إذا تبخر جزء من السائل بشكل ملحوظ، أضف ماءً مقطرًا ساخنًا إلى الدورق، مستخدمًا الخط الذي رسمته كمرجع.
    - ✓ اترك الأغاروز المصهور ليبرد حتى يصبح الدورق دافئًا بدرجة يمكن التعامل معها، ولكن يجب أن يظل دافئًا.

تنبيه: سيكون النموذج ساخنًا بعد الغليان.

03. بينما تنتظر تبريد الأغاروز المصهور قليلًا،
    - ✓ جهّز حجرة الفصل الكهربائي الأفقي وفقًا لتعليمات الشركة المصنعة.
04. عندما يبرد الأغاروز كما هو موضح في الخطوة 2،
    - ✓ صب الأغاروز المصهور وحدد موضع المشط. مع توجيه الجانب الطويل من حجرة الفصل الكهربائي بموازاة حافة طاولة المختبر، يجب وضع المشط في أقصى اليسار.من المهم أن تتذكر أن العينات ستتحرك من الطرف السالب (المهبط/الكاثود) ذي اللون الأسود إلى الطرف الموجب (المصعد/الأنود) ذي اللون الأحمر.
05. أثناء تصلب الأغاروز،
    - ✓ جهّز عينات "EcoRI" و "Control" للتحميل بإضافة 6 ميكرولتر من محلول تحميل الحمض النووي.
    - ✓ بالإضافة إلى ذلك، جهّز عينة قياسية للحمض النووي (عينة واحدة لكل هلام)، مثل Lambda-HindIII. أضف 6 ميكرولتر من محلول تحميل العينة إليها.
06. عندما يتصلب الهلام،
    - ✓ قم بإزالة المشط والحواجز برفق،
    - ✓ ثم صب حوالي 250 مل من محلول TBE في حجرة الفصل الكهربائي حتى يغمر الهلام تمامًا.
07. اضبط الماصة الدقيقة على 35 ميكرولتر.
    - ✓ ضع 35 ميكرولتر من كل عينة في الحفرة المخصصة لها، مع تغيير طرف الماصة الدقيقة بين العينات.

08. ضع الغطاء على حجرة الفصل الكهربائي، ووصل الأسلاك بمصدر الطاقة. تذكر أن الحمض النووي سيتحرك من الطرف السالب الأسود إلى الطرف الموجب الأحمر.

09. اضبط مصدر الطاقة على 90 فولت (جهد ثابت)، واترك الفصل الكهربائي يستمر لمدة ساعة واحدة. عندما يبدأ الفصل الكهربائي، سترى أن صبغة التتبع تتحرك نحو الطرف الموجب الأحمر. تسمح لك مقدمة الصبغة بمتابعة تقدم الفصل الكهربائي، ولكنها لا تلون الحمض النووي.

10. ارتدِ القفازات واستخدم ملعقة مسطحة لإزالة الهلام برفق من حجرة الفصل الكهربائي.

- ✓ ضع الهلام في وعاء أو طبق صغير، وقم بتلوينه باستخدام طريقة التلوين الفوري بصبغة DNA Blue.
- ✓ ضع ورقة التلوين فوق الهلام، واضغط عليها بأصابعك عدة مرات لضمان التصاقها.
- ✓ ثم ضع طبقًا زجاجيًا أو بلاستيكيًا فوقها مع دورق فارغ كوزن، واترك الهلام وورقة التلوين لمدة 15 دقيقة .

11. أزل ورقة التلوين وضع الهلام في طبق ضحل.

- ✓ أضف الماء المقطر المسخن إلى 37 درجة مئوية، وقم بتغيير الماء الدافئ كل 10 دقائق حتى تصبح الأشرطة مرئية.

12. افحص أنماط الأشرطة، وقارن بين العينات المهضومة بإنزيم EcoRI والعينات غير المقطوعة.

- ✓ وضح نتائجك في تقرير المختبر الخاص بك.
- ✓ خزّن الهلام المغلف بغلاف بلاستيكي في الثلاجة، أو انتقل إلى الخطوة التالية.

13. اقطع الهلام فوق الحفر (اقطع خلال الحفر)، وقم بعمل ثلم في الزاوية اليسرى السفلية من الهلام.

- ✓ قس وسجل أبعاد الهلام (الطول والعرض).

14. انقل الهلام إلى طبق صغير يحتوي على محلول التمسخ.

- ✓ تأكد من أن الهلام مغمور تمامًا.
- ✓ احتضن الهلام في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة مع التحريك من حين لآخر.

15. أثناء تثبيت الهلام في مكانه بيد ترتدي قفازًا،

- ✓ اسكب محلول التمسخ في دورق، ثم صب محلول تمسخ جديد فوق الهلام لتغميسه مرة أخرى.
- ✓ احتضن الهلام في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة مع التحريك من حين لآخر.

16. أثناء تثبيت الهلام في مكانه بيد ترتدي قفازًا،

- ✓ اسكب محلول التمسخ في دورق،
- ✓ واشطف الهلام سريعًا بالماء المقطر (من القارورة).
- ✓ أثناء تثبيت الهلام في مكانه بيد ترتدي قفازًا، اسكب الماء المقطر في الحوض.

17. صب محلول المعادلة في الطبق. تأكد من أن الهلام مغمور تمامًا.

- ✓ احتضن الهلام في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة مع التحريك من حين لآخر.

18. أثناء تثبيت الهلام في مكانه بيد ترتدي قفازًا،

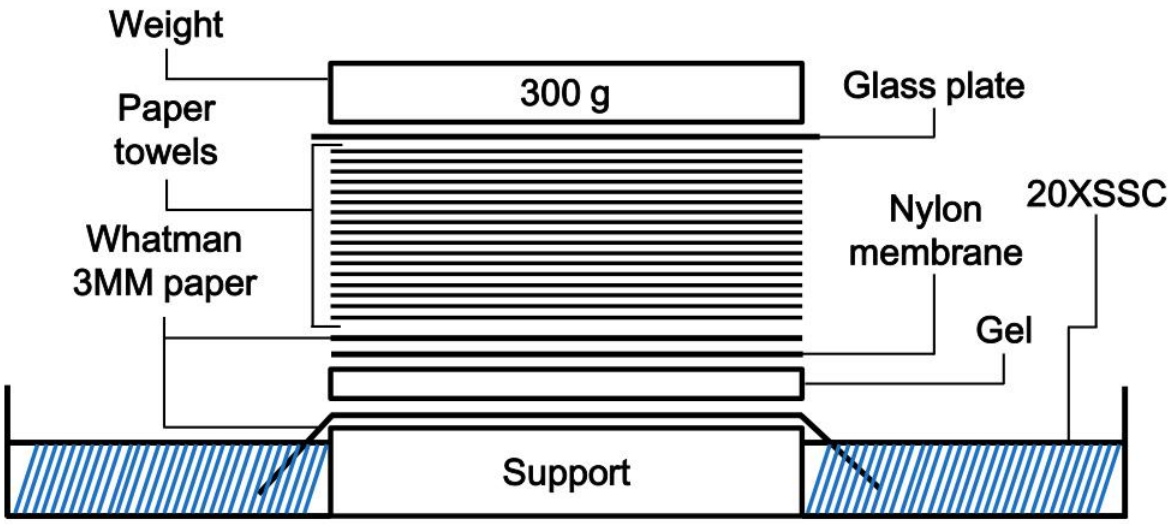
- ✓ اسكب محلول المعادلة في الحوض،
- ✓ ثم صب محلول معادلة جديد فوق الهلام لتغميسه.
- ✓ احتضن الهلام في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة مع التحريك من حين لآخر.

19. خلال خطوات الاحتضان 14-18، حضّر المواد اللازمة للنقل:

- ✓ ارتدِ قفازات نظيفة، واقطع قطعة من غشاء نيتروسليلوز بنفس حجم الهلام.
- ✓ استخدم شفرة حلاقة على سطح من الورق المقوى.
- ✓ حافظ على الغشاء المقطوع على سطح نظيف. قم بعمل ثلم في الغشاء في نفس موضع الثلم الذي أحدثته في الهلام (الزاوية اليسرى السفلية).
- ✓ اكتب الأحرف الأولى من اسمك والتاريخ على الحافة السفلية باستخدام قلم حبر جاف.

تنبيه : يجب التعامل مع غشاء نيتروسليلوز بقفازات نظيفة طوال إجراء النقل الجنوبي.

- ✓ باستخدام المقص، اقطع قطعتين من ورق الكروماتوغرافيا Whatman 3MM بنفس حجم الهلام، وقطعتين من الورق أكبر من الهلام بمقدار 1 سم في كل بُعد.
- ✓ اقطع عدة مناشف ورقية بنفس حجم الهلام (كومة مضغوطة بارتفاع 2 بوصة).

20. بلل غشاء نيتروسليلوز عن طريق تعويمه في طبق صغير يحتوي على محلول SSC بتركيز X10. بمجرد أن يبتل، اغمسه.

21. عندما تتم معادلة الهلام (بعد الخطوة 18)، قم بإعداد النقل كما هو موضح في الشكل التالي . اترك النقل الشعري يستمر طوال الليل.