البصمة الوراثية Genetic Fingerprinting

تحضير عينة PCR من دم الانسان
Human Blood PCR Preparation
&
الترحيل الكهربائي بالهلام
Gel Electrophoresis

علم الوراثة الجزيئي العملي

قسم علوم الحياة - المرحلة الثالثة

المختبر الثامنة 2019-2020

د. هبة عباس جاسم

م.م. مصطفى فلاح داود

References المصادر

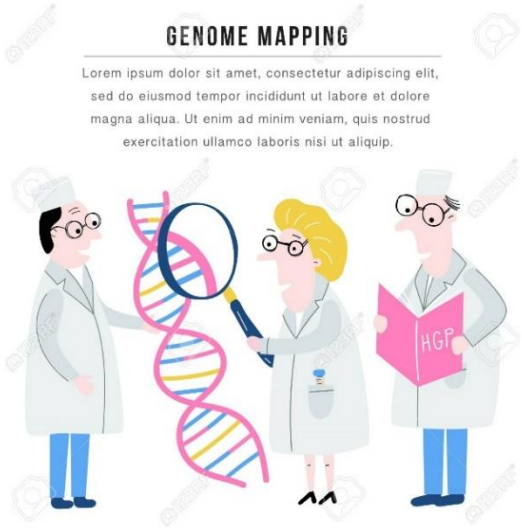
1- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. eds., 2012. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic press.

2- file:///C:/Users/Hiba%20Vaio/Downloads/PCR%20Master%20Mix%209PIM750.pdf

Drabik A., Bodzon-kutakowska A. and Silberring J. (2016) Proteomic Profiling and Analytical Chemistry: Gel Electrophoresis. 2ed. Elsevier

الحصول على البصمة الوراثية من عينة دم باستخدام تفاعل البوليمراز المتسلسل (PCR)

تهدف تقنية ال PCR الى تضخيم جزيئات قليلة من الحمض النووي DNA، بعد استخلاصه من خلايا او سوائل الجسم مثل الدم Blood وبالتالي الحصول على كميات كبيرة منه بحيث يمكن اجراء التحليل عليها.



خطوات التحقق من البصمة الوراثية:

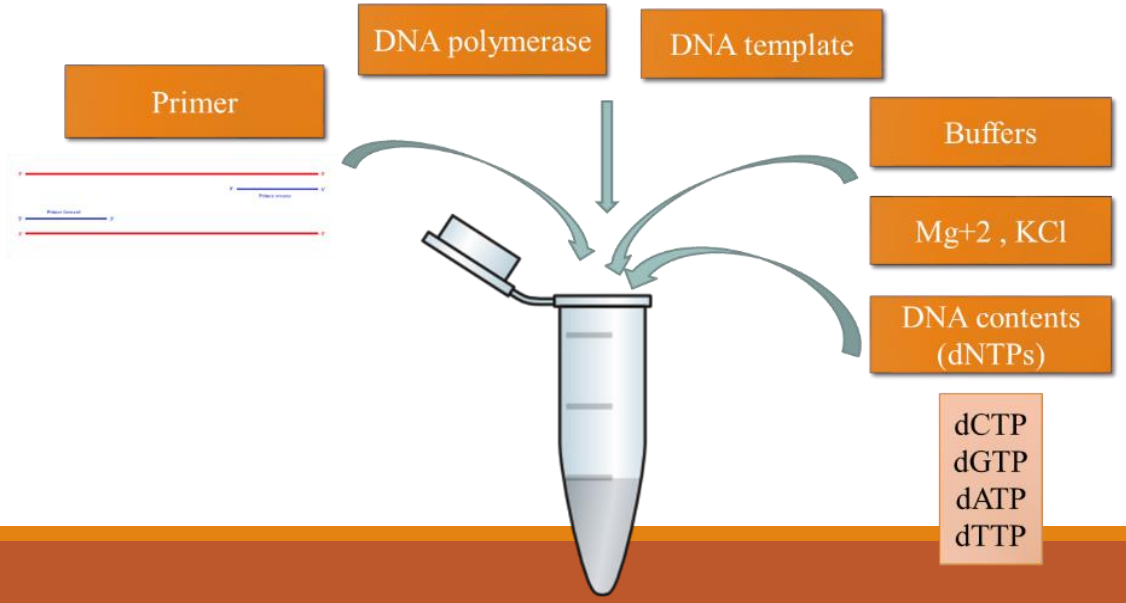
أولا: استخلاص الـ DNA من عينة الدم (المحاضرة السابعة)

ثانيا: تضخيم الـDNA بتقنيةالـ PCR(المحاضرة الحالية)

ثالثا: التحقق من البصمة الوراثية ، تمرير عينة الـ PCR في جل الاكاروز (المحاضرة الحالية)

ثانيا: تحضير عينة PCR

DNA generation



خطوات تحضير عينة PCR من عينة الدم

قالب الحمض النووي DNA template : للحصول على قالب الحمض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين DNA template من عينة الدم يجب المرور بمرحلة الاستخلاص. حيث تضاف بعض المواد للتخلص من الغشاء السايتوبلازمي والغشاء النووي و التخلص من البروتينات المرتبطة مع الـDNA للحصول على قالب DNA نقي. (كما ذكر في المحاضرة السادسة)

قياس تركيز عينة الـDNA :

بعد الحصول على مستخلص ال DNAالتقي في الخطوة السابقة ، يتم قياس تركيز الـDNA باستخدام جهاز الطيف المرئي spectrophotometer . حيث يقاس ال DNAبوحدة النانوجرام لكل مايكروليتر (ng/µl).

طريقة القياس:

أ-تصفير الجهاز Blank: نضع 100 مايكروليتر hydration solution DNA أوDeionized water (ويجب أن تكون صفر ليقرأ تركيز باقي العينات بشكل صحيح)

ب-العينة Sample: نضع 2 مايكرولتر من العينة الDNA في98 مايكرولترمن Deionized water

ت-يتم قياس العينة المخففة على الطول الموجي 260 نانومولر

كيفية تحضير DNA عملي- (working DNA)

لعمل working DNA نعوض بالمعادلة التالية-:

التركيز 1 X الحجم 1 = التركيز 2 X الحجم 2

(C1 X V1 = C2 X V2)

التركيز Concentration (C)

الحجم Volume (V)

ينبغي أن نوحد التركيز لجميع العينات , لذلك نحضر 50 نانوغرام لكل ميكرولتر (يمكنك تحضير أي حجم) , فلو اردنا تحضير 100 ميكرولتر. وكان قراءة الجهاز لتركيز العينة(1) 400 ng/µl والعينة(2) 500 ng/µl

مثلاً-:

C1 X V1 = C2 X V2

عينة (1) : 400 ng/µl × V1 = 50 ng/µl × 100 µl

V1 = 5000 ÷ 400 = 12.5 µl

عينة (2) : 500 ng/µl × V1 = 50 ng/µl × 100 µl

V1 = 5000 ÷ 500 = 10 µl

عينة (1) : 12.5 µl من عينة DNA ونكمل الحجم إلى 100 µl ماء مقطر (أي 87,5µl ماء مقطر).

عينة (2) : 10 µl من عينة DNA ونكمل الحجم إلى 100 µl ماء مقطر (أي 90 µl ماء مقطر).

PCR Master Mix

في الوقت الحالي يتم استعمال مواد محضرة وجاهزة للاستخدام في تقنية الPCR، في تجربتنا سوف نستخدم Kit يدعى PCR Master Mix (MM) من شركة Promega. هذا المحلول الجاهز يتكون من :

أ- Nuclease-Free Water

ب- Taq DNA polymerase

ت- dNTPs

ث- $MgCl_2$

ج- Buffers at optimal concentrations

البادئات Primers

أ-البادئ الامامي Forward primer

ب-البادئ الرجعيReverse primer

تستخدم بادئات اما من نوع :

غير المتخصصة Rapid amplified polymorphic DNA analysis (RAPD): اذ تتكون من قواعد نيتروجينية قليلة (bp10) غير متخصصة حيث يمكنها الارتباط بقطع الDNA بشكل عشوائي لكونها قليلة العدد.

1. Random Hexamers

5' GpppACUGAACCUGAUUCGAAUUCCCGAAAAAAAAAAAAA 3'

← ACTTGG 5' ← TTAAGG 5'

او من النوع

المتخصص Specific: وهو اطول من البادئات غير المتخصصة، اذ يتكون من 18-22 bp، حيث يمكنها الارتباط بقطع محددة في الـDNA، لذا يعتبر من النوع النمتخصص.

3. Gene Specific Primers

5' GpppACUGAACCUGAUUCGAAUUCCCGAAAAAAAAAAAAA 3'

← CTAAGCTTAAGGGC 5'

ملاحظة: كلما كان عدد القواعد النيتروجينية كبير كلما كان تخصص البرايمر اكثر.

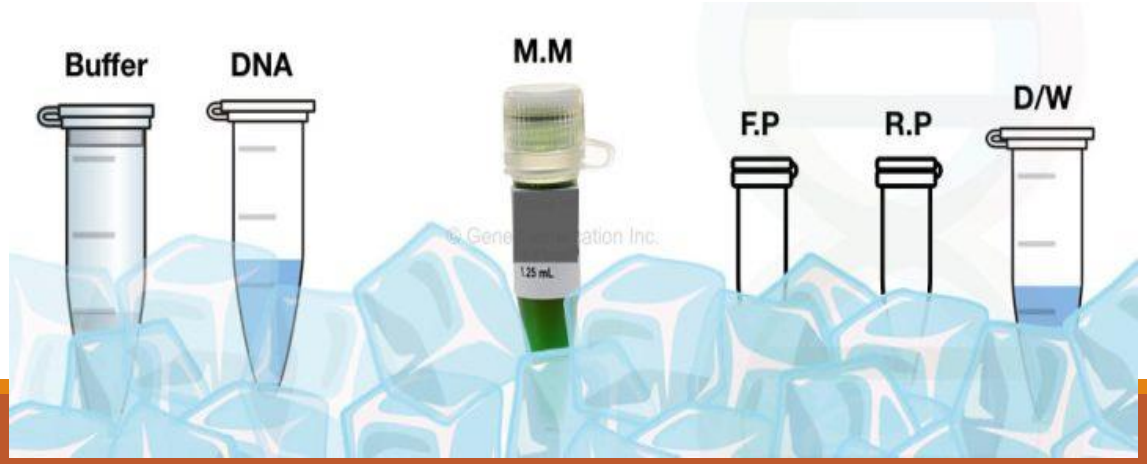
طريقة العمل Protocol:

أ- تعقيم مكان العمل باستخدام الايثانول.

ب- اذابة العينات (مستخلص الـ DNA) المحفوظة في (-20 او -80 مْ)، و اذابة الماستر مكس (-20 مْ)، في درجة حرارة الغرفة ، ثم يمزج Vortex الماستر مكس ثم يوضع لثواني في جهاز الطرد المركزي الدقيق microcentrifuge لجمع المزيج الموجود على جدران الانبوب . ثم توضع العينات و الماستر مكس في الثلج .

microcentrifuge

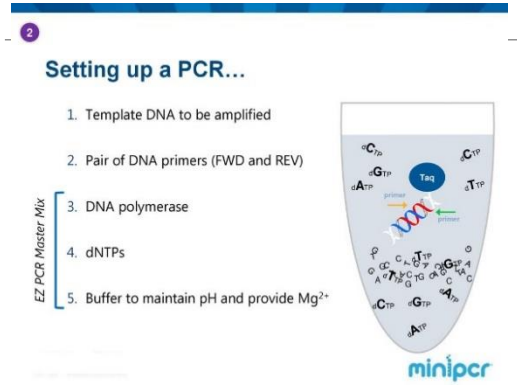
Vortex

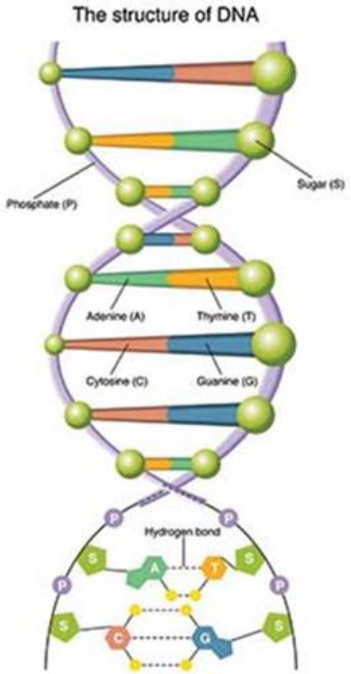


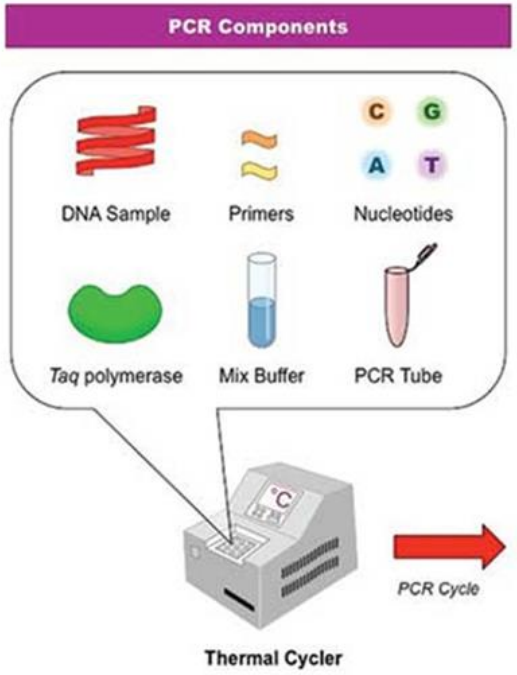
Component	Volume	Final Concentration
PCR Master Mix, 2X	25µl	1X
upstream (Forward) primer	10µM 0.5–5.0µl	0.1–1.0µM
downstream (Reverse) primer	10µM 0.5–5.0µl	0.1–1.0µM
DNA template	1–5µl	<250ng
Nuclease-Free Water	to 50µl	N.A.

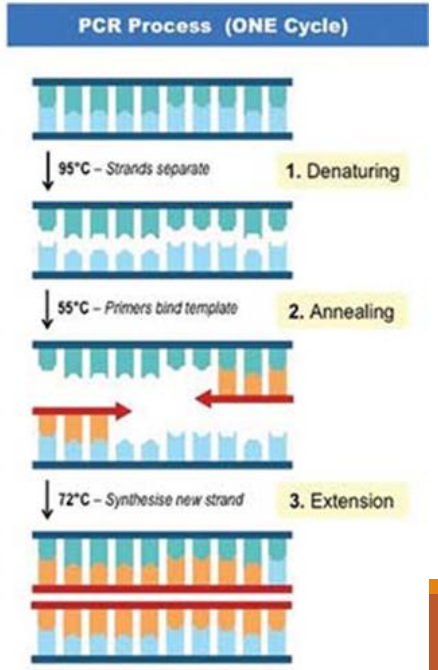
وضع عينة الـPCR المحضرة في جهاز thermocyclerلتضخيم (تضاعف) عينة الـDNA. وضبط الجهاز

كما يلي:

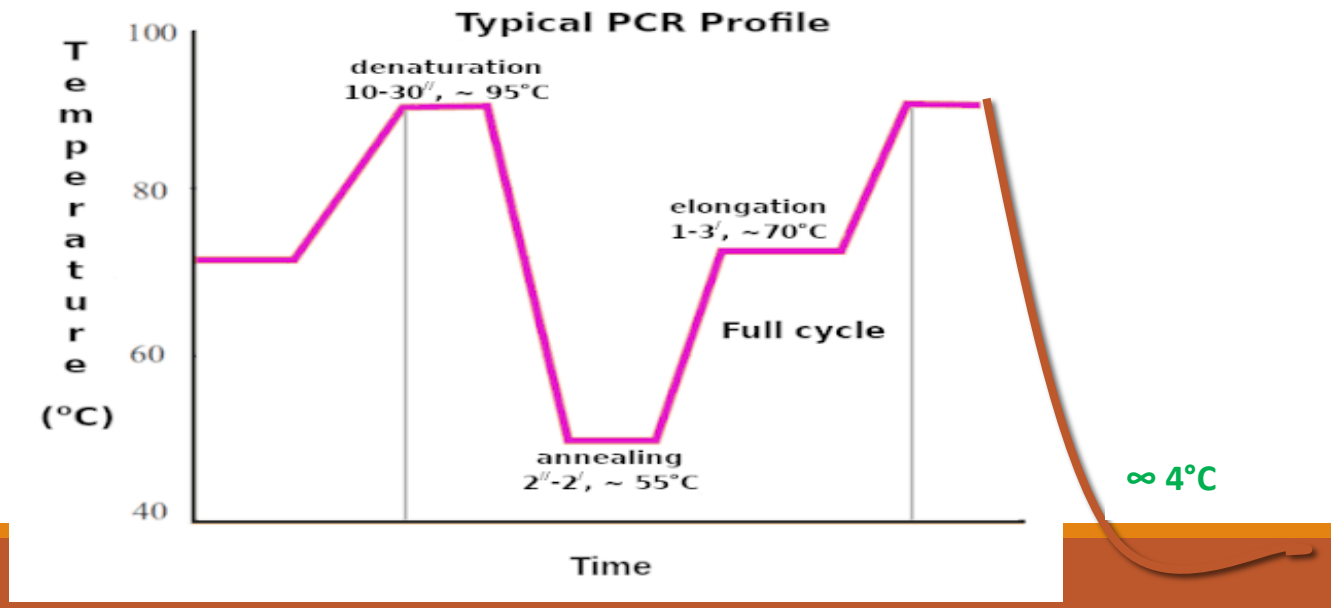


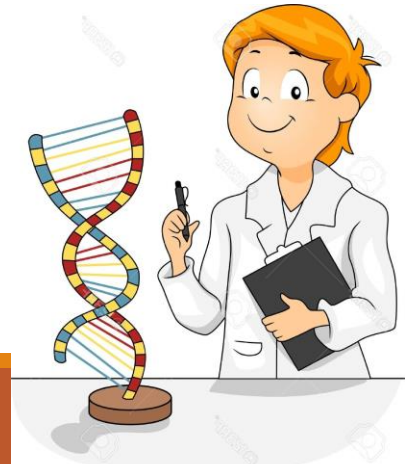






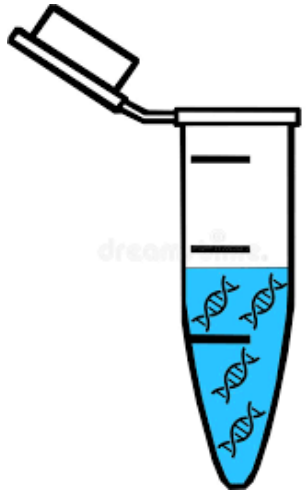
- التفكيك Denaturation: في البداية يتم تسخين العينة لمدة 2 دقيقة في درجة حرارة 95 مْ، بينما في الدورات اللاحقة من مرحلة التفكيك فان رفع درجة الحرارة الى 95 مْ لمدة 30 -60 ثانية تكون كافية لبدأ التفاعل.
- الاتحام Annealing: تخفض درجة الحرارة الى 55 مْ لمدة 30-60 ثانية لتتم عملية الالتحام.
- الاطالة Extension: ترفع درجة الحرارة الى 72-74 مْ لمدة 5 دقائق. لتتم عملية بناء شريط DNA جديدة اعتمادا على شريط الDNAالقالب.
- التبريد Refrigeration: في بعض اجهزة الثيرموسايكل يمكن خفض رجة الحرارة ال 4مْ لعدة ساعات بعد انتهاء دورات التفاعل، وذلك لتقليل فعالية انزيم البلمرة
- عدد الدورات Cycle Number: غالبا يضبط الجهاز لـ 25-30 دورة ، يمكن زيادة عدد الدورات الى 40 دورة اذا كانت عدد النسخ في العينة المستخلصة قليلة العدد.

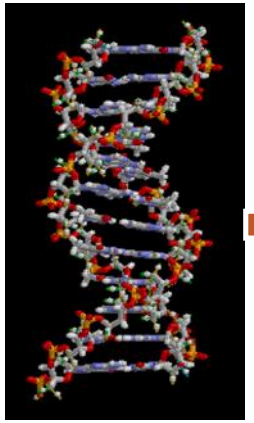


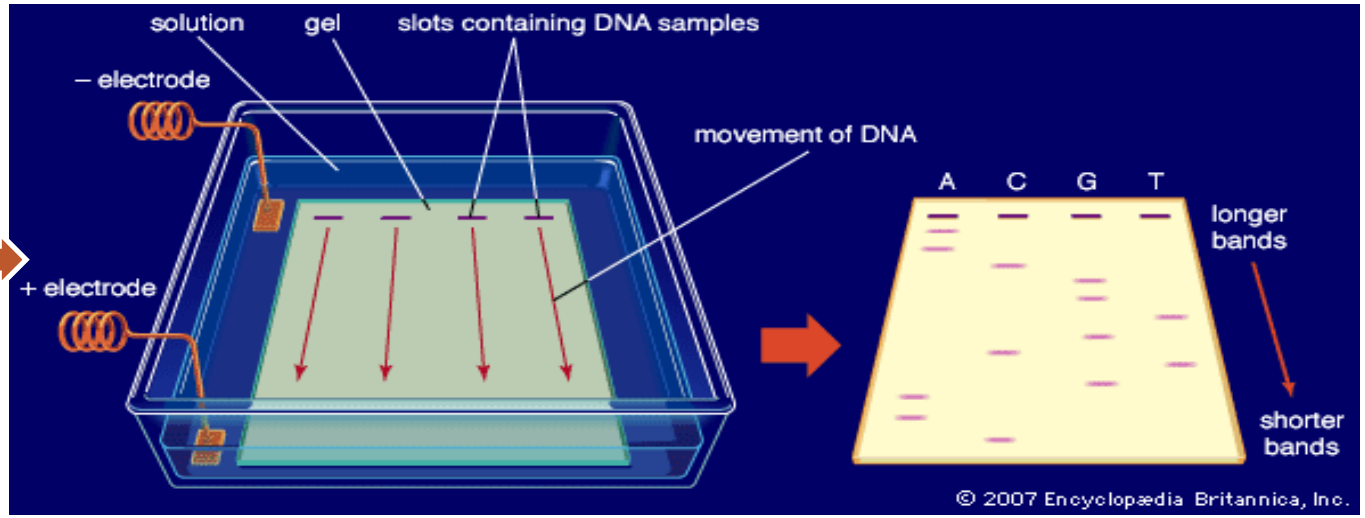


بعد انتهاء عملية تضخيم الحامض النووي ، يمكن حفظ العينة في درجة حرارة -20مْ او استخدامها مباشرة

في الخطوة اللاحقة وهي الترحيل الكهربائي .







ثالثا: التحقق من البصمة الوراثية ، تمرير عينة الـ PCR في جل الاكاروز - الترحيل الكهربائي بالهلام Gel Electrophoresis

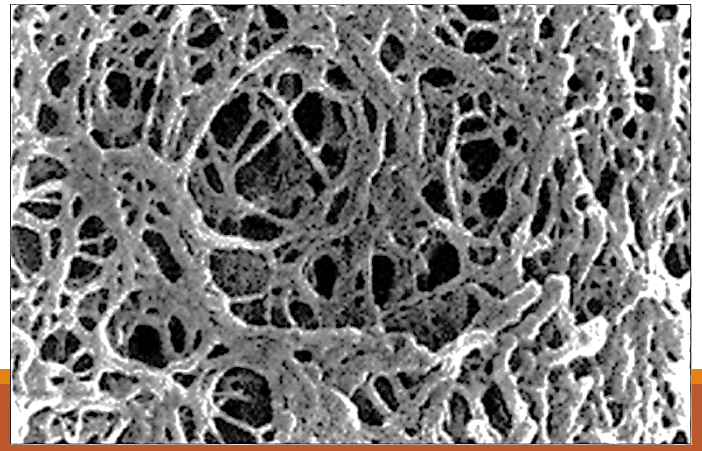
يعرف الترحيل الكهربائي بأنه حركة الأيونات والجزيئات العملاقة المشحونة **charged macromolecules** كالـ(**DNA, RNA, proteins**) خلال وسط معين (كهلام الأكاروز وهلام متعدد الاكريلامايد)عند تسليط تيار كهربائي. فإذا كان للجزيئة محصلة شحنة سالبة وموجبة، فإنها سوف تهاجر في المجال الكهربائي.

تستعمل تقنية الترحيل الكهربائي بشكل واسع في علم الخلية **cytology** وفي الوراثة الجزيئية **molecular genetics** لفصل الجزيئات الكبيرة العملاقة **macromolecules**. يمكن معرفة حجم هذه الجزيئات المفصولة على الهلام خلال مقارنتها بواسمات جزيئية قياسية **standard molecular markers** والتي ترحل بموازاة العينة الغير معروفة الحجم خلال الترحيل الكهربائي في الهلام.

إن الجزيئة ذات الشحنة السالبة (الأنيون **anion**) تهاجر وتنجذب إلى القطب الموجب (الأنود **anode**)، أما الجزيئات ذات الشحنة الموجبة (الكاتايون **cation**) سوف تهاجر وتنجذب نحو القطب السالب (الكاثود **cathode**)

يتم الترحيل في هلام يتكون من ثقوب مجهرية دقيقة (**microscopic pores**)، وتقوم هذه الثقوب بإعاقة حركة الجزيئات المختلفة من خلال التأثير المنخلي **sieving effect** لثقوبه الدقيقة، حيث إن الجزيئات الصغيرة والمدمجة تهاجر بشكل أسرع خلال الهلام مقارنة مع الجزيئات الكبيرة والتي تواجه مقاومة احتكاكية **frictional resistance** أثناء حركتها في شبكة الهلام الدقيق **gel meshwork**.

تحمل جزيئات الـ DNA والـ RNA شحنة سالبة أصيلة بسبب عمودها الفقري المحتوي على الفوسفات. أما البروتينات، فإنها تحمل شحنات مختلفة على سطحها باختلاف شحنات الأحماض الأمينية الموجودة فيها. ولهذا وبالنسبة للبروتينات فقط، فان محصلة شحنة الجزيئات تلعب دوراً مهماً في حركتها في الهلام.



العوامل التي تتحكم بحركة جزيئات الـ DNA في الهلام:

1- الشحنة **charge**(فيما إذا لو كانت سالبة أو موجبة)

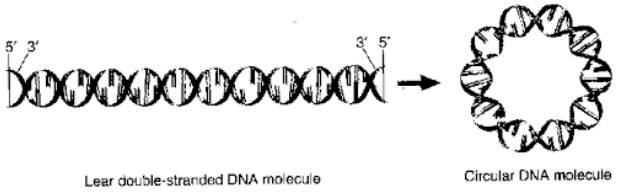
2- حجمها ووزنها الجزيئي **formula weight**(فالجزيئات الصغيرة تتحرك خلال الهلام بسورة أسرع من الجزيئات الكبيرة)

3- حجم الثقوب **pore size**(كلما كان حجم الثقوب صغيراً كلما كان ذلك ملائماً لفصل الجزيئات الصغيرة والعكس بالعكس)

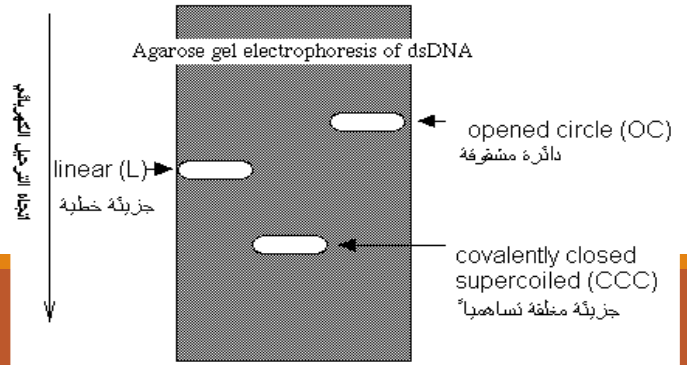
4- قوة التيار الكهربائي **the strength of the electrical field**(يستخدم التيار الكهربائي العالي للفصل السريع للجزيئات الصغيرة بشكل عام على ألا يكون التيار عالي جدا لأن هذا يؤدي إلى تحطم الجزيئات عند تعرضها إليه. أما التيار الواطئ فيستخدم عادةً لفصل الجزيئات الكبيرة التي تتشوه لان استخدام التيار العالي يؤدي إلى تشوهها أما التيار الواطئ جداً فيؤدي إلى زيادة وقت الترحيل، وكلما ازداد وقت الترحيل ازدادت نسبة تعرض حزم الجزيئات المرحلة إلى حالة الانتشار **band diffusion** والذي هو غير مرغوب به أثناء عملية الترحيل في الهلام.

أنواع الحمض النووي

1. الحمض النووي الخطي **linear**
2. الحمض النووي الدائري **circular** ويقسم الى نوعين
   A. الحمض النووي الدائري المغلق **closed**
   B. الحمض النووي الدائري المفتوح **opened**



تهاجر جزيئات الـ **DNA** ثنائية الشريط بشكل مختلف اعتمادا على كون الـ **DNA** دائري **circular** و خطي **linear** . تهاجر الجزيئات الخطية عبر ثقوب الاكاروز بشكل يشبه حركة الافعى من خلال الثقوب. أما الجزيئات الدائرية المغلقة تساهميا **covalently closed circular (CCC) molecules** فانها مدمجة **compact** أكثر لذا تهاجر عبر الثقوب بسهولة أكبر. وغالبا ما تهاجر الجزيئات الخطية ببطء مقارنة بجزيئات الـ **CCC** .



شكل يبين ترحيتل ثلاث جزيئات لها نفس التسلسل إلا أنها **DNA** ت تختلف بالشكل فقط

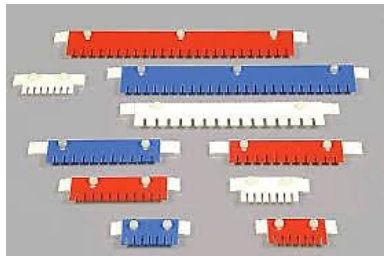
الادوات الواجب توفرها لغرض الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز

ماهي الأدوات الواجب توفرها لغرض الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز؟

1. غرفة ترحيل كهربائي **electrophoresis chamber**:

2. وعاء صب الهلام **gel casting tray**: والذي يتوفر بحجوم متعددة, ويتكون من بلاستك نفاذ للاشعة فوق البنفسجية **UV**. تغلق النهايات الحرة بشريط شفاف (في حال عدم توفر الماسكات النموذجية) قبل صب الهلام ثم يزال الشريط قبل القيام بعملية الترحيل الكهربائي

3. المشط **comb**: وهي اداه تستخدم لتكوين الحفر **Wells** (وهي الأماكن التي توضع فيها عينات الـ**DNA** المراد ترحيلها كهربائياً)



4. دارئ الترحيل الكهربائي **electrophoresis buffer**: وهو محلول ناقل للتيار الكهربائي، حيث يعمل على نقل التيار الكهربائي بين القطب الموجب والقطب السالب، ولولا وجود الدارئ لما انتقل التيار ولما اكتملت الدائرة الكهربائية. يكون الدارئ المستخدم بنوعين:

- دارئ **TAE** ويتكون من المكونات **tris-acetate-EDTA**
- دارئ **TBE** ويتكون من مكونات **tris-borate-EDTA**

1. دارئ التحميل **loading buffer**: يتألف من مكون أساسي كثيف (كليسيرول **Glycerol**) لكي يسمع للعينة بأن "تسقط" في الحفرة المراد ترحيلها ففي حالة عدم استخدام دارئ التحميل سيؤدي ذلك الى ارتفاع عينات **DNA** وخروجها من الحفرة، اما في حالة استخدام دارئ التحميل في حالة ترحيل الـ**DNA** مثلا فإنه وبسبب الكثافة النوعية العالية للكليسيرول فإنه سيحتل الموقع العلوي من الحفرة بينما سيحتل الـ**DNA** الموقع السفلي وهذا بدوره سيعمل على تثبيت جزيئات الـ**DNA** في الهلام.

---

2. يتكون دار~ التحميل (TBE 1x) من (Tris-base بتركيز 0ز089M) ، (Boric بتركيز 0ز089M) و (EDTA-Na2 بتركيز 0ز002 M).

وفي حالة عد وجود الكليسرول أو أي مادة كثيفة أخرى فان هذا قد يؤدي بدوره إلى عدم تثبيت الـ **DNA** في الهلام وبالتالي تحدث فيه حالة انتشار **diffusion**. ويتألف دارئ الترحيل كذلك من صبغة او صبغتين للتعقب **tracking dyes** مثل (**bromophenol blue** و **xylene cyanol**) والتي تهاجر في الهلام مع العينة وتسمع بمراقبة العينية ومعرفة المسافة التي قطعتها العينات أثناء ترحيلها كهربائيا في الهلام، وهذا بدوره يسهل لنا معرفة توقيت انتهاء الترحيل.

1. صبغة بروميد الاثيديوم **Ethidium bromide**: يحضر باذابة 0ز25 غرام من الصبغة في 50 مل ماء مقطر.يتم معرفة مواقع جزيئات **DNA** من خلال التصبيغ وهو عادة ما يحدث باستخدام صبغات مختلفة وأكثرها شيوعاً صبغة بروميد الاثيديوم والتي هي عبارة ع جزيئة مسطحة **planar molecule**ترتبط بالـ **DNA** ثنائي الشريط بواسطة التداخل **intercalation** بين أزواجه القاعدية. عندما تدخل الصبغة إلى منطقة الـ **DNA** الداخلية الكارهة للماء **hydrophobic interior**، والتي تتمثل بالأزواج القاعدية، فإنها تصبع أكثر تألقاً **more fluorescent**من الصبغة الحرة في المحلول. ويمكن رؤية هذا التألق باستخدام جهاز **UV transluminator** بطول موجي **360 nm-300**.

2. الموازن **balance**: وهو تركيب يشبه البوصلة، وهو ليس بالمكون الأساسي لوحدة الترحيل الكهربائي, لأنه يستخدم في معرفة مقدار الاتزان الحادث في المنضدة التي يوضع عليها الهلام . وذلك لأنه لو كانت المنضدة غير متزنة فان الهلام المرحل عليه ال **DNA**سيكون غير متساويا , وهذا يعمل على عدم توزيع التيار الكهربائي بصورة متساوية على الهلام وبالتالي فان عملية الهجرة لا تعكس الوزن الجزيئي الصحيح لجزيئات الـ**DNA**.

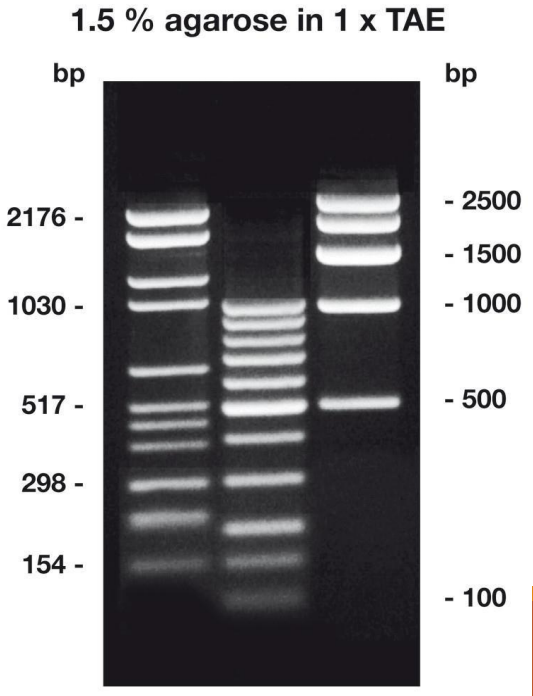
خطوات الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز

1. تلحم حافات وعاء صب الهلام بشريط شفاف, أو بالماسكات المتوفرة مع الوعاء. وتجري عملية اللحام عادة لمنع تسرب الهلام خلال عملية الصب، يوضع الوعاء بوضع افقي على الطاولة مع مراعاة حالة الاتزان الأفقي
2. تحضر كميات كافية من دارئ الترحيل الكهربائي، (مثل **TBE**) لملئ غرفة الترحيل الكهربائي ولتحضير الهلام.
3. أضف كمية مناسبة من مسحوق الاكاروز إلى كمية محسوبة من دارئ الترحيل الكهربائي في قارورة **Flask** ذات سدادة رخوة على أن لا يحتل حجم الدارئ أكثر من نصف حكم القارورة. يحضر هلام الاكاروز بتركيز 2% بإذابة 0.2 غرام من المسحوق في 100 مل من داكئ. TBE.
4. ملاحظة: من المهم استخدام نفس الدارئ في غرفة الترحيل الكهربائي وفي الهلام لان الاختلافات البسيطة في القوة الايونية **ionic strength** وفي الأس الهيدروجيني **pH** تخلق جبهات تلى الهلام تؤثر تأثيراً كبيراً على حركة جزيئات الـ**DNA**.
5. اغلق فتحة القارورة برخاوة. يجب التأكيد على رخاوة سداد القارورة. ثم سخن القارورة بحمام مائي بدرجة حرارة 100 مئوية الى ان يذوب الاكاروز
6. برد المحلول إلى درجة حرارة 60 مئوية، ثم تضاف صبغة بروميد الاثيديوم وتمزج جيداً(وضع 5 مايكرولتر من صبغة الاثيديوم بروميد ليصبح تركيزها النعائي 0.5 ملغرام/ مللتير). ان إضافة صبغة بروميد الاثيديوم لها جانبين احدهما إيجابي والأخر سلبي. أما الجانب الإيجابي فهو قدرة الباحث على تعقب موقع عينة الـ**DNA** في أي وقت من أوقت الترحيل الكهربائي. أما الجانب السلبي فيتمثل في احتمال تشوه عينات الـ**DNA** بسبب تداخل الصبغة في جزيئات الـ**DNA** وهذا قد يفقد جزيئات الـ**DNA** فعاليتها البايلوجية.
7. وضع المشط: يوضع المشط بارتفاع (0.5-1.0) **mm** فوق وعاء صب الهلام لكي تتكون حفرة كاملة عند إضافة الاكاروز. مع ملاحضة وجود مسافة كافية بين قاعدة الوعاء والمشط لان اقتراب المشط من قاعدة الوعاء سيزيد من احتمالية تمزق الهلام من الأسفل عند سحب المشط وبالتالي سيؤدي ذلك الى تسرب عينات **DNA** الى الأسفل ما بين الصفيحة والهلام.
8. اسكب محلول الهلام الساخن في وعاء الصب، ويكون الصب بهدوء تجنباً لحدوث فقاعات تؤثر على عملية الترحيل، ويجب ان يكون سمك الهلام ما بين (3-5) **mm**، افحص الهلام للتأكد من خلوه من الفقاعات **air bubbles** لان وجودها يعمل على تحطيم الـ**DNA** عند مروره بها.
9. بعد تصلب الهلام بشكل كامل (30-45) دقيقة بدرجة حرارة الغرفة. رفع المشط بحذر وترفع الماسكات أو الشريط عن وعاء الصب.
10. تخلط عينات **DNA** مع دارئ التحميل **loading buffer**.

1. توضع العينات الممزوجة مع دارئ التحميل باستخدام **micropipette** في الحفر ويوضع الوعاء في غرفة الترحيل.

2. اضف كمية كافية من دارئ الترحيل الكهربائي إلى أن يرتفع الدارئ بمقدار **1 mm** فقط عن الهلام. حيث ان ارتفاع الدارئ أكثر من ذلك سيؤدي الى تشويه حزم الـ**DNA** الناتجة فمثلا قد ينحرف شكل الحزمة الناتجة الى شكل مائل فتدعى الحزم بهذه الحالة باسم الحزم المبتسمة **smiled bands** أما إذا كان ارتفاع الدارئ اقل من **(0.5) mm** فان ذلك يؤدي الى جفاف الهلام وفشل عملية الترحيل الكهربائي.

3. يوضع الغطاء **lid** على غرفة الترحيل الكهربائي, ثم يوضع القطبين الكهربائيين بحيث يهاجر الـ **DNA** نحو الأنود (القطب الأحمر) وعند التوصيل الصحيح فان ذلك سيولد فقاعات.

4. بعد انتهاء الترحيل الكهربائي، يطفأ التيار الكهربائي, وتزال الأقطاب الكهربائية ويرفع الغطاء من غرفة الترحيل الكهربائي. يرفع وعاء صب الهلام

يوضع وعاء صب الهلام في غرفة جهاز **UV transluminator** , ليتم مشاهدة عينات الـ **DNA**