الأجهزة والأدوات المستخدمة في مختبر البيولوجي الجزيئي:

هناك العديد من الأجهزة المتخصصة في مختبر البيولوجي الجزيئي فضلا عن الأجهزة التقليدية في المختبرات علوم الحياة الأخرى ومنها:

أولا" جهاز النبذ المركزي: Centrifuge Apparatus

في هذا الجهاز يدار الجسم بحركة دورانية بسرع مختلفة وأثناء الحركة الدورانية تتولد قوة تسمى بالقوة المركزية Central Force والتي تحرك الجسم بعيدا عن مركز الدوران.

تكون الفائدة من ذلك فصل مكونات العينة السائلة بمعدل يعتمد على حجم وشكل وكثافة مكونات العينة، حيث تضغط الجزئيات الأكبر بالوزن باتجاه الأسفل (العمر) ليتكون الراسب Deposit ام السوائل فتبقى بالأعلى ل يجب موازنة جميع أنابيب النبذ المركزي المتقابلة وكلما زادت سرعة الجهاز كان لابد من الموازنة الدقيقة بحيث لا يتجاوز فرق الوزن في أجهزة النبذ المركزي عالية السرعة g0.0001 وإلا فهناك احتمال أن يترك الرأس موقعه. يتكون الرائق Supermatant

في البدء يجب ان يوضع الجهاز على سطح مستوي وان يكون بعيدا عن حافة السطح وبصوره عامة لابد من موازنة أنابيب النبذ المركزي باستمرار مهما كانت السرعة المستخدمة لان هناك احتمال كبير في تحطم الأنابيب الزجاجية المحتوية على المحلول في حالة عدم الموازنة حيث يجب أن يوضع الأنبوب مقابل الأنبوب الآخر كما ويجب الموازنة بالحجم .

يجب التذكر انه عند عمل جهاز النبذ المركزي فان الأنابيب تصبح بصورة أفقية تماما ولكن لا ينسكب السائل لأنه يكون منجذبا إلى المركز ولهذا يجب تجنب إيقاف الجهاز بصورة مفاجئة.

لحساب القوة المركزية النسبية (relative centrifuge force (ref يجب قياس نصف القطر (radius r) لذراع الدوران rotor arm بال (cm) وعدد الدورات بالدقيقة revolution per minute (rpm) ثم نطبق

المعادلة التالية:

يقاس الدوران بوحدتين:

?"x rx (rpm)10x 1.118ref=

عدد الدورات لكل دقيقة rpm :

والمقصود به عدد الدورات الكاملة (٣٦٠) درجة التي يكملها الجسم خلال دقيقة.

قوة الجاذبية الأرضية : gravitational force (g- force) :

والتي تشير إلى وحدة القوة المساوية للقوة المبذولة بواسطة الجاذبية الأرضية.

يتكون جهاز الطرد المركزي من الأتي:

عمود الدوران المركزي central spindle : وهو العمود الذي يدور بسرعة عالية.

الرأس head : وهو الجزء الذي يرتبط مع عمود الدوران المركزي لامساك أنابيب الطرد المركزي.

حامل الأنابيب tube holder : وهو مكان وضع الأنابيب الحاوية على المادة (المحلول) الذي سوف يطرد مركزيا".

يمكن تقسيم أجهزة النبذ المركزي إلى :

جهاز النبذ المركزي العادي المبرد: Cooling Centrifuges

تستخدم في فصل الخلايا الميكروبية حيث تفصل المواد استنادا إلى كثافتها ووزنها وتتراوح سرعتها بين – 0 6000rpm/min وبدرجة حرارة تتراوح بين ٣٠٠ – ٠ ، علما أن درجة الحرارة المستخدمة لفصل الخلايا هنا هي 4C ° ، أما حجم الأنابيب المستخدمة فيتراوح بين 100ml -5 .

أجهزة النبذ المركزي الدقيق : Microcentrifuge

هي أجهزة منضدية متخصصة إما أن تكون مبردة أو عادية تصل سرعتها إلى ١٥٠٠٠ دورة لكل دقيقة، وتستخدم أنابيب نبذ خاصة تسمى أنابيب ابندروف (Epindroff tubes) حجمها بين ml .. وهذه الأنابيب شائعة الاستخدام في مجال البيولوجي الجزيني وفصل البروتينات وتكون على شكل مخروطي وذات غطاء وهي من اللدائن الشفافة polypropylene حيث تمتاز بمقاومتها للمذيبات بأنواعها والحوامض المعدنية. تكون النهاية المخروطية لهذه الأنابيب مهمة لتركيز المادة المراد جمعها كونها ذات تركيز أو أوزان قليلة، وتستخدم في الطرق المصغرة لفصل المادة الوراثية لاسيما الدنا الخارجي Extrachromosomal DNA مثل البلازميدات.

3– جهاز النبذ المركزي عالي السرعة : High-speed cooling centrifuge

تمتاز بزيادة سرعة النبذ المركزي وتصبح الحاجة للتبريد أساسية وذلك لان زيادة السرعة يعني تولد حرارة عالية جدا، لذلك تصمم أجهزة النبذ المركزي عالية السرعة يكون التبريد أساسا فيها، وتصل سرعة هذه الأجهزة إلى ٢٠٠٠ دورة لكل دقيقة، وتستخدم فيها أنابيب ذات أحجام تتراوح بين ٥٠٠ml – ٥ وهي ليست منضدية وإنما أرضية حيث يتم موازنتها عند نصبها لتجنب ضررها وتستخدم هذه الأجهزة لفصل المواد استنادا إلى وزنها وكثافتها حيث تستخدم لفصل الدنا والرنا عند استخلاصهما من الخلية وكذلك لفصل

الجزيئات البروتينية كالأنزيمات والهرمونات والببتيدات الأخرى ويمكن فصل كميات جيدة بسبب السعة الكبيرة للأنابيب.

جهاز النبذ المركزي فائق السرعة : Ultra-centrifuge

تزيد سرعة هذه الأجهزة على ٥٠٠٠٠ دورة لكل دقيقة وتعمل تحت ظروف مبردة ويوجد فيها أجهزة خاصة لشفط الهواء الحار المتولد لدى الاحتكاك الغالي مع الرأس، تستخدم هذه الأجهزة في فصل قطع الدنا و البلازميدات وفي تنقية الدنا والرنا ويتم الفصل اعتمادا على الكثافة البيونية Bayonet density حيث لا تترسب قطع الدنا في قاع أنبوبة النبذ وإنما تتجمع القطع بنفس الوزن الجزيئي والكثافة والشكل الفيزياوي بشكل حزم تعرف من خلال الصبغة المستخدمة مثل Ethidium bromide

ثانيا : جهاز الترحيل الكهربائي : Gel electrophoresis Apparatus

توجد عدة أنواع من جهاز الترحيل الكهربائي ومنها :

الترحيل الهلامي الأفقي Horizontal GE

الترحيل الهلامي العمودي Vertical GE

الترحيل الهلامي الأنبوبي Tube GE

يستخدم هلام الاكاروز Agarose gel وهلام البولي اكريل امايد polyacrylamide gel مع آل Sodium (dodecyl sulfate (SDS أو بدونه مع الأجهزة المستخدمة في فصل جزيئات ألدنا DNA اعتمادا" على وزنهاالجزيئي وشكلها الفيزياوي

ثالثا: جهاز المطياف الضوئي : Spectrophotometer

يقرأ هذا الجهاز الامتصاصية Absorbance لكل مادة مذابة بأطوال موجية تتراوح بين 900 - 160 nm علما" أن أطوال الأشعة فوق البنفسجية تتراوح بين 400 - 160nm بينما أطوال الضوء المرئي تقع بين 900 – 400 nm. يقاس تركيز الـ DNA بطول موجي nm260 بينما يقاس تركيز البروتين بطول موجي nm280 .

رابعا: الكابينة البيولوجية : Biological cabinet

وتسمى أيضا" Laminar flow cabinet وهو حيز صندوقي مجهز بالإضاءة ومصدر للأشعة الفوق بنفسجية (UV-Light) ومنظومة لسحب الهواء وتعقيمه عبر مرشحات سليلوزية (0.5 - 0.2m) بما أن اصغر قطر للبكتريا هو (0.2um ()) لذلك يجب ان يكون حجم الثقب في المرشحات السليلوزية للكابينة البيولوجية المخصصة لزرع البكتريا (0.2m()) لكي لا تمر البكتريا عبرها.

يتم انجاز كل الفعاليات البيولوجية في هذه الكابينة لاسيما المتعلقة نمها بتجارب البيولوجي الجزيئي، الهندسة الوراثية والأحياء المجهرية.

خامسا" أجهزة التبريد والتجميد : Cooling & Freezing apparatus

تستخدم هذه الأجهزة الثلاجات (4°C) والمجمدات (4) – لحفظ العزلات الميكروبية والمواد الوراثية لفترات قصيرة أو متوسطة ثلاثة أشهر فقط وتحفظ المواد لفترات طويلة الأمد (سنوات) في مجمدات خاصة (80°C−) أو في سائل النتروجين Liquid nitrogen .

سادسا: أجهزة التجفيد : Freezing drying apparatus

وتسمى أيضا" Lypholizers وهي أجهزة تجمد المادة من خلال خفض درجة الحرارة وفي الوقت نفسه يتم تخفيف الضغط الجوي مما يؤدي إلى خروج قطرات الماء من المادة التي تحتفظ بشكلها الطبيعي ولا يوجد بداخلها حبيبات الثلج.

سابعا : جهاز الموجات فوق المغناطيسية : Microwave apparatus

وهو جهاز لتسخين الطعام باستخدام الموجات فوق الكهرومغناطيسية الأقصر من موجات الراديو. يقوم الجهاز بتسخين الطعام عن طريق إطلاق جزيئات كهرومغناطيسية تتحرك بسرعة كبيرة وتصطدم بجزينات الماء (الموجودة داخل الطعام مع يجعلها تفقد توازنها وتدور بسرعة حول نفسها جزيئات الماء كمعظم الجزيئات الأخرى لها شحنة موجبة في إحدى النهايتين وشحنة سالبة في النهاية الأخرى، ولهذا تدور حول نفسها لغرض الوصول إلى حالة التوازن ويؤدي دوران جزينه الماء إلى توليد طاقة تؤدي إلى دوران الجزيئات المحيطة بها مثل جزيئات البروتينات والكربوهيدرات والدهون وغيرها مما يؤدي إلى تسحين الطعام بسرعة. في حالة التسخين الاعتيادي على النار تتحرك الجزيئات المكونة للنار بسرعة فتصطدم بسطح الإناء الموضوع فيه الطعام وتجعل جزيئاته في حالة عدم توازن وهذه الجزئيات تحفز جزيئات الماء في الطعام على الحركة وهكذا. الفرق بين عملية التسخين بالمايكروويف والتسخين الاعتيادي هو قدرة الموجات الكهرومغناطيسية في بالمايكروويف على اختراق مناطق عميقة من الطعام مما يؤدي إلى تسخينه مما أدى إلى القول الشائع الخاطئ بان (المايكروويف يسخن الطعام من الداخل إلى الخارج). بصورة عامة يغلي الماء النقي بسرعة كبيرة في المايكروويف بينما الطعام المجمد يحتاج وقت أكثر لان جزينات الماء تحتاج وقت لتتحرك وتحتاج جزيئات الدهون فترة طويلة ليتم تسخينها.

ثامنا : الميزان : Balance

هو جهاز يستخدم لتحديد كتلة (mass (المادة الكيميائية . إن الكتلة . mass تمثل مقدار أو مقياس المادة المكونة للشيء.

أما الوزن weight مقدار أو مقياس قوة الضغط الجوي والجاذبية الأرضية على الكتلة المكونة للشيء.

هناك عدة أنواع من الموازين منها:

الميزان الكبير : Large balance

يستخدم لقياس المادة الموجودة على ظهر الشاحنة (truck) ويكون بألاف الكيلو غرامات.

الميزان متوسط الحجم : Medium sized balance

يستخدم لقياس المادة بمئات الكيلو غرامات.

يستخدم لقياس المادة بمئات الكيلو غرامات.

الميزان التحليلي : Analytical balances

يستخدم هذا النوع لقياس المواد الكيمياوية بأجزاء من الغرام (بالمائة ، بألف) جزء من الغرام وهو ما شائع استخدامه في المختبرات العلمية.

طريقة استخدام هذا النوع تتم بتشغيل الميزان "أولا وذلك بإيصاله بالتيار الكهربائي ثم تنظيف السطح بشكل جيد وبعدها يتم وضع ورقة اختبار نظيفة على السطح ثم يصفر الجهاز وتوضع المادة المراد تحديد وزنها بهدوء لضمان عدم انسكابها خارج الميزان وبعد تحديد الوزن يصفر الجهاز ويطفئ لحين الاستخدام الآخر.

تاسعا : الحاضنة : Incubator

إن الفكرة أو المفهوم الأساسي للتحضين يشير إلى توفير والمحافظة على الظروف البينية التي نحتاجها لنمو وتطور الخلايا ، الأنسجة ، البيوض ، الكائنات الحية الدقيقة. الوظيفة الأساسية للحاضنة هي المحافظة على الجزء الذي يتم تنميته وتوفير الظروف المطلوبة من درجة حرارة ورطوبة وجو معقم بشكل تام وبعضها يوفر الأوكسجين وال 2CO طريقة استخدام الحاضنة تتضمن تشغيلها في وقت مبكر وضبطها على الدرجة الحرارية المطلوبة أي قبل إجراء التجربة وذلك لضمان الحصول على درجة الحرارة المطلوبة عند تنفيذ التجربة، ثم توضع المادة المطلوبة وتغلق الحاضنة وبد انتهاء التجربة يتم إطفائها.

عاشرا : جهاز المزج : Mixer

هناك بعض المواد (المحاليل) تحتاج عملية مزج لمكونات المحلول حيث ان بعضها لا يؤدي الغرض المطلوب إذا لم تتم عملية المزج.

تتضمن عملية الاستخدام تشغيل الجهاز ثم تعيين الوقت المناسب والسرعة المناسبة وبعدها توضع العينة في المكان المخصص لإجراء عملية المزج.

احد عشر : جهاز مقياس الحموضة : (pH meter)

هو جهاز لقياس الرقم الهيدروجيني ph للمحاليل الكيميائية.

هو مقياس يعبر عن درجة تركيز أيونات في المحلول ومقدار تأينها في الماء (الرقم الهيدروجيني pH للمحاليل الكيميائية) وغالبا ما تتراوح النتائج بين الحامضي والقاعدي، اما نقطة التعادل فهي غالبا تعاير مع الماء المقطر = ٧. اولا : معايرة درجة الحموضة

قم بتذويب قرص و حد من اقراص بفر 4 = ph في ١٥٠ مل من الماء المقطر.

علما يوجد محاليل جاهزة من 7ph و 4ph

ملاحظة:

في كل عبوة من أقراص pH تحتوى على طريق تحضير محلول المعايرة و كمية الماء المقطر التي تحتاجه

ادخل طرف مجموعة الالكترود في مقبس. mv / pH

حرك مفتاح التشغيل الى الوضع. pH

اغمس الالكترود في ماء مقطر لبضع ثواني ثم انقله الى محلول بفر 7 =pH

اضبط مفتاح al7pH تحصل على قراءة صحيحة تساوي 7.00 =pH

انقل الالكترود من المحلول و غمسه في ماء مقطر لبعض ثوان ثم اغمسه في محلول بفر 4=pH اضبط مفتاح call 4=pH حتى تحصل على قراءة صحيحة. 00، 4 =pH

اثنا عشر الحمام الماني الرقمي : Digital water bath

في ظل التقانه الحديثة التي أدخلت على المختبرات المدرسية بات العالم الرقمي هو العالم السائد بحيث أصبحت معظم الأجهزة المخبريه رقمية وتملك من الكفاءة والجودة للرقي بمختبراتنا وفنينا في جهازنا اليوم الحمام الماني الرقمي وكان الجهاز السابق له يحمل مسمي) الحمام الماني الكهرباني كان الجهاز يدوي ويعمل بالطريقة التقليدية سلسله من الانتقالات والتطويرات التي أدخلت على الأجهزة المختبرية في جهازنا اليوم ستتمكن من التعامل معه بكل سهولة ومتعة ما يمكنك من الحصول على نتائج صحيحة في وقت قياسي.

طريقة عمل الجهاز

يملئ الحوض بالماء إلى أن يغطي السخان بالكامل والمستشعر.

. قم بتوصيل الكابس بالتيار الكهربائي.

. قم بتشغيل مفتاح التشغيل رقم (١).

. قم بضبط مفتاح الأمان رقم (٥) الخاص بدرجة الحرارة ويفضل أن تكون أعلي بقليل من درجة الحرارة المطلوبة.

المحاليل:

اولاً : طرائق تحضير المحاليل في المختبر :

يحتاج العاملون في المختبرات العلمية الى العمل بمحاليل أما أن تمتلك نسبة مئوية أو ثابتة أو انها ذات تركيز معين وعليه فمن الواجب الإلمام بها ومعرفة كيفية

تحضيرها. وقبل التطرق الى أنواع المحاليل لابد من فهم بعض التعاريف مثل:

تركيز المحلول: هو نسبة كمية مادة ما في وحدة الحجم أو وحدة الوزن لمادة أخرى ويستعمل الوزن الجزيئي الغرامي Gram molecular wight) لتحضير المحاليل بتراكيز مختلفة.

الوزن الجزيئي: هو مجموع الأوزان الذرية للعناصر المكونة لأي مركب أو مادة وهو يساوي وزن عدد معين من الجزيئات ويعرف بعدد أفوكادرو (Avogadros number ويساوي 6.02×10^{23}.

الوزن المكافئ الغرامي (Gram equavlent wight): هو عبارة عن عدد غرامات العنصر أو المركب التي تتحد أو تحل محل غرام واحد من الهيدروجين أو ثمانية غرامات من الأوكسجين أو الوزن المكافئ الغرامي لأي عنصر أو مركب.

اذ ان التكافؤ هو عدد ذرات العنصر التي تحل محل الهيدروجين للعنصر أو المركب

$$HCl + K \longrightarrow KCl + H$$

اذ أن الوزن المكافئ الحامض HCl في هذه الحالة = $\frac{\text{الوزن الذري}}{\text{التكافؤ}}$

$$= \frac{36.5}{1} = 1$$

وكذلك

$$H2SO4 + Na2O \longrightarrow Na2SO4+H2$$

أنواع المحاليل المستعملة وطرائق التعبير عن تراكيزها

محاليل النسبة المئوية وتشمل :

محاليل النسبة المئوية – الوزنية (W/V) (wight/volume) (وزن الحجم) فالمحلول الذي تركيزه 1% (W/V) معناه إذابة 1 غم من المادة ويكمل الحجم الى 100 مل من المادة المذيبة. ويستعمل هذا النوع من المحاليل في حالة إذابة بعض المواد مثل السكروز والأكاروز للوسط الغذائي. فمثلاً في حالة التركيز المطلوب من السكروز للوسط الغذائي هو 3% (W/V) معناه إذابة 30 غم من السكروز في لتر من الوسط الغذائي.

محاليل النسبة المئوية الحجمية (V/V) (volume/volume) (حجم/حجم) فالمحلول الذي تركيزه 10% (V/V) معناه خلط 10مل من المادة الأولى مع 90 مل من المادة الثانية وتستعمل هذه الطريقة للتعبير عن التراكيز في حالة إضافة المستخلصات الطبيعية مثل حليب جوز الهند وعصير الطماطة والبرتقال الى الاوساط الغذائية فعندما يراد تحضير حليب جوز الهند بتركيز 5% (V/V) في الوسط الغذائي فهذا يعني اضافة 50مل منها في لتر الوسط الغذائي .

المحاليل المولارية Molar solutions:

هو المحلول الناتج من إذابة وزن جزيئي غرامي واحد من المركب (المذاب) في لتر من الماء المقطر (المذيب) فنحصل على محلول 1 مولاري أو 1 عياري فمثلاً ملح كبريتات المغنسيوم MgSO4.7H20 تتبع ما يلي: نحسب الوزن الجزيئي لهذا المركب بجمع الأوزان الذرية لذرات العناصر المكونة له فيكون

32+24+(4×16)+(187) 246 غم مول

أي يذاب 246غم من هذا المركب في حجم معين من الماء المقطر ويكمل الحجم الى لتر فنحصل على محلول 1 مولاري (M1).

س / حضر محلول 0.05 من كبريتات المغنسيوم $MgSO4.7H_20$

ج / $246 \times 0.05 = \frac{5}{100} \times 246 = 12,3$ غم /مول

يذاب 12.3 غم من كبريتات المغنسيوم في حجم معين من الماء المقطر ويكمل الحجم الى لتر فنحصل على محلول 0.05 مولاري (0.05)

كيفية تحويل التراكيز المولارية الى mg/L وبالعكس

في حالة كون التراكيز ملغم لتر والمطلوب تحويلها الى مايكرومول نتبع مايلي:

يحسب الوزن الجزيئي للمركب.

يحول التركيز ملغم الى غرام بالقسمة على 1000.

يقسم الوزن غرام / لتر على الوزن الجزيئي فنحصل على التركيز بالمول - Mole

نضرب الناتج بمليون ونحول الـ M الى AM (مايكرومول).

مثال

ما تركيز Kinetin بالمايكرومول في حالة وجوده في وسط غذائي

بتركيز 1.0 ملغم/لتر.

في حالة الحوامض والقواعد يؤخذ التكافؤ بنظر الإعتبار عند تحضير المحاليل العيارية إذ يتم الإعتماد على الوزن المكافئ الغرامي

مثال: حضر محلول 1 عياري (1N) NaOH .

الحل:

الوزن الجزيئي لـ $Ca(OH)_2$ = 74 غم/ مول

الوزن المكافئ لـ $Ca(OH)_2$ = $\frac{\text{الوزن الجزيئي}}{\text{التكافؤ}} = \frac{74}{2} = 37$غم/مول

يوزن 37 غم من $Ca(OH)_2$ ويذاب في حجم معين من الماء المقطر ويكمل الحجم الى لتر فنحصل على محلول 1 عياري.

استخلاص الحامض النووي الدنا DNA extraction

يشكل الحامض النووي الدنا نسبة صغيرة من مكونات الخلية وعادة ما يوجد في أماكن محددة ومعروفة من الخلية. في الخلية بدائية النواة Procaryotic cell يوجد الدنا بشكل مكثف ومتمركز في مكان يدعى المنطقة النووية Nucleoi والتي لا تنفصل عن بقية مكونات الخلية بغشاء خلوي. اما في الخلية حقيقة النواة Eucaryotic cell فيوجد الدنا في مكان محدد وهو النواة والتي تنفصل عن بقية اجزاء الخلية الأخرى بغشاء خلوي، حوالي ٩٠% من الدنا يوجد في النواة ضمن الكروموسوم ويسمى الدنا النووي Nuclear DNA اما البقية فيوجد في المايتوكوندريا ويسمى الدنا المايتوكونديري Mitochondrial DNA وفي البلاستيدات الخضراء ويسمى الدنا البلاستيدي . Chloroplast DNAاما في الفيروسات فيوجد المنا محاط بالغلاف البروتيني ويشكل ٣٠-٥٠ من الكتلة الكلية للفايروس. كمية الدنا الموجودة في الفايروس قلية

جدا بالمقارنة مع كميتة الدنا الموجودة في الخلايا الحقيقية والبدائية النواة.

تعد عملية استخلاص الدنا من العمليات الضرورية للحصول على نموذج الدنا، واياً كان مصدر الاستخلاص (بكتريا خلايا نباتية، خلايا حيوانية) فان عملية الاستخلاص تتضمن ازالة الشوائب للحصول على الدنا نقيا. ان عملية استخلاص الدنا من الكائنات الحية مهمة جدا وتمثل الخطوة الأولى والأساسية للعديد من التجارب والفحوصات المختبرية الوراثية الأخرى يمكن ان تعرف عملية الاستخلاص بشكل عام بأنها عملية الحصول على مادة محددة من المجموع الكلي للمواد الأخرى بواسطة التاثير الفيزيائي أو الكيميائي. ان استخلاص الدنا في حالات كثيرة تمثل المطلب الاساسي للعديد من T العمليات الجزيئية الأخرى.

الاهداف الرئيسية لاستخلاص الدنا هي:

1- فصل الدنا من كل مكونات الخلية الأخرى ضمن خطوات متسلسلة، ويجب أن يكون هذا الدنا نقيا" وبدون اي ملوثات من بروتينات او كربوهيدرات او RNA والخ. يمكن فصل الدنا عن المكونات الأخرى لان وزنه الجزيئي عالي مقارنة بالجزيئات الأخرى.

2- الحصول على تركيز أو كمية كافية من الدنا لإجراء التجارب الأخرى المطلوبة.

3- تحضير دنا ذو نقاوة عالية وخالي من الملوثات الأخرى

4- تحضير دنا ذو وزن جزيئي عالي (HMW) وتسمى هذه العملية Integrity والذي يتراوح بين 50 – 200 Kbp

تعد مبادئ عزل واستخلاص الدنا من الكائنات الحية واحدة لجميع الطرق لذلك فان جميع الطرق المستخدمة لاستخلاص الدنا تتضمن الخطوات الأربعة التالية:

1- تحضير المستخلص الخلوي تكسير الخلايا

تكسير الجدران والأغشية الخلوية لتسهيل خروج الدنا وبقية مكونات الخلوية الأخرى ودون التعرض لأي أضرار أخرى.

هناك العديد من الطرق المستخدمة في تكسير الجدران والأغشية الخلوية مثل الطحن grinding المزج او الخلط

blending الضغط العالي high pressure كل هذه الطرق تسمى التكسير الميكانيكي والتي تعطي قوة عالية لتكسير الجدران أو الأغشية الخلوية. تكسير الخلايا النباتية يتم باستخدام النتروجين السائل الذي يكون ذو درجة حرارة واطئة جدا ١٧٦ تحت الصفر مع الهاون mortar والذي توضع فيه العينة والصدقة أو يدة الهاون pestle والذي يستخدم للسحق الخلايا الحيوانية فانها تمزج او تفرم الزيادة المساحة السطحية. اما الخلايا البكتيرية فلا تحتاج لمثل هذه العمليات تكسير الخلايا يتم باستخدام الطرق الكيميائية المنظفات ((detergentsو / أو باستخدام الطرق الانزيمية.

المنظفات تعمل على إذابة اللبيدات الموجودة في الاغشية الخلوية بالإضافة الى أنها تملك تأثير تثبيطي لأنزيمات DNases التي تعمل على تحليل ال DNA ويمكن ان تمسخ البروتينات وبذلك تساعد في ازالة البروتينات من المحلول الاغشية الخلوية تحطم او تحلل باستخدام محلول الاستخلاص والذي يحتوي على EDTA و SDS في اغلب الاحيان. ال EDTA يعمل على ازالة ايونات Mg والتي تمثل الدعامة الأساسية في حفظ التركيب الكلي للغشاء الخلوي .

اما ال SDS فانه يساعد في تحطيم الأغشية الخلوية بإزالة اللبيدات من تلك الاغشية.

تنقية الدنا من المستخلص الخلوي Purification of DNA from cell extract

بالإضافة إلى الدنا يحتوي محلول المستخلص الخلوي كميات من البروتينات والحامض النووي الرنا RNA لذلك يجب التخلص من هذه الملوثات للحصول على الدنا بشكل نقي.

إزالة البروتينات Removal of Protein :

يتم فصل الدنا عن المكونات الخلوية الأخرى باستخدام العديد من عمليات إزالة البروتينات والتي تسمى Deproteinization Process من خلال استخدام معاملات بروتينية وأنزيمية . يتم ازالة البروتينات من المحلول بالاعتماد على الصفات (الخواص الفيزيائية للبروتينات والأحماض النووية والتي تمثل الاختلاف في عملية الذوبان، وهناك طريقتين

لإزالة البروتينات من المحلول هي:

إزالة البروتينات باستخدام المذيبات العضوية

معظم الطرق المستخدمة لإزالة البروتينات تعتمد على الاختلاف في ذوبانية الأحماض النووية والبروتينات المذيبات العضوية. الأحماض النووية جزيئات محبة للماء hydrophilic molecules وتذوب بسهوله ضمن المحلول (الطبقة) المائية، أما البروتينات فانها تحتوي على بقايا (جذور) كارهة للماء تجعلها تذوب في المذيب العضوي أشهر المذيبات العضوية المستخدمة في ازالة البروتينات هي الفينول phenol والكلوروفورم chloroform المضاف اليه كمية قليلة.

الفينول مادة بلورية في درجة حرارة الغرفة، يتحول الى سائل باذابته في محلول Tris-HCL ذو اس هيدروجيني . ان البروتينات تحتوي على بقايا (جذور) كثيرة كارهة للماء متمركزة في وسط الجزيئة، وجزيئات الفينول من ناحية أخرى كارهة جدا للماء عليه عندما يتم مزج محلول المستخلص الخلوي مع حجم مماثل من محلول الفينول فان بعض جزيئات الفينول تميل الى الذوبان في لب (وسط مركز) جزئية البروتين بدلا ذوبانها في الماء وبالتالي تنتشر جريئة الفينول في وسط جزيئة البروتين وأخيرا تجعلها تنتفخ ثم تنفجر أو تمسخ . denatureجزيئات البروتين الممسوخة تذاب ضمن طبقة الفينول أما جزيئات الأحماض النووية والتي لا تملك الجزيئات الكارهة للماء فإنها تبقى ضمن الطبقة المائية العلوية . ضمن هذه المرحلة لا يستطيع الفينول إزالة كل البروتينات من المحلول وعليه تكرر عملية الاستخلاص بالفينول مرة ثانية لإزالة كل البروتينات الموجودة ضمن المحلول مع كل مرحلة استخلاص يتم فقدان حوالي ٢٠% من جزيئات الدنا وبما ان الفينول مادة سامة Toxic وعملية تحضيره مزعجة لانه ذو رائحة كريهة لذلك يفضل استخدام الطرق الانزيمية في إزالة البروتينات.

أما الكلوروفورم فانه لا يذوب في الماء ولا تفقد جزئيات الدنا حتى عندما تعاد عملية الاستخلاص به عدة مرات فعالية الكلوروفورم في إزالة البروتينات The deproteinization action of chloroform مبنية على قدرة الكلوروفورم على مسخ البروتينات وجعلها تدخل ضمن الطبقة الوسطى المتكونة بينه وبين الماء the water-chloroform interphase ونتيجة لذلك يرتفع تركيز البروتينات ضمن الطبقة الوسطى مما يؤدي الى ترسيبها. بما أن فعالية الكلوروفورم في إزالة البروتينات تحصل ضمن الطبقة الوسطى المتكونة بينه وبين الماء لذلك فإن فعالية الكلوروفورم تزداد بزيادة المساحة السطحية، لانجاز ذلك يتكون اولا شكل مستحلب من الكلوروفورم والماء، ونظرا لان الكلوروفورم لا يستطيع الاختلاط أو الامتزاج مع الماء بالشكل الاعتيادي لذلك يتم التحريك (الاهتزاز) القوي vigorous shaking للمزيج لانجاز ذلك، وفي بعض الاحيان يضاف ال isoamyl alcohol ليساعد في تكوين المستحلب وزيادة المساحة السطحية للماء والكلوروفورم .

إزالة البروتينات باستخدام الأنزيمات

يمكن ان تزال البروتينات من مزيج المستخلص الخلوي باستخدام الانزيمات والتي من اكثرها استخداما" ال proteinase K و pronase ، كلا الأنزيمين ثابتة جدا وتستخلص من الفطريات بشكل طبيعي ويمكن ان تحضر بشكل صناعي وتمتاز بكونها خالية من انزيمات DNase ولكن تكون غالية الثمن هذه الانزيمات تكون فعالة جدا بوجود تراكيز واطئة من المنضفات السالبة anionic detergent وتراكيز عالية من الاملاح وال EDTA ومدى واسع من الأس الهيروجيني (6.0–10.0) ودرجة الحراة المثلى لها (67–50) لذلك تستطيع ان تحطم البروتينات بدون ان تحتاج الى عوامل مساعدة.

المشكلة في استخدام هذه الانزيمات انها تستطيع ان تزيل ٨٠–٩٠ من البروتينات الموجودة وهذا يعود الى ان تحطيم البروتينات يعتمد على تركيز الانزيم والمادة الاساس عمليا" معدل ازالة البورتينات the deproteinization rate يعتمد فقط على تركيز المادة الأساس ((substrateللانزيم بسبب انه ليس عمليا" ان تضاف كمية كبيرة من الانزيم لتسريع التفاعل عند تركيز منخفض من المادة الاساس، وكاي تفاعل كمياتي فان تركيز المادة الاساس يقل كلما تقدم وقت التفاعل، لمعالجة هذا التباطؤ ولاكمال الانزيم عمله إلى نهاية الوقت المحدد يتم استخدام تركيز عالي من الانزيم والمادة الاساس حيث ان الانزيم يستطيع

ازالة ٨٠–٩٠% من البروتينات ضمن الوقت المعقول. هذه المشكلة يمكن ان تعالج باستخدام احد المذيبات العضوية في الاستخلاص ولمرة واحدة فقط.

إزالة الحامض النووي Removal of RNA :

ازالة الحامض النووي الرنا خلال عملية استخلاص الدنا باستخدام الانزيمات ولكن هذه الانزيمات لا تزيل كل الرنا الموجود ولذلك نلاحظ بقاء كمية قليلة منه مع الحامض النووي الدنا. من افضل وارخص الانزيمات المستخدمة لهذا الغرض هي ribonuclease A and ribonuclease 1 والتي تستطيع ان تحطم جزيئة الرنا وخاصة عند القاعدة السايتوسين C و اليوراسيل U .

بعد استخدام المذيبات العضوية او الانزيمات في تحطيم البروتينات وازالة الحامض النووي الرنا يتم ترسيب البروتينات الممسوخة باستخدام الترسيب الميكانيكي الطرد المركزي ((Centrifugationوالذي يتم إجراءه بعد التحضين في الحمام الماني Water Bath مباشرتا" او احيانا يسبق عملية الطرد المركزي اضافة محلول يهدروكسيد الصوديوم ذو التركيز العالي ٥ – ٦) مولاري) حيث يؤدي ذلك الى ترسيب البروتينات وبقية المكونات الخلوية ضمن الطبقة السفلى (الأثقل) اما الدنا فيبقى ضمن الطبقة المائية بشكل ذائب ويحتاج الى عملية ترسيب.

ترسيب الحامض النووي الدنا precipitation of the DNA :

يتم ترسيب الدنا الموجود ضمن الطبقة المائية بتركيزه (تجميعه) باستخدام نوعين رئيسين من الكحول وهما الايثانول جزيئات الماء القطبية Polar تحيط بجزيئات الدنا في المحلول الماني aqueous solution ، عملية ذوبان الدنا في الماء تحصل عن طريق تفاعل قوي بين الشحنة السالبة لمجموعة الفوسفات لجزيئة الدنا مع الشحنة الموجبة لجزيئة الماء مما يؤدي الى ذوبان الدنا في الماء.

ترسيب الدنا بالكحول يعتمد على اساس تقليل ذوبانية الدنا في الماء، حيث يتم اضافة الكحول الى المحلول الماني والذي يعمل على تجميع خيوط الدنا ضمن المحلول المائي بسحب جزيئات الماء منها. بعدها يتم سحب خيوط الدنا المتجمعة والتي عادةً تكون باللون الابيض باستخدام الخطاف Hook باستخدام عملية الطرد المركزي لترسيب خيوط الدنا في اسفل انبوبة
الاختبار.

عندها يتم اضافة محلول ethanol 70% بمقدار 2 مل الى الدنا المترسب وتحريكه بهدوء لغرض غسل الدنا وازالة بقية الاملاح المترسبة معه. بعد ذلك نرسب الدنا من هذا المحلول باستخدام عملية الطرد المركزي وتترك انبوبة الاختبار مفتوحة لمدة نصف ساعة لتجف خيوط الدنا بشكل تام وتتطاير بقايا جزيئات الايثانول. أخيرا" يتم اذابة الدنا المترسب باضافة محلول TE او الماء المقطر وبمقدار ١٠٠-٥٠٠ مايكروليتر حسب كمية الدنا المترسب ثم يترك المحلول الاخير الى اليوم التالي بدرجة حرارة الغرفة لغرض ذوبان الدنا ضمن المحلول بشكل تام ويفضل التحريك اذا توفر ذلك Isopropanol والايزوبر وبانول ethanol.

جزيئات الماء القطبية Polar تحيط بجزيئات الدنا في المحلول الماني aqueous solution ، عملية ذوبان الدنا في الماء تحصل عن طريق تفاعل قوي بين الشطة السالبة لمجموعة الفوسفات الجزيئة الدنا مع الشحنة الموجبة لجزيئة الماء مما

يؤدي الى ذوبان الدنا في الماء.

ترسيب الدنا بالكحول يعتمد على اساس تقليل ذوبانية الدنا في الماء ، حيث يتم اضافة الكحول إلى المحلول المائي والذي يعمل على تجميع خيوط الدنا ضمن المحلول الماني بسحب جزيئات الماء منها. بعدها يتم سحب خيوط الدنا المتجمعة والتي عادتا" تكزن باللون الابيض باستخدام الخطاف Hook باستخدام عملية الطرد المركزي لترسيب خيوط الدنا في اسفل انبوبة

الاختبار.

عندها يتم اضافة محلول thanol 70 % بمقدار مل الى الدنا المترسب وتحريكه بهدوء لغرض غسل الدنا وازالة بقية الاملاح المترسبة معه. بعد ذلك ترسب الدنا من هذا المحلول باستخدام عملية الطرد المركزي وتترك انبوبة الاختبار

مفتوحة لمدة نصف ساعة لتجف خيوط الدنا بشكل تام وتتطاير بقايا جزيئات الايثانول.

اخيرا" يتم اذابة الدنا المترسب باضافة محلول TE او الماء المقطر وبمقدار ١٠٠-٥٠٠ مايكروليتر حسب كمية الدنا المترسب ثم يترك المحلول الاخير الى اليوم التالي بدرجة حرارة الغرفة لغرض ذوبان الدنا ضمن المحلول بشكل تام ويفضل التحريك اذا توفر ذلك.

تقدير تركيز نقاوة الدنا Determination of the Purity and Quantity of DNA :

المرحلة الأخيرة في اي عملية استخلاص للاحماض النووية ((DNA NAهي تقييم النتيجة، بالنسبة للدنا يتضمن ذلك تقدير نقاوة الدنا وتركيزه. يتم تقدير تركيز ونقاوة الاحماض النووية باستخدام التقدير الطيفي باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer System تستعمل طريقة الامتصاص عند الطول الموجي ٢٦٠ لقياس كمية الدنا او الرنا أو كليهما في محاليلها وهي طريقة سريعة وسهلة ودقيقة لقياس كمية الأحماض النووية.

تستعمل كمية الامتصاص (الكثافة الضوئية (Optical Densityعند الطول الموجي ٢٦٠ نانوميتر لقياس كمية الدنا لان الحامض النووي الدنا يملك اعلى امتصاص للكثافة الضوئية عند هذا الطول الموجي واقل امتصاص عند الطول الموجي ٢٣٠ نانوميتر . اما كمية الامتصاص عند الطول الموجي mnm فتستخدم لتقدير كمية البروتينات الموجودة ضمن محلول الدنا. ان كثافة ضوئية قدرها 1 تقابل ٥٠ مايكروغرام من الدنا لكل 1 مل (50 (ug/mlبينما تقابل ((40 g/mlللحامض النووي الرنا.

تتصف المحاليل النقية للدنا أو للرنا بقيمة الكثافة الضوئية للطولين الموجيين ٢٦٠ مقسومة على ٢٨٠ وهي ١،٨ للدنا و ٢ للرنا وتقل القيمة في حالة وجود ملوثات النموذج الحامض النووي كالبروتينات وغيرها.

طريقة العمل:

١. يفضل استخدام محلول منظم في عملية القياس وافضلها محلول TE ويفضل الابتعاد عن استخدام الماء المقطر لانه قد يؤدي الى انفصال شريطي الدنا.

٢. يستعمل المذيب نفسه المستعمل في الاذابة في تصفير جهاز المطياف الضوئي.

٣. تملئ حاوية النموذج Cuette بمقدار ١٠ من المذيب ثم يضاف له ٢٠ من نموذج الدنا ويمزج بشكل جيد ثم تقرأ الكثافة الضوئية على الطول الموجي ٢٦٠ و ٢٨٠ نانومتر.

٤. تقسم قيمة القراءة عند ٢٦٠ على قيمة القراءة عند ال ٢٨٠ وتمثل القيمة الناتجة مقدار قيمة نقاوة الدنا وتمثل القيمة اعلى نقاوة للدنا، اذا انخفضت القيمة عن ذلك فهذا يشير الى وجود ملوثات مع الدنا ومن ابرزها البروتينات، اما اذا ارتفعت اعلى من ٢ فإن ذلك يشير الى وجود الحامض النووي الرنا.

٥. يتم تقدير تركيز الدنا في المحلول من خلال تطبيق المعادلة التالية:

$$\text{DNA } \mu g/mL = OD260 \times 100 \text{ (Dilution Factor)} \times 50$$

ال ١٠٠ تمثل معامل التخفيف للعينة وال ٥٠ تقابل ٥٠ مايكروغرام من الدنا لكل كثافة ضوئية قدرها 1.
واذا اردنا ان تحصل على تركيز الدنا بالمايكروغرام لكل ميكرولتر) (g/lويتم قسمة المعادلة اعلاه على ١٠٠٠.

الترحيل الكهربائي للدنا في هلام الاكاروز :

اكتشفت هذه التقنية في السبعينات من القرن الماضي وقد عوضت عن تقنية المحلول المتدرج الكثافة Ultra-Centrifugal
Sucrose Gradient ، والتي تتضم. وضع محلول الدنا فوق مطول متدرج الكثافة من السكروز ثم تجرى عملية نبذ مركزي فائق السرعة، بحيث تتكون حزم حسب تدرج كثافة السكروز حيث أن مرورها سيكون حسب أطوالها وأوزانها
الجزيئية من مساوئ هذه التقنية المتدرجة الكثافة هي صعوبة فصل القطع التي تكون متقاربة بالأطوال والأوزان الجزيئية واستخلاصها كما إن تنقية القطع من السكروز يحتاج إلى عملية طويلة لذلك تم استبعاد هذه الطريقة تماما" بعد إمكانية
استخدام تقنية الترحيل الكهربائي. يمثل الفصل باستعمال الترحيل الكهربائي في الهلام احد أكثر التقنيات البسيطة والمهمة في
فصل وتنقية وتعريف الدنا والرنا. إن الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis طريقة قياسية سريعة وبسيطة لفصل وتشخيص وتنقية قطع الدنا خلال مرورها ضمن الهلام وتستخدم :

لفصل مزيج من قطع الدنا DNA ، الرنا RNA ، البروتين Protein
الحساب الوزن الجزيئي للجزيئات المفصولة من الهلام مقارنة مع مؤشر Marker ذو وزن جزيئي معلوم.

أنواع الهلام المستخدم في الترحيل الكهربائي

هلام الأكاروز

إن هلام الاكاروز المستخدم بشكل واسع في هذه التقنية عبارة عن سلسلة متشابكة من السكريات المتعددة المكونة من

الكالكتوز ومشتقاته والمرتبطة مع بعضها بأواصر هيدروجينية لتكوين شبكة معقدة Complex Net تعتمد فتحاتها Pore على تركيز الاكاروز فكلما كان التركيز عاليا كلما كانت الفتحات اصغر والعكس صحيح، يتضح من ذلك ان قابلية الهلا على فصل القطع تعتمد على تركيزه فكلما زاد التركيز كلما زادت قابلية الفصل. إن تركيز هلام الاكاروز يتراوح بين 0.5 – 2 وبطول ١٢ سم ، والأكثر استخداما" هو 1 – 0.7 والذي يستخدم لفصل قطع دنا كبيرة الوزن الجزيئ 20kbp - 200bp .

هلام اكريل امايد متعدد

هو عبارة عن ناتج ارتباط مادة الاكريل امايد المتبلورة مع مادة بز اكريل امايد Bisacrylamide لتكوين شبكة معقدة ذات ثقوب اصغر قطرا" من تلك الموجودة في هلام الاكاروز، ولهذا السبب فان هلام اكريل امايد متعدد أكثر ملائمة في فصل قطع الدنا الأصغر والتي تتراوح بين 2000 – 1 ، ويكون التركيز الأفضل للاكريل امايد متعدد هو ٧,٥% ولكن من مساوئ هذا النوع من الهلام (الطريقة (انه أصعب وذو كلفة عالية بالمقارنة مع الاكاروز.

هلام الأكاروز

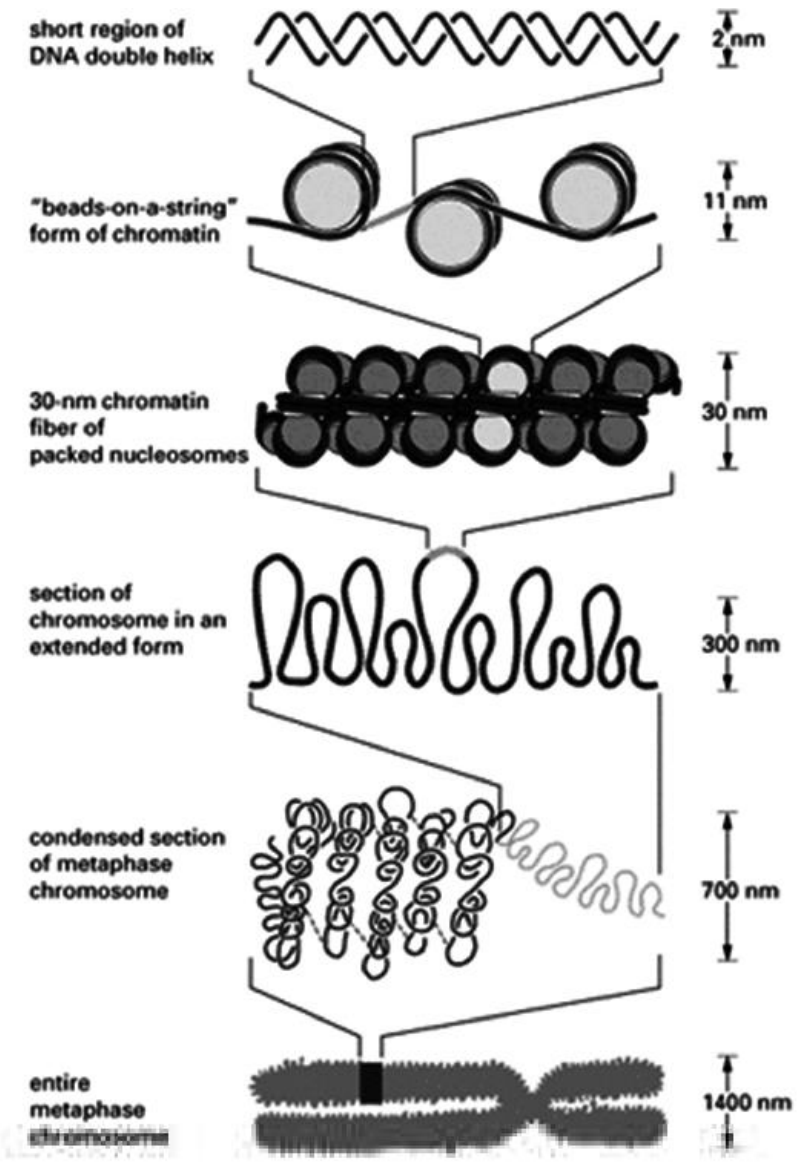
أن مبدأ هذه العملية يعتمد على مرور الجزيئات خلال وسط (حقل) كهربائي يجهز بالشحنات السالبة من أحد الأطراف وبالشحنات الموجبة من الطرف الآخر وبذلك سوف تحصل حركة دائرية للشحنات الكهربائية، بما أن جزيئة الدنا تملك الشحنة السالبة نتيجة لوجود مجموعة الفوسفات لذلك يجب ان تكون الحفر Wells التي ستوضع بها عينة الدنا من جهة القطب السالب لكي تتحرك جزيئة الدنا باتجاه القطب الموجب نتيجة لانجذاب الشحنات السالبة نحو الموجبة مما يؤدي الى انفصالها حسب الوزن الجزيئي.

سوف نتناول بالتفصيل الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز.

تعبئة الدنا في الكروموسوم للكائنات حقيقية النواة:

يبلغ طول الدنا في مجين الانسان حوالي 2 م وعند مقارنة هذا الطول مع حجم النواة الموجود فيها والذي لا يتجاوز قطرها 10 مايكرومتر فأن الأمر يتطلب تفسيراً منطقياً لطريقة تعبئة هذا الدنا في الكروموسوم، فعند فحص الكروماتين المعزول بواسطة المجهر الالكتروني وجد انها تحتوي على سلسلة من حبات قطرها 110 انكستروم وارتفاع 60 انكستروم تدعى بالنيوكليوسومات ((Nucleosomesمربوطة بخيط رفيع. وقد اشارت الدراسات الى ان قطعاً من الدنا يبلغ طولها 146 نيوكليوتيدة محمية بطريقة ما من هظم إنزيمات النيوكليز تدعى بقلب النيوكليوسوم ((Nucleosome coreوان تراكيبها ثابتة في كل الكائنات ذات النواة الحقيقية وتشمل على اثنان من جزيئات كل من الهستونات H2 و H2 وH4 و H3

وقد اظهرت دراسات الحراف الاشعة السينية على بلورات قلب النيوكليوسوم وان الدنا يكون ملتفاً بـ 13 من دورات اللولب الفائق حول تركيب الهستون الثماني ((Octamerتتصل النيوكليوسومات مع بعضها بروابط ((Linkersويتغاير حجم الروابط من الدنا نوع الى آخر ومن نمط خلوي معين الى اخر ويبلغ طول الرابط من 8 الى 114 نيوكليوتيدة وان جزيئات H1 موزعة على طول الرابط ويقترح في بعض الادلة على ان النيوكليوسوم الكامل يحتوي على جزيئة واحدة من هستون H1 تنتظم النيوكليوسومات مع بعضها لتكوين ليفة بقطر 11 نانومتر (شكل (7–2– وتلتف تلافيف فائقة – (Superويكون بشكل Solenoid لتشكل تركيب يدعى((coilالياف بقطر 30 نانومتر والذي يلتف تلافيف فائقة ((Super Super-coilاخرى لتكوين Chromomers الذي يبلغ قطره 700 نانومتر وهو كروماتيد دور الاستواء المعبأ بصورة مضبوطة وهو المستوى الثالث من التعبئة وتشترك فيها أيظاً البروتينات غير الهستونية ويتكون بذلك الكروموسوم الذي يبلغ قطره 1400 نانومتر.



شكل 7-1 تعبئة الدنا في الكروموسوم للكائنات حقيقية النواة

الحامض النووي الرايبوزي منقوس الأوكسجين

الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين الدنا ((DNAعبارة عن سلسلة طويلة من الوحدات البنائية تسمى النيوكليوتيدات ((Nucleotidesويمثل تسلسل نيكليوتيدات الحامض النووي الدنا جميع المعلومات

الوراثية المتعلقة بالكائن الحي وتعد الأساس فيما تحتويه الخلية الحية من بروتين وهو المكون الأساس في بناء هيكلها وعملها. ويمثل الدنا كذلك مصدر التغايرات المظهرية ((Phenotypic variationsفي كائنات النوع الواحد. أهتم العلماء بدراسة المادة الوراثية في الخلية كونها المسيطر على جميع صفاتها وفعاليتها، وكان يعتقد سابقاً أن البروتين هو المادة الوراثية في الخلية، الا أن العالمين Hershey و Chase أثبتا بما لا يقبل الشك أن الدنا هو المادة الوراثية في الخلية عام 1952 اذ استخدما العاثيات البكتيرية ((Bacteriophagesالتي تتكاثر داخل البكتريا في اثبات ذلك . يتكون كل نيوكليوتيد من سكر خماسي رايبوزي منقوص الأوكسجين مرتبط بمجموعة فوسفات وقاعدة نتروجينية وتعود القواعد النتروجينية التي تدخل في تركيب الاحماض النووية الى مجموعتين رئيسيتين هي :

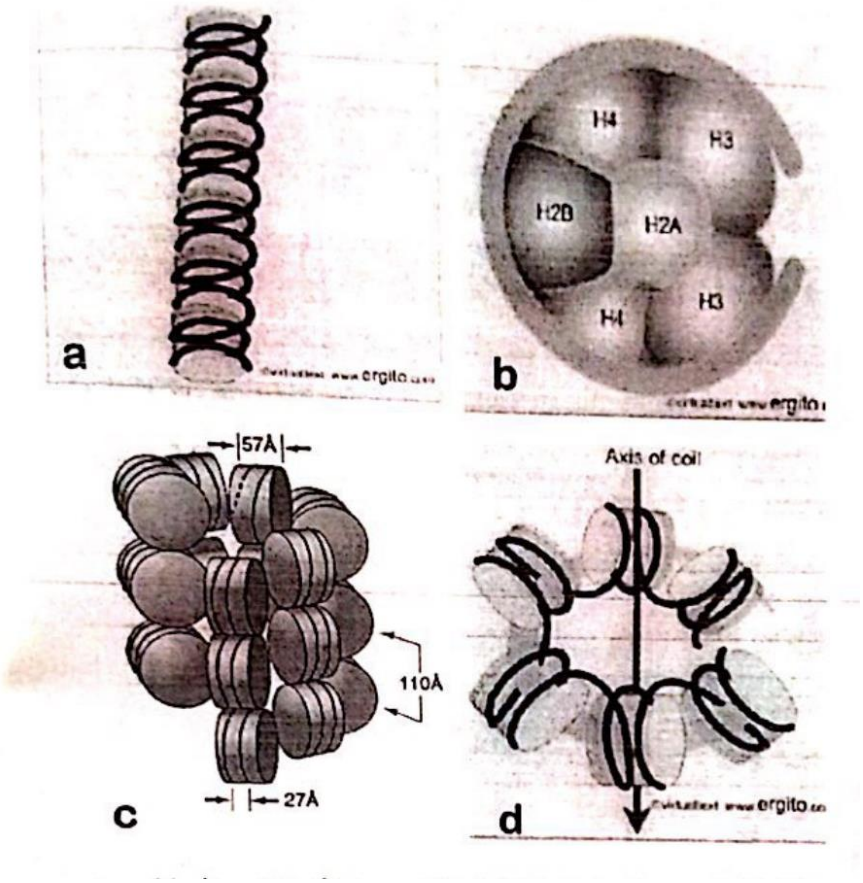
1- البيورينات :(Purines) وتشمل الادنين (Adenine (Aوالكوانين النادي.

2 البريميدينات :(Pyrimidines) وتشمل السايتوسين (Cytosine (Cوالثايمين (Thymine (Tوكذلك اليوراسيل (Uracil (Uالذي يدخل في تركيب الحامض النووي الرايبوزي الرنا (RNA) بدلاً من الثايمين كما يكون السكر قة مفردة الرايبوزي في الرنا بدلاً من السكر الرايبوزي منقوص الأوكسجين كما في الدنا.

ترتبط البيورينات والبريميدينات مع السكر الخماسي عن طريق أواصر كلايكوسيدية بين ذرة الكاربون رقم 1 للسكر الخماسي وذرة النتروجين رقم 1 للبريميدين أو ذرة النتروجين رقم 9 للبيورين وتدعى الجزيئة الناتجة عن هذا الارتباط بالنيوكليوسيد لكي يمكن للنيوكليوسيد ان يكون جزءاً من الدنا أو الرنا فعليه أولا ان يرتبط مع مجموعة فوسفات ليكون الوحدة البنائية للاحماض النووية هي النيوكليوتيد (. (Nucleotideتعتمد تسمية النيوكليوتيدات على نوع السكر الخماسي الموجود وعلى نوع القاعدة النتروجينية.

ترتبط النيوكليوتيدات المكونة للحامض النووي عن طريق أواصر كيميائية تتكون بين مجموعة الفوسفات المرتبطة مع ذرة الكربون للسكر الخماسي لأحد النيوكليوتيدات وذرة الكاربون للسكر الخماسي التالي وبهذا تتكون سلسلة من الأواصر الفوسفاتية ثنائية الاستر ((Phosphodiester bondتحمل النيوكليوتيدات مع بعضها على طول شريط الدنا أو الرنا . يكون السكر الخماسي ومجموعة الفوسفات العمود الفقري لسلسلة نيوكليوتيدات الدنا في حين تبرز القواعد النتروجينية من هذا العمود الفقري وبما انها جزيئات مسطحة فإنها تكون مرتبطة واحدة فوق الأخرى. ان طريقة ارتباط النيوكليوتيدات بواسطة الأواصر الفوسفاتية ثنائية الاستر تعطي سلسلة الدنا صفة القطبية، إذ يحمل احد طرفي السلسلة مجموعة فوسفات مرتبطة بذرة الكربون رقم 5-5) للسكر الخماسي في حين يحمل الطرف الآخر مجموعة هيدروكسيل مرتبطة مع ذرة الكربون رقم

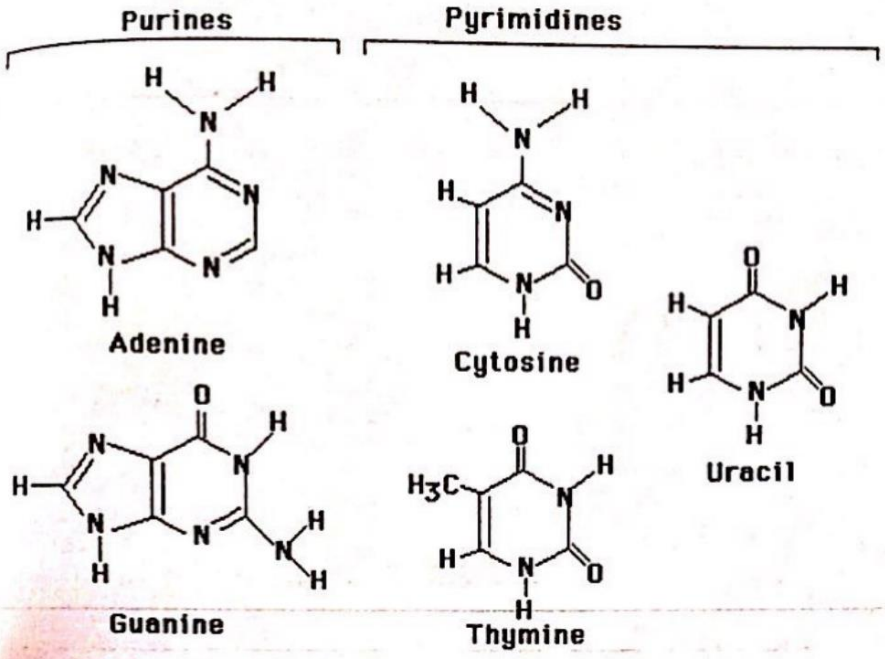
(3) للسكر الخماسي. وقد أوضح واطسن Watson وكريك Crick لأول مرة عام 1953 البنية الحلزونية المزدوجة للدنا ويعد هذا الإنجاز الرائع واحد من أهم الإنجازات في تاريخ علوم الحياة اذ مهد الطريق لفهم وظائف الجين على المستوى الجزيئي. ترتبط سلسلتا الحلزون مع بعضها عن طريق الأواصر الهيدروجينية المتكونة بين ازواج القواعد النتروجينية اذ يزدوج الادنين ((Aدائما مع الثايمين ((Tباصرتين هدروجينيتين،



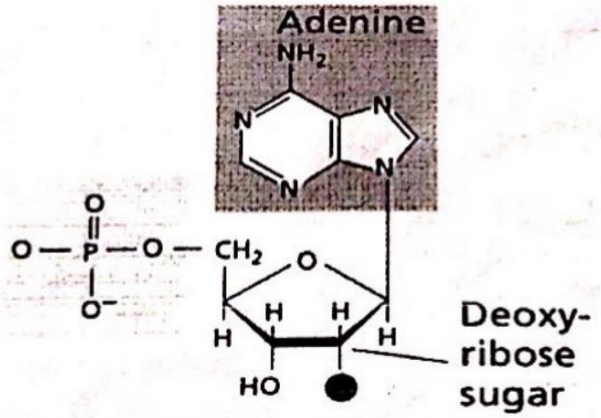
والكوانين ((Gمع السايتوسيل ((Cبثلاث أواصر هدروجينية (شكل (7–7) تعد خاصية الازدواج القاعدي ((Base pairingمن أهم صفات حلزون الدنا المزدوج اذ ينتج عنها علاقة تكاملية بين تتابع القواعد في السلسلتين الملتفتين فعلى سبيل المثال اذا وجد التتابع ATGTC على احد السلسلتين فان السلسلة المقابلة يجب ان تحتوي على التسلسل TACAG وعل هذا الاساس فان سلسلتي الحلزون ستكونان متخالفتين في القطبية اي انهما تتجهان با

تجاهين متعاكستين احدهما بالاتجاه 5 3 والأخرى باتجاه 3 5 .

شكل 7–2 مستويات تعبئة الدنا في الكروموسوم (2) تركيب النيوكليوسوم للمستوى الأولي (1) تعبئة المستونات في النيوكليوسوم ، و (1) تركيب (Solenoid)



شكل 7-4: أنواع القواعد النتروجينية الداخلة في تركيب الأحماض النووية



شكل 7-5: تركيب النيوكليوتيد وهو الوحدة البنائية للحامض النووي

الية التكرار Replication mechanism:

يمكن تلخيصها بما:

1- قطع ثم فك ارتباط شريطي الدنا بوساطة إنزيم Topoisomerase – (Unwinding Enzyme).

2- مسك شريطي الدنا بوساطة إنزيم .Helicase.

3- يقوم إنزيم خاص يسمى RNA primase بتخليق خيط قصير من RNA ذي تتابع مكمل لبداية خيط الدنا الأبوي اذ ترتبط هذه القطعة مع الشريط بأواصر هيدروجينية.

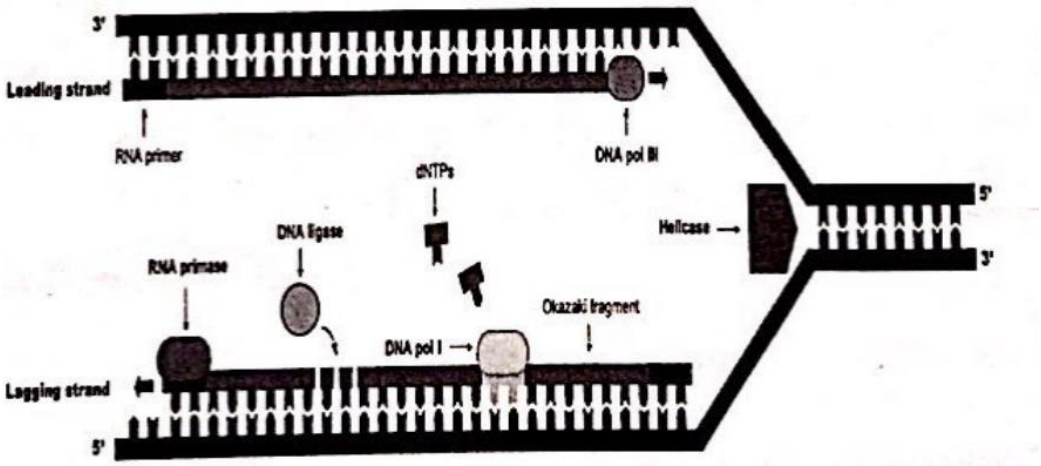
4- يقوم إنزيم DNA polymerase III بإضافة النيوكليوتيدات الى الطرف الذي يتوفر في نهاية البادئ وبالتالي بناء شريط مكمل بالاتجاه 53 ويسمى هذا الشريط بالشريط القائد (Leading Strand).

5- بالنسبة للشريط الآخر يقوم إنزيم RNAprimase بتخليق خيط قصير من اوكازاكي (Okazaki fragments يبلغ طولها 1000 نيوكليوتيدة على طول الرنا ذو تتابع مكمل لبداية خيط الدنا الأبوي فيتم بناء قطع الدنا تسمى قطع الشريط.

6- ازالة البادئ من قطع اوكازاكي بواسطة إنزيم . Nuclase.

7- تملا الفراغات التي تركها البادئ بواسطة الإنزيم DNA polymerase I وبذلك تلتحم القطع المتجاورة من الدنا لتكوين الشريط الذي يسمى بالشريط المتكأ.

8- تتكون بادئات جديدة كلما تقدمت شوكة التكرار كما تلتحم قطع الدنا المتكون للربلكونات المتجاورة لتكوين شريطي الدنا الابوي والبنوي الجديد المزدوج.



شكل 7-8: طريقة تكرار الحامض النووي الدنا.

التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا وتطبيقاته Polymerase Chain Reaction (PCR)

المقدمة

((Polymerase chain reactionوصف التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا وإختصاراً PCR لأول مرة من قبل الباحث Kary Mullis في عام 1985 على أساس أن عمل هذه التقانة هو مضاعفة قطعة معينة من الدنا المنتجة من المجين الكلي إنزيمياً وخارج الجسم الحي In vitro بوجود البادئات Primers والتي تربط بالتتابع المكمل لها على شريط الدنا القالب ((Template (DNAوتعد هذه العملية محاكاة لما يحدث في الطبيعة في جميع الكائنات الحية والتي تتضاعف مادتها الوراثية أثناء الانقسام فالتفاعل بسيط ومحتوياته موجودة منذ قدم الحياة قبل ان ينفذها Mullis خارج الجسم الحي وقد توصل الى ذلك بالصدفة عندما كان يبحث عن طريقة لتشخيص الطفرة الوراثية التي تسبب مرض فقر الدم المنجلي (Sickle cell anemia)فتوصل الى طريقة لتضاعف قطعة من الدنا موجودة بكميات قليلة جداً لإجراء الدراسات اللازمة عليها وان هذا الاكتشاف احدث ثورة في عالم البيولوجيا الجزيئية تضاهي الثورة التي أحدثها اكتشاف التركيب المزدوج للدنا من قبل Watson و Cri (1953)، وعلى الرغم من عدم اهتمام الكثيرين به في البداية لكن اليوم تعد PCR التقانة الأكثر رواجاً في مختبرات الوراثة الجزيئية في جميع أنحاء العالم والأساس الذي تعتمد عليه الكثير من الدراسات على مستوى الدنا وبهذا استحق عليها Mullis جائزة نوبل عام 1993 اذ جعلت إمكانية إستعمال قطرة دم أو شعرة أو حتى خلية واحدة لإجراء عمليات PCR عليها.

متطلبات التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا

إن أهم متطلبات PCR هي إنزيم بلمرة الدنا Taq DNA Polymerase والبادئات (Primers) والنيوكليوسيدات منقوصة الأوكسجين الثلاثية الفسفور (Deoxynucleosid triphosphates) الحاوي على أيونات المغنيسيوم (Mg) وقالب الدنا (DNA Template) فضلاً عن جهاز المبلمر الحراري (Thermocycler) ومكونات أخرى سيتم التطرق اليها لاحقاً، وفيما يلي توضيح لهذه المتطلبات:

إنزيم البلمرة DNA Polymerase :

يعد إنزيم بلمرة الدنا واحداً من المكونات الأساسية والرئيسة في تفاعلات PCR، اذ تعتمد هذه التفاعلات على قابلية هذا الإنزيم على البناء وبالتالي مضاعفة تتابعات محدده من الدنا القالب المكملة لتتابعات البادئ لذا فان الاهتمام في تطوير نوعية وكفاءة هذا الإنزيم حظي باهتمام الكثير من الباحثين و المختصين بهذا المجال. استهل العمل بهذه التقانة مع إنزيم البلمرة (Klenow fragment) المستخلص من بكتريا القولون E.coli وهو من نوع DNA Polymerase I إلا أن هذا الإنزيم يفقد القدرة على البناء عند تعرضه الى الحرارة العالية المطلوبة لمسخ خيوط الدنا القالب مما يجعل عمله يتوقف إلا بإضافة كميات أخرى منه في كل دورة مما جعل الباحثين يتجهون إلى إستنباط نوع جديد هو Taq Polymerase الثابت حرارياً والمعزول من البكتريا المحبة للحرارة (Thermophallic إذ أن له القدرة على Thermus aqueticus وتدعى Eubacterium) الإستمرار بنشاطه وبدرجة 95 م وبناء قطع اطول من الإنزيم السابق، إذ تتراوح افضل درجات فعاليته في البناء بين 70 – 80 م وله نشاط خاص في البناء يتراوح بين 35 – 100 نيوكليوتيدة في الثانية لكل جزيئه إنزيم إذ يضيف القواعد عند النهاية .3-OH دفع النجاح الذي حققه هذا الإنزيم الباحثين والشركات المختصة الى كلونة الجين المسؤول عن إنتاجه ونقله الى داخل بكتريا E. coli لينتج على نطاق تجاري.

البادئ Primer

يعرف البادئ بكونه قطعة قصيرة من الدنا أو الرنا ترتبط بقالب شريط الدنا المفرد الشريط عند النهاية 3 المحتوية على مجموعة الهيدروكسيل OH الضرورية لبدأ عمل إنزيم بلمرة الدنا. هناك عدة أنوع من البادئات تختلف في طبيعتها باختلاف نوع المؤشرات فقد تكون ذات تتابعات عامة ((Universalويمكن إستعمالها مع مجين كل الكائنات، وقد تكون تلك البادئات مصممة بشكل خاص ليتعرف على موقع متخصص متوزع بشكل عشوائي داخل المجين، وقد يصمم البادئ بوجود تسلسل معين في تركيبه.

المحلول المنظم أو الدارئ PCR buffer

لمحلول المنظم هو المحلول الذي يحافظ على قيمة أسه الهيدروجيني من التغيرات عند إضافة حامض أو قاعدة إليه أو عند تخفيف المحلول، ويقوم هذا المحلول بعملية تنظيم عمل إنزيم البلمرة والمحافظة على نشاطه لذا أصبح هناك العديد منها وفقاً لنوع الإنزيم المستخدم. وتختلف هذه المحاليل المنظمة من حيث تركيز مكوناتها والرقم الهيدروجيني لها، إلا أن القياسية منها تحتوي على المكونات الرئيسة مثل كلوريد المغنيسيوم MgCl2 بتركيز 50 مللي مولر وكلوريد البوتاسيوم KCl بتركيز 1.5 مللي مولر والترس الحامضي Tri-HCl بتركيز 100 مللي مولر ذي رقم هيدروجيني 8.3 فضلاً عن 0.1% حجم وزن من الجيلاتين ليصبح المحلول بقوة 10 ويتم تخفيفه اثناء تحضير التفاعل ليصبح X1.

النيوكليوسيدات منقوصة الأوكسجين الثلاثية الفوسفات
Deoxynucleoside triphosphate (dNTPs)

وهي عبارة عن القواعد النتروجينية الاربع مع سكر منقوص الأوكسجين وثلاث مجاميع من الفوسفات والتي تشكل مادة بناء شريط الدنا والذي يقوم إنزيم بلمرة الدنا باضافته الى النهاية OH بدأ من نقطة ارتباط البادئ بالقالب وبطول يختلف حسب نوع المؤشرات المستعملة وهي:

Deoxy Adenosine Triphosphate (dATP)
Deoxy Thymosine Triphosphate (dTTP)
Deoxy Guanosine Triphosphate (dGTP) Deoxy Cytosine Triphosphate (dCTP)

+ ذلك التركيز على تركيز Mg وذلك لأن زيادة تركيز dNTPs يؤدي الى قلة Mg الجاهز لفعالية إنزيم بلمرة الدنا وكذلك يتاثر تركيز dNTPs بتركيز البادئات المستعملة وطول القطع المتضاعفة وعدد دورات

PCR ويمكن الوصول وتضاف هذه المكونات الأربعة بتراكيز متساوية ومناسبة لإجراء التفاعل ويعتمد الى التركيز المناسب تجريبياً.

- قالب الدانا DNA template

إن التطور في تقانات PCR وفرت طريقة سريعة وكفوءة للكشف عن وجود أو غياب تتابع معين من قواعد الدنا في نموذج ما مما جعل بالإمكان تحليل مئات النماذج مرة واحدة وخاصة عند توفير قالب الدنا الملائم الذي يمكن الحصول عليه من مصادر عديدة كالمكتبات المجينية (Genomic libraries) كما ويمكن الحصول على دنا الحيوانات والنباتات المختلفة وبشكل تجاري ومن مختلف الأنسجة والخلايا.

جهاز المبللمر الحراري

ان اكتشاف جهاز المبلمر الحراري ادى الى تجاوز الكثير من المحددات المهمة لتقانة PCR عند بداية اكتشافها إذ كانت تستعمل طريقة النقل اليدوي للنماذج بين الحمامات المائية للحصول على الدرجات الحرارية المطلوبة لكل دورة من دورات PCR، ويعد هذا الجهاز من أهم متطلبات تفاعل PCR ولقد تم تطوير هذه الأجهزة من ناحية استيعابها لعدد اكبر من العينات تصل الى حوالي 96 حفرة بدلاً من الأنابيب وهذا يسرع في عملية تحضير النماذج وكذلك الكشف عن النواتج وعلى العموم يؤثر الجهاز المستعمل في نتائج التفاعل والمدة المستغرقة في كل دورة وعدد الدورات والوقت المستغرق بين دورة وأخرى ((Ramp time والذي يفضل ان يكون اقصر ما يمكن وذلك ليمنع استطالة البادئات المرتبطة بالمواقع الخطأ.

مراحل التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR stages

تم تحديد تفاعل PCR بثلاث مراحل أو خطوات أساسية تتكرر في كل دورة من دورات التضاعف ولمدة زمنية محددة (شكل 13-1)، وهذه المراحل هي:

المسخ :

تعد هذه المرحلة الأولى والأساس في تحضير دنا القالب مزدوج السلسلة للعمليات اللاحقة ومن المعروف إن تلك العملية تحدث في الخلية ((In vivoأثناء الطور البيني من الانقسام الخلوي وبواسطة إنزيمي DNA Helicase و Topoisomerase ولأن ارتباط الشريطين يكون عن طريق الأواصر الهيدروجينية

فقد وجد بـان الحرارة العالية أيضا تؤدي الى فتح الشريطين وقد استثمرت هذه الظاهرة في تحقيق المرحلة الأولى من PCR وذلك برفع درجة الحرارة محلول التفاعل والذي يحتوي على قالب الدنا إلى 92–95 م ولوقت يتراوح بين 5–3 دقائق للحصول على شريط مفرد ليعمل كقالب لبناء القطعة المكملة لها وتعتمد عملية المسخ على عدد من العوامل كنوعية دنا القالب ومصدره ونوع الإنزيم المستخدم.

مرحلة ارتباط البادئ :

وهي المرحلة التي تأتي بعد مرحلة المسخ مباشرة إذ يتم فيها ارتباط البادئات مع التتابعات من القواعد النتروجينية المكملة لها في الشريط المفرد من ألدنا القالب وذلك ببناء الأواصر الهيدروجينية بينهما وتعتمد درجة الحرارة وطول الفترة الزمنية اللازمة لهذه المرحلة على العديد من العوامل التي تحدد كفاءتها، ومنها تركيز وطول البادئ ونسبة احتوائه على قواعد G+C ويتم احتساب درجة الحرارة اللازمة للارتباط من خلال تطبيق احدى المعادلات الحسابية الملائمة لطول البادئ وذلك لاستخراج الدرجة الحرارية الحقيقية لتفكك

$$Tm = (\text{عدد قواعد } A+T) \times 2^{\circ}\text{م} + (\text{عدد قواعد } C+G) \times 4^{\circ}\text{م}$$

50% منه والتي تسمى Melting temperature (Tm) والتي يمكن حسابها على وفق المعادلة الآتية:

مرحلة الاستطالة :

وهي المرحلة الاخيرة من تفاعل PCR وتتضمن عملية إضافة dNTPs الى النهاية OH للبادئ عند منطقة ارتباطه بقالب الدنا لتكوين شريط دنا مكمل لذلك القالب من قبل إنزيم البلمرة و ان افضل درجة حرارية تتم فيها عملية الاستطالة وهي الدرجة الملائمة لاعطاء أعلى فعالية للإنزيم وهي 72 م. أما المدة اللازمة لذلك فتختلف حسب نوع المؤشرات المستعملة والمؤشرات التي تعطي نواتج تضاعف كبيرة الحجم تحتاج الى وقت اطول من تلك التي تعطي نواتج تضاعف قصيرة وذلك لقدرة إنزيم البلمرة المستخدم Taq DNA polymerase على بناء 35 – 100 نيوكليوتيدة في الثانية وعلى العموم تكون الفترة اللازمة للاستطالة أطول (10) دقائق) في الدورة الأخيرة لتفاعلات PCR وذلك لضمان استطالة جميع نواتج التفاعل. تجدر الاشارة الى ان عدد الدورات المستعملة في تفاعلات PCR 40 دورة كافية للحصول على عدد نسخ ملائمة للدنا الهدف بحيث يمكن رؤيتها عند الكشف عنها بإستعمال هلام الاكاروز كما ان فعالية الإنزيم تقل بعد ذلك العدد من الدورات اما الكشف عن نواتج PCR فيتم بعدة طرائق أكثرها شيوعاً الهجرة

الكهربائية باستعمال هلام الاكاروز والتصبيغ بإستعمال بروميد الايثيديوم والكشف بإستعمال الاشعة فوق البنفسجية أو بإستعمال هلام متعدد الاكريل امايد والتصبيغ بإستعمال نترات الفضة مع الكشف المباشر بالعين المجردة وتستغرق هاتان الطريقتان عدة ساعات.

المؤشرات التي تعتمد على التهجين الجزيئي

ظهرت هذه التقانة بعد اكتشاف انزيمات القطع انزيمات التقييد Restriction enzyme عام 1968 ووصمة سوذرن Southern blotting عام 1975 وساهمت هذه في بناء أول تقنية Restriction Fragments Length) RFLP سميت تقنية تباين أطوال قطع التقييد (Polymorphismوهي أولى التقنيات المستخدمة وتعتمد على استخدام انزيمات التقييد في قطع شريط DNA من مواقع محددة ومن ثم تكوين قطع مختلفة الأطوال من DNA، تفيد هذه التقانة في معرفة أصناف وسلالات النبات والأنواع والأفراد ولا توجد حاجة لتحديد تتابعات محددة للنيوكليوتيدات، أما عيوب هذه التقنية فهو الحاجة إلى كمية DNA كبيرة وبنقاوة عالية وتحتاج إلى وقت وجهد وتكاليفه مرتفعة (Southem 1975 وخير الله، (2015).

مؤشرات تعتمد على تفاعل تضاعف سلسلة DNA

تشمل الآتي

أولاً: التضاعف العشوائي متعدد الاشكال

):(RAPD Randomly Amplified Polymorphic DNA

تعد واحدة من المؤشرات التي تعتمد على تقنية تضاعف DNA وتستخدم بادئ عشوائي واحد أو أكثر تتكون من 10 قواعد نيتروجينية وتعطي نواتج عدة ومن مواقع مختلفة على الجين لوجود مواقع عدة لارتباط البادئ من مزاياها أنها تعطي وفرة عالية وتغطية للجينوم ولا توجد حاجة المعرفة التسلسلات مسبقاً ولا تحتاج إلى كمية كبيرة من الحامض النووي وتمتاز بالسرعة، أما مساوئها فإنها لا تستخدم مع الأنواع العاصي 1996 ، الزهيري 2013 و Khan وآخرون2016.

ثانياً: تباين اطوال قطع الدنا المتضاعفة

Amplified Fragment Length Polymorphism(AFLP) :

تعد إحدى التقنيات المعتمدة على تضاعف DNA وهي مفيدة في الدراسات والتقديرات للشكل الوراثي ولكون هذه التقنية تعتمد على الانزيمات القاطعة وهضم مواقع محددة من DNA من جهة، ومن جهة أخرى تعمل على إكثار قطع DNA وبكميات كافية لإجراء الدراسة ومن ثم فإن هذه التقنية تجمع بين تقنيتين الأولى هي تقنية تباين أطوال قطع التقييد (RFLP) لاستخدامها انزيمات التقييد أو انزيمات القطع والثانية التضاعف العشوائي متعدد الأشكال ((RAPDكونها تعمل على اكثار DNA إلى كميات كبيرة، ومن مزاياها أنها ذات حساسية عالية وذات تعدد شكلي مرتفع وممكن تطبيقها بين الأنواع ولا توجد حاجة لمعرفة التسلسل مسبقاً، أما عيوبها فأنها غير قابلةللتكرار وأنها تحتاج إلى بادى دقيق ((VOSوآخرون، 1995 و Khan وآخرون، (2016)

ثالثاً: مؤشرات التتابعات القصيرة المتكررة

Single Sequence Repeats (SSR):

تعد واحدة من مؤشرات DNA الحديثة وتتميز بقدرتها على كشف مناطق تتكرر فيها تتابعات معينة للنيوكليوتيدات بطول يتراوح بين 1 – 5 زوج من القواعد النيتروجينية وتكون منتشرة بشكل كبير على الجينوم للنبات أو الحيوان لان البادئ يكون معروفاً وتستخدم في هذه التقنية بادئات تعمل في الاتجاهين كليهما Forward primer و Reverse primers ومن ثم ستظهر التباينات بين العينات المدروسة لاختلاف الأطوال للناتج المتضاعف لكل عينة من مزاياها أنها لا تحتاج إلى كمية كبيرة من DNA وتحتاج إلى بعض المستلزمات المختبرية البسيطة وتفيد في البصمة الوراثية سهلة التنفيذ نسبياً، أما عيوبها فلا تستخدم بين الأنواع وتحتاج إلى معرفة التتابعات مسبقاً صبوح وآخرون 2010 و Khan وآخرون 2016

رابعاً: مؤشرات التتابعات البيئية البسيطة المتكررة

): Inter simple sequence Repeat (ISSR

تعد إحدى التقنيات المهمة التي تسهم في الكشف عن التنوع والتباين الوراثي بين الأصناف وتعتمد في عملها على تضخم قطع DNA ضمن تفاعل تضاعف سلسلة (DNA (PCRبحيث يكون ناتج التضخيم قطع DNA كثيرة ذات تتابعات للنيوكليوتيدات دقيقة، وتمتاز بسهولة إجرائها وتكاليفها مقبولة وغير مرتفعة

وتمتاز أيضاً بدقتها العالية في تحديد بصمة النبات الوراثية وإمكانية استخدام بادئ أو بادئين لإعطاء فرصة أكبر للارتباط ولا تحتاج إلى دراسة ومعلومات مسبقة عن التتابعات للDNA الهدف (Qian وآخرون 2007 Khanam وآخرون، 2012 والزهيري)2016(،وآخرون 2013 Khan والجدول 4 أوب يبين بعض خصائص المؤشرات الجزيئية.

تطبيقات مؤشرات الدنا الجزيئية في مجال تحسين النبات

1- تقدير التنوع الوراثي وتحديد بصمة التراكيب الوراثية.

2- رسم خرائط مواقع الصفات احادية الجين والمواقع المسؤلة عن الصفات الكمية Quantitatve trait locus (QTL) للمصفات الاقتصادية المهمة

3- تقدير البعد الوراثي أو درجة القرابة بين المجتمعات وخطوط التربية من بينمجموعة من الأصناف.

4- تحديد تسلسل الجينات المرشحة للصفات الاقتصادية المهمة لعمليات التربية.

5- التربية الجزيئية لتحمل الشد الاحيائي واللاحيائي.

6- الإنتخاب بمساعدة المؤشرات لتحسين المحاصيل للأنواع الناتجة من زراعة الأنسجة النباتية.

7- توصيف المادة الوراثية النباتية وتقييمها لحالات عدم التوافق الذاتي والعقم الذكري والانثوي للأنواع النباتية والمهمة اقتصادياً.

8- التوصل الى الآليات التي تسبب في اختلاف النباتات المكثرة بالزراعة النسيجية في مجين النواة والمايتوكوندريا والبلاستيدات الخضراء.

9- تحديد اصل الأعضاء القابلة للتوالد في زراعة حبوب اللقاح والمتوك وكذلك إندماج البروتوبلاست.

10- فحص الثبات الواثي للنباتات الناتجة من زراعة حبوب اللقاح لتفادي الانعزالات المشوهه وزيادة نسبة بقاء النباتات الناتجة.

11- حديد التغيرات غير الثابتة في عمليات خزن وحفظ المواد الوراثية (مثل تحديد التضاعف أو خلط البذور أو الانجراف الوراثي).