مختبر ٣

استخلاص الحامض النووي من فطر الـ (*Candida*)

DNA(nucleic acid) Extraction from *Candida*

جنس من أجناس الخمائر yeast معيشة أنواع جنس ***candida*** تكون :

١- **endosymbiosis** التعايش السلمي : يعني إن يعيش ضمن جسم أو خلية كائن أخر مثل يتعايش مع مضائف الحيوانات (الإنسان).
٢- **Commensalisms** : التعايش بين كائنين احدهم يستفاد من هذا التعايش بينما الأخر لايتأثر.
٣- **Opportunistic** : بعض أنواع الـ ***candida*** لها قابلية كامنة على ان تسبب الأمراض وأكثر الأنواع المرضية هو ***candida albicans*** التي تسبب candidiasis (thrush) بالإنسان بالأخص لدى المرضى المصابين بالوهن المناعي immunocompromed patients وفي باقي الحيوانات.
٤- تعايشيه بشكل طبيعي بالأمعاء gut flora مثل تعايش ***candida albicans*** في أمعاء الحيوانات.

زادت بالسنوات الأخيرة أهمية دراسة الأجناس المسببة للإصابات الانتهازية نتيجة لانتشارها في العالم بالأخص لدى الموهنين مناعيا، ونتيجة لمعرفة التتابع الدقيق للقواعد النتروجينيه للجين لعدد من أجناس الـ ***candida*** من ما ساعد على تطوير عدد من العلاجات المضادة للفطريات antifungal therapies .

الخصائص المختبرية Laboratory Characteristic

تظهر المستعمرات في الوسط الزرعي Agar plate كبيرة، مدورة، بيضاء أو كريمية (حيث أشتق اسمها اللاتيني albicans بمعنى whitish).

الخصائص السريرية Clinical Characteristic

١- بعضها مسؤول عن الإصابات السطحية superficial infections مثل vaginal candidiasis .
٢- البعض الآخر مسؤول عن الإصابات الانتهازية التي تهدد حياة المريض بالأخص لدى مرضى الأيدز aids ومرضى السرطان الذين يستقبلون العلاج الكيميائي.
٣- تسبب oral candidiasis حيث ينتقل الفطر عن طريق أطقم الأسنان.
٤- تنمو مستعمرات بالقناة المعوية المعدية gastrointestinal tract نتيجة لتناول الأدوية المضادة للحموضة antihyperacidity drugs.

الخصائص الوراثية Genetic characteristic

أثبتت الدراسات الوراثية ودراسات البايولوجي الجزيئي ان نوع الـ *candida* يكون ثنائي المجموعة الكروموسومية diploid ومتباين الزيجة heterozygous .

كما اثبتت علاقتها بالخمائر عن طريق قياس محتوى الـ DNA بطريقة Diphenyl amine و flow cytometry .

كما انه اثبت ان الفطر ثنائي المجموعه الكروموسومية عن طريق الطبيعة الحركية لجزيئه DNA عن طريق إعادة الارتباط للـ DNA الكلي الممسوخ.

الفرق بين الفطريات والبكتريا وراثيا:

Bacteria	Fungi
١- كائنات بدائية النواة لاتحتوي على غلاف نووي المادة النووية مبعثرة بالسايتوبلازم.	١- كائنات حقيقية النواة تحوي على غلاف نووي والـ DNA موجود في النواة والمايتوكوندريا.
٢- الـ DNA يكون خيط مفرد يتألف من الأحماض النووية فقط متصل بالغشاء السايتوبلازمي.	٢- يوجد أكثر من خيط صغير من الـ DNA يتركب من بروتين نووي اضافه للاحماض النووية.
٣- نسبة الكوانين والسايتوسين في DNA ٢٨-٧٣% .	٣- نسبة الكوانين والسايتوسين في DNA تقترب من ٤٠%.
٤- تركيب وبناء البروتين يتم أثناء التكاثر ويشترك RNA وحيد مع بعض البروتينات، اما الرايبوسومات المشتركة في التركيب (البناء) هي نوع 70s موزعة في السايتوبلازم.	٤- يحدث بناء البروتين في السايتوبلازم بتوجيه من النواة وتشترك ٣ أنواع من الـ RNA والرايبوسومات موزعه في الجدار الخلوي والشبكة الاندوبلازمية من نوع 80s بينما المايتوكوندريا 70s .

ملاحظة: معامل الترسيب sedimentation coefficient (s)

وزن جزيئي $70s = 2.4x10^6$

$80s = 4.5x10^6$

مختبر وراثة أحياء مجهرية

تحضير المحاليل

1M=1000mM

المولاري

كل ١ الوزن الجزيئي للمادة = وزن المادة في لتر

M=W./M.Wt.x1000/v.

مثال: حضر 0.1M من Tris-base علما ان الوزن الجزيئي للمادة يساوي ١٢١.٤

ج/ بتطبيق القانون

M=W./M.Wt.x1000/v.

Phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1)

اذا كان حجم العينه المراد اضافتها ٧٥٠ مايكروليتر

750/50=15

25x15=375 x no. Of samples =

24x15=360 x no. of samples=

1x 15=15 x no. of samples =

Chloroform: isoamylalcohol

(24:1)

750/25=30

24x30=(720) x no. of samples=

1x 30=(30) x no. of samples =

مختبر وراثة أحياء مجهرية

Materials and Method

Chemicals and Instruments

الأجهزة والمواد الكيميائية

Instruments

Metter balance

Hotplate

pH-Meter

Autoclave

Centrifuge

Micropipettes

Vortex

Tibs

Eppendrofe tubes

Glass beads

Refrigerator

Chemicals

EDTA(1mM) pH=8

Tris-HCL (10mM)

SDS 1%

NaCL (100mM)

Trition X-100 2%

Phenol

Chloroform

2-propanol

Ethanol 70%

Working Solution

1-lysis buffer

(10mM Tris, 1mM EDTA, 1% SDS, 100mM NaCL, 2%Triton X-100)

2-TE buffer

(10mM Tris, 1mM EDTA)

طريقة العمل Protocol:

١- ننقل جزء من المزرعة باللوب loop وتوضع في انبوبة Eppendrof ونضيف $300\mu L$ من محلول lysis buffer .
٢- نضيف $300\mu L$ من محلول isoamyl alcohol-chloroform (1:1) و 300mg من glass beads (قطرها 0.5mm) .
٣- نمزج العينة باستخدام إلـ vortex لمدة 5min لتحطيم الخلايا بشكل كامل.
٤- تطرد العينة مركزيا باستخدام إلـ centrifuge بسرعة 10.000 rpm لمدة 5 min .
٥- ينقل الرشح الى أنبوبة eppendrof جديدة ثم تستخلص مع كمية مساوية من chloroform .
٦- تطرد العينة مركزيا باستخدام الـ centrifuge بسرعة 10.000 rpm لمدة 5 min .
٧- ينقل الرشح إلى أنبوبة eppendrof جديدة وترسب ألعينه باستخدام 2-propanol أو 70% ethanol.
٨- يعمل طرد مركزي للعينة .
٩- نتخلص من الراشح وتترك العينه تجف بالهواء في درجة حرارة الغرفه لمدة 15 min .
١٠- تحفظ العينة ب $100\mu L$من محلول الحفظ TE وتحفظ بدرجة حرارة $20\text{-}C^{\circ}$ لحين الاستخدام.

المحاذير (Bio-safety)

١- ارتداء الصدرية والكفوف أثناء العمل.
٢- استخدام الكمامة عند استخدام phenol و chloroform مع استخدام hood أثناء العمل كما يجب الحذر من ملامسة الجلد مع هذه المواد لأنها مواد مسرطنه Carcinogenic material.
٣- التعامل مع الفطر بحذر لأنه من المسببات المرضية .
٤- تعقيم مكان العمل والتخلص من النفايات الاستخلاص .
٥- الحفاظ على micropipette من التلف بالـ phenol نتيجة لتصاعد أبخرة phenol.