مختبر ٣

استخلاص الحامض النووي من الفطريات

DNA(nucleic acid) Extraction from fungi

تتميز الفطريات بصورة عامة والخمائر بصورة خاصة بأهميتها الصناعية الكبيرة فهي تستخدم بشكل واسع في التقنية الحياتية لانتاج العديد من الانزيمات والمواد المهمة صناعيا ولعل خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* هي من أهم الخمائر المستخدمة صناعيا فدورها في صناعة الخبز والتخمرات الصناعية معروفا منذ فترات طويلة، لذا فقد كانت موضوعا للعديد من الدراسات التي اوضحت الكثير من خصائصها الفسلجية والوراثية. بما أن الخمائر تعود الى حقيقية النواة فقد توجهت الانظار نحوها لاستعمالها كمضيف للجينات المكلونة من أجل الحصول على سلالات مهندسة وراثيا وذات مواصفات جيدة لاستخدامها في التقنية الحياتية لانتاج المواد المهمة طبيا وصناعيا.

تحتوي الخمائر على $1.5 * 10^7$ base pairs من الـ DNA لكل خلية ففي *Saccharomyces cerevisiae* تحتوي على 16 كروموسوم. عادة تتواجد الخمائر أما أحادية أو ثنائية المجموعة الكروموسومية هذا عادة يسهل عزل الطفرة والتحليل الجيني مقارنة مع الحجم الصغير للكروموسوم لذا تختار الخمائر كمادة جيدة للتجارب الضرورية للخلايا حقيقية النواة. الا أن هناك عوائق أساسية من أهمها عدم وجود طريقة مناسبة لادخال جزيئات الـ DNA الى خلايا هذه الكائنات الا أن تم تجاوز هذه المشكلة في عام 1978 ، حيث تم تطوير طريقة تحول الخمائر بحيث أصبحت في الوقت الحاضر بدرجة من الكفاءة تجعلها ملائمة لأغراض الكلونة.

ان الطريقة المتبعة في تحول خلايا الخمائر تعتمد على ازالة جدران الخلايا بواسطة انزيمات معينة لانتاج مايعرف بالسفيروبلاست spheroplast حيث تتميز خلايا السفيروبلاست بقابليتها على أخذ قطع الـ DNA المضافة بمساعدة مادتي البولي اثلين كلايكول وكلوريد الكالسيوم CaCl2 وبعد دخول الـ DNA لابد من اعادة خلايا السفيروبلاست المتحولة الى خلايا اعتيادية وذلك من خلال اعادة بناء جدران الخلايا.

نظرا للاختلافات الفسلجية والوراثية بين الخلايا حقيقية النواة وبدائية النواة لذا توجهت الانظار نحو الخمائر لاستعمالها مضايف لدراسة تعبير الجينات المكلونة وبالذات تلك المشتقة من حقيقية النواة ، اذ أن من أهم الاسباب التي تؤدي الى فشل تعبير جينات حقيقية النواة في البكتريا هو عدم قدرة البكتريا على ازالة الانترونات الموجودة في هذه الجينات، لذا استعملت الخمائر كمضايف للجينات المكلونة على اعتبار ان الخمائر هي من حقيقية النواة وتملك الأجهزة اللازمة لازالة الانترونات .

وعلى الرغم من الجهود المستمرة لتذليل الصعاب التي تواجه عملية تعبير الجينات الغريبة في الخمائر الا أنها لازالت تعاني من مشاكل كثيرة لابد من تجاوزها للوصول الى الهدف المطلوب من الكلونة في الخمائر.

مختبر الهندسة الوراثية

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 $^{\circ}C$-20 لحين الاستخدام.