مختبر ٨

عزل البلازميدات

Plasmids Isolation

البلازميدات عناصر وراثية من جزيئات DNA على شكل دوائر صغيرة، متواجدة داخل سايتوبلازم الخلية البكتيرية، خارج الكروموسوم البكتيري ولأنها منفصلة عن الكروموسوم فانها تتكاثر بصورة مستقلة عنه، الا أن هناك بلازميدات يرتبط تضاغفها في الخلية بتضاعف الكروموسوم. تختلف البلازميدات عن بعضها البعض في الحجم وأعداد النسخ الموجودة بالخلية، وتحمل البلازميدات جينات تضيف للخلية صفات اضافية الا أنها غير ضرورية لحياة الخلية ولاتؤثر على حيوية الخلايا ويدل على ذلك انه يمكن لبعض المواد الكيمياوية ازالة البلازميدات من الخلية عن طريق وقف تكاثرها، وباستمرار تضاعف الخلايا البكتيرية يتناقص أعداد البلازميدات حتى نحصل على خلايا بكتيرية خالية من البلازميدات Cured cells.

تمتاز كل من الخلايا البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة گـرام باحتوائها على البلازميدات الا أن هناك اختلاف في طرق استخلاص البلازميدات بين البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة گـرام ، يرجع ذلك لاختلاف تركيب الجدار الخلوي وعدد نسخ النوع داخل الخلية البكتيرية، فنجد أن عدد نسخ النوع (copy number) البلازميد الواحد في الموجبة أقل بكثير عنه في الخلية السالبة لصبغة جرام ممايؤثر في كفاءة وسهولة عملية عزل البلازميدات علاوة على اختلاف طرق العزل.

يطلق على البلازميدات نواقل لاستخدامها في نقل الجينات من والى الكائنات وعليه يمكن للباحثين المختصين التحكم في تركيب البلازميدات (النواقل) لادخال صفات وراثية "الجينات" مرغوبة، ومن ثم ادخالها اما داخل الخميرة أو اعادة ادخالها للخلية البكتيرية بغرض الاستفادة من خاصية التكاثر الذاتي لها وعليه سيتم انتاج كميات كبيرة من هذه الجينات تسمى هذه العملية بالكلونة وتختلف البلازميدات عن بعضها البعض من حيث الوزن الجزيئي فمنها الكبير ومنها الصغير وبالتالي تختلف في حملها للجينات فمنها مالايحتوي على أي جين بينما هناك أنواع كبيرة تحتوي على عدة جينات. يمكن بناء بلازميدات في المختبر تحتوي على الخصائص الأساسية مثل منطقة التضاعف، مقاومة المضادات الحيوية، مناطق حساسة لانزيمات القطع.

على الرغم من أن عزل وتنقية دنا العديد من البلازميدات أصبح سياقا عاما في الوقت الحاضر الا أن طرق عزل البلازميدات لازالت تجابه بعض المشاكل بسبب عدم وجود طريقة عامة واحدة لعزل البلازميدات من البكتريا.

تعتمد طرق تنقية البلازميد اساسا على الاختلاف في الطبيعة الفيزياوية لكل من دنا البلازميد ودنا الكروموسوم وخاصة من ناحيتي الحجم والشكل الفيزياوي. من المعروف أن حجم البلازميدات صغيرة جدا بالمقارنة مع حجم كروموسوم البكتريا فان أكبر البلازميدات لاتشكل الا حوالي ٨% من حجم كروموسوم بكتريا *E. coli* في حين توجد بلازميدات أصغر من ذلك بكثير. أما من ناحية الشكل فعلى الرغم من أنها تشابه كروموسوم البكتريا في كونها حلزونا مزدوجا دائري الشكل الا أنها توجد داخل الخلايا بشكل مختلف عن الكروموسوم حيث تكون ملتفة على نفسها مكونة جزيئات عالية الالتفاف Supercoiled molec وتبقى على هذا الشكل مالم يتعرض خيطي الحلزون الى كسر وتسمى هذه الجزيئات اسم الجزيئات الدائرية المغلقة تساهميا

Covalently closed-circular molecules (ccc) ، وفي حالة تعرض احدى خيطي الحلزون للقطع تفقد الجزيئة خاصية الالتفاف العالي مكونة جزيئة دائرية مفتوحة Open-circular molecules (oc) اما في حالة قطع خيطي الحلزون في نفس المكان فستنتج جزيئة خطية Linear molecule.

طرق عزل البلازميدات:

لأجل الحصول على بلازميدات بنقاوة عالية لابد من فصلها عن القطع الكروموسومية المتواجدة معها في الرائق ويتم ذلك باستغلال الشكل المميز لجزيئات البلازميد اذ تعتمد طرق عزل البلازميد اعتمادا على الشكل المميز للبلازميدات مقارنة مع كروموسوم الخلية البكتيرية ومن أهم هذه الطرق هي طريقة الطرد المركزي في محلول كلوريد السيزيوم متدرج الكثافة وطريقة التحلل القاعدي.

١- **طريقة الطرد المركزي في محلول كلوريد السيزيوم متدرج الكثافة**

Purification of Plasmids by Cesium Chloride Density Gradient Centrifugation

تُستخدم هذه الطريقة للحصول على كميات كبيرة من البلازميدات المركبة وبنقاوة عالية لإجراء دراسات أخرى مستفيضة عليها، نأخذ 500 ml من الخلايا ثم نقوم بتركيزها وتحويلها إلى Spheroplasts بعد ذلك تعامل بمادة Triton X-100 إذ تُعتبر هذه مادة كيميائية معتدلة لها القدرة على إحداث ثقوب في الجدار الخلوي للخلايا دون تحطيمها فيتمكن البلازميد من التسرب عبر هذه الثقوب إلى الخارج تاركاً الكروموسوم في الداخل والذي سيتحول فيما بعد إلى Pellet مع الخلايا.

يُنقى المحلول الرائق الحاوي على البلازميد مرة أخرى عن طريق الطرد المركزي متدرج الكثافة، إذ يتم إضافة كلوريد السيزيوم CsCl و بروميد الأثيديوم Et Br إلى هذا المحلول الناتج من تكسير الخلايا ثم يُنقل إلى أنابيب الطرد المركزي ويُعمل لها طرد مركزي بقوة 40.000 rpm لمدة يومين. يؤدي هذا الطرد المركزي إلى تحويل محلول كلوريد السيزيوم إلى محلول متدرج الكثافة إذ ستكون هجرة الجزيئات إعتماداً على كثافتها فستكون الطبقة الطافية حاوية على الجزيئات الأقل كثافة بينما تزداد كثافة الجزيئات كلما تدرجنا إلى قعر الأنبوب، فاذا كان هذا المحلول حاوي على جزيئات مختلفة الكثافة فستكون هذه الجزيئات على شكل حزم تختلف مواقعها في أنبوب الطرد المركزي إعتماداً على كثافة هذه الجزيئات. إن كثافة كل من DNA البلازميد والملوثات الكروموسومية هي نفسها لذا ستكون هناك صعوبة في الفصل بينهما، وللتغلب على هذه المشكلة تُضاف مادة بروميد الأثيديوم للتخلص من الجزيئات الكروموسومية.

تُضاف بروميد الأثيديوم إلى هذا المحلول إذ كما هو معروف أن بروميد الأثيديوم هي مادة كلابية لها القدرة على الإرتباط بجزيئات DNA عن طريق إقحام نفسها بين القواعد النتروجينية المتجاورة مسببة فك إلتفاف حلزون DNA. بما أن جزيئات DNA الأخرى (غير البلازميدية) تمتلك نهايات حرة غير مرتبطة بعكس البلازميد وإن هذه النهايات الحرة ستسمح لها من الإرتباط بكميات كبيرة من بروميد الأثيديوم بعكس البلازميدات التي تكون نهاياتها مرتبطة بقوة فان إنفكاكها سيكون محدوداً وبالتالي لاترتبط بكميات كبيرة من بروميد الأثيديوم لذا ستزداد كثافة البلازميدات عن باقي جزيئات DNA الأخرى والمرتبطة بكميات كبيرة من بروميد الأثيديوم إذ كلما إزداد إرتباط بروميد الأثيديوم بجزيئة DNA كلما قلت كثافتها وبهذا ستكون البلازميدات في الأسفل.

مختبر الهندسة الوراثية

تحدد مواقع حزم الدنا في محلول كلوريد السيزيوم بتعريض الأنبوبة الى الاشعة فوق البنفسجية نتيجة لوجود بروميد الاثيديوم مؤدية الى تألقها باللون الأحمر وبعد تحديد مواقع الحزم تسحب حزمة دنا البلازميد بغرس حقنة طبية خلال جدران انبوبة الطرد المركزي البلاستيكية وسحب الحزمة المطلوبة بحذر. تزال صبغة بروميد الأثيديوم من الدنا البلازميدي وذلك بغسله عدة مرات بالبيوتانول لحين اختفاء اللون الأحمر ويتم التخلص من جزيئات كلوريد السيزيوم باستخدام الديلزة ثم تركز العينة باستخدام الكحول الأثيلي المطلق وحفظها في الثلاجة لحين الاستعمال.