## 1 Results / النتائج

### 1.1 Amplification of the HLA-A*0201 and β-2m gene from PBMC / *مضاعفة جين هلا*0201 وبيتا-2آم من المحيط الخارجي لخلايا الدم البيضاء*

| | |
|---|---|
| **First:** we isolated the total RNA form PBMC as follows:<br>We drew 10ml of blood from a person, we putted it in 4ml of EDTA (fig.1) to prevent the agglutination (EDTA is an anticoagulant) and we centrifugated it into a centrifugation at 4000rpm for 8 minutes (fig.2), we obtained the result designed in fig.3 then we aspirated the phase 2 that contains the white blood cells with a micropipette 1000µl, we putted it in a 1.5ml microcentrifuge tube finally we isolated the total RNA by the peqGold viral RNA kit (can be stored the result at 4°C). | **أولاً:** قمنا بعزل الرنا الكامل من المحيط الخارجي لخلايا الدم البيضاء كما يلي:<br>قمنا بسحب 10مل من دم إنسان، ووضعناه في 4مل من إيثلين ( صورة 1) لمنع تخثر EDTAثنائي الأمين رباعي حمض الخل ( الدم (منع التجلط) ومن ثم وضعناه في آلة الطاردة لفصل الدم على سرعة 4000 آر.بي.آم لمدة 8 دقائق (صورة 2)، وبعدها حصلنا على ثلاث طبقات من الدم كما في الصورة 3 وبواسطة الماصة سحبنا الطبقة الثانية من الدم .1000µlالأوتوماتيكية الخاصة ب المحتوية على كريات الدم البيضاء ووضعناها في أنبوب 1.5مل وبدأنا بعملية عزل الرنا الكامل بواسطة مجموعة الرنا الفيروسي بك غولد.<br>(تحفظ النتيجة على 4م°) |

**Figure 1: putting the blood in 4ml EDTA / الصورة 1: وضع 10 مل من الدم في 4مل من مضاد التخثر**

**Figure 2: centrifugation at 4000rpm for 8min / الصورة 2: عملية الفصل على 4000آر.بي.آم لمدة 8دقائق**

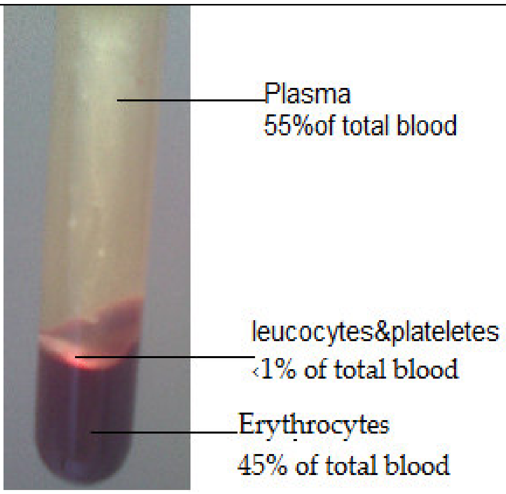


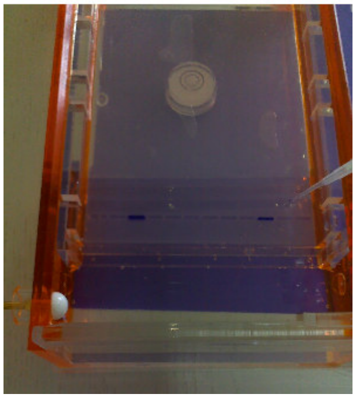

**Figure 3: Blood components after centrifugation / الصورة 3: مكونات الدم بعد الفصل.**

| | |
|---|---|
| **Second**: we retrotranscripted the tRNA | **ثانياً:** قمنا بعملية إعادة نسخ الرنا الناقل إلى الدنا الناسخ بواسطة أنزيم |

| | |
|---|---|
| to cDNA by M-MLV reverse transcriptase as described in part 3.6 step 3.<br><br>**Third:** we amplified the cDNA by PCR as described in part 3.6 step 4, and we obtained a quantity amplified of HLA-A*0201 and β2-m. | M-MLV reverse transcriptase كما هو مذكور في الجزء 3.6 المرحلة 3.<br><br>**ثالثاً:** بعدما حصلنا على الدنا الناسخ قمنا بمضاعفة كميته بواسطة آلة تفاعل البلمرة المتسلسل كما هو مذكور في الجزء 3.6 المرحلة 4، وهكذا نكون قد حصلنا على كمية مضاعفة من ال هلا*0201 وبيتا2-آم. |

| | |
|---|---|
| <br>**Figure 4: Pipetting of 1µl of M-MLV(RT) / الصورة 4: إمتصاص 1 ميكروليتر من M-MLV** | <br>**Figure 5: PCR machine / الصورة 5: آلة تفاعل البلمرة المتسلسل** |

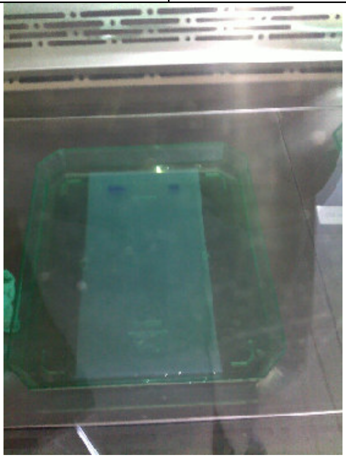
| | |
|---|---|
| **Fourth:** we purified the PCR product on an agarose gel;<br><br>1. we prepared the agarose gel as follows:<br><br>The preparation of an agarose gel: - Put 1g of agarose in 100ml of TAE buffer 1×PH and dissolve it at 90°C.<br>- Let the gel cool down to about 60°C at room temperature.<br>- Put the gel on the gel rack then insert the comb and let it to solidify. | **رابعاً:** قمنا بتنقية منتج آلة تفاعل البلمرة المتسلسل بواسطة هلام الأغاروز:<br><br>1. قمنا بتحضير الهلام الأعاروزي كما يلي:<br><br>طريقة التحضير: - وضعنا 1غ من الأغاروز في 100مل من منظم TAE 1×درجة الحموضة ثم قمنا بتذويبه على 90°م.<br>- تركناه ليبرد إلى 60م° على درجة حرارة الغرفة.<br>- أضفناه على طبق الهلام وأضفنا عليه المشط ثم تركناه حتى يجمد. |

| | | | |
|---|---|---|---|
| <br>**Figure 6: Dissolve the gel at 90°C with agitation /** الصورة 6: تذويب الهلام على 90°م مع التحريك. | <br>**Figure 7: putting of the gel on the gel rack /** الصورة 7: وضع الهلام على الطبق | <br>**Figure 8: injetion of 10µl of sample into the wells of gel /** الصورة 8: وضع 10ميكروليتر من العينة في فتحة الهلام | <br>**Figure 9: migration of the three bands (2 bands for HLA-A*0201& 1 band for β2-m)** الصورة 9: هجرة البقع الثلاثة (بقعتين للهلا وبقعة لبيتا2–آم) |

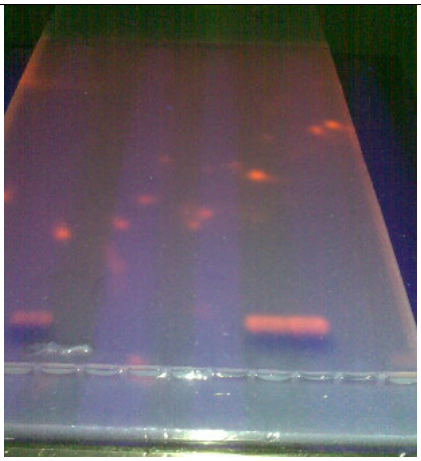
| | |
|---|---|
| 2. After the solidification of gel, we drew the comb and the border of the gel rack, we added 1liter of TAE buffer to cover all the gel, then we injected 10µl of each sample (we putted in each new eppendorf tube 6 µl of the DNA (HLA-A*0201 or β-2m) + 3µl of glycerol + 3µl of bormophenol blue) into the wells of the gel prepared, we closed the lid of electrophoresis chamber and applied the voltage at 120 volts for 30min, (400mA, 400 Watts). | 2. بعد جماد الهلام جيداً، قمنا بسحب المشط وأطراف طبق الهلام، وأضفنا 1 ليتر من منظم TAE 1×درجة الحموضة لتغطية الهلام كاملاً ووضعنا في الفتحات الصغيرة للهلام 10ميكروليتر من كل عينة (تحتوي العينة في كل أنبوب على 6ميكروليتر من الدنا إما الهلا 0201وإما بيتا2–آم + 3 ميكروليتر من الغليسيرول + 3 ميكروليتر من البروموفينول الأزرق) ثم أغلقنا غطاء الرحلان الكهربائي وقمنا بتشغيل التيار الكهربائي على 120ڤولت لمدة 30 دقيقة. |
| 3. After the migration of bands we turned off the power supply we removed the gel and putted it into a deep vessel we covered it by 250ml of $dH_2O$ and we added 30µl of ethidium bromide and late it for 30min. then we washed the gel 3 times from ethidium bromide with dist.water.(250ml in each times). | 3. بعد هجرة بقع الدنا قمنا بإطفاء التيار الكهربائي عن الآلة، أخذنا الهلام ووضعناه في وعاء عميق أضفنا عليه 250مل من الماء المعقم مع 30 ميكروليتر من بروميد الإثيديوم وتركناه لمدة 30 دقيقة، بعدها قمنا بغسله من بروميد الإثيديوم 3 مرات بواسطة الماء المعقم (وضعنا في كل مرة 250مل من الماء المعقم). |
| **WARNING: be curful with the ethidium bromide!!! Use specific gloves, put the waste liquid of ethidium bromide in a specific place, and do not throw it in the nature.** | **تحذير: يجب الحذر في التعامل مع الإتيديوم !!! إستخدم القفازات الخاصة , ضع الماء المحتوية على بروميد الإثيديوم في مكان** |

| | |
|---|---|
| **Ethidium bromide could cause a cancer and it is mutagen.**<br><br>4. We putted the gel on UV-machine to see if we have bands or no, if yes, so the steps are correct and we can continue the protocol.<br><br>***Result***: AlHamdullillah we observed the 3 bands and we could continue the protocol (fig.12). | **خاص و لا ترميه في الطبيعة . لأنه قد يسبب السرطان ويحدث الطفرات (التغيير المفاجئ للدنا ).**<br><br>4. بعد غسله جيداً من بروميد الإثيديوم وضعناه على آلة الأشعة ما فوق البنفسجية لنرى إذا كان هناك بقع من الدنا، إلا إن هذه المرحلة ستبين لنا نتيجة ما تم فعله حتى الآن.<br><br>***النتيجة***: الحمدلله تمكنا من رؤية البقع الثلاثة التي تم وضعهم (بقعتين للهلا وبقعة لبيتا2–آم) وتمكنا من إكمال العمل (الصورة–12). |

**:injection of 30µl of ethidium 10Figure bromde in the gel recovered with 250ml /dH₂O.** **الصورة 10: إضافة 30 ميكروليتر من بروميد الإثيديوم في الهلام المغطى ب 250مل من الماء المعقم**



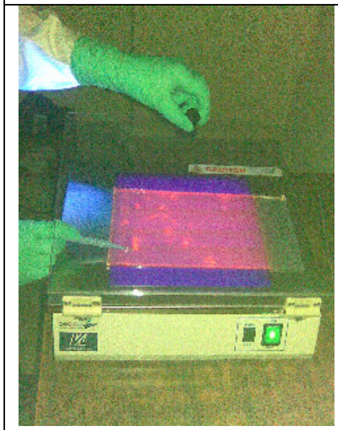
**: soaking the gel with 11Figure ethidium bromide for 30min /** **الصورة 11: نقع الهلام ببرميد الإثيديوم لمدة 30 دقيقة**



**: observation of 2 bands of HLA-A*0201 12Figure at the right an 1 band of β2-m at the left on UV-machine /** **الصورة 12: ملاحظة بقعتي الدنا من الهلا 0201 من الجهة اليمنى للهلام وبقعة للبيتا2–آم على الجهة اليسرى منه على آلة الأشعة ما فوق البنفسجية.**

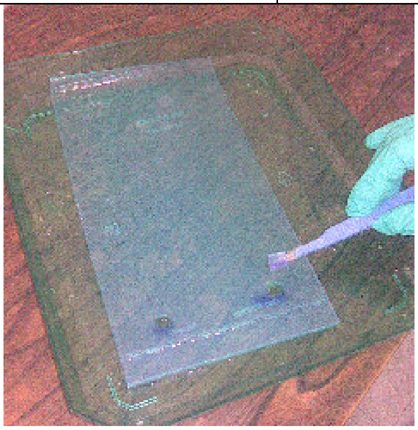
| | |
|---|---|
| 5. We marked off the border of each band on the UV-machine (fig.14), then we putted the gel in the deep vessel to cut the bands and should be remove all the excess of gel (fig.15) then we putted each band in a new eppendorf tube (fig.16), we balanced each tube before and after the addition of band in it for obtain the weight of bands to begin the | 5. بينما كان الهلام على آلة الأشعة مافوق البنفسجية قمنا بتعيين حدود البقع (الصورة 14)، ثم نقلناه إلى وعاء عميق ثم قطعنا البقع جيداً مع إزالة الهلام الزائد (الصورة 15) وضعنا كل بقعة في أنبوب خاص (الصورة 16)، ثم قمنا بأخذ وزن كل أنبوب بداخله البقعة من الهلام وأنبوب فارغ لنحصل على الوزن الصافي للهلام لنبدأ بتصفيته عبر |

| | |
|---|---|
| purification of those bands with the Qiaquick gel extraction kit[1] (the weight of HLA-A*0201 was 1.32g, and for β2-m was 1.31g) then we stored the purified DNA at -20°C until use. | مجموعة إستخلاص هلام كياكويك (الوزن الصافي للهلا 0201 كان 1.32غ وبيتا كان 1.31غ) وبعدها قمنا بحفظ الدنا المنقى على -20°م حتى إستعماله في المراحل القادة. |



: marking off the border of bands/ 13Figure

الصورة 13: تعيين أطراف البقع



: cutting the DNA band from the 14Figure

الصورة14 gel/: إزالة الهلام عن بقع الدنا ووضعهم

: DNA band in eppendorf tube 15Figure

الصورة 15/: وضع بقع الدنا في الأنبوب

## 1.2 Preparation of vector / تحضير الناقل

| | |
|---|---|
| To digest the vector we assembled the following components in a microcentrifuge tube:<br>3 µl pET vector<br>3 µl 10X restriction enzyme buffer<br>1 µl (10–20 U) EcoR I restriction enzyme<br>23 µl Nuclease-free water brought to volume<br>30 µl Total volume<br><br>We incubated at the appropriate temperature (usually 37°C) for 2–4 h in the water bath. We ran a 3 µl sample on an agarose gel to check the | لقطع الناقل قمنا بجمع المكونات التالية في أنبوب النابذة:<br>3 ميكروليتر من الناقل pET.<br>3 ميكروليتر من منظم أنزيم القطع 10×.<br>1 ميكروليتر (10-20وحدة) من أنزيم القطع إيكو.آر.وان<br>23 ميكروليتر من ماء خال من النيوكياز.<br>الحجم النهائي في الأنبوب 30 ميكروليتر.<br>قمنا بحضن الأنبوب لمدة ساعتين على 37°م في حوض ماء. |

[1] For more detail see MEGBI training courses book part I page 54-58.

[2] Refer to MEGBI training courses book part I page 54-58.

extent of digestion (fig.16), when digestion is complete, we added 1µl of calf intestinal alkaline phosphatase (we diluted 0.2µl of calf intestinal alkaline phosphatase in 0.8 µl of water for obtain 0.05U) directly to the remainder of the digestion. We incubated at 37°C for 30 min in the water bath then we injected the sample in 4 wells in the gel (fig.17), we ran the gel to separate the linear plasmid from nicked and supercoiled species. We visualized the DNA band with a long wave UV light source (fig.18) and we cut the band from the gel using a clean razor blade.

WARNING: Avoid over exposure to the light source, which can cause nicks and double strand breaks in the DNA.

We balanced the bands to begin that purification with QIA quick gel extraction kit[2] Resuspended the final product in a total volume of 30 µl (usually about 50 ng/µl DNA). Assume recoveries in the range of 50% for the ligation step. Then we stored the treated vector at –20°C until use.

ومن ثم وضعنا 3 ميكروليتر من العينة على هلام الأغاروز لنتحقق من قطعه (صورة 16)، وعندما تأكدنا من تقطيعه أضفنا 1 ميكروليتر من أنزيم الفوسفاتيز القلوي المعوي للعجل (ولكن لنحصل على تركيز 0.05وحدة من الأنزيم أضفنا 0.8ميكروليتر من الماء على 0.2ميكروليتر من الأنزيم) مباشرة لإبقاء عملية القطع ووضعناه في حوض ماء على 37°م لمدة 30دقيقة ثم قمنا بوضعه في 4 فتحات من الهلام الأغاروزي لتنقيته (الصورة 17)، بعد هجرة البقع على الهلام كما في المرحلة السابقة قمنا بتقطيعهم من الهلام الزائد بواسطة مشرط حاد ونظيف (الصورة 18).

تحذير: يجب تجنب تعريض الزائد للهلام على الأشعة ما فوق البنفسجية لأن ذلك قد يسبب شقوق وكسر للحبلين المزدوجين للدنا.

ومن ثم قمنا بقياس وزن البقع لنبدأ بعملية تنقيتهم من الهلام بواسطة مجموعة إستخلاص هلام كياكويك. الحجم النهائي من المنتج هو 30ميكروليتر ويمكن حفظه على -20م° إلى حين إستعماله مرة أخرى.

Figure 16: visualization the band of the digestion vector in the gel / الصورة 16: رؤية بقع دنا الناقل المقطع على الهلام

Figure 17: injection the samples in 4 wells in gel / الصورة 17: وضع العينات في 4 فتحات في الهلام

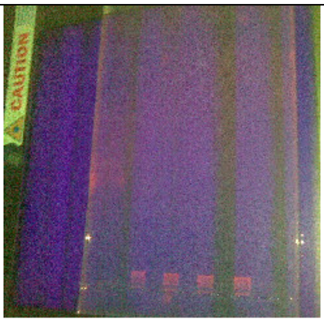



Figure 18: observation the bands on UV-machine / الصورة 18: ملاحظة البقع على ألة الأشعة ما فوق البنفسجية

## 1.3 Ligation / عملية الربط

We prepared 3 eppendorfs tubes and we marked each eppendorf tube (the first for the ligation of vector with HLA-A*0201, the second for the vector with β2-m, the third for the vector with T7 RNA Polymerase).

In this step we would tried if the insert can be legated with the vector without adapter!

**Figure 19: Marking of each tube / الصورة 19: وضع إشارة على كل أنبوب**

في هذه العملية قمنا بتجهيز 3 أنابيب من النابذة مع الكتابة على كل أنبوب ما الدنا الذي سيحتويه ( مثلاً: الأنبوب الأول كتبنا عليه الناقل مع الهلا0201، الثاني الناقل مع بيتا-2آم أما الثالث كتبنا عليه الناقل مع تي7 بوليميراز الرنا).

في هذه المرحلة كنا نريد أن نجرب هل من الممكن ربط الدنا الزائد بالناقل من دون الوصيلة (adapter).

We added in each eppendorf tube (1.5ml):

2 µl 10X Ligase Buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.6,

8 µl 25 mM MgCl2

ثم أضفنا في كل أنبوب (1.5مل):

2 ميكروليتر من منظم الليغاز 10×.

8 ميكروليتر من كلور الماغنيزيوم 25mM.

| | |
|---|---|
| 2 µl 100 mM DTT<br><br>1 µl 10 mM ATP<br><br>2 µl 50 ng/µl prepared pET vector<br><br>1 µl T4 DNA ligase, diluted (with ligase dilution buffer) 0.2–0.4 Weiss units/µl<br><br>2 µl Prepared target gene insert (0.2 pmol)<br><br><u>2 µl Nuclease-free water to volume</u><br><br>20 µl Total volume<br><br>Then gently we mixed by stirring with a pipet tip, we incubated at 16°C to overnight. | 2 ميكروليتر من 100mM DTT.<br><br>1 ميكروليتر من 10Mm ATP.<br><br>2 ميكروليتر من الناقل pET المحضر 50ng/µl.<br><br>1 ميكروليتر من ليغاز الدنا تي4، المخفف (مع المنظم المخفف ليغاز) 0.2-0.4 وحدة/ ميكروليتر.<br><br>2 ميكروليتر من الدنا المحضر (0.2 pmol).<br><br><u>2 ميكروليتر من ماء خالٍ من النيوكلياز.</u><br><br>20 ميكروليتر الحجم النهائي.<br><br>ومن ثم مزجناهم بلطف بواسطة الممصة صعوداً ونزولاً وتركناهم على 16°م طيلة الليل. |

## 1.4 Transformation / *عملية النقل*

| | |
|---|---|
| **Transformation into host strain for cloning**<br>In this step we would to prove if the ligation of the insert with the vector without adapter was possible or no, for this reason we transformed them in the host strain for cloning then we platted them and if in the next day the colonies was amplified on the plate this mean that ligation is possible and vice versa.<br>For this step we brought a plate contains e.coli from the hospital because when we worked in the e.coli that presented in our lab we found it death and not lost the | **عملية النقل إلى داخل خلايا الإستنساخ**<br>في هذه المرحلة أردنا أن نقوم بتجربة ربط الدنا الزائد بالناقل من غير الموصل (adapter)، وللتأكد من ذلك يجب نقل المنتج من عملية الربط إلى داخل خلايا البكتريا وزرعها على وسط غذائي ملائم ثم مراقبتهم في اليوم التالي فإذا تبين أن خلايا البكتيريا تكاثرت فهذا يعني أن عملية الربط قد نجحت والعكس صحيح.<br>ولهذه التجربة جلبنا بكتريا مزروعة من المستشفى وذلك لأن البكتريا التي كانت موجودة عندنا في المختبر وجدناه ميتة بينما كنا نجهزها لنعمل بها ولكي لا نخسر الكثير من الوقت بإنتظار إحضار بكتيريا أخرى من الشركة، قمنا بالعمل ببكيريا المستشفى |

| | |
|---|---|
| time we worked this step as follows: | كما يلي: |
| 1- We took some colonies from the plate then we putted it in 5ml LB medium. | 1- أخذنا بعض من البكتريا المزروعة في صحن بتري ووضعناهم في 5 مل من وسط آل بي. |
| 2- We incubated over night at 37°C with shaking | 2- حضناهم طيلة الليل على 37م° مع الإهتزاز. |
| 3- In the second day we observed a big quantity of e.coli in the medium we distributed the medium in 4 eppendorf tubes and we chilled them on ice for 10 min, centrifuged them at 4000 rpm for 10 min at 4°C, discarded the supernatant and resuspended the pellets each in 600 µl of cold 0.1M calcium chloride, leaved them on ice for 25 min, centrifuged them at 4000 rpm for 10 min at 4°C, resuspended each pellet in 60 µl of cold 0.1M calcium chloride (this step for competent cells) then we let some microliter for the next step and we stored the remaining at -20°C | 3- في اليوم التالي لاحظنا أن خلايا تكاثرت بشكل ملحوظ في الوسط آل بي عندئذ وزعنا كمية الوسط التي كانت في الأنبوب إلى 4 أنابيب نابذة ووضعناهم في الثلج لمدة 10 دقائق، ومن ثم نبذناهم على 4000 آر.بي.آم لمدة 10 دقائق على 4م°، ثم إرمي السائل وأضف 600ميكروليتر من كلورايد الكالسيوم 0.1M البارد على المترقد في الأنبوب وإتركه في الثلج لمدة25 دقيقة ومن بعدها إنبذهم على4000 آر.بي.آم لمدة 10 دقائق على 4م° ثم أضف 60ميكروليتر من كلورايد الكالسيوم 0.1M على المترقد في الأنبوب (هذه المرحلة هي لفتح الخلايا) وأخيراً تركنا بعض الميكروليتر لنعمل بهم في المرحلة التالية وقمنا بتخزين الباقي في الثلاجة على -20م°. |
| 4- We did the transformation as follows: We pipetted 20 µl aliquots of cells e.coli from the hospital into pre-chilled tube we added 1 µl of each ligation reaction (we added the pET that without cutting as control positive), stirred gently to mix and we returned to the ice we incubated 5 min on ice , we placed the tubes in a 42°C water for exactly 30 sec. (do not shake), we placed the tubes on ice for 2 min, we added 80 µl LB medium to each tube, kept the tube on ice until all have received LB, | 4- قمنا بعملية النقل كالتالي: أخذنا 20 ميكروليتر من خلايا البكتريا ووضعناهم في أنبوب بارد وأضفنا 1 ميكروليتر من كل من تفاعل الربط (وأضفنا أيضاً إحدى الأنابيب الناقل pET لوحده كتحكم إيجابي)، حركناهم بنعومة لخلطهم ووضعناهم في الثلج لمدة 5 دقائق ثم في الماء الساخن على 42م° لمدة 30 ثانية (من دون تحريك) ثم في الثلج مرة ثانية لمدة 2 دقيقتين وأضفنا 80 ميكروليتر من وسط آل بي لكل أنبوب، وتركناهم في الثلج إلى أن يصل الوسط إلى الجميع في الأنبوب ثم وضعناهم في الحاضنة لمدة |

| | |
|---|---|
| incubated for 1 hour at 37°C with shaking. | ساعة على 37 م° مع التحريك. |
| 5- We Platted them onto plate contain LB medium with ampicillin then incubated overnight at 37°C | 5- ثم زرعناهم على صحن بتري المحتوي على وسط آل بي مع الأمبيسيلين ومن بعدها وتركناهم طيلة الليل على 37 م°. |
| 6- We observed in the second day colonies on the pate and that mean the ligation is possible and we can continue with the expression. | 6- وفي اليوم الثاني لاحظنا مجموعات متكاثرة من البكتريا على الصحن وهذا يعني أن عملية الربط ممكنة ويمكننا تكملة العمل في التعبير عن البروتين. |
| 7- For the plate that contains the pET (the control positive) we took some colonies from it and we putted it the 2.5ml LB medium with ampicillin then we incubated it overnight at 37°C for 12-16 hours. | 7- أما بالنسبة لصحن الناقل الذي أخذناه كتحكم إيجابي أخذنا منه بعض مجموعات البكتريا ووضعناهم في 2.5مل من وسط آل بي مع الأمبيسيلين وتركناهم طيلة الليل على 37م° لمدة 12-16ساعة. |
| 8- In the next day we centrifuged it and we purified it with Qiaprep spin Miniprep kit then we stored the result at -20°C. | 8- وفي اليوم التالي نبذناهم ثم قمنا بتصفيتهم بواسطة مجموعة "كيابرب سبين مينيبرب" والناتج الذي حصلنا عليه خزناه على -20م°. |

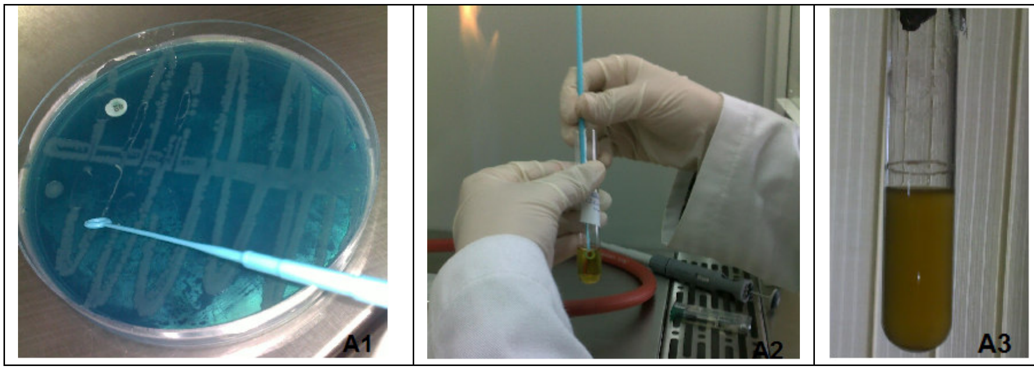



**Figure 20**: A1) take some colonies from the plate. A2) put the colonies in LB medium and let overnight at 37°C with shaking, next day observe the result as in A3, continue with the competent cells, and the transformation.

**الصورة 20**: أ) **خذ بعض مجموعات البكتريا من الصحن، أ2) وضعهم في وسط آل بي وتركهم طيلة الليل على 37م° مع التحريك، في اليوم التالي لاحظنا أن الوسط تغير لونه كما في أ3، أكمل في فتح خلايا البكتربا، ومن ثم في عملية النقل**

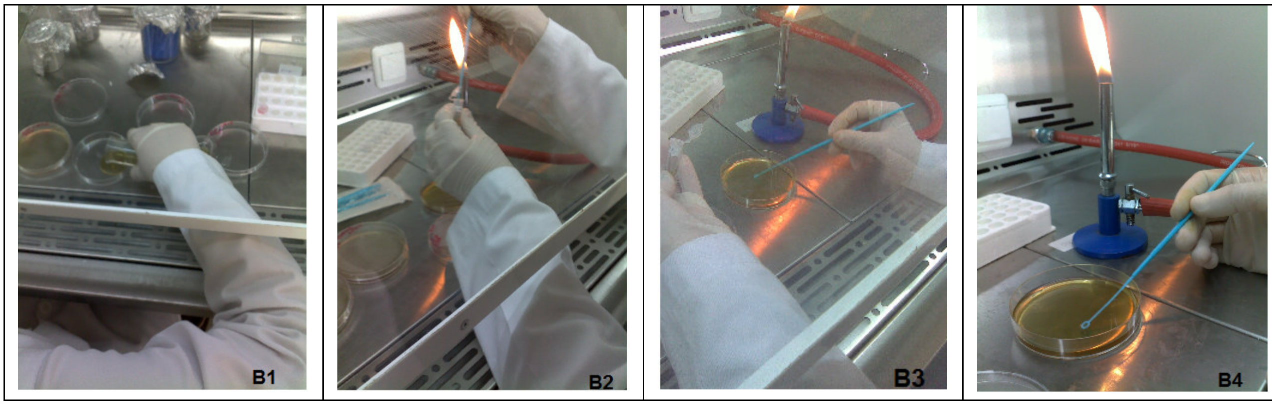



**Figure 21**: after preparing the LB medium with the ampicillin, B1) put it in the plate with attention from introducing air bubbles, B2) take some microliter from the transformation and plate it on the medium as fig. B3, B4)

الصورة **21**: بعد تحضير وسط آل بي مع الآمبيسلين، ب**2**) ضعه في الصحن مع الإنتباه من تكوين فقاقيع من الهواء، ب**2**) خذ بعض الميكروليتر من عينة الناقل وازرعهم على الوسط كما في ب**3**) وب**4**).

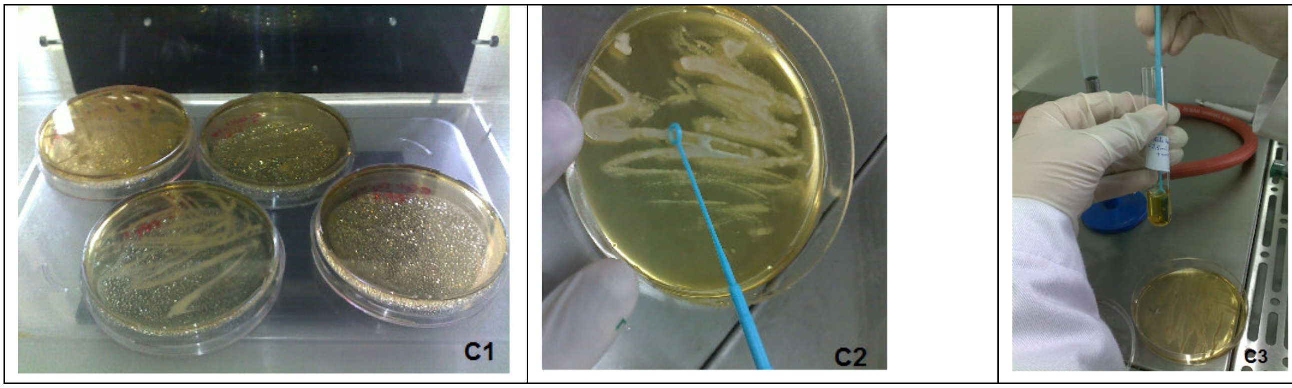



**Figure 22**: C1) after plating, incubate the plates overnight at 37°C, C2) in the next day take some colonies from the plate and put it in LB medium with ampicillin as C3) and let it between 12-16h at 37°C.

الصورة **22**: ج **1**) بعد عملية الزرع، أترك الصحون طيلة الليل على **37**م°، ج**2**) في اليوم التالي خذ بعض المجموعات من الصحن وضعها في وسط آل بي مع أمبيسيلين كما في ج**3**) وأتركهم ما بين **12**– **16** ساعة على **37**م°.

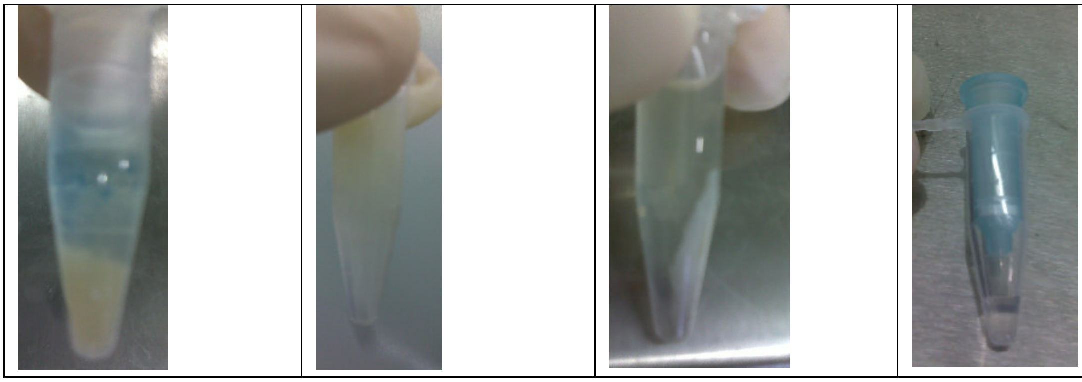


**Figure 23**: this the result in each step when worked in the purification of plasmid not cutting for restored at -20°C./ **الصورة 23: هذه الأنابيب هي نتيج كل مرحلة من مرحلة تنقية الناقل الغير مقطع والذي سيحفظ على -20م°.**

| **Transformation into expression host** | **عملية النقل إلى داخل الخلايا المعبرة** |
|---|---|

| | |
|---|---|
| We tried in this step to work in host for cloning and we added in it the T7 RNA Polymerase recombinant with the pET vector (step of ligation) and we added it with the transformation of HLA-A*0201 recombinant and β2-m recombinant then we platted them onto petri dishes and we continued the protocol until ELISA test for see if there was a complex that meaning there is a protein and this step is correct and vice versa.<br>To do this first should be prepared the host strain, second should be done the transformation, the plating then the extraction the protein from the strain and purified it, finally should be done the ELISA test.<br>We took the e.coli top 10 from -70°C and that should be competent and we worked | في هذه المرحلة قمنا بتجربة العمل على الخلايا البكتيرية المخصصة للإستنساخ مع إضافة جين بوليمراز الرنا ت7 المؤتلف مع الناقل pET (الذي جهز في مرحلة الربط) وأضفناه مع كل عملية نقل سواء كانت نقل هلا 0201 المؤتلف أو بيتا2-آم المؤتلف ثم زرعناهم على صحون بتري وأكملنا بهم العمل حتى فحص إيليزا لنرى إن كان هناك مركب فهذا يعني أن هذه المرحلة صحيحة والعكس صحيح.<br>ولفعل ذلك يجب أولاً تحضير سلسلة الخلايا، ثانياً يجب نقل المنتج من الربط إلى الخلايا المحضرة ومن ثم زرعهم ومن بعدها إستخراج التعبير البروتييني من سلسلة الخلايا وتصفيته، وأخيراً يجب التأكد منه بواسطة إيليزا.<br>في البداية أخذنا بكتريا إشيريكي القلونية top 10 من درجة -70م° حيث يجب أن تكون مفتوحة إلا أن أثناء العمل وزرعها على صحن بتري لم يتبين لنا في اليوم التالي أنها تكاثرت لهذا السبب ظننا بأنها ميتة وللتاكد من ذلك قمنا |

in it but when we plated onto petri dish we didn't saw in the second day any colonies, for this reason we think that the e.coli was died but for prove that we putted some micro liter of this e.coli into 5ml LB medium and we incubated them at 37°C with shaking for overnight and in the second day we saw the amplification of e.coli and that meaning the e.coli wasn't died but it wasn't competent, we did the competent for the e.coli as follows:

We dispensed the 5ml of sample that in the tube in 4 eppendorf tube 1.5ml and we let them in glace for 10 min, then we centrifuged them at 4000 rpm at 4°C for 10 min, we discarded the supernatant and we added 600µl of $CaCl_2$ 0.1M cold, we let them in glace for 25 min then we centrifuged at 4000 rpm for 10 min at 4°C finally we resuspended each pellet in 60µl of $CaCl_2$ 0.1M cold, then we stored 3 eppendorf tubes at -20°C and we let one eppendorf for use it in the transformation.

Secondly, we did the transformation as follows:

We pipetted 20 µl aliquots of cells top 10 into pre-chilled tube we added 1 µl of each ligation reaction (first tube contains ligation of HLA-A0201 and T7RNA polymerase, second it contains the ligation of β2-m and T7RNA polymerase), stirred gently to mix and we returned to the ice, incubated 5 min on ice, placed the tubes in a 42°C water for exactly 30 sec. (do not shake), turned the

بوضع بعض الميكروليترات في 5 من وسط آل بي وتركناهم طيلة الليل على 37م° مع التحريك وفي اليوم الثاني لاحظنا أن البكتريا تكاثرت وهذا يوكد بأن البكتريا ليست ميتة ولكن كانت غير مفتوحة لذا قمنا بعملية فتحها على الشكل التالي:

وزعنا ال5مل من وسط آل بي المتكاثر فيها البكتريا على 4 أنابيب نابذة (1.5مل) وتركناهم في الثلج لمدة 10 دقائق، ثم نبذناهم على 4000آر.بي.آم لمدة 10 دقائق على 4م°، ومن بعدها رمينا السائل الطائف في الأنبوب ووضعنا 600 ميكروليتر من كلورايد الكالسيوم 0.1M البارد، ثم تركناهم في الثلج لمدة 25 دقيقة، ثم نبذناهم على 4000آر.بي.آم لمدة 10 دقائق على 4م°، وأخيراً رمينا السائل الطائف في الأنبوب ووضعنا 60 ميكروليتر من كلورايد الكالسيوم 0.1M البارد، ثم قمنا بتخزين 3 أنابيب على -20م° وتركنا أنبوب لنكمل العمل به في عملية النقل.

ثانياً قمنا بعملية النقل كالتالي:

أخذنا 20 ميكروليتر من خلايا top 10 ووضعناهم في أنبوب مبرد وأضفنا 1 ميكروليتر من تفاعل الربط (الأنبوب الأول يحتوي على رابط هلا0201 مع رابط بوليمراز الرنا ت7، الثاني يحتوي على رابط بيتا2-آم مع رابط بوليمراز الرنا ت7)، حركناهم بنعومة لخلطهم وأعدناهم إلى الثلج لمدة 5 دقائق ثم وضعناهم في الماء الساخن على 42م° لمدة 30 ثانية (من دون تحريك) ثم في الثلج مرة ثانية لمدة 2 دقيقتين وأضفنا 80 ميكروليتر من وسط آل بي لكل أنبوب، وتركناهم في الثلج إلى أن يصل الوسط إلى الجميع في الأنبوب ثم وضعناهم في الحاضنة لمدة ساعة على 37 م° مع التحريك.

ثم زرعناهم على صحنين بتري المحتوي على وسط آل بي مع الأمبيسيلين ومن بعدها تركناهم طيلة الليل على 37 م°، وفي

| | |
|---|---|
| tubes on ice for 2 min, added 80 µl LB medium to each tube kept the tube on ice until all have received LB, incubated for 1 hour at 37°C with shaking.<br>then we platted them onto 2 plates contain LB medium with ampicillin then incubated overnight at 37°C, we observed in the second day colonies on the plate, we took some colonies from each tube and putted in 2.5ml LB medium contains ampicillin we incubated them for 12-16 hours at 37°C then we centrifuged them at 4000rpm for 5 min, resupended the pellets in 229.84 µl of tris HCl (10mM) and we added in it 25 µg lyososyme, 10 µl phenylmethylsulfonylfluoride (50mg/ml), 0.08 µl DNase (1000U) 0.08 µl RNase (10mg/ml) 1 µl EDTA (1mM), incubated at 22°C for20 min, heat shock for 40s in a boiling water, centrifuged at 10000×g for 20min, washed the pellet with 250 µl 10 mM tris HCl, PH 8, dissolved it in 125 µl of 100mM tris HCl, PH8, 8M urea, then should be centrifuged at 4°C for 1 hour at 150000×g but because we didn't have a centrifuge it speed more than 13000×g we centrifuge them at 13000×g for 2 hours and saw a pellet for this reason we continued in this way, | اليوم التالي لاحظنا تكاثر البكتريا على الوسط، فأخذنا بعض من المجموعات المتكاثرة ووضعناهم في 2.5 مل من وسط آل بي مع الأمبيسيلين وتركناهم على 37 م° لمدة 12-16ساعة ومن ثم نبذناهم على 4000 آر.بي.آم لمدة 5 دقائق، ومن أضفنا على المترقد في أسفل الأنبوب 229.84 ميكروليتر من تريس حمض الهيدروكلوريك (0.1M) وأضفنا عليه 25 ميكروغرام من اللايزوزيم، 10 ميكروليتر من فنيل ميثيل سولفونيل الفلورايد (50mg/ml)، 0.08 ميكروليتر من أنزيم الدنا (1000U) و 0.08 ميكروليتر من أنزيم الرنا (10mg/ml)، 1 ميكروليتر من إي.دي.تي.آي (1mM)، ثم تركناهم على 22م° لمدة 20 دقيقة، ومن بعدها قمنا بصدمة حرارية للأنبوب لدة 40 ثانية في ماء مغلية، ثم نبذناهم على 10000×g لمدة 20 دقيقة، ومن ثم قمنا بغسل المترقد في أسفل الأنبوب ب250 ميكروليتر من تريس حمض الهيدروكلوريك (10mM)، درجة الحموضة 8، ومن ثم ذوبه في 125 ميكروليتر من تريس حمض الهيدروكلوريك (100mM)، درجة الحموضة 8، مع اليوريا (8M)، ثم كان يجب نبذهم على 4م° لمدة ساعة على 150000×g ولكن بما أن النابذة الموجودة في المختبر السرعة القصوى لديها 13000×g قمنا بنذ الأنبوبين على 13000×g لمدة 2ساعتين وعندما لاحظنا أن هناك كمية من المترقد في أسفل الأنبوب أكملنا العمل على هذا النحو، |

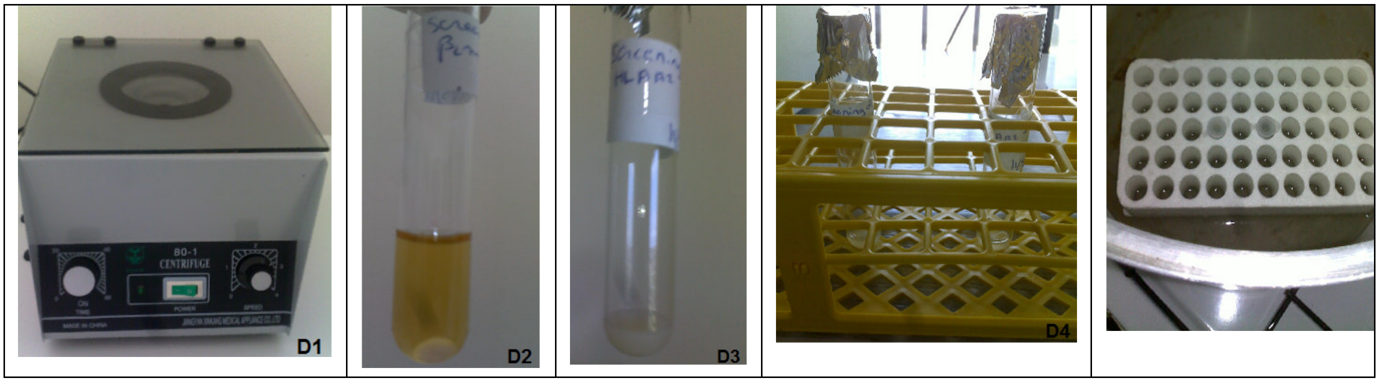



**Figure 24**: after incubation the colonies that contain the insert recombinant,D1) centrifuge them at 4000rpm for 5 min and obtain the result as D2), then resuspend the pellet with the buffer as D3) and incubated at 22°C for 20 min as D4) then transfer them to microcentrifuge tube, heat shock 40s as D5).

**الصورة 24: بعد حضن المجموعات التي تحتوي على الدنا في الوسط، د1) انبذ الوسط على 4000أر.بي.آم لمدة 5 دقائق وبعدها ستحصل على النتيجة كما في الصورة د2)، ومن بعدها ذوب المترقد بالمنظم كما في د3) واحضنه على 22م° لمدة 20 دقيقة كما في د4) وانقلهم إلى أنابيب نابذة وقم بصدمة حرارية لهم على 40 ثانية كما في د5).**

| | |
|---|---|
| We purified the protein of HLA-A0201 and β2-m by anion exchange chromatography Q sepharose fast flow (QFF) as follows: | قمنا بتصفية بروتيين الهلا0201 وبيتا2-آم بواسطة غروماتوغرافيا تبادل الإيون السيفاروزي للتدفق السريع كما يلي: |
| 1. We filled the syringe with the start buffer, removed the stopper and connected the column to the syringe with the provided connector, drop to drop to avoid introducing air into the column. | 1. أملأنا الإبرة بمنظم البدء، ثم أزلنا السدادة التي على العامود وأوصلنا العامود بالإبرة بالرابط المناسب، وبحذر ولتجنب دخول الهواء على العامود وضعنا نقطة نقطة من الإبرة على العامود إلى أن يلصق به. |
| 2. Removed the snap-off end at the column outlet. | 2. أزلنا النهاية المضافة عند أسفل العامود. |
| 3. Washed out the preservatives with 5 column volumes of start buffer, at 1ml/min for the HiTrap 1ml. | 3.قمنا بغسل المواد في العامود ب 5 مرات من حجم العامود بمنظم البدء، على 1مل/بالدقيقة لكل 1مل من عامود "هاي ترب". |
| 4. Washed with 5 column volumes of elution buffer. | 4. قمنا بغسل ب 5 مرات من حجم العامود بمنظم الإستخراج. |
| 5. Finally equilibrated with 5 column volumes of start buffer. | 5. أخيراً قمنا بتعديل العامود ب 5 مرات من حجم العامود |

| | |
|---|---|
| | بمنظم البدء. |
| 6. applied the sample (the protein of HLA-A0201) at 1ml/min for HiTrap 1ml using a syringe fitted to the luer connector | 6. وضعنا العينة من البروتين المراد نتقيته (الهلا0201)على 1مل/بالدقيقة لكل 1مل من عامود "هاي ترب" بإستخدام الإبرة الموصلة الرابط المناسب. |
| 7. Washed with at least 5 column volumes of start buffer or until no material appears in the effluent. | 7. قمنا بغسل العامود ب 5 مرات من حجم العامود بمنظم البدء. |
| 8. Eluted with 5-10 column volumes of elution buffer. | 8. ثم إستخرجنا العينة ب5 مرات من حجم العامود بمنظم الإستخراج. |
| 9. After completed elution, regenerated the column by washing with 5 column volumes of regeneration buffer (elution buffer) followed by 5-10 column volumes of start buffer. The column is now ready for a new sample. | 9. بعد إكمال عملية الإستخراج، قم بغسل العامود ب 5 مرات من حجم العامود بمنظم الإستخراج ثم أيضاً ب 5 مرات من حجم العامود بمنظم البدء. والآن أصبح العامود جاهزاً لتنقية عينة جديدة. |
| 10. Applied the sample (the protein of $\beta$2-m) at 1ml/min for HiTrap 1ml using a syringe fitted to the luer connector. | 10. أضفنا العينة الثانية المراد تنقيتها (البيتا2-آم) على 1مل/بالدقيقة لكل 1مل من "هاي تراب" بإستخدام الإبرة الموصولة بالرابط المناسب. |
| 11. Washed with at least 5 column volumes of start buffer or until no material appears in the effluent. | 11. قمنا بغسل العامود ب5 مرات من حجمه بمنظم البدء. |
| 12. Eluted with 5-10 column volumes of elution buffer. | 12. قمنا بعملية الإستخراج بإضافة 5 مرات من حجم العامود من منظم الإستخراج. |
| 13. When we finished the purification of the entire sample we rinse the column with water then washed with 5 column volumes 20 % ethanol at 1ml/min for the HiTrap 1ml to prevent microbial growth. | 13. عند الإنتهاء من نتقية العينات قمنا بغسل العامود بالماء ومن ثم بالأيثانول 20% على 1مل /بالدقيقة لكل 1مل من "هاي تراب" لمنع نمو الجراثيم. |
| Sealed the column with the supplied stoppers. | وأخيراً قمنا بختم العامود بالسدادات المزودة والمناسبة. |
| And stored at 4°C to 30°C. | ووضعنا العامود على درجة حرارة بين 4م° و 30م°. |

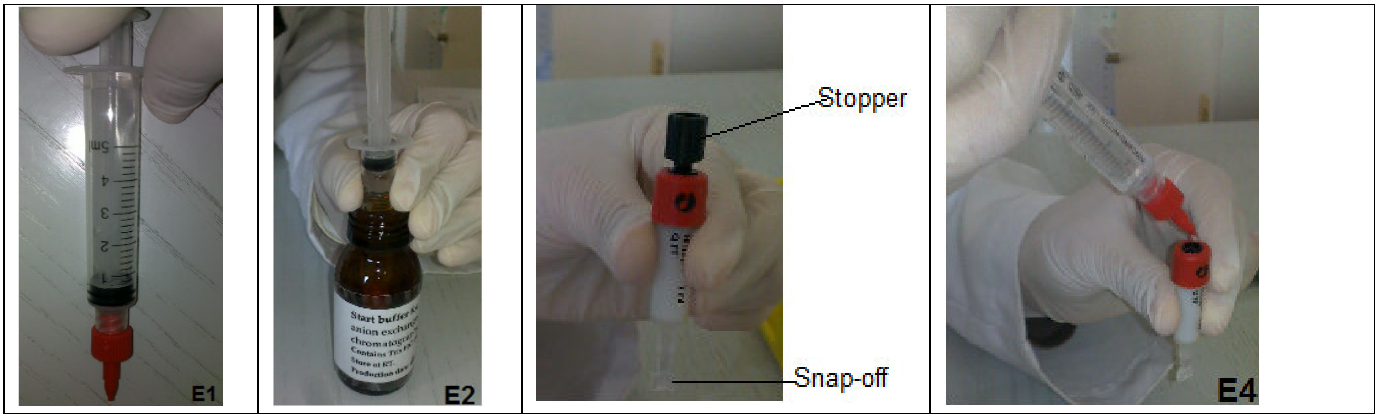



**Figure 25**: E1) prepare the syringe with the provider connector and fill it with the start buffer as E2), remove the stopper from the column and connect it with the syringe by drop drop as E4) to avoid introducing air to the column.

**الصورة 25: ه1) جهزّ الإبرة بالرابط المناسب ومن ثم قم بملئها بمنظم البدء كما في ه2)، أزل السدادة من أعلى العامود وقبل بإيصال الإبرة بالعامود قم بوضع بعض النقاط على العامود لمنع دخول الهواء كما في ه4).**

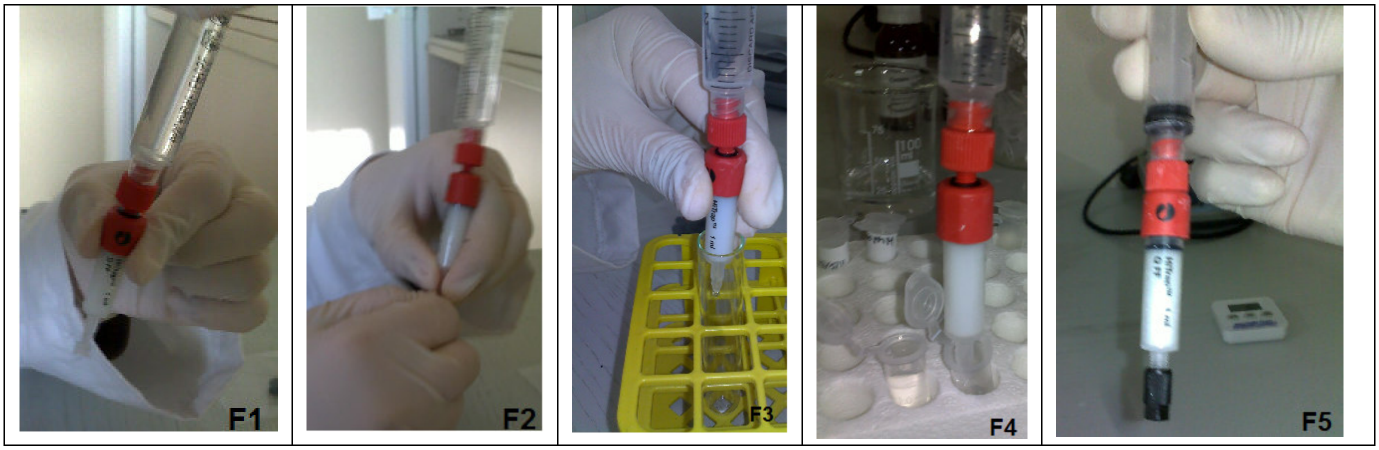



**Figure 26**: after the connection of syringe with the column remove the snap-off end the column as F2) wash the column with the start buffer and the elution buffer as F3) then elute the sample in a sterile eppendorf tube as F4) then when it finish the rinsing of column seal it with the supplied stopper.

**الصورة 26: بعد ربط الإبرة بالعامود قم بإزالة النهاية المضافة للعامود كما في و2) ثم قم بغسل العامود بمنظم البدء ثم بمنظم الإستخراج كما في و3) ثم قم بإستخراج العينة وضعها في أنبوب نابذة كما في و4) وعند الإنتهاء من إستخراج العينة قم بغسل العامود وتنظيفه ثم أغلق الفتحات بالسدادات المناسبة.**

| | |
|---|---|
| Finally we began in the ELISA test as follows:<br>In the first day we dilute 5 µl of pan specific mouse anti HLA class I antibody, W6/32 in 1ml of carbonate buffer (0.1M) PH 9.6, and we putted 50 µl/well in A1, A2, A3, A4, A5, C1, C2, C3, C4 and we let it at 4°C for overnight.<br>In the second day we added 350 µl/well 10% w/v protein block to block the residual bind, then we washed twice with 600 µl/well of 0.05% tween in PBS at room temperature to remove the unbound W6/32 and blocking reagent, then we diluted the purified recombinant HLA-A0201 molecule 100 fold into 100µl 0.3 mM tris maleat buffer, PH 6.6, containing human β2-m (100nM), peptide(optimal 1nM to 1µM) and lutrol F-68 (1g/L) and we incubated them at 18°C for 48 hours.<br>In the fourth day of ELISA test we diluted 2 µl fo the sample reaction in 10 µl of protein block with 40 µl PBS 0.05% Tween then we added 50 µl of the sample in each this well C1, C2, C3, C4 and we added on A1,A2, A3, A4, A5, the same sample but without dilution and we let the plate for 2h at 4°C, then we washed 6×times 300µl/well with PBS 0.05% Tween at room temperature, and for detecting the binding complex, we incubated the plate for 1h at 4°C, with 49 µl of post primary block + 1 µl of protein | وأخيراً بدأنا في فحص إيليزا كما يلي:<br>في اليوم الأول قمنا بتخفيف 5 ميكروليتر من pan specific mouse anti HLA class I antibody, W6/32 في 1مل من منظم الكاربونات (0.1M) درجة الحموضة 9.6 ، ووضعنا 50 ميكروليتر/في كل من الفتحات التالية: أ1، أ2، أ3، أ4، أ5، ج1، ج2، ج3، ج4 وتركناهم على 4م° طيلة الليل.<br>وفي اليوم الثاني أضفنا 350 ميكروليتر/بالفتحة من 10% من البروتيين المانع لمنع أي ربط آخر، ومن بعدها قمنا بغسل الفتحات مرتين ب600 ميكروليتر/بالفتحة من 0.05% من التويين في PBS على درجة حرارة الغرفة لإزالة الW6/32 الغير مربتط بالفتحة وإيقاف ما تب<br>قي من الكواشف، ثم قمنا بتخفيف جزيئات الهلا المؤتلف المنقى في 100 ميكروليتر من منظم tris maleat buffer (0.3mM) درجة الحموضة 6.6، ويحتوي على البيتا2-آم (100nM)، الببتيد (1nM to 1µM) واللوترول ف-68 (1g/l) وتركناهم لمدة ساعة على 18م° لمدة 48 ساعة.<br>وفي اليوم الرابع من فحص إيليزا قمنا بتخفيف 2 ميكروليتر من تفاعل العينة في 10 ميكروليتر من البروتيين المانع مع 40 ميكروليتر من PBS مع0.05% من التويين، ثم أضفنا 50 ميكروليتر من العينة في كل من الفتحات التالية ج1، ج2، ج3، ج4 وأضفنا في الفتحات أ1، أ2، أ3، أ4، أ5 نفس محتويات العينة ولكن من غير تخفيفها ثم تركناهم على 4م° لمدة ساعتين، وبعدها قمنا بغسل الفتحات 6 مرات ب300ميكروليتر من |

| | |
|---|---|
| block, then we washed 6×times 300µl/well with PBS 0.05% Tween, we added one drop of Novolink polymer /well and incubated them for 30min at room temperature to enhance the detection, then we washed 6×times 300µl/well with PBS 0.05% Tween, we added 3 µl of 3,3′5, 5′-tetramethylbenzidine hydrogenperoxide in A1, A2, A3, C1, C2, and we added 3 µl of DAB Chromogen in A4, A5, C3, C4, and we observed directly a change of color in A1, A2, A3, C1, C2 from incolor to blue color and after 30 min we observed that color was change to yellow and that was meaning there is a complex and AlHamdullillah we successful in the protocol and in our experiment. | PBS مع التووين على درجة حرارة الغرفة، ولإستبان المركب المؤلف من الهلا والببتيد أضفنا 49 ميكروليتر من بوست برايميري بلوك مع 1 ميكروليتر من البروتيين بلوك وتركناهم لمدة ساعة على 4م°، ومن ثم قمنا بغسل الفتحات 6 مرات ب300ميكروليتر من PBS مع التووين، ثم أضفنا نقطة من النوفولينك بوليمر على كل فتحة وتركناهم لمدة 30 دقيقة على درجة حرارة الغرفة لتحفيز الإستبيان، ومن ثم قمنا بغسل 6 مرات ب300ميكروليتر من PBS مع التووين، ومن بها أضفنا 3 ميكروليتر من 3,3′5, 5′-tetramethylbenzidine hydrogenperoxide في الفتحات التالية أ1، أ2، أ3، ج1،ج2، وأضفنا 3 ميكروليتر من DAB Chromogen في الفتحات أ4، أ5، ج3، ج4 و لاحظنا أن اللون في الفتحات أ1، أ2، أ3، ج1، ج2 قد تغير من اللون الشفاف ألى اللون الأزرق وبعد 30 دقيقة لاحظنا أن اللون الأزرق تحول إلى اللون الأصفر وهذا يعني أنه يوجد مركب وأننا الحمدلله نجحنا في البروبوكول وفي تجربتنا. |

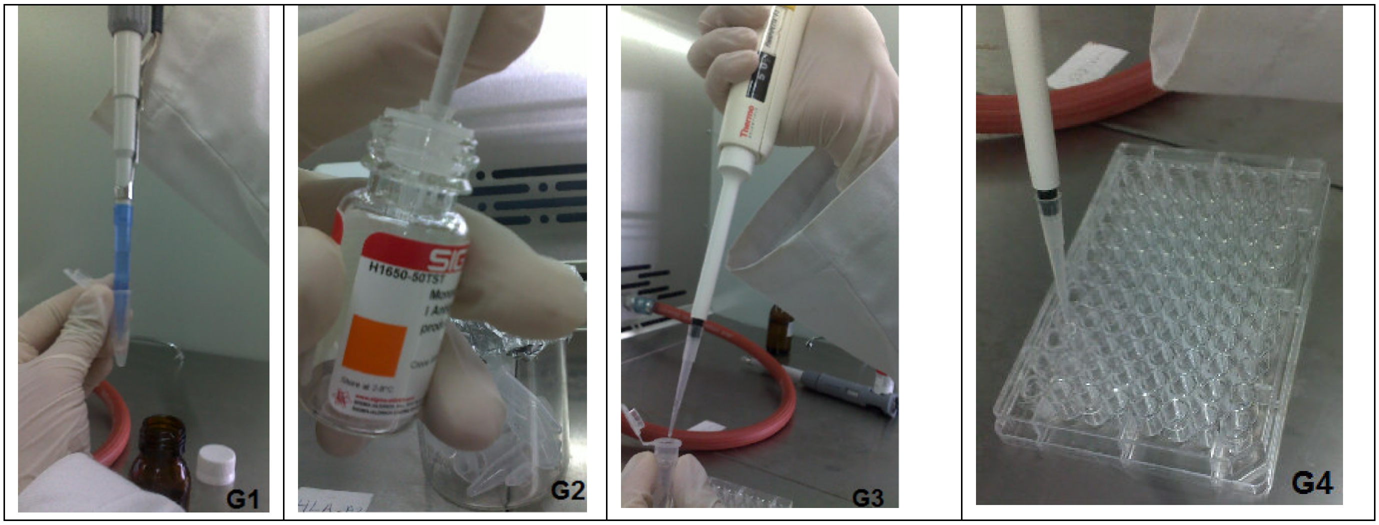



**Figure 27**: G3) dilute the w6/32 (G2) with the carbonate buffer (G1) and put it the wells as G4.

**الصورة 27**: ز3) خفف w6/32 (ز2) مع منظم الكاربونات (ز1) ضعهم في الفتحات كما في ز4).

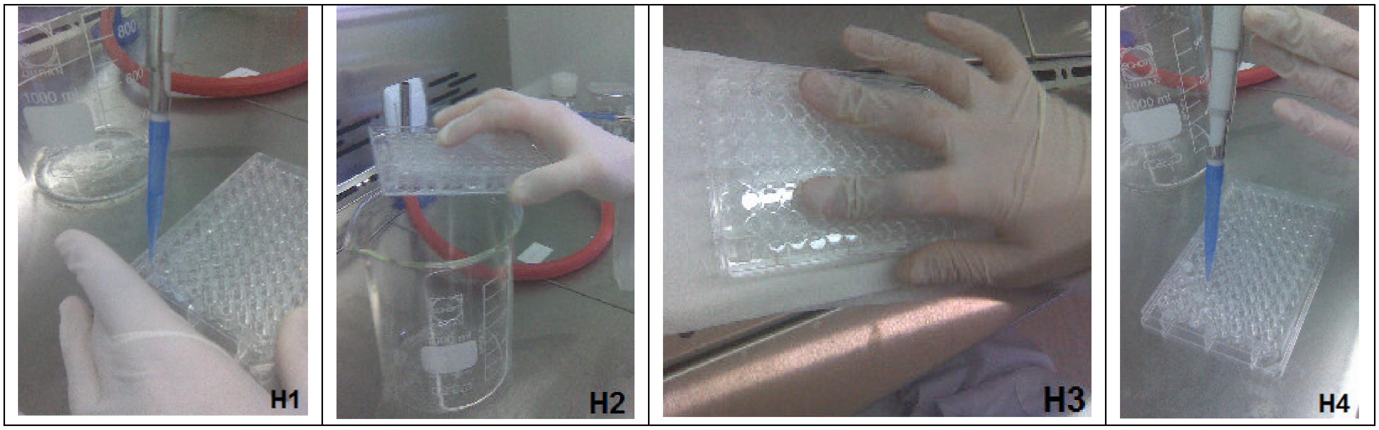



**Figure 28:** H1) put PBS with tween for the washing and discard them the waste as H2) then dry it by a towel as H3) then repeat the washing as the same method.

**الصورة 28**: ح1) ضع PBS مع التوين للغسل ثم إرميه في المهملات كما في ح2) ثم جففه على المنشفة كما في ح3) ثم أعد عملية الغسل على نفس الطريقة.

**Figure 29:** add the protein bock then the post primary block then the Novolink polymer but after adding each reagent should be wash by PBS with tween.

الصورة 29: أضف البروتين المانع ومن ثم البوست برايميري بلوك ومن ثم النوفولينك بوليمير ولكن بعد إضافة كل عامل يجب الغسل بالPBS مع التوين.

**Figure30:** add drop of the Novolink polymer in each well as J1) then add in part of wells TMB (J2) and in the second part DAB (J3), J4) observe the wells that have TMB change it color to blue after many seconds.

الصورة 30: أضف قطرة من النوفولينك بوليمير في كل فتحة كما في ي1) ثم أضف في قسم من الفتحات الTMB (ي2) وفي القسم الثاني DAB (ي3)، ي4) لاحظ أن الفتحات التي تملك TMB تغير لونها إلى الأزرق بعد ثواني

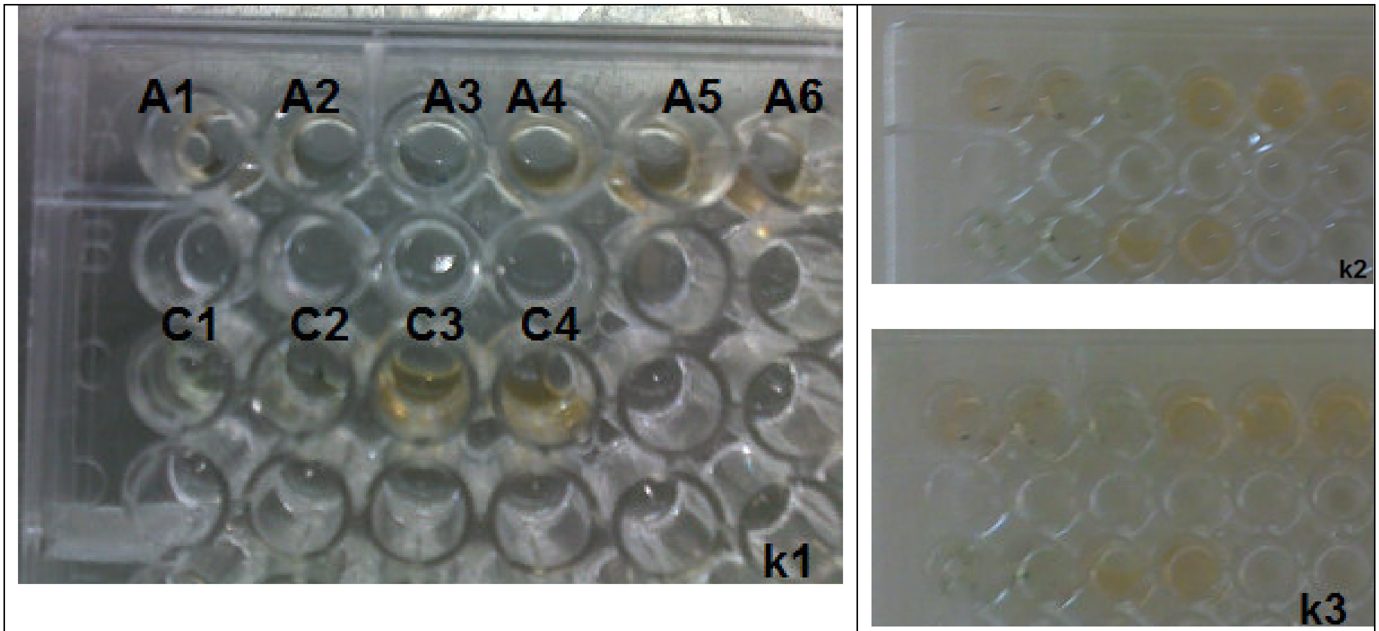



**Figure 31: observe the result after 30 min the color blue change to yellow in the wells A1, A2, A3, C1, C2, that have the TMB.**

**الصورة 31: لاحظ النتيجة بعد 30 دقيقة اللون الأزرق تغير إلى الأصفر في الفتحات التي تملك TMB :أ1، أ2، أ3، ج1، ج2.**