بسم الله الرحمن الرحيم

MEGBI Training Courses

تدريبات مختبرية في ميدان البيوتكنلوجيا

جميع التفاصيل باللغتين العربية والانجليزية

I	**Basic recombinant techniques for working with DNA**	**التطبيقات الأساسية للعمل في الحمض النووي**
II	**Detection of Swine Flu virus (H1N1 virus) by nested PCR**	**الكشف عن فيروس إنفلونزا الخنازير بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل المزدوج**
III	**Vaccine production techniques: Egg based and Cell based amplification of influenza virus**	**فنون لتصنيع اللقاح: العمل بتكبير فيروسات الانفلوينزا عن طريق البيض و عن طريق الخلايا**

Authors:
Samir Mourad, Noha Abdulwahab, Ghina al-Eter, Raghid AlHaj,
Omran Zaki, Layal Chbib, and Mirna Khoder

الاصدار الأول آب 2010
First edition August 2010

Institute for Genetic Engineering, Ecology and Health (IGEEH)
Karlsruhe, Germany
http://www.aecenar.com/institutes/igeeh
Postal Address: Verein für Gentechnik, Ökologie und Gesundheit (VGÖG) e.V., Haid-und-Neu-Str.7, 76131 Karlsruhe, Germany

مركز ابحاث الشرق الاوسط للجينات والتقنية البيولوجية
رأسنحاش – قضاء البترون – لبنان
Middle East Genetics and Biotechnology Institute (MEGBI)
Main Road, Ras Nhache, Batroun, Lebanon,
www.aecenar.com/institutes/megbi
Email: info@aecenar.com

Member Institutes of

AECENAR
Association for Economical and Technological Cooperation in the Euro-Asian and North-African Region
www.aecenar.com

Remark: All photos in the 3 parts are taken from laboratory work in MEGBI, Ras Nhache, Lebanon.

ملاحظة: جميع الصور المصورة بالكاميرا اخذت من العمل في مختبر MEGBI في رأس نحاش – لبنان

ISBN 978-3-940871-10-7

Content / المضمون

I. BASIC TECHNIQUES FOR WORKING WITH DNA / تطبيقات أساسية للعمل في الحمض النووي 7

OVERVIEW /نظرة عامة 8

TIME TABLE / جدول الأوقات 9

REQUIRED LAB DEVICES /آلات المختبر المطلوبة 9

LIST OF SUPPLIERS IN LEBANON AND KITS/MATERIALS /قائمة الموردين في لبنان من مجموعات و مواد 10

1 INTRODUCTION TO THEORY AND METHODS /مدخل الى النظرية و الطرق 11

1.1 MOLECULAR CLONING / الاستنساخ الجزيئي 11
1.2 DNA /الحمض النووي الريبي 15
1.2.1 Comparison of different genome sizes/مقارنة بين مختلف انواع احجام الجينوم 16
1.3 PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) /تفاعل البوليميراز المتسلسل 17
1.3.1 PCR principles and procedure / مبادئ و إجراءات تفاعل البلمرة المتسلسل 19
1.3.2 PCR stages / مراحل تفاعل البلمرة المتسلسل 24
1.3.3 Primer design / تصميم المشرع 25
1.3.4 Application of PCR / تطبيق تفاعل البلمرة المتسلسل 25
1.4 RESTRICTION ENZYMES / أنزيمات الإقتطاع 29
1.4.1 Recognition sites / مواقع الإقتطاع 30
1.4.2 Enzyme classes / أنواع الأنزيمات 31
1.4.3 Type I / النوع الأول 31
1.4.4 Restriction enzymes as tools / أنزيمات الإقتطاع كأدوات 33
1.4.5 Examples / أمثال 34
1.5 CLONING VECTOR / ناقلات الإستنساخ 36
1.5.1 Common Features / السمات المشتركة 36
1.5.2 Screening: example of the blue/white selection / العرض : مثال على إختيار اللون الأزرق/الأبيض 37
1.6 LIGASE / ليغاز انزيم الربط 38
1.6.1 Ligase mechanism / ميكانيكية الليغاز (انزيم الربط) 38
1.6.2 Applications in molecular biology research / تطبيقات في أبحاث البيولوجيا الجزيئية 39
1.6.3 DNA ligation / عملية ربط الدنا 39
Troubleshooting 42
1.7 PLASMID PREPARATION / تحضير البلازميد 44
1.7.1 Miniprep Protocol / برتوكول Miniprep 44
1.8 SEPARATING DNA WITH GEL ELECTROPHORESIS / فصل الدنا بواسطة الفصل الكهربائي للهلام 45
1.8.1 Materials / المواد 45
1.8.2 Preparation / التحضير 46
1.8.3 Procedure / الإجراءات 47

2 EXPERIMENTAL PART: CLONING OF SRY GENE / الجزء العملي: إستنساخ الجين الذكري 49

2.1 ISOLATION OF HUMAN CELLS AND AMPLIFICATION OF SRY GENE WITH PCR (2ND DAY) / عزل خلايا الإنسان ومضاعفة الجين الذكري بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (اليوم الثاني) 49
2.1.1 SRY gene / الجين SRY 49
2.1.2 Devices / الآلات 50
2.1.3 Material / المواد 50
2.1.4 Protocol / بروتوكول 51
2.1.5 Gel electrophoresis / الفصل الكهربائي للهلام 52

2.2 GEL PURIFICATION / تنقية الهلام 54

2.2.1 *Devices / الآلات* 54

2.2.2 *Material / المواد* 55

2.2.3 *Protocol / البروتوكول* 55

2.3 LIGATION OF PCR PRODUCT IN PGEM-T EASY (PROMEGA) / ربط منتج تفاعل البلمرة المتسلسل في PGEM-T EASY (PROMEGA) 59

2.3.1 *Devices / الأدوات* 59

2.3.2 *Material / المواد* 59

2.3.3 *Protocol for Ligations Using the pGEM®-T Easy Vector and the 2X Rapid Ligation Buffer / بروتوكول الربط يستخدم الناقل pGEM-T Easy و2× منظم رابط سريع* 60

2.4 TRANSFORMATION OF E.COLI JM109 BY PLASMID DNA CARRYING SRY GENE (3RD DAY) / نقل الإشيريكي كولي بواسطة دنا البلازميد الحامل جين SRY. (اليوم الثالث) 62

2.4.1 *Protocol: Preparation of E.coli competent cells / بروتوكول: تجهيز الخلايا الإشريكية القولونية المفتوحة* 62

2.4.2 *Devices / الآلات* 63

2.4.3 *Materials (other than JM 109 from Promega pGEM-T Easy Kit II) / المواد (غير JM 109 from Promega pGEM-T Easy Kit II.(* 63

2.5 SCREENING TRANSFORMANTS FOR INSERTS: PRESELECTION OF TRANSFORMANTS (4TH DAY) / فحص تحولات الدنا المراد زيادتها : الإختيار الأول للتحولات (اليوم الرابع) 66

2.5.1 *Protocol / بروتوكول* 67

2.6 ISOLATION OF RECOMBINANT PLASMID FROM E.COLI CELLS WITH QIAGEN MINIPREP KIT (5TH DAY) / عزل البلازميد المؤتلف من خلايا الإيكولي مع مجموعة QIAGEN MINIPREP (اليوم الخامس) 67

2.6.1 *Principle / المبدأ* 68

2.6.2 *Protocol / البروتوكول* 70

2.7 RESTRICTION DIGESTION: CUTTING OUT THE RECOMBINANT DNA (SRY GENE) FROM PLASMID AND VISUALIZATION ON AGAROSE GEL (5TH DAY) / قطع الدنا المؤتلف : عملية هضم الإقتطاع SRY GENE من البلازميد و رؤيته على الهلام (اليوم الخامس). 73

2.7.1 *Protocol / البرتوكول* 73

II. DETECTION OF SWINE FLU VIRUS (H1N1) BY NESTED PCR / الكشف عن فيروس إنفلونزا الخنازير من خلال تفاعل البلمرة المتسلسل المزدوج **75**

OVERVIEW / نظرة عامة **75**

3 INTRODUCTION / المقدمة **76**

4 PURIFICATION OF RNA FROM TISSUES / تنقية الرنا من الأنسجة **79**

4.1 STORAGE OF RNA / تخزين الرنا 82

5 NESTED PCR / تفاعل البلمرة المتسلسل المزدوج **85**

6 PRATICAL PART / الجزء العملي **90**

6.1 TAKING THE PROBE / أخذ الخزعة 90

6.2 PURIFICATION OF RNA FROM PROBE/ تنقية الرنا من الخزعة 90

6.3 (تصنيع SYNTHESIS (CDNA) من الرنا RNA(.... 93

6.3.1 *Handling RNA / معالجة الرنا* 98

6.3.2 *Buffer AW1 / المنظم AW1* 99

6.3.3 *Buffer AW2 / المنظم AW2* 99

6.4 PEQGOLD VIRAL RNA ISOLATION PROTOCOL / 99

III. VACCINE PRODUCTION TECHNIQUES: EGG BASED AND CELL BASED INFLUENZA VIRUS PROPAGATION / العمل بتكبير فيروسات الانفلوينزا عن طريق البيض الخلايا و عن طريق 103

7 GENERAL REMARKS ON WORKING ON EGG BASED VIRUS PROPAGATION / ملاحظات عامة للعمل بتكبير الفيروس عن طريق البيض 104

7.1 BASIC LABORATORY SKILLS / المهارات المخبرية الأساسية 104
7.2 RECORDING DETAILS OF EGG PURCHASES / التسجيل بالتفصيل لعملية شراء البيض 104
7.3 CLEANING AND DECONTAMINATION / التنظيف و التطهير 105
7.4 INCUBATION OF EGGS BEFORE INOCULATION / حضانة البيض قبل التلقيح 105
7.5 INCUBATION OF EGGS AFTER INOCULATION / حضانة البيض بعد التلقيح 106
7.6 CLEANING AND DECONTAMINATION OF INCUBATORS / نظيف و تطهير الحاضنة 106
7.7 CANDLING EGGS / تشميع البيض 106
7.8 MARKING THE INOCULATION SITE / تعيين مكان التلقيح 107

8 PROTOCOL: INOCULATION OF EMBRYONATED EGGS WITH INFLUENZA VIRUS BY THE ALLANTOIC CAVITY ROUTE /تلقيح أنسجة البيض عن طري الالونتويك كافتي 108

8.1 INOCULATION OF THE ALLANTOIC CAVITY / تلقيح الالونتويك كافتي 109
8.2 HARVESTING ALLANTOIC FLUID TO TEST FOR PRESENCE OF HAEMAGGLUTININ / حصد الالونتويك كافتي لفحص وجود الهيماكلوتينين 110
8.3 HAEMAGGLUTINATION TEST / فحص الهيماكلوتينيشن 111
8.3.1 Red blood cell control in the haemagglutination test /تحكم الكريات الحمراء بفحص الهيماكلوتينيشن 112

9 INTRODUCTION TO CELL BASED VIRUS PROPAGATION: TISSUE CULTURE METHODS / طرق مدخل: زراعة الأنسجة 113

9.1 TYPES OF CELLS GROWN IN CULTURE /أنواع الخلايا التي تتكاثر خلال الزراعة 113
9.1.1 Primary cell cultures / زرع الخلايا البدائية أو الأولية 113
9.1.2 Diploid cell strains / سلالات الخلايا المضاعفة 113
9.1.3 Continuous cell lines / خطوط الخلايا المستمرة بالتطور 114
9.2 WORKING AREA AND EQUIPMENT / مكان العمل و المعدات 114
9.2.1 CO_2 Incubators / معدل ثاني أوكسيد الكربون في الحاضنة 114
9.2.2 Microscopes / المجهر 115
9.2.3 Vessels / الأوعية 115
9.3 PRESERVATION AND STORAGE OF TISSUE CELLS / الحفظ و التخزين 115
9.4 HARVESTING AND REFEEDING CULTURE CELLS / الحصاد 116
9.4.1 Suspension culture / زراعت الخلايا الغير ملتصقة 116
9.4.2 Adherent cultures / زراعت الخلايا الملتصقة 116
9.5 MEDIA AND GROWTH REQUIREMENTS / متطلبات الوسط الغذائي والنمو 117
9.5.1 Physiological parameters / المقابيس الفزيولوجية 117
9.5.2 Medium requirements (often empirical) / (غالباً تجريبي) متطلبات الوسط الغذائي 118
9.5.3 Feeding / التغذية 118
9.5.4 Measurement of growth and viability / مقياس النمو و القدرة على العيش 118
9.6 SAFETY CONSIDERATIONS / إرشادات السلامة 119
9.7 TISSUE CULTURE PROCEDURES / إجراءات زراعة الأنسجة 119
9.7.1 Subculturing adherent cells / الزراعة الفرعية للخلايا الملتصقة 120
9.7.2 Trypsin-EDTA / EDTA - التريبسين 120
9.7.3 EDTA alone / وحده EDTA 121
9.7.4 Thawing frozen cells / تذويب الخلايا المجمدة 121
9.7.5 Freezing cells /تجميد الخلايا 121
9.7.6 Viable cell counts with Hemacytometer / حساب الخلايا الحية 122

10 PROTOCOL: CULTURE OF PRIMARY CHICKEN EMBRYO FIBROBLAST (CEF) CELLS / برتوكول: الزراعة الأولية لخلايا جنين بيضة الدجاج 124

10.1 MATERIALS / المواد 124
10.1.1 Preparation of Saline A / صناعة سالين أ 124

10.1.2 Minimum Essential Medium Eagle (MEM) / صناعة أم إي أم *124*
10.2 DEVICES / الاجهزة 125
10.3 PROTOCOL 126

I. Basic techniques for working with DNA / تطبيقات أساسية للعمل في الحمض النووي

5 days training course for researchers and technical staff

التدريب لمدة 5 أيام للباحثين والتقنيين

Authors: Samir Mourad, Noha Abdulwahab, Ghina al-Eter

Overview /نظرة عامة

In this course some fundamental techniques for working with DNA are trained. The duration of this course is 5 days.

Molecular biological and genitival experimental strategies are used today for many tasks in agriculture, pharmaceutical and medical sciences. For this the goal of this course block is to teach basic techniques in this field.

The techniques learned in this course block will be used, insha Allah, to clone a human SRY gene, starting with the isolation of the DNA, with PCR and then compiling a plasmid vector. In one of the next courses, this vector shall be used to transform a plant.

Learning goals:

-Gene isolation

-PCR

-Methods to produce and analyse recombinant DNA (Electrophoresis, Plasmid technology, Restriction enzymes)

يتم التدريب في هذا البرنامج على بعض التقنيات الأساسية للعمل في الحمض النووي. مدة هذه الدورة 5 أيام.

تستخدم اليوم إستراتجيات التجارب الجينية و البيولوجيا الجزيئية للعديد من المهام في المجلات الزراعية والصيدلة والعلوم الطبية. لذلك فإن هدف هذا البرنامج هو تدريس التقنيات الأساسية في هذا المجال.

سيتم العمل في هذا التدريب, إن شاء الله , في إستنساخ الجين الذكري للإنسان, بدءاً من عزل الحمض النووي, بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل و من ثم تجميع ناقل البلازميد. في أحد الدورات المقبلة سيتستخدم الناقل في تحويل النبات.

أهداف التعليم:

-عزل الجينات.

-تفاعل البلملرة المتسلسل.

-طرق لإنتاج و تحليل الحمض النووي المؤتلف (الفصل الكهربائي للهلام , تقنية الناقل , أنزيمات الإقتطاع)

Time Table / جدول الأوقات

Mon	8 – 12	Theoretical background of the training course and methods, Discussion of the workflow of the training course / دراسة نظرية التدريب ومناقشته قبل العمل
	13 – 18	Preparation of plates for bacteria (LB plates with ampicillin/IPTG/X-Gal, SOC medium) / تحضير صفائح من البكتيريا
Tue	8 – 12	DNA isolation, primer design for PCR / عزل الدنا , تصميم المشرع لتفاعل البلمرة المتسلسل
	13 – 18	PCR to isolate SRY gene / تفاعل البلمرة المتسلسل لعزل الجين الذكري
Wed	8 – 12	Agarose gel to check the PCR and isolate the PCR product / هلام الأغاروز للتحقق من منتج تفاعل البلمرة المتسلسل
	13 – 18	Ligation of SRY gene in pGEM-T, Transformation in E.coli and plating (overnight growth) / عملية ربط الجين بالبلازميد, ونقله إلى البكتيريا وزرعه خلال الليل
Thu	8 – 12	Screening of E.coli colonies, inoculation of minipreps (overnight growth) / عرض مجموعات البكتيريا وتلقيح الminiprep
	13 – 18	Sight seeing tour (history and antique culture area in Byblos) /
Fri	8 – 12	Miniprep of the plasmid DNA (Isolation of recombinant plasmid from E.coli cells) / عزل البلازميد المؤتلف من خلايا البكتيريا.
	14 – 19	Restriction digest and Agarose Gel, Discussion / هضم الإقتطاع و الهلام الإغاروزي , مناقشة

Required Lab Devices / آلات المختبر المطلوبة

Common / عامةً

Refrigator and freezer for the following temperatures:/ براد وثلاجة على حرارت مختلفة

4°C
-20°C
-70°C (storage of pGEM-T Easy Kit)

PCR and gel purification of PCR product / تفاعل البلمرة المتسلسل وتنقية الهلام للمنتج

Incubator / حاضنة

Thermocycler/ تفاعل البلمرة المتسلسل

Electrophoresis device / آلة الفصل الكهربائي للهلام

Precision weight / ميزان دقيق

Ligation and plasmid isolation from E.coli / عملية ربط وعزل البلازميد من الإشريكي القولونية

Microcentrifuge capable of 14,000 × *g* / نابذة

Vortex apperature / دوامة

List of suppliers in Lebanon and kits/materials / قائمة الموردين في لبنان من مجموعات و مواد

Sigma, http://www.sigmaaldrich.com

Contact in Lebanon

Ibra Hadad, Beirut, Lebanon, Phone: 961 1 614233, Fax: 961 1 616020, E-mail: ibra@ibrahadad.com
Adress: schari' al-Arid, Sodiqo, Bank as-Sina'a wal amal, Galerie Haddad, 6th etage

Qiagen

Contact in Lebanon

Contact: QIAGEN in Lebanon, Order: +961-1-39 66 77, NUMELAB s.a.r.l. – Lebanon, Mrs. Myriam Daou
Address: Le 457 New Naccache, P.O.Box 70-410, Antelias- LEBANON, Telephone: +961-1-39 66 77, Fax. +961-1-39 66 88
Email: numelab@numelab.com , Website: www.numelab.com

List of kits/materials from Qiagen

Name	Details	Cat. No.	List Price (for Lebanon)
QIAquick Gel Extraction Kit (50)	50 QIAquick Spin Columns, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	28704	More than 100 EUR
QIAprep Spin Miniprep Kit (50)	For 50 high-purity plasmid minipreps: 50 QIAprep Spin Columns, Reagents, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	27104	More than 100 EUR

Aternatively there can be used similar kits for example from Peqlab.

Promega

Contact in Lebanon

Promega distributor in Lebanon:
DPC leb Horsh Tabet – Sin El-Fil – Gedco center – 6th floor - Beirut – Lebanon. TeleFax: 01 – 502812/ 01 – 511545. Mobile: 03 – 839285. Website: www.dpcleb.com

List of kits/materials from Promega

Ligation kit:

pGEM®-T Easy Vector System II	GPR	A1380	20 reactions

Plasmid extraction from E.coli:

Wizard® *Plus* SV Minipreps DNA Purification System	GPR	A1330	50 preps

1 Introduction to Theory and Methods /مدخل الى النظرية و الطرق

1.1 Molecular cloning / الاستنساخ الجزيئي/

Molecular cloning refers to the procedure of isolating a defined DNA sequence and obtaining multiple copies of it *in vivo*. Cloning is frequently employed to amplify DNA fragments containing genes, but it can be used to amplify any DNA sequence such as promoters, non-coding sequences, chemically synthesised oligonucleotides and randomly fragmented DNA. Cloning is utilized in a wide array of biological experiments and technological applications such as large scale protein production.

In the classical restriction and ligation cloning protocols, cloning of any DNA fragment essentially involves the following steps:

1. Isolation of the genetic material (DNA or cDNA) from the donor organism
2. DNA fragmentation with restriction endonucleases or specific amplification of DNA parts with PCR
3. ligation of DNA fragments to a plasmid (vector)
4. transformation

(transfection (Putting vector into a cell, which is therefor transformed), …)
screening/selection

Although these steps are invariable among cloning procedures a number of alternative routes can be selected at various points depending on the particular application; these are summarized as a 'cloning strategy'.

Isolation of insert (1. and 2.)

Initially, the DNA fragment to be cloned needs to be isolated. Preparation of DNA fragments for

يشير الاستنساخ الجزيئي الى اجراءات عزل تسلسل الدنا المعروف والحصول على عدة نسخ منه في المختبر. و كثيرا" ما يستخدم الاستنساخ لمضاعفة قطع الدنا المحتوية على جينات أو لمضاعفة أي سلسلة من الدنا كرمز (promoter) أو كسلسلة دون رمز (non coding sequences).يتم كيميائيا" تحضير قليلات النتوكليوتيدات (oligonucleotides) و قطع الدنا بشكل عشوائي .يستخدم الاستنساخ بشكل واسع في التجارب البيولوجية و التطبيقات التكنولوجية مثل انتاج بروتين كبير الحجم .

بروتوكولات لتقطيع و توصيل القطع المستنسخة في خريطة كلاسيكية ,تشمل استنساخ العديد من قطع الدنا . المراحل التالية :

1_عزل المواد الجينية (الدنا cDNA) من الكائن المانح.

2_تقطيع الدنا بواسطة أنزيم التقطيع اندونوكلياز او مضاعفة خاصة لجزيئات الدنا عن طريق آلة تفاعل البوليميريز المتسلسل.

3_توصيل قطع الدنا مع البلازميد (vector)

4_نقل (ضع البلازميد داخل الخلية حيث يتم تحويله).

5_عرض/اختيار.

على الرغم من ان هذه المراحل هي ثوابت بين اجراءات الاستنساخ ,يوجد هناك عدد من الطرق البديلة باستطاعتها اختيار نقاط مختلفة اعتمادا" على تطبيقات معينة ؛و تتلخص ك<استراتيجية استنساخ >.

_ عزل قطعة الدنا الزائدة (1و2).

في البداية ،قطعة الدنا التي نريد استنساخها بحاجة لان تكون معزولة .تحضير قطع الدنا للاستنساخ يمكن ان يتم في عديد من الطرق المختلفة . تجهيز قطع الدنا غالبا" ما يتم عن طريق ما يعرف ب<<تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR)>>، ولكن

cloning can be accomplished in a number of alternative ways. Insert preparation is frequently achieved by means of polymerase chain reaction, but it may also be accomplished by restriction enzyme digestion, DNA sonication and fractionation by agarose gel electrophoresis. Chemically synthesized oligonucleotides can also be used if the target sequence size does not exceed the limit of chemical synthesis. Isolation of insert can be done by using shotgun cloning, c-DNA clones, gene machines (artificial chemical synthesis).

يمكن أيضا" أن يتم بواسطة الهضم بأنزيم التقطيع أو آلة الفوق الصوتية (ultra sond) للدنا، وتجزئتهم بواسطة آلة الفصل الكهربائي للهلام الاغاروزي (Agrose gel electrophoresis).
يمكن تجهيز ال olginucleotide كيميائيا" واستعماله ايضا" اذا كان قياس السلسلة التي نريدها لا تتجاوز الحد الاقصى من التركيب الكيميائي. عزل قطع الدنا المستنسخة يمكن ان يتم باستخدام الاستنساخ الاكراهي، او باستنساخ cDNA او آلات الجين (تركيب كيميائي مصَنع).

Ligation (3.)

عملية الربط (3)

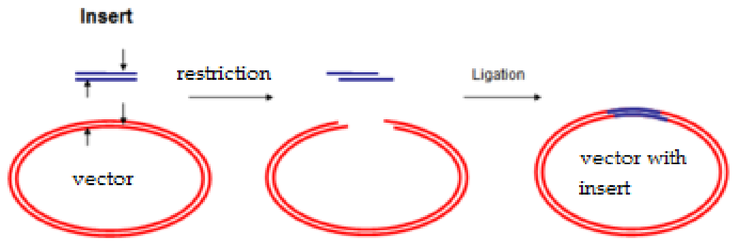


figure 1.1 .see plate 1 for color version./.الشكل 1.1. أنظر الصفيحة 1 لنسخة ملونة

Transformation (4.)

Following ligation, the ligation product (plasmid) is transformed into bacteria for propagation. The bacteria is then plated on selective agar to select for bacteria that has your plasmid of interest. Individual colonies are picked and tested for the wanted insert. Maxiprep can be done to obtain large quantity of the plasmid containing your inserted gene.

Transfection (Putting vector into a cell, which is therefor transformed)

Following ligation, a portion of the ligation reaction, including vector with insert in the desired orientation is transfected into cells. A number of alternative techniques are available, such as chemical sensitization of cells, electroporation and biolistics. Chemical sensitization of cells is frequently employed since this does not require specialized equipment and provides relatively high transformation

عملية التحويل

عملية الربط الأولى، يتم تحويل ربط المنتج الى البكتيريا للتكاثر. ثم نطليها على الاغار الذي يختارها لوحدها لتعيش و تتكاثر مع البلازميد.المجموعات الفردية يتم اختيارها و اختبارها لقطع الدنا المستنسخة المطلوبة.ال Maxiprepيمكن ان تستخدم للحصول على كمية كبيرة من البلاسميد المحتوي على جينات قطع الدنا المستنسخة .

_عملية النقل (وضع البلاسميد داخل الخلية ، حيث يتم تحويله
(

عملية الربط الثانية :جزء من تفاعل الربط، ادخال الناقل مع قطع الدنا المستنسخة في التوجه المطلوب للنقل الى الخلايا. هناك العديد من التقنيات المتوفرة.مثل وضع احساس للخلايا كيميائيا"،التثقيب الكهربائي،وbiolistics(gene gum).وضع احساس للخلايا كيميائيا هو غالبا ما يستعمل لانه لا يتطلب معدات متخصصة ويوفر نسبيا" كفاءة تحويل عالية. التثقيب

efficiencies. Electroporation is used when extremely high transformation efficiencies are required, as in very inefficient cloning strategies. Biolistics are mainly utilized in plant cell transformations, where the cell wall is a major obstacle in DNA uptake by cells. The bareial transformation is generally observe by blue white screning.

Selection (5.)

Finally, the transfected cells are cultured. As the aforementioned procedures are of particularly low efficiency, there is a need to identify the cells that contain the desired insert at the appropriate orientation and isolate these from those not successfully transformed. Modern cloning vectors include selectable markers (most frequently antibiotic resistance markers) that allow only cells in which the vector, but not necessarily the insert, has been transfected to grow. Additionally, the cloning vectors may contain colour selection markers which provide blue/white screening (via α-factor complementation) on X-gal medium. Nevertheless, these selection steps do not absolutely guarantee that the DNA insert is present in the cells. Further investigation of the resulting colonies is required to confirm that cloning was successful. This may be accomplished by means of PCR, restriction fragment analysis and/or DNA sequencing.

الكهربائي يستعمل عندما يتطلب الامر الى كفاءة تحويل عالية للغاية ؛و كما هو الحال في استراتيجيات استنساخ غير فعالة .ال biolistics تستخدم بشكل رئيسي في نقل الخلايا النباتية حيث جدار الخلية يشكل عقبة رئيسية في امتصاص الدنا من قبل الخلايا. وعادة ما تحدد نجاح عملية النقل من خلال اللونين الابيض و الازرق.

عملية الإختيار (5.)

الاختيار 5: أخيرا"، الخلايا المعدية (التي دخل عليها البلاسميد)زرعت .وبما ان الاجراءات السابقة هي ذو كفاءة منخفضة بشكل خاص ،هي بحاجة إلى أن تميز الخلايا المحتوية على قطع الدنا المستنسخة المطلوبة بالاتجاه المناسب و عزلها عن الخلايا الغير المعدية. عملية الاستنساخ الحديثة تشمل علامات اختيار (معظم الاحيان علامات المقاومة للمضاضات الحيوية) التي تسمح فقط للخلايا التي تحتوي على البلاسميد وليس بالضرورة على البلازميد مع قطع الدنا المستنسخة بالنمو.بالاضافة الى ذلك، بامكان استنساخ البلازميدأان يحتوي على علامات اختيار اللونين الازرق/الابيض للفحص (عن طريق عامل التكامل) على وسط غذائي إكس_غال(x-gal). ومع ذلك، فان اختيار هذه المراحل لا تضمن على الإطلاق وجود الدنا المستنسخ في الخلايا، لذلك مطلوب أن يتم التحقيق أكثر في نتائج المجموعات للتأكد من أن الاستنساخ قد نجح. ويمكن تحقيق ذلك عن طريق تفاعل البوليميراز المتسلسل، وتحليل قطع أو تسلسل الدنا.

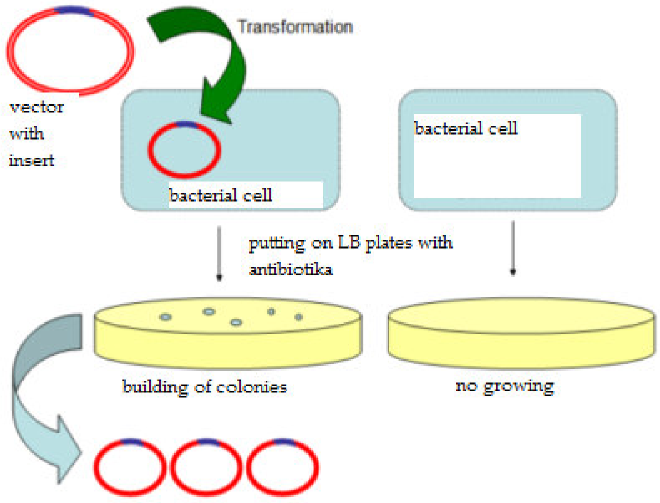


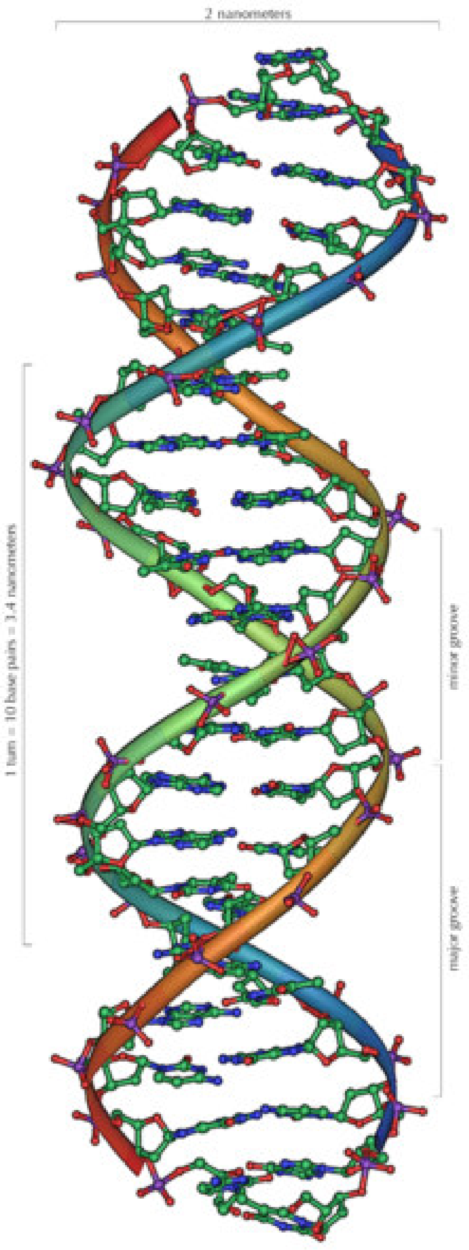
Figure 1.2: Transformation and selection see plate 2 for color version

صورة **1.2**: عملية التحويل و الإختيار.

أنظر الصفيحة **2** لنسخة ملونة.

1.2 DNA /الحمض النووي الريبي/

Deoxyribonucleic acid (**DNA**) is a nucleic acid that contains the genetic instructions used in the development and functioning of all known living organisms and some viruses. The main role of DNA molecules is the long-term storage of information. DNA is often compared to a set of blueprints or a recipe, since it contains the instructions needed to construct other components of cells, such as proteins and RNA molecules.
The DNA segments that carry this genetic information are called genes, but other DNA sequences have structural purposes, or are involved in regulating the use of this genetic information.



الحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين أو **الدنا** (بالإنجليزية: DNA دي إن إيه، Deoxyribonucleic acid) هو الحمض النووي الذي يحتوي على التعليمات الجينية التي تصف التطور البيولوجي للكائنات الحية ومعظم الفيروسات كما انه يحوي التعليمات الجينية اللازمة لأداء الوظائف الحيوية لكل الكائنات الحية. يعتبر وسيلة التخزين الطويل الأجل للمعلومات الوراثية هو الوظيفة الأساسية لجزيئات الدنا بالإضافة الي انه يمكن من خلال هذه الجزيئات الحصول على المعلومات اللازمة لبناء البروتينات و جزيئات الرنا . وتسمي قطع الدنا التي تحمل معلومات وراثية يمكن ترجمتها لبروتينات بالجينات Genes أو المورثات كما ان للبعض الآخر أغراض تركيبية وتنظيمية .

figure 1.3. see pate 3 for color version
الشكل1.3 أنظر الصفيحة 3 لنسخة ملونة./.

Chemically, DNA consists of two long polymers of simple units called nucleotides, with backbones made of sugars and phosphate groups joined by ester bonds. These two strands run in opposite directions to each other and are therefore anti-parallel. Attached to each sugar is one of four types of molecules called bases. It is the

كيميائياً؛ يعتبر الدنا بوليمر (عديد جزيئات) يتكون من وحدات بناء تسمي النيوكليوتيدات وكل نيوكليوتيدة تتكون من ثلاثة جزيئات هي :سكر خماسي دي اوكسي ريبوز (سكر ريبي منقوص الأكسجين)، مجموعة فوسفات و قاعدة نيتروجينية (احدي قواعد البيورين او البريميدين) ويتم اتصال جزيئات السكر والفوسفات بشكل متتابع لتكوين ما يعرف بهيكل سكر الفوسفات بحيث تتصل مجموعة

sequence of these four bases along the backbone that encodes information. This information is read using the genetic code, which specifies the sequence of the amino acids within proteins. The code is read by copying stretches of DNA into the related nucleic acid RNA, in a process called transcription.

Within cells, DNA is organized into structures called chromosomes. These chromosomes are duplicated before cells divide, in a process called DNA replication. Eukaryotic organisms (animals, plants, fungi, and protists) store their DNA inside the cell nucleus, while in prokaryotes (bacteria and archae) it is found in the cell's cytoplasm. Within the chromosomes, chromatin proteins such as histones compact and organize DNA. These compact structures guide the interactions between DNA and other proteins, helping control which parts of the DNA are transcribed

الفوسفات بذرة الكربون َ5 لسكر النيوكليوتيدة التي تتبع لهاعن طريق رابطة تساهمية وبذرة الكربونَ3 لسكر النيوكليوتيدة التالية عن طريق رابطة استيرية ويتم ارتباط القواعد النيتروجينية علي هيكل سكر الفوسفات عن طريق ارتباطها بذرة الكربون َ1علي جزئ السكر المقابل . ويعطي تتابع القواعد النيتروجينية على طول هيكل سكر الفوسفات في جزئ الدنا اكواداً او شفرات يمكن من خلالها تحديد تتابع الأحماض الأمينية للبروتين المقابل وتم ذلك كما يلي :يتم نسخ جزئ رنا مقابل لجزئ الدنا المحتوي علي كود البروتين في عملية تسمي بعملية النسخ transcription. ويتم ترجمة الأكواد الي احماض امينية مقابلة خلال عملية الترجمة translation لتعطي البروتين المقابل.وليس بالضرورة ان يتم ترجمة الشفرات الي بروتين اذ ان بعض جزيئات الرنا تدخل في تركيبات مثل الريبوسومات ribosomes والاسبليسوسومات spliceosomes.

ينتظم الدنا داخل الخلية في تركيبات تسمي الكروموسومات (الأجسام الصبغية) والكروموسومات في مجموعها تكون ما يعرف بالجينوم Genome (المحتوي الجيني او الصبغي للخلية). قبل انقسام الخلية تتضاعف الكروموسومات فيما يعرف بتضاعف الدنا Replication ويتم ذلك في كل من بدائيات النوى prokaryotes وفي حقيقيات النواة eukaryotes .

1.2.1 Comparison of different genome sizes/مقارنة بين مختلف انواع احجام الجينوم

Organism	Genome size (base pairs)	Note
Virus, Phage λ	50,000	
Bacterium, Escherichia coli	4,000,000	
Plant, Arabidopsis thaliana	157,000,000	First plant genome sequenced, Dec 2000.

Yeast,Saccharomyces cerevisiae	20,000,000	
Nematode, Caenorhabditis elegans	98,000,000	First multicellular animal genome, December 1998[11]
Insect, Drosophila melanogaster aka Fruit Fly	130,000,000	
Fish, Tetraodon nigroviridis, type of Puffer fish	385,000,000	Smallest vertebrate genome known
Human	3,200,000,000	

Note: The DNA from a single human cell has a length of ~1.8 m (but at a width of ~2.4 nanometers).

يبلغ طول الدنا في خلية الإنسان الواحدة حوالي 1.8 متر (ولكن عرضها حوالي 2.4 نانومتر).

1.3 PCR (Polymerase chain reaction) /تفاعل البوليميراز المتسلسل

The polymerase chain reaction (PCR) is a technique widely used in molecular biology. It derives its name from one of its key components, a DNA polymerase used to amplify a piece of DNA by in vitro enzymatic replication. As PCR progresses, the DNA thus generated is itself used as a template for replication. This sets in motion a chain reaction in which the DNA template is exponentially amplified. With PCR it is possible to amplify a single or few copies of a piece of DNA across several orders of magnitude, generating millions or more copies of the DNA piece. PCR can be extensively modified to perform a wide array of genetic manipulations.

PCR is very versatile. Many types of samples can be analyzed for nucleic acids. Most PCR uses DNA as a target, rather than RNA, because of the stability of the DNA molecule and the ease with which DNA can be isolated. Almost all PCR applications employ a heat-stable DNA

تفاعل البلمرة المتسلسل (بالإنجليزية: Polymerase chain reaction) و اختصار PCR. هي عملية حيوية تهدف بالأساس لزيادة كمية الدنا الموجودة. تتم هذه العملية بصنع خليط من :دنا العينة، و الأنزيمات، و النيوكليوتيدات والمشرعات و بعض المحاليل الأخرى بتراكيز مختلفة. ثم توضع في جهاز يقوم تلقائيا برفع درجة الحرارة و خفضها، و تكرار العملية تباعا ؛ حتى الوصول إلى تركيز أكبر من الدنا.

من الطرائق الهامة والشائعة في البيولوجيا الجزيئية المعاصرة. جاء اسمه من أحد مكوناته، وهو إنزيم بوليميراز الـــDNA المستعمل في التنسُّخ الإنزيمي للـــDNA. خلال التفاعل يخدم DNA مرصافاً لنفسه، فيحدث تفاعل تسلسلي حين تتضاعف كمية المرصاف وسرعة التفاعل مع كل طور، مما يسمح بالحصول على ملايين النسخ من سلسلة DNA خلال فترة وجيزة لتحليله

ان تفاعل البوليميراز المتسلسل هو شديد التنوع ، هذه الآلة تستطيع تحليل العديد من العينات للاحماض النووية (DNA). وهي تستخدم الدنا بدل الرنا (RNA)بسبب الاستقرار الجزيئي للدنا و سهولة

polymerase, such as Taq polymerase, an enzyme originally isolated from the bacterium Thermus aquaticus. This DNA polymerase enzymatically assembles a new DNA strand from DNA building blocks, the nucleotides, using single-stranded DNA as template and DNA oligonucleotides (also called DNA primers) required for initiation of DNA synthesis. The vast majority of PCR methods use thermal cycling, i.e., alternately heating and cooling the PCR sample to a defined series of temperature steps. These thermal cycling steps are necessary to physically separate the strands (at high temperatures) in a DNA double helix (DNA melting) used as template during DNA synthesis (at lower temperatures) by the DNA polymerase to selectively amplify the target DNA. The selectivity of PCR results from the use of primers that are complementary to the DNA region targeted for amplification under specific thermal cycling conditions.

Developed in 1983 by Kary Mullis, PCR is now a common and often indispensable technique used in medical and biological research labs for a variety of applications. These include DNA cloning for sequencing, DNA-based phylogeny, or functional analysis of genes; the diagnosis of hereditary diseases; the identification of genetic fingerprints (used in forensic sciences and paternity testing); and the detection and diagnosis of infectious diseases. In 1993 Mullis won the Nobel Prize in Chemistry for his work on PCR.

عزله.تستخدم كل تطبيقات تفاعل البوليميريز المتسلسل أنزيم دنا بوليميراز مستقر حراريا"، مثل تاك بوليميريز وهو انزيم عزل من بكتيريا تيرموس اكواتيكس . يعمل هذا الانزيم على تجميع خيط دنا جديد من النيوكليوتيدات (مكعبات بناء الدنا)و ذلك باستعمال خيط دنا مفرد كقالب و قليلات النيوكليوتيدات(وتسمى ايضا" بوادئ الدنا)وهي مطلوبة لبدأ تصنيع الدنا .معظم طرق تفاعل البلمرة المتسلسل تستخدم التدوير الحراري ، بمعنى أنه يتم تسخين وتبريد عينة تفاعل البوليميريزالمتسلسل و ذلك طبقا" لسلسلة خطوات حرارية محددة.

وهذه الخطوات الحرارية ضرورية لفصل التسلسل الحلزوني المزدوج للدنا (ذوبان الدنا على درجة حرارة عالية) و من ثم تستخدم مكعبات بناء الدنا لبناء تسلسل جديد من الدنا (على درجة حرارة منخفضة) باستخدام بوليميراز الدنا و هكذا تتم مضاعفة الدنا المطلوب.

تعتمد تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل على المشرعات (primers). لتكثير كمية الدنا المطلوبة_ المشرع هو تسلسل من الدنا يستخدم كنقطة بداية لعملية تناسخ الدنا و ذلك لعدم قدرة انزيمات البوليميراز على بناء سلسلة جديدة من العدم . و ذلك تحت شروط سلسلة من درجات الحرارة المتغيرة.

في سنة 1983 أنجز كاري موليس تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل التي تستعمل في مختبرات الأبحاث الطبية والبيولوجية, وتدخل في عملية إستنساخ الدنا, DNA-based phylogeny, تحليل وظيفة الجينات , تشخيص الأمراض الوراثية ,تحديد البصمات الوراثية (المستخدمة في علوم الطب الشرعي واختبار الأبوة), تشخيص الأمراض المعدية . حاز موليس في سنة 1993 على جائزة نوبل في الكيمياء لعمله على تفاعل البليميراز المتسلسل.

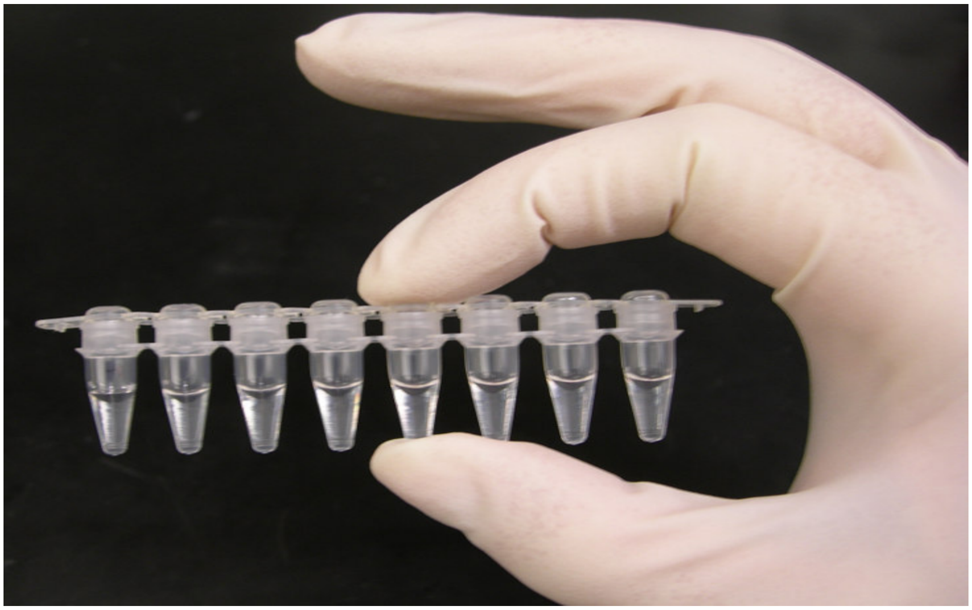


Figure 1.4: A strip of eight PCR tubes, each containing a 100µl reaction

الشكل 1.4: أنابيب بلاستيكية يحتوي كل منها على 100µl من مزيج تفاعل PCR

1.3.1 PCR principles and procedure / مبادئ و إجراءات تفاعل البلمرة المتسلسل

PCR is used to amplify specific regions of a DNA strand (the DNA target). This can be a single gene, a part of a gene, or a non-coding sequence. Most PCR methods typically amplify DNA fragments of up to 10 kilo base pairs (kb), although some techniques allow for amplification of fragments up to 40 kb in size

تستعمل تقنية البلمرة المتسلسل لمضاعة منطقة محددة من الدنا ممكن ان تكون اما تسلسل جيني واحد , جزء من جين , أو تسلسل دون كود. بعض طرق تفاعل البلمرة المتسلسل عادة ما تعمل على مضاعفة الدنا لتصل إلى 10kb و البعض الآخر إلى 40kb في الحجم.

Figure 1.5: A primitive three-temperature thermal cycler for PCR. Modern thermocycler are closed and programmable / الشكل 1.5: تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدية لديها ثلاث دورات حرارية, أما الحديثة هي آلة مغلقة و مبرمجة

A basic PCR set up requires several components and reagents. These components include:

DNA template that contains the DNA region (target) to be amplified.

Two primers, which are complementary to the DNA regions at the 5' (five prime) or 3' (three prime) ends of the DNA region.

A DNA polymerase such as Taq polymerase or another DNA polymerase

يتطلب إعداد تفاعل البلمرة المتسلسل عدة عناصر و مكونات. تشمل هذه العناصر:

قالب الدنا يحتوي الذي على منظقة الدنا المطلوبة للمضاعفة.

إثنان من المشرعات (بوادئ الدنا) التي هي تكملة لمنطقة الدنا من نهاية التسلسل '5 أو '3.

أنزيم بوليمراز الدنا مثل تاك بوليمراز أو أي نوع أخر مثله

with a temperature optimum at around 70°C.

Deoxynucleoside triphosphates (dNTPs; also very commonly and erroneously called deoxynucleotide triphosphates), the building blocks from which the DNA polymerases synthesizes a new DNA strand.

Buffer solution, providing a suitable chemical environment for optimum activity and stability of the DNA polymerase.

Divalent cations, magnesium or manganese ions; generally Mg^{2+} is used, but Mn^{2+} can be utilized for PCR-mediated DNA mutagenesis, as higher Mn^{2+} concentration increases the error rate during DNA synthesis.

Monovalent cation potassium ions.

The PCR is commonly carried out in a reaction volume of 10-200 µl in small reaction tubes (0.2-0.5 ml volumes) in a thermal cycler. The thermal cycler heats and cools the reaction tubes to achieve the temperatures required at each step of the reaction (see below). Many modern thermal cyclers make use of the Peltier effect which permits both heating and cooling of the block holding the PCR tubes simply by reversing the electric current. Thin-walled reaction tubes permit favorable thermal conductivity to allow for rapid thermal equilibration. Most thermal cyclers have heated lids to prevent condensation at the top of the reaction tube. Older thermocyclers lacking a heated lid require a layer of oil on top of the reaction mixture or a ball of wax inside the tube.

يملك درجة حرارة 70 م° .

التريفوسفات دي أوكسينيوكليوزيد (dNTPs وأيضاً شائع إسمه التريفوسفات دي أوكسينيوكليوتيد) الكتل المبنية من أي أنزيم بوليمراز الدنا تصنع تسلسل دنا جديد.

محلول منظم , الذي يوفر بيئة كيميائية مناسبة لنشاط و استقرار بوليمراز الدنا .

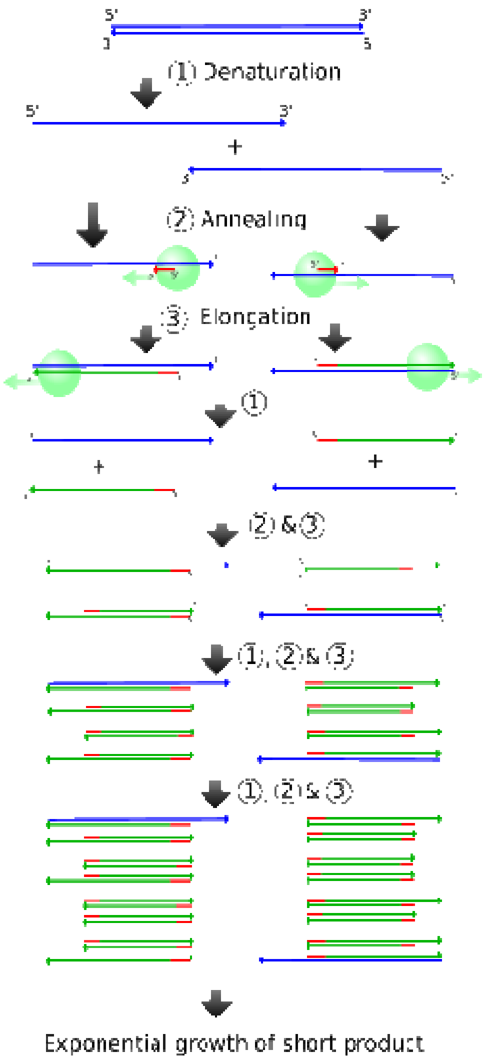
كاتيونات ثنائي التكافؤ مثل:المانييزيوم أو المانغنييز, عادة ما يستخدم المانييزيوم لأن المانغنيز يتم إستخدامه أكثر في تفاعل البلمرة المتسلسل–المتوسط لطفرات الدنا.مثلاً التركيز العالي من المانغنيز يسبب بعض الأخطاء خلال تركيب الحمض النووي.

كاتيون أحادي التكافؤ :مثل إيون البوتاسيوم.

تفاعل البليمراز المتسلسل ينجز من 10-200 ميكروليتر في أنبوب صغير (حجمه 0.2-0.5 ml) و ضمن التدوير الحراري, الذي هو آلة لتسخين و تبريد الأنابيب لتحقيق درجة الحرارة المطلوبة في كل مرحلة من هذه العملية (أنظر أدناه). العديد من التدوير الحراري الحديث يستفيد من تأثير بلتير (طاقة كهروحرارية) الذي يسمح لكل من التسخين و التبريد لتفكيك العقد المتكتلة في أنبوب تفاعل البلمرة المتسلسل من خلال عكس التيار الكهربائي. أما الأنابيب الرقيقة الجدران تسمح بتوصيل الحرارة ليكون هناك سرعة في التوازن الحراري.معظم التدوير الحراري يملك أغطية ساخنة لمنع التكثيف في الجزء العلوي من الأنبوب.أقدم هذه الآلات تفتقر إلى الأغطية الساخنة و تتطلب طبقة من الزيت على رأس الخليط أو كرة من الشمع داخل الأنبوب.

1.3.1.1 Procedure / الإجراءات

Figure 1.6: Schematic drawing of the PCR cycle. **(1) Denaturing at 94-96°C. (2) Annealing at ~65°C (3) Elongation at 72°C.** Four cycles are shown here. The blue lines represent the DNA template to which primers (red arrows) anneal that are extended by the DNA polymerase (light green circles), to give shorter DNA products (green lines), which themselves are used as templates as PCR progresses. The PCR usually consists of a series of 20 to 40 repeated temperature changes called cycles; each cycle typically consists of 2-3 discrete temperature steps. Most commonly PCR is carried out with cycles that have three temperature steps.



see plate 4 for color version **أنظر الصفيحة 4 لنسخة ملونة /**

الشكل 1.6: رسم تخطيطي لدورة تفاعل البلمرة المتسلسل. (1)تغيير طبيعة الدنا على 94-96 °م.(2)تعليق المشرع على قالب الدنا على 65 °م (3)تطويل الدنا على 72 °م . تستغرق هذه العملية 4 دورات.الخط الأزرق يمثل قالب الدنا أما المشرعات (الأسهم الحمراء) التي سيقدمها بوليمراز الدنا (دوائر الضوء الخضراء) ستعمل على نسخ دنا جديد (الخط الأخضر) متطابق لقالب الدنا و الذي سيتكاثر في تفاعل البلمرة المتسلسل يحتوي تفاعل البلمرة المتسلسل عادة على سلسلة متكررة من 20 إلى 40 سلسلة من التغيرات الحرارية و تدعى دورات , و كل دورة تتضمن من 2-3 خطوات حرارية منفصلة وعادة ما تكون 3 خطوات حرارية في تفاعل البلمرة المتسلسل.

The cycling is often preceded by a single temperature step (called hold) at a high temperature (>90°C), and followed by one hold at the end for final product extension or brief storage. The temperatures used and the length of time they are applied in each cycle depend on a variety of parameters. These include the enzyme used for DNA synthesis, the concentration of divalent ions and dNTPs in the reaction, and the melting temperature (Tm) of the primers.

و غالباً ما تحاوط هذه الدورات في البداية و النهاية خطوة حرارية واحدة وتكون على درجة عالية (90°م) لتمديد الإنتاج النهائي أو تخزينه لفترة وجيزة. درجات الحرارة المستخدمة و طول الفترة الزمنية التي يتم تطبيقها في كل دورة تعتمد على مجموعة متنوعة من العناصر. هذه العناصر تشمل الإنزيم المستعمل لتصنيع الدنا , التركيز للإيونات الثنائية التكافؤ و dNTPs في التفاعل و درجة إنصهار حرارة المشرعات (بوادئ الدنا).

Initialization step: This step consists of heating the reaction to a temperature of

مرحلة التهيئة: تحتوي هذه المرحلة على تسخين المحتوى على

94-96°C (or 98°C if extremely thermostable polymerases are used), which is held for 1-9 minutes. It is only required for DNA polymerases that require heat activation by hot-start PCR.

Denaturation step: This step is the first regular cycling event and consists of heating the reaction to 94-98°C for 20-30 seconds. It causes melting of DNA template and primers by disrupting the hydrogen bonds between complementary bases of the DNA strands, yielding single strands of DNA.

Annealing step: The reaction temperature is lowered to 50-65°C for 20-40 seconds allowing annealing of the primers to the single-stranded DNA template. Typically the annealing temperature is about 3-5 degrees Celsius below the Tm of the primers used. Stable DNA-DNA hydrogen bonds are only formed when the primer sequence very closely matches the template sequence. The polymerase binds to the primer-template hybrid and begins DNA synthesis.

Extension/elongation step: The temperature at this step depends on the DNA polymerase used; Taq polymerase has its optimum activity temperature at 75-80°C and commonly a temperature of 72°C is used with this enzyme. At this step the DNA polymerase synthesizes a new DNA strand complementary to the DNA template strand by adding dNTPs that are complementary to the template in 5' to 3' direction, condensing the 5'-phosphate group of the dNTPs with the 3'-hydroxyl group at the end of the nascent (extending) DNA strand. The extension time depends both on the DNA polymerase used and on the length of the DNA fragment to be amplified. As a rule-of-thumb, at its optimum temperature, the DNA polymerase will polymerize a thousand bases per minute. Under optimum conditions, i.e., if there are no limitations due to limiting substrates or reagents, at each extension step, the amount of DNA target is doubled, leading to exponential

94-96 م° (أو 98 م° إذا تم استخدام البوليمراز الحراري) لمدة 1-9 دقائق . هذه المرحلة تتطلب بوليمراز الدنا الذي بحاجة إلى تنشيط حراري بواسطة تفاعل البوليمراز المتسلسل.

مرحلة تغيير طبيعة الدنا: هي المرحلة الأولى التي تحدث على درجات حرارية منتظمة و تحتوي على تسخين التفاعل على 94-98 م° لمدة 20-30 ثانية . و تسبب في ذوبان قالب الدنا والمشرع (بوادئ الدنا) بتعطيل الروابط الهيدروجينية بين سلالات الدنا المتقابلة مما يؤدي على انفصالها والحصول على تسلسل دنا فردي.

مرحلة تعليق المشرع على قالب الدنا : تنخفض حرارة التفاعل على 50-65 م° لمدة 20-40 ثانية مما تسمح بتعليق المشرعات (بوادئ الدنا) على قالب الدنا الفردي. عادة تكون درجة حرارة هذه العملية أدنى من درجة حرارة انصهار المشرعات المستعملة ب 3-5 درجات مئوية و تكون شدة إستقرار روابط الهيدروجين بين سلسلتين متقابلتين من الحمض النووي إذا أن هناك تقابل تام بين سلسلة المشرع و قالب الدنا. ثم يلتصق البوليمراز إلى جانب المشرع و القالب و يبدؤا بتصنيع الدنا.

مرحلة تطويل/تمديد الدنا: درجة الحرارة في هذه المرحلة تعتمد على نوعية بوليمراز الدنا المستعمل : مثل تاك بوليمراز (بوليمراز المستحرة المائية) يعمل على 72-80 م°و أيضاً على 72 م° إذا كان مع الأنزيم و يقوم على تصنيع سلسلة دنا جديدة و متطابقة مع قالب الدنا المطلوب بزيادة dNTPs المتطابقة مع القالب في اتجاه 5' إلى3'.يتم تكثيف مجموع فوسفات 5'من dNTPs مع مجموعة الهيدروكسيل 3' في نهاية تمديد سلسلة الدنا. وقت هذا التمديد يعتمد على كل من بوليمراز الدنا المستعمل و طول قطعة الدنا المراد مضاعفتها. كقاعدة عامة , في الدرجة الحرارية المثلى, باستطاعة بوليمراز الدنا أن يلصق حوالي ألف وحدة نيوكليوتيدية في الدقيقة الواحدة. في ظل هذه الظروف أي إن لم يكن هناك قيود تحد

(geometric) amplification of the specific DNA fragment.
Final elongation: This single step is occasionally performed at a temperature of 70-74°C for 5-15 minutes after the last PCR cycle to ensure that any remaining single-stranded DNA is fully extended.
Final hold: This step at 4-15°C for an indefinite time may be employed for short-term storage of the reaction.

من الركائز والعوامل , في كل خطوة تمديد فإن كمية الدنا ستتضاعف.

التطويل النهائي: هذه مرحلة واحدة تتم أحياناً على 70-74 م°لمدة 5-15 دقيقة قبل آخر دورة في تفاعل البوليمراز المتسلسل للتأكد من أن جميع تسلسلات الدنا المتبقية تمددت بشكل كامل.

العقدة النهائية: تتم هذه المرحلة على 4-15 م° لفترة غير محددة لتخزين التفاعل على المدى القصير.

Figure 1.7: Ethidium bromide-stained PCR products after gel electrophoresis. Two sets of primers were used to amplify a target sequence from three different tissue samples. No amplification is present in sample #1; DNA bands in sample #2 and #3 indicate successful amplification of the target sequence. The gel also shows a positive control, and a DNA ladder containing DNA fragments of defined length for sizing the bands in the experimental PCRs.

الشكل 1.7: يُلون منتج تفاعل البلمرة المتسلسل بالإتيديوم بروميد بعد وضعه في آلة الفصل الكهربائي للهلام(gel electrophoresis) وتستخدم في هذه التجربة مجموعتان من المشرعات لمضاعفة تسلسل الدنا المطلوب والمأخوذ من 3 عينات من الأنسجة المختلفة . و كما يبدو في الصورة أنه لا مضاعفة للتسلسل في العينة الأولى , أما في العينات 2 و 3 هناك نجاح في مضاعفة تسلسل الدنا المطلوب. و يعرض على الهلام أيضاً فحص التحكم الإيجابي (positive control) و وجود للدنا الذي يحتوي على قطع الدنا المنشورة على طول الهلام لتحديد مقياس أو موقع القطع الأخرى من الدنا المنتجة من قبل تفاعل البلمرة المتسلسل التجريبي.

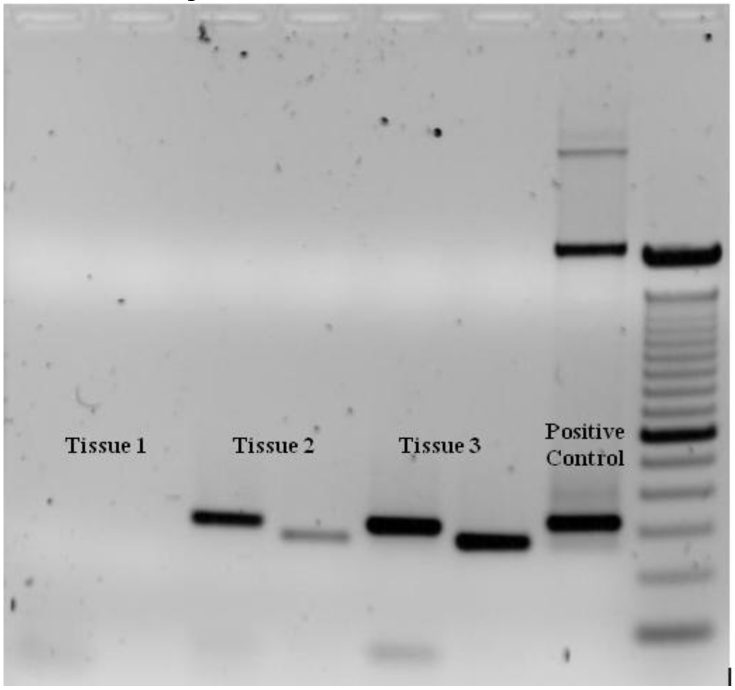


Figure 1.7 / 1.7 الشكل

To check whether the PCR generated the anticipated DNA fragment (also

للتحقق ما إذا كان تفاعل البلمرة المتسلسل قد أنشأ قطع الدنا

sometimes referred to as the amplimer or amplicon), agarose gel electrophoresis is employed for size separation of the PCR products. The size(s) of PCR products is determined by comparison with a DNA ladder (a molecular weight marker), which contains DNA fragments of known size, run on the gel alongside the PCR products (see Fig.1.7).

المتوقعة (كما يشار عليها أحياناً على أنها amplimer or amplicon), يستخدم الفصل الكهربائي للهلام الأغاروزي لقياس حجم إنفصال الدنا المنتج و مقارنته بشاهد الدنا (علامة الوزن الجزيئي) الذي يتضمن على قطع من الدنا المعروف مقياسها و الذي تعمل على الهلام مثل باقي الدنا المنتجة من تفاعل البلمرة المتسلسل (أنظر الشكل 1.7).

1.3.2 PCR stages / مراحل تفاعل البلمرة المتسلسل

The PCR process can be divided into three stages:

Exponential amplification: At every cycle, the amount of product is doubled (assuming 100% reaction efficiency). The reaction is very specific and precise.

Levelling off stage: The reaction slows as the DNA polymerase loses activity and as consumption of reagents such as dNTPs and primers causes them to become limiting.

Plateau: No more product accumulates due to exhaustion of reagents and enzyme.

يمكن تقسيم عملية تفاعل البلمرة المتسلسل إلى 3 مراحل:

مضاعفة الأسي (exponential amplification): تتضاعف كمية الدنا المنتجة في كل دورة (حوالي 100%) ضمن تفاعل محدد و دقيق.

مرحلة الإستواء المقابل (leveling off stage): تتبطأ عملية التفاعل عندما يخسر البوليمراز الدنا نشاطه بسبب إستهلاكه للكواشف مثل dNTPs و المشرعات .

حالة الإستقرار النسبي: لا مزيد من تراكم المنتج بسبب نفاد الكواشف و الأنزيمات.

1.3.2.1 PCR optimization / تفاعل البلمرة المتسلسل الأمثل

In practice, PCR can fail for various reasons, in part due to its sensitivity to contamination causing amplification of spurious DNA products. Because of this, a number of techniques and procedures have been developed for optimizing PCR conditions. Contamination with extraneous DNA is addressed with lab protocols and procedures that separate pre-PCR mixtures from potential DNA contaminants. This usually involves spatial separation of PCR-setup areas from areas for analysis or purification of PCR products, and thoroughly cleaning the work surface between reaction setups. Primer-design techniques are important in improving PCR product yield and in avoiding the formation of spurious products, and the usage of alternate buffer components or

في الممارسة, يمكن لتفاعل البلمرة المتسلسل أن يفشل لعدة أسباب , منها حساسيته بالتلوث الناجم عن مضاعفة الدنا المزيف. ولهذا السبب وضعت بعض التقنيات والإجراءات لتحسين شروط تفاعل المتسلسل . التلوث و الدنا الغريب يوجه ضمن بروتوكول المختبر و إجراءات فصل خليط ما قبل تفاعل البلمرة المتسلسل من تلوث الدنا المحتمل.

و هذا عادةً يشمل مكان فصل آلة تفاعل البلمرة المتسلسل عن مكان تحليل المنتج و تنقيته , و تنظيف أسطح العمل جيداً بين الأجهزة التي تمت عليها التفاعلات .

تقنية تصميم بوادئ الدنا هي مهمة في تحسين كمية المنتج و تجنب تشكيل منتج مزيف, و يمكن إستخدام مكونات منظمة أو أنزيمات البوليمراز لتساعد في مضاعفة المنتج دون

polymerase enzymes can help with amplification of long or otherwise problematic regions of DNA.

مشاكل مثل التلوث .

1.3.3 Primer design / تصميم المشرع

For PCR there must be designed two oligonucleotides (primers). Please refer to the practical part (chapter 2) to see at the example (SRY gene), how to do this.

يجب تصميم إثنان من بوادئ الدنا لتفاعل البلمرة المتسلسل. من فضلك راجع الجزء العملي (الفصل الثاني) لترى المثل (حين SRY) , وكيفية القيام بذلك.

1.3.4 Application of PCR / تطبيق تفاعل البلمرة المتسلسل

1.3.4.1 Isolation of genomic DNA / عزل الحمض النووي الجينومي

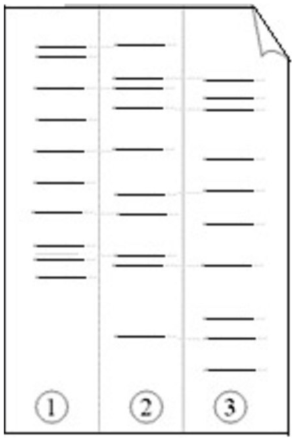
PCR allows isolation of DNA fragments from genomic DNA by selective amplification of a specific region of DNA. This use of PCR augments many methods, such as generating hybridization probes for Southern or northern hybridization and DNA cloning, which require larger amounts of DNA, representing a specific DNA region. PCR supplies these techniques with high amounts of pure DNA, enabling analysis of DNA samples even from very small amounts of starting material.

Other applications of PCR include DNA sequencing to determine unknown PCR-amplified sequences in which one of the amplification primers may be used in Sanger sequencing, isolation of a DNA sequence to expedite recombinant DNA technologies involving the insertion of a DNA sequence into a plasmid or the genetic material of another organism. Bacterial colonies (E.coli) can be rapidly screened by PCR for correct DNA vector constructs.

يسمح تفاعل البلمرة المتسلسل بعزل قطع الدنا من الدنا الجينومي بمضاعفة منطقة محددة منه, مما زاد في إستعماله للعديد من الطرق مثل توليد تحقيقات التهجين (generating hybridization probes) لجنوب أو شمال التهجين واستنساخ الدنا و التي تتطلب كمية كبيرة من الحمض النووي,تمثل منطقة محددة من الدنا .تزود هذه التقنية كمية عالية من الدنا المنتقى التي يمكن تحليله وإن كان ذو كمية صغيرة في البدء.

هناك تطبيقات أخرى من تفاعل البلمرة المتسلسل تشمل تسلسل الدنا لتحديد تسلسل منتج من تفاعل البلمرة المتسلسل الغير معروف و التي يمكن فيها استخدام المشرع لمضاعفة الدنا من تسلسل سانجر (sanger sequencing) ، , عزل تسلسل الحمض النووي للإسراع في تقنية تأليف الدنا التي تتضمن زيادة تسلسل الدنا داخل البلازميد أو مادة وراثية من أي كائن حي. تستطيع مجموعات البكتيريا (E.coli) في تفاعل البلمرة المتسلسل أن تبتلع بسرعة البلازميد مع الدنا بهدف زيادة كمية الدنا.

Figure 1.8: Electrophoresis of PCR-amplified DNA fragments. (1) Father. (2) Child. (3) Mother. The child has inherited some, but not all of the fingerprint of each of its parents, giving it a new, unique fingerprint.



الشكل 1.8: الفصل الكهربائي لقطع الدنا المضاعفة بتفاعل البلمرة المتسلسل (1) الأب (2) الطفل (3) الأم . الطفل يحمل بعض البصمات الوراثية من الأهله و ليس جميعها إذاً لديه بصمة وراثية.

PCR may also be used for genetic fingerprinting; a forensic technique used to identify a person or organism by comparing experimental DNAs through different PCR-based methods. Some PCR 'fingerprints' methods have high discriminative power and can be used to identify genetic relationships between individuals, such as parent-child or between siblings, and are used in paternity testing (Fig.1.8). This technique may also be used to determine evolutionary relationships among organisms.

تفاعل البلمرة المتسلسل يستعمل أيضاً لأخذ البصمات الوراثية بهدف تحديد هوية الشخص من خلال مقارنة الدنا وتتم عبر عدة طرق من تفاعل البلمرة المتسلسل أو بهدف تحديد العلاقات الجينية بين الأفراد, مثل الأهل و الطفل أو بين الأشقاء و تستخدم أيضاً في إختبار الأبوة (الشكل 1.8) أو بهدف تحديد العلاقات بين الكائنات الحية .

1.3.4.2 Amplification and quantitation of DNA / مضاعفة و تحديد كمية الحمض النووي

Because PCR amplifies the regions of DNA that it targets, PCR can be used to analyze extremely small amounts of sample. This is often critical for forensic analysis, when only a trace amount of DNA is available as evidence. PCR may also be used in the analysis of ancient DNA that is tens of thousands of years old. These PCR-based techniques have been successfully used on animals, such as a forty-thousand-year-old mammoth, and also on human DNA, in applications ranging from the analysis of Egyptian mummies to the identification of a Russian Tsar.

بما أن تفاعل البلمرة المتسلسل يضاعف المنطقة المطلوبة من الدنا فبإمكاننا إستخدام عينات صغيرة للتحليل ,مثل الذي تؤخذ في الطب الشرعي كأدلة , أو من الحمض النووي للكائنات القديمة المنقرضة منذ عشرات آلاف السنين مثل الماموث (الفيل الضخم المنقرض) منذ 40 ألف سنة و مثل الموميات المصرية.

Quantitative PCR methods allow the estimation of the amount of a given sequence present in a sample – a technique often applied to quantitatively determine levels of gene expression. Real-time PCR is an established tool for DNA quantification that measures the accumulation of DNA product after each round of PCR amplification.

تسمح طرق تفاعل البلمرة المتسلسل في تحديد كمية الدنا في تقدير كمية التسلسل المفترض الموجود في العينة,إلا أنها بحاجة لتحديد عدد المراحل للوصول إلى الكمية المطلوبة. RT-PCR أنشأت آداة لتقدير كمية الدنا المتراكم في المنتج بعد كل دورة من دورات مضاعفة تفاعل البلمرة المتسلسل.

1.3.4.3 PCR in diagnosis of diseases / تفاعل البلمرة المتسلسل في تشخيص الأمراض

PCR allows early diagnosis of malignant diseases such as leukemia and lymphomas, which is currently the highest developed in cancer research and is already being used routinely. PCR assays can be performed directly on genomic DNA samples to detect translocation-specific malignant cells at a sensitivity which is at least 10,000 fold higher than other methods.

PCR also permits identification of non-cultivatable or slow-growing microorganisms such as mycobacteria, anaerobic bacteria, or viruses from tissue culture assays and animal models. The basis for PCR diagnostic applications in microbiology is the detection of infectious agents and the discrimination of non-pathogenic from pathogenic strains by virtue of specific genes.

Viral DNA can likewise be detected by PCR. The primers used need to be specific to the targeted sequences in the DNA of a virus, and the PCR can be used for diagnostic analyses or DNA sequencing of the viral genome. The high sensitivity of PCR permits virus detection soon after infection and even before the onset of disease. Such early detection may give physicians a significant lead in treatment. The amount of virus ("viral load") in a patient can also be quantified by PCR-based DNA quantitation techniques.

يتيح التشخيص المبكر للأمراض الخبيثة مثل سرطان الدم و الأورام ,التي هي الآن أعلى تطور في الأبحاث السرطانية التي تستعمل بشكل روتيني . تفاعل البلمرة المتسلسل يستطيع إجراء المقاييس مباشرة على عينات الدنا الجينومي للكشف عن الخلايا الخبيثة بحساسية تزيد على 10000 مرة من الطرق الأخرى .

تفاعل البلمرة المتسلسل يسمح أيضاً بتحديد الكائنات الحية الدقيقة الغير قابلة للزراعة أو البطيئة النمو , مثل المتفطرات (mycobacteria) أو البكتيريا اللاهوائية (anaerobic bacteria) أو فيروس من نسيج زراعي المراد تحليله أو من نماذج أخرى حيوانية . الأساس في تطبيقات تشخيص تفاعل البلمرة المتسلسل في علم الأحياء الدقيقة هو الكشف عن مسببي العدوى والتمييز بين الوكلاء الغير ضارة من السلالات المسببة للأمراض بحكم جينات معينة.

وكذلك يمكننا الكشف عن الحمض النووي الفيروسي بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام المشرعات (بوادئ الدنا) المحددة بحسب التسلسل من الحمض الفيروسي , ويمكن استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل للتحاليل التشخيصية أو لتسلسل دنا للجينوم الفيروسي. الحساسية العالية من تفاعل البلمرة المتسلسل تسمح بكشف الفيروس بعد وقت قصير من العدوى و حتى قبل ظهور المرض . و هذا الكشف المبكر قد يعطي للأطباء فارق كبير في العلاج . وأيضاً من خلال هذه التقنية بالإمكان تحديد كمية الفيروس (الشحنة الفيروسية) في المريض.

1.3.4.4 History / التاريخ

A 1971 paper in the Journal of Molecular Biology by Kleppe and co-workers first described a method using an enzymatic assay to replicate a short DNA template with primers in vitro. However, this early manifestation of the basic PCR principle did not receive much attention, and the invention of the polymerase chain reaction in 1983 is generally credited to Kary Mullis. At the core of the PCR method is the use of

في صفحة 1971 من مجلة البيولوجيا الجزيئية بواسطة كليبي (Kleppe) و زملائه في العمل وصفت أول طريقة عمل استخدموها في الأنزيم لتكرار قالب الدنا القصير مع المشرع خارج الجسم (في المختبر).و مع ذلك فإن إختراع كاري موليس في سنة 1983 لتفاعل البلمرة المتسلسل و سلسلة تفاعل البوليمراز لم يحصل على الإهتمام الكثير.أساس طريقة

a suitable DNA polymerase able to withstand the high temperatures of >90°C (>195°F) required for separation of the two DNA strands in the DNA double helix after each replication cycle. The DNA polymerases initially employed for in vitro experiments presaging PCR were unable to withstand these high temperatures. So the early procedures for DNA replication were very inefficient, time consuming, and required large amounts of DNA polymerase and continual handling throughout the process.

A 1976 discovery of Taq polymerase a DNA polymerase purified from the thermophilic bacterium, Thermus aquaticus, which naturally occurs in hot (50 to 80 °C (120 to 175 °F)) environments paved the way for dramatic improvements of the PCR method. The DNA polymerase isolated from T. aquaticus is stable at high temperatures remaining active even after DNA denaturation, thus obviating the need to add new DNA polymerase after each cycle. This allowed an automated thermocycler-based process for DNA amplification.

At the time he developed PCR in 1983, Mullis was working in Emeryville, California for Cetus Corporation, one of the first biotechnology companies. There, he was responsible for synthesizing short chains of DNA. Mullis has written that he conceived of PCR while cruising along the Pacific Coast Highway one night in his car. He was playing in his mind with a new way of analyzing changes (mutations) in DNA when he realized that he had instead invented a method of amplifying any DNA region through repeated cycles of duplication driven by DNA polymerase.

In Scientific American, Mullis summarized the procedure: "Beginning with a single molecule of the genetic material DNA, the PCR can generate 100 billion similar molecules in an afternoon. The reaction is easy to execute. It requires no more than a test tube, a few simple reagents, and a source of heat." He was awarded the Nobel

تفاعل البلمرة المتسلسل هي أنزيم بوليمراز الدنا القادر على العمل على درجة عالية أكثر من 90 م° المطلوبة لفصل الدنا الحلزوني المزدوج بعد كل دورة من تفاعل البلمرة المتسلسل . إلا أنه في البداية هذا الأنزيم لم يتمكن على تحمل هذه الحرارة المرتفعة . لذا الإجراءات المبكرة لعملية تكرار الدنا لم تكن فعالة , وتستغرق وقتاً طويلاً , و كمية كبيرة من بوليمراز الدنا و معالجة مستمرة خلال العملية.هذا ما سمح باكتشاف بوليمراز المستحرة المائية (تاك بوليمراز: taq polymerase) الذي ينتقى من بكتيريا المستحرة المائية (thermophelik bacterium) حيث يعيش على درجة حرارة مرتفعة (50 إلى 80 م°) و هو إنزيم أساسي في تفاعل البلمرة المتسلسل و يعمل حتى تعد تغيير طبيعة الدنا و بالتالي لا تستوجب الحاجة إلى زيادة بوليمراز الدنا بعد كل دورة مما تسمح بالعمل على التدوير الحراري أوتوماتيكياً لمضاعفة كمية الدنا.

في الوقت الذي تطور به تفاعل البلمرة المتسلسل في 1983 كان موليس يعمل في ولايته كاليفورنيا في شركة قيطس و هي واحدة من شركات التكنولوجيا الحيوية الأولى.حيث كان مسؤولاً عن تجميع سلالات الدنا القصيرة و كتب أنه تخيل تفاعل البلمرة المتسلسل و كأنه يطوف على ساحل المحيط الهادئ ليلة واحدة في سيارته . و كان يفكر في ذهنه مع طريقة جديدة لتحليل التغيرات (الطفرات) في الحمض النووي عندها أدرك أنه قد إخترع طريقة لمضاعفة أي منطقة من الدنا خلال دورات متكررة من الإزدواجية يقودها أنزيم بوليمراز الدنا.

في أميركا العلمية , إختصر موليس هذه العملية (الإبتداء بجزيئي واحد من مواد الدنا الوراثي , ثم يستطيع تفاعل البلمرة المتسلسل توليد 100 مليار جزيئي مشابه في فترة بعد الظهر .هذا التفاعل هو سهل التنفيذ ولا يتطلب الكثير من أنابيب الإختبار إنما القليل من الكواشف البسيطة ومصدر

Prize in Chemistry in 1993 for his invention, seven years after he and his colleagues at Cetus first put his proposal to practice. However, some controversies have remained about the intellectual and practical contributions of other scientists to Mullis' work, and whether he had been the sole inventor of the PCR principle. (see main article: Kary Mullis)

للطاقة و قد حصل على جائزة نوبل في الكيمياء سنة 1993 على هذا الإختراع و بعد سنوات وضع إقتراحه للممارسة . ومع ذلك, ظلت بعض الخلافات حول المساهمات الفكرية و العملية لعلماء آخرين ضد عمل موليس, وعما إذا كان المخترع الوحيد لهذه التقنية (أنظر مقال الرئيس : كاري موليس).

1.3.4.5 Patent wars / براءة إختراع الحروب

The PCR technique was patented by Cetus Corporation, where Mullis worked when he invented the technique in 1983. The Taq polymerase enzyme was also covered by patents. There have been several high-profile lawsuits related to the technique, including an unsuccessful lawsuit brought by DuPont. The pharmaceutical company Hoffmann-La Roche purchased the rights to the patents in 1992 and currently holds those that are still protected.

A related patent battle over the Taq polymerase enzyme is still ongoing in several jurisdictions around the world between Roche and Promega. The legal arguments have extended beyond the life of the original PCR and Taq polymerase patents, which expired on March 28, 2005

كانت براءة إختراع تفاعل البلمرة المتسلسل من قبل شركة قيطس حيث كان يعمل موليس عندما إخترعها في سنة 1983 وأعطي أيضاً براءة إختراع على أنزيم المستحرة المائية (تاك بوليمراز) و كان هناك عدة قضايا بارزة تتعلق بهذه التقنية, منها الدعوة القضائية الغير ناجحة من دبونت (dupont). إشترت شركة هوفمان لاروش الصيدلانية حقوق براءات الإختراع عام 1992 وتملك حالياً تلك التي لا تزال محمية.

أما معركة براءة إختراع إنزيم بوليمراز المستحرة المائية ما زالت مستمرة في عدة ولايات قضائية في جميع أنحاء العالم بين روش (Roche) و بروميغا(promega) ظلت الحجج القانونية قائمة وراء براءة إختراع تفاعل البلمرة المتسلسل وتاك بوليمراز إلى أن إنتهت في 28 مارس 2005 .

1.4 Restriction enzymes / *أنزيمات الإقتطاع*

A **restriction enzyme** (or **restriction endonuclease**) is an enzyme that cuts double-stranded DNA following its specific recognition of short nucleotide sequences, known as restriction sites, in the DNA. Such enzymes, found in bacteria and archaea, are thought to have evolved to provide a defense mechanism against invading viruses. Inside a bacterial host, the restriction enzymes selectively cut up foreign DNA in a process called restriction; host DNA is methylated by a modification enzyme (a methylase) to protect it from the restriction enzyme's activity. Collectively, these two processes form the restriction modification system. To cut the DNA, a restriction

هي الأنزيمات التي تقطع تتاليات الدنا عند مواضع محددة تعرف بمقرات الإقتطاع , توجد لدى الجراثيم التي يعتقد بأنه يقيها من غزو العاثيات (bacteriophage) و تستخدم تلك الأنزيمات كأدوات في الدراسات الوراثية و التشخيص الوراثي.

تفسير الكلمات الصعبة لأنزيم الإقتطاع

الإقتطاع : هو نوع معين من القاعدة التي تعرف حدود محددة لنوع من عملية أو وظيفة.

enzyme makes two incisions, once through each sugar-phosphate backbone (i.e. each strand) of the DNA double helix.

Restriction enzyme glossary

- **restriction** – is a specific type of rule that defines a finite (and generally absolute) boundary defined for a type of process or function
- **enzyme** – a protein that catalyzes a chemical reaction
- **endonuclease** – an enzyme that cleaves the phosphodiester bond within a polynucleotide chain such as DNA. A restriction enzyme is a type of endonuclease.
- **molecular recognition** – used by restriction enzymes to locate specific sequences of DNA on which to bind and subsequently cleave
- **recognition site** or **recognition sequence** – the DNA location/sequence to which restriction enzymes bind
- **restriction site** – the DNA sequence that is cleaved by the restriction enzyme

أنزيم: بروتين الذي يساعد على التفاعل الكيميائي.

أندونيوكلياز (endonuclease) أنزيم يقطع روابط الفوسفو دي إستر ضمن سلسلة البولينيوكليوتيد مثل الدنا. أنزيم إقتطاع هو نوع من الاندونيوكلياز.

التحديد الجريئي: المستخدم بواسطة أنزيم الإقتطاع لتحديد تسلسل الدنا الخاص الذي ربط ثم انفصل.

المواقع المحددة أو التسلسل المحدد: تسلسل أو موقع الدنا الذي ربط الإنزيمات الإقتطاع.

موقع الإقتطاع : هو تسلسل الدنا المقطوع بواسطة أنزيم الإقتطاع.

المواقع المحددة : هي مواقع تقرأ إما إعتيادياً أو عكسياً.

1.4.1 Recognition sites / مواقع الإقتطاع

5'-GTATAC-3' |||||| 3'-CATATG-5'	A palindromic recognition site reads the same on the reverse strand as it does on the forward strand

Restriction enzymes recognize a specific sequence of nucleotides and produce a double-stranded cut in the DNA that prevents the phage from replicating. While recognition sequences vary widely, with lengths between 4 and 8 nucleotides, many of them are palindromic; that is, the sequence on one strand reads the same in the reverse direction on the complementary strand. The meaning of "palindromic" in this context is different from what one might expect from its linguistic usage: GTAATG is not a palindromic DNA sequence, but GTATAC is (GTATAC is complementary to CATATG).

انزيمات الاقتطاع تتعرف على تسلسل خاص من النيوكليوتيد و تسبب بقطع تتاليات الدنا التي تمنع العاثيات من التكاثر.

في حين أن التسلسل المحدد يختلف بشكل واسع من حيث الطول بين 4 و 8 نيوكليوتيد, فإن الكثير منهم يقرأ على الوجهين الإعتيادي و العكسي مثل تسلسل يقرأ إعتيادياً من جهة و يقرأ معاكساً من الجهة الأخرى فيكونا متكاملين . مثال GTATAC و من الجهة المعاكسة CATATG التي هي في الحقيقة متكاملة للوجه الأول.

G AATTC CTTAA G	CCC GGG GGG CCC
*Eco*RI digestion produces "sticky" ends أنزيم الإقتطاع EcoRI ينتج نهاية لزجة	*Sma*I restriction enzyme cleavage produces "blunt" ends أنزيم الإقتطاع SmaI ينتج نهاية حادة

Recognition sequences in DNA differ for each restriction enzyme, producing differences in the length, sequence and strand orientation (5' end or the 3' end) of a

يختلف التسلسل المحدد للدنا حسب الأنزيم الإقتطاعي المستخدم, طول التسلسل, و توجه التسلسل (5' أو 3') من

sticky-end "**overhang**" of an enzyme restriction.
Different restriction enzymes that recognize the same sequence are known as neoschizomers. These often cleave in a different location of the sequence; however, the specific type that cleaves in the same location as the prototype is known as an isoschizomer.
Bacteria prevent their own DNA from being cut by modifying their nucleotides via DNA methylation.

النهاية اللزجة (المهددة) من الأنزيم.
أنزيمات الإقتطاع المختلفة التي تتعرف على نفس التسلسل تعرف ك نيوسكيزومرز (neoschizomer).إلا إن كل واحد منها يقطع التسلسل في مواقع مختلفة, ولكن هناك أنواع معينة تقطع في نفس الموقع في التسلسل تعرف ك إيزوسكيزومر (isoschizomer)
تمنع البكتيريا الدنا من القطع من خلال تغيير النيوكليوتيد بواسطة المتيليوم (DNA methylation)

1.4.2 Enzyme classes / أنواع الأنزيمات

Restriction endonucleases are categorized into three general groups (Types I, II and III) based on their composition and enzyme cofactor requirements, the nature of their target sequence, and the position of their DNA cleavage site relative to the target sequence.

تصنف أنزيمات الإقتطاع إلى 3 أنواع (النوع I,II,III) حسب تكوينها و حسب متطلباتها للأنزيم المساعد, طبيعة حجم التسلسل المطلوب , مكان موقع الدنا في التسلسل المطلوب

1.4.3 Type I / النوع الأول

Type I restriction enzymes were the first to be identified and are characteristic of two different strains (K-12 and B) of *E. coli*. These enzymes cut at a site that differs, and is some distance (at least 1000 bp) away, from their recognition site. The recognition site is asymmetrical and is composed of two portions – one containing 3-4 nucleotides, and another containing 4-5 nucleotides – separated by a spacer of about 6-8 nucleotides. Several enzyme cofactors, including S-Adenosyl methionine (AdoMet), hydrolyzed adenosine triphosphate (ATP) and magnesium (Mg^{2+}) ions, are required for their activity. Type I restriction enzymes possess three subunits called HsdR, HsdM, and HsdS; HsdR is required for restriction, HsdM is necessary for adding methyl groups to host DNA (methyltransferase activity) and HsdS is important for specificity of cut site recognition in addition to its methyltransferase activity

هو الأول من أنزيمات الإقتطاع الذي عرّف و أعطي خصائص لتسلسلين مختلفين (K 12-B) من الإكولي هذه الأنزيمات تقطع في مواقع مختلفة و على مسافة بعيدة, (على الأقل 1000bp) من مواقعهم المعروفة .
المواقع المحددة هي غير متناسقة و تتألف من جزئين الأول يحتوي على 3-4 نيوكليوتيد و الثاني على 4-5 نيوكليوتيد منفصلين بمسافة 6-8 نيوكليوتيد. البعض من الأنزيم المساعد, الذي يتضمن S-Adenosyl methionine (AdoMet) , يستخدم لتذويب أو تحليل adenosine triphosphate ATP), إيون المانييزيوم (Mg^{2+}) يتضمن هذا النوع من أنزيمات الإقتطاع على 3 وحدات تدعى HsdR, HsdM, and HsdS; الأولى تستخدم للتقييد , الثانية لتزيد مجموعة متيل في الدنا المستضيف , و الثالثة تستخدم لتعيين الموقع المحدد للقطع بعد زيادة المتيل

1.4.3.1 Type II / النوع الثاني

Typical type II restriction enzymes differ from type I restriction enzymes in several ways. They are composed of only one subunit, their recognition sites are usually undivided and palindromic and 4-8 nucleotides in length, they recognize and cleave DNA at the same site, and they do not use ATP or AdoMet for their activity – they usually require only Mg^{2+} as a cofactor. These are the most commonly available and used restriction enzymes. In the 1990s and early 2000s, new enzymes from this family were discovered that did not follow all the classical criteria of this enzyme class, and new subfamily nomenclature was developed to divide this large family into subcategories based on deviations from typical characteristics of type II enzymes. These subgroups are defined using a letter suffix.

Type IIB restriction enzymes (e.g. BcgI and BplI) are multimers, containing more than one subunit. They cleave DNA on both sides of their recognition to cut out the recognition site. They require both AdoMet and Mg2+ cofactors. Type IIE restriction endonucleases (e.g. NaeI) cleave DNA following interaction with two copies of their recognition sequence. One recognition site acts as the target for cleavage, while the other acts as an allosteric effector that speeds up or improves the efficiency of enzyme cleavage. Similar to type IIE enzymes, type IIF restriction endonucleases (e.g. NgoMIV) interact with two copies of their recognition sequence but cleave both sequences at the same time. Type IIG restriction endonucleases (Eco57I) do have a single subunit, like classical Type II restriction enzymes, but require the cofactor AdoMet to be active. Type IIM restriction endonucleases, such as DpnI, are able to recognize and cut methylated DNA. Type IIS restriction endonucleases (e.g. FokI) cleave DNA at a defined distance from their non-palindromic

النوع الثاني(II)

يختلف هذا النوع عن النوع الأول في عدة طرق فهو يتألف من وحدة فقط أما موقعه المحدد فهو عادة غير مجزأ و يقرأ على الوجهين الإعتيادي و العكسي و طوله 4-8 نيوكلوتيد.و يتعرف على الدنا و يقطعه في نفس الموقع و هو لا يستخدم ATP or AdoMet ليعمل , ولكنه بحاجة لإيون المانييزيوم (Mg^{2+}) فقط كمساعد للعمل,

هما دائماً متوفرين و يستعملا كأنزيمات إقتطاع.

في سنة 1990 و في بداية 2000 تم إكتشاف أنزيمات جديدة من هذا النوع ولكن حسب خصائص وأسس كل منها. قسمت الأسماء ضمن العائلة الكبيرة بزيادة أحرف عليها مثل النوع الثاني هو العائلة الكبيرة أما النوع الثاني بي فهو من ضمن هذه العائلة.

النوع الثاني بي- II (type II-B) من أنزيمات الإقتطاع (مثل BcgI,BplI) هو كثير الوحدات (multimers) و يقطع الدنا في كلا الجانبين من التسلسل المعروف. و يطلب للمساعدة AdoMet و إيون المانييزيوم (Mg^{2+}). النوع الثاني-إي (type IIE) مثل NaeI يقطع الدنا المتفاعل مع نسختين من التسلسل المعروف. يمثل موقع واحد معروف كهدف للقطع, في حين أن الموقع الثاني يؤثر على الألوستريك الذي يحسن من كفاءة أنزيم الإقتطاع.

أما النوع الثاني-آف (type IIF) مثل NgoMIV فهو مشابه للنوع الثاني-إي لأنه يتفاعل أيضاً مع نسختين من التسلسل المعروف ولكنه يفصلهما في نفس الوقت, النوع الثاني-جي (type-IIG) مثل Eco571 يملك وحدة واحدة ولكن بحاجة لـAdoMet للمساعدة , النوع الثاني _آم (type II M) مثل DpnI قادر لمعرفة وقطع المتيليوم (methylated DNA).

النوع الثاني-آس (type IIS) مثل FoKI يقطع الدنا في الموقع المعروف الغير متجانس و لا يقرأ إعتيادياً أو عكسياً و قد تعمل

asymmetric recognition sites. These enzymes may function as dimers. Similarly, Type IIT restriction enzymes (e.g., Bpu10I and BslI) are composed of two different subunits. Some recognize palindromic sequences while others have asymmetric recognition sites.

هذه الأنزيمات كوحدتين (dimers). مثل النوع الثاني- تي (type IIT) مثل Bpu10I و BslI الذي يتألف من وحدتين مختلفتين.

بعض التسلسل العروف يقرأ إعتياياً و عكسياً في حين أن البعض الآخر يملك موقع معروف غير متجانس.

1.4.3.2 Type III / النوع الثالث

Type III restriction enzymes (e.g. *Eco*P15) recognize two separate non-palindromic sequences that are inversely oriented. They cut DNA about 20-30 base pairs after the recognition site. These enzymes contain more than one subunit and require AdoMet and ATP cofactors for their roles in DNA methylation and restriction, respectively.

مثل EcoP15 الذي يتعرف على تسلسلين منفصلين ولا يقرآن إعتيادياً وعكسياً و الذي يتوجه عكسياً. يقطع حوالي 20-30 bp بعد ما يتعرف على الموقع يتضمن أكثر من وحدة و يطلب AdoMet و ATP للمساعدة في دوره بزيادة المتيليوم ومن ثم تقييده.

1.4.3.3 Nomenclature / التسميات

Since their discovery in the 1970s, more than 100 different restriction enzymes have been identified in different bacteria. Each enzyme is named after the bacterium from which it was isolated using a naming system based on bacterial genus, species and strain. For example, the name of the EcoRI restriction enzyme was derived as shown in the box.

E	***Escherichia***	**(genus)**
Co	*coli*	(species)
R	RY13	(strain)
I	First identified	(order of identification in the bacterium)

في سنة 1970 منذ إكتشاف أكثر من 100 أنزيم إقتطاعي مختلف يملك قدرة للتعرف عليه في عدة بكتيريا. يصنف كل أنزيم بحسب جنس البكتيريا مثلاً الإشريكي كولي :

نوعها وتسلسلها :EcoRI.

جنسها: إشريكية.

نوعها : قولونية.

تسلسلها: RY13.

I: يعني النوع الأول من الأنزيم (لتحديد هوية البكتيريا).

1.4.4 Restriction enzymes as tools / أنزيمات الإقتطاع كأدوات

Isolated restriction enzymes are used to manipulate DNA for different scientific applications.

They are used to assist insertion of genes into plasmid vectors during gene cloning and protein expression experiments. For optimal use, plasmids that are commonly used for

أنزيمات الإقتطاع المعزولة تستخدم للتعامل مع الدنا في مختلف التطبيقات العلمية.وأيضاً في المساعدة لإدخال قطع الجين على ناقل البلازميد خلال عملية الإستنساخ و التجارب التعبير البروتييني. للإستخدام الأمثل, البلازميد

gene cloning are modified to include a short linker sequence (called the multiple cloning site, or MCS) rich in restriction enzyme recognition sequences. This allows flexibility when inserting gene fragments into the plasmid vector; restriction sites contained naturally within genes influence the choice of endonuclease for digesting the DNA since it is necessary to avoid restriction of wanted DNA while intentionally cutting the ends of the DNA. To clone a gene fragment into a vector, both plasmid DNA and gene insert are typically cut with the same restriction enzymes, and then glued together with the assistance of an enzyme known as a DNA ligase.

They can be used to distinguish gene alleles by specifically recognizing single base changes in DNA known as single nucleotide polymorphisms (SNPs). This is only possible if a SNP alters the restriction site present in the allele. In this method, the restriction enzyme can be used to genotype a DNA sample without the need for expensive gene sequencing. The sample is first digested with the restriction enzyme to generate DNA fragments, and then the different sized fragments separated by gel electrophoresis. In general, alleles with correct restriction sites will generate two visible bands of DNA on the gel, and those with altered restriction sites will not be cut and will generate only a single band. The number of bands reveals the sample subject's genotype, an example of restriction mapping.

In a similar manner, restriction enzymes are used to digest genomic DNA for gene analysis by Southern Blot. This technique allows researchers to identify how many copies (or paralogues) of a gene are present in the genome of one individual, or how many gene mutations (polymorphisms) have occurred within a population. The latter example is called Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).

الأكثر إستعمالاً في إستنساخ الجينات يتعدل ليشمل تسلسل ربط قصير (يدعى موقع الإستنساخ المتعدد) غني بأنزيمات الإقتطاع و هذا يسمح بمرونة البلازميد عند إدخال قطع الجين عليه , مواقع الإقتطاع التي تكون عادة داخل الجين تؤثر في إختيار إنزيم الإقتطاع لأنه من المهم منع قطع تسلسل الدنا المطلوب إلا في نهايته ليلصق بالبلازميد لأنه عند عملية إستنساخ قطع الدنا في البلازميد. يجب قطع كلا البلازميد و تسلسل الدنا في نفس أنزيم الإقتطاع, ليتم يعد ذلك إلصاقهم بواسطة مساعد الأنزيم ويعرف بأنزيم ليغاز الدنا (DNA ligase)

ويستخدم أيضاً للتميز بين أليلات (alleles) الجين بواسطة ما يعرف بالإختلافات الفردية للنيوكليوتايد (SNPs) و هذا يمكن فقط إذا كان SNP يغير موقع الإقتطاع الموجود في الدليل في هذه الطريقة, أنزيم الإقتطاع يمكن أن يستخدم عينة لجينوتيب الدنا دون الحاجة إلى تسلسل جيني خاص . هذه العينة تُقسم بالأنزيم و تفصل ويؤخذ قياسها على الفصل الكهربائي للهلام. عموماً الآليات تولد نقطتين من الدنا على الهلام إذا كانت في المواقع الصحيحة للإقتطاع أما إذا لم تكن فلا تولد سوى نقطة واحدة من الدنا على الهلام. يظهر عدد النقاط لعينة الجينوتيب المأخوذة مثال على ذلك خرائط الإقتطاع.

بطريقة مماثلة , تستخدم أنزيمات الإقتطاع لتقطيع الدنا الجينومي وتحليله بواسطة سوترن بلات (Southern blot). هذه التقنية سمحت للباحثين بمعرفة عدد نسخ الجين الموجودة في الجينوم عند الفرد الواحد, أو عند التغيير الجينومي المفاجئ (الطفرات) للفرد , مثال أخير يدعى تعدد شكل طول جزء الحصر (restriction fragment length polymorphism).

1.4.5 Examples / أمثال

Examples of restriction enzymes include:

أمثال على أنزيمات القطع وتشمل:

Enzyme الأنزيم	Source المصدر	Recognition Sequence التسلسل المحدد	Cut موقع الإقتطاع
*Eco*RI	*Escherichia coli*	5'GAATTC 3'CTTAAG	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'
*Eco*RII	*Escherichia coli*	5'CCWGG 3'GGWCC	5'--- CCWGG---3' 3'---GGWCC ---5'
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquefaciens*	5'GGATCC 3'CCTAGG	5'---G GATCC---3' 3'---CCTAG G---5'
*Hin*dIII	*Haemophilus influenzae*	5'AAGCTT 3'TTCGAA	5'---A AGCTT---3' 3'---TTCGA A---5'
*Taq*I	*Thermus aquaticus*	5'TCGA 3'AGCT	5'---T CGA---3' 3'---AGC T---5'
*Not*I	*Nocardia otitidis*	5'GCGGCCGC 3'CGCCGGCG	5'---GC GGCCGC---3' 3'---CGCCGG CG---5'
*Hin*fI	*Haemophilus influenzae*	5'GANTC 3'CTNAG	5'---G ANTC---3' 3'---CTNA G---5'
*Sau*3A	*Staphylococcus aureus*	5'GATC 3'CTAG	5'--- GATC---3' 3'---CTAG ---5'
*Pov*II*	*Proteus vulgaris*	5'CAGCTG 3'GTCGAC	5'---CAG CTG---3' 3'---GTC GAC---5'
*Sma*I*	*Serratia marcescens*	5'CCCGGG 3'GGGCCC	5'---CCC GGG---3' 3'---GGG CCC---5'
*Hae*III*	*Haemophilus aegyptius*	5'GGCC 3'CCGG	5'---GG CC---3' 3'---CC GG---5'
*Alu*I*	*Arthrobacter luteus*	5'AGCT 3'TCGA	5'---AG CT---3' 3'---TC GA---5'
*Eco*RV*	*Escherichia coli*	5'GATATC 3'CTATAG	5'---GAT ATC---3' 3'---CTA TAG---5'
*Kpn*I[29]	*Klebsiella pneumoniae*	5'GGTACC 3'CCATGG	5'---GGTAC C---3' 3'---C CATGG---5'
*Pst*I[29]	*Providencia stuartii*	5'CTGCAG 3'GACGTC	5'---CTGCA G---3' 3'---G ACGTC---5'
*Sac*I[29]	*Streptomyces achromogenes*	5'GAGCTC 3'CTCGAG	5'---GAGCT C---3' 3'---C TCGAG---5'
*Sal*I[29]	*Streptomyces albus*	5'GTCGAC 3'CAGCTG	5'---G TCGAC---3' 3'---CAGCT G---5'
*Sca*I[29]	*Streptomyces caespitosus*	5'AGTACT 3'TCATGA	5'---AGT ACT---3' 3'---TCA TGA---5'
*Sph*I[29]	*Streptomyces phaeochromogenes*	5'GCATGC 3'CGTACG	5'---G CATGC---3' 3'---CGTAC G---5'
*Stu*I [30][31]	*Streptomyces tubercidicus*	5'AGGCCT 3'TCCGGA	5'---AGG CCT---3' 3'---TCC GGA---5'
*Xba*I[29]	*Xanthomonas badrii*	5'TCTAGA 3'AGATCT	5'---T CTAGA---3' 3'---AGATC T---5'

* = blunt ends .النهاية الحادة

N = C or G or T or A

W = A or T

1.5 Cloning vector / ناقلات الإستنساخ

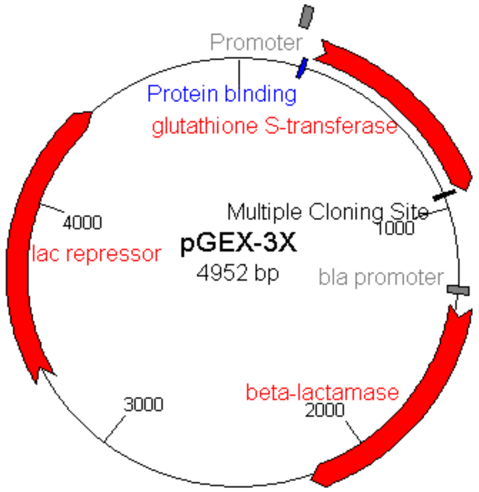


Figure 1.9: The pGEX-3x plasmid is a popular cloning vector. See plate 5 for color version.

الشكل 1.9: هذا بلازميد pGEX-3x هو مجموعة ناقل للإستنساخ. أنظر الصفيحة 5 لنسخة ملونة.

A **cloning vector** is a small DNA vehicle into which a foreign DNA fragment can be inserted. The insertion of the fragment into the cloning vector is carried out by treating the vehicle and the foreign DNA with the same restriction enzyme, then ligating the fragments together. There are many types of cloning vectors. Genetically engineered plasmids and bacteriophages (such as phage λ) are perhaps most commonly used for this purpose. Other types of cloning vectors include bacterial artificial chromosomes (BACs) and yeast artificial chromosomes (YACs).

ناقلات الإستنساخ هي آداة نقل قطع الدنا الصغيرة الزائدة, هذه القطع الزائدة يمكن إخراجها و قطعها عن الناقل بواسطة نفس أنزيمات الإقتطاع التي إستعملت للربط سابقاً. يوجد عدة أنواع من ناقلات الإستنساخ , البلازميد المهندس وراثياً والعاثيات من phage λ قد تكون الأكثر إستعمالاً لهذا العمل. هناك أنواع أخرى من ناقلات الإستنساخ تشمل كروموزومات الإصطناعي البكتيري و كروموزومات الإصطناعي الفطري.

1.5.1 Common Features / السمات المشتركة

Most commercial cloning vectors have key features that have made their use in molecular biology so widespread.
In the case of expression vectors, the main purpose of these vehicles is the controlled expression of a particular gene inside a convenient host organism (eg. *E. coli*). Control of expression can be very important; it is usually desirable to insert the target DNA into a site that is under the control of a particular promoter. Some commonly used promoters are T7 promoters, lac promoters (bla promoter) and cauliflower mosaic virus's 35s promoter

معظم ناقلات الإستنساخ التجارية تملك ميزات رئيسية حيث جعلت إستخدامها واسع في نطاق البيولوجيا الجزيئي. في حالة ناقلة التعبير العمل الرئيسي لهذه الناقلات هو التعبير المحكم لجين معين داخل الجسم المضيف (داخل الخلية المستهدفة) مثل إيكولي.التحكم في التعبير الجيني ضروري جداً عند زيادة قطع الدنا المطلوبة و التي من الأفضل أن تكون تحت سيطرة المحفزات (promoters) المشاغل الأكثر شيوعاً هي مشغل ت-7 و مشغل لاك (lac promoter) ومشغل 35 فيروس تبرقش القنبيط لناقلات النباتات(cauliflower mosaic virus's 35s

(for plant vectors).

To allow for convenient and favorable insertions, most cloning vectors have had nearly all their restriction sites engineered out of them and a synthetic multiple cloning site (MCS) inserted that contains many restriction sites. MCSs allow for insertions of DNA into the vector to be targeted and possibly directed in a chosen orientation. A selectable marker, such as an antibiotic resistance [eg. beta-lactamase (see figure)] is often carried by the vector to allow the selection of positively transformed cells. All plasmids must carry a functional origin of replication (ORI; not shown in figure).

Some other possible features present in cloning vectors are: vir genes for plant transformation, intergrase sites for chromosomal insertion, lacZα fragment for α complementation and blue-white selection, and/or reporter genes in frame with and flanking the MCS to facilitate the production of recombinant proteins.

.(promoter

للسماح بإضافة قطع الدنا المفضلة و الملائمة للناقلات, الكثير من الناقلات تملك ما يقارب جميع مواقع الإقتطاع المهندسة لخروج الدنا منها وتصنع مواقع إستنساخ عديدة للدنا الزائد الذي يحتوي على العديد من مواقع الإقتطاع,تسمح مواقع الإستنساخ بإضافة الدنا على الناقلات المطلوبة و الموجه ربما في الإتجاه المفضل.

هناك علامات إختيار مثل المقاومة للمضادات الحيوية (beta-lactamase) التي غالباً ما تدعم الناقل بإختيار الخلايا التي تحولت إيجابياً على جميع البلازميد أن يحمل العمل الأصلي لعملية التكرار (مثل:ORI لكن لم يعرض في الشكل)

بعض السمات الأخرى الممكنة و الموجودة في ناقلات الإستنساخ هي جينات فير (vir gene) لتحويل النبات ,مواقع النقول (integrases sites) لزيادة الكروموزومات ,قطع لاك زاد ألفا (lac z α) لتكملة ألفا و عرض اللونين الأزرق و الأبيض , و/ أو الجينات المخبرة في إطار ومع مرافقة مواقع الإستنساخ لتسهيل عملية إنتاج البروتيينات المؤتلفة.

1.5.2 Screening: example of the blue/white selection / العرض : مثال على إختيار اللون الأزرق/الأبيض

Many general purpose vectors such as pUC19 usually include a system for detecting the presence of a cloned DNA fragment, based on the loss of an easily scored phenotype. The most widely used is the gene coding for E. coli β-galactosidase, whose integrity can easily be detected by the ability of the enzyme it encodes to hydrolyze the soluble, colourless substrate X-gal (5 bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-d-galactoside) into an insoluble, blue product (5,5'-dibromo-4,4'-dichloro indigo). Cloning a fragment of DNA within the vector-based gene encoding the β-galactosidase prevents the production of an active enzyme. If X-gal is included in the selective agar plates, transformant colonies are generally blue in the case of a vector with no inserted DNA and white in the case of a vector containing a fragment of cloned DNA.

العديد من ناقلات العمل عامة مثل Puc19 تشمل نظام كشف عن وجود قطع الدنا المستنسخة والخاسرة شكلها الظاهري.والأكثر إستخداما هو الجين التي يرمز لإشريكي القولونية بتا غالكتوزيداز,من الذين يستطيعون بسهولة إكمال الكشف بواسطة قدرة الإنزيم الذي يحول إلى رموز مثل ذوبان الهيدروليز الذي لا يعطي لونا وهو ركيزة الـx-gal(5-bormo,4-chloro,3-inodolyl-beta-d-galactoside). أما الغير قابل للذوبان فيعطي اللون الازرق -5,5′-dibromo-4,4′) dichloro indigo) إستنساخ قطع من الدنا مع الناقل الاساسي يرمز إلى منع بتا – غالكتوزيداز من إنتاج انزيم فعال.إذا كان x-gal يدخل في إختيار صفحة الاغار, المجموعات المتحولة تكون زرقاء إذا لم يتم دخول الدنا المستنسخ الناقل أما إذا تم دخوله فتكون هذه المجموعات بيضاء اللون.

1.6 Ligase / ليغاز/ انزيم الربط

In molecular biology, **DNA ligase** is a particular type of ligase (EC 6.5.1.1) that can link together two DNA strands that have single-strand breaks (a break in both complementary strands of DNA). The alternative, a double-strand break, is fixed by a different type of DNA ligase using the complementary strand as a template but still requires DNA ligase to create the final phosphodiester bond to fully repair the DNA.

DNA ligase has applications in both DNA repair and DNA replication. In addition, DNA ligase has extensive use in molecular biology laboratories for Genetic recombination experiments.

في البيولوجيا الجزيئية، ليغاز الدنا هو نوع معين من الليغاز(6.5.1.1. Ec) الذي يستطيع ربط سلسلتين من الدنا اللتين كانتا منفصلتين (انفصال في كل من تسلسلات الدنا المتكاملة).البديل،انفصال تسلسل مزدوج من الدنا ، يثبت بواسطة أنواع مختلفة من ليغاز الدنا لكي يعين رابط الفوسفو دي آستر (phosphodiester) ليجمع على الاقل تسلسل الدنا .

ليغاز الدنا يملك تطبيقات في إصلاح الدنا و تكراره بالإضافة إلى إستخدامه الواسع في مختبرات البيولوجيا الجزيئية لتجارب إعادة التركيب الجيني .

1.6.1 Ligase mechanism / ميكانيكية الليغاز (انزيم الربط)

The mechanism of DNA ligase is to form two covalent phosphodiester bonds between 3' hydroxyl ends of one nucleotide with the 5' phosphate end of another. ATP is not required for the ligase reaction. A pictorial example of how a ligase works (with sticky ends):

ميكانيكية ليغاز الدنا هي تحويل رابطتين من الفوسفور دي آستر التساهمية بين نهاية الهيدروكسيل ‘3 نيوكليوتايد واحد مع نهاية الفوسفات‘ 5 للنيوكليوتايد آخر عملية تفاعل الليغاز لا تتطلب ATP للمساعدة .وهذا مثال بالصورة لكيفية عمل الليغاز (مع نهاية غير لزجة).

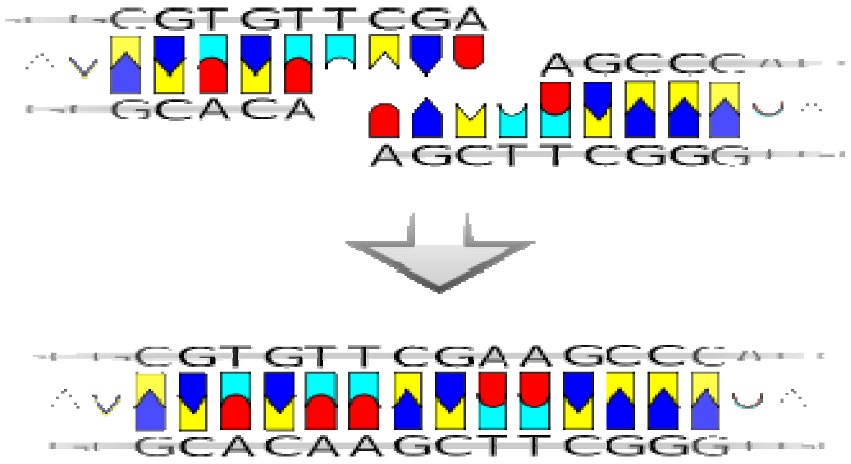


fig.1.10: see plate 6 for color version / الشكل 1.10: أنظر الصفيحة 6 لنسخة ملونة

Ligase will also work with blunt ends, although higher enzyme concentrations and different reaction conditions are required.

يستطيع الليغاز ان يعمل ايضا مع نهاية غير نهاية غير لزجة او حادة . بالرغم من الحاجة الضرورية إلى تركيز انزيمي مرتفع و شروط تفاعل مختلفة .

1.6.2 Applications in molecular biology research / تطبيقات في أبحاث البيولوجيا الجزيئية

DNA ligases have become an indispensable tool in modern molecular biology research for generating recombinant DNA sequences. For example, DNA ligases are used with restriction enzymes to insert DNA fragments, often genes, into plasmids.

One vital, and often tricky, aspect to performing successful recombination experiments involving ligase is controlling the optimal temperature. Most experiments use T4 DNA Ligase (isolated from bacteriophage T4) which is most active at 25°C. However in order to perform successful ligations, the optimal enzyme temperature needs to be balanced with the melting temperature T_m (also the annealing temperature) of the DNA fragments being ligated.

If the ambient temperature exceeds T_m, homologous pairing of the sticky ends will not occur because the high temperature disrupts hydrogen bonding. The shorter the DNA fragments, the lower the T_m. Thus for sticky ends (overlaps) less than ten base pairs long, ligation experiments are performed at very low temperatures (~4-8°C) for a long period of time (often overnight).

The common commercially available DNA ligases were originally discovered in bacteriophage T4, E. coli and other bacteria.

أصبح ليغاز الدنا أداة لا غنى عنها في أبحاث البيولوجيا الجزيئية الحديثة لتوليد تسلسلات الدنا المؤتلف. على سبيل المثال، استعمال ليغاز الدنا مع انزيمات الإقتطاع في عملية ادخال الدنا الى البلازميد.

الواحد من الاسس المهمة و الصعبة في كثير من الاحيان هو التحكم بدرجة الحرارة المثلى لليغاز .معظم التجارب تستخدم ليغاز الدنا ت4 (T4 DNA LIGASE) (المستخرج من العاثيات (bacteriophages)ت4) التي يعمل معظمها على 25 درجة مئوية. و مع ذلك و من أجل عملية ربط ناجحة يجب أن تكون درجة حرارة الانزيم متوازنة مع درجة حرارة ذوبان قطع الدنا التي يتم ربطها .

إذا كانت درجة حرارة المحيط تتجاوز عملية الإقتران المتماثل لنهاية الدنا اللزجةفهذه العملية لن تتم لان الحرارة المرتفعة تعطل عملية الربط الهيدروجيني لقطع الدنا القصيرة و درجة حرارة الذوبان المنخفضة وبالتالى للحصول على نهاية لزجة (التداخل) يبلغ طولها الى اقل من 10 وحدات نيوكليتودية ، تتم عملية الربط هذه على ادنى درجة حرارة ولكن لفترة طويلة من الزمن (طيلة الليل في اغلب الاحيان).

ليغار الدنا المتوفر تجاريا اكتشف اصلا من العاثيات ت4 ،اشريكي القولونية وبكتيريا اخرى .

1.6.3 DNA ligation / عملية ربط الدنا

DNA ligation is the process of joining together two DNA molecules ends (either from the same or different molecules). Specifically, it involves creating a phosphodiester bond bond between the 3' hydroxyl of one nucleotide and the 5' phosphate of another. This reaction is usually catalyzed by a DNA ligase enzyme. This enzyme will ligate DNA fragments having blunt or overhanging, complementary, 'sticky' ends. Typically, it

عملية ربط الدنا هى عملية جمع نهاية جزيئين من الدنا مع بعضهما (اما من نفس الجزيئيات او من جزيئيات اخرى) على وجه التحديد،فانه ينطوي على انشاء ربط الفوسفودي استر الرابط بين الهيدروكسيل '3 للنيوكليوتيد الاول و الفوسفات '5 للنيوكليوتيد الاخر. عملية التفاعل تسرع عادة باستخدام انزيم لليغاز الدنا . هذا الانزيم يربط قطع الدنا ان كانت ذو نهاية حادة ،متكاملة او حتى لزجة .

is easier to ligate molecules with complementary sticky ends than blunt ends. T4 DNA ligase is the most commonly used DNA ligase for molecular biology techniques and can ligate 'sticky' or blunt ends.
The two components of the DNA in the ligation reaction should be equimolar and around 100µg/ml. Most commonly, one wants to ligate an insert DNA molecule into a plasmid, ready for bacterial transformation. Typically, DNA and plasmid vector are individually cut to yield complementary ends, then both are added to a ligation reaction to be circularised by DNA ligase. If the plasmid backbone to insert DNA ratio is too high then excess 'empty' mono and polymeric plasmids will be generated. If the ratio is too low then the result may be an excess of linear and circular homo- and heteropolymers.

عادة من الاسهل ربط جزيئات ذو نهاية حادة.لهذا فان استخدام ليغاز الدنا ت4 (T4 DNA LIGASE) هو الاكثر شيوعا في التقنيات الجزيئية لان بامكانه ان يربط النهايات اللزجة و الحادة ايضا .العنصرين الاساسين للدنا في عملية تفاعل الربط يجب ان يكونا متساويين في التركيز الى حوالي.100µg/ml الاكثر شيوعا،عندما يدخل جزيئي الدنا على البلازميد فهو جاهز لينتقل الى البكتيريا.عادة، الدنا و ناقل البلازميد المنقطعان وحدهما الى كمية من نهاية متكاملة .يضافان الى عملية تفاعل الربط التي ستجعلهما مستديران بواسطة ليغاز الدنا. اذا كان في الاساس نسبة البلازميد اعلى من نسبة الدنا المزادة فسيتم الحصول على وحدات من البلازميد الفارغة. اما اذا كانت النسبة متدنية فسيتم الحصول على هوموبوليمار و هيتروبوليمار.

1.6.3.1 Materials / المواد

Reagents / العناصر

- T4 DNA ligase
- 10x T4 DNA Ligase Buffer
- Deionized, sterile H_2O
- Purified, linearized vector (likely in H_2O or EB)
- Purified, linearized insert (likely in H_2O or EB)

- ليغاز الدنا ت4
- x10 منظم ليغاز الدنا ت4
- ماء معقم دي ايونايزد
- ناقل مستقيم ،منقى (يتلائم مع الماء اوEB)
- قطع الدنا المراد زيادتها مستقيمة ،منقّاة (تتلائم مع الماء او EB)

1.6.3.2 Equipment / المعدات

Vortex : الدوامة

1.6.3.3 Protocol for 10µl ligation mix / بروتوكول لخلط رابط10µL

- µL 10X T4 ligase buffer
- 6:1 molar ratio of insert to vector (~10ng vector)
- Add (8.5 - vector and insert volume)µl ddH_2O
- 0.5 µL T4 Ligase
- (larger ligation mixes are also commonly used)

- X 10µL منظم ليغاز ت4
- 1:6.من نسبة إدخال الدنا على الناقل (الناقل من 10 mg)
- اضف(.8.5 µL .من حجم الناقل و الدنا المراد زيادته) من الماء .
- 0.5 µL من ليغاز ت4
- (عملية مزج ربط كبير ممكنة ايضاً)

1.6.3.4 Calculating Insert Amount / حساب كمية الدنا المراد زيادتها

$$\text{Insert Mass in ng} = 6 \times \left[\frac{\text{Insert Length in bp}}{\text{Vector Length in bp}}\right] \times \text{Vector Mass in ng}$$

The insert to vector molar ratio can have a significant effect on the outcome of a ligation and subsequent transformation step. Molar ratios can vary from a 1:1 insert to vector molar ratio to 10:1. It may be necessary to try several ratios in parallel for best results.

نسبة مولار الدنا المراد زيادته الى الناقل يملك تأثير كبير في نتيجة الربط و مرحلة التحول اللاحقة .يمكن ان تختلف نسبة مولار الدنا الزائدة من نسبة مولار الناقل من 1:1 إلى 1:10.قد يكون من الضروري محاولة عدة نسب متوازنة للحصول على افضل النتائج .

1.6.3.5 Method / الطريقة

1. Add appropriate amount of deionized H_2O to sterile 0.6 mL tube
2. Add 1 µL ligation buffer to the tube.
   Vortex buffer before pipetting to ensure that it is well-mixed. Remember that the buffer contains ATP so repeated freeze, thaw cycles can degrade the ATP thereby decreasing the efficiency of ligation.
3. Add appropriate amount of insert to the tube.
4. Add appropriate amount of vector to the tube.
5. Add 0.5 µL ligase. Vortex ligase before pipetting to ensure that it is well-mixed. Also, the ligase, like most enzymes, is in some percentage of glycerol which tends to stick to the sides of your tip. To ensure you add only 0.5 µL, just touch your tip to the surface of the liquid when pipetting.
6. Let the 10 µL solution sit at 22.5°C for 30 mins
7. Denature the ligase at 65°C for 10min
8. Dialyze for 20 minutes if electroporating
9. Use disks shiny side up
10. Store at -20°C

1. اضف حوالي كمية من ماء دي ايونايزد الى(0.6 مل) انبوب معقم
2. اضفµL 1.من منظم الربط الى الانبوب.
   اخلط المنظم في الدوامة قبل الاستعمال للتاكد من ذوبانه بالكامل .
   تذكر بان المنظم يحتوي على ATP لذا يجب اعادة تثليجه ،عملية تكرار الذوبان يمكن ان تؤدي الى تقطع ATP وبالتالي الى نقص من نسبة فعالية الربط .
3. اضف حوالى الكمية المزادة من الدنا المراد زيادته الى الانبوب
4. اضف حوالى الكمية المزادة من الناقل الى الانبوب
5. اضف 0.5µL من الليغاز
   اخلط الليغاز في الدوامة قبل الاستعمال للتاكد من ذوبانه بالكامل .
   ايضا هذا الليغاز مثل الانزيم ،يوجد فيه نسبة من الكلستيرول الذي يلتصق بالتيب(tip) لذا يجب التأكد من زيادة 0.5µL.فقط منه
6. احضن 10µL من المحلول على 22,5 م°.لمدة 30 دقيقة
7. غيّر طبيعة الليغاز على 65 درجة مئوية لمدة 10 دقائق
8. Dialyze for 20 minutes if electroporating
9. استخدم صحون شيني من الجهة العلوية .

10. خزنه على 20- م° .

1.6.3.6 Critical steps / مراحل الانتقاد

Troubleshooting

Factors affecting efficiency (From Tom Ellis)

A protocol analysis experiment for a typical DNA ligation (7.2 kb vector + 0.6 kb insert, sticky ends) gave optimal ligation efficiency when 50 ng of vector was ligated overnight at 16°C with a 2:1 insert:vector molar ratio and standard T4 ligase. Ligase was heat inactivated at 65°C for 20 mins before 2 µL (of 20 µL) was used to transform commercial heat-shock competent cells. Ligation efficiency was **marginally decreased** by doing a 1 hr ligation at room temperature using 100 ng vector

1.Using insert:vector molar ratios of 5:1 and 1:1

Ligation efficiency was **noticably decreased** (x100) by

1. Sticky end ligation with a larger insert (5.2 kb vector + 2.6 kb insert)

2.Blunt end ligation

Ligation efficiency was **severely decreased** (x10000) by

1.Using DNA fragments that have been exposed to ethidium bromide and UV during the gel extraction procedure (difficult to avoid but heartily recommended)

2.Using the NEB Quick Ligation Kit (possibly a bad batch)

For additional trouble shooting, check out the NEB FAQ page for T4 ligation:

العوامل التي تؤثر على الكفاءة (من توم الينTOM ELLIN).

قدم بروتوكول التجارب التحليلية لربط الدنا النموذجي (Kb7,2 ناقل ..Kb0,6 دنا زائد ذو نهاية لزجة) كفاءة ربط مثلى عندما تم ربط 50ng من الناقل طيلة الليل على 16 م°.مع 2/.1من نسبة مولار الدنا الزائد على الناقل و مستوى من ليغاز ت4.الليغاز يتوقف عمله على 65م°.لمدة 20 دقيقة قبل هذا 2µl يتم استعمالهم للتحويل التجاري من خلال صدمة حرارية للخلايا المختصة (competent cells) .

تنخفض كفاءة الربط بشكل هامشي.اذا تم استعمال 100ng من الناقل على درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة .

1.إستعمال نسبة مولار الناقل / الدنا الزائد من 5/1 و 1/1.

تنخفض كفاءة الربط بشكل ملحوظ (×100) بواسطة:

1.ربط النهاية اللزجة بتسلسل كبير من الدنا المراد زيادته (5,2 kb من الناقل + 2,6kb من الدنا الزائد).

2.ربط نهاية حادة.

تنخفض كفاءة الربط بشدة (x1000)بواسطة:

1.استعمال قطع الدنا التي ستتعرض للاتيديوم بروميد و الاشعة ما فوق البنفسجية (uv)خلال عملية الفصل على الهلام(ومن الصعب تجنبها)

2.استخدام مجموعة NEB للربط السريع (ممكن أن يكون سيئاً).

مخرج اضافي،راجع صفحةNEB_FAG لربط ت4

1.6.3.7 Notes / ملاحظات

1. Make sure the buffer is completely melted and dissolved. The white precipitate is BSA according to NEB. Make sure the buffer still smells strongly like "wet dog" (to check if the DTT is still good).

1.تأكد من أن المنظم قد ذاب تماما الترسب الأبيض في الأسفل هو BSA بحسب NEB_تأكد من أن رائحة المنظم لا تزال قوية مثل "الكلب الرطب ".(لمعرفة ما اذا كان DTT ما زال

2. Because ligase buffer contains ATP, which is unstable and degraded by multiple freeze/thaw cycles, you may want to make 10-20ul aliquots from the original tube. Ligase buffer may be spiked with additional ATP.
3.If you are having trouble with your ligation, NEB offers FAQ's (Quick Ligation T4 DNA ligase) and tips to help.
4. Prior to the ligation, some heat their DNA slightly (maybe ~37°C) to melt any sticky ends which may have annealed improperly at low temperatures.
5.Tom Knight has read that ligase can inhibit transformation. By heat-inactivating the ligase, this inhibition can be avoided. However, according to the NEB FAQ, heat-inactivation of PEG (which is present in the ligation reaction) also inhibits transformation; therefore a spin-column purification is recommended prior to transformation if you are having problems.
6. Treating PCR products with proteinase K prior to restriction digest dramatically improves the efficiency of subsequent ligation reactions.
7. Using SYBR Safe DNA Gel Stain is asafer, non-carcinogenic alternative to ethidium bromide.
8. T4 DNA Ligase is very sensitive to shear, so spinning your ligation mix or vortexing it to mix it can affect your yields. Instead try mixing with the pipette tip or slowly resuspending the solution.

جيدا)
2.إن منظم الليغاز يحتوي على ATP،الذي هو غير مستقر و يتقطع بسبب التجميد و التذويب الدائمين ,ولتجنب هذا من الممكن تقسيم الكمية الأصلية إلى 10_20µL في كل أنبوب. قد يفسد منظم الليغاز اذا تمت زيادة ATPعليه
3.اذا كنت تواجه مشكلة مع الربط فإن NEBو FAQ يقدمان المساعدة و أيضا التيب(tip)
4.قبل الربط ضع الدنا على حرارة منخفضة 37 م° لتذويب أية نهاية لزجة التي قد تملك نهاية صلبة غير صحيحة إن ظلت على حرارة متدنية .
5.قرأ توم نايت أن الليغاز يستطيع أن يوقف التحويل و لمنع هذا التوقف من الممكن إيقاف حرارة الليغاز و مع ذلك, ووفقا لneb_faq فإن ايقاف حرارة PEG(التي هي موجودة في عملية تفاعل الليغاز) أيضاً تعيق التحول, لذلك من الأفضل استخدام العامود SPINقبل التحويل اذا كان هناك أية مشكلة
6.علاج انتاج الPCRبواسطة البروتنياز كا قبل الاقتطاع يحسن كثيرا من كفاءة التفاعل الربطي اللاحق
7.استعمال هلام SYBR SAFE DNA GEL STAIN هو الاكثر امانا ,وهو البديل عن الاتيديوم بروميد الذي يسبب السرطان
8.ليغاز الدنا ت4 هو حساس جدا عند القطع. لذا اعزل الرابط و اخلطه في الخلاط بدلا من الممصة او إعمل على ترسيبه ببطئ لأن ذلك يؤثر على الكمية المطلوبة

1.6.3.8 Acknowledgments / شكر و تقدير

This protocol is primarily based on Endy: DNA ligation using T4 DNA ligase.

المؤسس الاول لهذا البروتوكول هو اندي: الذي استعمل لربط الدنا انزيم ليغار الدنا ت4

1.6.3.9 References / المراجع

Crowe JS, Cooper HJ, Smith MA, Sims MJ, Parker D, and Gewert D. *Improved cloning efficiency of polymerase chain reaction (PCR) products after proteinase K digestion.* Nucleic Acids Res 1991 Jan 11; 19(1) 184. Pmid: 2011503. PubMed HubMed [Crowe-NAR-1991]
Olivera BM and Lehman IR. *Linkage of polynucleotides through phosphodiester bonds by an enzyme from*

Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A 1967 May; 57(5) 1426-33. pmid:5341238. PubMed HubMed [Olivera-PNAS-1967]

1.7 Plasmid preparation / تحضير البلازميد

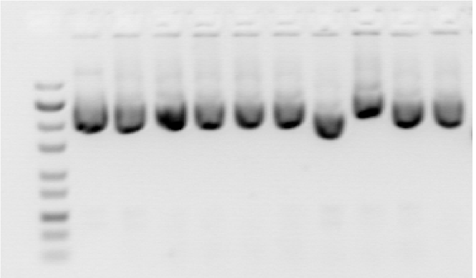


Fig. 1.11: Plasmid miniprep. 0.8% agarose gel ethidium bromide-stained.

الشكل 1.11: بلازميد مينيرب (MINIPREP)0,8.%.من هلام الأغاروز الملطخ بالاتيديوم بروميد

Minipreparation of plasmid DNA and Ding dong DNA is a rapid, small-scale isolation of plasmid DNA from bacteria. It is based on the alkaline lysis method invented by the researchers Birnboim and Doly in 1979. The extracted plasmid DNA resulting from performing miniprep is itself often called"miniprep".

When bacteria are lysed under alkaline conditions both DNA and proteins are precipitated. Some scientists reduce the concentration of NaOH used to 0.1M in order to reduce the occurrence of ssDNA. After the addition of acetate-containing neutralization buffer the large and less supercoiled chromosomal DNA and proteins precipitate, but the small bacterial DNA plasmids can renature and stay in solution. Addition of phenol/chlorofrom can dissolve and denature proteins, like DNase. This is especially important if the plasmids are to be used for enzyme digestion. Otherwise, smearing may occur in enzyme restricted form of plasmid DNA.

Minipreps are used in the process of molecular cloning to analyze bacterial clones. A typical plasmid DNA yield of miniprep is 20 to 30 µg depending on the cell strain.

MINIPREPERATIONمن دنا البلازميد و دنا دينغ دونغ هو السريع لان عزلة الدنا من البكتيريا هي على نطاق صغير وهو يقوم على اسلوب التحلل القلوي المخترعة من قبل الباحثين بيرنبويم و دولي في سنة 1979 . منتج دنا البلازميد المستخرج من MINIPREP هو في حد ذاته كثيرا ما يسمى MINIPREP .

عندما يتم كسر قشرة البكتيريا تحت الشروط القلوية يتم ترسب الدنا و البروتيين خفض بعض العلماء من تركيز هيدروكسيد الصوديوم المستعمل إلى (0.1M) وذلك لتخفيف ال ssDNA . بعد زيادة الخلات التي تحتوي على منظم عازل ,كمية كبيرة من كروموزومال الدنا و البروتيين تترسب ولكن بلازميد الدنا البكتيري الصغير يتمكن من إعادة طبيعته ويبقى في المحلول.زيادة الفينول /الكلوروفورم يمكنه حل وتدمير طبيعة البروتيينات مثل أنزيم الدنا (DNase) وهذا أمر مهم إذا كان البلازميد سيستعمل أنزيم الهضم.

إستخدمت الMiniprep عملية إستنساخ الجزيئيات لتحليل مجموعات البكتيريا. وعادة كمية الدنا البلازميد في Miniprep هي بين 20-30µg بحسب تسلسل الخلايا.

1.7.1 Miniprep Protocol / برتوكولMiniprep

From http://www.protocol-online.org/prot/Molecular_Biology/Plasmid/Miniprep/, e.g. http://penguin.uchc.edu/~intron/Protocols/Alkaline%20lysis.html:

Mini-prep **Mini-prep**

1. Spin down 1.5 ml of overnight

culture in eppie for 1 minute on high.

2. Asprirate supernatant and resuspend cell pellet in 100 µl Solution I (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA).

3. Add 200 µl Solution II (0.2 N NaOH, 1.0% SDS) and mix gently by inversion.

4. Add 150 µl Solution III (3M KOAc, pH 4.8 [60 ml 5M KOAc, 11.5 ml HOAc, 28.5 ml H2O]), vortex briefly to mix, and spin for 5 minutes on high.

5. Transfer supernatant to fresh tube containing 500 µl phenol:chloroform, vortex and spin for 5 minutes on high.

6. Transfer aqueous layer to fresh tube containing 1 ml ethanol, mix well by inversion, and spin for 5 minutes on high.

7. Remove supernatant and wash pellet with 100 µl 75% ethanol, spin for 1 minute.

8. Remove as much of ethanol as possible and dry tubes by leaving on bench with lids open for ~5 minutes.

9. Resuspend DNA in 40 µl of 20 µg/ml RNase A H2O.

10. Use for transformation, restriction digestion, sequencing, etc.

1. إجعل 1.5ml من المحلول الذي دار ببطئ طيلة الليل في أنبوب إبي (eppie) يدور على سرعة عالية لمدة دقيقة واحدة.

2. اشفط ما في أعلى الأنبوب وضع المترسب في الأسفل في 100µl من محلول I (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA).

3. أضف 200µl من محلول II (0.2 N NaOH, 1.0% SDS) وأخلطه بنعومة بواسطة الإنعكاس.

4. 150µL من محلول III (3M من خلات البوتاسيوم (KOAc) , درجة الحموضة 4.8[60 ml 5M KOAc, 11.5 ml HOAc, 28.5 ml H2O])، أخلط بالدوامة بشكل سريع ثم دعها تدور لمدة 5 دقائق على درجة عالية.

5. أنقل ما في أعلى الأنبوب إلى أنبوب آخر يحتوي على 500µL من الفينول / الكلوروفورم , أخلطه في الدوامة ثم ضعه ليدور لمدة 5 دقائق على سرعة عالية.

6. أنقل الطبقة المائية إلى أنبوب جديد يحتوي على 1 مل من الإيتانول , أخلطه جيداً بالمعاكسة , ثم ضعه ليدور لمدة 5 دقائق على سرعة عالية.

7. أزل طبقة السائل العليا ثم أغسل المترسب في الأسفل ب 100µL من الإيتانول (75%) وضعه ليدور لمدة دقيقة واحدة.

8. أزل بقدر الإمكان الإيتانول ثم أترك الأنبوب دون غطاء ليجف لمدة 5 دقائق.

9. ضع الدنا المترسب في 40µL من أنزيم الحمض الريبي (RNaseA 20µg/ml)

10. للتحويل إستخدم : أنزيم الهضم الإقتطاعي, التسلسل....

1.8 Separating DNA with Gel Electrophoresis / *فصل الدنا بواسطة الفصل الكهربائي للهلام*

1.8.1 Materials / المواد

Typically 10-30 µl/sample of the DNA fragments to separate are obtained, as well as a mixture of DNA fragments (usually 10-20) of known size (after processing with DNA size markers either from a

عادة نحصل من 10-30µl/عينة من قطع الدنا للفصل وكذلك إلى خليط من قطع الدنا (عادة من 10-20) المعروف قياسها (بعد المعالجة مع كل من علامات مقياس الدنا الآتية من المصدر التجاري أو

commercial source or prepared manually).
- Buffer solution, usually TBE buffer or TAE 1.0x, pH 8.0
- Agarose
- An ultraviolet-fluorescent dye, ethidium bromide, (5.25 mg/ml in H_2O). The stock solution is careful handling this. Alternative dyes may be used, such as SYBR Green.
- zNitrile rubber gloves. Latex gloves do not protect well from ethidium bromide
- A color marker dye containing a low molecular weight dye such as "bromophenol blue" (to enable tracking the progress of the electrophoresis) and glycerol (to make the DNA solution more dense so it will sink into the wells of the gel).
- A gel rack
- A "comb"
- Power Supply
- UV lamp or UV lightbox or other method to visualize DNA in the gel

من التحضير اليدوي.).
– محلول منظم هو عادة المنظم TBE أو TAE ×1.0 درجة الحموضة 8.0.
– الأغاروز.
– صبغة الفلورسنت ما فوق البنفسجية, إتيديوم بروميد (5.25 mg/ml في الماء) إنتبه تعامل مع هذا المحلول بحذر, ويمكن إستخدام الصبغة البديلة: مثل SYBR الخضراء .
– قفازات مطامية من النتريل لأن القفازات العادية لا تحمي من الإتيديوم بروميد.
– تحتوي صبغة العلامة الملونة على وزن جزيئي منخفض من الصبغات الأخرى مثل البروموفينول الأزرق (ليتمكن من التقدم على الفصل الكهربائي للهلام) و الكليسرول (ليعطي للدنا ثقلاً ليغرق في فتحات الهلام).
– طبق للهلام.
– مشط.
– تيار كهربائي.
– مصباح ذو أشعة ما فوق البنفسجية أو صندوق ضوء ذو أشعة ما فوق البنفسجية لرؤية الدنا على الهلام.

1.8.2 Preparation / التحضير

There are several methods for preparing gels. A common example is shown here. Other methods might differ in the buffering system used, the sample size to be loaded, the total volume of the gel (typically thickness is kept to a constant amount while length and breadth are varied as needed). Most agarose gels used in modern biochemistry and molecular biology are prepared and run horizontally.

1 Make a 1% agarose solution in 100ml TAE, for typical DNA fragments. A solution of up to 2-4% can be used if you analyze small DNA molecules, and for large molecules, a solution as low as 0.7% can be used.

هناك طرق عديدة لتحضير الهلام , والمثل الأكثر شيوعاً يعرض هنا , أما الطرق الأخرى قد تختلف حسب إستخدام نظام التخزين المؤقت من الممكن تخزين حجم العينة من الحجم الإجمالي للهلام (عادة يتم الإحتفاظ بسماكة معينة تتغير حسب الحاجة في الطول و العرض).

معظم المواد الهلامية الأغاروزية المستخدمة في الكيمياء الحياتية و بيولوجيا الجزيئية تحضر و يُعمل عليها أفقياً.

1.إصنع 1% من محلول الأغاروز في 100 مل من TAE لقطع الدنا النموذجية. ويمكنك إستخدام ما يصل من 2 إلى 4% من المحلول إذا كنت تحلل جزيئيات الدنا الصغيرة , والجزيئيات الكبيرة ويمكن أيضاً إستخدام ما يقل عن 0.7 % من المحلول.

2 Carefully bring the solution just to the boil to dissolve the agarose, preferably in a microwave oven.
3 Let the solution cool down to about 60 °C at room temperature, or water bath. Stir or swirl the solution while cooling.
Wear gloves from here on, ethidium bromide is a mutagen.

4 Add 5 µl ethidium bromide stock (10 mg/ml) per 100 ml gel solution for a final concentration of 0.5 ug/ml. Be very careful when handling the concentrated stock. Some researchers prefer not to add ethidium bromide to the gel itself, instead soaking the gel in an ethidium bromide solution after running.
5 Stir the solution to disperse the ethidium bromide, then pour it into the gel rack.
6 Insert the comb at one side of the gel, about 5-10 mm from the end of the gel.
7 When the gel has cooled down and become solid, carefully remove the comb. The holes that remain in the gel are the wells or slots.
8 Put the gel, together with the rack, into a tank with TAE. Ethidium bromide at the same concentration can be added to the buffer. The gel must be completely covered with TAE, with the slots at the end electrode that will have the negative current.

2.ضع بحذر المحلول في فرن ميكروويف لتذويب الأغاروز عند حالة الغليان.

3.أترك المحلول لبيرد حتى 60 م° على درجة حرارة الغرفة أو في حوض ماء مع التحريك إلى أن يبرد.

من هنا وصاعداً يجب إرتداء القفازات , لأن الإتيديوم بروميد يسبب الطفرات (تغيير جيني مفاجئ).

4.أضف 5µL من مخزون الإتيديوم بروميد (10mg/ml) في 100 مل من محلول الهلام إلى أن يصل التركيز النهائي إلى 0.5ug/ml . كن حذراً جداً عند التعامل مع مخزون الإتيديوم بروميد.يفضل بعض العلماء عدم زيادة الإتيديوم على الهلام نفسه و لكن نقعه لبضع دقائق عندما ينتهي التشغيل.

5.حرك المحلول ليتوزع جميع الإتيديوم بروميد ثم نضعه في طبق الهلام.

6.ضع المشط على أي جهة من الهلام , ما بين 5-10mm من نهاية الهلام.

7.عندما يبرد الهلام ويصبح جامداً , إسحب بحذر المشط أما الثقوب التي تبقى في الهلام فتسمى الآبار أو الفتحات.

8.ضع الهلام مع الطبق في محلول منظم TAE الموجود في العلبة الكبيرة لآلة الفصل الكهربائي للهلام. ونفس الكمية من الإتيديوم بروميد يمكن أن تضاف إلى المنظم و يجب أن يغطى الهلام بالكامل بال TAE وفتحات الهلام يجب أن تكون من الجهة السلبية للآلة (negative current).

1.8.3 Procedure / الإجراءات

After the gel has been prepared, use a micropipette to inject about 2.5 µl of stained DNA (a DNA ladder is also highly recommended). Close the lid of the electrophoresis chamber and apply current (typically 100 V for 30 minutes with 15 ml of gel). The colored dye in the DNA ladder and DNA samples acts as a "front wave" that runs faster than the DNA itself. When the "front wave" approaches the end of the gel, the current is stopped. The DNA is stained with

بعدما يصبح الهلام جاهزاً إستعمل ممصة صغيرة (micropipette) لوضع حوالي 2.5µl من الدنا المجهز سابقاً (ويطلب أيضاً سلم الدنا).

أغلق غطاء غرفة الفصل الكهربائي وشغل التيار الكهربائي.(عادة 100V لمدة 30 دقيقة مع 15 مل من الهلام).صبغة الألوان وسلم الدنا و عينات من الدنا التي

ethidium bromide, and is then visible under ultraviolet light.

1. The agarose gel with three slots/wells (S).
2. Injection of DNA ladder (molecular weight markers) into the first slot.
3. DNA ladder injected. Injection of samples into the second and third slot.
4. A current is applied. The DNA moves toward the positive anode due to the negative charges on its phosphate backbone.
5. Small DNA strands move fast, large DNA strands move slowly through the gel. The DNA is not normally visible during this process, so the marker dye is added to the DNA to avoid the DNA being run entirely off the gel. The marker dye has a low molecular weight, and migrates faster than the DNA, so as long as the marker has not run past the end of the gel, the DNA will still be in the gel.
6. Add the color marker dye to the DNA ladder.

هي بمثابة الموجه الأول و الأسرع من الدنا نفسه.عندما يقترب الموجه الأول من نهاية الهلام يجب توقيف التيار الكهربائي. الدنا الآن ملطخ بالإتيديوم بروميد لهذا يمكننا أن نراه تحت أشعة الضوء الفوق بنفسجي.

1. الهلام الأغاروزي يوجد فيه 3 فتحات.
2. ضع في الفتحة الأولى : سلم الدنا.
3. ضع في الفتحة الثانية و الثالثة عينات الدنا.
4. شغل التيار الكهربائي ولاحظ أن الدنا سيتحرك باتجاه الجهة الإيجابية وسببه الأساسي الفوسفات.
5. تسلسل الدنا الصغير يتحرك بسرعة على الهلام أما التسلسل الكبير فهو بطيء ولا يمكن أن نراه في هذه العملية بوضوح لذا تتم زيادة الصبغة التي هي أسرع من الدنا لذلك إذا لم تتم رؤية هذه العلامة فهذا يبرهن بأن الدنا لا يزال في فتحة الهلام.
6. أضف الصبغة الملونة على سلم الدنا.

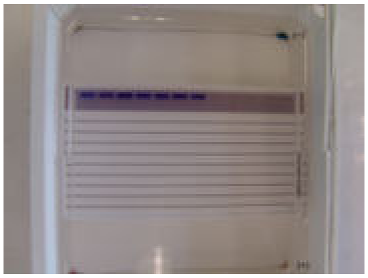


Fig.1.12: Agarose gel with samples loaded in the slots, before the electrophoresis process

الشكل 1.12: الهلام الأغاروزي مع عينات من الفتحات قبل العملية الكهربائية

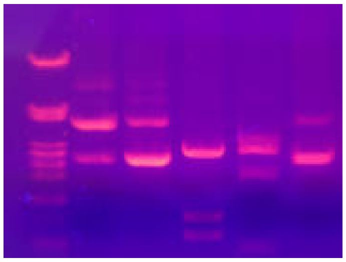


Fig 1.13: A pattern of DNA-bands under UV light

الشكل 1.13: نموذج من بقع الدنا تحت الأشعة ما فوق البنفسجية

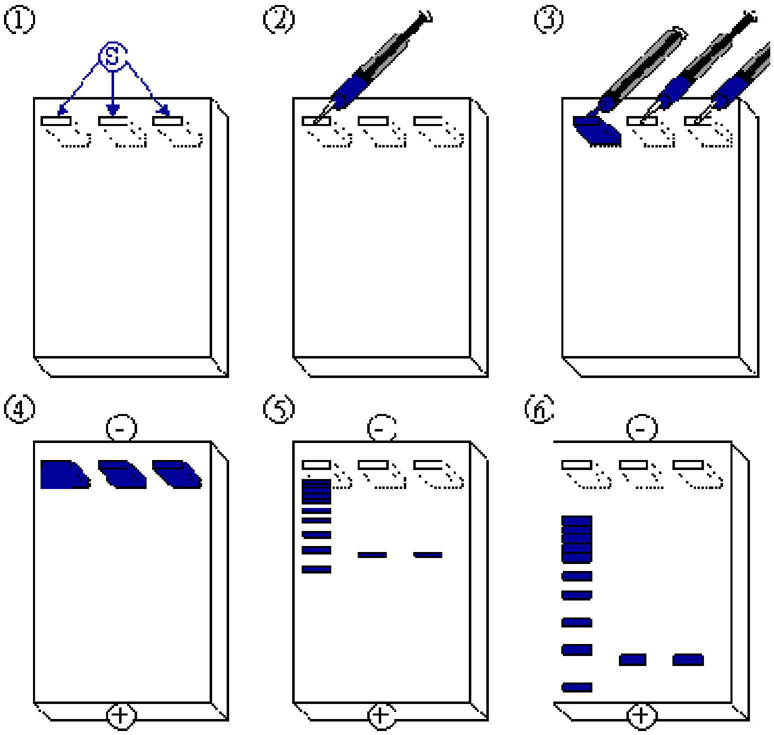


Figure 1.14: Schematic drawing of the electrophoresis process, see text for description of steps

الشكل 1.14: رسم تخطيطي للعملية الكهربائية.واجع النص لوصف المراحل

2 Experimental Part: Cloning of SRY gene / الجزء العملي: إستنساخ الجين الذكري

2.1 Isolation of human cells and amplification of SRY gene with PCR (2nd day) / *عزل خلايا الإنسان ومضاعفة الجين الذكري بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (اليوم الثاني)*

2.1.1 SRY gene / SRY الجين

SRY (**Sex-determining Region Y**) is a sex-determining gene on the Y chromosome in the therians (placental mammals and marsupials)

SRY هو الجين الذي يحدد الجنس على الكروموسوم y في ثديات المشيمة و الجرابية

This intronless gene encodes a transcription factor that is a member of the high mobility group (HMGtt)-box family of DNA-binding proteins. This protein is the testis determining factor (TDF), also referred to as the **SRY protein**, which initiates male sex determination.

جين الإنترون يرمز إلى عامل نسخ الذي هو عضو في مجموعة التنقل العالية (HMGtt) ضمن الأسرة من البروتيين الرابط للدنا . هذا البروتيين هو عامل تحديد الخصبة , و يشار إليه أيضاَ ببروتيين SRY الذي يبدأ بتحديد الجنس الذكري.

Sequence of SRY: تسلسلSRY

1 gttgaggggg tgttgagggc ggagaaatgc aagtttcatt acaaaagtta acgtaacaaa
61 gaatctggta gaagtgagtt ttggatagta aaataagttt cgaactctgg cacctttcaa
121 ttttgtcgca ctctccttgt ttttgacaat gcaatcatat gcttctgcta tgttaagcgt
181 attcaacagc gatgattaca gtccagctgt gcaagagaat attcccgctc tccggagaag

241 ctcttccttc ctttgcactg aaagctgtaa ctctaagtat cagtgtgaaa cgggagaaaa
301 cagtaaaggc aacgtccagg atagagtgaa gcgacccatg aacgcattca tcgtgtggtc
361 tcgcgatcag aggcgcaaga tggctctaga gaatcccaga atgcgaaact cagagatcag
421 caagcagctg ggataccagt ggaaaatgct tactgaagcc gaaaaatggc cattcttcca
481 ggaggcacag aaattacagg ccatgcacag agagaaatac ccgaattata agtatcgacc
541 tcgtcggaag gcgaagatgc tgccgaagaa ttgcagtttg cttcccgcag atcccgcttc
601 ggtactctgc agcgaagtgc aactggacaa caggttgtac agggatgact gtacgaaagc
661 cacacactca agaatggagc accagctagg ccacttaccg cccatcaacg cagccagctc
721 accgcagcaa cgggaccgct acagccactg gacaaagctg taggacaatc gggtaacatt
781 ggctacaaag acctacctag atgctccttt ttacgataac ttacagccct cactttctta
841 tgtttagttt caatattgtt ttcttttctc tggctaataa aggccttatt catttca

The sequence is given in the direction 5'---→----3'

هذا التسلسل حسب إتجاه :'5----<---'3

3D structure of TDF (there are several variants in the database, e.g. 1J46 and 1HRY):

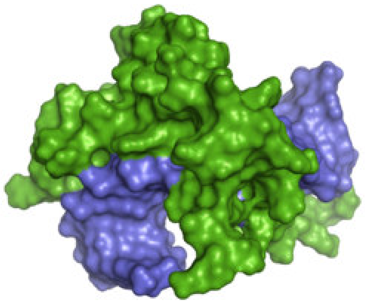
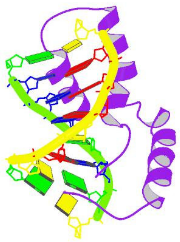


fig.1.15: see plate 7 for color version

الشكل 1.15: أنظر الصفيحة 7 لنسخة ملونة.

Testis determining factor **TDF (HMG-Domain, green) with DNA (blue) according to PDB 1J46**

بنية عامل تحديد الخصية في الأبعاد الثلاثية.ومتلائم مع بنية بنك بيانات البروتيين.



http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1HRY

FASTA format sequence of the protein (version 1hry):
>1HRY:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
VQDRVKRPMNAFIVWSRDQRRKMALENPRMRNSEISKQLGYQWKMLTEAEKWPFFQEAQKLQAMHR
EKYPNYKYRP
>1HRY:C|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
GTTTGTGC
>1HRY:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
GCACAAAC

2.1.2 Devices / الآلات

Shaker Incubator / حاضنة مع محرك

Thermocycler(PCR) / تفاعل البلمرة المتسلسل

Water bath / حوض.تسخين

See plate 8 for color figure.

2.1.3 Material / المواد

PBND buffer (for explose the membrane):
0,372g KCl (50 mM)
2,5ml Tris pH 8.3 (10 mM)
1ml MgCl2 (2.5 mM)
Gelatine(0.1 mg/ml)
450µl NP-40 (0.45%)
450µl Tween-20 (0.45%)

منظم PBND (لتفجير غشاء الخلايا)

0.372g من كلور البوتاسيوم (50Mm) .

2.5ml من tris[3] على درجة حموضة 8.3 (10mM).

جلاتين (0.1mg/ml).

450µl من NP40 (0.45%)

450µL من Tween-20 (0.45%)

Primers / المشرعات

hSRY5: 5′-gttgaggggg tgttgagggc ggaga-3′

hSRY3: 5′-tgaaatg aataaggcct ttattagcca-3′

(hSRY3 is complementary sequence of 5′- tggctaataa aggccttatt catttca -3′

Important remark: The SRY gene has to be put later in pGEM-T vector and then has to be cut out from it afterwards with EcoRI. For this reason there has to be put at both primers a EcoRI cutting sequence. In this course primers without these EcoRI cutting sequences are used. So the last step of the course (restriction digest with EcoRI) is not possible.

ملاحظة هامة: إن الجين بحاجة لاحقاً إلى وضعه في ناقل pGEM-T و من ثم قطعه بأنزيم EcoRI . لهذا السبب يجب وضع مشرعات الإقتطاع لأنزيم الEcoRI. ولكن في هذا التدريب هذه المشرعات ليست موجودة لذلك فإن المرحلة الأخيرة لم تتم.

2.1.4 Protocol / بروتوكول

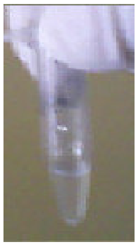
1. If you are male: Take a smear of your oral mucosa. Take it with a plastic spatula. Ask for a probe of a female oral mucosa smear.
   If you are female: Take a smear of your oral mucosa. Take it with a plastic spatula. Ask for a probe of a male oral mucosa smear
   Each of the smear (marked as "male" and as "female") is flushed with 20µl PBND buffer into an Eppendorf tube.

Figure: Putting the smear probe in an Eppendorf tube

ضع المسحة من الغشاء المخاطي في أنبوب النابذة.

1.إذا كنت ذكراَ : عليك أخذ مسحة من الغشاء المخاطي عن طريف الفم بواسطة ملعقة من البلاستيك , وأخذ مسحة أخرى من الأنثى للتحقق من النتيجة.

إذا كنت أنثى : عليك أخذ مسحة من الغشاء المخاطي عن طريف الفم بواسطة ملعقة من البلاستيك , وأخذ مسحة أخرى من الذكر للتحقق.



لديك الآن أنبوبين من النابذة .

You have now two Eppendorf tubes

كلا المسحتين (يجب وضع علامة لكل من الأنبوبين للتميز) تذوب ب20µL من منظم PBND في أنبوب نابذة صغير.

For each Eppendorf tube:

2. Add 3µl Proteinase K (10mg/ml). Then incubate several (about 3-5) hours at 55 °C(for activation the enzyme).
3. Incubate at 95°C for 15 minutes (95˚c: for denaturation the proteinase k) .

4.Set up of PCR:(time *3 the yield).

5µl of DNA (from your

لكل أنبوب:

2. أضف 3µL من البروتيياز كا (Protease k) (10mg/ml). ثم أحضنه لعدة ساعات (3 أو 4 ساعات) على 55 °م (لتنشيط عمل الأنزيم).

3.أحضنهما على 95 °م لمدة 15 دقيقة (لتوقيف عمل الأنزيم)

4. وضعه في آلة تفاعل البلمرة المتسلسل : (يجب ضرب الكمية ب3)

5 µL من الدنا (المأخوذ سابقاَ).

0.6 µL من المشرع Hsry5 (10 µM).

0.6 µL من المشرع hsry3 (10 µM).

probe)
0.6µl hSRY5 (10µM)
0.6µl hSRY3 (10µM)
2µl 10xbuffer(15 mM MgCl2)
0.4µl dNTPs (10mM)
0.6µl MgCl2 (50mM)
0.2µl Taq polymerase
10.6µl H2O

5. Performing the PCR reaction: Program the cycler as follows:

<u>40 cycles of:</u>
40sec. at 95°C
40sec. at 53°C
1 min. at 72°C
(95˚C for denaturation the double brind of DNA, 53˚C for activation the primer, 72˚C for activation the polymerase).

Result: Obtain yield of DNA

2 µL من 10*المنظم (15mM $MgCl_2$) .
.(10mM)dNTPs 0.4 µL
0.6 µL كلور المانييزيوم(50mM).
0.2 µL تاك بوليميراز .
10.6 µL من الماء.

5. تنفيذ عملية تفاعل البلمرة المتسلسل : برنامج الدورة على النحو التالي:

<u>40 دورة وكل دورة تحتوي :</u>
40 ثانية على 95 م˚ .
40 ثانية على 53 م˚.
1 دقيقة على 72 م˚.
(95م˚ لتغير طبيعة الربط بين سلالتي الدنا , 53 م˚ لتنشيط عمل المشرع , 72 م˚ لتنشيط عمل البوليميراز).

النتيجة من هذه العملية الحصول على كمية أكبر من الدنا.

2.1.5 Gel electrophoresis / الفصل الكهربائي للهلام

2.1.5.1 Devices / الآلات

Precision Balance / ميزان دقيق
Gel rack with voltage supply:طبق هلام
UV machine:آلة الأشعة ما فوق البنفسجية
Agitator machine (with heating possibility) / (مع إمكانية إستخدام الحرارة) آلة خلط
See pate 8 for color figure

2.1.5.2 Material / المواد

1. TAE buffer 1.0×pH8.0 (preparated in part 2.1.5.4).
2. Agarose
3. Ethidium bromide (Stock solution: 1g Eth.bromide in 100 ml dest. water)

1.منظم TAE *1 درجة الحموضة 8 (المحضرة في القسم 2.1.5.4).
2.الأغاروز .
3.إتيديوم بروميد (محلول التخزين : 1g من بودرة الإتيديوم بروميد في 100ml من الماء المعقم).

2.1.5.3 Preparation of gel / تحضير الهلام

- weight 1% agarose for 100ml TAE (see part 2.1.5.4).
- Dissolve the agarose on the agitator machine (agarose dissolve at 70 °C).
- Let the solution cool down to about 60°C at room temperature.
- Stir or swirl the solution while cooling.
- Put the gel on the gel rack and insert the comb.
- Let the gel to solidify.

- زن 1% من الأغاروز لكل 100ml من سائل TAE (أنظر على كيفية تحضير TAE في 2.1.5.4)..
- `ذوب الأغاروز على آلة المحرك على 70م°.
- أترك المحلول ليبرد على درجة حرارة الغرفة.
- قم بالتحريك خلال عملية التبريد,
- أضف الهلام على طبق الهلام ثم ضع المشط
- أتركه ليجمد.

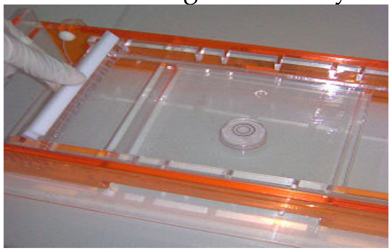


Figure 1.16: Gel rack.with comb See plate 9 for color version

صورة 1.16: طبق الهلام مع المشط. أنظر الصفيحة 8 لنسخة ملونة.

2.1.5.4 Preparation of TAE buffer 10×pH8.3 / كيفية تحضير المنظم TAE درجة الحموضة 10×

1. 20ml EDTA (0.5M).
2. 240ml acetic acid (5%).
3. 400 ml Tris base (0.01M).
4. 240ml distilled water.
5. Regulate with NaOH(2M) the pH on 8.2-8.4.

Figure 1.17: pH Meter See plate 10 for color version

الصورة 1.17: ميزان درجة الحموضة.

أنظر الصفيحة 10 لنسخة ملونة

20ml من إي دي تي آي (رباعي خلات ثنائي أمين الإيثيلين).(0.5M).

240ml حمض الخلات (5%).

400ml من tris base (0.01M).

4. 340 ml من الماء المعقم (distilled water).

5.تنظيم درجة الحموضة على 8.2-8.4 بواسطة هيدروكسيد الصوديوم (NaOH).

2.1.5.5 Separating DNA with gel electrophoresis and visualization of DNA under UV light / فصل الدنا على آلة الفصل الكهربائي للهلام ورؤيته على الأشعة ما فوق البنفسجية

I Take of each of your 3 Eppendorf tubes (male DNA, female DNA, DNA ladder) 4µl DNA and add as into a new Eppendorf tube as follows:

- For male smear probe: 4µl DNA (from smear) +3µl bromophenol blue + 3µl glycerol.
- For female smear probe: 4µl

I يجب أخذ 4 µL من الدنا (من كل من 3 أنابيب : أنبوب الدنا الذكري ,الأنثوي , السلمي) و وضعهم في 3 أنابيب جديدة ثم أضافة على كل أنبوب التالي:

- لأنبوب المسحة الذكري : 4µL من الدنا (المأخوذ سابقاَ) + 3µL من البروموفينول الأزرق + 3µL من الكليسيرول.

DNA (from smear) +3µl bromophenol blue + 3µl glycerol.

- For DNA ladder: 4µl ladder DNA +3µl bromophenol blue + 3µl glycerol.

II Inject 10µl from each eppendorf tube in the slots/wells of gel preparated on the gel rack

- لأنبوب المسحة الأنثوي : 4µL من الدنا (المأخوذ سابقاً) + 3µL من البروموفينول الأزرق + 3µL من الكليسيرول.
- لأنبوب سلم الدنا :4 µL من سلم الدنا + 3µL من البروموفينول الأزرق + 3µL من الكليسيرول.

II ضع 10 µL من كل أنبوب في حفر الهلام المحضر على طبق الهلام سابقاً

III Close the lid of the electrophoresis chamber and apply the voltage of 80 V for 1h30min.

IV After migration of the band; put the gel into a deep vessel (to put Ethidium bromide on it and to wash it afterwards).

V Soaking of gel with Ethidium bromide: Put 250 ml dest. water and afterwards 30µl of ethidium bromide stock solution into the vessel with the gel. Let it soaking for 30 min.

III أغلق غطاء خزان الرحلان الكهربائي ثم قم بتشغيل التيار الكهربائي لمدة 30 دقيقة على 80V.

IV بعد هجرة بقع الدنا ,ضع الهلام في وعاء غميق (لنقعه بالإتيديوم بروميد ومن ثم غسله عدة مرات).

V إنقع الهلام بالإتيديوم بروميد لمدة 30 دقيقة(ضع 250ml من الماء المعقم و من ثم 30 µL من االإتيديوم بروميد)

Warning: Be careful with ethidium bromide!!! Use specific gloves, put the water with ethidium bromide in a specific place, do not throw it in the nature. Ethidium bromide could cause cancer (propably onkogen) and it is mutagen.

VI Wash the gel from ethidium bromide 3 times with dist. water (250ml).

VII Put the gel on UV- machine. Insha Allah you will see bands for the DNA ladder and the male DNA:

تحذير : يجب الحذر في التعامل مع الإتيديوم !!! إستخدم القفازات الخاصة , ضع الماء المحتوية على الإتيديوم بروميد في مكان خاص و لا ترميه في الطبيعة . لأنه قد يسبب السرطان ويحدث الطفرات (التغيير المفاجئ للدنا).

VI اغسل الهلام 3 مرات في الماء المعقم (250ml) بعد الإتيديوم بروميد.

VII.ضع الهلام على آلة الأشعة ما فوق البنفسجية . و إنشاء الله سنرى بقع للدنا الذكري و لسلم الدنا.

2.2 Gel purification / تنقية الهلام

Before the PCR product is ligated into a plasmid it is purified on a agarose gel from unspecific reaction products.

قبل إلصاق المنتج من تفاعل البلمرة المتسلسل بالبلازميد يجب تنقيته من الهلام والمواد الغير ضرورية .

2.2.1 Devices / الآلات

Warming bath or incubator / حاضنة

Electrophoresis device / الفصل الكهربائي للهلام

Precision weight / ميزان دقيق

Centrifuge / نابذة

Vortex / دوامة

see plate 8 for color.figure / أنظر الصفيحة 8 لصور ملونة

2.2.2 Material / المواد

Eppendorf tubes / أنبوب نابذة

Scalpel / مشرط حاد

QIAquick Gel extraction Kit : هي مجوعة تساعد على عملية الفصل

2.2.3 Protocol / البروتوكول

QIAquick Gel Extraction Kit Protocol using a microcentrifuge
This protocol is designed to extract and purify DNA of 70 bp to 10 kb from standard or low-melt agarose gels in TAE or TBE buffer. Up to 400 mg agarose can be processed per spin column. This kit can also be used for DNA cleanup from enzymatic reactions.
For DNA cleanup from enzymatic reactions using this protocol, add 3 volumes of Buffer QG and 1 volume of isopropanol to the reaction, mix, and proceed with step 6 of the protocol. Alternatively, use the MinElute Reaction Cleanup Kit.

Important points before starting

■The yellow color of Buffer QG indicates a pH ≤7.5

■Add ethanol (96–100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).

■All centrifugation steps are carried out at 17,900 x g (13,000 rpm) in a conventional table-top microcentrifuge at room temperature.

QIA quick gel extraction kit هو بروتوكول يستخدم أنبوب النابذة الصغير

يهدف هذا البروتوكول إلى إستخراج و تنقية الدنا من 70bp إلى 10kb أو إنخفاض نسبة ذوبان الهلام الأغاروزي في المنظم TAE أو TBE يمكن معالجة أكثر من 400mg من الأغاروز في عامود الدوران . هذه المجموعة يمكنها أن تنظف أيضاَ الدنا من التفاعل الأنزيمي.

يستخدم هذا البروتوكول لتنظيف الدنا من التفاعل الأنزيمي , أضف على هذا التفاعل 3 أحجام من المنظم QG لكل 1 حجم من الإيزوبروبانول, اخلطه ,و من ثم أكمل الخطوة السادسة من البروتوكول. أو بدلا من ذلك استخدم مجموعة التنظيف Min Elute reaction .

نقاط هامة قبل البدء.

-اللون الأصفر للمنظم QG يشير إلى أن درجة الحموضة أدنى أو تساوي 7.5 .

-أضف الإيتنول (96-100%) على المنظم PE قبل الإستعمال.

-جميع مراحل النبذ نفذت على سرعة 17,900*g(13,000 rpm) في آلة النبذ العادية على درجة حرارة الغرفة.

Procedure / الإجراءات

1. Cut the DNA fragment from the agarose gel with a clean sharp scalpel.

1.إقطع بقع الدنا من الهلام الأغاروزي بمشرط نظيف وحاد.

الصورة 1.18 أنظر الصفيحة 11 لنسخة ملونة

fig.1.18 see plate 11 for color version

Minimize the size of the gel slice by removing extra agarose.

حاول قدر المستطاع إزالة الهلام الزائد .

2. Weigh the gel slice in a colorless tube. Add 3 volumes of Buffer QG to 1 volume of gel (100 mg ~ 100 µl).

For example, add 300 µl of Buffer QG to each 100 mg of gel. For >2% agarose gels, add 6 volumes of Buffer QG. The maximum amount of gel slice per QIAquick column is 400 mg; for gel slices >400 mg use more than one QIAquick column.

2.ضع القطعة في أنبوب شفاف ثم زنها . أضف 3 أحجام من منظم QG لكل 1 حجم من الهلام (100 µl ~ 100 mg) مثال على ذلك , أضف 300 µl من منظم QG لكل 100mg من الهلام . لأكثر من% 2 من الهلام الأغاروزي , أضف 6 أحجام من منظم QG . الكمية القصوى من الهلام في عامود Qia quick هي 400mg , لأكثر من هذه الكمية إستعمل أكثر من عامود Qia quick .

3. Incubate at 50°C for 10 min (or until the gel slice has completely dissolved). To help dissolve gel, mix by vortexing the tube every 2–3 min during the incubation.

IMPORTANT: Solubilize agarose completely. For >2% gels, increase incubation time.

3.أحضن على 50م° لمدة 10 دقائق (أو إلى أن يذوب الهلام بالكامل) لمساعدة الهلام على الذوبان , أخلط الأنوب بالدوامة كل 2–3 دقائق خلال الحضن.

هام: يجب ذوبان الأغاروز بالكامل . وإذا كان الهلام أكبر من % 2 يجب زيادة وقت الحضن.

4. After the gel slice has dissolved completely, check that the color of the mixture is yellow (similar to Buffer QG without dissolved agarose).

4.بعد تذويب الأغاروز بالكامل يجب التحقق من لون الخليط الأصفر (المشابه تماما للمنظم QG قبل الاستعمال).

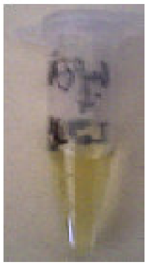


fig.1.19. see plate 12 for color version / الشكل 1.19. أنظر الصفيحة 12 لنسخة ملونة

If the color of the mixture is orange or violet, add 10 µl of 3 M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The color of the mixture will turn to yellow. The

إذا كان لون الخليط برتقالي أو بنفسجي , أضف 10 µL من خلات الصوديوم 5M, درجة الحموضة 5.0 ثم اخلطه. يجب أن

adsorption of DNA to the QIAquick membrane is efficient only at pH ≤7.5. Buffer QG contains a pH indicator which is yellow at pH ≤7.5 and orange or violet at higher pH, allowing easy determination of the optimal pH for DNA binding.

5. Add 1 gel volume of isopropanol to the sample and mix.

For example, if the agarose gel slice is 100 mg, add 100 µl isopropanol. This step increases the yield of DNA fragments <500 bp and >4 kb. For DNA fragments between 500 bp and 4 kb, addition of isopropanol has no effect on yield. Do not centrifuge the sample at this stage.

6. Place a QIAquick spin column in a provided 2 ml collection tube.

7. To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column, and centrifuge for 1 min.

يعود اللون إلى اللون الأصفر . لأن كفاءة امتصاص الدنا على غشاء QIA quick تكون على درجة حموضة أقل أو تساوي 7.5 . يحتوي المنظم QG على مؤشر لدرجة الحموضة حيث يعطينا اللون الأصفر على درجة حموضة 7.5 أو أقل منها , أما إذا كان اللون برتقالي أو بنفسجي فهذا يشير بأن درجة الحموضة عالية , مما يسمح بسهولة تحديد درجة الحموضة المثلى لربط الدنا.

5.أضف 1 من حجم الهلام من الإيزوبروبانول للعينة وأخلطه.

على سبيل المثال , إذا كان 100mg من الهلام الأغاروزي يجب زيادة 100 µL من الإيزوبروبانول . هذه المرحلة تزيد من كمية قطع الدنا التي هي أقلل من 500bp و أكثر من 4kb. أما لقطع الدنا ما بين 400bp-4kb فإن زيادة الإيزوبروبانول لا تؤثر على الكمية. لا تنبذ العينة في هذه المرحلة .

6. ضع عامودي الدوران Qiaquick في إثنين من الأنبوب الجامع (collection tube).

7.لربط الدنا, ضع العينة في عامود Qiaquick , أنبذ لمدة 1 دقيقة.

The maximum volume of the column reservoir is 800 µl. For sample volumes of more than 800 µl, simply load and spin again.

8. Discard flow-through and place QIAquick column back in the same collection tube.

Collection tubes are reused to reduce plastic waste.

9. Recommended: Add 0.5 ml of Buffer QG to QIAquick column and centrifuge for 1 min.

This step will remove all traces of agarose. It is only required when the DNA will subsequently be used for direct sequencing, in vitro transcription, or

الحجم الأقصى لخزان العامود هو 800 µL أما إذا كان الحجم أكثر من ذلك فيجب أن تحمل العينة و تعيد الدوران.

8. إرمي السائل في الطبقة العليا ثم أعد وضع عامود Qiaquick إلى نفس العامود الجامع

يعاد إستعمال العامود الجامع لتقليل كمية النفايات البلاستيكية.

9.نصيحة : أضف 0.5ml من منظم QG إلى عامود Qiaquick وأنبذه لدقيقة واحدة

هذه المرحلة تزيل جميع بقايا الأغاروز .و هي مطلوبة إذا كان الدنا سيستعمل لتسلسل مباشر , للنقل في المختبر , أو

microinjection.
10. To wash, add 0.75 ml of Buffer PE to QIAquick column and centrifuge for 1 min.
Note: If the DNA will be used for salt-sensitive applications, such as blunt-end ligation and direct sequencing, let the column stand 2–5 min after addition of Buffer PE, before centrifuging.
11. Discard the flow-through and centrifuge the QIAquick column for an additional 1 min at 17,900 x g (13,000 rpm).
IMPORTANT: Residual ethanol from Buffer PE will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation.
12. Place QIAquick column into a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.
13. To elute DNA, add 50 µl of Buffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) or water (pH 7.0–8.5) to the center of the QIAquick membrane and centrifuge the column for 1 min. Alternatively, for increased DNA concentration, add 30 µl elution buffer to the center of the QIAquick membrane, let the column stand for 1 min, and then centrifuge for 1 min.
IMPORTANT: Ensure that the elution buffer is dispensed directly onto the QIAquick membrane for complete elution of bound DNA. The average eluate volume is 48 µl from 50 µl elution buffer volume, and 28 µl from 30 µl. Elution efficiency is dependent on pH. The maximum elution efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water, make sure that the pH value is within this range, and store DNA at –20°C as DNA may degrade in the absence of a buffering agent. The purified DNA can also be eluted in TE (10 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0), but the EDTA may inhibit subsequent enzymatic reactions.
14. If the purified DNA is to be analyzed on a gel add 1 volume of Loading Dye to 5volumes of purified DNA. Mix the solution by pipetting up and down before loading the gel.
Loading dye contains 3 marker dyes

. microinjection

10.للغسل , أضف 0.75ml من منظم PE إلى عامود Qiaquick و أنبذ لدقيقة واحدة .

ملاحظة : إذا كان الدنا سيستعمل لتطبيقات الملح الحساسة . مثل ربط النهاية الحادة و التسلسل المباشر , قبل النبذ أترك العامود لمدة 2–5 دقائق لزيادة المنظم PE.

11.إرمي السائل وأعد النبذ لدقيقة واحدة على 17.900*G(13.000rpm)

هام: الإيتانول المتبقي لن يزول بالكامل من منظم PE إلا إذا تم رمي السائل قبل إعادة النبذ.

12. ضع عامود Qiaquick في أنبوب نابذة جديد 1.5ml.

13. لإزالة الدنا , أضف 50µl من منظم EB (10mM tris Cl, PH 8.5) أو ماء (PH 7.0-8.5) في نصف غشاء Qiaquick ثم أنبذ العامود لمدة دقيقة واحدة .أو بدلاً من ذلك , لزيادة تركيز الدنا , أضف 30µl من منظم الإزالة (elution buffer) في نصف غشاء Qiaquick, أترك العامود لدقيقة ثم أنبذ أيضاً لدقيقة.

هام : تأكد من أن المنظم وزّع مباشرةً على غشاء Qiaquick لتكملة إزالة الدنا المقيد . معدل حجم السائل المستخرج هو 48µl من 50µl من حجم منظم الإزالة. كفاءة الإستخراج متعلقة بدرجة الحموضة. كفاءة الإستخراج القصوى تتم إذا كانت درجة الحموضة بين 7.0-8.5. لذا عندما تستعمل الماء, تأكد من أنها ضمن نطاقها ثم خزّن الدنا على –20م°كما إنه يمكن إن يتحلل بغياب العامل المنظم. تنقية الدنا يمكن أن تكون في TE (10 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) إلا أنّ إي دي تي آي قد تمنع ردود فعل أنزيمية لاحقة.

14 إذا كان تحليل أنزيم الدنا سيتم على الهلام أضف 1 حجم من تحميل الصبغ (loading dye) لكل 5 أحجام من الدنا المنقى . أخلط المحلول بواسطة الممصة صعوداً و نزولاً

(bromophenol blue, xylene cyanol, and orange G) that facilitate estimation of DNA migration distance and optimization of agarose gel run time. Refer to Table 2 (page 15) to identify the dyes according to migration distance and agarose gel percentage and type.

قبل وضعه على الهلام.

يحتوي تحميل الصبغ على 3 علامات من الأصباغ (البروموفينول الأزرق , سيانول إكسيلان , البرتقالي ج (orange G)) التي تسهل من تقدير مسافة الدنا الذي هاجر و الإستفادة القصوى من الهلام وقت التشغيل .راجع الجدول 2 (صفحة 15) للتعرف على الأصباغ وفقاً لمسافة الهجرة ونسبة الهلام و نوعه.

2.3 Ligation of PCR product in pGEM-T Easy (Promega) / *ربط منتج تفاعل البلمرة المتسلسل في*pGEM-T Easy (Promega)

In PCR Taq polymerase was used. If Taq polymerase is used, the PCR products include at the 3′ end a overhanging A nucleotide. This feature is used by the so-called T/A cloning.

The DNA fragments (SRY gene) are cloned into a vector which has overhanging 5′ T nucleotides. So these vector endings are compatible to the endings of the PCR products, and the PCR products can be ligated with high efficiency into the vector. One of such vectors is the pGEM-T Easy.

يستعمل تاك بوليمراز في تفاعل البلمرة المتسلسل وإذا تم إستعماله فإن منتج تفاعل البلمرة المتسلسل يشمل النهاية '3 ليخيم على النيوكليوتيد آي (nucleotide A) هذه الميزة ستستعمل بواسطة الإستنساخ الذي يدعى تي / آ .

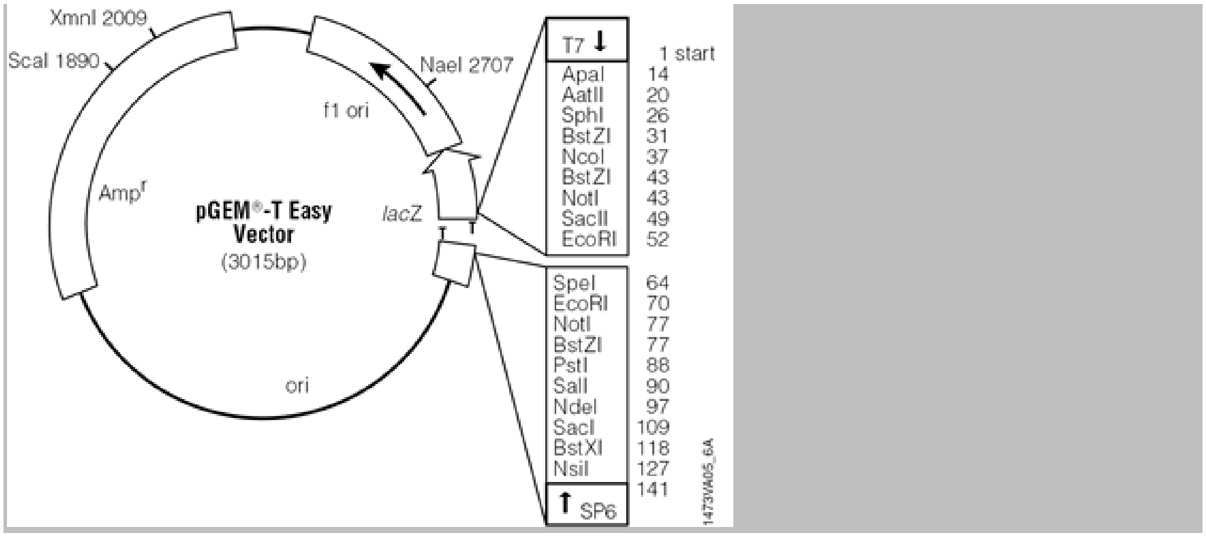
قطع الدنا المستنسخة في الناقل الذي يخيم على النيوكليوتيد تي آي. لذا فإن نهايات الناقل متكاملة مع نهايات منتج تفاعل البلمرة المتسلسل, ومن الممكن ربط هذا المنتج ضمن كفاءة عالية في الناقل .أحد هذه الناقلات هو pGEM-T Easy .

2.3.1 Devices / الأدوات

Table centrifuge for Eppendorf tubes / جدول نابذة لأنابيب النابذة
Vortex / دوامة

2.3.2 Material / المواد

Promega pGEM T Easy (Promega Cat. #A1380)



Product	Size	Cat.#
pGEM®-T Easy Vector System II	20 reactions	A1380

For Laboratory Use. Includes:

- 1.2µg pGEM®-T Easy Vector (50ng/µl)
- 12µl Control Insert DNA (4ng/µl)
- 100u T4 DNA Ligase
- 200µl 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase
- 1.2ml JM109 Competent Cells, High Efficiency (6 × 200µl)
- 1 Protocol

Storage Conditions: For Cat.# A3610, A1380, store the Competent Cells at –70°C. All other components can be stored at –20°C.

2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase (provided with pGEM-T Easy II Kit)

60mM Tris-HCl (pH 7.8)

20mM MgCl2

20mM DTT

2mM ATP

10% polyethylene glycol (MW8000, ACS Grade)

Store in single-use aliquots at –20°C. Avoid multiple freeze-thaw cycles.

×2 منظم سريع الربط , تي 4 ليغاز الدنا (المتوفر في pGEM-T Easy II Kit)

60mM Tris-HCl (pH 7.8)

20mM MgCl2

20mM DTT

2mM ATP

10% polyethylene glycol (MW8000, ACS Grade)

إحفظ بشكل مجزأ حيث يتم إستخدام كل جزء مرة واحدة على – 20م° تجنب التثليج والتذويب المتكررين.

2.3.3 Protocol for Ligations Using the pGEM®-T Easy Vector and the 2X Rapid Ligation Buffer / بروتوكول الربط يستخدم الناقل pGEM–T Easy و2× منظم رابط سريع

1. Briefly centrifuge the pGEM®-T or pGEM®-T Easy Vector and Control Insert DNA tubes to collect contents at the bottom of the tubes.

1.أنبذ باختصار الناقل pGEM-T Easy أو pGEM-T و التحكم بقطع الدنا المراد زيادتها على الناقل لتجميع المحتوى في أسفل الأنابيب .

2. Set up ligation reactions as described below.

Note: Use 0.5ml tubes known to have low DNA-binding capacity (e.g., VWR Cat.# 20170-310).

Vortex the 2X Rapid Ligation Buffer vigorously before each use.

2. إعداد ردود فعل الربط كما هي موضحة في الأعلى.

ملاحظة : استخدم 0.5ml من الأنابيب معروف إنها تملك قدرة منخفضة لربط الدنا. استعمل الدوامة ل 2 × منظم سريع الربط بقوة قبل كل استعمال .

	Standard Reaction	Positive Control	Background Control
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5µl	5µl	5µl
pGEM®-T or pGEM®-T Easy Vector (50ng)	1µl	1µl	1µl
PCR product	Xµl*	–	–
Control Insert DNA	–	2µl	–
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)	1µl	1µl	1µl
deionized water to a final volume of	**10µl**	**10µl**	**10µl**

*Molar ratio of PCR product:vector may require optimization (see Section VI.C).

3. Mix the reactions by pipetting. Incubate the reactions 1 hour at room temperature. Alternatively, if the maximum number of transformants is required, incubate the reactions overnight at 4°C.

3.أخلط التفاعل بالممصة ثم أحضنه لمدة ساعة على درجة حرارة الغرفة. أو بدلاً من ذلك .إذا كان أقصى عدد من النقل مطلوب فيجب إحتضان التفاعل طوال الليل على 4م°.

Notes (from Promega):

1. Use only Promega T4 DNA Ligase supplied with this system to perform pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector ligations. Other commercial preparations of T4 DNA ligase may contain exonuclease activities that may remove the terminal . Use only Promega T4 DNA Ligase supplied with this system to perform pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector ligations. Other commercial preparations of T4 DNA ligase may contain exonuclease activities that may remove the terminal deoxythymidines from the vector.

2. 2X Rapid Ligation Buffer contains ATP, which degrades during temperature fluctuations. Avoid multiple freeze-thaw cycles and exposure to frequent temperature changes by making single-use aliquots of the buffer.

3. It is important to vortex the 2X Rapid Ligation Buffer before each use.

4. Longer incubation times will increase the number of transformants. Generally, incubation overnight at 4°C will produce the maximum number of transformants.

from the vector.

2. 2X Rapid Ligation Buffer contains ATP, which degrades during temperature fluctuations. Avoid multiple freeze-thaw cycles and exposure to frequent temperature changes by making single-use aliquots of the buffer.

ملاحظات من promega

1.إستخدم فقط ليغاز الدنا ت 4 الآتية من promega لتنفيذ عملية النقل . لأن التحضيرات التجارية الأخرى قد تحتوي على أنشطة ممكن أن تؤدي إلى إزالة . deoxythymidine التي هي محطة من الناقل .

2.2× منظم سريع الربط يحتوي على ATP الذي يتدمر من خلال التقلبات بدرجات الحرارة , تجنب التذويب و التبريد المتكررين والتعرض للتغيرات الحرارية المتكررة من خلال تقسيم الكمية إلى أجزاء ضمن المنظم ثم تخزينها بحيث يحتوي كل جزء على الكمية الكافية لإستعمال واحد.

3. من المهم خلط 2× منظم الربط السريع

3. It is important to vortex the 2X Rapid Ligation Buffer before each use.
4. Longer incubation times will increase the number of transformants. Generally, incubation overnight at 4°C will produce the maximum number of transformants.

في الدوامة قبل كل الإستعمال.
4.الوقت الطويل من الحضانة يزيد من عدد المتحولات.عادةً تكون الحضانة طوال الليل على 4 م°.

2.4 Transformation of E.coli JM109 by plasmid DNA carrying SRY gene (3rd day) / نقل الإشيريكي كولي بواسطة دنا البلازميد الحامل جين SRY. (اليوم الثالث)

For the transformation there are used cells which are already made competent or preperate by the following protocol. These competent E.coli JM109 cells are provided with the Promega pGEM-T Easy Kit II

لهذا النقل يجب أن تكون الخلايا جاهزة و مفتوحة و محضرة من خلال هذا البروتوكول . هذه الإشيريكي كولي المفتوحة JM109 متوفرة لدى Promega pGEM-T Easy Kit II .

2.4.1 Protocol: Preparation of E.coli competent cells / بروتوكول: تجهيز الخلايا الإشريكية القولونية المفتوحة

1.Set up 5ml culture of E.coli in L.B medium ,incubate over night at 37°C on a rotry shaker

1.إعداد 5ml من الإشيريكي القولونية في وسط مغذي أل بي (L.B medium), أحضن طوال الليل على 37 م° في الحاضنة مع تشغيل عملية الدوران.

Figure 1.20: Tube with E.coli culture in Shaker Incubator. See plate 13 for color version / الشكل 1.20: أنابيب يوجد فيها خلايا الإشريكي القولونية المزروعة داخل الحاضنة.أنظر الصفيحة 13 لنسخة ملونة.

2.Add 1ml of the over night culture to 100ml L.B medium .incubate at 37°c on a shaker until the OD_{650}=0.3(about 3h)
3.Aliquot culture into 2 *50ml Oakridge tubes chill on ice for 10 min . Centrifuge at 4000 rpm for 10min at 4°c.Discard supernatant and resuspend the pellets each in 20ml of cold 0.1M calcium chloride.

2.أضف 1 ml من المنتج خلال الليل في 100ml من الوسط أل بي. ثم أحضنه على 37 م° مع تشغيل عملية التحريك (خلال ثلاث ساعات)
3. قسم المنتج من الزراعة إلى 2× 50ml في الأنابيب ثم برده في الثلج لمدة 10 دقائق. أنبذ على 4000 rpm لمدة 10 دقائق على 4 م°. إرمي ما في الأعلى من الأنبوب ثم ضع على المترسبات في كل أنبوب 20ml من كلوريد الكالسيوم البارد(0.1M.).

4.Leave on ice for 25min. centrifuge at 4000rpm for 10min at 4˚c resuspend each pellet in 2ml of cold 0.1M calcium chloride.

4.أتركه في الثلج لمدة 25 دقيقة. أنبذ على 4000rpm لمدة 10 دقائق على 4 م˚ ضع في كل مترسب 2ml من كلوريد الكالسيوم (0.1M).

2.4.2 Devices / الآلات

Waterbath / حوض تسخين

Shaking incubator / حاضنة مع محرك

2.4.3 Materials (other than JM 109 from Promega pGEM-T Easy Kit II) / المواد (غير JM 109 from Promega pGEM–T Easy Kit II.)

- LB plates with ampicillin/IPTG/X-Gal

LB medium (per liter)
10g Bacto®-tryptone
5g Bacto®-yeast extract
5g NaCl
Adjust pH to 7.0 with NaOH.

LB plates with ampicillin
Add 15g agar to 1 liter of LB medium. Autoclave. Allow the medium to cool to 50°C before adding ampicillin to a final concentration of 100µg/ml. Pour 30–35ml of medium into 85mm Petri dishes. Let the agar harden. Store at 4°C for up to 1 month or at room temperature for up to 1 week.

LB plates with ampicillin/IPTG/X-Gal
Make the LB plates with ampicillin as above; then supplement with 0.5mM IPTG and 80µg/ml X-Gal and pour the plates. Alternatively, 100µl of 100mM IPTG and 20µl of 50mg/ml X-Gal may be spread over the surface of an LB-ampicillin plate and allowed to absorb for 30 minutes at 37°C prior to use.

صفحة أل بي مع أمبيسيلين / أي بي تي جي(IPTG) / إكس–غال.

وسط مغذي أل بي (في الليتر).

10g من bacto –tryptone .

5g من bacto-yeast extract

5g من كلوريد الصوديوم

عدل درجة الحموضة على 7.0 بواسطة هيدروكسيد الصوديوم

صفحة أل بي مع أمبيسيلين

أضف 15g من الأغار لكل ليتر من وسط أل بي. عقم .إسمح للوسط أن يبرد حتى 50 م˚ قبل زيادة الأمبيسيلين حتى يكون التركيز النهائي 100µg/ml . أضف 30-35ml من الوسط إلى علبة بيري. أترك الأغار ليجمد . ثم خزنه لأكثر من شهر على 4 م˚ أو لأسبوع على درجة حرارة الغرفة.

صفحة أل بي مع أمبيسيلين/ أي بي تي جي/ إكس – غال.

إصنع صفحة أل بي مع أمبيسيلين كما ورد سابقاً , ثم أضف عليها 0.5mM من أي بي تي جي و 80µg/ml من إكس – غال . أو بدلاً من ذلك ,جهز 100µl من أي بي تي جي (100mM) و 20µl من إكس – غال (50mg/ml) ثم أنشرهم على سطح صفحة أل بي مع أمبيسيلين ثم إسمح لها بالإمتصاص خلال 30 دقيقة على 37 م˚ قبل الإستعمال.

تخزين محلول أي بي تي جي (0.1M)

1.2g أي بي تي جي.

<u>IPTG stock solution (0.1M)</u>
1.2g IPTG
Add water to 50ml final volume. Filtersterilize and store at 4°C.

أضف الماء إلى 50 ml من الحجم النهائي. ثم صفي المحتوى عبر فلتر معقم و خزنه على 4 مْ

<u>X-Gal (2ml)</u>
100mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside
Dissolve in 2ml N,N′-dimethylformamide. Cover with aluminum foil and store at –20°C.

<u>إكس – غال (2 مل)</u>

100mg من 5-برومو-4- كلورو-3- إيندول – بتا –دي- غالكتوزيد ذوبهم في 2ml من آن-آن – ديمتيل فورماميد. غطيهم بغطاء من الألومينيوم و خزنهم على 20- مْ

The genotype of JM109 is *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*, *hsd*R17 (rK–,mK+), *rel*A1, *sup*E44, Δ(*lac*-*pro*AB), [F′, *tra*D36, *pro*AB, *lac*IqZΔM15].

Protocol / البروتوكول

1. Prepare two LB/ampicillin/IPTG/X-Gal plates for each ligation reaction, plus two plates for determining transformation efficiency (see Section "Trasformation Control"). Equilibrate the plates to room temperature prior to plating (Step 10).

2.Centrifuge the tubes containing the ligation reactions to collect contents at the bottom of the tube. Add 2µl of each ligation reaction to a sterile 1.5ml microcentrifuge tube on ice (see Note 1). Set up another tube on ice with 0.1ng uncut plasmid for determination of the transformation efficiency of the competent cells (see Section "Trasformation Control").

3.Remove tube(s) of frozen JM109 High Efficiency Competent Cells from storage and place in an ice bath until just thawed (about 5 minutes). Mix the cells by **gently** flicking the tube.

Note: Avoid excessive pipetting, as the competent cells are extremely fragile.

4. **Carefully** transfer 50µl of cells into each tube prepared in Step 2 (100µl cells for determination of transformation efficiency).

5. **Gently** flick the tubes to mix and place them on ice for 20 minutes.

6.Heat-shock the cells for 45–50 seconds in a water bath at exactly 42°C (**Do not shake**).

7. Immediately return the tubes to ice for 2 minutes.

1.جهز إثنان من صفحة أل بي مع أمبيسيلين/ أي بي تي جي/ إكس – غال لكل من تفاعل الربط , أضف إثنان أيضاً من الصفحات لتحديد كفاءة التحويل . وازن الصفحات حسب درجة حرارة الغرفة قبل الطلي عليها (مرحلة 10).

2.أنبذ الأنابيب المحتوية على تفاعلات الربط لجمع المحتوى في أسفل الأنبوب . أضف 2µl من كل تفاعل إلى أنبوب نابذة جديد 1.5ml و ضعهم في الثلج. جهز أنبوب آخر في الثلج يحتوي على 0.1ng من البلازميد الغير مقطّع لتحديد كفاءة تحويل الخلايا المفتوحة.

3.أجلب الخلايا المفتوحة من الإيكولي من الثلاجة وضعها في حوض بارد إلى أن تذوب (خلال 5 دقائق). أخلط جيداً الخلايا من خلال هزّ الأنبوب بنوعومة.

ملاحظة: لا تستعمل الممصة لخلط الخلايا لتجنب تمزيقها.

4.أنقل بحذر 50µl من الخلايا إلى كل أنبوب محضر في المرحلة 2 (100µl من الخلايا لتحديد كفاءة النقل).

5.هز الأنبوب بنوعومة للخلطهم و ضهم في الثلج لمدة 20 دقيقة.

6.أصدم الخلايا بالحرارة لمدة 45-50 ثانية في حوض التسخين على 42 مْ (دون تحريك).

7.أنقل الأنبوب فوراً إلى الثلج لمدة 2 دقيقتين.

8.أضف 950µl من الوسط المغذي سوك (SOC medium)

8. Add 950µl room temperature SOC medium to the tubes containing cells transformed with ligation reactions and 900µl to the tube containing cells transformed with uncut plasmid (LB broth may be substituted, but colony number may be lower).
9. Incubate for 1.5 hours at 37°C with shaking (~150rpm).
10. Plate 100µl of each transformation culture onto duplicate LB/ampicillin/IPTG/X-Gal plates. For the transformation control, a 1:10 dilution with SOC medium is recommended for plating. If a higher number of colonies is desired, the cells may be pelleted by centrifugation at 1,000 × *g* for 10 minutes, resuspended in 200µl of SOC medium, and 100µl plated on each of two plates.
11.Incubate the plates overnight (16–24 hours) at 37°C. In our experience, if 100µl is plated approximately 100 colonies per plate are routinely seen when using competent cells that are 1 × 108cfu/µg DNA. Longer incubations or storage of plates at 4°C (after 37°C overnight incubation) may be used to facilitate blue color development. White colonies generally contain inserts; however, inserts may also be present in blue colonies.
Please see Section "Screening Transfo`rmants for Inserts: Preselection of transformants" for more information.

إلى الأنبوب الذي يحتوي على الخلايا الناقلة مع تفاعل الربط على درجة حرارة الغرفة , و 900µl إلى الأنبوب الذي يحتوي على الخلايا الناقلة مع البلازميد الغير مقطوع (من الممكن إستعمال الوسط أل بي مكان السوك ولكن عدد المجموعات سيقل).
9.أحضن لمدة ساعة ونصف على 37 م° مع التحريك (150rpm).
10.ضع 100µl كل من المزروع سابقاً في صفحتين من أل بي مع أمبيسيلين/ أي بي تي جي/ إكس – غال. للتحكم بالنقل , خفف المحتوى إلى 1:10 بالوسط المغذي سوك. إذا كان المطلوب هو عدد كبير من المجموعات , فمن الممكن تجميع الخلايا بواسطة النابذة على 1.000×g لمدة 10 دقائق , ضع المترسب في الأسفل في200 µl من الوسط المغذي سوك , و أضف 100µl من المراد طليه على كل من الصفحتين.

11.أحضن الصفحات خلال الليل (16-24 ساعة) على 37 م°. في هذه التجربة . إذا كانت كمية الطلي 100µl فإن 100 مجموعة في الصفحة ستظهر إذا تم إستخدام الخلايا المفتوحة حيث يتم وجود 1×108cfu/µg من الدنا . الحضانة الطويلة أو التخزين على 4 م° للصفحات (بعد 37 م° من الحضانة خلال الليل) قد تستعمل لتسهيل تطور اللون الأزرق . عادة المجموعات البيضاء تحتوي على الدنا المطلوب أما المجموعات الزرقاء فلا تحتوي على الدنا.
من فضلك راجع القسم (فحص تحولات الدنا المراد زيادتها : الإختيار الأول للتحولات) للمزيد من المعلومات.

Notes:

1. In our experience, the use of larger (17 × 100mm) polypropylene tubes (e.g., Falcon Cat.# 2059) has been observed to increase transformation efficiency. Tubes from some manufacturers bind DNA, thereby decreasing the colony number, and should be avoided.
2. Colonies containing β-galactosidase activity may grow poorly relative to cells lacking this activity. After overnight growth,

ملاحظات :

1.في هذه التجربة, قد لوحظ أن الإستخدام الأكبر (17* 100mm) لأنابيب عديد البروبيلان تزيد من كفاءة التحويل. أما الأنابيب من بعض المصنيعين تقلل من عدد المجموعات.
2.المجموعات التي تحتوي على الناشط بتا-غالكتوزيداز قد

the blue colonies may be smaller than the white colonies, which are approximately one millimeter in diameter.

تقلل من نسبة نمو الخلايا. بعد النمو طوال الليل, المجموعات الزرقاء ستكون أصغر من المجموعات البيضاء , بما يقارب واحد ملليمتر في القطر.

Promega recommends to transformation control. This won't be done in this course.

تنصح بروميغا بمراقبة التحول. إلا أنه لم يتم ذلك في هذه الدورة.

2.5 Screening Transformants for Inserts: Preselection of transformants (4th day) / فحص تحولات الدنا المراد زيادتها : الإختيار الأول للتحولات (اليوم الرابع)

Successful cloning of an insert into the pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vectors interrupts the coding sequence of β-galactosidase; recombinant clones can usually be identified by color screening on indicator plates. However, the characteristics of PCR products cloned into the pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vectors can significantly affect the ratio of blue:white colonies obtained following transformation of competent cells. Clones that contain PCR products, in most cases, produce white colonies, but blue colonies can result from PCR fragments that are cloned in-frame with the *lac*Z gene. Such fragments are usually a multiple of 3 base pairs long (including the 3′-A overhangs), and do not contain in-frame stop codons. There have been reports of DNA fragments of up to 2kb that have been cloned in-frame and have produced blue colonies.
Even if your PCR product is not a multiple of 3 bases long, the amplification process can introduce mutations (e.g., deletions or point mutations) that may result in blue colonies when competent cells are transformed with the fragment inserted into the pGEM®-T or pGEM®-T Easy Vectors.

The white colonies have to be verified with plasmid miniprep.

الإستنساخ الناجح للدنا الزائد على الناقل pGEM®-T and pGEM®-T Easy المنقطع تسلسل رمز بتا- غالكتوزيداز , يمكن معرفة المجموعات المؤتلفة (recombinant clones) بواسطة عرض اللون على صفحات المؤشر. و مع ذلك فإن خصائص منتج تفاعل البلمرة المتسلسل المستنسخة على الناقل pGEM®-T and pGEM®-T Easy بإستطاعته التأثير على نسبة المجموعات الزرقاء: البيضاء التي تم الحصول عليها من بعد تحولات الخلايا المختصة. في معظم حالات الاستنساخ الذي يحتوي على منتج تفاعل البلمرة المتسلسل ينتج المجموعات البيضاء , لكن اللون الأزرق يأتي نتيجة قطع تفاعل البلمرة المتسلسل الذي يتم نسخه في إطار مع جين لاك زاد (lac Z gene). هذه القطع عادة ما تكون مضاعفة لـ3bp في الطول , لكن لا يوجد رمز للتوقف في هذا الإطار. إلا أن هناك تقارير عن قطع الدنا التي إستنسخت في هذا الإطار و وصل طولها لـ2kb و أنتجت مستعمرات زرقاء. وحتى لو كان المنتج أقل من 3bp بإمكان عملية المضاعفة أن تدخل الطفرات و تنتج مستعمرات زرقاء عندما تتحول الخلايا المخصصة مع قطع الدنا الزائدة على الناقلات pGEM®-T and pGEM®-T Easy .

يجب التحقق من المجموعات البيضاء بواسطة بلازميد مينيبرب (plasmid miniprep).

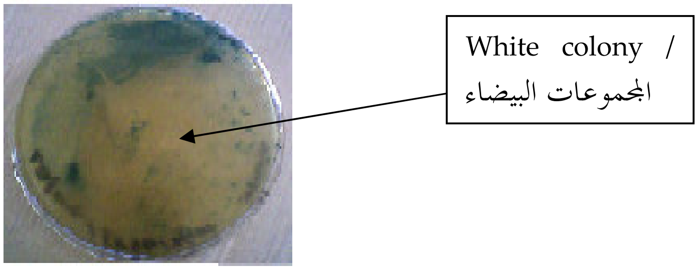


Figure 1.21. see plate 14 for color version..الشكل 1.21. أنظر الصفيحة 14 لنسخة ملونة.

2.5.1 Protocol / بروتوكول

Set up mini cultures of 4 white colonies in 2.5ml LB/Ampicilin. The cultures are incubated over night at 37°C.

حضر زراعات صغيرة من 4 مجموعات في 2.5 مل من وسط أل.بي/ أمبيسيلين. هذه الزراعات يجب أن تحضن طوال الليل على 37 م°.

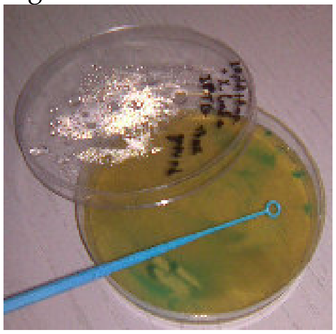


Figure 1.22: Taking E.coli with sterile soft loop see plate 15 for color version. / الشكل 1.22. أخذ مجموعات الإيكولي بحلقة لينة أنظر الصفيحة 15 لنسخة ملونة.

2.6 Isolation of recombinant plasmid from E.coli cells with Qiagen Miniprep kit (5th day) / *عزل البلازميد المؤتلف من خلايا الإيكولي مع مجموعة* **Qiagen Miniprep** *(اليوم الخامس)*

The plasmid has to be isolated from the overnight cultures

QIAprep Spin Miniprep Kit (50)	For 50 high-purity plasmid minipreps: 50 QIAprep Spin Columns, Reagents, Buffers, Collection Tubes (2 ml)	27104

هذا البلازميد يمكن عزله من المزروعات المنتجة خلال الليل .

Kit Contents

QIAprep Spin Miniprep Kit	(50)	(250)
Catalog no.	**27104**	**27106**
QIAprep Spin Columns	50	250
Buffer P1	20 ml	73 ml
Buffer P2	20 ml	73 ml
Buffer N3*	30 ml	140 ml
Buffer PB*	30 ml	150 ml
Buffer PE (concentrate)	2 x 6 ml	55 ml
Buffer EB	15 ml	55 ml
LyseBlue	20 µl	73 µl
RNase A†	200 µl	730 µl
Collection Tubes (2 ml)	50	250
Handbook	1	1

Storage: QIAprep Miniprep Kits should be stored dry at room temperature (15–25°C). Kits can be stored for up to 12 months without showing any reduction in performance and quality. For longer storage these kits can be kept at 2–8°C.

التخزين : مجموعة Qiagen Miniprep يجب أن تحفظ على درجة حرارة الغرفة (15-25م°) بإمكان هذه المجموعات أن تحفظ لمدة سنة على هذه الحرارة وتحفظ على 2-8 م° لوقت أكثر من التخرين.

If any precipitate forms in the buffers after storage at 2–8°C it should be redissolved by warming the buffers to 37°C before use. After addition of RNase A and optional LyseBlue reagent, Buffer P1 is stable for 6 months when stored at 2–8°C. RNase A stock solution can be stored for two years at room temperature.

إذا كان هناك أية ترسبات في المنظمات بعد التخزين على 2-8 م° يجب أن تذوب هذه الترسبات على 37 م° قبل الإستعمال. بعد زيادة أنزيم الرنا أي (RNase A) و العامل الملون ليز الأزرق (lyses blue) على المنظم P1 يمكناه من الإستقرار لمدة 6 أشهر على 2-8 م°. محلول أنزيم الرنا أي (RNase A) يمكن أن يخزن على درجة حرارة الغرفة لمدة سنتين.

2.6.1 Principle / المبدأ

The QIAprep miniprep procedure is based on alkaline lysis of bacterial cells followed by adsorption of DNA onto silica in the presence of high salt (1). The unique silica membrane used in QIAprep Miniprep Kits completely replaces glass or silica slurries for plasmid minipreps. The procedure consists of three basic steps:

- ■ Preparation and clearing of a bacterial lysate
- ■ Adsorption of DNA onto the QIAprep membrane
- ■ Washing and elution of plasmid DNA

All steps are performed without the use of

إجراءات Qiagen Miniprep يجب أن تتم في محيط قلوي (basic) لكسر خلايا البكتيريا ليساعد على امتصاص الدنا بوجود كمية عالية من الملح (1). غشاء سيليكا الوحيد يستخدم في مجموعة Qiagen Miniprep و بُدل تماماً مكان glass or silica slurries لبلازميد miniprep . تحتوي هذه الإجراءات على 3 مراحل أساسية:

- تحضير وتنظيف البكتيريا المنكسرة .
- إمتصاص الدنا عبر غشاء Qiaprep .
- غسل و إستخراج بلازميد الدنا.

phenol, chloroform, CsCl, ethidium bromide, and without alcohol precipitation.

Preparation and clearing of bacterial lysate

The QIAprep miniprep procedure uses the modified alkaline lysis method of Birnboim and Doly (2). Bacteria are lysed under alkaline conditions, and the lysate is subsequently neutralized and adjusted to high-salt binding conditions in one step. After lysate clearing, the sample is ready for purification on the QIAprep silica membrane.

DNA adsorption to the QIAprep membrane

QIAprep columns, strips, and plates use a silica membrane for selective adsorption of plasmid DNA in high-salt buffer and elution in low-salt buffer. The optimized buffers in the lysis procedure, combined with the unique silica membrane, ensure that only DNA will be adsorbed, while RNA, cellular proteins, and metabolites are not retained on the membrane but are found in the flow-through.

Washing and elution of plasmid DNA

Endonucleases are efficiently removed by a brief wash step with Buffer PB. This step is essential when working with endA+ strains such as the JM series, HB101 and its derivatives, or any wild-type strain, to ensure that plasmid DNA is not degraded. The Buffer PB wash step is also necessary when purifying low-copy plasmids, where large culture volumes are used. Salts are efficiently removed by a brief wash step with Buffer PE. High-quality plasmid DNA is then eluted from the QIAprep column with 50–100 µl of Buffer EB or water. The purified DNA is ready for immediate use in a range of applications — no need to precipitate, concentrate, or desalt.

Note: Elution efficiency is dependent on pH. The maximum elution efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water for elution, make sure that the pH value is within this range. Store DNA at –20°C when eluted with water since DNA may degrade in the absence of a buffering

جميع هذه المراحل أنجزت من دون إستعمال الفينول , الكلوروفورم , كلور السيزيوم , إيتيديوم بروميد, ودون ترسب الكحول.

تحضير وتنظيف البكتيريا المنكسرة .

إجراءات Qiaprep miniprep تستخدم طرق تعديل التقطيع القلوي من بيرنبويم و دولي (Birnboim,Doly) (2) البكتيربا ستقطع تحت شروط القلوية ومن ثم تعدل في مرحلة واحدة بشروط مرتبطة بكمية الأملاح المرتفعة. بعد تنظيف كسرالخلايا , العينة أصبحت جاهرة للتنقية على غشاء سيليكا Qiaprep.

إمتصاص الدنا عبر غشاء Qiaprep

عامود ,Qiaprep , الفصل , والصفحات تستخدم غشاء سيليكا لإختيار إمتصاص بلازميد الدنا في منظم أملاح مرتفع ولإزالته في منظم أملاح منخفض . لأفضل نتيجة يجب إستخدام المنطمات المثلى مع غشاء سيليكا الوحيد حيث نتأكد من إمتصاص الدنا فقط من دون الرنا , البروتينات , المواد الناشئة عن الأيضة (metabolites).

غسيل و إستخراج بلازميد الدنا.

أنزيم أندونيوكليزياز (endonucleases) يمكن إزالته باختصار بغسله بمنظم PB. هذه المرحلة مهمة عند العمل بخلايا JM و مشتقاته, للتأكد من أن بلازميد الدنا لن يتدمر. وهذا المنظم ضروري أيضاً لتنقية نسخة متدينة من البلازميد , حيث تم إستخدام حجم كبير من الزراعة. مع هذا المنظم سيزول الملح تماماً و سيتم إستخراج نوعية عالية من البلازميد و الدنا المتنقي جاهز للتطبيق الفوري.

ملاحظة : كفاءة الإستخراج متعلقة بدرجة الحموضة ما بين 7.0-8.5 . وتأكد تماماً من أن درجة الحموضة هي ضمن نطاقها عند إستخدام الماء. خزن الدنا على 20- م° وعند إستحدام الماء يجب زيادة عامل منظم لتجنب تدمير الدنا.

agent.

DNA yield

Plasmid yield with the QIAprep miniprep system varies depending on plasmid copy number per cell (see page 39), the individual insert in a plasmid, factors that affect growth of the bacterial culture (see pages 39–42), the elution volume (Figure 1), and the elution incubation time (Figure 2). A 1.5 ml overnight culture can yield from 5 to 15 µg of plasmid DNA (Qiagen Miniprep Handbook, Table 1, page 14). To obtain the optimum combination of DNA quality, yield, and concentration, we recommend using Luria-Bertani (LB) medium for growth of cultures (for composition see Qiagen Miniprep Handbook,page 41), eluting plasmid DNA in a volume of 50 µl, and performing a short incubation after addition of the elution buffer.

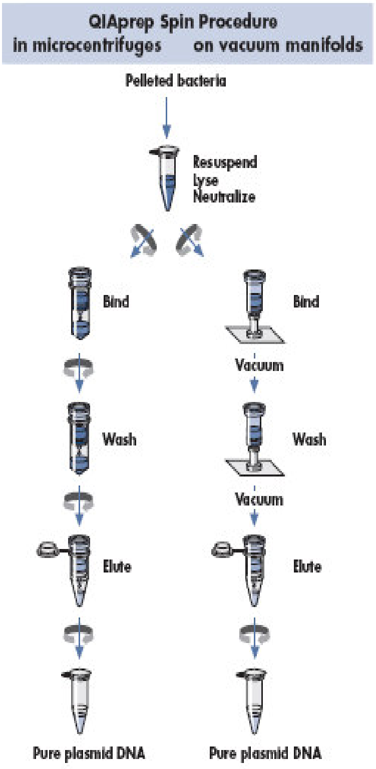
كمية الدنا

كمية البلازميد مع نظام Qiaprep minprep المتغير يتعلق بعدد البلازميد المنسخ في الخلية (أنظر صفحة 39), والدنا الفردي الزائد على البلازميد , العوامل التي تؤثر على نمو البكتيريا المزروعة (أنظر صفحة 39-42) , الحجم المستخرج (الشكل 1) , وقت حضانة المستخرج (الشكل 2). 1.5مل من المزروع خلال الليل يمكن أن تكون كميته من 5 إلى 15µg من دنا البلازميد (Qiagen Miniprep Handbook, Table 1, page 14). للحصول على إتحاد في كمية و نوعية و تركيز الدنا يجب إستخدام الوسط المغذي أل.بي (for composition see Qiagen Miniprep Handbook,page 41) لإستخراج دنا البلازميد في حجم 50µl يتطلب إحتضانه قبل زيادة منظم الإستخراج.

2.6.2 Protocol / البروتوكول

In the following text is described the Plasmid DNA Purification using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge. This protocol is designed for purification of up to 20 µg of high-copy plasmid DNA from 1–5 ml overnight cultures of E. coli in LB (Luria-Bertani) medium. For purification of low-copy plasmids and cosmids, large plasmids (>10 kb), and DNA

لقد تم الشرح بالتفصيل عن عملية تنقية البلازميد بواسطة Qiprep spin,Miniprep kit, وأنبوب النابذة. هذا البروتوكول يعمل على تنقية 20µl من البلازميد من 1.5ml من الإيكولي المزروعة طوال الليل في الوسط المغذي أل.بي. أما لتنقية عدد نسخ أكثر من 10kb يجب مراجعة



prepared using other methods, refer to the recommendations on Qiagen Miniprep Handbook, page 44. Please read "Important Notes" of Qiagen Miniprep Handbook, pages 15–21 before starting. Note: All protocol steps should be carried out at room temperatur

بروتوكول آخر في كتيب Qiagen Miniprep . من فضلك إقرأ الملاحظات الهامة في هذا الكتيب قبل البدء في صفحة 15-21 . ملاحظة: جميع مراحل هذا البروتوكول تتم على درجة حرارة الغرفة.

Procedure / الإجراءات

1.Resuspend pelleted bacterial cells in 250 µl Buffer P1 and transfer to a microcentrifuge tube.

Ensure that RNase A has been added to Buffer P1. No cell clumps should be visible after resuspension of the pellet. If LyseBlue reagent has been added to Buffer P1, vigorously shake the buffer bottle to ensure LyseBlue particles are completely dissolved. The bacteria should be resuspended completely by vortexing or pipetting up and down until no cell clumps remain.

2. Add 250 µl Buffer P2 and mix thoroughly by inverting the tube 4–6 times.

Mix gently by inverting the tube. Do not vortex, as this will result in shearing of genomic DNA. If necessary, continue inverting the tube until the solution becomes viscous and slightly clear. Do not allow the lysis reaction to proceed for more than 5 min. If LyseBlue has been added to Buffer P1 the cell suspension will turn blue after addition of Buffer P2. Mixing should result in a homogeneously colored suspension. If the

1.ضع خلايا البكتيريا المترسبة في منظم P1 ثم أنقله إلى أنبوب نابذة صغير.

تأكد من أن المنظم P1 أُضيف إليه أنزيم الرنا آي (RNaseA). و أنه لا يوجد كتل خلايا بعد الترسب. إذا تم إضافة العامل الملون ليز الأزرق على المنظم P1 فيجب خلطه جيداً إلى أن يذوب بالكامل. يجب أن تترسب البكتيريا بالكامل بواسطة الخلط بالدوامة أو الممصة لكي لا يبقى أية كتل من الخلايا.

2.أضف 250µL من المنظم P2 و اخلطه جيداً في الأنبوب من 4-6 مرات .

الخلط بنعومة من خلال قلب الأنبوب بنعومة وليس بالدوامة وتستمر هذه الطريقة من التحريك إلى أن يصبح المحلول صافياً إلاّ أنه يجب الإنتباه إلى منع التفاعل من التقطع إذا تمت هذه العملية لأكثر من 5 دقائق, أما إذا تم وضع الملون الأزرق في المنظم P1 فسيتحول لونه إلى

suspension contains localized colorless regions or if brownish cell clumps are still visible, continue mixing the solution until a homogeneously colored suspension is achieved.

3. Add 350 µl Buffer N3 and mix immediately and thoroughly by inverting the tube 4–6 times.

To avoid localized precipitation, mix the solution thoroughly, immediately after addition of Buffer N3. Large culture volumes (e.g. ≥5 ml) may require inverting up to 10 times. The solution should become cloudy. If LyseBlue reagent has been used, the suspension should be mixed until all trace of blue has gone and the suspension is colorless. A homogeneous colorless suspension indicates that the SDS has been effectively precipitated.

4. Centrifuge for 10 min at 13,000 rpm (~17,900 x g) in a table-top microcentrifuge.

A compact white pellet will form.

5. Apply the supernatants from step 4 to the QIAprep spin column by decanting or pipetting.

6. Centrifuge for 30–60 s. Discard the flow-through.

7. Recommended: Wash the QIAprep spin column by adding 0.5 ml Buffer PB and centrifuging for 30–60 s. Discard the flow-through.

This step is necessary to remove trace nuclease activity when using endA+ strains such as the JM series, HB101 and its derivatives, or any wild-type strain, which have high levels of nuclease activity or high carbohydrate content. Host strains such as XL-1 Blue and DH5®™ do not require this additional wash step.

8. Wash QIAprep spin column by adding 0.75 ml Buffer PE and centrifuging for 30–60 s.

9. Discard the flow-through, and centrifuge for an additional 1 min to remove residual wash buffer.

Important: Residual wash buffer will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation. Residual ethanol from Buffer PE may inhibit subsequent enzymatic

الأزرق بعد زيادة المنظم P2. لذلك يجب خلطه جيداً ليصبح مزيجاً ذو طبقة واحدة واللون الأزرق فقط هو الظاهر.

3.أضف 350µl من المنظم N3 وأخلطه فوراً وجيداً من خلال قلب الأنبوب من 4-6 مرات.

أخلط بقوة لمنع ترسب المحلول وكذلك مباشرةً بعد إضافة المنظم N3. أما الأحجام الكبيرة تتطلب خلط لأكثر من 10 دقائق إلى أن يصبح المحلول غائماً. إذا تم إستخدام الملون الأزرق يجب الخلط إلى أن يختفي ويصبح التعليق من دون لون.

4.أنبذ لمدة 10 دقائق على سرعة 13.000rpm (17.900×g) في النابذة .

سيتكون عندئذ ترسب أبيض مضغوط.

5.ضع السائل المنتج من المرحلة 4 في عامود دوران Qiaprep بواسطة الصب (decanting) أو بواسطة عملية التمصيص(pipetting).

6.أنبذ لمدة 30-60 ثانية, ثم إرمي السائل.

7.نصيحة: إغسل عامود الدوران Qiaprerp بواسطة 0.5ml من منظم PB ثم أنبذ لمدة 30-60 ثانية. وإرمي السائل.

هذه المرحلة ضرورية لإزالة جميع بقايا النيوكلياز الناشط عند إستخدام سلالة نهايتها A+ من سلسلة JM و HB101 و توابعهما أو نوع أخر يملك مستويات عالية من النيوكلياز الناشط أو الكاربوهيدرات. السلالات المضيفة لا تتطلب هذه المرحلة من الغسل.

8.أغسل عامود الدوران Qiaprep بواسطة 0.75ml من المنظم PE ثم أنبذه لمدة 30-60 ثانية.

9.إرمي السائل ثم أنبذ من جديد لدقيقة واحدة لإزالة ما تبقى من منظم الغسل .

هام: بقايا منظم الغسل لن تزول بالكامل من أول عملية

reactions.

10. Place the QIAprep column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. To elute DNA, add 50 µl Buffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) or water to the center of each QIAprep spin column, let stand for 1 min, and centrifuge for 1 min.

نبذ و بالتالي فإن الإيتانول الموجود في المنظم PE ممكن أن يوقف عملية التفاعل الأنزيمي اللاحقة.

10.ضع عامود Qiaprep في أنبوب نابذة جديد حجمه 1.5ml . ثم لإزالة الدنا اضف 50µl من منظم EB (10 Mm Tris Cl, PH 8.0) أو ماء في نصف كل عامود دوران Qiaprep ثم أتركه لدقيقة واحدة ثم أنبذه أيضاً لدقيقة.

2.7 Restriction digestion: cutting out the recombinant DNA (SRY gene) from plasmid and visualization on agarose gel (5th day) / قطع الدنا المؤتلف : عملية هضم الإقتطاع SRY gene من البلازميد و رؤيته على الهلام (اليوم الخامس).

With the restriction digest we want to confirm the a proper DNA fragment has been cloned into the plasmid vector.

On both sides of the insertion site of pGEM-T Easy is a EcoRI interface, that means that the insert could be cut completely out of the plasmid with EcoRI digest.

بواسطة إنزيم الإقتطاع نريد أن نتأكد من أن قطع الدنا تم نسخها في الناقل البلازميدي.

في كلا الجهتين من مواقع الزيادة من pGEM-T Easy is a EcoRI وهذا يعني أنه من الممكن قطعه بالكامل من البلازميد بواسطة أنزيم الهضم EcoRI .

2.7.1 Protocol / البرتوكول

1.Set up restriction digest and incubate for at least 1 hour at 37°C.

Restriction digest set up:
1µl Plasmid DNA
2µl 10xBuffer
0.2µl EcoRI
<u>16.8 µl H2O (ad 20 µl with H2O)</u>
20µl

2.After 1 hour of digestion 2 µl probe buffer is added and the whole probe is put onto a 1% agarose gel. Also add a DNA ladder into another column to be able to identify the largeness of analysed DNA molecule. There should be a DNA with 897bp.

1.تجهيز أنزيم القطع و احتضانه لمدة ساعة على 37 م°.

تجهيز هضم الإقتطاع كا
1µL من دنا البلازميد
2 µL من 10× المنظم
0.2 µL من EcoRI .
16.8µL من الماء
الحجم النهائي 20µL.

2.بعد ساعة من عملية الهضم أضف 2µL من المنظم و ضعه بالكامل على الهلام الاغاروزي مع سلم الدنا لمعرفة وتحليل الدنا الجزيئي. يجب أن يكون الدنا حوالي 897bp.

II. Detection of Swine Flu virus (H1N1) by nested PCR / الكشف عن فيروس إنفلونزا الخنازير من خلال تفاعل البلمرة المتسلسل المزدوج

2 days training course for researchers and technical staff

التدريب لمدة يومين للباحثين والتقنيين

Authors: Samir Mourad, Raghid AlHaj

Overview /نظرة عامة

This chapter describes the techniques necessary to undergo the diagnosis test.

هذا الباب يصف التقنيات الضرورية الخاضعة للفحص التشخيصي.

3 Introduction / المقدمة

There are two tests for the new influenza virus (causing the «swine influenza»):

- Fast antibody test
- Genetic (PCR) test

The fast antibody test is not reliable, because is has a failing rate of about 50%.

The Genetic (PCR) test is today done with a real time (RT) PCR machine. This machine costs at least about 40.000 USD. Here is no Gel electrophoresis needed.

If no RT PCR machine is available, but only a PCR machine, the test could be done by nested PCR.

The key to successful purification of RNA from cells and tissues is speed . Cellular Rnases should be inactivated as quickly as possible at the verry first stage in the extraction process . Once the endogenous Rnases have been destroyed , the immediate threat to the intergrity of the RNA is greatly reduced , and purification can proceed at a more graceful pace.

Because of the urgency ,many methods for the isolation of the intact RNA from cells use strong denaturants such as guanidinium hydrochloride or guanidinium thiocyanate to disprut cells , solubilize their components, and denature endogenous Rnases simultaneously. The use of guanidinium isocyanate in RNA extraction, first mentioned briefly by Ullrich et al.1977 , was documentd in papers published by Han et al. 1987 and Chirgwin et al . 1979. The Han method is labrious as it involves solubilization of RNA pellets in progressivley smaller volumes of 5 M guanidinium thiocyanate.In the Chirgwin method, cultured cells or tissues are homogenized in 4 M guanidium isothiocyanate,and the

هناك نوعين من الفحوصات لفيروس الإنفلونزا.

- فحص سريع للأجسام المضادة.
- فحص الوراثة (PCR).

الفحص السريع للأجسام المضادة ليس مضمون, لأنه يملك نسبة فشل بمعدل 50% .أمّا فحص الوراثة يقام اليوم بواسطة آلة تفاعل البلمرة المتسلسل (real time PCR). ثمن هذه الآلة حوالي 40.000 دولار أميركي. وهنا لا نحتاج لآلة الفصل الكهربائي للهلام (gel electerophoresis).

إذا كانت آلة real time PCR غير متوفرة, ولكن آلة PCR وحدها متوفرة, يمكن أن يتم الإختبار من قبل nested PCR .

المفتاح لنجاح تنقية الحمض النووي الريبي (RNA) من الخلايا والأنسجة سريع. وينبغي تعطيل أنزيم الحمض النووي الريبي للخلية(Rnases) بسرعة في المرحلة الأولى من عملية الإستخراج. أنزيم الحمض النووي الريبي (Rnases) يتدمر , و التهديد المباشر للحمض النووي الريبي (RNA) يتقلص بشكل كبير , وعملية التنقية تتتابع بشكل سليم.

بسبب الحاجة الضرورية. العديد من الطرق لعزل الرنا من الخلايا تستخدم تغير طبيعة الخلايا بشكل قوي مثل هيدروكلوريد الغوانيديوم أو إيزوسينات الغوانيديوم لتمزيق الخلايا, تذويب مكوناتهم, وتغير طبيعة أنزيم الرنا الغريب في وقت واحد. إستخدام إيزوسينات الغوانيديوم في إستخراج الرنا, ذُكر في المرة الأولى بواسطة Ullrich et al.1977 , ونشر في صحيفة Han et al.1987 و في صحيفة Chirguin et al.1979

طريقة هان (Han) في المختبر تنطوي على تذويب حبيبات الرنا (RNA) تدريجياً في حجم صغير من 5M الغويانيديوم تيوسيانات. وفي طريقة شرغوين (Chirgwin) زراعة الخلايا أو الأنسجة هي متجانسة في 4M من الغويانيديوم

إيزوتيوسيانات,و التقطيع إنفصل إلى طبقات على وسادة كثيفة من كلور السيزيوم.

بما أن كثافة الرنا العائمة في (1.8g/ml CsCl) هي أفضل بكثير من مكونات الخلايا الأخرى , فالرنا الريبوزومي و الرنا الرسائلي يسقطان في أسفل الأنبوب خلال النبذ (كليزين في 1974). ما دامت مرحلة التدرجات ليست منحدرة فالبروتيينات تبقى في قطع الغوانيديوم خلال طوفان الدنا في وسادة كلورالسيزيوم. وبما أن طريقة شرغوين تنتج نوعية عالية و منقاة من الرنا و هي ليست عمل/مكثف, أصبحت التقنية الأساسية في سنة 1980 لعزل أصناف متنوعة من جزيئيات الرنا. ومع ذلك تملك هذه الطريقة ضعفاً واحداً, لأنها غير مستقرة في معالجة عينات عديدة. بسبب هذه النتيجة, إستبدلت بالكامل هذه الطريقة وتم إستخدام تقنية المرحلة الفردية ل: Chomczynsky و Sacchiفي سنة 1987. حيث أن الإيزوسينات الغوانييديوم المتجانس إستخرج من الفينول-الكلوروفورم اللذان أضعفا درجة الحموضة. إستبعاد مرحلة النبذ تسمح لعينات عديدة من أن تعالج بسرعة وفي كلفة معتدلة و دون خسارة في كمية أو نوعية الرنا. العديد من المحقيقين, وصفوا تقنية المرحلة الفردية في البروتوكول 1 وأبقوها هي الإختيار لعزل الرنا من الخلايا المزروعة و من أنسجة معظم الحيونات.

يوجد حدثين في إجراء المرحلة-الفردية وهما غير مقبولين. الإجراء الأول لا يستخرج الرنا بفعالية من الأنسجة الدهنية الحيوانية الغنية بالتريغليسيريد. أفضل تحضير للرنا من المصادر الدهنية هو بواسطة تعديل طريقة شيرغوين و أل. الموصوفة من

lysate is layered onto a dense cushion of CsCl . Because the buoyant density of RNA in CsCl (1.8 g/ml) is mush greater than that of other cellular components,rRNAs and mRNAs migrate to the bottom of the tube during ultracentrifugation (Glisin et al. 1974). As long as the step gradients are not overloaded, proteins remain in the guanidium lysate while DAN floats on the CsCl cushion. Because the Chirgwin method yields RNA of very high quality and purity and is not labor/intensive, it became the standard technique during the early 1980s for isolation of undergraded high molecular weight RNA . However, the method has one weakness; IT is unsuitable for simltaneous processing of many samples. For this purpose, it has been almost completely displaced by the single step technique of Chomczynski and Sacchi (1987), in which the guanidinium thiocyanate homogenate is extracted of with phenol;chloroform at reduced PH. Elimination of the ultracentrifugation step allows many samples to be processe simultaneously and speedily at modest cost and without sacrifice in yield or quality of RNA. For many investigatorse, the single step technique described in protocol 1 remains the method of choice to isolate RNA from cultured cells and most animal tissues.

There are two circumstances in which single-step procedure is not recommended. First , the procedure does not extract RNA efficiently from adipose tissues that are rich in triglycerides. RNA is best prepared from these fatty sources by a modification of the method of Chirgwin et al. , described by Tavangar et al . Second, RNA prepared by guanidine lysis is sometimes contaminated to a

significant extent by cellular polysaccharides and proteoglycans . These contaminant are reported to prevent solubilization of RNA after precipitation with alcohols , to inhibit Reverse-transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCRs), and to bind to membranes during RNA blotting . If contamination by proteoglycans appears to be a problem , include an organic extraction step and change the condition used to precipitate the RNA .

The yield of total RNA depends on the tissue or cell source, but it is generally in the range of 4-7μg/mg of starting tissue or 5-10 μg/10^6 cells.

خلال تفانغار و أل. أما الإجراء الثاني: تحضير الرنا بواسطة قطع الغوانيدبيوم هو في بعض الأحيان يتلوث لمتداد مهم بواسطة بوليسكريد الخلايا و البروتيوغليكان. هذا التلوث جهز لمنع تذويب الرنا بعد ترسبه بالألكول, لتوقيف تفاعل تسلسل أنزيم Reverse trancriptase polymerase, ولوصل الغشاء خلال تفشي الرنا. إذا ظهر تلوث من البروتيوغليكان يكون هناك مشكلة, تدخل في مرحلة إستخراج الأعضاء و تغير الشروط المستعملة لترسيب الرنا.

تتعلق كمية الرنا الكاملة بالأنسجة أو بمصدر الخلية, ولكن هو عادةً يتراوح بين 4-7μg من الأنسجة البدائية أو بين 5- 10μg من الخلايا.

4 Purification of RNA from tissues / تنقية الرنا من الأنسجة

This protocol describes a single-step for the purification of RNA. Cells are homogenized in guanidinium thiocyanate and the RNA is purified from the lysate by extraction with phenol-chloroform at reduced PH. This method allows many samples to be processed simultaneously and quickly.The yield of total RNA depends on the tissue or cell source and is generally in the range of 4-7μg per ml starting tissue or 5-10μg per 10^6cells.All reagents used in this protocol must be prepared with diethyl pyrocarbonate(DEPC)-treated H_2O.

هذا البروتوكول يصف مرحلة واحدة من تنقية الرنا. الخلايا المتجانسة في الغوانيديوم تيوسيانات و الرنا المتنقية من lysate باستخراجها مع الفنول كلوروفورم تقلل من درجة الحموضة . هذه الطريقة تسمح للعديد من العينات بأن تتقدم في وقت واحد وبسرعة. كمية من مجموع الرنا العالق على الأنسجة أو على مصدر خلية و عادةً في صف من 4-7 ميكرو غرام \مل من بدء الأنسجة أو 5-10 ميكرو غرام \$10^6$ من الخلايا . جميع العوامل التي تستعمل في هذا البروتوكول يجب أن تحضر مع الديإتيل بيروكاربونات (diethylpyrocarbonate(DEPC) في الماء.

Procedure:

الإجراءات

1.Prepare cells or tissue samples for isolation of RNA as appropriate for the material under study. Consult the table below for the amounts of the solution D (4 M guanidinium thiocyanate , 25 mM sodium citrate-$2H_2O$,0.5% (wt/vol) sodium lauryl sarcosinate, 0.1 M 2-mercaptoethanol) required for different types of samples.

1.جهز الخلايا او عينات من الأنسجة لعزل الرنا الذي هو تقريباً المادة الموضوعة تحت الدراسة. نتيجة الجدول التالي لكمية محلول الدي(solution D) [4M من الغوانيديوم تيوسيانات, 25mM من الصوديوم$2H_2O$ – (0.5% (wt/vol)) من الصوديوم لوريل ساركوزينات () ,(0.1 M 2-mercaptoethanol)] المطلوبة لعدة أنواع من العينات.

Amount of tissue or cells / Amount of solution D	
.100mg of tissue	3 ml
75ml(1-75)flask of cells	3 ml
60mm plate of cells	1ml
90mm plate of cells	2 ml

كمية الأنسجة أو الخلايا./.كمية محلول الدي

100ملغ من الخلايا ....3مل.

75مل (1-75)قارورة للخلايا .....3مل.

60مم علبة للخلايا ....1مل.

90مم علبة للخلايا ....2مل.

For tissues:

A-Isolate the desired tissues by dissection and place them immediately in liquid nitrogen.

B-Transfer100 mg of the frozen tissue to a mortar containing liquid nitrogen and pulverize the tissue using a pestle. Keep the tissue frozen by the addition of liquid nitrogen.

C- Transfer the powdered tissue to a

للخلايا

A-إعزل الأنسجة المطلوبة بتشريحها و وضعها مباشرة في السائل النيتروجيني.

B-أنقل 100ملغ من الخلايا المتجمدة إلى ملاط (mortar)

polproylene snap-cap tube containing 3 ml of solution D and homogenized at 15-25 °C for 15-30 s with a polytron homogenizer(kinematica).

<u>For mammalian cells grown in suspension:</u>

A-Harvest the cells by centrifugation at 200-1900g at 15-25 °C for 5-10 min.Resuspend the cells in 1-2 ml of sterile ice-cold PBS (137mM Nacl,2.7mM Kcl, 10mM Na_2HPO_4 , 2mM KH_2PO_4).

B-Harvest the cells again by centrifugation , remove the PBS completely by aspiration and add 2 ml of solution D per 10+ cells.

C-Homogenize the lysates with a Polytron homogenizer at 15-25 °C for 15-30 s.

<u>For mammalian cells grown in monolayers:</u>

A-remove the medium and rinse the cells once with 5-10 ml of sterile ice-cold PBS.

B-remove PBSand lyse the cells in 2ml of solution D per 90mm culture dish (1ml per 60mm dish).Transfer the lysates to a polypropylene snap-cap tube.

C-Homogenize the lysates with a polytron homogenizer at 15-25 °C for 15-30 s.

2-Transfer the homogenate to a fresh tube and sequentially add 0.1ml of 2 M sodium acetate(PH 4.0),1 ml of phenol and 0.2 ml of 49:1(wt/vol) chloroform/ isoamyl per millilitre of solution D. After addition of each reagent ,cap the tube and mix the contents thoroughly by inversion.

3-Vortex the homogenate vigorously for 10 s. Incubate the tube for 15 min on ice.

4-Centifuge the tube at 10,000 g at 4 °C for 20 min and then transfer the

يحتوي على السائل النيتروجيني ثم إطحن الخلايا باستعمال المدقة. حافظ على الخلايا مثلجة بزيادة السائل النيتروجيني .

C-أنقل بودرة الخلايا إلى أنبوب البولبرويلين snap cap يحتوي على 3مل من محلول الدي ثم إجعله متجانساً على 15-25 م° لمدة 15-30 ثانية مع البوليترون المتجانس(kinematica)

<u>لنمو خلايا الثديات في التعليق</u>

A-أحصد الخلايا من خلال النابذة على 200-1900g على 15-25 م° لمدة 5-10 دقائق. ضع الخلايا الموجودة في الأسفل في 1-2 مل من محلول PBS المثلج_البارد المعقم (137mM من كلورور الصوديوم, 2.7mM من فوسفات الصوديوم, 2mM من فوسفات الكالسيوم).

B-أحصد الخلايا مجدداً بالنابذة, ثم أزل محلول PBS كاملاً بواسطة الشفط ثم أضف 2مل من محلول الدي \10+الخلايا.

C-جانس الليزات (lysate) مع البوليترون المتجانس على 5-25 م° لمدة 15-30 ثانية.

<u>نمو خلايا الثديات في طبقة الخلايا الواحدة :</u>

A-إزالة الخلايا من الوسط و غسلها مرة واحدة في 5-10مل من محلول PBS البارد_المثلج المعقم.

B-إزالة PBS وlyse الخلايا في 2 مل من محلول الدي في 90ملم من علبة الزراعة (1مل \60ملم من العلبة).أنقل lysate إلى البوليبروبيلين أنبوب.snap-cap .

C- جانس الليزات (lysate) مع البوليترون المتجانس على 5-25 م° لمدة 15-30 ثانية.

2-أنقل المتجانس إلى أنبوب طازج و بشكل متسلسل أضف 0.1مل من 2M أسيتات الصوديوم (درجة الحموضة:4.0)(PH:4.0), 1مل من الفينول و 0.2مل من 49:1(wt/vol) الكلوروفورم\إيزوأميل (isoamyl) في مل من محلول الدي. بعد زيادة كل عامل, ضع الغطاء على الأنبوب و أخلط المحتوى تماماً.

3-أخلط المزيج بقوة لمدة 10 ثواني . أحضن الأنبوب لمدة 15 دقيقة في الثلج.

4-أنبذ الأنبوب على سرعة 10.000g على 4 م° لمدة 20 دقيقة ثم أنقل السائل الذي في الأعلى و الذي يحتوي على الرنا المستخرج إلى أنبوب آخر جديد.

5-أضف نصف حجم الإيزوبروبانول إلى الرنا المستخرج. أخلط المحلول جيداً و اترك الرنا ليتجمع في الأسفل على 20c°- لأقل من ساعة تقريباً.

6-إجمع الرنا بالنابذة على سرعة 10.000g على م° لمدة 30 دقيقة.

6-إفصل بحذر الإيزوبروبانول و ذوّب حبيبات الرنا في 0.3مل من محلول الدي لكل 1مل من المحلول المستعمل في المرحلة الأولى.

7-أنقل المحلول إلى أنبوب النابذة, أخلط جيداً و جمّع الرنا في الأسفل مع 1 من حجم الإيزوبروبانول على ° 20c- لمدة ساعة أو أكثر .

8-إجمع المترقد من الرنا بالنابذة على أقصى سرعة على 4م° لمدة 10 دقائق في النابذة. إغسل الحبيبات مرتين في 75% من الكحول, ثم أعد النبذ ثم أزل جميع فضلات الكحول بواسطة الماصة (pipette tip). أترك الحبيبات في الهواء الجاف لبضع دقائق قبل تذويتها في 50-100 ميكرو ليتر من DEPC-treated H_2O ثم خزنها على 70 °C-.

9-قدّر تركيز الرنا بقياس الإمتصاص على 260nm من نتيجة القسمة الصحيحة من التحضير النهائي.

الرنا المنقى ليس لديه مانع أن ينقسم بأنزيم الرنا بعد إعادة تعليقه في 0.5% من محلول الكبريات دوديكل الصوديوم (SDS). لذلك يفضل بعض المحققون تذويب حبيبات الرنا في 50-100ميكرو ليتر من الفورماميد المستقر و تخزينه على 20%-. تستطيع أن تحمي الرنا من الفورماميد من خلال تجمعيه في الأسفل مع 4 من حجم الإيتانول. للمزيد من التفاصيل, من فضلك إقرأ لوحة

upper,aqueous phase containing the extracted RNA to a fresh tube.

5-Add an equal volume of isopropanol to the extracted RNA.Mix the solution well and allow the RNA to precipate at -20 °C for at least 1 h.

6-Collect the precipitated RNA by centrifugation at 10.000g at °C for 30 min.

7-Carefully decant the isopropanol and dissolve the RNApellet in 0.3 ml of solution D for every 1ml of this solution used in step 1.

8-Transfer the solution to a microcentifuge tube, vortex it well and precipate the RNAwith 1 volume of isopropanol at -20 °C for 1 h or more.

Collect the precipitated RNA by centrifugation at maximum speed at 4 °C for 10 min in a microcentrifuge. Wash the pellet twice with 75%ethanol,centrifugeagain and remove any remaining ethanol with a disposable pipette tip.Allow the pellet to air dry for a few minutes before dissolving it in 50-100µl of DEPC-treated H_2O and storing at -70 °C.

9-Estimate the concentration of the RNA by measuring the absorbance at 260 nm of an aliquot of the final preparation.

Purifed RNA is not immune to degradation by RNase after resuspension in the 0.5%SDSsolution.Some investigators therefore prefer to dissolve the pellet of RNA in 50-100 µl of stabilized formamide and store the solution at -20 °C. RNA can be recevored from formamide by precipitation with 4 volumes of ethnol. For further details ,please see the panel on STORAGE OF RNA.

SDS should be removed by chloroform extraction and ethanol precipitation before enzymatic treatment of the

RNA(e.g, primer extension,reverse transcriptase, and in vitro translation). The redissolved RNA can then be used for mRNA purification by oligo (dT)-cellulose chromatography or analysed by standard techniques such as blot hybridization or mapping.

RNA prepared from tissues is generally not contamined to a significant extene with DNA. However,RNA prepared from cell lines undergoing spontaneous or induced apoptosis is often contaminated with fragments of degraded genomic DNA,RNAprepared from transfected cells is almost always contaminated by fragments of the RNA used for transfection.Some investigators therefore treat the final RNA preparation with RNase-free DNase .Alternatively, fragments of DNA may be removed by preparing poly(A)^ RNA by oligo(dT)chromatography.

تخزين الرنا.

الكبريات دوديكل الصوديوم (SDS) يجب إزالته بواسطة الكلوروفورم المستخرج و الإيتانول المتجمع في الأسفل قبل العلاج الإنزيمي للرنا (مثل : primer extension,reverse transcriptase, and in vitro translation) إعادة تذويب الرنا يمكن أن يستعمل في الرنا الرسائلي (RNAm) المنقى بواسطة oligo (dt) –cellulose chromatographie أو بتحليله عبر تقنية سائدة مثل لطخة من التهجين أو وضع خريطة.

الرنا المحضر من الأنسجة هو عادةً غير ملوث وذو إمتداد هام مع الدنا (DNA). ومع ذلك الرنا المحضر من خط الخلايا يمر تلقائياً أو يموت لأنه غالباً ما يكون ملوثاً بقطع الدنا المنقسمة, الدنا و الرنا المحضرين من الخلايا التعدائية تقريباً دائماً تكون غير ملوثة بقطع الرنا المستعملة للتعداء (التعداء : هو عملية إدخال مراد جيني للخلية عن طريق إحداث ثغرات في الغشاء البلازمي للخلية).لذلك عالج بعض المحققون الرنا المحضر في النهاية بأنزيم الرنا (RNase) الخالي من أنزيم الدنا (DNase). أو بدلاً من ذلك, قطع الدنا يمكن إزالتها بتحضير poly(A)^ RNA by .oligo(dT)chromatography

4.1 STORAGE OF RNA / *تخزين الرنا*

After precipitation with ethanol,store the RNAas follows:

• Dissolve the precipate in deionized and store at -20 °C. Formamide provides a chemically stable environment that also protects RNA against degradations by RNases. Purified, salt-free RNA dissolves quickly in formamide up to a concentration of 4 mg/ml. At such concentrations, samples of the RNA can be analysed directly by gel electrophoresis, RT-PCR, or RNase protection, saving time and avoiding potential degradation. If necessary , RNA can be recovered from formamide by precipitation with 4 volumes of ethanol as described by Chomczynski or by diluting the formamide fourfold with 0.2 M NaCl

بعد تجميع الرنا بالإيتانول ,خزن الرنا كما يلي:

-.ذوب المتجمع من الرنا في الدي إيونايزد و خزنه على - 20°C. يزود الفورماميد محيط مستقر كيميائياً ليحمي الرنا أيضاً من تقطيعها بواسطة أنزيم الرنا (RNases). التنقية, عدم وجود الملح في الرنا يساعدها على الذوبان بسرعة في الفورماميد على معدل تركيز أعلى من 4ملغ\مل. في هذا التركيز, العينات من الرنا يمكن تحليلها مباشرةً على آلة الفصل الكهربائي للهلام (gel electrophoresis), RT-PCR , أو حماية أنزيم الرنا (RNase) , يوفر الوقت و يجنب من تقطيع محتمل. إذا لزم الأمر, الرنا يمكن حمايته من الفورماميد من خلال تجمعيه في الأسفل مع 4 من حجم الإيتانول الموصوف

ب chomczynski أو بواسطة تخفيف الفورماميد أربعة مرات في 0.2M من كلورور الصوديوم(NaCl) ثم إضافة 2 من حجم الإيتانول.

- ذوّب المتجمع من الرنا في منظم مائي على 80°c-. المنظم الشائع إستعماله في هذا العمل يشمل الكبريات دوديكل الصوديوم (SDS) (0.1-0.5%) in TE (PH 7.6)or in DEPC-treated H_2O containing 0.1 mM EDTA (PH 7.5). هذا SDSيجب إزالته بالكلوروفورم المستخرج و الإيتانول المتجمع في الأسفل قبل العلاج الإنزيمي للرنا.

تخزين المتجمع من الرنا كالتعليق على 20°c- في الإيتانول . العينات من الرنا يمكن إزالتها, حسب الحاجة, بواسطة ممصة أوتوماتيكية. ومع ذلك, لأن الرنا المترسب متقطع و لزج و متجزئ بسبب الخسارة على سطح الممصة, فإن إعادة تجميعه عير منظمة.

and then adding the conventional 2 volumes of ethanol.

• Dissolve the precipitate in an aqueous buffer and store at -80 °C. Buffers commonly used for this purpose include SDS (0.1-0.5%) in TE (PH 7.6)or in DEPC-treated H_2O containing 0.1 mM EDTA (PH 7.5). The SDS should be removed by chloroform extraction and ethanol precipitation before enzymatic treatment of the RNA (e.g, primer extension, reverse transcription, and in vitro translation).

• Store the precipate of RNA as a suspension at -20 °C in ethanol. Samples of the RNA can be removed , as needed , with an automatic pipetting device. However , because precipitates of RNA are lumpy and sticky , and partly because of losses onto the surfaces of disposable pipette tips , the recovery of RNA is inconsistent.

بروتوكول بديل مأخوذ من:

http://nar.oxfordjournals.org/cgi/pdf_extract/19/14/4011; *A Rapid membrane-based viral RNA isolation method for the polymerase chain reaction*, Kevin R.Porter et.al., Naval Medical Research Institute, Bethesda, MD and the Walter Reed Army institute for Research, Washington, DC, USA

الطرق المستخدمة لتحضير الرنا لإستخدامه في الPCR تتطلب عادة إستعمال مواد كيميائية عشوائية كالغوانيديم إيزوتيوسينات , الكلوروفورم و الفينول.

هنا نصف طريقة الغشاء-الأساسي السريعة لعزل الRNA عن الفيروسات الموجودة في المصل. ضمن هذا النظام جميع أجزاء الفيرس الموجودة في المصل تثبت على الغشاء بواسطة عملية التصفية المضغوطة إيجابياً. هضم جزء من غشاء-المقيد بواسطة المطهر و البروتييناز كا ينتج اسيد نيوكلييك من غلاف الغشاء و الريبونيوكلياز المدمر الموجود في العيينة.

Methods used to prepare RNA for use in PCR generally require the use of hazardous chemicals such as guanidine isothiocyanate, chloroform and phenol.

Here we describe a rapid membrane-based method for the isolation of RNA from viruses present in serum. In this system whole virus particles present in serum are immobilized on a membrane by positive pressure filtration. Digestion of the membrane-bound particle with a detergent and proteinase K releases nucleic acid from its capsid and destroys ribonucleases present in the sample.

Strips of Immobilon-P membrane (polyvinylidene difluoride (PVDF), Millipore Corporation, Bedford, MA), measuring 5/32 inches by 1 1/2 inches, were placed on three (3) thicknesses of Whatman 3MM filter paper. One hundred microliters of human serum spiked with varying amounts of West Nile virus (Family Flaviviridae, RNA genome), strain 956B, were spotted near the end of the membrane in two 50 µl spots. A 1 ml tuberculin syringe was used to apply the samples by positive pressure (1, 2). The membrane strip spots were immediately immersed into 0.5 ml microfuge tubes containing 81.75 µl of digestion buffer (79.25 µl distilled water, 0.5 µl Tween-20 and 2 µl proteinase K (20 mg/ml)) and the tubes closed with a portion of the membrane extending outside. The tubes were incubated at 50°C for one hour and subsequently heated to 95°C for 10 minutes to inactivate the proteinase K. After removal of the membranes, 1 µl (0.33 µg) each of sense and antisense strand primer was added. The specimens were heated to 68°C and cooled on ice to allow primer annealing. Sequentially added were 5 µl 2 mM stock of deoxyribonucleotide triphosphates, 10 µl 10×PCR buffer, 0.5 µl RNAsin (Sigma Chemical, St Louis, MO), and 0.25 µl (200 units/ul) of murine maloney leukemia virus reverse transcriptase. Following a one hour incubation at 42°C, brief denaturation at 94°C and a second 42°C incubation, 0.5 µl of Taq DNA polymerase (1.25 units) was added to give a final volume of 100 µl. Samples were then amplified using a PCR protocol for West Nile virus (3).

Ten microliters of PCR product were Southern transferred to Nytran membrane. The membrane was hybridized to a 151-base pair digoxigenin-labeled probe (Genius Kit, Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN). Hybridized probe was detected by chemiluminescence using Lumi-Phos (Boehringer Mannheim Corporation, Indianapolis, IN).

A positive signal was seen in lanes A1 through A5 (Figure 1). No signal was seen with human RNA or dengue virus RNA, another flavivirus. Virus-free serum also failed to show any bands.

The data presented show this membrane-based procedure to be rapid, sensitive and less cumbersome than conventional viral RNA isolation techniques. The hydrophobic Immobilon-P membrane has a very high protein binding capacity. Its nucleic acid binding efficiency is extremely low. This allows any nucleic acid that is liberated to stay in solution while much of the protein can be adsorbed back onto the membrane. This pressure blotting membrane technique has been used previously for the detection of antibodies to other togaviruses (1) and meningococcal polysaccharide (2).

This membrane-based method was able to detect as few as 6.5 plaque forming units of RNA virus in 100 µl of serum. This degree of sensitivity should be adequate for the detection of RNA viruses that produce low-level viremias.

5 Nested PCR / تفاعل البلمرة المتسلسل المزدوج

PCR is a powerful method to amplify specific sequences of DNA from a large complex mixture of DNA. For example, you can design PCR primers to amplify a single locus from an entire genome. From a single template molecule, you can
produce over 1 billion copies of the PCR product very quickly. However, the capacity to amplify over one billion fold also increases the possibility of amplifying the wrong DNA sequence over one billion times. The specificity of PCR is determined by the specificity of the PCR primers. For example, if your primers bind to more than one locus (e.g. paralog or common domain), then more than one segment of DNA will be amplified. To control for these possibilities, investigators often employ nested primers to ensure specificity.

Nested PCR means that two pairs of PCR primers were used for a single locus (figure 1). The first pair amplified the locus as seen in any PCR experiment. The second pair of primers (**nested primers**) bind within the first PCR product (figure 4) and produce a second PCR product that will be shorter than the first one (figure 5). The logic behind this strategy is that if the wrong locus were amplified by mistake, the probability is very low that it would also be amplified a second time by a second pair of primers.

تفاعل البلمرة المتسلسل هي طريقة قوية لمضاعفة سلسة محددة من الدنا من خليط كبير و معقد من الدنا (DNA), على سبيل المثال يمكن تصميم مشرع تفاعل البلمرة المتسلسل(PCR) لمضاعفة موقع واحد من كل الجينوم. من جزء واحد من القالب, يمكنك إنتاج أكثر من 1 بليون نسخة من PCR المنتج بشكل سريع. إلا أن زيادة قدرة المضاعفة إلى أكثر من واحد بليون مرة من المحتمل أن تزيد من مضاعفة سلسلة DNA الخاطئة إلى أكثر من بليون مرة. خصوصية PCR تحدد بخصوصية مشرع تفاعل البلمرة المتسلسل المصمم, مثلاً ,إذا كان المشرع يربط أكثر من موقع واحد (مثل نطاق مشترك أو paralog), أكثر من سلسلة واحدة من DNA ستتضاعف. للسيطرة على هذا الاحتمال, المحققون غالباً ما إستعملوا Nested primer (هو مشرع مصمم تماماً مثل المشرع الإول إلا إنه يكون أقصر منه من حيث الطول) للتأكيد على خصوصيته.

Nested PCR يعني أنه قد تم استخدام نوعين مزدوجين من مشرعات تفاعل البلمرة المتسلسل لمنطقة واحدة (صورة 1). الزوج الأول لمضاعفة المنطقة كما ترى في أي تجربة PCR. الزوج الثاني من PRIMER (Nested PCR) يربط ضمن أول PCR منتجة (صورة 4) و ينتج ثاني PCR التي ستكون أقصر من المرحلة الأولى (صورة 5) الهدف من وراء هذه الإستراتيجية لأنه إذا تم خطاءً مضاعفة الخطأ في المرحلة الأولى, إحتمال المضاعفة ضئيل جداً في المرة الثانية بواسطة الزوج الثاني من المشرع.

```
5' ..GCAT...TTGG....//....GCGC...ATAT.. 3'
3' ..CGTA...AACC....//....CGCG...TATA.. 5'
```

Figure 1. Nested PCR strategy. Segment of DNA with dots representing nondiscript DNA sequence of unspecified length. The double lines represent a large distance between the portion of DNA illustrated in this figure. The portions

صورة 1 :إستراتيجية NESTED PCR.سلسلة من الDNA مع النقاط تمثل سلسلة الDNA. سلسلة الدنا الصعب تصنيفها ذو طول غير محدد. الخطين المزدوجين يمثلان المسافة الكبيرة بين أجزاء الDNA. أجزاء هذا الDNA تعرض بأربع وحدات

of DNA shown with four bases in a row represent PCR primer binding sites, though real primers would be longer.

نيوكليوتيدية(bases) في صف يمثل مشرع تفاعل البلمرة المتسلسل المرتبط بالموقع, على الرغم من أن المشرع الحقيقي سيكون أطول.

```
5′ ..GCAT...TTGG....    ....GCGC...ATAT.. 3′
                              ←tata

        gcat→
3′ ..CGTA...AACC....    ....CGCG...TATA.. 5′
```

Figure 2. The first pair of PCR primers (blue with arrows) bind to the outer pair of primer binding sites and amplify all the DNA in between these two sites.

صورة 2: الزوج الأول من مشرع تفاعل البلمرة المتسلسل (الأزرق مع السهم) يصل الزوج الخارجي من المشرع المرتبط بالموقع و يضاعف جميع الدنا بين هذين الموقعين.

```
5′ GCAT...TTGG....// ....GCGC...ATAT 3′
3′ CGTA...AACC....// ....CGCG...TATA 5′
```

Figure 3. PCR product after the first round of amiplificaiton. Notice that the bases outside the PCR primer pair are not present in the product.

صورة 3:منتج تفاعل البلمرة المتسلسل بعد المرحلة الأولى من المضاعفة. لوحظ أن الوحدات النيوكليوتيدية (base) الخارجة عن مشرع تفاعل البلمرة المتسلسل المزدوج ليست موجودة في المنتج.

```
5′ GCAT...TTGG....    ....GCGC...ATAT 3′
                         ←cgcg

             ttgg→
3′ CGTA...AACC....    ....CGCG...TATA 5′
```

Figure 4. Second pair of **nested primers** (red with arrows) bind to the first PCR product. The binding sites for the second pair of primers are a few bases "internal" to the first primer binding sites.

صورة 4: الزوج الثاني من nested PCR (الأحمر مع السهم) يربط أول منتج من تفاعل البلمرة المتسلسل. المواقع المرتبطة للزوج الثاني من المشرع لديها وحدات نيوكليوتيدية (base) قليلة "داخلة" ضمن المواقع المرتبطة بالمشرع الأول .

```
5′ TTGG....// ....GCGC 3′
3′ AACC....// ....CGCG 5′
```

Figure 5. Final PCR product after second round of PCR. The length of the product is defined by the location of the internal primer binding sites.

صورة 5: منتج تفاعل البلمرة المتسلسل الأخير بعد المرحلة الثانية من PCR. تتم معرفة طوله بحسب مكان المواقع المرتبطة بالمشرع الداخلي.

عندما تعرف سلسلة الجينوم كاملاً, فمن السهل التأكد من أن منطقة الخطأ لن تتضاعف ولكن عدد قليل جداً من جينوم العالم يملك سلسلة متكاملة , nested primer ستستمر لتكون عنصر مهم في العديد من التجارب .

When a complete genome sequence is known, it is easier to be sure you will not amplify the wrong locus but since very few of the world's genomes have been sequenced completely, nested primers will continue to be an important control for many experiments.

سلسلات المشرع

فيروس الأنفلونزا A (A/Ohio/07/2009(H1N1)) سلسلة 4 من جين(gene) الهيماكلوتينين (HA), كامل cds.

The primer sequences

Influenza A virus (A/Ohio/07/2009(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds.

FJ984401 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ984401)

Primer Influenza H1N1 Indication 1. Round: 215bp

H1N1-F 5′-AGCAATTGAGCTCAGTGTCATC-3′

H1N1-R 5′-GAGGACTTCTTTCCCTTTATCATT-3′

Primer Influenza H1N1 Indication 2. Round: 160bp

H1N1-F_nested 5′-CATTTGAAAGGTTTGAGATATTCCC-3′

H1N1-R_nested 5′-ttgctgagctttgggtatga-3′

>gi|229396503|gb|fj984401.1| influenza a virus (a/ohio/07/2009(h1n1)) segment 4 hemagglutinin (ha) gene, complete cds

atgaaggcaatactagtagttctgctatatacatttgcaaccgcaaatgcagacacattatgtataggttatcat

gcgaacaattcaacagacactgtagacacagtactagaaaagaatgtaacagtaacacactctgttaaccttct
a

gaagacaagcataacgggaaactatgcaaactaagaggggtagccccattgcatttgggtaaatgtaacatt
gct

ggctggatcctgggaaatccagagtgtgaatcactctccacagcaagctcatggtcctacattgtggaaacatc
t

agttcagacaatggaacgtgttacccaggagatttcatcgattatgaggagctaagagAGCAATTGA
GCTCAGTG

TCATCATTTGAAAGGTTTGAGATATTCCCcaagacaagttcatggcccaatcatgactc
gaacaaaggtgtaacg

gcagcatgtcctcatgctggagcaaaaagcttctacaaaaatttaatatggctagttaaaaaaggaaatTCA
TAC

CCAAAGCTCAGCAAatcctacattAATGATAAAGGGAAAGAAGTCCTCgtgct
atggggcattcaccatccatct

actagtgctgaccaacaaagtctctatcagaatgcagatgcatatgtttttgtggggacatcaagatacagcaa
g

aagttcaagccggaaatagcaataagacccaaagtgagggatcaagaagggagaatgaactattactggac
acta

gtagagccgggagacaaaataacattcgaagcaactggaaatctagtggtaccgagatatgcattcgcaatg
gaa

agaaatgctggatctggtattatcatttcagatacaccagtccacgattgcaatacaacttgtcagacacccaag

ggtgctataaacaccagcctcccatttcagaatatacatccgatcacaattggaaaatgt

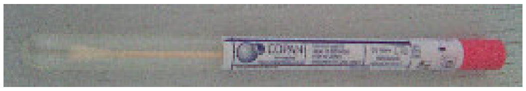
Remarque: before starting put a FILTOSTAT FS CODE

FFP2 D

ملاحظات : قبل البدء ضع الكمامة filtostat FS code FFP2 D

6 Pratical Part / الجزء العملي

6.1 Taking the probe / *أخذ الخزعة*



Cotton steril

/ قطن معقم

6.2 Purification of RNA from probe / *تنقية الرنا من الخزعة*

Protocol: Purification of Viral RNA (Spin Protocol)

This protocol is for purification of viral RNA from 140 µl plasma, serum, urine, cellculture

Important points before starting

■ Read "Important Notes" (pages–98)

■ All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).

Things to do before starting

■ Equilibrate samples to room temperature (15–25°C).

■ Equilibrate Buffer AVE to room temperature for elution in step 11.

■ Check that Buffer AW1 and Buffer AW2 have been prepared according to the instructions at the end of this chapter

■ Add carrier RNA reconstituted in Buffer AVE to Buffer AVL

Important; if not have QIAamp Viral RNA mini , we can use peqGOLD Viral RNA Kit protocoles See page 33 or visit www.peqlab.de

Procedure

1. Pipet 560 µl of prepared Buffer AVL containing carrier RNA into a 1.5 ml microcentrifuge tube.

If the sample volume is larger than 140 µl, increase the amount of

بروتوكول: تنقية RNA الفيروس (spin protocol)

هذا البروتوكول هو لتنقية الرنا الفيروسي من 140µl من البلازما, المصل , البول, و الخلايا المزروعة.

نقاط مهمة قبل البدأ:

اقرأ "الملاحظات المهمة" (صفحة 98)

جميع خطوات النابذة تجري على درجة حرارة الغرفة (15_25 م درجة)

من الأشياء التي يجب عملها قبل البدأ:

-موازنة حرارة العينات بحسب درجة حرارة الغرفة(15-25 م°).

-موازنة حرارة المنظم AVE بحسب حرارة الغرفة لعملية الاستخراج في المرحلة 11.

-تحقق من أن المنظمين AW1 و AW2 مجهزين بحسب الإرشادات في نهاية هذا الباب.

-أضف الرنا الناقل الموجود في المنظم AVE إلى المنظم AVL.

هام: إذا كنت لا تملك مجموعة QIAamp Viral RNA mini بإمكانك إستخدام peqGOLD Viral RNA Kit protocoles في الصفحة 33 أو الدخول على الموقع www.peqlab.de.

الإجراءات

1.إسحب 560µL من المنظم AVL المجهز و المحتوي على الرنا الناقل إلى أنبوب نابذة حجمه 1.5 مل.

Buffer AVL–carrier RNA proportionally (e.g., a 280 µl sample will require 1120 µl Buffer AVL–carrier RNA) and use a larger tube.

* Fully automatable on the QIAcube. See www.qiagen.com/MyQIAcube for protocols.

2. Add 140 µl plasma, serum, urine, cell-culture supernatant, or cell-free body fluid to the Buffer AVL–carrier RNA in the microcentrifuge tube. Mix by pulse-vortexing for 15 s.

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample is mixed thoroughly with Buffer AVL to yield a homogeneous solution. Frozen samples that have only been thawed once can also be used.

3. Incubate at room temperature (15–25°C) for 10 min.

Viral particle lysis is complete after lysis for 10 min at room temperature. Longer incubation times have no effect on the yield or quality of the purified RNA.

Potentially infectious agents and RNases are inactivated in Buffer AVL.

4. Briefly centrifuge the tube to remove drops from the inside of the lid.

5. Add 560 µl of ethanol (96–100%) to the sample, and mix by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the tube to remove drops from inside the lid.

Only ethanol should be used since other alcohols may result in reduced RNA yield and purity. Do not use denatured alcohol, which contains other substances such as methanol or methylethylketone. If the sample volume is greater than 140 µl, increase the amount of ethanol proportionally (e.g., a 280 µl sample will require 1120 µl of ethanol). In order to ensure efficient binding, it is essential that the sample is mixed thoroughly with the ethanol to yield

إذا كان حجم العينة أكثر من 140µL, فيجب زيادة حجم المنظم AVL المجهز و المحتوي على الرنا الناقل أيضاً بمعدل (مثلاً : 280µl من العينة تتطلب 1120µl من المنظمAVL المجهز و المحتوي على الرنا الناقل) ويجب إستخدام أنبوب أكبر.

2.أضف 140µl من البلازما, المصل, البول, والخلايا المزروعة أو الخلايا المتوفرة في الكتلة السائلة. إلى المنظم AVL المجهز و المحتوي على الرنا الناقل في أنبوب النابذة. أخلط بحيوية في الدوامة لمدة 15 ثانية.

تأكد من فعالية القطع, لذلك من المهم خلط العينة بقوة مع المنظم AVL لزيادة المحلول المتجانس. بإمكانك تجميد العينة وثم إعادة تذويبها وإستعمالها لمرة واحدة فقط.

3.أحضن الأنبوب على درجة حرارة الغرفة (15-25 م°) لمدة 10 دقائق.

جسيّمات قطع الفيروسي تكتمل بعد عملية القطع لمدة 10 دقائق على درجة حرارة الغرفة. فترة الحضن لمدة أطول لا تؤثر على كمية الرنا المنقى أو نوعيته.

من الممكن توقيف عمل العوامل المعدية أو أنزيم الرنا في المنظم AVL.

4.أنبذ الأنبوب لوقت قصير لإزالة القطرات المتواجدة في باطن الغطاء.

5.أضف 560µl من الإتانول (96-100%) إلى العينة, ثم أخلطهم بحيوية بواسطة الدوامة لمدة 15 ثانية. بعد الخلط, أنبذ الأنبوب لوقت قصير لإزالة القطرات المتواجدة في باطن الغطاء.

لا يجب إستخدام أي نوع آخر من الألكول سوى الإيتانول لأنه قد يخفض من كمية الرنا و نقاوته, وقد يحتوي على مواد مثل الميتانول أو الماتيل إتيل كاتون. إذا كان حجم العينة أكبر من 140µl يجب زيادة كمية الإيتانول (مثلاً : 280µl من العينة

a homogeneous solution.

6. Carefully apply 630 µl of the solution from step 5 to the QIAamp Mini column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini column into a clean 2 ml collection tube, and discard the tube containing the filtrate.

Close each spin column in order to avoid cross-contamination during centrifugation.Centrifugation is performed at 6000 x g (8000 rpm) in order to limit microcentrifuge noise. Centrifugation at full speed will not affect the yield or purity of the viral RNA. If the solution has not completely passed through the membrane, centrifuge again at a higher speed until all of the solution has passed through.

7. Carefully open the QIAamp Mini column, and repeat step 6.

If the sample volume was greater than 140 µl, repeat this step until all of the lysate has been loaded onto the spin column.

8. Carefully open the QIAamp Mini column, and add 500 µl of Buffer AW1. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.

It is not necessary to increase the volume of Buffer AW1 even if the original sample volume was larger than 140 µl.

9. Carefully open the QIAamp Mini column, and add 500 µl of Buffer AW2. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min. Continue directly with step 11, or to eliminate any chance of possible Buffer AW2 carryover, perform step 10, and then continue with

تتطلب 1120µl من الإيتانول). في طلب للتأكد من فعالية الربط, من المهم خلط العينة بقوة مع الإيتانول للحصول على كمية من المحلول المتجانس.

6.ضع بحذر 630µl من المحلول من المرحلة 5 في عامود QIAamp Mini (في 2 مل من أنبوب المجموعة (collection tube) من دون أن تبلل الحافة. أغلق العامود, ثم أنبذ على 6000 × g (8000rpm) لمدة 1دقيقة واحدة. ضع العامود في أنبوب المجموعة الجديد 2مل, وإرمي الأنبوب المحتوي على المادة المتبقية من عملية التصفية(filtrate).

أغلق جميع أعمدة الدوران لتجنب التلوث خلال عملية النبذ. تتم عملية النبذ على (8000rpm) 6000 × g بهدف تحديد ضوضاء النابذة. النبذ على سرعة عالية لا تؤثر على كمية أو تنقية الرنا الفيروسي. إذا لم يتم مرور المحلول كاملاً عبر الغشاء, أعد عملية النبذ على سرعة عالية إلى أن يمر المحلول تماماً.

7. إفتح عامود QIAamp Mini بحذر ثم أعد المرحلة 6.

إذا كان حجم العينة أكثر من 140µl أعد هذه المرحلة إلى أن يتم تحميل جميع الليزات (lysate) على عامود الدوران.

8. إفتح بحذر عامود QIAamp Mini و أضف 500µl من المنظم AW1. أغلق العامود, ثم أنبذ على (8000rpm) 6000 × g لمدة دقيقة واحدة. ضع العامود في أنبوب المجموعة الجديد 2مل, وإرمي الأنبوب المحتوي على المادة المتبقية من عملية التصفية(filtrate).

ليس من ضروري زيادة حجم المنظم AW1 إن كان حجم العينة الأساسية أكثر من 140µl.

9. إفتح عامود QIAamp Mini بحذر, ثم أضف 500µl من المنظم AW2. أغلق العامود وأنبذ على سرعة عالية (20,000 x g; 14,000 rpm) لمدة 3 دقائق. أكمل مباشرة في المرحلة 11 أو للتخلص من أي إحتمال ممكن في الإحتفاظ بالمنظم AW2, بالإمكان الإكمال في

المرحلة 10 ومن ثم في المرحلة 11.

ملاحظة: بقاء المنظم AW2 في المستخرج قد يسبب مشاكل في التطبيقات اللاحقة. قد تستجيب بعض النابذات على تبطيء السرعة, نتيجة السائل الذي مرّ عبر الغشاء يحتوي على المنظم AW2, المحتك بعامود QIAamp Mini. إزالت هذا العامود و وضع أنبوب المجموعة قد يسبب أيضاً بإحتكاك السائل الذي يمر عبر الغشاء بعامود QIAamp Mini. في هذه الحالة يجب إختيار المرحلة 10.

10. هام: ضع عامود QIAamp Mini في أنبوب المجموعة 2 مل (ليس شرطاً) , وإرمي أنبوب المجموعة القديم مع السائل الذي مرّ عبر الغشاء. أنبذ بسرعة عالية لمدة دقيقة واحدة.

11. ضع عامود QIAamp Mini في أنبوب المجموعة الجديد 2 مل (ليس شرطاً) وإرمي أنبوب المجموعة القديم مع السائل الذي مرّ عبر الغشاء. إفتح بحذر عامود QIAamp Mini وأضف 60µl من المنظم AVE المتوازن مع درجة حرارة الغرفة. أغلق العامود, وأحضنه على درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة واحدة. ثم أنبذ 6000 g × (8000rpm) لمدة 1دقيقة واحدة.

إستخراج مرة واحدة 60µl من المنظم AVE كافية لإستخراج 90% على الأقل من الرنا الفيروسي في عامود QIAamp Mini . لتأدية إستخراج مضاعف إستخدم 2 x 40 µl من منظم AVE الذي سيزيد الكمية إلى أكثر من 10%. الإستخراج بحجم أقل من 30 µl سيؤدي إلى إنخفاض الكمية و لن يزيد من التركيز النهائي للرنا في المستخرج. يظل الرنا الفيروسي مستقراً لأكثر من سنة على –20°C or –70°C.

step 11.

Note: Residual Buffer AW2 in the eluate may cause problems in downstream applications. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in flow-through, containing Buffer AW2, contacting the QIAamp Mini column.Removing the QIAamp Mini column and collection tube from the rotor may also cause flow-through to come into contact with the QIAamp Mini column. In these cases, the optional step 10 should be performed.

10. Recommended: Place the QIAamp Mini column in a new 2 ml collection tube (not provided), and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.

11. Place the QIAamp Mini column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided). Discard the old collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini column and add 60 µl of Buffer AVE equilibrated to room temperature. Close the cap, and incubate at room temperature for 1 min. Centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min.

A single elution with 60 µl of Buffer AVE is sufficient to elute at least 90% of the viral RNA from the QIAamp Mini column. Performing a double elution using 2 x 40 µl of Buffer AVE will increase yield by up to 10%. Elution with volumes of less than 30 µl will lead to reduced yields and will not increase the final concentration of RNA in the eluate. Viral RNA is stable for up to one year when stored at –20°C or –70°C.

6.3 تصنيع (synthesis) cDNA من الرنا (RNA)

First-strand cDNA Synthesis Using M-MLV Reverse Transcripase /

السلسلة الأولى من تصنيع cDNA تستخدم أنزيم M-MLV Reverse Transcripase

A 20µl reaction volume can be used for 1ng-5µg of total RNA or 1-500ng of mRNA

يتم إستخدام 20µl من حجم التفاعل لكل 1ng-5µg من حجم الرنا النهائي أو500ng من مرسال الرنا (mRNA) .

RNA probes / جزء من الرنا

1- Add the following components to a nuclease-free microcentrifuge tube:

1-أضف المكونات التالية إلى أنبوب نابذة لا يحتوي على النيوكلياز:

- put in the tube of outer-primer 100µl TE buffer than take 0.6µl of this.
- We have lyophilized probes of naked H1N1 virus RNA (RNA without protein coat). Put into the probe 50 µl TE buffer. Take from this 5µl.
- 1µl (10mM) dNTP Mix (10mM each dATP,dGTP,dCTP and dTTPat neutral PH).
- Add sterile, distilled water to 12 µl.

-ضع في أنبوب المشرع الخارجي (outer primer) 100µl من منظم TE و من ثم إسحب 0.6µl من.

-تملك جرعة لزجة من فيروس الرنا H1N1 المعزول (من دون طبقة البروتيين). أضف إليه 50µl من منظم TE ثم إسحب منه 5µl.

-1µl من خليط dNTP (10mM) (10mM each dATP,dGTP,dCTP and dTTPat neutral PH).

-أضف ماء معقم حتى 12µl.

2/-Heat mixture to 65oC for 5 min and quick chill on ice.

2-أخلط على درجة حرارة عالية 65°م لمدة 5 دقائق ثم برده فوراً بالثلج.

Water-bath / حوض تسخين see plate 8 for color figure / أنظر الصفيحة 8 لصورة ملونة

collect the content of the tube by brief **centrifugation (e.g. 20s , 10 000 rpm)**

إجمع محتوى الأنبوب من خلال نبذة سريعة (مثلاً 20 ثانية, 10.000rpm)

Microcentrifuge / نابذة

see plate 8 for color figure / أنظر الصفيحة 8 لصورة ملونة

And add:
-4µl 5X First-Strand Buffer
-2µl 0.1 M DTT

ثم أضف:

-4µl من 5× منظم التسلسل-الأول

-2µl من DTT (0.1M)

First strand-buffer / منظم التسلسل الأول.

3.- Mix contents of the tube gently and incubate at 37 °C for 2 min

3-أخلط المحتوى الذي في الأنبوب بنعومة ثم أحضنه على 37م° لمدة 2 دقيقتين.

4- Add 1µl (200 units) of M-MLV (RT), and mix by pipetting gently up and down.

4- أضف 1µl من (200 units) (RT) M-MLV , و أخلطه بنعومة بواسطة الممصة من الأعلى إلى الأسفل.

M-MLV solution

5-Incubate 50 min at 37°C.

5-أحضن لمدة 15 دقيقة على 37 م° .

6- Inactivate the reaction by heating at 70°C for 15 min.

6-توقيف التفاعل بتعريضه للحرارة على 70 م° لمدة 15 دقيقة.

7- Incubate 40s at 90 °C (with PCR machine)

7-أحضن لمدة 40 ثانية على 90 م° (في آلة تفاعل البلمرة المتسلسل).

8- Immediately put the tube into ice for 1 min

8-ضع الأنبوب مباشرةً في الثلج لمدة دقيقة واحدة.

9- Add 3µl RNase A

9-أضف 3µl من أنزيم الرنا آي(RNaseA).

10- Incubate 20 min at 37 °C (with PCR machine).

10-أحضن لمدة 20 دقيق على 37 م° (في آلة تفاعل البلمرة المتسلسل).

Now we have cDNA.

الآن تم الحصول على cDNA .

11. Add the above to a PCR reaction

11-أضف على ما سبق وفي أنبوب تفاعل البلمرة المتسلسل

tube for a final reaction volume of 50 µl :

- 5µl **10X PCR Buffer**[200mM Tris-HCl (PH 8.4), 500 mM KCl]
- 1.5 µl (50 mM) **$MgCl_2$**
- 1µl 10 mM **dNTP Mix**
- 1µl **amplification primer 1**(10µM)
- 1µl **amplification primer 2** (10µM)
- 0.4 µl **Taq DNA polymerase** (5U/µl)
- 2µl **cDNA** (from first- strand reaction)
- **autoclaved, distilled water** to 50 µl

إلى حجم نهائي 50µl :

-µl 5 من × 10 منظم تفاعل البلمرة المتسلسل [200mM Tris-HCl (PH 8.4), 500 mM KCl].

-1.5µl من كلور المانييزيوم (50 mM).

-1µl من خليط dNTP (10mM).

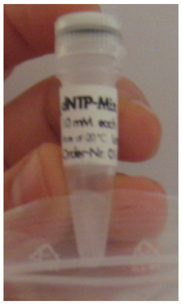
-1µl من المشرع 1 المضاعف (10µM).

-1µl من المشرع 2 المضاعف (10µM).

-0.4µl من أنزيم تاك بوليمراز الدنا (5U/µl).

-2µl من cDNA (من تفاعل أول سلسلة).

-أضف ماء حتى 50µl.



amplification primers / المشرعات المضاعفة

dNTP solution

- Mix gently and layer 1-2 drops (50µl) of silicone oil over the reaction

(**Note:** the addition of silicone oil is unnecessary in thermal cyclers equipped with a heated lid.)

- Heat reaction to 94 °C for 2 min to denature.
- PCR program : **35 cycles**:

  10s 95 °C

-أخلط بنعومة و ضع طبقة من 1-2 نقطتين من زيت السيليكون فوق التفاعل.

(**ملاحظة**: زيادة زيت السيليكون غير ضروري في آلة تفاعل البلمرة المتسلسل لأنه مجهز بطبقة حرارية).

-سخن التفاعل حتى 94 م° لمدة 2 دقيقتين لتوقيف التفعالية.

-برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل: 35 دورة:

10 ثواني , 95م°.

10s 60 °C

10 ثواني , 60م°.

30-60s 72 °C

30-60 ثانية , 72 م°.

PCR machine / جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل

see plate 8 for color figure / أنظر الصفيحة 8 لصورة ملونة

5-put 5 µl in a PCR with 50 µl. take 5µl from the result and put in the second round PCR.

(**Note:** we use inner primers 3 and 4 in the second round of PCR)

5-ضع 5µl من تفاعل البلمرة المتسلسل في 5µl من المنتج وضعه في المرحلة الثانية من تفاعل البلمرة المتسلسل.

(**ملاحظة**: لقد تم إستعمال المشرعات الداخلية 3 و 4 في المرحلة الثانية من تفاعل البلمرة المتسلسل).

6- put the PCR product on the gel

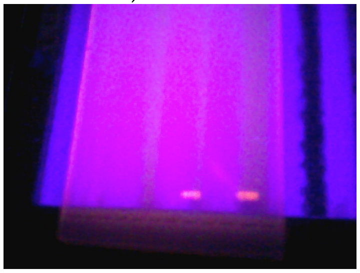
6-ضع منتج تفاعل البلمرة المتسلسل على الهلام.

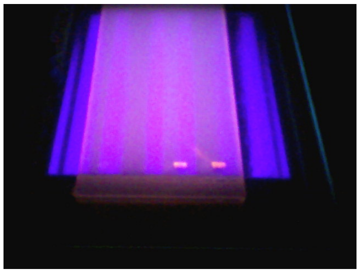
Electrophoresis / الفصل الكهربائي للهلام

see plate 8 for color figure / أنظر الصفيحة 8 لصورة ملونة

7- take a image with digital camera (with a red filter)

7- بالإمكان أخذ صورة من كاميرا دجيتال (مع فلتر أحمر).





Result: The person is infected with H1N1 virus because there are bands seen / شخص يحمل فيروس إنفلونزا الخنازير لأن لديه بقعتين على الهلام

Important Notes / ملاحظات هامة

If preparing RNA for the first time please read “Handling RNA” (page 34). All steps of the QIAamp Viral RNA Mini protocols should be performed quickly and at room temperature.

إذا كان تحضير الرنا هي المرة الأولى فيجب قراءة[تدابير الرنا](صفحة 34). جميع المراحل من بروتوكول يجب أن تتم بشكل سريع و على درجة حرارة الغرفة .

After collection and centrifugation, plasma (untreated or treated with anticoagulants other than heparin) or serum can be stored at 2–8°C for up to 6 hours. For long-term storage, freezing at –20°C to –80°C in aliquots is recommended. Frozen plasma or serum samples must not

بعد التجميع و النبذ , البلازما أو المصل بالإمكان تخزيتهم على 2-8 م° لأكثر من 6 ساعات. لتخزين مدة أطول في الثلاجة على -20°c or -80°c من المطلوب أن تقسم الكمية إلى عينات صغيرة. تثليج عينات من البلازما أو المصل لا يجب أن

be thawed more than once. Repeated freezing and thawing leads to denaturation and precipitation of proteins, causing reduced viral titers and subsequently reduced yields of the isolated viral RNA. In addition, cryoprecipitates formed by freeze–thawing will cause clogging of the QIAamp membrane. If cryoprecipitates are visible, they can be pelleted by briefly centrifuging at 6800 x g for 3 minutes. The cleared supernatant should be removed, without disturbing the pellet, and processed immediately. This step will not reduce viral titers.
The QIAamp Viral RNA Mini procedure is not designed to separate RNA from DNA.
To avoid cellular DNA contamination follow the guidelines in "Cellular DNAThe QIAamp Viral RNA Mini procedure isolates all RNA molecules larger than 200 nucleotides. Smaller RNA molecules will not bind quantitatively under the conditions used.

تذوب لأكثر من مرة واحدة. عملية تكرار التثليج أو التذويب تؤدي إلى تغير طبيعة البروتيين و ترسبه, وتسبب أيضاً في إنخفاض كمية الرنا الفيروسي المعزول. بالإضافة إلى, الترسب الناجم بسبب التجميد والتثليج الذي يؤدي إلى إنسداد غشاء QIAamp إذا كان الترسب مرئياً فمن الممكن نبده على 6800×g لمدة 3 دقائق. يجب إزالة ما طاف من دون الإخلال بالترسب ومعالجته على الفور. هذه المرحلة لا تقلل من كمية الفيروس.

نظام QIAamp Viral RNA Mini ليس مصمماً لفصل الرنا عن الدنا.

لتجنب تلوث الدنا يجب إتباع الخطوات الإرشادية في نظام QIAamp Viral RNA Mini الذي يعمل على عزل أكثر من 200 وحدة نيوكليوتيدية . أما جزيئيات الرنا الصغيرة لن يترابط عددها تحت هذه الشروط.

6.3.1 Handling RNA / معالجة الرنا

Ribonucleases (RNases) are very stable and active enzymes that generally do not require cofactors to function. Since RNases are difficult to inactivate and only minute amounts are sufficient to destroy RNA, do not use any plasticware or glassware without first eliminating possible RNase contamination. Great care should be taken to avoid inadvertently introducing RNases into the RNA sample during or after the purification procedure. In order to create and maintain an RNase-free environment, the following precautions must be taken during pretreatment and use of disposable and non-disposable vessels and solutions while working with RNA.

أنزيم الرنا (RNase) هو أنزيم مستقر و ناشط ولا يتطلب عوامل المساعدة للعمل. وبما أنه من الصعب توقيف نشاطه وقوته في تدمير الرنا في وقت قصير, لذلك لا يجب إستعمال أية من المعدات البلاستيكية أو الزجاجية من دون تنظيفهم من هذا الأنزيم. ويجب أن يؤخذ الحذر لتجنب دخول هذا الأنزيم على عينات الرنا خلال أو بعد عملية التنقية. للحفاظ على أن يكون هذا الأنزيم بعيداً عن محيط عملنا, يجب أن تؤخذ الإجراءات التالية خلال عملية تنقية الأوعية المستعملة و الغير مستعملة والمحاليل خلال العمل في الدنا.

6.3.2 Buffer AW1 / المنظمAW1

Buffer AW1 is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle in Buffer AW1 is stable for 1 year when stored closed at room temperature, but only until the kit expiration date.

المنظم AW1 هو مزود كتركيز. قبل الإستعمال في المرة الأولى , أضف الإتانول (96-100%) كما هو مشار إليه على علبة المنظم AW1 ويمكن تخزينه لمدة سنة على درجة حرارة الغرفة مع الحفاظ على جودته, ولكن فقط حتى نهاية تاريخ صلاحية المجموعة.

6.3.3 Buffer AW2 / المنظمAW2

Buffer AW2 is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) to Buffer AW2 concentrate as indicated on the bottle.

Buffer AW2 is stable for 1 year when stored closed at room temperature, but only until the kit expiration date.

المنظم AW2 هو مزود كتركيز. قبل الإستعمال في المرة الأولى , أضف الإيتانول (96-100%) كما هو مشار إليه على علبة المنظم AW2 .

ويمكن تخزينه لمدة سنة على درجة حرارة الغرفة مع الحفاظ على جودته, ولكن فقط حتى نهاية تاريخ صلاحية المجموعة.

6.4 PEQGOLD VIRAL RNA ISOLATION PROTOCOL / بروتوكول عزل الرنا الفيروسي عبر PEQGOLD

Materials required, but not supplied:
! 100 % ethanol
! Sterile RNase-free pipette tips and microcentrifuge tubes

1. Lysis

Add 450 µl RNA Lysis Buffer T to an Extraction Tube. Pipet 150 µl plasma, cell free body fluid, cell culture supernatant or urine into the tube, mix thoroughly by vortexing for 10 seconds and incubate for 15 minutes at room temperature.

2. Load and bind

Add 600 µl RNA Binding Solution and mix thoroughly by pipetting until a homogeneous solution is formed. Apply 600 µl

المواد المطلوبة والغير موجودة في هذه المجموعة.

-الإيتانول(100%)

-تيبس للممصة خال من أنزيم الرنا وأيضاً أنبوب النابذة.

1.الليزيز (القطع):

أضغف 450µl من منظم الليزيز الريبي تي في أنبوب الإستخراج. ضع بواسطة الممصة 150µl من البلازما , خلايا الجسم اللزجة, الخلايا المزروعة الطائفة أو البول في هذا الأنبوب ثم أخلطه لمدة 10 دقائق بالدوامة وأحضنه لمدة 15 دقيقة على درجة حرارة الغرفة.

2.التحميل و الربط

of the sample to a PerfectBind RNA Column assembled in a 2 ml Collection Tube. Centrifuge for 1 minute at 10.000 x g. Discard Collection Tube and assemble Perfect Bind RNA Column to a new Collection Tube. Apply residual 600 µl of the sample and centrifuge for 1 minute at 10.000 x g. Discard Collection Tube and assemble PerfectBind RNA Column to a new Collection Tube.

Note: If the sample should not have run by the filter completely, centrifugation time might be extented!

3. Wash I

Add 500 µl RNA Wash Buffer I to the column and centrifuge the PerfectBind RNA Column/Collection Tube assembly for 1 minute at 10.000 x g. Discard flow-throw liquid and re-use the Collection Tube.

4. DNase I Digestion (optional)

Since PerfectBind RNA resin and spin-column technology actually removes most of DNA without the DNase treatment, it is not necessary to do DNase digestion for most downstream applications. However, certain sensitive RNA applications might require further DNA removal. Following steps provide on-membrane DNase I digestion (Order No. 12-1091).

a. For each PerfectBind RNA Column, prepare this DNase I digestion reaction mix:

DNase I Digestion Buffer 73.5 µl

RNase-free DNase I (20 Kunitz units/µl) 1.5 µl

Total volume 75 µl

Note:

1. DNase I is very sensitive for physical denaturation, so do not vortex this DNase I mixture!

أضف 600µl من محلول الربط الريبي وأخلطه بشكل كامل بواسطة الممصة إلى أن يصبح المحلول متجانساً. ضع 600µl من هذه العينة في عامود PerfectBind RNA الموصول بأنبوب المجموعة(collection tube) 2مل. أنبذ لمدة دقيقة واحدة على 10.000 × g. إرمي أنبوب المجموعة و ضع العامود في أنبوب مجموعة جديد .

ملاحظة: إذا لم تتم تصفية المجموعة بالكامل عبر الفلتر فبالإمكان زيادة وقت عملية النبذ.

3. منظم الغسل الأول:

أضف 500µl من منظم الغسل الريبي الأول إلى العامود وأنبذ العامود مع الأنبوب لمدة دقيقة على 10.000 × g . وإرمي السائل ثم أعد إستعمال الأنبوب ذاته.

4.أنزيم الهضم الدنا الأول (إختياري):

بما أن صمغ الرنا و تقنية عامود الدوران يزيلان معظم الدنا من دون إستعمال أنزيم الدنا المعالج , لذلك ليس من الضروري إستعمال هذا الأنزيم في التطبيقات. إلا أن بعض تطبيقات الرنا الحساسة تتطلب أيضاً إزالة الدنا. المراحل التالية مزودة بغشاء يحتوي على أنزيم الهضم الدنا الأول (No. 12-1091 Order).

a.لكل عامود PerfectBind RNA, يجب تجهيز خليط تفاعل من أنزيم الهضم الدنا الأول:

73.5µl من منظم الهضم الدنا الأول.

1.5µl من أنزيم الدنا الخالي من أنزيم الرنا (20 Kunitz units/µl).

الحجم النهائي 75µl.

ملاحظة:

1.أنزيم الدنا الأول هو أنزيم حساس جداً لتغيرات الطبيعة الفيزيائية, لذا لا تخلط هذا الأنزيم في الدوامة!.

أخلطه بنعومة من خلال تحريك الأنبوب من الأعلى إلى الأسفل.

جهز خليط أنزيم الهضم الدنا الأول مباشرةً قبل عزل الرنا.

2.منظم الهضم الدنا الأول خالي تماما من أنزيم الرنا و غني بأنزيم الدنا. منظم أنزيم الدنا القياسي هو ليس متجانساً مع غشاء أنزيم هضم الدنا!.

b. بواسطة الممصة إسحب 75µl من خليط تفاعل أنزيم الهضم الدنا الأول وضعه مباشرةً على سطح المادة الصمغية PerfectBind RNA في كل عامود . تأكد من أن خليط الأنزيم وُضع تماما على الغشاء. لن يكتمل أنزيم الهضم الدنا الأول إذا علّق البعض منه على جدران عامود RNA PerfectBind.

c. أحضن على درجة حرارة الغرفة (25-30م°) لمدة 15 دقيقة.

d. ضع عامود RNA PerfectBind في أنبوب المجموعة 2 مل ثم أضف 400µl من منظم الغسيل الأول الريبي . ضع هذا العامود عند نهاية المقعد لمدة 5 دقائق. أنبذ على 10.000 × g لمدة 5 دقائق ثم إرمي السائل الموجود في أنبوب المجموعة وأعد إستعمال الأنبوب للإنتقال إلى المرحلة التالية (المرحلة 5).

أكمل مع المرحلة الخامسة.

5.منظم الغسيل الثاني

أضف 650µl من منظم الغسيل الريبي الثاني في العامود وأنبذ العامود مع الأنبوب لمدة دقيقة على 10.000 × g .إرمي السائل الموجود في الأنبوب ثم أعد هذه مع إستعمال الأنبوب نفسه ثم إرمي السائل.

Mix gently by inverting the tube. Prepare the fresh DNase I digestion mixture directly beforeRNA isolation.

2. DNase I Digestion Buffer is supplied with RNase-free DNase set. Standard DNase buffers are not compatible with on-membrane DNase digestion!

b. Pipet 75 µl of the DNase I digestion reaction mix directly onto the surface of PerfectBind RNA resin in each column. Make sure to pipet the DNase I digestion mixture directly onto the membrane. DNase I digestion will not be complete if some of the mix stick to the wall or the O-ring of the PerfectBind RNA Column.

c. Incubate at room temperature (25 - 30 °C) for 15 minutes.

d. Place a PerfectBind RNA Column into a new 2 ml Collection Tube and add 400 µl RNA Wash Buffer I. Place the column at benchtop for 5 minutes. Centrifuge at 10.000 x g for 5 minutes and discard flow-through. Re-use Collection Tube in the next step.

Continue with step 5.

5. Wash II

Add 650 µl completed RNA Wash Buffer II to the column and centrifuge the PerfectBind RNA Column/Collection Tube assembly for 1 minute at 10.000 x g. Discard the flowthrough liquid. Repeat this wash step using the same Collection Tube and discard the flow-through liquid.

6. Dry (Important, do not skip this step!)

Place the PerfectBind RNA Column in the Collection Tube and centrifuge for 2 minutes at

10.000 x g to dry the column matrix.

7. Elution

Place the PerfectBind RNA Column into a fresh 1.5 ml microcentrifuge tube. Add 30 - 80 µl RNase-free Water directly to the binding matrix in the PerfectBind RNA Column, incubate 2 minutes and centrifuge for 1 minute at 6.000 x g to elute RNA.

A second elution may be necessary if the expected yield of RNA is > 50 µg. Alternatively, RNA may be eluted with a higher volume of water. While additional elution increase total RNA yield, the concentration will be lowered since more than 80 % of RNA is recovered with the first elution.

Pre-heating RNase-free Water to 70 °C before adding to the spin column and incubating the spin column for 5 minutes at room temperature before centrifugation may increase yield. Instead of eluting twice, the RNA can directly be eluted in a bigger volume of RNase-free Water.

6.التجفيف(مرحلة مهمة لا يجب تخطيها!).

ضع العامود في أنبوب المجموعة وأنبذ لمدة 2 دقيقتين على 10.000 g × لتجفيف العامود.

7. عملية الإستخراج

ضع العامود PerfectBind RNA في أنبوب نابذة جديد 1.5مل. أضف 30-80µl من الماء الخالي من أنزيم الرنا لربط الخليط على عامود PerfectBind RNA , أحضن لمدة دقيقتين ثم أنبذ لمدة دقيقة واحدة على 6.000 × g لإستخراج الرنا.

قد يكون الإستخراج الثاني ضروري إذا كانت كمية الدنا أكبر من 50µg. أو بدلاً من ذلك, من الممكن إستخراج الرنا بكمية كبيرة من الماء. في حين أن الإستخراج الإضافي يزيد من كمية الدنا الكاملة, التركيز سينخفض لأن أكثر من 80% من الرنا إستعيدت في أول إستخراج.

الحرارة الأولية للماء الخالي من أنزيم الرنا على 70 م° قبل زيادته إلى عامود الدوران و حضانته لمدة 5 دقائق على درجة حرارة الغرفة قبل النبذ قد يزيد من الكمية. بدلاً من عملية الإستخراج المزدوجة, بإمكان الرنا أن يستخرج مباشرةً من خلال كمية كبيرة من الماء الخالي من أنزيم الرنا.

III. Vaccine Production Techniques: Egg Based and Cell Based Influenza Virus Propagation / العمل بتكبير فيروسات الانفلوينزا عن طريق البيض و عن طريق الخلايا

1 day training course for researchers and technical staff

Authors:
Noha Abdulwahab, Ghina al-Eter, Omran Zaki, Layal Chbib, and Mirna Khoder

7 General remarks on working on egg based virus propagation / ملاحظات عامة للعمل بتكبير الفيروس عن طريق البيض

Chickens are susceptible to many infectious diseases. One of the most important of these is the viral disease known as influenza which is caused for examples by the actural H1N1 virus. For this reasons viruses can be propagated will in chicken eggs for vaccine production purpose.
Eggs for our work can be purchase from normal chicken farms.the eggs must be 9-10 days old when purchased.
Then the virus probe is inoculated into the eggs where the virus is propagated while the eggs are incubated. The work must be done under very clean circumstances and atmosphere to prevent contamination.
Testing the actual state of the eggs is done by candling.

الدجاج معرض إلى العديد من الأمراض المعدية. أحد أهم هذه الامراض المعروفة هو مرض الإنفلونزا الذي يسبب فيروس ..H1N1 . لهذا السبب يمكننا تكبير الفيروس في البيض لإنتاج اللقاح المفترض.
يمكننا شراء البيض الملقح والمناسب لعملنا من مزرعة الدجاج و يجب أن يتراوح عمره من 9-10 أيام.
الفيروس المراد تكبيره يوضع في البيض ثم نضع البيض في الحاضنة. يجب المحافظة على مكان العمل لمنع التلوث.

7.1 Basic laboratory skills / *المهارات المخبرية الأساسية*

Laboratory staff should be familiar with and have practiced the following skills prior to the commencement of H1N1 disease vaccine production - this manual does not contain further details about these skills:

- Aseptic technique.
- Sterilization by autoclaving and hot air of glassware and discarded materials.

موظفو المختبر يجب أن يكونوا يداً واحدة ضمن ممارستهم المهارات التالية قبل البدء بإنتاج اللقاح لمرض ها1ن1.
لا يحتوي هذا الكتاب على تفاصيل عن:

- تقنية التعقيم
- التعقيم بواسطة الهواء الحار للزجاجيات و التخلص من فضلات المواد .

7.2 Recording details of egg purchases / *التسجيل بالتفصيل لعملية شراء البيض*

An order can be placed for the delivery of the eggs. It is useful if the person responsible for placing the orders and receiving the eggs keeps records. The following information should be recorded in a notebook set aside for this purpose.

- Date when the eggs are ordered and the name of the person who
- received the order.
- Number and age of the eggs ordered.
- Date and number of the eggs received.
- Colour and appearance of the eggs received.
- Number of eggs damaged during

يمكن وضع نظام لتقديم البيض .ومن المفيد إذا الشخص المسؤول عن وضع الأوامر وتلقي البيض يحفظ المعلومات بسجلات. ينبغي تسجيل المعلومات التالية في دفتر خاص:

- تاريخ متى تم طلب البيض واسم الشخص الذي تلقى الطلب.
- عدد وعمر البيض المطلوب.
- تاريخ وعدد البيض المستلم.
- لون ومظهر البيض المستلم .

transport.
- Date and number of eggs placed in incubator.
- Number of viable eggs after candling prior to inoculation.

- عدد البيض المنكسر خلال النقل .
- تاريخ وعدد البيض الموضوع بالحاضنة
- عدد البيض المتوفر بعد التشميع و المفضل للتلقيح

7.3 Cleaning and decontamination / *التنظيف و التطهير*

Appropriate chemical disinfectants must be used for cleaning equipment, materials and work surfaces. All laboratory wastes must be assigned to a category and placed in clearly labeled bins from where the waste will be disposed of appropriately.

يجب إستخدام المطهرات الكيميائية الملائمة لمعدات التنظيف ,الأدوات وأسطح العمل. جميع نفايات المختبر يجب أن توضع حسب فئتها في صناديق مع تفسير واضح إلى أن نتخلص منها بشكل مناسب .

Alcohol

A 70% volume/volume (v/v) solution of alcohol diluted with water is useful for wiping down benches and disinfecting the outside of eggs before inoculation and harvesting of allantoic fluid. The addition of 2 percent iodine will increase the effectiveness of this solution.

Note that 70 percent solution of alcohol is flammable!

الكحول

70 في المئة من الكحول المخففة بالماء هي مفيدة لمسح المقاعد وتطهير السطح الخارجي للبيض قبل التلقيح و حصد سائل الألونتوييك . إلاّ أن زيادة 2 في المئة من الإيودين تيزيد من فعالية المحلول .

ملاحظة: 70 في المئة من الكحول قادرة على الإشتعال !

Chlorine

There are several chlorine compounds that are used as disinfectants. Sodium hypochlorite (NaOCl) or household bleach is readily available and cheap.

Soaking overnight in a 2 percent solution of chlorine is useful for disinfecting plastic materials. Note that commercial bleach contains 12 to 14 percent hypochlorite when manufactured but this concentration deteriorates with time.

Note that chlorine damages fabric and corrodes many metals!

Always read the instructions before using disinfectants and cleaning reagents!

الكلورين

يوجد عدة مركبات للكلور التي يمكن استخدامها كمطهرات: هيبوكلوريت الصوديوم أو المواد المبيضة المتوفرة في المنازل والرخيصة. نقع 2 في المئة من الكلور خلال الليل مفيد لتطهير المواد البلاستيكية.

ملاحظة عندما بدأت صناعة المواد المبيضة كانت تحتوي من 12 إلى 14 في المئة من الهيبوكلوريت إلاّ أن هذه النسبة تنقص مع الوقت.

ملاحظة الكلور يدمر و يأكل المعادن !

لذلك إقرأ دائماً الإرشادات قبل إستعمال مواد التنظيف أو التطهير!

7.4 Incubation of eggs before inoculation / *حضانة البيض قبل التلقيح*

Many vaccine production centres will already have large commercial incubators installed. Smaller incubators are available

العديد من مراكز إنتاج اللقاح لديها حاضنات تجارية مثبتة.أصغر الحاضنات المتوفرة هي مناسبة لإنتاج اللقاح على

and are suitable for the small-scale production of vaccine.

- Incubation temperature = 38oC to 39oC.
- Humidity should be maintained at 60 to 65 percent. A tray filled with water and placed in the bottom of the incubator is usually sufficient to maintain this level of humidity.
- Place the eggs in the incubator with the air sac on top.

نطاق صغير .

- درجة حرارة الحضانة من 38 إلى39 درجة مئوية.
- ينبغي الحفاظ على الرطوبة من 60 إلى 65 بالمئة. بواسطة صينية مليئة بالماء توضع في الجزء السفلي من الحاضنة وعادة تكفي للحفاظ على هذا المستوى من الرطوبة.
- ضع البيض في الحاضنة بطريقة أن يكون الكيس الهوائي للبيضة من جهة الأعلى.

7.5 Incubation of eggs after inoculation / حضانة البيض بعد التلقيح

Inoculated eggs contain virus and should be placed in a different incubator.

البيض الملقح يحتوي على الفيروس ويجب وضعه في حاضنة أخرى.

7.6 Cleaning and decontamination of incubators / نظيف و تطهير الحاضنة

Keep surfaces clean by wiping out with a wet cloth and disinfecting with 70 percent alcohol solution or a non-corrosive disinfectant.

حفاظ على أسطح الحاضنة نظيفة عن طريق المسح بقطعة قماش مبللة وتطهيرها ب 70 في المئة من محلول الكحول أو أي مطهر آخر غير قابل للتآكل.

7.7 Candling eggs / تشميع البيض

Candling is the process of holding a strong light above or below the egg to observe the embryo. A candling lamp consists of a strong electric bulb covered by a plastic or aluminium container that has a handle and an aperture. The egg is placed against this aperture and illuminated by the light. If you do not have a candling lamp, improvise. Try using a torch. Candling is done in a darkened room or in an area shielded by curtains.

التشميع هو عملية عقد ضوء قوي من أعلى أو أسفل البيضة بهدف مراقبة الجنين. مصباح التشميع يتألف من مصباح كهربائي قوي مغطى بالبلاستيك أو حاوية من الألومنيوم الذي يحتوي على مقبض وفتحة. يتم وضع البيض مقابل هذه الفتحة ويتم إضاءتها بالنور. إذا لم يكن لديك مصباح تشميع. حاول استخدام الشمعة. يتم التشميع في غرفة مظلمة أو من خلف الستائر.

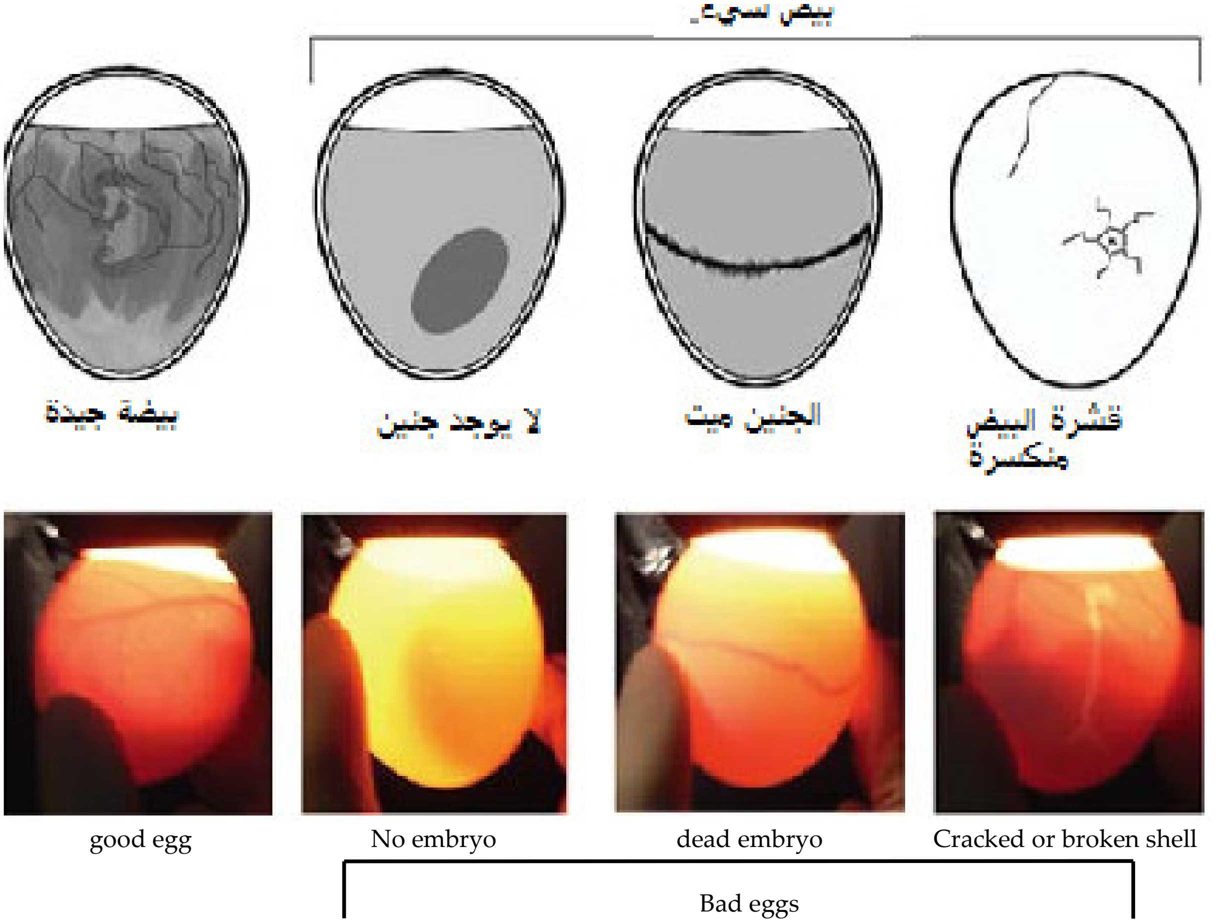


Fig 3.1 see plate 16 for color version .الشكل 3.1 أنظر الصفيحة 16 لنسخة ملونة

7.8 Marking the inoculation site / *تعيين مكان التلقيح*

1) Hold the blunt end of the egg against the aperture of the candling lamp and note the position of the head of the embryo.
2) Turn the egg a quarter turn away from the head.
3) Draw a line on the shell marking the edge of the air sac.
4) Draw an X approximately 2 mm above this line.
5) The X marks the inoculation site.

__Note:__ In some eggs the air sac will have not developed on the blunt end but half way down the egg. These eggs are not suitable for vaccine production.

1) ضع يدك عند النهاية الحادة للبيضة مقابل فتحة المصباح ثم لاحظ موقع رأس الجنين.

2) ادر البيضة ربع دوره بعيدا عن الرأس.

3) ارسم خطا على قشرة البيضة لتعليم مساحة الكيس الهوائي.

4) ضع إشارة على حوالي 2 مم فوق هذا الخط.

5) مكان هذه الإشارة يكون موقع التلقيح.

__ملاحظة:__ بعض البيض لديهم كيس هوائي غير مكتمل في مكانه ولكن من نصف البيضة إلى أسفلها. وهو غير مناسبا لإنتاج اللقاح.

8 Protocol: Inoculation of embryonated eggs with influenza virus by the allantoic cavity route /تلقيح أنسجة البيض عن طري الالونتويك كافتي

The most convenient method of propagating of influenza virus in the laboratory is by the inoculation of the allantoic cavity of embryonated eggs. All strains of virus will grow in the cell of the allantoic cavity. The virus enters these cells where it multiplies. As the cells are disrupted the virus is shed into the allantoic fluid. Virulent strains of the virus will invade cells beyond the lining of the allantoic cavity and kill the embryo. The time taken for this to occur is the basis of the "Mean Death Time Assays", which indicates the level of virulence. The avirulent strain of influenza virus will not kill embryos inoculated into the allantoic cavity.

Inoculation of the allantoic cavity of embryonated eggs is a technique used in the following procedures:

1. influenza virus vaccine production
2. Establishing the infectivity titre of a suspension of virus.
3. Isolation of virus from field specimens for laboratory Diagnosis

الطريقة الأكثر ملاءمة لنشر فيروس الإنفلونزا في المختبر هي التلقيح عن طريق الالونتويك كافتي لخلايا البيض. لأن جميع سلالات الفيروس تنمو داخل هذه الخلايا. عندما يدخل الفيروس هذه الخلايا تتوقف عن التكاثر. فيقع الفيروس في سائل الالونتويك كافتي والسلالات الفيروس القاتلة تغزو الخلايا خارج بطانة الالونتويك كافتي وتقتل الجنين. الوقت المستغرق لهذا الحدث هو أساس ما يسمى "يعني الموت وقت فحوصات" ، مما يدل على مستوى من العنف والحدة. أمّا السلالات الغير قاتلة من فيروس الانفلونزا لا تقتل الجنين الملقح في الالونتويك كافتي. التقنية المستخدمة لتلقيح البيض هي عن طريق الالونتويك كافتي ضمن الإجراءات التالية:

1. إنتاج لقاح فيروس الإنفلونزا .
2. إنشاء كمية من عدوى الفيروس المتوقف عن العمل
3. عزل الفيروس من العينات الميدانية للمختبرات التشخيصية

8.1 Inoculation of the allantoic cavity / تلقيح الالونتويك كافتي

Materials

Eggs 9-day old or 10-day old embryonated eggs. Candle the eggs and mark the inoculation sites . Eggs should be placed in an egg rack with the inoculation site uppermost.

- Egg shell punch or forceps.
- Cotton.
- A 70 % alcohol solution in water.
- Syringe 1 mL.
- Needles preferably 25 gauge, 16 mm.
- sticky tape or melted wax to seal the inoculation site.
- Inoculum. This must be free of microbial contamination.
- Discard tray.

المواد

بيض ملقح من عمر 9 إلى 10 أيام . تشميع البيض وتعليم مواقع التلقيح. يجب وضع البيض في رفوف البيض بعد التلقيح من الجهة العليا.

- مخرمة لتقشر البيض أو ملقط.
- قطن.
- محلول الكحول 70 في المئة في الماء.
- حقنة 1 مل.
- حقن يفضل مقياسها 25 أو 16 ملم.
- شريط لاصق أو شمع ذائب لإغلاق موقع التلقيح.
- اللقاح ويجب أن يكون خالي من التلوث الميكروبي.
- طبق أو صينية لرمي النفايات.

Method

1. Use cotton wool and 70 percent alcohol to swab the end of the eggs to be inoculated. Allow the alcohol to evaporate.
2. Swab the eggshell punch with 70 percent alcohol solution. Place used cotton wool in discard tray.
3. Pierce a hole in the end of the egg at the marked inoculation site.
4. Attach needle to 1 mL syringe.
5. Draw inoculum into 1 mL syringe.
6. Keeping the needle and syringe vertical, place the needle through the hole in the eggshell. The needle will need to penetrate approximately 16mm into the egg to reach the allantoic cavity.
7. Inject 0.1 mL of inoculum into the egg.
8. Withdraw the needle from the egg.
9. Seal the hole in the shell with stationery tape or melted wax.
10. Discard the used needles and syringes.
11. Place the inoculated eggs into a second incubator. Check the temperature and humidity of incubator.

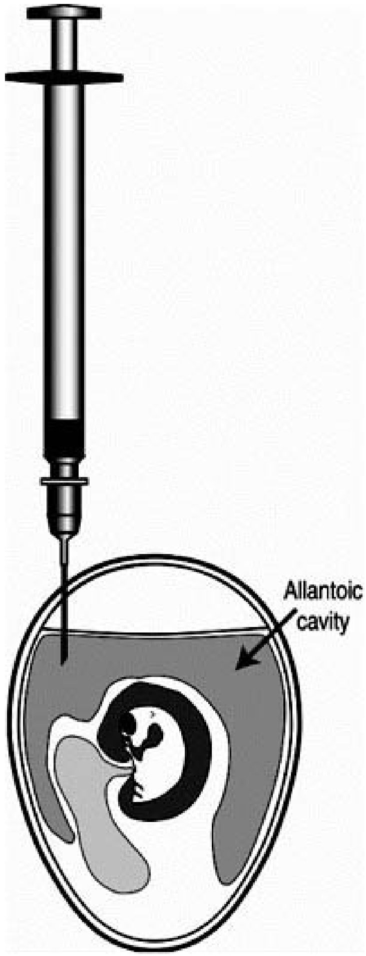


Figure 2: Inoculation of the allantoic cavity

صورة 2: تلقيح عبر الألونتويك كافتي

الطريقة

1. استخدم القطن و محلول الكحول لمسح مكان الكيس الهوائي للبيض مكان تعيين التلقيح. ثم إسمح لمحلول الكحول أن يتبخر.
2. إمسح مكان ثقب قشرة البيضة في 70 في المئة من محلول الكحول ضمن الصينية المعدة للنفايات مع القطن.
3. أثقب قشرة البيضة في المكان المعين للتلقيح .
4. جهز الحقنة على 1 مل.
5. أدخل اللقاح في الحقنة إلى 1 مل.
6. حافظ على الإبرة عاموديا ضع الإبرة من خلال الثقب في قشرة البيضة. الإبرة بحاجة أن تدخل لحوالي 16مم في البيضة لتصل إلى الالونتويك كافتي.
7. أحقن البيضة ب 0.1 مل من اللقاح.
8. إسحب الإبرة من البيضة .
9. أغلق ثقب القشرة بالمادة اللاصقة .
10. إرمي الحقن و الإبر المستعملة .
11. ضع البيضة الملقحة في حاضنة أخرى. تحقق من حرارة و رطوبة الحاضنة.

8.2 Harvesting allantoic fluid to test for presence of Haemagglutinin / *حصد الالونتويك كافتي لفحص وجود الهيماكلوتينين*

The following method describes harvesting a small sample of allantoic fluid for testing for the presence of

الطريقة التالية تصف كيفية حصد كمية صغيرة من سائل الالونتويك لفحص وجود الهيماكلوتينين (ها1). عبر فحص

haemagglutinin using the rapid or micro tests.

Materials

- Forceps or a small pair of scissors
- Absolute alcohol for flaming forceps
- Cotton.
- 70 percent alcohol solution
- Discard tray
- 50 µL micropipette and tips, a wire loop or sterile Pasteur pipettes

Method

1. Chill eggs at 4oC for at least two hours to kill the embryo and to reduce the contamination of the allantoic fluid with blood during harvesting.
2. Remove sticky tape (if used to seal the eggs) and swab each egg with cotton wool soaked with 70 percent alcohol to disinfect and remove condensation from the shells.
3. Dip the forceps or scissors in absolute alcohol and flame to sterilize. Remove the eggshell above the air space.
4. Discard embryos that are visibly contaminated.
5. Remove a sample of allantoic fluid from each egg. Use a micropipette and sterile tip, sterile glass pipette or a flamed loop and dispense the sample according to method being used for the test

سريع .

المواد

- ملقط أو مقص صغير .
- كحول لتعقيم الملقط.
- قطن .
- 70 في المئة من محلول الكحول.
- صينية لرمي النفايات.
- ممصة 50 ميكرو ليتر مع تيبس (tips) , مع قطارة.

الطريقة

1.برّد البيض على 4 درجة مئوية لمدة ساعتين لقتل الجنين و لتقليل تلوث سائل الالونتويك بالدم أثناء الحصد .

2.إنتزع المادة اللاصقة(التي تم استعمالها سابقا) و امسح كل بيضة بالقطن المبلل ب 70 في المئة من الكحول لتطهير و إزالة كثافة القشرة.

3.أغمس الملقط أو المقص في الكحول ثم فوق النار للتعقيم.

4.إنتزع قشرة البيضة فوق منطقة الهواء .

5.إرمي الأجنة لأنها بالتأكيد ملوثة.

6.إنتزع سائل الالونتويك من كل بيضة . بإستعمال ماصة ميكرو(micropipette) و تيب (tip) معقم.

8.3 Haemagglutination test / فحص الهيماكلوتينيشن

This is the result of the haemagglutinin part of the haemagglutinin/ neuraminidase viral protein binding to receptors on the membrane of red blood cells. The linking together of the red blood cells by the viral particles results in clumping. This clumping is known as haemagglutination. Haem-agglutination is visible macroscopically and is the basis of haemagglutination tests to detect the presence of viral particles. The test does not discriminate between viral particles that are infectious and particles that are degraded and no longer able to infect cells. Both can cause the agglutination of red blood cells.

هذه هي نتيجة جزء هيماكلوتينين من الهيماكلوتينين /النورامينيداز باتصاله مع المستقبل (receptor) على غشاء الكريات الحمراء. هذا الاتصال هو نتيجة دموية. هذه النتيجة الدموية (التجمد) تسمى بالهيماكلوتينيشن. الهيماكلوتينيشن يرى نظريا و هو أساس فحص الهيماكلوتينيشن لتحديد وجود الفيروس. هذا الفحص لا يميز بين الفيروسات المكتملة والفيروسات المدمرة والغير قادرة على إصابة الخلايا. الأن الاثنين يسببان بالهيماكلوتيتيشن مع الكريات الحمراء .

8.3.1 Red blood cell control in the haemagglutination test / تحكم الكريات الحمراء بفحص الهيماكلوتينيشن

Every time a haemagglutination test is carried out, it is necessary to test the settling pattern of the suspension of red blood cells. This involves mixing diluent with red blood cells and allowing the cells to settle.

1. Dispense diluent.
2. Add red blood cells and mix by gently shaking.
3. Allow the red blood cells to settle and observe the pattern.
4. Observe if the cells have a normal settling pattern and there is no auto-agglutination. This will be a distinct button of cells in the micro test and an even suspension with no signs of clumping in the rapid test.

Note: The diluent used for haemag-glutination tests in this manual is PBS. There should be no signs of haemolysis in the red blood cell suspension. If there are signs of haemolysis, a fresh suspension must be prepared. There should not be any sign of auto-agglutination in the red blood cell control. If an agglutination pattern is observed, discard the suspension of red blood cells. Prepare a fresh suspension and test again.

في كل مرة يتم إجراء فحص الهيماكلوتينيشن , الضروري لفحص العينة المترسخة من تعليق كريات الدم الحمراء . وتتم هذه العملية بخلط مخفف من السائل مع كريات الدم الحمراء ثم السماح للخلايا أن تترسخ.

1. إستغني عن التخفيف .
2. اضف الكريات الدم الحمراء و اخلط بنعومة .
3. إسمح لكريات الدم الحمراء بالترسخ وأنظر إلى العينة
4. انظر إذا كانت الخلايا تملك ترسخ في العينة طبيعيا وأنه غير مجمد نفسه وهذا سيميز برعم الخلايا في الفحص الدقيق وحتى في التعليق من دون أي إشارة للتجمد في الفحص السريع.

<u>ملاحظة</u>: السائل المخفف المستعمل في فحص الهيماكلوتينيشن هو بي بي أس (PBS). يجب أن لا يكون هناك أي إشارة لإنحلال كريات الدم الحمراء المعلقة . أمّا إذا كانت توجد هذه الإشارة ,يجب تحضير معلق آخر. يجب أن لا يكون هناك أي إشارة للتجمد الذاتي لكريات الدم الحمراء .أمّا إذا كان هذا التجمد واضحا, فيجب رمي التعليق من كريات الدم الحمراء. وتحضير تعليق آخر لفحص آخر.

9 Introduction to Cell Based Virus Propagation: Tissue Culture Methods / مدخل: طرق زراعة الأنسجة

9.1 Types of cells grown in culture / أنواع الخلايا التي تتكاثر خلال الزراعة

Tissue culture is often a generic term that refers to both organ culture and cell culture and the terms are often used interchangeably. Cell cultures are derived from either primary tissue explants or cell suspensions. Primary cell cultures typically will have a finite life span in culture whereas continuous cell lines are, by definition, abnormal and are often transformed cell lines.

زرع الأنسجة: يعود هذا المصطلح لزرع الخلايا و زرع الأعضاء وغالباً ما يستخدم بالتبادل بينهما.زرع الخلايا يأتي إمّا من حصد الأنسجة البدائية أو من الخلايا المعلقة. زرع الخلايا البدائية عادةً تعيش لفترة قصيرة بينما خطوط الخلايا المستمر بالتطور هو غير طبيعي و غالباً ما سيتحول.

9.1.1 Primary cell cultures / زرع الخلايا البدائية أو الأولية

When cells are taken freshly from animal tissue and placed in culture, the cultures consist of a wide variety of cell types, most of which are capable of very limited growth in vitro, usually fewer than ten divisions. These cells retain their diploid karyotype, i.e., they have the chromosome number and morphology of their tissues of origin. They also retain some of the differentiated characteristics that they possessed in vivo. Because of this, these cells support the replication of a wide range of viruses. Primary cultures derived from monkey kidneys, mouse fetuses, and chick embryos are commonly used for diagnostic purposes and laboratory experiments.

عندما تؤخذ الخلايا طازجة من انسجة الحيوان و توضع للزراعة ,تكون هذه الخلايا محتوية على عدد كبير من عدّة أنواع من الخلايا و معظم الذين يقدرون على العيش خارج الجسم(في المختبر) لا يستطيعون أن ينقسموا إلى أكثر من 10 إنقسامات. هذه الخلايا تحتفظ بنواة الخلية (karyotype) مثل الإحتفاظ بعدد الصبغيات أو الكروموزومات: (chromosomes) و شكلها كخلاياها الأصلية تماماً.كما تحتفظ ببعض خصائصها الإنقسامية (differenciated) كما كانت داخل الجسم.لهذا السبب , تكون هذه الخلايا محطة تكاثر للعديد من الفيروسات. عادةً الخلايا البدائية المستخرجة من كلى القرد , جنين الفأر ,و جنين الدجاجة تستخدم لدوافع تشخيصية و تجارب مخبرية.

9.1.2 Diploid cell strains / سلالات الخلايا المضاعفة

Some primary cells can be passed through secondary and several subsequent subcultures while retaining their original morphological characteristics and karyotype. Subcultures will have fewer cell types than primary cultures. After 20 to 50 passages in vitro, these diploid cell strains usually undergo a crisis in which their growth rate slows and they

بعض الخلايا الأولية تستطيع أن تنتقل إلى المرحلة الثانية أو إلى عدة مراحل أخرى من الزراعة الثانوية مع الإحتفاظ بخصائصها الأصلية كالشكل و نواة الخلية (karyotype). الزراعة الثانوية ستملك الآن عدد أقل من الخلايا عمّا كان في المرحلة الأولى. بعد 20إلى 30 مرحلة في المختبر , عادةً سلالات هذه الخلايا المضاعفة تمر في أزمة تؤدي في إبطاء نموها ثم في النهاية

eventually die out. Diploid strains of fibroblasts derived from human fetal tissue are widely used in diagnostic virology and vaccine production.

إلى موتها. سلالات fibroblast المضاعفة و المستخرجة من أنسجة جنين الإنسان تستعمل في التشخيص الفيرولوجي و في إنتاج اللقاح بشكل واسع.

9.1.3 Continuous cell lines / خطوط الخلايا المستمرة بالتطور

Certain cultured cells, notably mouse fetal fibroblasts, kidney cells from various mammalian species, and human carcinoma cells, are able to survive the growth crisis and undergo indefinite propagation in vitro. After several passages, the growth rate of the culture slows down; then isolated colonies of cells begin to grow more rapidly than diploid cells, their karyotype becomes abnormal , their morphology changes, and other poorly understood changes take place that make the cells immortal. The cells are now "dedifferentiated," having lost the specialized morphology and biochemical abilities they possessed as differentiated cells in vivo. Continuous cell lines and HeLa, both derived from human carcinomas, support the growth of a number of viruses.

بعض الخلايا المزروعة لا سيما خلايا الليمفية(fibroblast) لجنين الفأر ,خلايا الكلى من عدة أنواع من الثديات , و خلايا الإنسان السرطانية , قادرة على العيش رغم الأزمات المتكررة التي تتعرض لها في المختبر. بعد عدة مراحل, نسبة نمو الزرع ستنخفض , أما مجموعات الخلايا المعزولة ستبدأ بالنمو بسرعة أكبر من الخلايا المضاعفة, ونواة الخلايا ستصبح غير طبيعية , شكلها سيتغير, و تغيرات أخرى غير مفهومة ستحدث لتجعل الخلايا حية لمدى طويل. الخلايا الآن أصبحت غير قادرة على الإنقسام (dedifferenciated), بعد أن خسرت شكلها الخاص و قدرتها الكيميائية الحيوية. خطوط الخلايا المستمرة و خلايا هيلا (HeLa) , المأخوذين من خلايا إنسانية السرطانية, و التي تساعد على نمو عدد كبير من الفيروس.

9.2 Working area and equipment / *مكان العمل و المعدات*

9.2.1 CO_2 Incubators / معدل ثاني أوكسيد الكربون في الحاضنة

The cells are grown in an atmosphere of 5-10% CO_2 because the medium used is buffered with sodium bicarbonate/carbonic acid and the pH must be strictly maintained. Culture flasks should have loosened caps to allow for sufficient gas exchange. Cells should be left out of the incubator for as little time as possible and the incubator doors should not be opened for very long. The humidity must also be maintained for those cells growing in tissue culture dishes so a pan of water is kept filled at all times.

تنمو الخلايا في فضاء يحتوي من 5-10% من ثاني أوكسيد الكربون لأن الوسط المغذي يحتوي على عازل يتضمن بيكاربونات الصوديوم \أسيد الكاربونيك و يجب أن تكون درجة الحموضة ثابتة بدقة. لا يجب أن يكون غطاء قوارير الزراعة محكماً ليسمح بتغير الهواء. يسمح للخلايا أن تخرج من الحاضنة لوقت قصير جداً و كذلك باب الحاضنة يمكن فتحه لفترة قصيرة. كما يجب المحافظة على معدل نسبة الرطوبة في الحاضنة من خلال المحافظة على وجود وعاء ماء دائماً فيها لضمان نمو الخلايا.

9.2.2 Microscopes / المجهر

Inverted phase contrast microscopes are used for visualizing the cells. Before using the microscope, check that the phase rings are aligned.

الطبقة المعاكسة للمجهر هي التي تستخدم لمشاهدة الخلايا. تأكد من محاذات الطبقة الدائرية للمجهر قبل الإستعمال.

9.2.3 Vessels / الأوعية

The vessels should be transparent surface that will allow cells to attach and allow movement for growth. The most convenient vessels are specially-treated polystyrene plastic that are supplied sterile and are disposable. These include petri dishes, multi-well plates, microtiter plates, roller bottles, and screwcap flasks .

يجب أن تكون الأوعية ذو سطح شفاف لتسمح للخلايا بأن تتجمع و تتحرك لنمو. و من الأوعية الأكثر ملاءمةً تلك المصنوعة من بلاستيك البوليستيرين و التي يمكن أن نجده معقماً ثم نقدر على رميه بسهولة. تتضمن هذه الأوعية : علبة بتري, multi-well plates, microtiter plates, roller bottles, and screwcap flasks

9.3 Preservation and storage of tissue cells / الحفظ و التخزين

(If available) liquid N_2 is used to preserve tissue culture cells, either in the liquid phase (-196°C) or in the vapor phase (-156°C). Freezing can be lethal to cells due to the effects of damage by ice crystals, alterations in the concentration of electrolytes, dehydration, and changes in pH. To minimize the effects of freezing, several precautions are taken. First, a cryoprotective agent which lowers the freezing point, such as glycerol or DMSO, is added. A typical freezing medium is 90% serum, 10% DMSO. In addition, it is best to use healthy cells that are growing in log phase and to replace the medium 24 hours before freezing. Also, the cells are slowly cooled from room temperature to -80°C to allow the water to move out of the cells before it freezes. The optimal rate of cooling is 1°-3°C per minute.

The Mr. Frosty is filled with 200 ml of isopropanol at room temperature and the freezing vials containing the cells are placed in the container and the container is placed in the -80°C freezer. The effect of the isopropanol is to allow the tubes to come to the temperature of the freezer slowly, at about 1°C per minute.

(اذا كان متوفراً) يستعمل سائل النيتروجين لحفظ أنسجة الخلايا المزروعة, إما أن يكون سائلاً (-196°c)أو غازياً (-156°c). هذه المرحلة يمكن أن تقتل الخلايا بسبب قطع الثلج الموجودة, أو عبر تعديل تركيز الإلكتروليت, الجفاف,أو من درجة الحموضة المتغيرة. لتقليل هذه المؤثرات الثلجية, إجراءات عديدة يمكن أخذها: أولاً, من عوامل الحماية التي تقلل من درجة التجمد, زيادة الكليسرول أو DMSO. وسط التجميد المغذي النموذجي يحتوي على 90% من المصل, 10% من DMSO. بالإضافة إلى ذلك, فمن الأفضل إستعمال خلايا سليمة و التي تقدر على النمو لفترة طويلة مع إستبدال الوسط المغذي قبل 24 ساعة من التجميد. أيضاً عملية تجميد الخلايا تتم ببطء من درجة حرارة الغرفة إلى -80°c للسماح للماء بالخروج من داخل الخلايا. أفضل نسبة للتبريد هي من 1 إلى -3°c في الدقيقة . السيد فروستي أضاف 200 مل من الإيزوبروبانول على درجة حرارة الغرفة إلى قارورة الخلايا التي ستتجمد على-80°c.دور الإيزوبروبانول هو تبطيء سرعة التجمد إلى 1°c

بالدقيقة.

MAINTENANCE

Cultures should be examined daily, observing the morphology, the color of the medium and the density of the cells. A tissue culture log should be maintained that is separate from your regular laboratory notebook. The log should contain: the name of the cell line, the medium components and any alterations to the standard medium, the dates on which the cells were split and/or fed, a calculation of the doubling time of the culture (this should be done at least once during the semester), etc.

المتابعة

يجب أن تفحص الخلايا المزروعة يومياً, لمراقبة شكلها, لون الوسط المغذي و كثافة الخلايا. لذلك يجب أن يكون هناك سجل خاص في المختبر يدوّن عليه جميع تغيرات الخلايا المزروعة. يحتوي هذا السجل على: إسم خطوط الخلايا, محتويات الوسط المغذي و أي تعديل تم فيه, تاريخ متى تم فصل الخلايا و\أو تغذيتها, حساب الوقت المضاعف للزرع (و هذا يجب أن يفعل مرة واحد في الفصل على الأقل), و ما إلى ذلك.

9.4 Harvesting and refeeding culture cells / الحصاد

Cells are harvested when the cells have reached a high density which suppresses growth.

يتم حصد الخلايا عندما تصل إلى مرحلة الكثافة العالية التي تقمع النمو .

9.4.1 Suspension culture / زراعت الخلايا الغير ملتصقة

Suspension cultures are fed by dilution into fresh medium.

يتم زرع الخلايا الغير ملتصقة في وسط غذائي طازج ومخفف.

9.4.2 Adherent cultures / زراعت الخلايا الملتصقة

Adherent cultures that do not need to be divided can simply be fed by removing the old medium and replacing it with fresh medium.

When the cells become semi-confluent, several methods are used to remove the cells from the growing surface so that they can be diluted.

زراعت الخلايا الملتصقة التي لا تحتاج للتقسيم يمكن بسهولة تغذيتها عن طريق إزالة الوسط الغذائي القديم و استبداله بوسط غذائي جديد وطازج.

وعندما تصبح الخلايا شبه منتفخة, يمكن إستعمال عدة طرق لإزالتها من السطح المغذي لذا يجب تخفيفها.

9.4.2.1 Mechanical / ميكانيكيا

A rubber spatula can be used to physically remove the cells from the growth surface. This method is quick and easy but is also disruptive to the cells and may result in significant cell death. This method is best when harvesting many different samples of cells for preparing extracts.

يمكن إستعمال الملعقة المطاطية لإزالة الخلايا عن السطح المغذي. هذه الطريقة سريعة و سهلة و لكنها تؤدي إلى اضطراب الخلايا و موتهم. هذه الطريقة مفضلة عند حصاد عدة أنواع من الخلايا لإعداد المستخلصات.

9.4.2.2 Proteolytic enzymes / أنزيمات التحلل البروتييني

Trypsin, collagenase, or pronase, usually in combination with EDTA, causes cells to detach from the growth surface. This method is fast and reliable but can damage the cell surface by digesting exposed cell surface proteins. The proteolysis reaction can be quickly terminated by the addition of complete medium containing serum

التريبسين , الكولاجوناز , أو البروناز , وعادةً يخلط مع إي دي تي آي, والسبب لنزع الخلايا من السطح المغذي. هذه الطريقة سريعة و موثوقة ولكنها تسبب في تدمير سطح الخلايا من خلال هضم البروتيينات الموجودة على سطح الخلية. ردّ فعل التحلل البروتييني يمكن إيقافته بسرعة بزيادة وسط غذائي كامل يحتوي على المصل.

9.4.2.3 EDTA / إي دي تي آي

EDTA alone can also be used to detach cells and seems to be gentler on the cells than trypsin.

EDTA يمكن أن يستعمل وحده لفصل الخلايا ومن الملاحظ أنّه ألطف من التريبسين.

9.4.2.4 Procedure for detaching cells / الإجراءات المعتادة لفصل الخلايا الملتصقة

The standard procedure for detaching adherent cells is as follows:

1. Visually inspect daily
2. Release cells from monolayer surface
3. wash once with a buffer solution
4. treat with dissociating agent
5. observe cells under the microscope
6. Incubate until cells become rounded and loosen when flask is gently tapped with the side of the hand.
7. Transfer cells to a culture tube and dilute with medium containing serum.
8. Spin down cells, remove supernatant and replace with fresh medium.
9. Count the cells in a hemacytometer, and dilute as appropriate into fresh medium.

الإجراءات المعتادة لفصل الخلايا الملتصقة هي:

1. الفحص النظري
2. إصدار الخلايا من طبقة الخلايا السطحية.
3. اغسل مرة واحدة بالمحلول العازل
4. معالجة العوامل المتفككة .
5. مراقبة الخلايا تحت المجهر.
6. حضن الخلايا إلى أن تصبح دائرية .
7. نقل الخلايا إلى أنبوب زراعي و خففه بالوسط (medium) المحتوي على المصل.
8. تدوير الخلايا في الأسفل , لذا يجب إزالة الطبقة العائمة و استبدالها بوسط طازج .
9. حسب الخلايا في الهيموسيتومتر ,وخففه حسب الطلب بوسط طازج.

9.5 Media and growth requirements / *متطلبات الوسط الغذائي والنمو*

9.5.1 Physiological parameters / المقاييس الفزيولوجية

- temperature - 37C for cells from homeother
- pH - 7.2-7.5 and osmolality of medium must be maintained

- درجة حرارة الخلية 37 .
- يجب المحافظة على درجة الحموضة بين 7.5-7.2 و على

- humidity is required
- gas phase - bicarbonate conc. and CO_2 tension in equilibrium
- visible light - can have an adverse effect on cells; cells should be cultured in the dark and exposed to room light as little as possible

osmolality of medium

- المحافظة على الرطوبة المطلوبة.
- المحافظة على توازن طبقة الغاز_كمية البيكربونات_و ثاني أوكسيد الكربون.
- الضوء المرئي_يستطيع أن يلحق ضرر بالخلايا, لذا يجب أن تزرع الخلايا في الظلام وأن لا تعرض للضوء على أكبر قدر ممكن.

9.5.2 Medium requirements (often empirical) / متطلبات الوسط الغذائي (غالباً تجريبي)

- Bulk ions - Na, K, Ca, Mg, Cl, P, Bicarb or CO_2
- Trace elements - iron, zinc, selenium
- sugars - glucose is the most common
- amino acids - 13 essential
- vitamins - B, etc.
- choline, inositol
- serum - contains a large number of growth promoting activities such as buffering toxic nutrients by binding them, neutralizes trypsin and other proteases, has undefined effects on the interaction between cells and substrate,and contains peptide hormones..
- antibiotics - although not required for cell growth, antibiotics are often used to control the growth of bacterial and fungal contaminants.

- معظم الإيونات هم من السوديوم ,البوتاسيوم ,الكالسيوم ,المانييزيوم ,الكلور ,الفوسفور ,البيكاربونات ,أو ثاني أوكسيد الكربون.
- العناصر المؤثرة هم الإيرون ,الزنك ,السلينيوم .
- السكر :الأكثر شيوعاً هو الغلوكوز .
- الحمض الأميني : هم 13 الأساسين .
- الفيتامين :ب, ...
- الكولين ,الإينوزيتول.
- المصل :يحتوي على عدد كبير من العوامل المساعدة للنمو مثل التواصل مع عازل المواد الغذائية السامة .و التي تعمل على توقيف عمل التريبسين (Trypsin) و غيره من البروتيياز (proteases) وآثاره الغير معروفة بتفاعله بين الخلايا و الطبقة التحتية و هو يحتوي على هورمون الببتيد (peptide).
- المضادات الحيوية :بالرغم من أنها غير مطلوبة لنمو الخلايا , إلاّ أناه عالباً ما تستعمل للتحكم بنمو البكتريا و الفطريات الملوثة.

9.5.3 Feeding / التغذية

2-3 times/week

التغذية من 2-3 مرات في الأسبوع

9.5.4 Measurement of growth and viability / مقياس النمو و القدرة على العيش

The viability of cells can be observed visually using an inverted phase contrast microscope. Live cells are phase bright; suspension cells are typically rounded and somewhat

يمكن أن نتأكد من وجود الخلايا بواسطة الميكروسكوب . فالخلايا الحية توجد في الطبقة الضوئية ,أمّا الخلايا المعلقة عادةً تكون دائرية ومتماثلة إلى حد ما , الخلايا الملتصقة ستسقط

symmetrical; adherent cells will form projections when they attach to the growth surface. Viability can also be assessed using the vital dye, trypan blue, which is excluded by live cells but accumulates in dead cells. Cell numbers are determined using a Hemacytometer.

عندما تعلق على سطح النمو ويمكن إستعمال التريبان الأزرق (trypan blue) لتحديد أكثر بين الخلايا الحية و الخلايا الميتة فيعطى اللون الأزرق للخلايا الميتة فقط. و يمكن حساب عدد الخلايا بإستعمال الهيماسيتومتر (Hemacytometer).

9.6 Safety considerations / إرشادات السلامة

Assume all cultures are hazardous since they may harbor latent viruses or other organisms that are uncharacterized.

The following safety precautions should also be observed:

- pipetting: use pipette aids to prevent ingestion and keep aerosols down to a minimum
- no eating, drinking, or smoking
- wash hands after handling cultures and before leaving the lab
- decontaminate work surfaces with disinfectant (before and after)
- autoclave all waste
- use safety cabinet when working with hazardous organisms.
- use aseptic technique
- dispose of all liquid waste after each experiment.

جميع الخلايا المزروعة تحمل الخطر منذ وجود الفيروس أو الكائنات الأخرى الغير معروفة . لذلك أن تؤخذ إحتياطات السلامة التالية بعين الإعتبار:

- عملية الإمتصاص (pipetting): يجب إستعمال الممصة(pipette) لمنع دخول الهواء في السوائل والمحافظة على انخفاض كميته إلى أدنى مستوى.
- عدم الأكل , الشرب , أو التدخين.
- غسل الأيدي بعد العمل في زرع الخلايا وقبل ترك المختبر.
- تنظيف أسطح العمل وتطهيرهم (قبل و بعد).
- تعقيم جميع الأواني.
- إستعمال حجرة الأمان (safety cabinet) عند العمل بالكائنات الخطرة .
- إستعمال تقنية التعقيم.
- التخلص من جميع النفايات السائلة بعد كل تجربة.

9.7 Tissue culture procedures / إجراءات زراعة الأنسجة

The cells should be monitored daily for morphology and growth characteristics, fed every 2 to 3 days, and subcultured when necessary. A minimum of two 25 cm^2 flasks should be carried for each cell line. Each time the cells are subcultured, a viable cell count should be done, the subculture dilutions should be noted, and, after several passages, a doubling time determined. As soon as you have enough cells, several vials should be frozen away and stored in liquid N_2.

يجب أن تراقب الخلايا يومياً من حيث شكلها وخصائص نموها , وتغذيتها كل 2 أو 3 أيام ,و إعادة زراعتها (subcultured) عند الضرورة. يجب إعداد إثنين من القوارير 25سم^2 على الأقل لكل خط من الخلية ,في كل مرة يتم (subcultured) الخلية يجب حساب الخلايا القابلة للنمو وتخفيف (subcultured) , وبعد عدة مراحل نحدد ضعف الكمية.و في أسرع وقت يجب تجميد ما لديك من الخلايا في عدة قوارير ثم تخزينها في سائل النيتروجين (N_2).و نذوب عينة

One vial from each freeze down should be thawed 1-2 weeks after freezing to check for viability. These frozen stocks will prove to be vital if any of your cultures become contaminated.

من كل تخزين بعد 1-2 أسبوعين من التجميد لنتحقق من صلاحيتها و لنتأكد من أن الخلايا حية و خالية تماماً من أي تلوث.

the minimal nutritional requirements of cultured cells :mixture of salts, amino acids, vitamins and cofactors, carbohydrates, and horse serum. By eliminating one component at a time , then determined which nutrients were essential for cell growth. His minimum essential medium (MEM) contains 13 amino acids (human tissue in vivo requires only eight), 8 vitamins and cofactors, glucose as an energy source, and a physiological salt solution that is isotonic to the cell. The pH is maintained at 7.2 to 7.4 by $NaHCO_3$ in equilibrium with CO_2. The pH indicator phenol red is usually incorporated into the medium; it turns red-purple if the medium is basic, yellow if the medium is acidic, and remains red-orange if the pH is in the right range.

الحد الأدنى من المتطلبات الغذائية لزراعة الخلايا يتكون من: خليط من الأملاح أحماض أمينية, فيتامينات و العوامل المساعدة له, الكربوهيدرات و مصل الحصان. و من خلال القضاء على عنصر واحد في وقت واحد يتم تحديد العناصر الغذائية الضرورية لنمو الخلايا. (MEM)يحتوي على 13 عنصر من الحمض الأميني (أنسجة الإنسان داخل الجسم تتطلب 8 منهم فقط). 8 من الفيتامين و العوامل المساعدة له, الغلوكوز كمصدر للطاقة , ومحلول الأملاح الفيزيولوجية المتساوية مع الخلية. درجة الحصموضة تثبت على 7.2 إلى 7.4 بإستعمال كاربونات الصوديوم ($NaHCO_3$) بتوازن مع ثاني أوكسيد الكربون (CO_2) و مؤشر درجة الحموضة للفينول الأحمر (Phenol red) عادةً ما يستخدم في الوسط (medium), ليعطي اللون الأحمر الأرجواني إذا كان الوسط (basic) واللون الأصفر إذا كان (acid) واللون الأحمر الليموني إذا كان في نطاقه الصحيح.

Serum in concentrations of 1 to 10% must be added to the medium to provide the cells with additional poorly defined factors, without which most cells will not grow. Most mammalian cells are incubated at 37°C; avian, reptilian, and arthropod cells may grow best at higher or lower temperatures.

يجب إضافة 1إلى 10 %من تركيزات(concentrations) المصل على الوسط مع إضافة ضعف العوامل المحددة لزيادة عدد الخلايا. والتي بدونها لن تنمو معظم الخلايا. الكثير من خلايا الثديات تحتضن على 37 درجة مئوية , أما خلايا الطيور, الزواحف والمفصليات قد تنمو أفضل على درجة أعلى أو أدنى من 37م° .

9.7.1 Subculturing adherent cells / الزراعة الفرعية للخلايا الملتصقة

When adherent cells become semi-confluent, subculture using 2 mM EDTA or trypsin/EDTA.

عندما تصبح الخلايا شبه متراكمة, تستخدم الزراعة الفرعية 2Mm من أسيد ايتيلين ديامين تترأستيك (EDTA) أو التريبسين EDTA/.

9.7.2 Trypsin-EDTA / EDTA - التريبسين

- Remove medium from culture dish

- أزال الوسط من علبة الزراعة و غسل الخلايا بمحلول الملح

and wash cells in a balanced salt solution without Ca++ or Mg++. Remove the wash solution.

- Add enough trypsin-EDTA solution to cover the bottom of the culture vessel and then pour off the excess.
- Place culture in the 37°C incubator for 2 minutes.
- Monitor cells under microscope. Cells are beginning to detach when they appear rounded.
- As soon as cells are in suspension, immediately add culture medium containing serum. Wash cells once with serum containing medium and dilute

المتوازن من دون الكالسيوم (Ca++) أو المغنزيوم (Mg++) ثم إزالته.

- أضافة ما يكفي من محلول التريبسين – EDTA لتغطية أسفل وعاء الزراعة ثم إضافة القليل فوق ذلك.
- ضع الخلايا المزروعة في الحاضنة على 37 م° لمدة 2 دقيقتين .
- راقب الخلايا تحت المجهر. يبدأ فصل الخلايا عندما تصبح دائرية .
- وبمجرد أن الخلايا أصبحت في التعليق (suspension) أضف فوراً الوسط المغذي الذي يحتوي على المصل .ثم إغسل الخلايا مرة واحدة بالوسط المخفف.

9.7.3 EDTA alone / EDTA وحده

- Prepare a 2 mM EDTA solution in a balanced salt solution (i.e., PBS without Ca^{++} or Mg^{++}).
- Remove medium from culture vessel by aspiration and wash the monolayer to remove all traces of serum. Remove salt solution by aspiration.
- Dispense enough EDTA solution into culture vessels to completely cover the monolayer of cells.
- The coated cells are allowed to incubate until cells detach from the surface. Progress can be checked by examination with an inverted microscope.
- Dilute cells with fresh medium and transfer to a sterile centrifuge tube.

- حضر محلول 2mM EDTA في محلول الملح المتوازن (مثل PBS من دون الكالسيوم أو المعنزيوم).
- أزال الوسط الغذائي من وعاء الزراعة بواسطة الشفط (aspiration) و إغسل طبقة الخلايا جيداً لإزالة أي أثر من المصل . إزالة محلول الملح بواسطة الشفط.
- وضع كمية صغيرة من محلول EDTA داخل وعاء الزراعة لتغطية الخلايا فقط .
- أحضن الخلايا المعلقة إلى أن تنفصل من السطح. ثمّ راقب تتطورها من خلال الفحص بالمجهر
- خفف الخلايا بوسط طازج وأنقلها إلى أنبوب نابذ معقم (sterile centrifuge tube).

9.7.4 Thawing frozen cells / تذويب الخلايا المجمدة

Remove cells from frozen storage and quickly thaw in a 37°C waterbath.

أزال الخلايا من الثلاجة و تذويبها على 37 م° في الماء المسخن (waterbath).

9.7.5 Freezing cells / تجميد الخلايا

- Harvest cells as usual and wash

- أحصد الخلايا كالعادة و غسلها مرة واحدة بالوسط الكامل.

once with complete medium.

- Resuspend cells in complete medium and determine cell count/viability.
- Centrifuge and resuspend in ice-cold freezing medium: 90% calf serum/10% DMSO or glycerol with ethylene glycol , at 10^6 - 10^7 cells/ml. Keep cells on ice.
- Transfer 1 ml aliquots to freezer vials on ice.
- Place in a Mr. Frosty container that is at room temperature and that has sufficient isopropanol.
- Place the Mr. Frosty in the -70°C freezer overnight. Note: Cells should be exposed to freezing medium for as little time as possible prior to freezing
- Next day, transfer to liquid nitrogen (DON'T FORGET).

- حدد الخلايا الموجودة داخل الوسط .
- أنبذ (centrifuge) و ضع الخلايا التي في الأسفل في وسط بارد مجمد يتكون من: 90% مصل العجل(10% DMSO) الديمتيمل سلفوكسيد أو الغليسرول مع الإتيلين غليكول(ethylene glycol)على 10^6 - 10^7 خلية\مل . إحفظ الخلايا بالثلج.
- أنقل 1 مل من السائل (aliquot) إلى قارورة الثلج على الجليد.
- ثم ضعه في وعاء السيد فروستي (Mr. Frosty) على درجة حرارة الغرفة و الذي يوجد فيه كمية كافية من الإيزوبروبانول (isopropanol).
- ضع وعاء السيد فروستي (Mr. Frosty) في الثلاجة على 70م° طوال الليل . ملاحظة : الخلايا يجب أن تكون معرضة للوسط المتجمد قبل تثليجها بفترة قصيرة.
- في اليوم التالي أنقلهم إلى السائل النيتروجيني (liquid nitrogen) (لا تنسى).

9.7.6 Viable cell counts with Hemacytometer / حساب الخلايا الحية

USE A HEMACYTOMETER TO DETERMINE TOTAL CELL COUNTS AND VIABLE CELL NUMBERS.

Blue is one of several stains recommended for use in dye exclusion procedures for viable cell counting. This method is based on the principle that live cells do not take up certain dyes, whereas dead cells do.

- Prepare a cell suspension, either directly from a cell culture or from a concentrated or diluted suspension and combine 20 µl of cells with 20 µl of trypan blue suspension (0.4%). Mix thoroughly and allow to stand for 5-15 minutes.
- With the cover slip in place, transfer a small amount of trypan blue-cell suspension to both chambers of the Hemacytometer by carefully touching the edge of the cover slip

إستعمل الهيموسيتومتر (HEMACYTOMETER) لتحديد عدد جميع الخلايا و عدد الخلايا الحية .

اللون الأزرق هو واحد من عدة طرق تستعمل في إجراءات صبغ الخلايا المية . وتستند هذه الطريقة على مبدأ صبغ الخلايا الميتة بينما الخلايا الحية لا تلون.

- حضر الخلايا المعلقة إمّا مباشرةً من الخلايا المزروعة أو من التركيز أو من التعليق المخفف و إجمع 20ميكرو ليتر من الخلايا مع 20 ميكرو ليتر من التريبان الازرق المعلق (0.4%). أخلط المزيج على مهل و اتركه لمدة – 5-15 دقيقة .
- إزل الغطاء عن مكانه , أنقل كمية صغيرة من الخلايا المعلقة مع التريبان الأزرق (trypan blue) إلى الناحيتين من الهيموسيتومتر (Hemacytometer) بعناية من خلال

with the pipette tip and allowing each chamber to fill by capillary action. Do not overfill or underfill the chambers.

- Starting with 1 chamber of the Hemacytometer, count all the cells in the 1 mm center square and four 1 mm corner square. Keep a separate count of viable and non-viable cells.
- If there are too many or too few cells to count, repeat the procedure either concentrating or diluting the original suspension as appropriate.
- Include cells on top and left touching middle line. Do not count cells touching middle line at bottom and right. Count 4 corner squares and middle square in both chambers and calculate the average
- Each large square of the Hemacytometer, with cover-slip in place, represents a total volume of 0.1 mm^3 or 10^{-4} cm^3. Since 1 cm^3 is equivalent to approximately 1 ml, the total number of cells per ml will be determined using the following calculations:Cells/ml = average cell count per square x dilution factor x 10^4;
- Total cells = cells/ml x the original volume of fluid from which the cell sample was removed; % Cell viability = total viable cells /total cells x 100.

لمس حافة زلة الغطاء مع أنبوب الممصة والسماح لكل جهة بالإمتلاء . إنتبه أن لا تفيض أو تنقص الحفر داخل الهيموسيتومتر .

- إبدأ بأول حفرة من الهيموسيتومتر , أحسب جميع الخلايا في 1 مم من مركز المربع و أربعة من 1 مم من زاوية المربع . حافظ على فصل عدد الخلايا الحية عن الخلايا الميتة .
- إذا كان هناك أيضاً العديد أو القليل من عدد الخلايا ,أعد إجراء عملية إمّا التركيز وإمّا التخفيف من التعليق الأصلي حسب الحاجة .
- أدخل الخلايا على أعلى و يسار خط الوسط الملموس .لا تحسب الخلايا على أسفل و يمين خط الوسط الملموس . عدّ أربع زواية من المربع و وسط المربع في كلا الحفرتين و أحسب المتوسط منهم .
- كل مربع كبير من الهيموسيتومتر , يمثل إجمالي حجم 0.1 مم^3 أو10^{-4} سم^3 منذ 1 سم^3 يعادل ما يقارب 1 مل , عدد جميع الخلايا بال مل يحدد باستخدام الحسابات التالية : الخلية\مل=متوسط عدد الخلايا بالمربع x العامل المخفف x 10^4 ،

مجموع الخلايا = الخلايا \ مل x الحجم الأصلي للسائل الذي تم منه إزالة عينة المخلية, نسبة الخلايا الحية %= مجموع الخلايا الحية \مجموع الخلايا x 100.

10 Protocol: Culture of primary chicken embryo fibroblast (CEF) cells / برتوكول: الزراعة الأولية لخلايا جنين بيضة الدجاج

10.1 Materials / المواد/

- 10 to 12 day old embryonated eggs.

- Sterile 125 ml Erlenmeyer flask with magnetic stir bar.
- Sterile 25 cm^2 flask containing MEM (Minimum Essential Medium Eagle) plus 10% fetal calf serum.
- Sterile 0.5% trypsin in saline A.
- Sterile 15 ml centrifuge tube containing 0.5 ml of serum.
- Sterile saline A

- بيض ملقح من عمر 10 إلى 12 يوم .
- 125 مل دورق إرلنمير مع قضيب تحريك مغناطيسي.
- 25 سم^2 دورق معقم يحتوي على أم إي أم (MEM) مع 10% من مصل جنين العجل.
- 0.5 % من التريبسين في السالين آي.
- 15 مل من أنبوب نابذة معقم يحتوي على 0.5 مل من المصل.
- سالين آي معقم.

10.1.1 Preparation of Saline A / صناعة سالين أ

Ingredient	g/l
NaCl	8
KCl	0.4
NaHCO3	0.35
Glucose	1
Phenol red	0.05

Add distilled H_2O to 1 litre. Filter sterilize.

Saline A is usually prepared as a 10X solution and stored at -20 ˚C

10.1.2 Minimum Essential Medium Eagle (MEM) / صناعة أم إي أم

Ingredient	g/l
$CaCl_2.H_2O$	0.265
$MgSO_4$	0.09767
KCl	0.4
NaCl	6.8
NaH_2PO_4	0.122
L-arginine.HCl	0.126
L-cystine.HCl	0.0313
L-histidine.HCl.H_2O	0.042
L-isoleucine	0.052

L-leucine	0.052
L-lysine.HCl	0.0725
L-methionine	0.015
L-phenylalanine	0.032
L-threonine	0.048
L-tryptophan	0.010
L-tyrosine 2Na.2H_2O	0.0519
L-valine	0.001
Folic acid	0.001
myo-Inositol	0.002
Niacinamide	0.001
D-Pantothenic acid (calcium)	0.001
Pyridoxal.HCl	0.001
Riboflavin	0.0001
Thiamine.HCl	0.001
Glucose	1.0
Phenol red	0.011
$NaHCO_3$	2.2

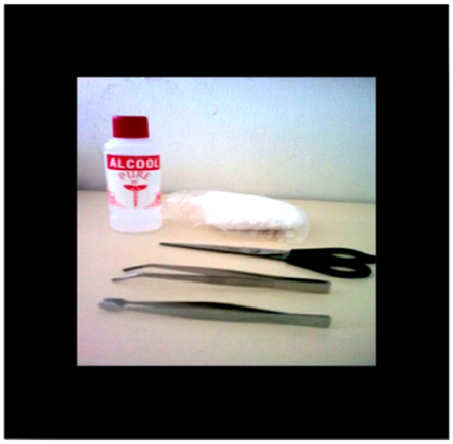
Add distilled H_2O to 1 liter. Filter sterilize. Minimum essential medium Eagle is usually purchased as a preweighed mixture or as a sterile solution. The above formulation has Earle's salts.

10.2 Devices / الاجهزة/

- Incubator
- Centrifuge

- حاضنة
- نابذة

- Forceps and scissors
- Alcool



- ملقط و مقص
- كحول

- Sterile Petri dish

- علبة بتري معقمة.

- Hema-cytometers

- هموسيتوميتر.

- 1ml and 10ml pipettes

- 1 مل إلى 10 مل من حجم الممصة.

10.3 Protocol

1-Desinfect the surface of the egg over the air sac with scissors or forceps, break the shell.

1- طهر سطح البيضة من جهة الكيس الهوائي ثم إكسر البيضة بواسطة المقص أو الملقط.

2-Sterilize forceps by dipping in alcool and flaming. Cool forceps, then peel away the shell over the air sac

2- عقم الملقط بإغماسه بالكحول ثم ضعه فوق النار. برد الملقط, قشّر قشرة البيضة من جهة الكيس الهوائي.

3-Sterilize forceps again, and pull back the shell membrane and chorioallantoic membrane to expose the embryo.

3- أعد تعقيم الملقط, ثم إسحب غشاء القشرة و عشاء الكوريوألونتويك لإظهار الجنين.

4-Resterilize the forceps, graps the embryo loosely around the neck, and remove the entire embryo from the egg to a sterile Petri dish.

4- أعد تعقيم الملقط, و على مهل ضعه حول عنق الجنين و إسحبه من البيضة بشكل كامل و ضعه في علبة بتري المعقمة.

5-Using forceps + scissors decapitate and eviscerate the embryo. Mince the embryo carcass into very small fragment with scissors .

5- إستعمل الملقط و المقص لقطع رأس و إزالة إحشاء الجني. ثم بواسطة المقص قطع جثّة الجنين إلى أجزاء صغيرة جداً.

6- Add about 10ml sterile saline A to tissue fragment in the Petri dish,

6- أضف حوالي 10 مل من سالين آي المعقم إلى أجزاء الخلايا الموجودة في علبة بتري,

Swirl gently for 1 to 2 minutes, and carefully pour the entire content into a 125 ml Erlenmeyer flask ,tilt flask ,for decant saline A. Discard the saline A.

حرك بنوعومة من 1 إلى 2 دقائق , ثم بحذر ضع المحتوى في 125 مل دورق إرلنمير, أمل الدورق لفصل السالين. إرمي السالين.

7-Add 10 ml of sterile warm trypsin and pour into centrifuge filtrate at 1000 rpm for 10 minutes ,discard supernatant and resuspend the cells in 20 ml growth medium .

8-Mix well for counting in a hemacytometer.

N.B: be sure to keep your cell sterile.

9-Dilute 0.1ml of cell suspension with 0.9ml of MEM and count cell in a hemacytometer

10-Adjust concentration to $5*10^5$ cells per ml growth medium and dispense into cultures tubes.

11-Incubate at 37°c until monolayered (6-7 days).

Note: be sure examine cell culture each day ,if the medium is yellow may need to be adjust by 7.5%$NaHCO_3$ .if floating cell are present or the color of the medium indicate a basic PH the medium should be changed.

7-أضف 10مل من التريبسين المعقم الساخن لمدة 10 دقائق.ثم ضعه في أنبوب نابذ مع فلتر على 1000 أر ب أم لمدة 10 دقائق, إرمي من مرّ بالفلتر و ضع من بقي من الخلايا في 20 مل من المستنبت المغذي.

8-أمزج جيداً المحتوى لنحصيه في الهيماسيتوميتر.

ملاحظة: تأكد من أن تحافظ على الخلايا معقمة.

9-خفف 0.1 مل من الخلايا المعلقة في 0.9 مل من أم إي أم و إحصي الخلايا في الهيماسيتوميتر.

10-أضبط الكمية على $5*10^2$ من الخلايا في ليتر و وزعه في أنابيب التغذية.

11-أحضنهم على 37 درجة مئوية إلى أن يصبحوا خطاً واحداً من الخلايا (6-7 أيام).

ملاحظة: تأكد من فحص الخلايا يومياً, إذا كان الوسط ذو لون أصفر فهو بحاجة إلى تعديل بواسطة 7.5% من الهيدروجينو كاربونات الصوديوم. أمّا إذا عامت الخلايا أو كان الوسط يشير على أنّه بازيك هذا الوسط يجب أن يتغير .

تم بحمد لله