((المختبر الثامن عشر))

وراثة بكتريا

عزل سلالات بكتريا الرايزوبيوم *Rhizobium* من العقد الجذرية للنباتات البقولية

يتم عزل بكتيريا الرايزوبيوم من جذور النباتات البقولية التي تجمع من مناطق زراعية حسب طريقة (Vincent, 1970 , 1982) وكما في ادناه:

1. يقتلع النبات الكامل من التربة ويغسل بماء الحنفية الجاري لأزالة التربة العالقة بالجذور.
2. تأخذ من ثلاثة الى اربعة عقد جذرية وردية اللون من الجذور وتغسل بالماء المقطر المعقم.
3. تغمس العقد الجذرية في كحول الأيثانول تركيز 95% ولمدة من 2-4 دقائق.
4. تغسل العقد الجذرية بعد ذلك بالماء المقطر المعقم.
5. تغمس العقد الجذرية بمحلول كلوريد الزئبق $HgCl_2$ المحمض بتركيز 0.1% لمدة 3-6 دقائق (يحضر هذا المحلول من اذابة 1 غم من $HgCl_2$ في 5 مل من حامض HCl المركز ويكمل الحجم إلى 1000 مل بالماء المقطر).
6. تغسل العقد الجذرية من 5-7 مرات بالماء المقطر المعقم لأزالة بقايا محلول كلوريد الزئبق المحمض والكحول.
7. تسحق العقد الجذرية بأستخدام قضيب زجاجي في انبوبة اختبار حاوية على 1.0 مل من محلول السلاين المعقم Sterile Saline الذي يكون بتركيز 0.85% (يحضر من اذابة 0.85 غم من NaCl في 100 مل من الماء المقطر ويعقم بالمؤصدة تحت درجة حرارة 121ºC لمدة 15 دقيقة وتحت ضغط جوي 15 بار/انج^2).
8. يفرش 0.1 مل من العالق على اطباق حاوية على اوساط غذائية MSY صلبة، وتحضن الأطباق في حاضنة كهربائية تحت درجة حرارية 28±2ºC ولمدة من 2-4 أيام.
9. المستعمرات اللزجة البيضاء اللون تختار وتنقى ومن ثم تفحص لغرض التأكد منها.
10. تحفظ السلالات المنقاة في ثلاجة كهربائية وتحت درجة حرارة 4ºC.

((المختبر االتاسع عشر))

وراثة بكتريا

تحضير الأوساط الزرعية الخاصة ببكتريا الرايزوبيوم

1. تحضير الوسط الغذائي الكامل Yeast extract mannitol (YEM) medium لبكتيريا الرايزوبيوم *Rhizobium*

يتم تحضير الوسط الغذائي الكامل (YEM) لبكتيريا الرايزوبيوم حسب طريقة (Vincent, 1970) من اذابة المواد المذكورة في الجدول أدناه:

المادة	الكمية غم / لتر
Mannitol	10
Yeast extract	10
K_2HPO_4	0.5
$MgSO_4.7H_2O$	0.2
NaCl	0.1
$CaCO_3$*	3
Distilled water	يكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر

*= يضاف عند الحاجة إلى معادلة pH.

ينظم pH للوسط الغذائي اعلاه إلى 6.8 بأستخدام NaOH بتركيز 0.1 عياري، ويضاف الأكار Agar بتركيز 1.5-2.0 غم لكل 100 مل من الوسط الغذائي لغرض الحصول على أوساط غذائية صلبة، ومن ثم يعقم الوسط الغذائي بالمؤصدة تحت درجة حرارة 121ºC لمدة 15 دقيقة وتحت ضغط جوي 15 بار/أنج^2.

2. تحضير الوسط الغذائي الكامل Mannitol salt extract (MSY) medium لبكتيريا الرايزوبيوم *Rhizobium*

يتم تحضير الوسط الغذائي الكامل (MSY) لبكتيريا الرايزوبيوم حسب طريقة (Khanja and Kumar, 1989) من اذابة المواد المذكورة في الجدول ادناه:

المادة	الكمية غم / لتر
Mannitol	10
Yeast extract	0.2
K_2HPO_4	0.2
KH_2PO_4	0.2
$MgSO_4.7H_2O$	0.1
$CaCl_2.2H_2O$	0.05
Distilled water	يكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر

ينظم pH للوسط الغذائي اعلاه الى 6.8 بأستخدام NaOH بتركيز 0.1N، ويضاف الأكار Agar بتركيز 1.5-2.0 غم لكل 100 مل من الوسط الغذائي لغرض الحصول على اوساط غذائية صلبة، ومن ثم يعقم الوسط الغذائي بالمؤصدة تحت درجة حرارة 121ºC لمدة 15 دقيقة وتحت ضغط جوي 15 بار/أنج^2.

3. تحضير الوسط الغذائي الكامل Tryptone-yeast extract (TY) medium لبكتيريا الرايزوبيوم *Rhizobium*

يتم تحضير الوسط الغذائي الكامل (TY) حسب طريقة (Khanja and Kumar, 1988) من اذابة المواد المذكورة في الجدول ادناه:

المادة	الكمية غم / لتر
Tryptone	5
Yeast extract	3
$CaCl_2.2H_2O$	0.12
Distilled water	يكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر

ينظم pH للوسط الغذائي اعلاه إلى 7 بأستخدام NaOH بتركيز 0.1 عياري، ويضاف الأكار Agar بتركيز 1.5-2.0 غم لكل 100 مل من الوسط الغذائي لغرض الحصول على اوساط غذائية صلبة، ومن ثم يعقم الوسط الغذائي بالمؤصدة تحت درجة حرارة 121ºC لمدة 15 دقيقة وتحت ضغط جوي 15 بار/أنج^2.

4. تحضير الوسط الغذائي الناقص *Rhizobium* minimal medium (RMM) لبكتيريا الرايزوبيوم *Rhizobium*

يتم تحضير الوسط الغذائي الناقص (RMM) لبكتيريا الرايزوبيوم حسب طريقة (Singh *et al.*, 1984) من اذابة المواد المذكورة في الجدول ادناه:

المحلول A:

المادة	الكمية غم / لتر
$Na_2HPO_4.12H_2O$	0.45
$(NH_4)_2SO_4$	2
$FeCl_3$	0.002
$MgSO_4.7H_2O$	0.1
$CaCl_2.2H_2O$	0.040
Distilled water	يكمل الحجم إلى 990 مل بالماء المقطر

ينظم pH للوسط الغذائي اعلاه إلى 7 بأستخدام NaOH بتركيز 0.1 عياري، ويضاف الآكار Agar بتركيز 1.5-2.0 غم لكل 100 مل من الوسط الغذائي لغرض الحصول على اوساط غذائية صلبة، ومن ثم يعقم الوسط الغذائي بالمؤصدة تحت درجة حرارة 121ºC لمدة 15 دقيقة وتحت ضغط جوي 15 بار/أنج^2.

المحلول B:

يحتوي هذا المحلول على 20% من الكلوكوز الذي يعقم بواسطة الفلتر (يحضر هذا المحلول من اذابة 20 غم من الكلوكوز في 100 مل من الماء المقطر المعقم ويرشح بأستخدام الفلتر). ولتحضير 1 لتر من الوسط الغذائي الناقص يتم اضافة 10 مل من المحلول B الى 990 مل من المحلول A.

5. تحضير الوسط الغذائي الكامل Tryptone-yeast extract (TY) medium لبكتيريا الرايزوبيوم *Rhizobium*

يتم تحضير الوسط الغذائي الكامل (TY) حسب طريقة (Khanja and Kumar, 1988) من اذابة المواد المذكورة في الجدول أدناه:

المادة	الكمية غم / لتر
Tryptone	5
Yeast extract	3
$CaCl_2.2H_2O$	0.12
Distilled water	يكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر

ينظم pH للوسط الغذائي اعلاه إلى 7 بأستخدام NaOH بتركيز 0.1 عياري، ويضاف الآكار Agar بتركيز 1.5-2.0 غم لكل 100 مل من الوسط الغذائي لغرض الحصول على اوساط غذائية صلبة، ومن ثم يعقم الوسط الغذائي بالمؤصدة تحت درجة حرارة 121ºC لمدة 15 دقيقة وتحت ضغط جوي 15 بار/أنج^2.

((المختبر العشرون))
وراثة بكتريا

تطفير بكتيريا الرايزوبيوم بأستخدام حامض النايتروز (HNO_2) Nitrous acid لغرض الحصول على طافرات العوز الغذائي Auxotrophic mutants

يتم تطفير بكتيريا الرايزوبيوم بحامض النايتروز حسب طريقة (Kerppola and Kahn, 1988) وكما في الخطوات التالية:

1. يتم تحضير حامض النايتروز (HNO_2) Nitrous acid في المختبر قبل البدء بعملية التطفير بأذابة 0.035 غم من نترات الصوديوم ($NaNO_2$) Sodium nitrite في 5 مل من بفر استيت الصوديوم Sodium acetate buffer بتركيز (pH4.6) 0.1 مولاري.
2. يتم تحضر بفر استيت الصوديوم Sodium acetate buffer بتركيز مولاري في دورق حجمي بحجم 100 مل وذلك بخلط 25.5 مل من حامض الأسيتك Acetic acid بتركيز 0.2 مولاري مع 24.5 مل من الصوديوم استيت Sodium acetate بتركيز 0.2 مولاري. يكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر ومن ثم يعقم بالمؤصدة.
3. يوضع 10 مل من الوسط الغذائي السائل TY المزروع ببكتيريا الرايزوبيوم في حاضنة هزازة لمدة 24 ساعة ويؤخذ منه بعد ذلك 0.1 مل ويعمل له تخافيف متسلسلة وتنمى على وسط غذائي صلب لغرض حساب عدد المستعمرات النامية CFU.
4. يؤخذ 1.5 مل ايضاً من نفس الوسط الغذائي المزروع ببكتيريا الرايزوبيوم وتنقل الى انبوبة Eppendorf ويتم ترسيب الخلايا بأستخدام الطرد المركزي بسرعة 6000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق ومن ثم يتم التخلص من الجزء الطافي ويعلق الراسب بأستخدام Vortex ببفر Sodium acetate (0.1 M) .
5. يتم ترسيب الخلايا مرة أخرى بأستخدام الطرد المركزي بسرعة 6000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق ويتم التخلص من الجزء الطافي ويتم تعليق الراسب بـ 1 مل من حامض النايتروز Nitrous acid المحضر حديثاً.

6. يسحب من العينة بعد 10 و 15 و 20 دقيقة من بعد البدء بعملية التطفير ويغسل بالسلاين (0.85% NaCl) لأزالة حامض النايتروز المتبقي ومن ثم تزرع الخلايا في الوسط الغذائي TY السائل وتحضن لمدة 8 ساعات لعزل الطفرات الراجعة.
7. تغسل الخلايا بعد ذلك بمحلول السلاين (0.85% NaCl) وتنمى الخلايا لمدة 6 ساعات على الوسط الغائي السائل الناقص RMM.
8. يضاف Penicillin بتركيز 300 µg/ml إلى الوسط الغذائي السائل الناقص RMM وتحضن لمدة ساعتين لقتل الخلايا التي لاتحتوى على طفرات غذائية.
9. تغسل الخلايا مرتين بمحلول السلاين (0.85% NaCl) ويعمل لها تخافيف متسلسلة وتزرع على الوسط الغذائي TY الصلب وتحضن في الحاضنة الكهربائية لمدة 24-48 ساعة وتحت درجة حرارة 28ºC±2 وبعد ذلك تحسب عدد المستعمرات النامية ومن ثم تخضع لأختبارات الكشف عن طافرات العوز الغذائي.
10. يتم حساب النسبة المئوية لعدد المستعمرات المتبقية وذلك بتقسيم عدد المستعمرات النامية والمحسوبة في الخطوة رقم 9 على عدد المستعمرات النامية والمحسوبة في الخطوة رقم 3 مضروباً في 100.

الرسالة العلمية / احسان عرفان حسين

((المختبر الحادي والعشرون))
وراثة بكتريا

استخلاص الدنا من بكتيريا الرايزوبيوم *Rhizobium* بطريقة Sambrook

يتم عزل دنا بكتيريا الرايزوبيوم حسب طريقة (Sambrook *et al.*, 1989) وكما في ادناه:

1. تنمى بكتيريا الرايزوبيوم على الوسط الغذائي TY الصلب لمدة يومين وتحت درجة حرارة 28ºC.
2. تؤخذ كمية من المزروع البكتيري بواسطة الـ Loop ويتم تعليقها بـ 25 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم في انبوبة Eppendorf.
3. يتم اضافة 25 مايكروليتر من بفر التحلل Lysis buffer المحضر حديثاً المكون من NaOH (0.1N) و SDS بتركيز 0.5%.
4. توضع انابيب Eppendorf الحاوية على الخليط في حمام مائي لمدة 15 دقيقة.
5. يتم اضافة 200 مايكروليتر من بفر TE المكون من (10 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA) ويتم طردها مركزياً لمدة 15 دقيقة وبسرعة 13000 rpm.
6. ينقل الجزء الطافي المتكون والحاوي على الدنا إلى انبوبة Eppendorf جديدة ومعقمة.
7. يتم تعيين تركيز ونقاوة الدنا بأستخدام الـ UV-Spectrophotometer أو Nanodrop بأستخراج نسبة A_{260}/A_{280} وأن الدنا النقي تكون قيمة نسبة الأمتصاص هي 1.8±0.1 (Clarck, 1997), وتحفظ العينة تحت درجة حرارة -20ºC.
8. يستخدم 100 نانوغرام من الدنا كقالب لغرض اجراء اختبار الـ PCR.

((المختبر الثاني والعشرون))
وراثة نبات

استخلاص الدنا من النباتات بطريقة Edwards

DNA extraction from plants by Edwards's procedure

طريقة عمل الطريقة حسب الخطوات التالية:

1. يتم وضع انسجة أوراق النبات (بضع ملغرامات تكون كافية) في انبوبة Eppendorf بحجم 1.5 مل.
2. تطحن العينة في درجة حرارة الغرفة بدون بفر لمدة 15-20 ثانية او لغاية خروج السائل من الخلايا.
3. يضاف 400 مايكروليتر من بفر الأستخلاص Extraction buffer ويخلط مع العينة بالـ Vortex لمدة 5 ثواني. في هذه اللحظة تترك العينة تحت درجة حرارة الغرفة ولغاية استخلاص المحتويات من العينة. يتكون بفر الأستخلاص من ; (200mM Tris-HCl (pH 7.5) 25mM EDTA ; 250mM NaCl ; 0.5% SDS).
4. يتم طرد العينة مركزياً وبدرجة دوران 13000 rpm ولمدة دقيقة واحدة تحت درجة حرارة الغرفة.
5. يزال 300 مايكروليتر الجزء الطافي وينقل إلى انبوبة Eppendorf جديدة ويضاف لها 300 مايكروليتر من Isopropanol وتترك تحت درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقتين.
6. يتم طرد العينة مركزياً بسرعة 13000 rpm ولمدة 5 دقائق.
7. يزال جميع الجزء الطافي من الجزء الراسب وتترك لتجف لمدة 20 دقيقة.
8. يذاب الجزء الراسب في 100 مايكروليتر في بفر 1X TE. يتكون TE buffer من (10mM Tris-HCl (pH 8.0 ; 1mM EDTA). في هذه الحالة يمكن خزن العينة لمدة تزيد عن عام واحد تحت درجة حرارة 4ºC.
9. يستخدم 2.5 مايكروليتر من الجزء الراسب المذاب في البفر TE لغرض استخدامه في تحليل الـ PCR لحجم 50 مايكروليتر من محلول التفاعل.