**المختبر الرابع الجامعة المستنصرية / كلية العلوم**

**التقانة الحياتية والهندسة الوراثية قسم علوم الحياة – المرحلة الرابعة**

**الانزيمـــــــــــات**

**انزيم البروتيز Protease:**

**تعد البروتييزات من انزيمات التحلل المائي ( Hydrolases ) والتي تتأثر بشدة ببعض الحوامض والقواعد القوية والمذيبات العضوية مؤدية الى مسخ البروتين (Denaturation) وبالتالي تحطيم فعالية الانزيم. تنتج البروتييزات من قبل العديد من خلايا الكائنات الحية الحيوانية والنباتية والاحياء المجهرية**

**الاحياء المجهرية المنتجة لها :-**

1. **البروتييزات المنتجة من قبل البكتريا Bacterial proteases**

 **وتقع ضمن هذه المجموعة البروتييزات المنتجة من قبل انواع عديدة لاجناس بكتيرية هيVibrio ، Aeromanas ،Serratia ، Bacillus ، Micrococcus ، Proteus ، Clostridium.**

**2-البروتييزات المنتجـة من قبل الاعفـان Fungal proteases**

 **ومن ضمنها *Aspergillus oryzae* ، *A. niger* ومعظم انواع الخمائر مثل Candida .**

**3-البروتييزات المنتجة من قبل الابتدائيات Protozoal proteases**

 **كما وتم تقسيم البروتييزات حسب فعلها التخصصي الى قسمين : داخلية Endopeptidase وتمتاز بانها تحلل اواصر داخل جزيئة البروتين وتسمى Proteinase . وخارجيـة ( Exopeptidase ) وتقوم بتحليل الاواصر الببتيدية الطرفية لجزيئة البروتين محررة بالتعـاقب الاحـماض الامينيـة الحـرة الى وسـط التفاعل وتسمى ( Peptidases ) .**

**الكشف عن قابلية العزلات لانتاج البروتيز :**

1. **استخدم وسط مرق نقيع القلب والدماغ Brain– heart infusion broth لتنمية وتنشيط العزلات.**
2. **حضن الوسط بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة.**
3. **نبذ المزروع باستخدام النبذ المركزي المبرد بسرعة 6000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة .**
4. **ثم اخذ 100مايكروليتر من راشح كل عزلة ووضع في حفر مقاسة على وسط Skim milk agar)) وحضن الوسط بدرجة 37م لمدة24 ساعة وبعد انتهاء مدة الحضن نلاحظ ظهور هالة شفافة حول الحفر، وهذا دليل على الايجابية وان المستعمرات منتجة لانزيم البروتيز .**

**تحضير وسط أغار حليب الفرز Skim milk agar**

 **حضر هذا الوسط باضافة (%5) من حليب فرز الى وسط الاغار المغذي Nutrient agar معقم ومبرد الى درجة (45)م ثم صب الوسط في اطباق معقمة , استخدم هذا الوسط للكشف عن قدرة العزلات على انتاج انزيم البروتيز.**

**انزيم الفوسفولايبيز Phospholipas :**

**الكشف عن قابلية العزلات لانتاج انزيم الفوسفولايبيزPhospholipas**

 **نقل جزء من مستعمرة نامية على وسط الاغار المغذي Nutrient agar بعمر 24 ساعة الى الوسط Egg Yolk في الكشف عن انتاج انزيم Phospholipase وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة, بعد انتهاء فترة الحضن, لوحظ ظهور هالة مترسبة بيضاء الى بنية اللون حول المستعمرة وهو دليل على ايجابية الاختبار .**

**تحضير وسط Egg Yolk للكشف عن انزيم الفوسفولايبيز :Phospholipase**

**حضر (100) مل من وسط الاغار المغذي Nutrient agar واضيف اليه (%1) ملح كلوريد الصوديوم (NaCl) وعقم بالموصدة، ثم برد الى درجة حراره (45) م ، واضيف اليه صفار بيضة واحدة في ظروف معقمة ومزجا جيدا بعدها صب الوسط في اطباق معقمة .**

**انزيم الامايليز Amylase**

**طريقة الكشف عن انتاج انزيم Amylase على وسط النشا وباستخدام صبغة Iodine .**

**طريقة العمل :**

1. **يصب وسط Starch agar في اطباق بتري ويترك ليتصلب يلقح الوسط وذلك بزراعته من المزروع البكتيري المراد الكشف عن انتاجه للانزيم له في وسط الطبق .**
2. **تحضن الاطباق المزروعة بدرجة 37 م◦ لمدة ( 5-1) ايام .**
3. **بعد الحضن اغمر كل طبق بمحلول اليود .**

**س / كيف يصبح لون الوسط بعد اضافة اليود ؟**

**النتائج / في حالة تكون هالة حول المستعمرات هذا يدل على قابلية الميكروب على افراز انزيم Amylase والعكس صحيح**

**المختبر الخامس الجامعة المستنصرية / كلية العلوم**

**التقانة الحياتية والهندسة الوراثية قسم علوم الحياة – المرحلة الرابعة**

 **Biodegradable Plastics or Bioplastics**

 في المجال الطبي حيث تستعمل في تصنيع الخيوط الجراحية القابلة للتحلل وكذلك تستخدم كوسيلة لتنظيم افراز وامتصاص بعض الادوية من الجسم . ويصنع حاليا من Monomers محورة من السيللوز او النشا او حامض اللاكتيك اسد التي توفر من المخلفات الزراعية وبقايا الصتاعات الغذائية وهو نوعان صلب Rigid ومرن Flexible .

**استخداماته :**

1. تصنيع الخيوط الجراحية القابلة للتحلل .
2. وسيلة لتنظيم افراز وامتصاص الجسم لبعض الادوية ويسمى Drug delivery توصيل الدواء لمكانه المناسب .
3. يمكن معالجة الاورام السرطانية عن طريق اقفال الشعيرات الدموية التي تغذيها بحقن البوليمر Polyurethane الذي يسبب تجويع الورم .

**التجربة :**

1. اضف 500 ml من الحليب .
2. يوضع الوعاء على النار بعد وضع الحليب .
3. يسخن الحليب وعند غليانه نضع (3) ملاعق من الخل ويحرك المزيج .
4. يصفى الخليط بالمصفاة او بقطعة القماش وهذه المادة هي البلاستيك العضوي .
5. يمكن ان تكون اشكالا منه وهو ساخن قبل ان يبرد .
6. تتركه مدة 24 ساعة حتى يجف .

**هدف التجربة :**

انتاج بلاستيك حيوي قابل للتحلل وذلك من مواد طبيعية قابلة للتجدد بدلا من استخدام المواد الاولية البتروكيميائية .

**التجربة الثانية :**

1-Add (12g) gelatin to (240 ml ) glycerol solution 1% (10 ml from glycerol /per liter of water ) .

2-Keep stirring untile dissolve completely .

3-Heat the mixture to (95 c◦) on hot plate and stirrer .

4-Carefuly put the mixture in flat pan and spread it to cool it .

5-Let the mixture to cool for several days and dry in room temperature.

**المختبر السادس الجامعة المستنصرية / كلية العلوم**

**التقانة الحياتية والهندسة الوراثية قسم علوم الحياة –المرحلة الرابعة**

**زراعة الخلايا و الانسجة الحيوانية Cell and Tissue culture**

**ما معنى زراعة الخلايا و الانسجة ؟**

 فصل الخلية عن النسيج الحيواني بعد استخراج النسيج من العضو الذي تم استخراجه من جسم حيوان أثناء تشريحه وابقاء هذه الخلية حية بوضعها في بيئة مناسبة و ظروف فيزيائية مناسبة .

• ابقاء الخلية الحيوانية حية و قادرة على القيام بوظائفها الحيوية خارج الكائن الحي ( In vitro) .

**الادوات المستخدمة في زراعة الانسجة الحيوانية :**

1. انابيب معقمة ذات غطاء محكم واطباق.
2. ادوات لتقطيع النسيج وغسله .
3. فلاسكات وورق ترشيح ودورق مخروطي للترشيح .
4. فلاسك خاص لزراعة الانسجة الحيوانية حيث قام Carrel بتصميم دورق خاص بزراعة الخلايا الحيوانية . يمكن بواسطة هذا الدورق تعقيم فتحته بالنار قبل القيام بأي عملية على خلايا الموجودة بالداخل و دون أن تتعرض هذه الخلايا للحرارة العالية



1. Hot plate , Magnetic sterir , Centerfug .
2. Hemoctometer وسلايدات لعد واختبار حيوية الخلايا .
3. indicator pH .
4. Incubator .

**المواد المستخدمة في زراعة الانسجة الحيوانية :**

1. بفرات PBS وبفر( ( Sodium bicarbonate and hepes .
2. Trypsin 0.025%.
3. الصبغات Trypan blueو Methyl green .
4. الوسط الاساس (Basal medium ( MEM , RPMI .
5. المصل Serum (FCS) .
6. مضادات Antibiotics ومضادات للنمو الفطري Anti-fungals .

**زراعة الانسجة الحيوانية :**

1. نأخذ الجزء من النسيج الحيواني المراد زراعته في انبوبة معقمة ذات غطاء حاوية بفر معقم PBS.
2. ناخذ النسيج بعد ذلك الى طبق وتقطيعه الى قطع صغيرة في ظروف معقمة وتغسل القطع بالبفر .
3. بعد التقطيع والغسل يؤخذ الخليط النسيجي المقطع ونضعه في فلاسك حاوي على (Trypsin 0.025% ) .
4. يوضع الخليط في Hot plate وباستخدام Magnetic sterir لمدة 30 دقيقة بدرجة 37◦C .
5. بعد ذلك يرشح الخليط باستخدام ورقة ترشيح الى انبوبة اخرى وناخذ الراشح في انبوبة ونضعه في جهاز الطرد المركزي Centerfug .
6. نقوم باجراء فحص Viability of Cells نحضر السلايد من الراسب Cell pellet ( نضع 80 مايكروليتر من الوسط ونظيفه الى 10 مايكروليتر من عالق الخلايا و10 مايكروليتر من صبغة Trypan blue بعدها نحسب 100 خلية (الخلايا الميته سوف تتلون بالصبغة بينما الخلايا الحية لاتتلون ). ناخذ عدد 100 خلية للحصول على المقياس التاكيدي للخلايا الحية .
7. يفحص السلايد تحت المجهر لحساب الخلايا الحية .

حساب الخلايا Counting of cells :

1. نضع 90 مايكروليتر من صبغة Methyl green .
2. نضع على الصبغة 10 مايكروليتر من عالق الخلايا .
3. تجهز الخلايا للحساب بواسطة hemoctometer ونحسب الخلايا ونحصل على عدد الخلايا بواسطة المعادلة التالية :

 Equation = Cell count/4 X 105

1. نحضر الفلاسك المخصص لزراعة الانسجة الحيوانية الحاوي على 5 مل من الوسط بالاضافة الى المصل لتحضير عالق الخلايا النهائي حيث يوضع راسب الخلايا Cell pellet في هذا الفلاسك بعدها ينقل الفلاسك الى الحاضنة وهو حاوي على المكونات الاساسية للوسط :
2. الوسط الاساس Basal medium ( MEM , RPMI ) .
3. المصل Serum (FCS) .
4. مضادات Antibiotics ومضادات للنمو الفطري Anti-fungals .
5. مقياس للاس الهيدروجيني indicator pH
6. مكونات البفر ( ( Sodium bicarbonate and hepes .
7. يوضع الفلاسك في الحاضنة Incubator بدرجة 37◦C .
8. قياس الخلايا بعد مدة الحضن تحت المجهر ( عند فترة الحضن الخلايا ترتبط في قاعدة الفلاسك وتبدء بالانقسام مكونة طبقة احادية من الخلايا (monolayer of cells .

**المختبر السابع الجامعة المستنصرية / كلية العلوم**

**التقانة الحياتية والهندسة الوراثية قسم علوم الحياة – المرحلة الرابعة**

**زراعة الأنسجة النباتية Plant Tissue Culture ( PTC)**

هو تكوين نباتات جديدة في وسط صناعي( Artificial medium ) تحت ضروف معقمة من أجزاء صغيرة جدا من النباتات مثل الجنين , البذور , السيقان , قمم السيقان , قمم الجذور , الكالس ( Callus ) , الخلايا المفردة ( Single cells ) و حبوب الطلع . هذه الأجزاء من النباتات عندما تستأصل وتزرع يطلق عليها مصطلح (Explants) .

**مختبر زراعة الانسجة النباتية Plant Tissue Culture Lab**

لغرض انشاء مختبر لزراعة الانسجة نحتاج الى تخطيط صحيح . ان المساحة المستخدمة في مختبر زراعة الانسجة يجب ان تقسم الى 5 وحدات مختبرية :

1. وحدة تحضير الوسط

هذه الوحدة تستخدم لتحضير الوسط الزرعي , لذا يجب تجهيزها بالعديد من المستلزمات مثل الطاولات , hot plate , magnetic stirrer , ميزان كهربائي , ميزان حساس , glassware , pH meter , Double Distilled Water , Autoclave .

1. وحدة غرفة نقل المعدات المعقمة المتطلبات :

Laminar air-flow cabinet (Hood ) : وذلك لتوفير جريان ثابت للهواء خلال مساحة العمل , Dissecting microscope , مشرط , ملقط , ابر . . . . الخ .

1. وحدة الزرع

بعد زراعة الاجزاء النباتية (Explants) في ظروف معقمة , يجب وضعها في بيئة متحكم بها ( تحت السيطرة ) . هذه الوحدات او الغرف يجب تجهيزها بدرجة حرارة معينة ومسيطر عليها (25-28 ◦C), بالاضافة الى مصدر للاضاءة (Fluorescent cool light ) .

1. وحدة الاحصاء المتطلبات :

مقيلس لوني (Colorimeter) للتقدير الكيميائي مثل تقدير نسبة الكلوروفيل , الحامض النووي , النشأ ... الخ , جهاز طرد مركزي ذو سرعة واطئة وجهاز قياس اللزوجة (Viscosity meter ) .

1. وحدة التأقلم

هذه الوحدة تستخدم لغرض اقلمة او تخشين النباتات الناتجة من الزراعة المختبرية In vitro culture لكي تكون جاهزة للزراعة الحقلية . لذا فان هذه الوحدة تحتاج الى اضاءة عالية (40000-10000 lux) ورطوبة عالية ( 90-100%) .

**طريقة تحضير وسط زراعة الأنسجة النباتية المسمى Morashige & Skoog medium :**

ان وسط زراعة الانسجة هو الاكثر اهمية في تجارب زراعة الانسجة , حيث يعتبر مستهلك للوقت ويحتاج الى الكثير من الجهود . ان الوسط الزرعي يتكون من العديد من المكونات لذا نستطيع ان نصنف هذه المكونات وفقا لمتطلباتها في الوسط الزرعي الى اربعة اصناف :

 **Stock l Stock II Stock III Stock lᴠ**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Vitamins & Organics** | **Chelated Iron**  | **Micronutrients** | **Macronutrients** |
| Thiamine –HClNicotinic acidPyridoxin –HClBiotinGlycinInositol | Na2 –EDTAFeSO4. 7H2O | Boric acidKIMnSO4. 4H2OZnSO4. 7H2ONa2MoO4. 2H2OCuSO4. 5H2OCoCl2. 6H2O | NH4 NO3KNO3MgSO4. 7H2OCaCl2.2H2OkH2 PO4KCl |

**كيفية تحضير الوسط الزرعي :**

**المحاليل الخزنية (Stock solutions) :**

هو محلول مركز من المواد الغذائية ذات الاحتياج الكثير والقليل ((Macro & Micronutrients ,الفيتامينات والهرمونات . يتم تحضيره بوزن 10 , 100 . . . الخ اضعاف الكميات الاصلية لمكونات الوسط ويتم اذابتها بحجم مناسب من المذيب .

**مثال 1** : الكمية الاصلية لمادة KNO3 في وسط MS هي 1.9 g/l . اذا اردت تحضير محلول خزني من ذلك المكون , يجب عمل التالي :

The original amount (1.9) ₓ No. of folds (10, 100 or 1000)

 (1.9) ₓ 100 = 190 g/l

وزن 190g من KNO3وذوبه في 1لتر من الماء المقطر .

190 ₓ 1000 mg/1000 ml = 190 mg /ml final stock conc .

**مثال 2** : حضر محلول خزني لــ Kinetin

Conc. Of hormone stock (mg/ml) =Wt .of hormone / Vol. of stock

 x 100 ml mg/ml 0.1 mg/ml = x / 100 ml . . . . x = 0.1

x= 10 mg . . . . .x=10 mg / 1000 = 0.01 g of hormone dissolve in 100ml DDW .

**كيفية استخدام المحاليل الخزنية لتحضير الوسط الزرعي**

نطبق القانون التالي :

C1 V1 = C2 V2

C1= Conc. Of stock solution

V1= Volume that I have to pull it from stock

C2= Original Conc. Of medium

V2= Volume of medium needed

**المنهج العام لتحضير الوسط الخاص بزراعة الانسجة النباتية**

بعد تحضير المحاليل الخزنية ( كما ذكرت اعلاه ) يمكن تحضير 1 لتر من الوسط الزرعي وكما يلي :

اضف الى دورق حجمه 1 لتر كل من المحاليل الاربعة المذكورة اعلاه مع اضافة كمية معينة من هرمونات النمو ( Auxins , Cytokinine ) ثم عدل الاس الهيدروجيني بين (5.6 – 6 ) . الحجم النهائي يتكون من 1 لتر من الماء المقطر مرتين DDW .

لتحضير الوسط الصلب , اضف Agar –Agar بنسبة (8 g/l) ولف الدورق بغلاف المنيوم وضعه على hotplate مع magnetic stirrer لاذابة الاكار . صب الوسط في انابيب ذات سعة 20 ml وعقم بالموصدة .

**استحداث** **الكالس من الاجزاء النباتية الورقية Callus induction from leaf explants**

الكالس هو كتلة خلوية منتفخة وغير متمايزة يتكون تحت تاثير ارتفاع مستويات الهرمونات النباتية .

1. اضف مادة Chlorox (مادة معقمة ) الى الاجزاء النباتية الورقية المراد زراعتها في صحن بتري نظيف .
2. عقم وحدة الزرع جيدا قبل الاستخدام بالكحول 70% .
3. صب الـ Chlorox في المغسلة .
4. اغسل الاجزاء النباتية 3 مرات بـ DDW .
5. استخدم ملاقط معقمة لنقل الاجزاء النباتية الى صحن بتري معقم
6. قطع الاوراق بحذر الى قطع يتراوح حجمها بين (3-5) .
7. انقل الاجزاء النباتية بحذر الى انابيب الوسط الزرعي المحضرة مسبقا وبطريقة معقمة .
8. ضع الانابيب تحت الاضاءة في غرفة النمو ( الحاضنة ) .
9. سجل ملاحظاتك .
10. تفحص المزروعات كل اسبوع .

: