التدريب المعملي التاسع
اختبار التعبير الجينى عن طريق التميز الكروماتوغرافي للبتريدينات Pteridines في الدروسوفيلا

صحبت إعادة اكتشاف نتائج أبحاث مندل في عام ١٩٠٠ دراسة عالم الكيمياء جارود Garrod لأمراض الأيض في الإنسان . وبناء على دراساته لتحليل النسب العائلى، فقد إتخذ جارود مرض البول الأسود alkaptonuria مثالاً لتوريث جين متنحى وانتهى لربط بعض العيوب الوراثية بغياب إنزيمات محدد. وجاء من بعده العالمان بيدل وتاتم Beadle & Tatum في الأربعينات من القرن الماضى بمفهوم الجين الواحد للإنزيم الواحد (الجين الواحد لعديد البيتيد الواحد) . وقد أوضح بيدل وتاتم م خلال تجاربهما على النيوروسبورا Neurospora أن الجينات تقوم بتنظيم كيمياء الخلايا بالتحكم في الأنزيمات . وقد ورد بيدل وتاتم الاختلافات في الشـــكل الظاهري بين الأفراد الطبيعيين والذين يحملون طفرات لتغيير في الكيمياء الحيوية للأفراد الطافرين وأن تاثير الجينات يظهر من خلال عمل الإنزيمات . وقد استطاع العالمان هادرون Ernst Hadron ومتشل Herschel Mitchel في عام ١٩٥١م تمييز الاختلافات الكيمائية بين كائنات تحمل اختلافات وراثية عن طريق استـخدام الكروماتوجراف . وســوف تطبق في هذا العملي طريقة هادورن ومتيشـــل لفصـــل صـــبغة البتريدينات في الدروســوفيلا . وهنالك ٧ أنواع معروفة من البتريدينات في ذبابة الفاكهة وهى : دروســوبترين (برتقالى) وأيســـوزانـــثـــوبـــتريـــن (بــــنـــفســـجي مـــزرق) وزانـــثـــوبـــتريـــن (أخضر-مزرق) (وزانثوبترين (أخضر-مزرق) وسبياترين (أصفر) و ٢- امينو ٤- هيدروكسي- بتيزيدين (أزق) وبيوتيريدين (أزرق) وأيسوسبياترين(أصفر) .

الاحتياجات :

- دورسوفيلا
- مذيب مكون من ٢٨% هيدروكســيد أمونيوم وكحول بروبانول بنســبة ١:١ – ورق ترشــيح وائتمان رقم ١ (٥× ٧ بوصات)
- دباسة
- ساق زجاجة الهرس
- كأس زجاجي سعة لتر
- علبة تانج أو لبن كبيرة
- مصدر أشعة فوق بنفسجية .

الطريقة :

١- أرسم خطاً بقلم الرصاص يبعد ١/٢ بوصة من حافة الضلع الأطول للورقة وقسم الخط إلى نقاط تبعد عن بعضها مقدار بوصة . سجل رقماً أو حرفاً عند كل نقطة .
٢- بواسطة ساق زجاجية أهرس أنثى واحدة من الدروسوفيلا عند الموقع الأول ثم أغسل الساق الزجاجية في المذيب . كرر الخطوة بوضع ذكر واحد في الموقع الثاني ، ثم أنثي مختلفة في الموقع الثالث وذكر مختلف في لموقع الرابع . ثم أهرس ٣ إناث عند الموقع الخامس و ٣ ذكور عند الموقع السادس بنفس الطريقة (هنالك اختلافات في البتريدنيات بين الجنسين (لا تلمس ورقة الترشيح بيدك لماذا ؟) .
٣- أترك الورقة لتجف لمدة ٣-٥ دقائق وأكتب أسمك في الحافة .
٤- دبس حافتي الورقة (٥ بوصة) على شكل اسطوانة دون إحداث أي تداخل بين المواقع التي هرست فيها الدروسوفيلا .

٥- ضع حوالي ٥٠ مل من المذيب في كأس سعة لتر وادخل الكأس في العلبة . أدخل ورقة الترشيح في الكأس بحيث تكون مواضع الهرس إلى أسفل مع مراعاة لمس المحلول لمكان الدروسوفيلا وعدم لمس ورقة الترشيح لحواف الكأس .

٦- أقفل العلبة وأتركها في الظلام (التريدينات حساسة للضوء) لمدة ساعة ونصف.

٧- أرفع ورقة الترشيح من المذيب وعلم بقلم الرصاص حدود المذيب على الورقة . أترك الورقة في وضع قائم لتجف في الظلام لمدة ٣-٥ دقائق.

٨- أبعد الدبابيس وأفرد أسطوانة الكروماتوجرام الجافة وافحصها تحت الأشعة فوق البنفسجية في غرفة مظلمة . حدد بقلم الرصاص دوائراً على مواقع البتريدنيات التي شاهدتها .

التمرين :

١- رتب تدرج صبغة التيريدينات في الكروماتوجرام من أسفل (البداية) إلى أعلى.

٢- قارن نتائجك مع زملائك وبين اختلاف البتريدينات في الجنسين .

٣- هل لاحظت غياب بتريدينات أو ظهور بتريدينات بكميات زائدة في أي من العينات؟ ما هي هذه التريدينات؟

٤- تعزى المسافة التي ينتقل عبرها مركب معين على ورقة الترشيح إلى طبيعة المركب الكيميائية وإلى المسافة الكلية المقطوعة بواسطة المذيب ، وتستخدم هذه المسافة في تمييز المركبات المختلفة ويرمز لها بـ (RF)=

$$\frac{\text{المسافة من خط البداية إلى مركز البقعة البتريدنية}}{\text{المسافة من خط البداية إلى سطح قمة المذيب}}$$

مستخدماً الكروماتوجرام الذي حصلت عليه حدد قيمة (RF) لكل صبغة بتريدنية.