قواعد الأمان في المخبر

يعد الالتزام بشروط الأمان أثناء العمل في تجارب ومخابر البيولوجيا والوراثة الجزيئية مسؤولية كل طالب وباحث وذلك حفاظاً على سلامته وسلامة الآخرين، ولتجنب الحوادث التي قد تؤدي إلى إصابات مؤلمة وخطيرة.

للحد من المخاطر التي يمكن أن يتعرض لها الباحث في المخبر، لا بد بداية من التعرف على المواد والأجهزة التي تستخدم بكثرة في مخابر التقانات الحيوية، والتي يجب التعامل معها بالكثير من الحيطة والحذر.

1- المواد المسببة للطفرات والمواد المسرطنة:

تعتبر أغلب المواد الكيميائية التي ترتبط مع ال DNA وتستخدم لأهداف مختلفة في المخبر، مواد محدثة للطفرات وقد تكون مسرطنة، من أهم الأمثلة عليها مادة بروم الايثيديوم Ethidium bromide .

تستخدم هذه المادة بشكل كبير جدا في مخابر التقانات الحيوية بهدف كشف ال DNA وال RNA، سواء في الهلامات أثناء عملية الرحلان الكهربائي، أو في الأنابيب أثناء عمليات تنقية أنواع مختلفة من ال DNA تبعاً لبنيتها وكثافتها وبوجود كلور السيزيوم، أو غيرها من التقنيات.

من الاحتياطات المتبعة عند التعامل مع بروم الايثيديوم:

- ارتداء القفازات الطبية عند وزن كميات من بروم الايثيديوم لاستخدامها في تحضير المحاليل واستخدامها في عمليات التلوين.

- يفضل وضع كمامة على الأنف والفم أثناء التعامل مع بروم الايثيديوم وهو على شكل مسحوق أو بودرة ويفضل أن يكون العمل ضمن ساحبة غازات.

- لا ترمى المحاليل المستخدمة من بروم الايثيديوم مباشرة في الأحواض كي لا تذهب إلى مياه الصرف الصحي لمنع

تسربها لأي حقل أو ماء مخزن أو ...الخ، وإنما لا بد من معاملتها بطرق معينة لتخليص المحاليل من النسبة العظمى من بروم الايثيديوم، كتمرير هذه المحاليل على طبقة من الفحم النشيط أو غيرها.

- الهلامات التي تلون ببروم الايثيديوم لا ترمى بعد الانتهاء من تحليلها مع القمامة العادية وإنما ترمى في أكياس

منفصلة وتعامل معاملة خاصة.

– يفضل تلوين الهلامات ببروم الايثيديوم بعد نهاية الرحلان الكهربائي وعدم إضافة بروم الايثيديوم إلى سائل الرحلان الكهربائي وذلك لتجنب تلوث أجهزة الرحلان الكهربائي بهذه المادة.

– بحال سقوط هذه المادة على الأرض أو على طاولات العمل، فان المحارم الورقية التي تستخدم بتجفيف ما سقط منها، ترمى في أكياس قمامة خاصة بها وليس مع باقي قمامة المخابر.

2– المواد الكيميائية المؤذية والسامة والحارقة:

- هناك بعض المواد السامة أو المخرشة للجهاز التنفسي والتي تستخدم بكثرة في تحاليل الـ DNA، نذكر منها مادة الأكريلاميد التي تستخدم لتجهيز الهلامات التي تستخدم كأوساط لتحميل عينات ال DNA في عملية الرحلان الكهربائي العامودي. تتصف هذه المادة بأنها مخرشة للجهاز التنفسي وتسبب اضراراً للجهاز العصبي عند استخدامها بشكل مسحوق أو بودرة لكونها تتطاير في الجو المحيط، لذلك لا بد من وضع الكمامات والتعامل معها بوجود ساحبة الغازات، كما يجب تجنب تلوث الأيدي عندما تكون بحالة سائلة بعد إذابتها بمحلول الرحلان الكهربائي بها من خلال استخدام القفازات المطاطية، وتنتهي خطورتها بعد أن تتم عملية تكاثفها (بلمرتها) وتتحول إلى الحالة الجامدة (الصلبة).
- يراعى تجنب الحروق بالفينول، و بالأحماض والقلويات.....الخ
- تحفظ هذه المواد بعبوات مناسبة وبطريقة محكمة الاغلاق.

3– الأشعة فوق البنفسجية:

تعتبر الطاولة المصدرة للأشعة فوق البنفسجية إحدى مصادر الأذية للباحث، حيث تؤثر عند النظر إليها مباشرة على نظره لدرجة كبيرة قد تؤدي لفقدان البصر في الحالات القصوى، كما أنها تسبب الحروق للجلد عند تعرضه لفترة طويلة نسبياً.

يمكن تجنب أضرارها من خلال استخدام النظارات الواقية أو الأقنعة المصنوعة من مواد تسمح بالرؤية وتحد من مرور الأشعة من خلالها ووصولها لأعيننا أو لجلدنا وبشرتنا.

4- أجهزة الرحلان الكهربائي:

وخاصة تلك المستخدمة في عمليات الرحلان الكهربائي العمودي، حيث يستخدم تيار كهربائي عالي الشدة، وبالتالي يجب التأكد من وضعه بمكان جاف بعيد عن أماكن استخدام وتجمع المياه.

كذلك يجب اخذ الاحتياطات والتأكد من عدم تسرب السوائل من أجهزة الرحلان الكهربائي، وعدم ترك أغطية أجهزة الرحلان الكهربائي مفتوحة وهي موصولة بالتيار الكهربائي، وكذلك عدم تشغيل الأجهزة إلا كانت الأيدي جافة.

5 -السخانات الكهربائية ذات المحرك المغناطيسي:

تستخدم لتسخين وإذابة بعض المواد، ترتفع درجة حرارتها لأكثر من 200 درجة مئوية، ويجب الانتباه عند الانتهاء من استخدام الجهاز ان يترك ما يشير لارتفاع درجة حرارتها (لكون الجهاز لا يبرد بسرعة) لتجنب أذية أي زميل اخر بالمخبر.

بالإضافة لما سبق، هناك بعض الإجراءات التي يطلب الالتزام بها لرفع مستوى الأمان في مخابر التقانات الحيوية بشكل عام، مثل:

- ارتداء لباس المخبر باستمرار (المعطف الابيض المخبري- القفازات البلاستيكية التي تستخدم لمرة واحدة فقط) لتجنب التلوث بالمحاليل والماد الملونة والصبغات.

- عدم تناول الطعام والشراب أثناء العمل، كذلك يمنع التدخين، ونزع العدسات، ووضع الأقلام التي تستخدم أثناء العمل في المخبر في الفم وذلك لتلافي التلوث بأي من المواد الضارة أو السامة أو المسرطنة.

- تجنب ارتداء الأحذية المفتوحة من الأمام لتلافي الحروق ببعض السوائل الساخنة أو الحامضية أو القلوية بحال سقوط أي منها عند التحضير، كذلك يطلب تجنب ارتداء الكعب العالي لتأمين سهولة وسرعة الحركة عند التعرض لأي حادث مفاجئ في المخبر.

- الانتباه لعدم وضع الأيدي على طاولات التسخين الكهربائية التي قد تتجاوز درجة حرارتها ال 200 درجة مئوية، والتي قد تكون قيد الاستعمال أو بعد الاستعمال مباشرة وذلك تجنباً للحروق، وبحال انتهائك من استخدام هذه السخانات للتو، يفضل وضع ما يشير إلى أن درجة حرارتها ما زالت مرتفعة ليتجنبها الآخرون في المخبر.

- منع سحب السوائل بالماصات باستخدام الفم منعا باتاً، لتجنب المخاطر التي تنجم عن أبخرة بعض السوائل المخرشة للجهاز التنفسي، وكذلك لتجنب وصول المحاليل الحارقة، أو السامة أو المسرطنة إلى الفم ومن ثم إلى الجهاز الهضمي.

- تجنب النظر الى الاشعة فوق البنفسجية بدون نظارات او قناع.

- مراعاة غسل الأيدي قبل مغادرة المخبر.

أهم الأجهزة المستخدمة في مخابر البيولوجيا الجزيئية ومبدأ عملها

تحتاج تجارب البيولوجيا الجزيئية وبالتحديد تجارب التقانات الحيوية التي تعتمد على دراسة وتحليل ومقارنة جزيئة ال DNA لمجموعة من الاجهزة والادوات والتي تعتبر اساسية لتنفيذ هذا النوع من الدراسات.

سنتعرف في هذه الجلسة على أهم الاجهزة المستخدمة والمتوفرة لدينا في مخبر الوراثة الجزيئية في كلية الزراعة.

1-الحمام المائيWater Bath :

عبارة عن حوض يحتوي على ماء ويحتوي على مصدر لرفع درجة الحرارة مع منظم ليؤمن ثباتها على الدرجة المطلوبة، له عدة اشكال واحجام.

الحمام المائي عبارة عن حوض من الستانلس ستيل مزدوج الجدران يؤمن عزل حرارة الماء عن حرارة الجو الخارجي ومزود بغطاء ليحافظ على درجة الحرارة لأكبر فترة ممكنة، يحوي الحوض بالداخل على عربة متحركة مرتبطة بذراع يتصل بمفتاح تشغيل من الخارج مع محدد لسرعة الحركة ليؤمن تجانس حرارة الماء بالحوض وليساعد على تحريك وتجانس محتويات العينات المحضنة بالحوض.

يحتوي الجهاز على وشيعة تسخين مرتبطة بمفتاح ومؤشر على الجهاز من الخارج لاختيار ومراقبة الحرارة المطلوبة.

الغاية من استخدام الجهاز: تحضين العينات لتأمين درجة الحرارة المطلوبة للعينات بما يناسب الهدف من العمل وذلك لفترة زمنية محددة، بالإضافة لتأمين تجانس حرارة ومحتوى العينة من خلال عملية التحريك.

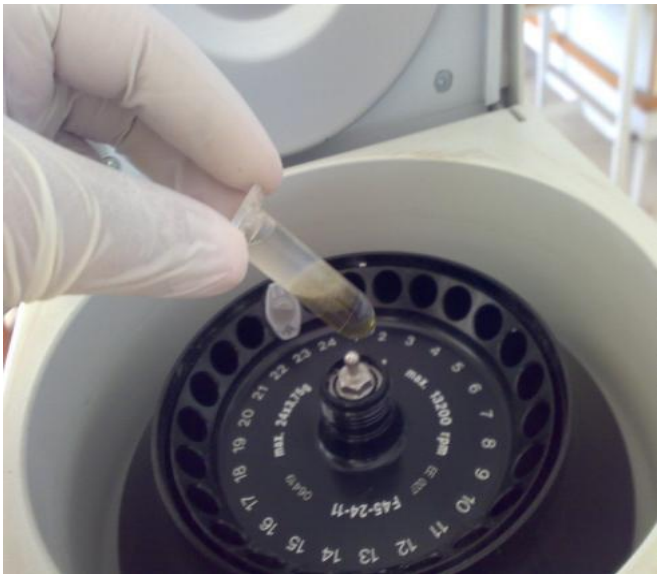
المبدأ الأساسي بالعمل :وجود وشيعة تؤمن عملية التسخين مرتبطة بمسبر يدل على درجة الحرارة ومتصل بفاصل واصل اوتوماتيكي يؤمن ثبات درجة الحرارة على الدرجة المطلوبة، أي عندما تصل درجة الحرارة بالحمام المائي للدرجة المطلوبة ينفصل التيار ويعود للعمل عندما تنخفض درجة الحرارة عن الدرجة المحددة .الجهاز مزود بمفاتيح من الخارج لإشعال واطفاء الجهاز اضافة للوحات لتوضيح ومراقبة درجات الحرارة بالإضافة لمؤشر يحدد سرعة الحركة.

2- المثفلة Centrifuge :

جهاز ذو جدران سميكة، يحتوي جوفه على حامل يتوضع عليه رأس (قابل للتغيير)يحمل تجاويف تناسب انابيب بقياسات واحجام مختلفة .يحمل من الخارج لوحات تساعد على تحديد السرعة، والزمن ودرجة الحرارة المناسبة لعملية التثفيل التي نقوم بها.

الغاية من استخدام الجهاز :فصل الاوساط أو المواد ذات الكثافات المختلفة عن بعضها البعض.

المبدأ الأساسي بالعمل :تعريض العينات لعملية طرد مركزي بسرعات كبيرة ومحددة ولفترات زمنية معينة وبدرجات حرارة معينة، مما يؤدي لفصل الاوساط عن بعضها تبعاً لكثافتها ويمكن بعد ذلك استبعاد بعض الأوساط والاحتفاظ بالأوساط الأخرى.



3- مقياس الطيف الضوئيSpectrophotometer :

الغاية من استخدام الجهاز :هو التعرف على وجود عناصر معينة في محلول ما وتركيز هذه العناصر، يلزمنا بمخابر البيولوجيا بشكل اساسي للتعرف على نقاوة ال DNA المستخلص من عينة ما ومعرفة تركيزه وبالتالي الكمية التي تم استخلاصها.

المبدأ الأساسي بالعمل :تعريض العينة لأشعة بأطوال موجات محددة (مناسبة للمادة المدروسة) ويعتمد على معرفة كمية الاشعة الممتصة من قبل جزيئات مادة ما عند طول موجة معين، وبالنسبة للأحماض النووية، الاشعة الممتصة هي الأشعة فوق البنفسجية Ultra violet (U.V.) وتتناسب كمية الاشعة الممتصة طرداً مع كمية الحمض النووي في العينة المدروسة.

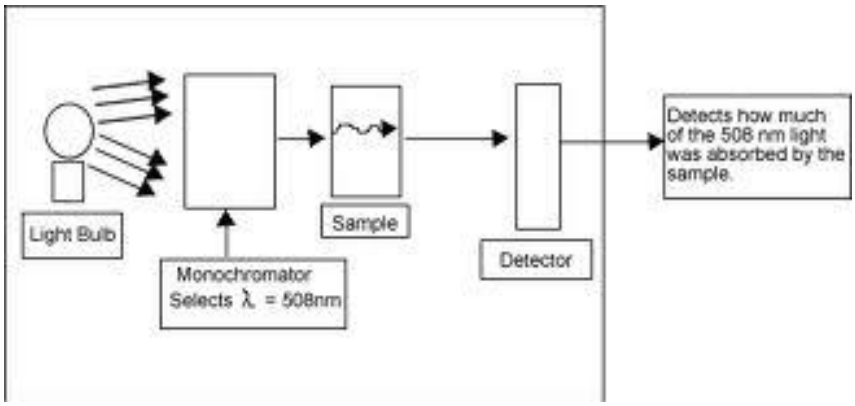
من المعروف ان الاحماض النووية تمتص الاشعة فوق البنفسجية بسبب وجود البنية الحلقية للقواعد الآزوتية، ويكون الامتصاص الأعظمي عند طول الموجة 260 n.m.

كل قراءة على جهاز السبكترومتر للكثافة النظرية =1 ، يدل على ان العينة المختبرة تحوي على 50 ميكروغرام من ال DNA في 1 مل من العينة.

تركيز الـ DNA /1 ميكروليتر من العينة = قراءة الكثافة النظرية x 50 x / عامل التمديد 1000 /

نقاوة الـ DNA: القراءة عند طول موجة 260nm/ القراءة عند طول موجة 280nm

قيمة النقاوة بين(1.8- 2) تعني ان الـ DNA نقي وغير ملوث بالبروتينات



4 - جهاز الدوران الحراري(جهاز الPCR):

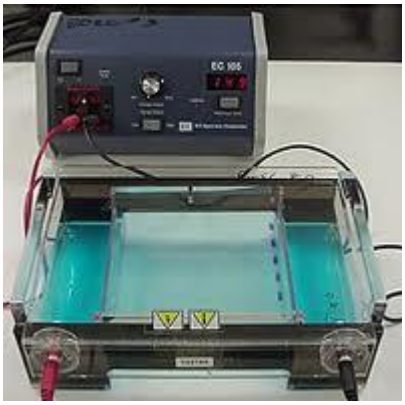
استخدام الجهاز :لمكاثرة قطعة محددة من ال DNA والحصول على عدد كبير من النسخ المتطابقة ليصل عددها لمليارات من الجزيئات بدءاً من جزيئة واحدة، يتم تحديد القطعة المراد مكاثرتها من خلال استخدام زوج من بادئات معينة وتعريض العينات لدورات حرارية تتألف كل منها من 3 مراحل (فصل ال DNA ، ارتباط البادئة بالقالب DNA، تصنيع واستطالة السلاسل الجديدة).

المبدأ الأساسي بالعمل :يعتمد على الية تسمح ببرمجة الجهاز لتأمين عدد معين من الدورات لفترات زمنية محددة ودقيقة وكذلك بدرجات حرارة معينة، يتميز الجهاز الجيد بآلية سريعة ودقيقة في عملية الانتقال بين درجات الحرارة المختلفة (من 96 ، الى 56 ، ثم 72 ، ولفترات محددة، ومن ثم البدء بدورة جديدة بشكل متتابع.)

5 - جهاز الرحلان الكهربائي Electrophoresis :

استخدام الجهاز :لفصل جزيئات ال DNA تبعا لوزنها الجزيئي ، على وسط(هلامة اجاروز أو أكريلاميد)، بوجود تيار كهربائي وسائل رحلان كهربائي وبشدة تيار محددة.

المبدأ الأساسي بالعمل :تعريض عينات ال DNA لتيار كهربائي (من جهاز خاص يزود بتيار كهربائي معروف الشدة) يجعل جزيئات ال DNA تهاجر من القطب السالب إلى القطب الموجب تبعا لوزنها الجزيئي.



6- جهاز التصوير والتوثيق:Gel documentation

استخدام الجهاز : لتصوير الهلامات والتعرف على ال DNA وحفظ الصور للاستفادة منها في معرفة نوعية ال DNA بعد الاستخلاص او لكشف الاختلافات بين قطع DNA من افراد معينة.

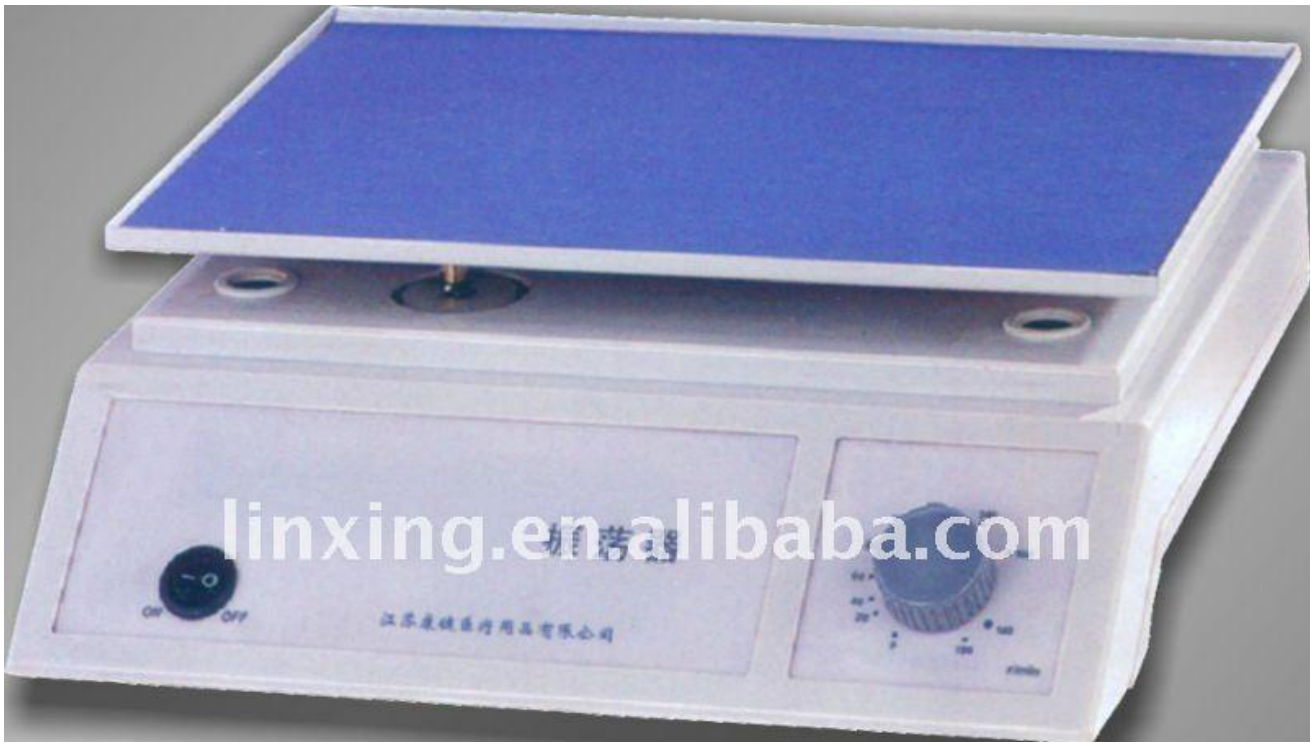
للتعرف على نقاوة ال DNA المستخلص من عينة ما ومعرفة تركيزه وبالتالي الكمية التي تم استخلاصها.

لدراسة الاختلافات بين DNA الافراد المدروسة باستخدام تقنيات مختلفة.

المبدأ الأساسي بالعمل :وجود مصدر للأشعة فوق البنفسجية وكاميرا والية لنقل الصورة الى شاشة معينة وان تكون الهلامة معاملة ببروم الايثيديوم الذي يدخل صمن جزيئة ال DNA ويشكل معقد يتوهج بتعريضه للأشعة فوق البنفسجية وتتناسب شدة التوهج طردا مع كمية ال DNA على الهلامة.

الطاولة المتحركة - الهزاز الافقيShaker :

استخدام الجهاز :لمزج العينات وتأمين تجانس المكونات المختلفة اثناء مراحل مختلفة من العمل، سواء باستخلاص الاحماض النووية او التلوين ببروم الايثيديوم .يمكن اختيار السرعة المناسبة لظروف العمل.



تحضير المحاليل والحساب الدقيق لتراكيزها

تحتاج التجارب العلمية بشكل عام وتجارب البيولوجيا الجزيئية بشكل خاص لاستخدام عدد كبير من المحاليل ذات التراكيز الدقيقة جداً، حيث ان الخطأ في تحضير أحد المحاليل قد يؤدي في بعض الحالات لفشل تجارب استمر العمل الأولي فيها لعدة أسابيع، لذلك سنتعرض في هذه الجلسة لبعض التعاريف والوحدات التي تلزمنا بشكل كبير اثناء الاختبارات العملية ومن ثم لطرق حساب تراكيز المحاليل ومن ثم تحضيرها.

الوحدات المستخدمة ولرموزها:

-الأوزان:

1 غرام = 1000ميلي غرام(مغ)= 10^6ميكروغرام(مكغ) = 10^9 نانوغرام (نغ) = 10^{12} بيكوغرام (بغ)

1 g = 1000(10^3) mg = 1000.000 (10^6) µg = 10^9 ng = 10^{12} pg

-الحجوم:

اليتر = 1000 ميلي ليتر (مل) = 10^6 ميكروليتر (مكل)

1 Litre (L) = 1000 mL = 10^6 µL

-الأطوال:

1متر (10^3)1000 = مليمتر(مم)= 10^6 ميكرومتر(مكم)= 10^9 نانومتر (نم)= 10^{10}انغستروم(Ao)

1 m = 1000(10^3) mm = 10^6 µm = 10^9 nm = 10^{10} Ao

-التراكيز:

المول : هو القيمة المطلقة للمادة بمعنى ان المول يحتوي على 10^{23} 6.022x جزيئة من المادة التي تملك وزناً جزيئياً معين.

المولارية :هي إذابة مول واحد [(10^{23} 6.022x) جزيئة] من مادة معينة في حجم نهائي قدره ليتراً واحد اً .على سبيل المثال : مول واحد من ماءات الصوديوم وزنه الجزيئي يساوي 42 غ.

إذا أردنا تحضير محلول من ماءات الصوديوم تركيزه مولار واحد، فهذا يتطلب إذابة 42 غ من ماءات الصوديوم في الماء حتى نحصل على حجم نهائي يساوي ليتراً واحداً.

1مول = 1000 ميلي مول =10^6 ميكرومول =10^9 نانومول = 10^{12} بيكومول

1mol = 1000 mmol = 10^6 µmol = 10^9 nmol = 10^{12} pmol

1مولار = 1000 ميلي مولار =10^6 ميكرومولار =10^9 نانومولار = 10^{12} بيكومولار

$1M = 1000\ mM = 10^6\ \mu M = 10^9\ nM = 10^{12}\ pM$

لحساب التركيز :ان اذابة 2.0 بيكومول من اية مادة في 122 ميكروليتر ماء يعطي محلولا تركيزه. 2nM

$$0.2\ pmol / 100\mu L = 2nM$$

ملاحظة :يجب ان تأخذ بعين الاعتبار قدرة الميزان أو الماصة المتوفرين في المخبر على وزن الكمية المطلوبة او سحب الحجم المطلوب وايجاد الحل المناسب لكل حالة.

المحاليل الأم (محاليل التخرين:)

عند الحاجة لمحاليل بتراكيز منخفضة جداً أو محاليل بكميات كبيرة، و بشكل خاص تلك المحاليل التي تتطلب وقتاً طويلا لتحضيرها، نقوم بتحضير المحلول بشكل يكون تركيزه 5 مرات، أو 10 مرات أو 20 مرة الخ ...على ان نضمن إذابة المادة بشكل كامل في السائل ومن ثم تجرى عملية تخفيف المحلول للتركيز المطلوب قبل الاستعمال مباشرة.

مثال :بفرض اننا نرغب بتحضير ليتراً واحداً من محلول الرحلان الكهربائي (1X TBE) المكون من:

89mM Boric acid , 20mM (Ethylene diamine tetra acetic acid)EDTA , 89mM (Tris hydroxylmethyl aminomethane hydrochloride) Tris-HCl, pH=8

علماً بأن الوزن الجزيئي للمواد المذكورة والذي يكون عادة مكتوباً على العبوات ، ويرمز له بالأحرف MW أو FWهو:

Boric acid = 61.84 , EDTA= 372.24 , Tris-HCl= 157.6

بما ان هذا المحلول يستخدم بكميات كبيرة يومياً ويحتاج لوقت طويل كي يذوب ويصبح جاهزاً للاستخدام، لذلك نقوم

بتحضير المحلول الأم منه(Mother solution محلول التخزين)على ان يكون مركزاً عشرة مرات ويرمز له عادة بالرمز. (10X)

الكميات اللازمة لتحضير ليتر واحد تركيزه 10X من محلول الرحلان الكهربائي:

Tris-HCl = 140.264 g, Boric acid = 54.937 g, EDTA = 74.4g.

تذاب المواد الثلاثة في حجم معين ولكن اقل من ليتر واحد، وليكن قدره 022 مل من الماء المقطر وتعدل درجة ال pH

لتصبح مساوية ل 8 ومن ثم يستكمل الحجم بإضافة الماء المقطر حتى نحصل على حجم نهائي مساو لليتر واحد.

عند الرغبة في تخفيف المحاليل حتى نحصل على التركيز المطلوب وبالحجم اللازم، نطبق المعادلة التالية:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

حيث C1 هو تركيز المحلول الأساسي و C2 هو التركيز المرغوب، V1 هو الحجم المطلوب من المحلول المركز للحصول

على الحجم المطلوب V2 عن طريق إضافة الماء المقطر(كمية الماء المقطر= V2-V1)

{ نهاية الجلسة }