الكلية الزراعة

الهندسة الوراثية / العملي

المختبر الاول : استخلاص الدنا البلازميدي Plasmid DNA Extraction

البلازميدات عبارة عن جزيئات دائرية Circular DNA Molecules بشكل دنا لولبي مزدوج دائري مغلق عالي الالتفاف supercoiled circular closed DNA تتواجد خارج الدنا الكروموسومي الاصلي للخلية البكتيرية ولها القابلية على التكرار بشكل مستقل عن الكروموسوم . تتواجد البلازميدات في بدائية النواة وخصوصا البكتيريا ونادرا ما تتواجد في حقيقية النواة الواطئة وتتميز بصغر حجومها الجزيئية مقارنة بالكروموسوم فهي تشكل 1% من الكروموسوم . ولا تتوقف حياة المضيف على وجود البلازميدات ,الا انها تضفي على الضيف صفات اضافية تمكنه من العيش تحت ظروف استثانية .

من اهم الصفات الوراثية التي تشفر لها البلازميدات مايلي :

2. انتاج البكتريوسينات 1.Bacteriosens. المقاومة للمضادات الحيوية .
4. تخمير السكريات3. انتاج الهيمولايسين Heamolysine .
5. مقاومة المعادن الثقيلة
6. تحطيم الهيدروكاربونات.

من اهم استخدامات البلازميدات هو انها تستخدم في مجال الهندسة الوراثية كنواقل استنسال Cloning vectors نتيجة امتلاكها للعديد من الصفات ومنها :

2. قابليتها على التواجد بنسخ متعددة .1. صغر حجومها الجزيئية .

طريقة عزل البلازميد مختبريا :

بشكل عام يمكن اعتمادا وسيليتين لعزل DNA البلازميدي مختبريا وهما :

1. **العزل على اساس سرعة التحضير** :

وتعتبر النقاوة هنا ليست مهمة وانما المهم التحري فقط عن وجود البلازميد المطلوب عزله ودراسته ويستخدم في هذه الطريقة التقنيات التالية :

A-Boiling method.

B-Small scale Alkaline lysis.

2. عزل البلازميد لغرض الحصول على كميات كبيرة منه ومن ثم تنقيته وهذا ما يستخدم في تقنيات الهندسة الوراثية اعتمادا على تقنية التحلل القاعدي على النطاق الكبير Large Scale Alkaline lysis والتي يتم فيها كسر الخلايا وفصل الدنا البلازميدي. وفيما يلي شرح مفصل لهذه الطريقة :

اساس **طريقة التحلل القاعدي** هو حدوث عملية المسخ Denaturation لكل من الدنا البلازميدي و الكروموسومي باستخدام NaOH والتي تقوم بكسر الاواصر الهيدروجينية اذ يبقى نصف الدنا اللازميدي محتفظا بهيئته الطبيعية Super Coiled نتيجة مقاومته لعملية التجزء في حين يتجزء الدنا الكروموسومي والسبب في ذلك يعود الى الاختلاف في الوزن الجزيئي والشكل الفيزيائي بين البلازميد والكروموسوم . وعند تعديل PH تحدث عملية Renaturation فتعود انصاف جزيئات الدنا البلازميدي الى وضعها الطبيعي بينما تتكون شبكة معقدة من الدنا الكروموسومي وتترسب بواسطة خلات البوتاسيوم ,بعدها ينقل الدنا البلازميدي الى انبوبة اختبار اخرى ويرسب بواسطة الكحول .

المحاليل المستخدمة :

1.Stock solution l (TEG) 500ml (50mM glucose , 25mMTris HCl (Ph=8.0) ,10Mm EDTA (Ph=8.0))

2. Stoch Solution ll 500ml (1% SDS , 0.2 N NaOH)

3. Stoch Solution lll 500ml (3M Potassium acetate , glacial acetate acid)

1. يحضر الوسط Luria broth (LB) ويضاف اليه المضاد الحيوي ampicillin بتركيز 50 ملغم/مل بعد ان يعقم بطريقة الترشيح ثم يضاف الى الوسط بعد ان يبرد .
2. يلقح وسط LB المضاف اليه المضاد الحيوي بمستعمرة واحدة من سلالة E.coli وتحضن لمدة 24 ساعة على درجة حرارة 37مْ , ان الغاية من اضافة المضاد الحيوي هو تحفيز انتاج البلازميد والحفاظ عليه لانه يفقد بعد نقلات للسلالة .
3. يؤخذ 0.5 مل من المزروع السابق ويضاف الى 500 مل من وسط LB المضاف اليه الامبسيلين باستخدام دورق حجمه 2 لتر ويحضن بدرجة 37مْ مع وجود التهوية وذلك باستخدام حاضنة هزازة ثم نؤخذ قراءات للمزروع باستخدام جهاز المطياف الضوئي على طول موجي 600 نانومتر عندما تصل القراءة (الكثافة الضوئية O.D) للمزروع 0.6 نوقف عملية الحضن .
4. لزيادة نسخ البلازميدات داخل خلايا المضيف يضاف المضاد الحيوي كلوامفينيكول (يقوم هذا المضاد بوقف تصنيع البروتين داخل الخلية البكتيرية مما يؤدي الى توقف تكوين الدنا الكروموسومي وبالتالي يستمر تضاعف الدنا البلازميدي فقط لانه غير معتمد على البروتينات

اللازمة لتصنيع الدنا الكروموسومي ,ولتحضير المضاد الحيوي يؤخذ 10 غم منه بتركيز 10% ويذوب في 100 مل من الايثانول المطلق 95% وبعدها يحضن مع التحريك في حاضنة هزازة لمدة 15 ساعة فقط .

5. تجمع الخلايا بواسطة جهاز الطرد المركزي المبرد (4 مْ) لمدة 10 دقائق وبسرعة 8000 دورة(rpm) وبعد اكتمال عملية الطرد المركزي يهمل الرائق ويؤخذ الراسب (البكتيريا) وتعاد الخطوة مرة اخرى بإضافة مزروع جديد في الراسب وينبذ فنحصل على راسب بكمية اكبر .
6. يضاف الى الخلايا التي تم تنميتها والمترسبة 0.2 مل من المحلول الاول TEG المبرد مع التحريك ببطء واحتراس ويحتوي هذا المحلول على :

الكلوكوز الذي يعمل على زيادة الضغط الازموزي خارج الخلية , **Tris** الذي يحافظ على الاس الهيدروجيني pH عند 8.0 و **EDTA** الذي يعمل كعامل مخلبي مع التأكيد على تعليق الخلايا الى نفس المحلول وتهيأتها للخطوة القادمة وهي تحليل الخلايا .

7. ينقل العالق البكتيري الى انبوبة طرد مركزي جديدة ويضاف لها 10 مل من المحلول الثاني II مع المزج مع التأكيد على عدم استخدام المازج الكهربائي Vortix لتجنب تكسر جزيئات الحامض النووي ,ويحفظ بحمام ثلجي لمدة 5 دقائق ,يحتوي هذا المحلول على **SDS** الذي يعمل على تخريب جدار الخلية اذ يكسر جزء من دهون الجدار ويمسخ البروتينات الخلوية اما **NaOH** فانه يقوم بمسخ الدنا الكروموسومي ويحوله الى شريط مفرد ,ثم يضاف 7.5 مل من المحلول الثالث III بواسطة قلب الانبوبة ويحفظ بدرجة صفر لمدة ساعة .
8. ينبذ الخليط بجهاز الطرد المركزي بسرعة 10000 دورة ولمدة 20 دقيقة وينقل الرائق الى انبوبة اخرى باستخدام ماصة دقيقة اذ تكون نهايتها رفيعة لان استخدام ماصة ذات نهاية عريضة يؤدي الى اخذ جزء من الراسب .
9. يحسب حجم الرائق ويضاف له كحول آيزوبروبانول وبنسبة 7:10 (اي 7 اجزاء من الكحول الى 10 اجزاء من الخليط) ويترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة 2 دقيقة ثم بعدها ينبذ الخليط بسرعة 100 دورة وعلى درجة حرارة 4 مْ ولمدة 20 دقيقة ,بعد اكتمال عملية النبذ سوف نلاحظ تكون خيوط الدنا المترسب واحيانا تكون دقيقة جدا وشفافة ولا يمكن رؤيتها ثم يؤخذ الراسب الحاوي على الدنا البلازميدي فقط .
10. يغسل الراسب عدة مرات بالايثانول 70% للتخلص من اثار الملح وSDS المتبقي مع الدنا البلازميدي ويتم التخلص من الكحول بواسطة ماصة ويترك ليجف لمدة 5 دقائق.
11. يذوب الراسب بمحلول Tris –EDTA (TE) ويمكن بعدها حفظه بالتجميد وبهذه الطريقة نحصل على بلازميد من مزرعة بكتيرية تكون كميته بحدود 1-2 ملغم .

كلية الزراعة

قسم علوم الاغذية **الهندسة الوراثية / العملي**

المختبر الثاني : فصل الحامض النووي الرايبوزي RNA

في بعض الاحيان قد يتطلب الامر فصل RNA الا انه بداية يعرف ان RNA حساس جدا للتكسير بواسطة الانزيمات المحللة للRNA (RNase) لذلك تحتاج عملية عزل RNA الى عناية فائقة .فيجب ان نقلل الى ادنى حد ممكن من نشاط الانزيمات المحللة لهذا الحامض والتي تتحرر اثناء خطوة تحليل الخلايا , ويمكن ذلك بواسطة استخدام بعض المواد الكيميائية والتي تثبط من فعل RNase بمجرد انطلاقها من الخلايا المتحللة . كذلك يجب ان تكون جميع الادوات البلاستيكية و الزجاجيات والمحايل المستخدمة خالية ايضا من هذه الانزيمات ويمكن ذلك باستخدام بعض الوسائل منها على سبيل المثال استخدام درجة حرارةعالية حوالي 180 مْ لمدة ساعتين او باستخدام مواد كيمائية مثبطة لل RNA مثل (DEPC Diethyl pyrocarbonate) ويتبع ذلك التعقيم بالاوتوكليف.

التخلص من الRNase :

اولا :استخدام الDEPC:

DEPC مثبط فعال للRNase ويستخدم عادة لمعاملة المحاليل والادوات المستخدمة في عملية تنقية الRNA حيث يعمل على تثبيط انزيمات RNase عن طريق اضافة مجموعة كاربوكسيل Carboxylation الى السلاسل الجانبية لبعض الاحماض الامينية الخاصة في الانزيم .

ويتم عادة اضافته الى المحاليل المنظمة والمواد الاخرى المستخدمة للتنقية بتركيز نهائي يتراوح ما بين 0.05 الى 0.01% (v/v) وبعد رج المحلول لعدة ساعات باستخدام هزاز كهربائي او تقليبه بشدة مغناطيسيا باستخدام مقلب مغناطيسي لمدة 20الى 30 دقيقة يتم التخلص من آثار DEPC تماما بواسطة تعقيم المحلول المعامل باستخدام الاوتوكليف واثناء التعقيم تسبب الحرارة والضغط على تكسير الDEPC الى ثنائي اوكسيد الكاربون والايثانول وكلاهما متطاير .

ملاحظات :

- لا يتم التخلص من الDEPC بالتعقيم بواسطة الاتوكليف في حالة المحاليل المحتوية على الSDS .
- لا يجب اضافة الDEPC الى اي محلول منظم يحتوي على مادة الTris او مادة البيتا ايثانول نظرا لتفاعل الDEPC مع هذه المواد , ولكن بدلا عن ذلك يتم استخدام ماء معقم سبق معاملته بالDEPC (اي انه تم اضافة الDEPC الى الماء ثم تعقيم الماء للتخلص من الDEPC) ثم تعقيم المحلول مرة ثانية .

- في حالة التخلص من الDEPC بالتعقيم بواسطة الاوتوكليف يجب عدم اخراج المحاليل مباشرة من الاوتوكليف بعد انتهاء التعقيم ولكن يجب تركها في الاوتوكليف لعدة ساعات وذلك للتخلص من اي اثار للDEPC والتي قد يؤدي وجودها الى حدوث تحوير كيميائي لقواعد الادنين في الRNA مما قد يسبب مشكلة اثناء ترجمة الـ RNA الى بروتين .

ثانيا: استخدام املاح الجوانيديم

بالاضافة الى الDEPC هناك بعض المواد الاخرى التي يمكن استخدامها لتقليل او ازالة اي نشاط لانزيمات الRNase , الا ان هذه المواد عادة لا تستخدم بمفردها وانما كمكون من مكونات المحاليل المنظمة المستخدمة في عزل الRNA فعلى سبيل المثال في حالة الخلايا الغنية بانزيمات الRNase يعتبر طحن العينة في محلول يحتوي على الجوانيدين ثيوسيانات او الجوانيدين هيدروكلوريد هو الاجراء المفضل والذي يعطي نتائج ثابتة من عينة لاخرى.

الجوانيدين هيدروكلوريد عبارة عن مادة ايونية قوية يكمن فعلها الاساسي في تغيير طبيعة البروتينات المعرضة لهذه المادة.وهي تعتبر مثبط ممتاز لنشاط انزيمات الRNase اثناء تنقية الاحماض النووية من الخلايا او الانسجة عند استخدامها بتركيز يتراوح من 4-8 مولر اما بالنسبة للجوانيدين ثيروسيانات فيعتبر اقوى في تاثيره من الجوانيدين هيدروكلوريد ويعتبر الافضل في حالة تحضير الRNA من المصادر الغنية بانزيمات الRNase خصوصا انسجة البنكرياس .

الطرق المستخدمة في عملية عزل الRNA

طريقة الاستخلاص المستخدمة تعتمد على مصدر الRNA ولكن في العادة تتضمن الخطوات المستخدمة في الاستخلاص الاتي :

1. تكسير الخلايا للحصول على الاحماض النووية بوجود مثبطات للRNase .
2. الجدر الخلوية والاغشية الخلوية الناتجة من التكسير يتم ازالتها بواسطة الطرد المركزي .
3. يتم التخلص من البروتينات بواسطة الفينول / كلورفورم .
4. يتم تجميع الاحماض النووية بواسطة الترسيب باستخدام Na^+/ Ethanol على درجة حرارة منخفضة .
5. يتم التخلص او ازالة DNA بواسطة الطرد المركزي في محلول 5.7 مولر من كلوريد السيزيوم حيث يتجمع الRNA في قاع الانبوبة ويمكن الحصول عليه وغسله بواسطة محلول 3 مولر من خلات الصوديوم.

طريقة الجوانيديم-كلوريد السيزيوم

تعتمد هذه الطريقة على معاملة الخلايا بمادة ايزوثيوسيانات الجوانيديم لغرض تحليلها وفي نفس الوقت تثبيط انزيمات RNase. بعد ذلك ينقى محلول الRNA من المتحلل الخلوي بواسطة الطرد المركزي الفائق السرعة خلال متدرج كثافي من كلوريد السيزيوم او ثلاثي فلورو خلات السيزيوم .ونظرا لان الRNA يتميز بانه اكثر كثافة من الDNA واغلب البروتينات ,فانه يترسب في قاع انبوبة الطرد المركزي بعد حوالي 12- 14 ساعة من الطرد المركزي على سرعة تساوي 32000 rpm وتؤدي هذه الطريقة التقليدية الى الحصول على RNA عالي الجودة بالمقارنة مع الطرق الاخرى الموجودة ,الا انه لا يمكن الحصول على انواع الRNA الصغيرة مثل tRNA بواسطة هذه الطريقة كما ان من عيوب هذه الطريقة :

1. انها تستغرق وقتا طويلا
2. معقدة وتتطلب الطرد المركزي لمدة طويلة .
3. عدد وحجم العينات التي يمكن استخدامها لتحضير الRNA يكون محدود ويعتمد على عدد الفراغات الموجودة في حامل الانابيب الخاص بجهاز الطرد المركزي .

وبالرغم من هذه العيوب الا انه اذا كان الهدف هو الحصول على RNA عالي الجودة من عدد محدود من العينات فان هذه الطريقة تعتبر الاكثر تفضيلا .

طريقة الجوانيدين – فينول

تعتبر الافضل نظرا لامكانية فصل الRNA من عدد كبير من العينات خلال مدة قصيرة 4-2 ساعة دون اللجوء الى استخدام الطرد المركزي فائق السرعة كما يمكن تنقية جميع جزيئات الRNA بالاضافة الى استخدامها في عزل الRNA اما على نطاق صغير او على نطاق اكبر طبقا لحجم العينة المستخدمة .

وتعتمد هذه الطريقة على قدرة الRNA على البقاء ذائبا في الطبقة المائية بعد تحليل الخلية بواسطة محلول يحتوي على 4 مولر جوانيدين ثيوسيانات ثم اجراء عملية رج لنواتج التحليل الخلوي مع محلول فينول / كلوروفورم على Ph=4 .

وعند هذه الدرجة المنخفضة من Ph تنتقل جزيئات الDNA الى طبقة فينول /كلوروفورم العضوية اما البروتين وبقية الجزيئات الخلوية الاخرى فتترسب عند السطح الفاصل بين الطبقة المائية والطبقة العضوية .

التجربة العملية

اولا: المحاليل

1. محلول DEPC
2. الفينول المشبع بالماء
3. محلول 2 مولر خلات الصوديوم Ph 4

4. Isoamyl/ chloroform (49 :1)
5. ايزوبروبانول Isopropanol .

طريقة العمل

1. يطحن 100 ملي غرام من الانسجة الحديثة(حيوانية او نباتية) على درجة حرارة الغرفة بواسطة مزجها مع 1مل من محلول DEPC.
2. ينقل المستخلص الى انبوبة مصنوعة من مادة البولي بروبين ذو سعة 4 مل ثم يضاف اليه على الترتيب كلا من:
   0.1 مل من محلول 2مولر خلات الصوديوم
   1 مل من الفينول المشبع بالماء
6. 0.1 مل من محلولIsoamyl/ chloroform (49 :1)

ثم يتم غلق الانبوبة وتخلط جيدا عن طريق قلب الانبوبة بعد اضافة كل محلول وبعد الانتهاء من جميع المحليل ترج بشدة لمدة 10 ثواني

3. تحضن الانبوبة في الثلج لمدة 15 دقيقة ثم تجرى عملية طرد مركزي على درجة حرارة 4 لفصل الطبقة المائية عن طبقة الفينول العضوية .
4. تنقل الطبقة المائية المحتوية على RNA الى انبوبة جديدة ثم يتم اضافة ما يساوي حجمها من الايزوبروبانول وتحضن الانبوبة على درجة حرارة 20 مْ لمدة ساعة على الاقل لترسيب الRNA .
5. تنقل الانبوبة الى جهاز الطرد المركزي على سرعة 10000 لمدة 20 دقيقة وبدرجة حرارة 4مْ ثم يتم التخلص من الرائق.
6. يذاب الراسب(الحاوي على الRNA) في 300 مايكروليتر من محلول DEPC ثم ينقل الى انبوبة ذات سعة 1.7 مل خالية من اي اثار للRNA.
7. يرسب المحلول الاخير الحاوي على RNA باضافة حجم مساوي له من الايزوبروبانول (المبرد بالثلج) ثم تحضن الانبوبة على درجة حرارة 20مْ لمدة ساعة .
8. يجمع الراسب بالطرد المركزي في جهاز الطرد المركزي الدقيق على اقصى سرعة لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 4مْ ثم يستبعد الرائق.
9. يغسل الراسب مرتين بواسطة 500 مايكروليتر من الايثانول 70% ثم تجرى عملية طرد مركزي ويجفف الراسب .
10. يذاب راسب الRNA مايكروليتر ماء مقطر معامل بمادةDEPC.

المختبر الثالث : انزيمات قطع الDNA

كما هو معروف فان البروتينات موجوده داخل الخلية على شكل قطع منفصلة عن بعضها البعض وهذا بالطبع يسهل عملية فصلها عن بعضها البعض بطرق فنية مناسبة, ولكن الجينات موجودة على الكروموسومات على شكل حبات متصلة ببعضها البعض وليست على شكل قطع منفصلة وهذا التسلسل والترابط في الجينات جعل عملية فصله وعزل واستخلاص جين محدد من بقية الجينات مهمة صعبة ان لم تكن مستحيلة قبل عام 1970.

ان اكتشاف الانزيمات القاطعة (Restriction Nucleases) ساعد في عملية استخلاص الجينات وقطع الدنا ونسخه.

الانزيمات القاطعة Restriction Nucleases

لا شك ان كل كائن حي لديه طرق دفاع مختلفة تحميه من الظروف البيئية غير المناسبة له والبكتيريا هي احدى هذه الكائنات ولها اعداء كثر ومن اهم اعدائها الفيروسات المختلفة ولقد قامت بعض انواع البكتيريا بانتاج انزيمات مهمتها تدمير الفيروسات ومن هذه الانزيمات الانزيمات القاطعة Restriction Nucleases وتقوم هذه الانزيمات بقص الحامض النووي الDNA للفيروس وبذلك يشل عمله ويبطل مفعوله. وبما ان الDNA مادة موجودة بشكل طبيعي في البكتيريا كما هو الحال في الفايروسات ومعظم الكائنات الحية فان هذه المقصات قد تشكل خطرا على البكتيريا نفسها لقصها الDNA الخاص بها. ولكن هذا لا يحدث والسبب في ذلك قيام البكتيريا بتحوير اجزاء من الDNA الخاص بها عن طريق اضافة مجموعة المثيل (Methyl) الى بعض القواعد النتروجينية من نوع الادنين او السايتوسين (Methylation at an A or a C residue) فلا يستطيع المقص او القاطع من قص الحامض النووي الخاص بالبكتيريا وعند اكتشاف هذه الانزيمات في السبعينيات بدأ العلماء في استخدامها كمقصات لقص الDNAوساعدتهم هذه الانزيمات في عملية التحكم في الDNA. ويوجد حاليا اكثر من مائة نوع من هذه الانزيمات وتقسم هذه الانزيمات الى نوعين :

1. النوع الاول يقص شريط الDNA المزدوج بشكل رأسي مستقيم.
2. النوع الثاني يقص بشكل متعرج وبالتالي يجعل طرفي الDNA المقطوع مادة قابلة للصق قطعة غريبة من الDNA وينتج عن هذا اللصق في الفراغ الناتج قطعة مركبة من قطعتين مختلفتين من الDNA وهذه القطعة تسمى الدنا المهجن (Recombinant DNA).

كيف يتعرف الانزيم القاطع على المكان المفترض ان يحدث القطع فيه ؟

كل انزيم قاطع يعتبر مقص خاص لقطع الDNA في نقطة محددة. ويتعرف الانزيم القاطع على مكان القطع حسب تسلسل قواعد الDNA للقطعة, فكل انزيم قاطع يقطع في تسلسل محدد فمثلا الانزيم القاطع المعروف هيبا واحد (Hpa I) يقطع عندما يجد 6 من القواعد النتروجينية في هذا التسلسل GTTAAC (سمي هذا الانزيم بهذا الاسم لانه يوجد في بكتيريا الهيموفلس باراانفلونزاHemophilusparainfluenzae وهو من الانزيمات التي تقطع بشكل رأسي مستقيم) بينما الانزيم الايكوار واحد (EcoRI)المأخوذ من بكتيريا Escherichia coli قيقطع عند التسلسل GAATTC وهو من الانزيمات التي تقطع بشكل متعرج.

استخدام انزيمات القطع

يعد استخدام انزيمات القطع غاية السهولة اذ يتم اضافة الكمية المناسبة من الانزيم الى محلول الDNA المراد هضمه في وجود محلول منظم مناسب للمحافظة على درجة pH مناسبة لفعل الانزيم ويجب حساب كمية الدنا المراد هضمه ويفضل ان لايزيد عن 10 مايكروغرام وعادة يتم استخدام 2-1 وحدة من انزيم القطع وذلك لهضم واحد مايكروغرام من الدنا الا انه في بعض الحالات يتم زيادة عدد وحدات انزيم القطع لضمان الهضم التام للدنا خاصة اذا كان الدنا يحتوي على شوائب تؤدي الى نقصان النشاط الانزيمي , ويلاحظ ان معظم انزيمات القطع تؤدي وظيفتها على اتم وجه عند درجة pH تعادل 7, ويلي ذلك تحضين خليط التفاعل على درجة 37مْ.

يعبر عن النشاط الانزيمي بالوحدات units اذ ان الوحدة هي كمية الانزيم التي تستطيع هضم واحدمايكروغرام من الDNA خلال ساعة عند درجة حرارة 37مْ.

التجربة العملية

المحاليل المطلوبة:

1. DNA المراد هضمه.
2. انزيم القطع المراد استخدامه (يخضع لطبيعة الدراسة التي يقوم بها الباحث).
3. المحلول المنظم الخص بأنزيم القطع (عادة ما يورد مع الانزيم من الشركة المنتجة).

طريقة العمل

1. يجب حساب كميات المحاليل اللازمة لإجراء تفاعل هضم للDNA سواء كروموسومي او بلازميد آخذا في الاعتبار ان حجم النهائي لمخلوط التفاعل 20 مايكروليتر.

2. اخلط الماء مع محلول الDNA في انبوبة سعة 1.5 ملي لتر معقمة.
3. اضف 2 ميكروليتر من محلول الهضم المنظم 10x(يتم تحضير هذا المحلول مركزا بمقدار 10 مرات) ثم اخلط المحليل السابقة عن طريق طرق قاع الانبوبة باصبع اليد.
4. اضف الكمية المطلوبة من انزيم الهضم .
5. تجرى عملية الطرد المركزي لمحتويات الانبوبة لمدة 10-5 ثوان لتجميع المواد المضافة في قاع الانبوبة .
6. يحضن المخلوط لمدة 1-2 ساعة على درجة الحرارة اللازمة والتي تحددها الشركة المنتجة للانزيم .
7. بعد انتهاء فترة الحضن يوقف التفاعل باضافة محلول 0.5مولر EDTA.

كلية الزراعة

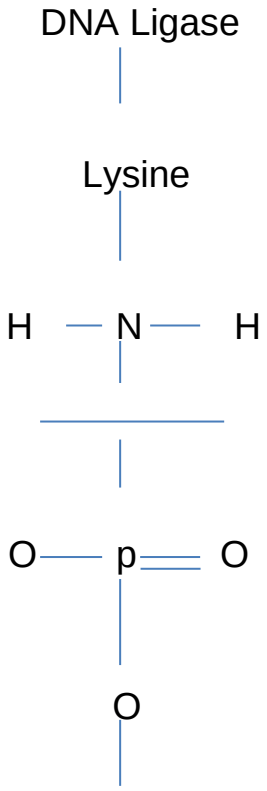
قسم علوم الاغذية **الهندسة الوراثية / العملي**

المختبر الرابع: انزيم ربط الـ DNA(DNA لايجيز)

يعتبر هذا من الانزيمات الخلوية المهمة حيث يستخدم بشكل واسع في الهندسة الوراثية . يحفز انزيم الـ DNA ligase تكوين رابطة فوسفات ثنائية الأستر بين سلسلتي الDNA .

ويحتاج هذا الانزيم الى مجموعة OH حرة عند الطرف 3 لأحد سلسلتي الDNA ومجموعة فوسفات عند الطرف 5 للسلسلة الاخرى , كما يتطلب تكوين رابطة الفوسفات ثنائية الاستر بين هاتين المجموعتين طاقة والتي تستمد اما من الـ NAD^+ في حالة البكتيريا اوATP كما في حالة الخلايا الحيوانية او الفيروسات البكتيرية . ومن الخصائص المهمة لأنزيم DNA ليجيز انه لا يستطيع ربط جزيئين من DNA مفردي الخيط ولكن يجب ان تكون سلسلتي الـ DNA اللتين ترتبطا بواسطة هذا الانزيم جزءاً من DNA حلزون مزدوج . ويتم التفاعل الذي يحفز بواسطة هذا الانزيم في ثلاث خطوات :

1- يتفاعل ATP (او NAD^+) مع الانزيم ليتكون معقد من الانزيم و AMP حيث يكون ارتباط AMP بالأنزيم عن طريق مجموعة الامينو ابسلون للحمض الاميني لايسين في الانزيم خلال رابطة فوسفو اميد phosphoamide (شكل 1)



(شكل 1) ارتباط AMP بالأنزيم

Ribose

Adenine

2- تنقل مجموعة AMP من الانزيم الى مجموعة الفوسفات في الطرف 5 للـ DNA وبذلك يتم تنشيط مجموعة الفوسفات.

3 - الخطوة الاخيرة هي مهاجمة مجموعة OH - 3 لمجموعة الفوسفات المنشطة وتكوين رابطة الفوسفات ثنائية الاستر وانفراد الـAMP .

$$E + ATP(\text{او}NAD \rightarrow E - AMP + PPi\ (NMN)$$

$$E - AMP + p - 5 - DNA \rightarrow E + AMP - p - 5 - DNA$$

$$DNA - 3 - OH + AMP - p - 5 - DNA \rightarrow DNA - 3 - O - p - 5 - DNA + AMP$$

$$DNA - 3 - OH + p - 5 - DNA + ATP + (\text{او}NAD+) \rightleftarrows$$

$$DNA - 3 - O - p - 5 - DNA + AMP(\text{او}NMN) + PPi$$

شكل (2) ميكانيكية التفاعل الذي يحفز بواسطة انزيم DNA Ligase

ويستخدم هذا الانزيم في مجال الهندسة الوراثية للعمل على التئام الكسور الموجودة في سلاسل DNAالناشئة عندما يتم تكوين DNAمهجن عن طريق لحم جزيئات DNAمن مصادر مختلفة معاً بواسطة توليد روابط الفوسفات ثنائية الاستر المطلوبة لانتاج DNA معاود الارتباط (هجين) . وبناءاً على ذلك فانه يجب استخدام تركيزات عالية من جزيئات الDNA الداخلة في التفاعل حتى تتزايد فرصة التقاء كل طرفين يراد ربطهما معاً . ويعبر عادة عن التركيز الفعال من جزيئات DNA في تفاعلات التنسيل بانه تركيز الاطراف concentration of terminlويجب ان نختار ظروف الربط بعناية .

ويعتبر الانزيم الاكثر شيوعاً في مجال الهندسة الوراثية هو DNA Ligaseالمنقى من خلايا بكتيريا القولون E.coliالمصابة بالاقم البكتيري T4 وبالرغم من ان هذا الانزيم يكون اكثر

كفاءة في لحم شظايا الDNA ذات النهاية اللزجة الا انه يستطيع ايضاً لصق جزيئات الـ DNA ذات النهاية المستوية تحت الظروف الملائمة . وانسب درجة حرارة لنشاط هذا الانزيم هي 37 درجة مئوية ولكن يمكن ان يعمل على درجات حرارة اقل (4-15 درجة مئوية) بهدف منع الدنترة الحرارية للمناطق القصيرة ذات القواعد المزدوجة الناشئة عن التئام النهايات اللزجة .

في بعض الحالات قد يفشل تفاعل الربط لعدة اسباب منها :

1- التركيز الغير صحيح لDNA المنسل (insert DNA) وللتغلب على هذه المشكلة يجب التحقق من تركيزالDNA باحدى طرق تقدير التركيز المتاحة تجارياً (Kit) . كما يجب التاكد من ان النسبة المولارية للناقل ال DNA المنسل على الاقل 1:1 حيث ان نسبة ال DNA المنسل الناقل اكبر من 1.5 تؤدي الى تثبيط التفاعل .
2- التركيز العالي جداً من الناقل . يجب خفض تركيز الناقل الى 2 نانوجرام لكل تفاعل .
3- وجود تركيز عالي من الاملاح احادية التكافؤ , على سبيل المثال Nacl او املاح الامونيوم . فتركيز هذه الاملاح يجب الا يزيد عن 50 ملليمولر . الغسل الجيد لراسب ال DNA باستخدام 70% ايثانول يؤدي الى ازالة الاملاح من البلازميد وتحضيرات ال DNA المراد تنسيله . اهمال اجراء هذه الخطوة سيؤدي الى فشل تفاعل الربط.

التجربة العملية

المحاليل المطلوبة

1. DNA كروموسومي مهضوم بانزيم قاطع مناسب .
2. DNA بلازميدي مهضوم بنفس انزيم القطع .
3. محلول 0.1 ادينوسين ثلاثي الفوسفاتATP.

طريقة العمل:

1. يتم حساب المحاليل اعلاه وفقا لخطوات حسابية محددة و تسجل النتائج .
2. في انبوبة ذات سعة محددة تبعا لاحجام المحاليل تضاف المحاليل السابقة مع ماء مقطر وانزيم اللايجيز .
3. يحضن مخلوط التفاعل على درجة 16 مْ لمدة 8 ساعات على الاقل .

المختبر الخامس : تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction

ما هو تفاعل البلمرة المتسلسل ؟

كثيرا ما يقتضي الامر دراسة جزء معين من جزء حامض DNA (المادة الوراثية ولكن صعوبة التعامل مع عدد محدد من جزيئات هذا الحمض تحول دون ذلك , لذا يستلزم الامر مضاعفة هذا الجزء المطلوب دراسته مرات عديدة خارج الجسم حتى يسهل استخدامه بعد ذلك في الدراسة المطلوبة وتسمى عملية المضاعفة هذه باسم (اكثار الدنا DNA amplification) ولأجراء عملية مضاعفة الجزء يلزم فك شريطي الجزئ عن بعضهما البعض , ثم تكوين شريط جديد امام كل شريط قديم باستخدام البلمرة DNA polymeras اذ يرتبط كل شريط جديد مع الشريط القديم وبذلك يصبح لدينا جزئيان من الحمض بدلا من جزئ واحد وبتكرار هذا الاجراء عدة مرات يتكون لدينا بمتوالية هندسية عدد كبير من جزيئات الحامض تشبه كلها الجزئ الاصلي الذي بدانا به.

اكتشاف تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

يرجع الفضل في هذه التقنية التي تسمى تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction " الى العالمين (مولس) Kary Mullis و(فالونا) Fred faloona في كاليفورنيا اذ قاما بنشرها في عام 1985 , وهي تعتمد على استخدام انزيم بلمرة ماخوذة من بكتريا (اشيرشيا كولاى) Escherichia coli واجراء عمليات المضاعفة في انبوبة in vitro amplification .

وفي العام نفسه نشر سبعة باحثين منهم (ساكي) Ronald saik وفالونا Fred faloona ومولس Kary Mullis بحثا عن توظيف هذه الطريقة في تشخيص مرض الانيميا وفي الواقع فان تقنية PCR استخدمت على مدى السنوات الاحقة في تشخيص الامراض الوراثية والامراض الطفيلية

متطلبات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR :

1- بما ان عملية فك شريطى جزيئ الDNA عن بعضهما تستلزم درجة حرارة تصل الى 90 °م , فان انزيم البلمرة المستخدم كان يتعرض للتلف مع كل دورة تضاعف ولا شك ان ذلك كان بشكل عبئا على من يقوم بالعمل .وكان حل هذه المشكلة في العام 1988 عندما قام ثمانية من العلماء بقيادة (ساكي) Ronald saik , وكان من بينهم مولس Kary Mullis باستخدام انزيم البلمرة من بكتريا تعرف باسم aquaticus

thermos تعيش في الينابيع الحارة , فمن المفترض ان انزيم البلمرة في هذه البكتريا على وجه الخصوص يعمل في درجة حرارة عالية وقد اطلق على هذا الانزيم اسم Taq polymeras ومن الواضح ان حروف Taqماخوذة من الاحرف الاولى لاسم الجنس واسم النوع الخاص بهذه البكتريا ومنذ ذلك الحين امكن للدارسين اكثار حامض DNA في الانابيب في المعمل باضافة انزيم Taq polymeras لمرة واحدة دون ان يصاب الانزيم بالتلف رغم تعرضه الى درجة حرارة تصل 90 °م في كل دورة تضاعف وتجدر الاشارة الى ان بعض المعامل تستخدم في السنوات الاخيرة انزيم يسمى pfu polymeras ماخوذة من بكتريا PyroCoccus Furious ويستطيع ان يعمل في درجة حرارة 100 °م دون ان يتلف .

وقد تعاونت شركة Cetus مع شركة Perkin – Elmer في امريكا لانتاج جهاز ذاتي التشغيل يقوم بمضاعفة جزيئات حمض DNA ويطلق على الجهاز اسم Cycler Automated thermal وهو يستخدم الان في نطاق واسع في معامل البحوث وفي هذا الجهاز ترتفع درجة الحرارة اليا لاتمام عملية فك الشريطان ثم تنخفض اليا لإتمام عملية بناء الشريط الجديد مرتبطا مع الشريط القديم ووفقا له , وهكذا فاذا بدانا بمئة جزئ مثلا فان عدد الجزيئات يرتفع الى 200 ثم 400 ثم 800 ثم 1600 ثم 3200 ثم 6400 وقد قدر انه في مدى 20 دورة يتم التضاعف بمقار بليون مرة وتتميز هذه الطريقة بسرعة الانجاز .

2- يلاحظ ان تخليق شريط جديد من حامض الDNA امام شريط قديم في انبوبة يقتضي ان تزود التفاعل بجزء من الشريط الجديد ليرتبط مع جزء مقابل من الشريط القديم وعندئذ فقط يبدا استكمال الشريط الجديد في التكوين عقب الجزء الذي اضفناه نحن ويسمى الجزء من شريط حمض DNA الذي نضيفه لهذا الغرض باسم بادئ (Primer) وعلى هذا فعلينا ان نعرف تتابع القواعد النيتروجينية في المنطقة المجاورة للجزء المطلوب مضاعفته حتى نختار له (البادئ) المناسب , واحدة تكمل تتابعا موجود على احد سلسلتي ال DNA المستهدف في مكان ما على يسار ال DNA المراد اكثاره والاخرى تكمل تتابعا على السلسلة الاخرى الى اليمين .

ومن الجدير بالذكر ان تكوين شريط DNA جديد يتم من الاتجاه (3) الى الاتجاه (5) وهو عكس اتجاه الشريط القديم الذي يتكون وفقا له هذا الشريط الجديد .

3- ومن المفترض اننا نوفر في الانبوبة التي تجرى فيها عملية التضاعف كل من النيوكليوتيدات الاربعة التي ستبنى منها الاشرطة الجديدة وهي :

Thymidine
Cytidine
Adenosine
Guanosine

ويتم ادخال كل من هذه النيوكليوتيدات في بناء الشريط الجديد النامي لحامض DNA ومع استمرار تكرار عملية التضاعف سنجد ان الجزء المطلوب مضاعفته قد تضاعف كثيرا وذلك دون باقي اجزاء حمض الDNA .

استخدامات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR :

- ان مضاعفة المادة الوراثية بهدف دراستها تتعاظم الحاجة اليه في مواقف عديدة منها التشخيص الطبي عن تواجد ميكروبات معينة وهنا يجري اكثار للمادة الوراثية للميكروب وقد تكون المادة الوراثية للميكروب هي حمض RNA وليس حمض DNA كما في حالة فيروس الايدز – وعندئذ يجرى في المعمل بناء شريط حمض DNA امام شريط المادة الوراثية للفيروس – ثم يتم بناء شريط حمض DNA امام شريط DNA الاول ثم تجرى تقنية PCR لجزئ DNA اذ تستخدم هذه التقنية على نطاق واسع في تشخيص مرض الايدز .
- وكما سبق القول فان هذه التقنية 3 . حيث ان سبب هذه الامراض يرجع الى تغيرات في حمض DNA كما في حالة مرض الثالسيميا B_ thalassemia كما تستخدم هذه التقنية في مجال الطب الشرعي حيث انها ضرورية في طرق الكشف عن مرتكبي الجرائم او في تحديد البنوة , حيث انها تسمح بمضاعفة اقل كمية من المادة الوراثية حتى لو كانت مستمدة من خلية واحدة كما تساعد هذه التقنية في الكشف عن وجود الجينات المسرطنة Oncogenes وقد تم تطبيق هذه التقنية ايضا في دراسة حمض DNA الخاص بالميتوكوندريا .

استخدام تقنية PCR في الكشف عن وجود فيروس معين في الدم مثل فيروس مرض الايدز

- تؤخذ قطرات من الدم ويجرى لها طرد مركزي لفصل الخلايا عن البلازما ويتم الاستغناء عن خلايا الدم .
- فلو افترضنا ان الشخص مريض يجرى فصل لحمض RNA من مصل الدم الذي يكون المادة الوراثية لفيروس الايدز ثم يجرى الحصول على حمض DNA من حامض ال RNA باستخدام انزيم النسخ العكسي Reverse transcriptase .
- يتم اكثار حمض RNA باستخدام تقنية PCR ثم يجرى للحمض النووي فصل كهربي جيلاتيني Gel electrophoresis حيث يتم التعرف على شريط المادة الوراثية في لوح الجيلاتين لاحظ ان اكثار المادة الوراثية يستلزم هنا توافر بادئ Primer مناسب للفيروس المراد البحث عنه .

ومن الجدير بالذكر ان الخبير بابو (Paabo) استخدم هذه التقنية في احدى الدراسات مع حمضDNA المأخوذ من امخاخ مومياوات قدماء المصريين Egyptian Mummies . ومن المهم ان ندرك ان مضاعفة المادة الوراثية عن طريق تقنية ال PCR وسيلة لما بعدها فهي ليست هدفا في حد ذاته .

المشاكل التي قد تحدث خلال تفاعل الPCR وكيفية التغلب عليها:

المشكلة الرئيسية في التفاعل هي ان نواتج تفاعل الPCR ضعيفة جدا وقد يكون السبب في ذلك :.

1.استخدام DNA غير نقي : يمكن التغلب على هذا السبب باعادة تنقية الDNA بواسطة فينول / كلوروفورم .

2. ظروف ارتباط البادئ غير مناسبة :فيكون الحل المقترح اما باعادة حساب درجة حرارة للبادئ, او التاكد من تركيز البادئ .

3. ظروف خطوة امتداد البادئ غير مناسبة : وتعالج باستخدام التركيز الامثل من DNA وكذلك تركيز النيوكليوتيدات.

المختبر السادس : ايجاد تتابع الدنا كيمياويا DNA sequencing

لقد اصبح ممكنا في الوقت الحاضر ايجاد تتابع النيوكليوتيدات للدنا بطريقة كيمياوية سهلة . فقد استطاع ماكسم وكلبرت في سنة 1977 الالمام بطريقة كيمياوية تتيح ايجاد تتابع النيوكليوتيدات في الدنا المفرد قصير الطول. اعتمد ماكسم وكلبرت في طريقتهما على معلومات نشرت في الخمسينات تخص تفاعل البيورينات والبرميدينات مع مواد كيمياوية تحورها ويمكن قطع الدنا من اماكن التحوير .

تعتمد طريقة ايجاد تسلسل الدنا كيمياويا على الخطوات التالية :

1. شطر الدنا كبير الحجم مزدوج الشريط الى قطع صغيرة باستعمال انزيم واحد او مزيج من الانزيمات القاطعة .
2. تعزل القطع المفردة باستعمال الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز او الاكرمايد .
3. يتم ازالة مجموعة الفوسفات من النهاية 5 للشريط المفرد بعد فصل الشريطين المتممين عن بعضهما بطرق الترحيل الكهربائي .
4. يتم ارجاع مجموعة الفوسفات (الموسومة بالاشعاع) الى النهاية 5 الحرة والخالية من الفوسفات (وسم الدنا).
5. توزع القطع على اربعة انابيب لتعاني جزيئات كل قطعة تفاعلا كيمياويا يعتمد على تحوير القاعدة المعنية ثم ازاحة القاعدة المحورة يليه قطع شريط الدنا بمكان القاعدة المحددة .يتصف كل تفاعل بانه محدد(كمية المواد الكيمياوية محددة لاجراء التحوير) وغير اختياري ونظرا لوجود الاف الجزيئات الدنوية في الفاعل فان ما يصيب القواعد من تحوير يوفر كل احتمالات القطع في قطعة الدنا .

المختبر السابع

الترحيل الكهربائي Gel Eletrophoresis

يعرف الترحيل الكهربائي بأنه حركه الايونات والجزيئات العملاقه المشحونه charged macromolecules مثل البروتينات والـ DNA والـ RNA خلال وسط معين (agarose or polyacrylamide) عند تسليط تيار كهربائي.

يوجد نوعان من المواد المستخدمه في الترحيل الكهربائي لكل ماده مواصفات خاصه واستخدامات خاصه تميزها عن الماده الاخرى

1- هلام الاكاروز Agarose

ماده سكريه تستخدم بتراكيز من 2% -0.5 فكلما كان حجم قطع الـ DNA المراد فصلها اصغر كلما ازداد تركيز الاكاروز (لماذا),يعتبر الاكاروز اكثر استخداما بسبب رخص ثمنه وسهوله تحضيره وهو ماده غير سامه كما ان نسبه وضوح العينه المفصوله بواسطته تكون اقل وضوحا من النوع الاخرو يستخدم هذا الهلام لفصل جزيئات DNA يتراوح وزنها الجزيئي بين 200pbالى 50000pb

2- **متعدد الاكريلمايد Polyacrylamide**

هو عباره عن بوليمر خليط من الاكريلامايد والـ bis-acrylamide يمتاز بكون ثقوب مادته اصغر من ثقوب الاكاروز لذا فهو يستخدم في فصل جزيئات الـDNA الاصغر من 500pb العينه تكون اكثر وضوحا من الاكاروز ويستخدم ايضا في فصل البروتينات والانزيمات الا ان طريقه تحضيره اكثر تعقيدا من الاكاروز وتعتبر ماده الاكريلاميد ماده سامه للاعصاب

العوامل التي تتحكم بحركه جزيئات الـ DNA في الاكاروز

1- الشحنه charge (ماهي شحنه الDNA وما اتجاه حركتها؟)
2- الحجم و الوزن الجزيئي للجزيئات (اي الجزيئات تتحرك اسرع؟)
3- حجم ثقوب الهلام (كلما كان حجم الثقوب صغيره كلما كان ذلك ملائما لفصل الجزيئات الصغيره)
4- قوه التيار الكهربائي (يستخدم التيار الكهربائي العالي للفصل السريع للجزيئات الصغيره بشكل عام ولكن على ان لا يكون عالي جدا لان هذا يؤدي الى تحطم الجزيئات ,اما التيار الواطئ فهو يستخدم لفصل الجزيئات الكبيره)

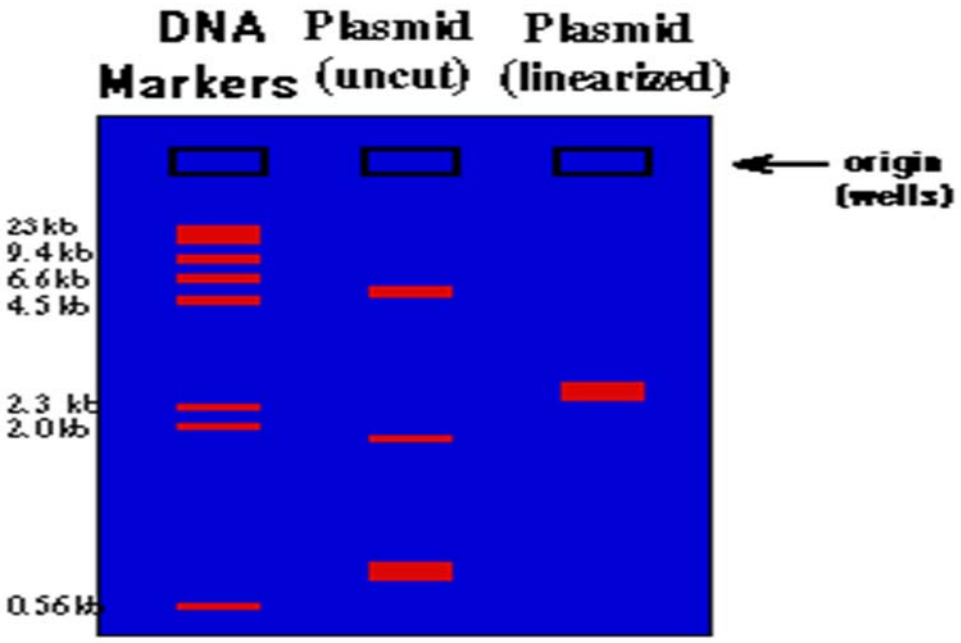
ان لشكل جزيئه الـ DNA اهميه في سرعه حركتها فالجزيئات العاليه الالتفاف covalently closed supercoiled (CCC) تكون اسرع من الجزيئات الخطيه linear (L) والتي تكون اسرع من النوع الحلقي المفتوح Opened circle (OC)

المواد و الاجهزه المستخدمه في الترحيل الكهربائي

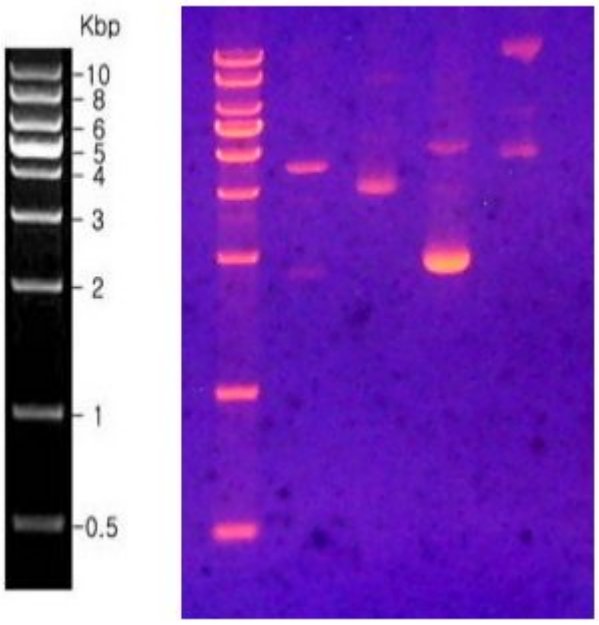
1- جهاز الترحيل الكهربائي المؤلف من
أ- مجهز الطاقه power supply
ب- وحده الترحيل الكهربائي electrophoresis chamber
ت- وعاء صب الهلام gel casting tray مصنوع من بلاستيك شفاف يسمح بنفاذ الاشعه الفوق بنفسجيه ,يجب غلق صرفي الوعاء بالسدادات المطاطيه الخاصه قبل صب الهلام (لماذا)
ث- المشط combهو اداه تستخدم لعمل حفر لوضع عينه الـ DNA في الهلام
ج- UV-transluminator جهاز الاشعه فوق البنفسجيه
2- المواد المستخدمه
A. TBE buffer
B. Loading buffer (ماهي مكوناته ولماذا يستخدم)
C. صبغه الـ ethidium bromide هي عباره عن صبغه متفلوره تتداخل بين ازواج القواعد النايتروجينيه لشريطي الـ DNA وعند تعرض هذه الصبغه للاشعه فوق البنفسجيه فأنها يعطي منطقه مشعه برتقاليه او حمراء اللون . هذه الصبغة مسرطنة واستبدلت بصبغات امينة وغير مسرطنة مثل Simplsafe.
D. هلام الكاروز
E. عينه DNAنقيه

طريقه العمل

1- يتم إذابة 1 غم من الاكاروز في 100 مليلتر من درائ TBE بتركيز (X0.5) ورقم هيدروجيني 8 في الحمام المائي و بعدها يترك الهلام ليبرد لتصل حرارته الى 50 م. ثم يضاف 2 مايكروليتر من محلول بروميد الاثيديوم بتركيز 2 ملغم/مليلتر ويمزج جيدا.
2- يحضر قالب صب الهلام (Tray) وذلك باحاطة حافتي القالب بالقطع المطاطيه الخاصه ويثبت مشط تكوين الحفر (Comb) على بعد واحد سنتمتر من احدى حافتي القالب, ثم يصب الهلام داخل القالب الموضوع في وضع أفقي تماما وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة وفيما بعد رفع المشط القطع المطاطيه برفق ويوضع القالب داخل حوض الترحيل الكهربائي المحتوى على دارئ TBE بحيث يغمر هلام الاكاروز.
3- تجرى عملية تحميل عينات الدنا في حفر الهلام بعد مزج 10 مايكروليتر من محلول الدنا مع 3 مايكروليتر من دارئ التحميل(Loading buffer) .
4- يتم ترحيل العينات كهربائيا تحت فرق جهد قدره 4-3 فولت/سم وبمعدل مرور للتيار 20 ملي أمبير ولمدة 3-1.5 ساعة حسب التجربة.
5- تم فحص الهلام بواسطة جهاز UV- Transilluminator بطول موجي مقداره 256 نانوميتر, ثم يصور بوساطة الكاميرا(Canon) .

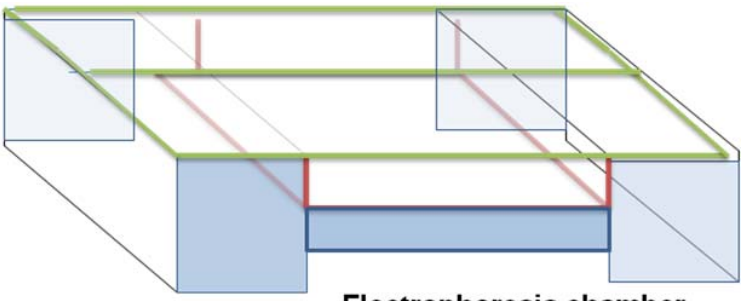


[Figure 1]

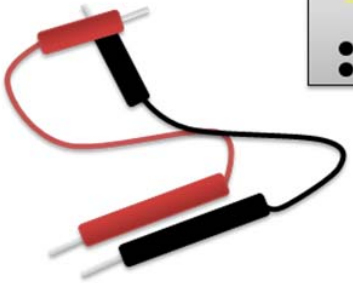


Lane 1 : 1kb DNA ladder
2 : pSB3C5
3 : pSB3T5
4 : pSB1A3-GFP
5 : pSB2K3-RFP

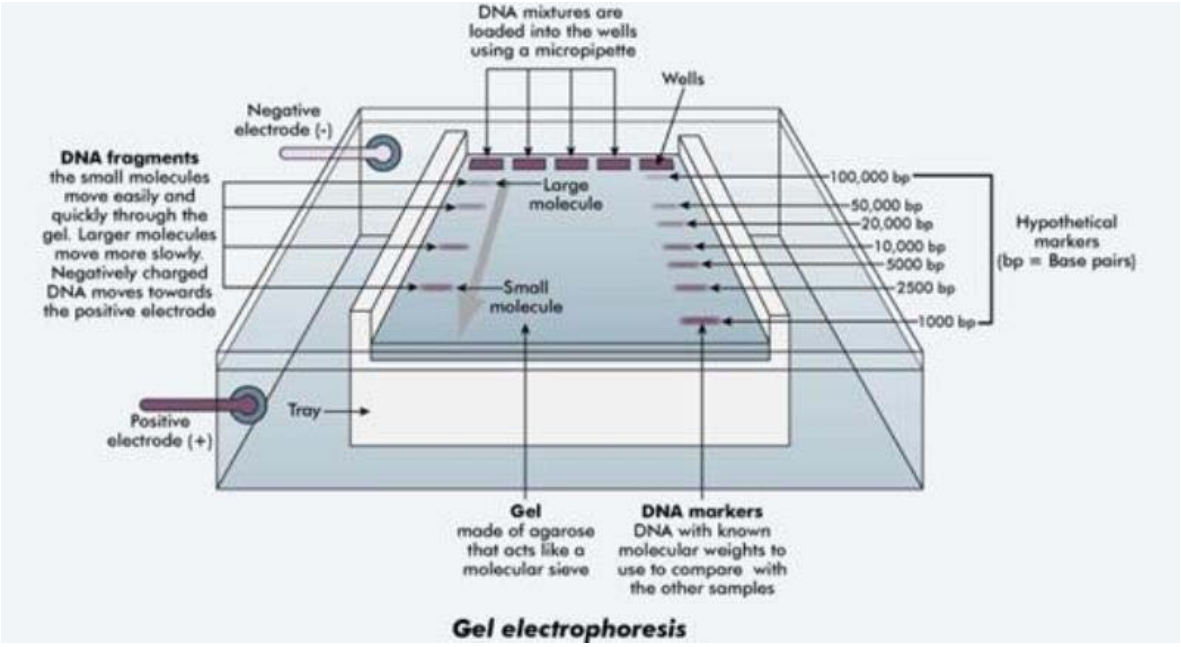
comb



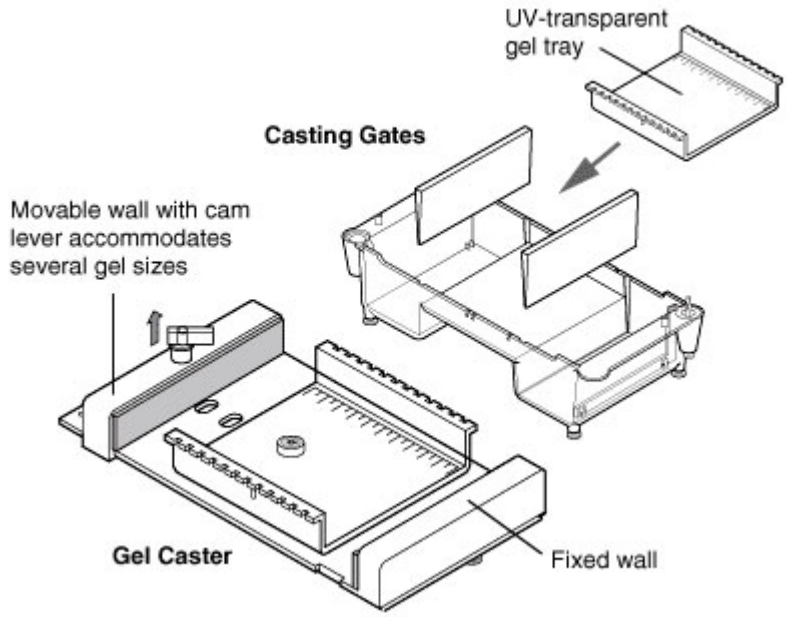
Electrophoresis chamber

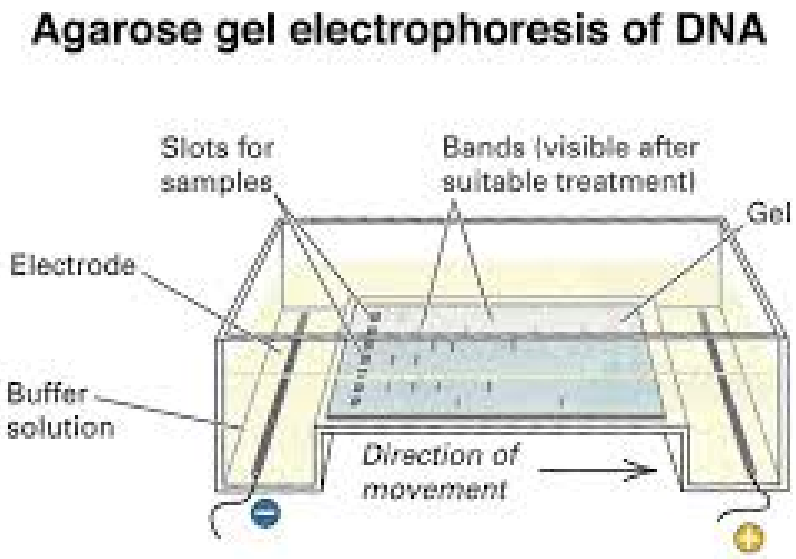


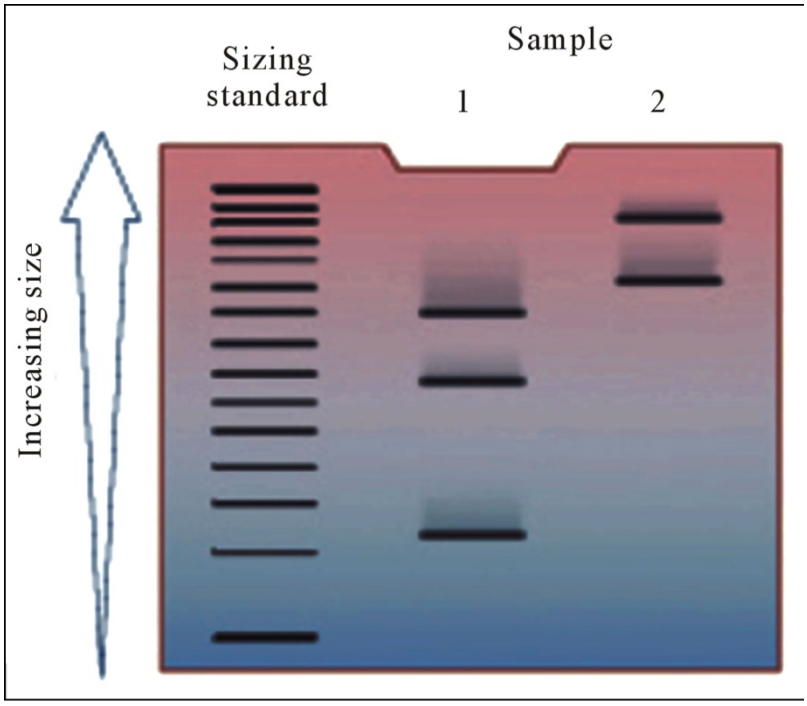
Power supply



Gel electrophoresis


UV-transparent
gel tray
Casting Gates
Movable wall with cam
lever accommodates
several gel sizes
Gel Caster
Fixed wall


Agarose gel electrophoresis of DNA
Slots for
samples
Bands (visible after
suitable treatment)
Gel
Electrode
Buffer
solution
Direction of
movement


Sizing
standard
Sample
1
2
Increasing size

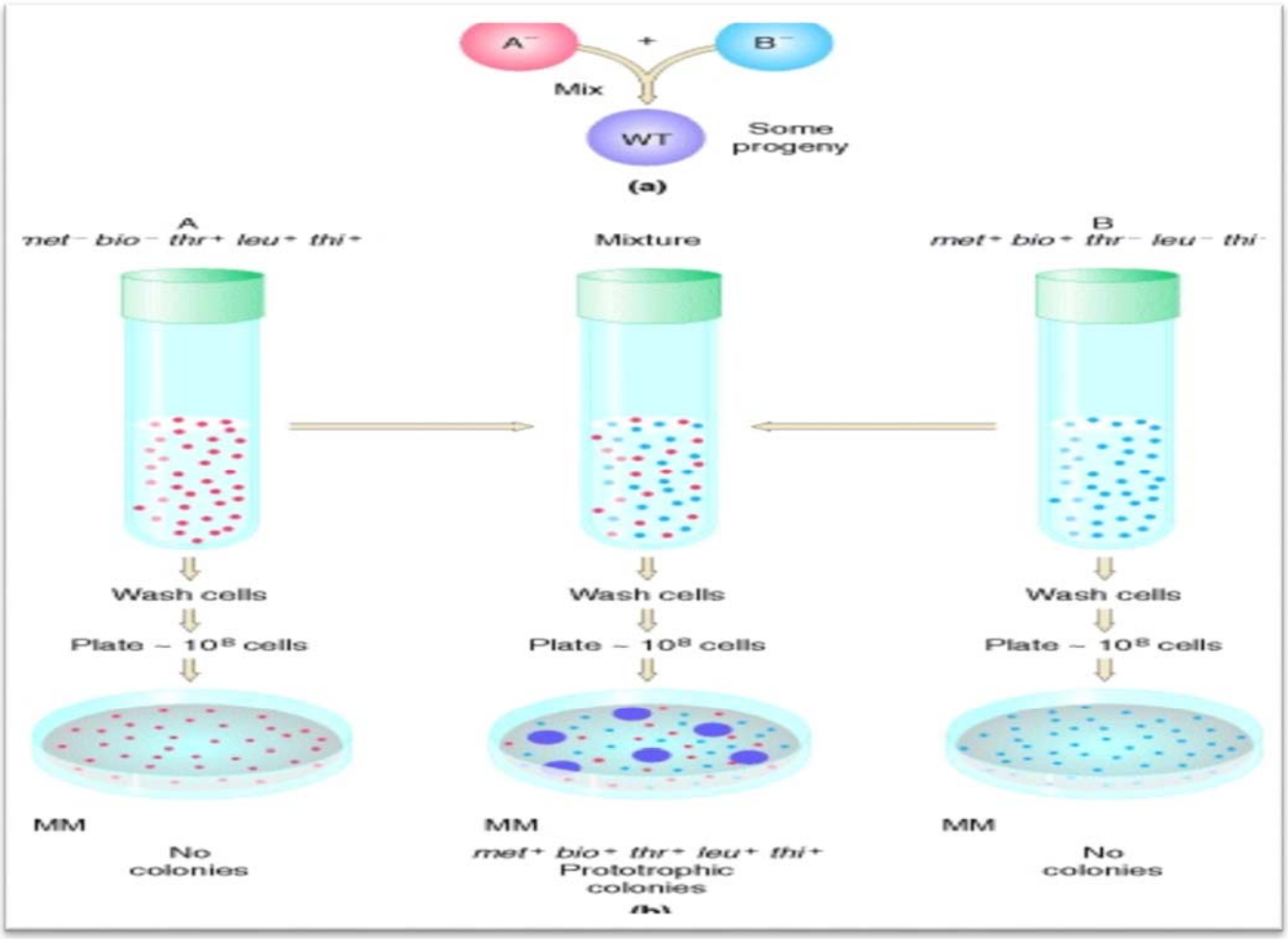
المختبر الثامن

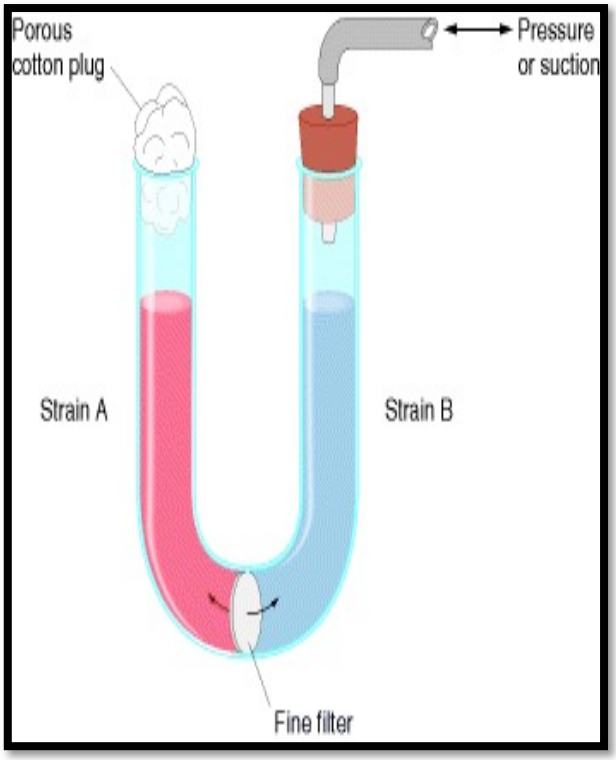
الاقتران البكتيري Bacterial conjugation

في هذا المختبر والمختبرات اللاحقه سنتناول طرق انتقال الجينات بين البكتريا. واول طريقه لانتقال الجينات هي الاقتران البكتيري بين نوعين بكتيريين مختلفي الصفه الوراثيه (ماالمقصود بذلك)

نظره تأريخيه عن الاقتران البكتيري

اكتشف الاقتران البكتيري لاول مره عام 1946 م من قبل العالمان ليدربيرك وتاتم من خلال عملهما على نوعين من بكتريا الـ E. coli مختلفتي المتطلبات الغذائيه, اذ تنمو البكتريا A على وسط غذائي حاوي على المثيونين والبايوتين اما البكتريا B فهو يحتوي وسط التنميه على الثريونين و الليوسين والثايونين ,قام العالمان بخلط النوعيين البكتيريين في وسط غذائي سائل ثم زرعت البكتريا من الوسط السائل على اطباق غير حاويه على اي مكمل غذائي من الاحماض التي تحتاجها الاسلاف وسميت هذه البكتريا بالبكتريا البريه Wild type بينما لم تظهر مستعمرات بكتيريه في الطبقين المزروعين باحد النوعين البكتيريين كما في الشكل ادناه

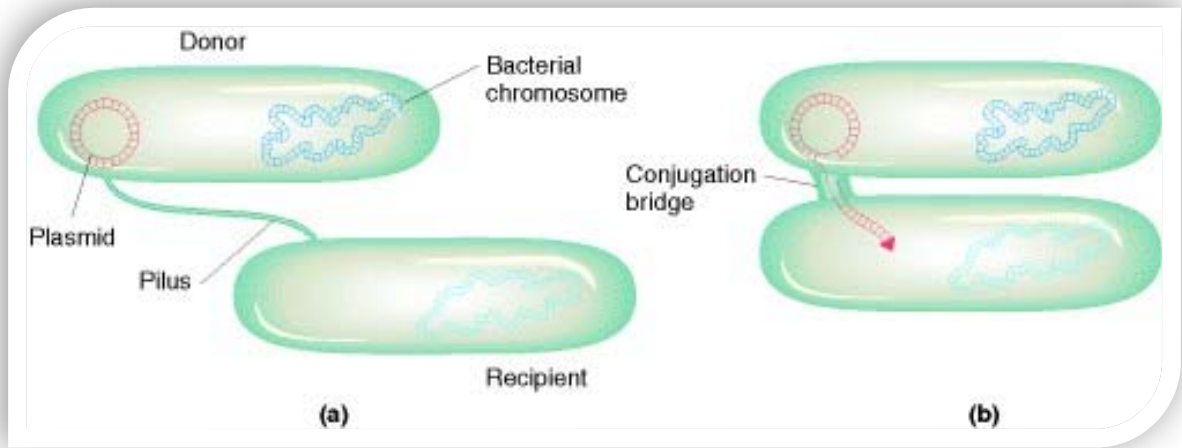




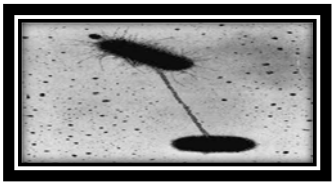
افترض العلماء في ذلك الوقت ان البكتريا التي استطاعت ان تنمو على الوسط غير الحاوي على مكملات غذائيه بسبب امتصاصها لهذه المواد وهو ليس انتقال حقيقي للجينات الا ان العالم دايفس اكد ظاهره انتقال الجينات بين البكتريا من خلال استخدام انبوبه على شكل حرف U يفصل بين الذراعين ورق ترشيح صغير الثقوب لايسمح بمرور البكتريا خلاله لكنه يسمح للمواد الذائبه فب الوسط بالعبور, كما في الشكل المجاور ,ووضع كل نوع بكتيري في احد ذراعي الانبوب وبعد فتره حضانه معينه لاحظ العالم دايفس ان اي نوع من البكتريا لم يستطع النمو لى الوسط الخالي من المكملات الغذائيه لذا افترض العالم دايفس ضروره وجود اتصال فيزيائي بين جنسي البكتريا لغرض حصول انتقال الجينات بينهما.

اكتشاف العامل F (Fertility factor)

في العام 1953 اكتشف العالم ويليم هيس بأن انتقال البكتريا يحصل باتجاه واحد , اكتشف فيما بعد ان الخليه التي تقوم بنقل الجينات تمتلك جين معين يسمى الـ Fertility factor (F factor) وتسمى بالخليه الواهبه بينما تسمى الخليه الاخرى بالخليه المستلمه وبعد انتقال هذه الجينات اليها (الخليه المستلمه) تتحول بدورها الى خليه واهبه. كما في الشكل التالي

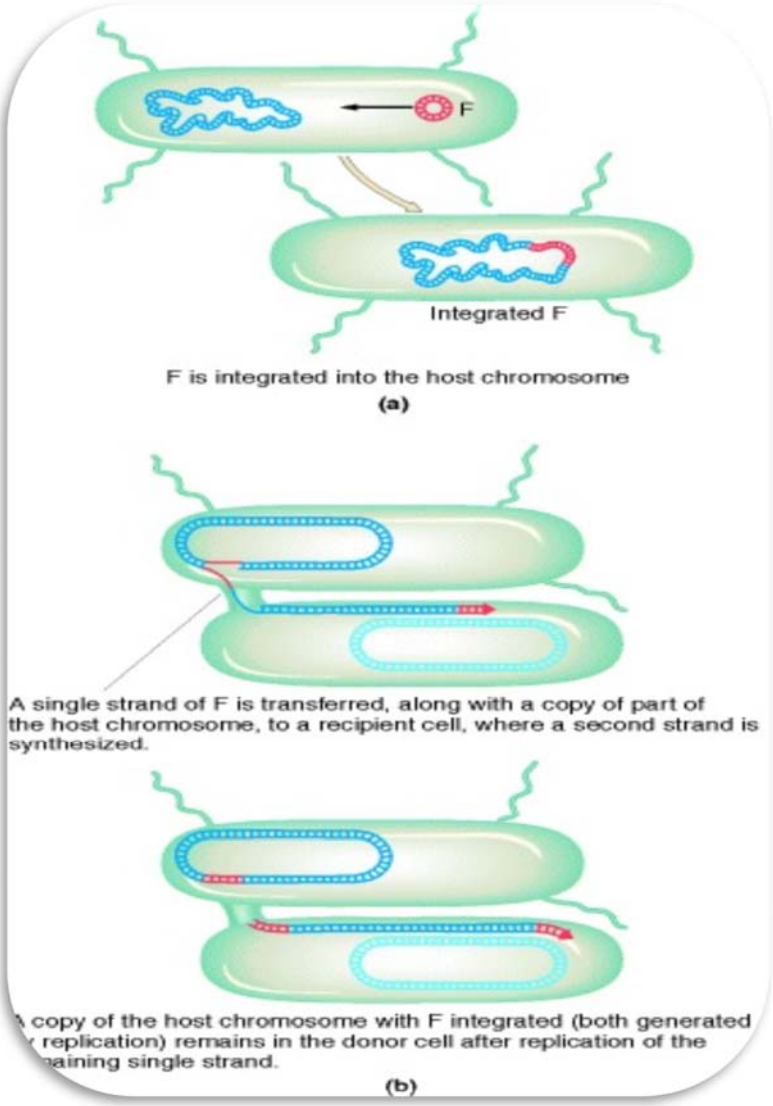


وان الاتصال بين الخليتين البكتيريتين يحدث بواسطه الشعيرات الجنسيه sex pili الموجوده على سطح الخلايا الواهبه والتي تستطيع تكون جسر سايتوبلازمي بين الخليتين الواهبه والمستلمه لغرض انتقال الجينات كما في الشكل المجاور



الخلايا الـ High frequency of recombination (Hfr)

يحدث في بعض الخلايا الحاويه الى الـ F factor ان يتحد الاخير مع كروموسوم الخليه البكتيريه وبالتالي تقوم هذه الخلايا بعمليه نقل جينات اكثر 1000 مره من الخلايا الاعتياديه الان الخلايا الناتجه لاتكون خلايا واهبه ولاخلايا Hfr بسبب الانتقال العشوائي للعامل F(عدم انتقال الجين F بصوره كامله) وفي حاله الـ Hfr يحدث انتقال لجزء من كروموسوم الخليه الواهبه ايضا كما في الشكل المجاور



المواد المستخدمه في التجربه

1- البكتريا القياسيه *E.coli* MM294 (السلاله المستلمه) تكون مقاومه للمضاد الحياتي الريفامبسين وتنمو في وسط حاوي على الثايمين
2- بكتريا الـ*E. coli* (السلاله الواهبه) يجب ان تكون البكتريا حساسه للمضاد الحياتي الريفامبسين (لماذا)
3- وسط الـ Nutrient agar
4- وسط الـ Nutrient broth

طريقه العمل

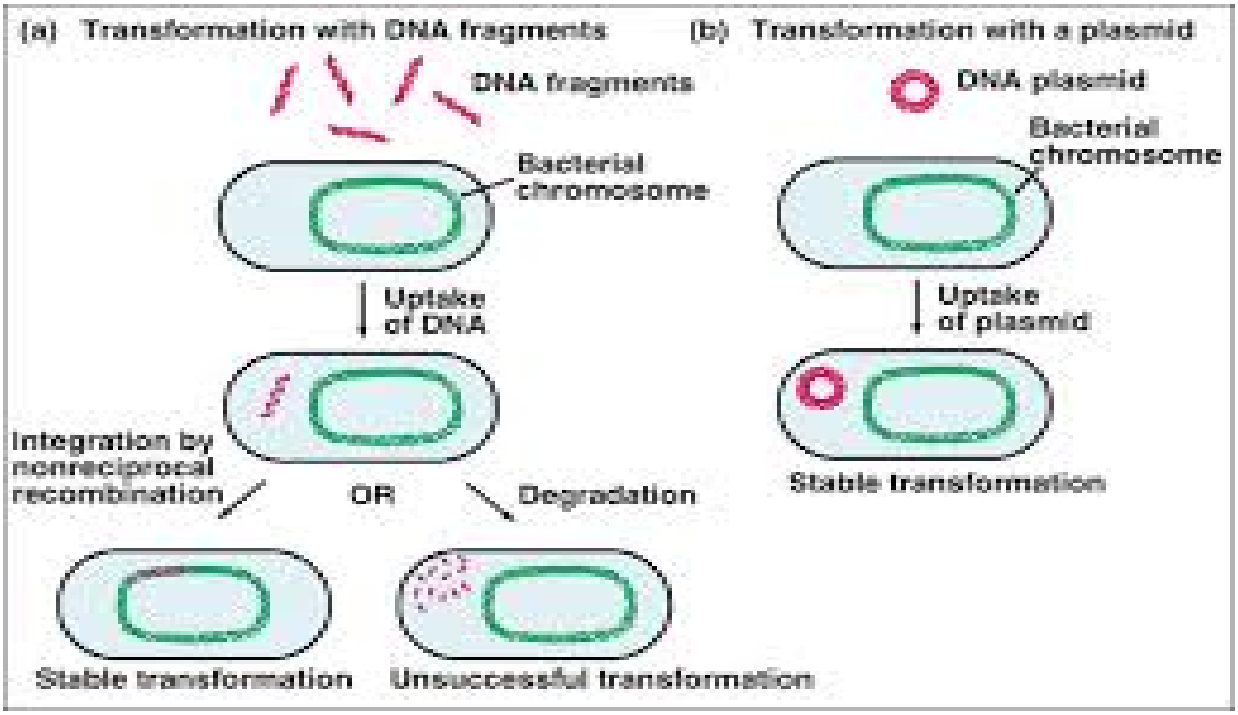
1- تزرع السلاله البكتيريه الواهبه على احد طرفي طبق بتري حاوٍ على الوسط المغذي الصلب المعقم , وتزرع بكتريا الـ *E.coli MM294* القياسية الخالية من البلازميدات كخلايا مستلمه على الطرف الاخر من الطبق ويخُلِط نوعا البكتيريا معا في وسط الطبق لاجراء الاقتران.
2- تحضن الاطباق بدرجه حرتره 37°م لمده 24 ساعه
3- يعلق مزيج الخلايا الواهبة والمستلمة لفصل الخلايا التي حصل فيها الاقتران في محلول التخفيف الفسلجي ثم ينشر 0.1 مليلتر منه في الوسط الانتقائي المحتوي على المضاد الريفامبسين ولا يحتوي على الثايمين لغرض تنمية الخلايا المقترنة فقط وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37°م لمدة 24- 48 ساعة
4- تسجل الملاحظات و يتم حساب تردد الخلايا المقترنه من القانون التالي

تردد الانتقال بالاقتران = عدد البكتريا المقترنه \ العدد الكلي للخلايا المستلمه

المختبر التاسع

التحول البكتيري Bacterial transformation

يقصد بالتحول البكتيري هي العمليه التي يتم بواسطتها ادخال جزيئه DNA غريبه الى خليه بكتيريه ,وان جزيئه الـ DNA يجب ان تكون محموله على ناقل كلونه مناسب Cloning vector (اذكر انواع نواقل الكلونه!!!).



خطوات عمليه التحول يمكن تلخيصها بما يلي

تثبيت DNA على سطح الخلية البكتيرية

التعبير عنه داخلها

اما الظروف التي قد تؤثر على عمليه التحول فتشمل

الأجناس البكتيريه

الأس الهيدروجيني

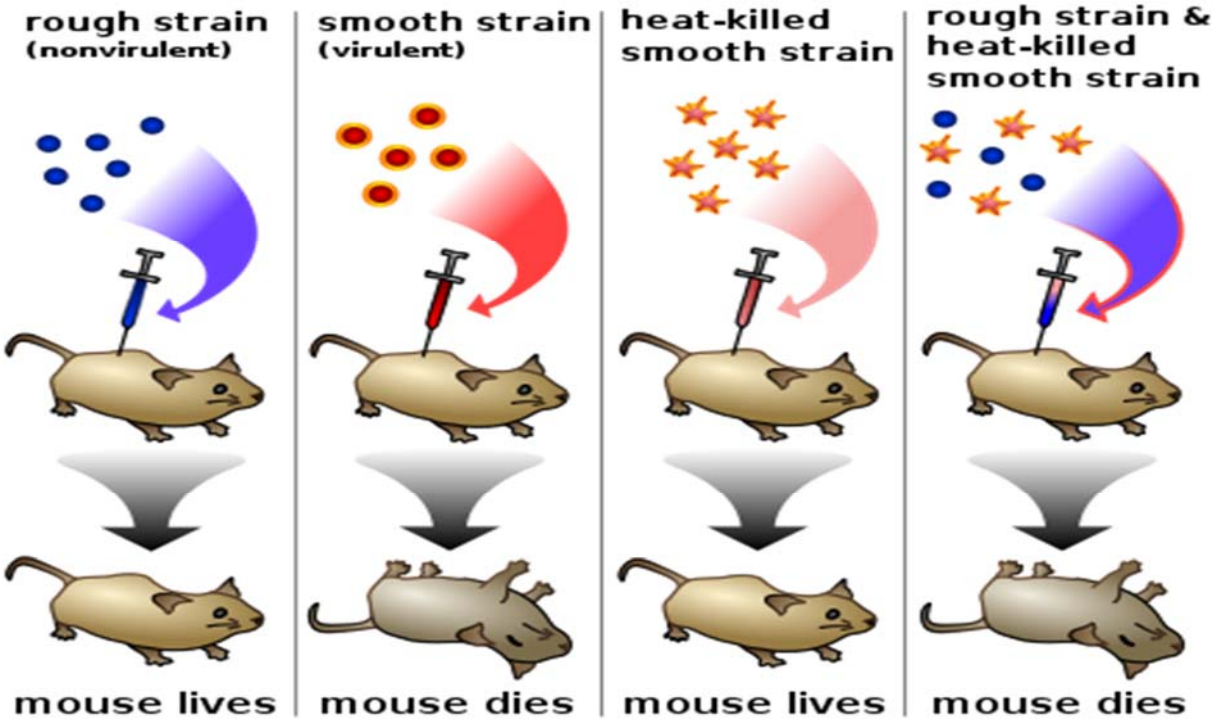
درجة حرارة الحضن

تركيز الـ DNA

التراكيز الأيونية، وتقدر المدة المتوسطة لها بحوالي 15 دقيقة ويمكن أن تستمر لأسبوع عند بكتيريا محفوظة في 40 م0 في الغليسيرول

ان اول من اكتشف التحول البكتيري كان العالم Griffith اذ قام باستخدام نوعين من بكتريا Streptococcus pneumone هما II-R لاتمتلك متعدد السكريد وهي غير ممرضه وIII-S التي تحيط نفسها بكبسوله من متعدد السكريد الذي يعطيها الملمس الناعم و يحميها من الجهاز المناعي للمضيف لذا فهي نوع قاتل.قام هذا العالم بقتل البكتريا الخشنه بالحراره واضاف بقاياها الي البكتريا الناعمه الحيه لاحظ ان الاخيره لم يتغير سلوكها الامراضي بينما اذا فعل

العكس اي قتل البكتريا الناعمه بالحراره واضاف بقاياها الى البكتريا الخشنه الحيه ثم حقنها في الفئران لاحظ ان الفئران تصاب بالمرض ومنها استنتج كرفث ان البكتريا الخشنه قد تحولت الى خلايا ناعمه من خلال عمليه تحولها(البكتريا الحيه الخشنه استقبلت جزيئه الـ DNA من بكتريا الناعمه المقتوله, وتحولت الى خلايا ناعمه) كما في الشكل التالي



ان عمليه التحول عمليه مهمه جدا بسبب القدره على ادخال العديد من الجينات حتى البشريه الى داخل خلايا بكتيريه وبالتالي الحصول على نواتج امنه (اذكر امثله على مواد تفيد البشر و تم نقل جيناتها الي البكتريا)

ان غالبيه البكتريا في لطبيعه ليس لها القدره على التحول بدون تدخل ومن امثله هذه البكتريا S.pneumoniae، S.sanguis، Bacillus subtilis، B.cereus , Neisseria gonorrhae , لذا سعى العلماء في السنوات الماضيه الى الحصول على خلايا لها القابله على التحول دون اجراء تغيرات كثيره على قطعه الـ DNA المراد نقلها والخلايا الناتجه سميت بالخلايا المهيئه competent cell وتتم عمليه تهيئه الخلايا بطريقتين هما

Electroporation تعريض الخلايا الى تيار كهربائي لغرض خلخله الجدار الخلوي مما يساعد على جعله اكثر نفاذيه لمرور جزيئه الـ DNA الغريبه خلاله

النقع في كلوريد الكالسيوم البارد ثم تعريض الخلايا الى صدمه حراريه كما سيجرى في المختبر.

طريقه العمل

يتم وضع 250µl من محلول كلوريد الكالسيوم في انابيب ابندروف معقمه .

توضع الانابيب في حمام ثلج لمده 2 min. .

توضع كميه من البكتريا (E.coli) بواسطه الـLoop الى الانابيب الاربعه المستخدمه في التجربه.

تضاف كميه من الـDNA البلازميدي الى اثنين من الانابيب السابقه وتترك الانبوبتين الاخريين بدون الـ DNA

توضع الانابيب الاربعه في حمام ثلجي لمده .10 min.

يتم تعريض الانابيب الاربعه لصدمه حراريه ,تنقل الانابيب الي حمام مائي بدرجه حراره 42c لمده 50 secثم تعاد مباشره الاى الحمام الثلجي.(مالفائده من هذه الخطوه؟)

يضاف لكل انبوبه 250µl من وسط الـ nutrient broth وتترك الانابيب بدرجه حراره الغرفه لمده .10 min .

انقل 100µl من الانابيب الاربعه الى اطباق بتري حاويه على وسط انتقائي حاوي على مضادي التتراسايكلين والامبسلين ,تحضن الاطباق لمده 4 -48 ساعه بدرجه 37c ثم تسجل النتائج.

المختبر العاشر

التحول البكتيري بالعاثي Transduction

تمتلك بعض العاثيات البكتيريه القدره على نقل جينات البكتريا من خليه الى اخرى .اول من اكتشف التحول البكتيري كان العالمان زندر وليدربيرك في العام 1951 م اثناء عملهما على بكتريا الـSalmonella typhimurum في محاوله لاجراء الاقتران البكتيري على غرار ماحدث مع بكتريا الـ E .coli الا ان العالمان عندما اجريا تجربه الفصل بين النوعين البكتيريين باستخدام الانبوبه U- shape حصلا على طراز بري للبكتريا وعند اجراء تجارب اضافيه اكتشفا ان العاثي البكتيري P22 هو المسؤول عن نقل الجينات بين النوعين البكتيريين وبالتالي الحصول على النوع البري .

ان عمليه نقل الجينات تحصل اثناء خطوه تعبئه الماده الوراثيه في رؤوس العاثي اذ قد يحصل احيانا ان تعبئ قطعه من الماده الوراثيه للبكتريا في رأس العاثي وتنتقل الى الخلايا الاخري عند اصابه العاثي للخلايا السليمه كما في الشكل التالي (ما المقصود بالـ transducing phage ؟؟؟)

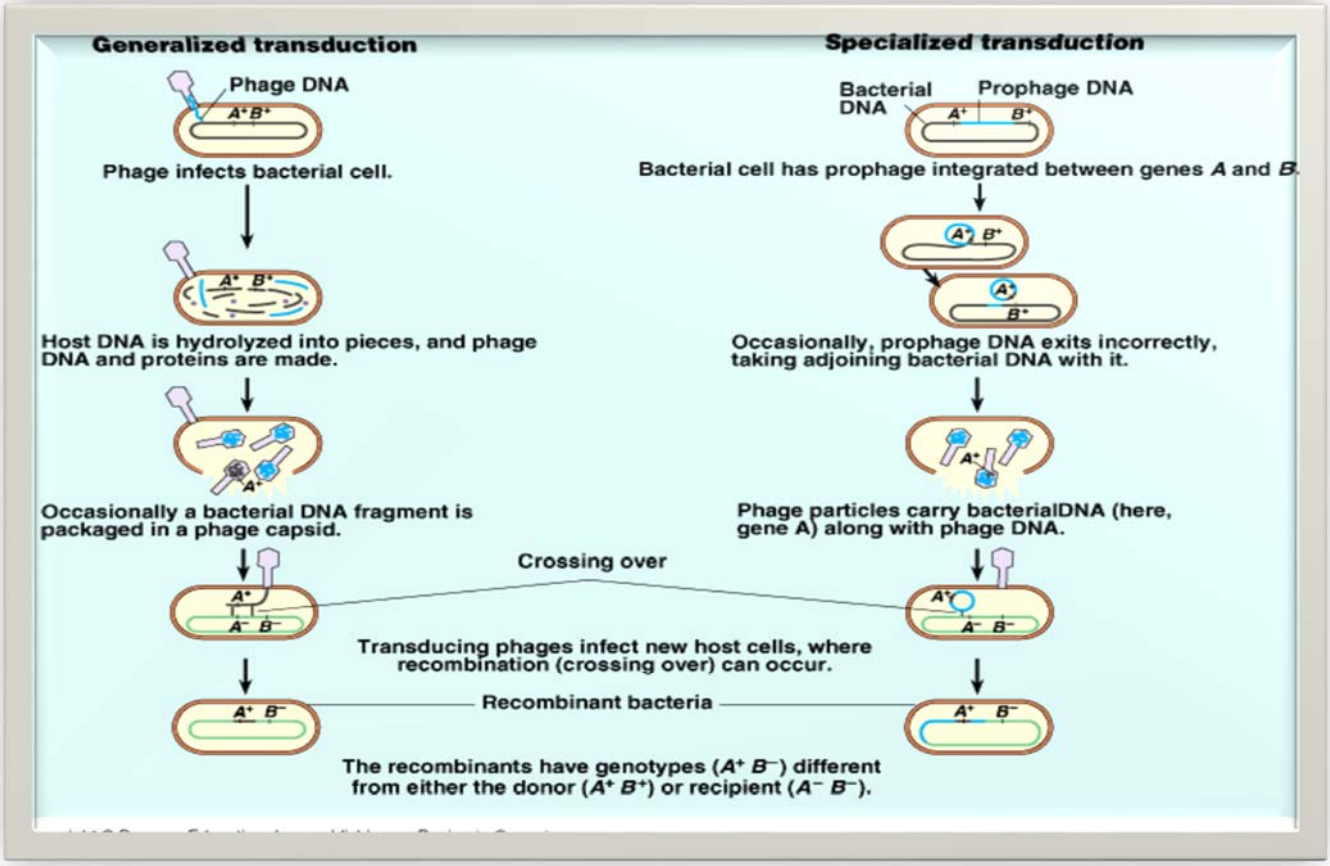
هناك نوعان من التحول بالعاثي هما

التحول العام Generalized transduction :

و يقصد به ان العاثي البكتيري قد يحمل اي قطعه جينيه من الماده الوراثيه للخليه المضيفه ومن الامثله على هذا النوع من العاثيات البكتيريه P22 & P1عاثيات تصيب السالمونيلا) . ان العاثي p22 له القدره على الاتحاد مع كروموسوم خليه المضيف اما العاثي P1 فيبقى حرا في السايتوبلازم. (ما المقصود باجمله الاخيره وكيف تحصل عمليه تضاعف الماده الوراثيه للعاثيان السابقا الذكر ؟)

التحول المتخصص Specialized transduction

ويعرف على انه قدره العاثي البكتيري على حمل قطعه معينه من الماده الوراثيه لخليه المضيف ومن اهم العاثيات على هذا النوع من العاثيات هو العاثي لمدا λ- phage ان عمليه الارتباط بين الماده الوراثيه للعاثي لمدا والكرموسوم البكتيري تحدث بأستخدام نظام انزيمي خاص وان اهميه هذا النظام تكمن في ضمان الارتباط الصحيح بين الماده الوراثيه للعاثي مع كروموسوم البكتريا في موقع محدد .



الجينات القافزه Transposons

الجينات القافزه هي عباره عن سلسله من الـ DNA لها القدره على تغيير موقعها ضمن الجينوم وهي خالبا تسلسل غير مشفر من الـ DNA .تسبب الجينات القافزه طفرات وراثيه . قد تكون سببا لزياده او تقليل حجم الطفرات , تساعد في اعاده ترتيب الجينوم و تساعد في تنظم التعبير الجيني

ان عالمة النباتات الامريكية Barbara McClintock كانت اول من قام بوصف ظاهرة الجينات القافزه وحصلت بفضل ذلك على جائزة نوبل عام 1983 .ان سبب اهتمامها نبع من ملاحظة ان نوع من عرانيس الذرة غالبا تملك حبوبها الوان متعددة على شكل الموزائيك .لقد ظهر ان الخلايا ، في الاصل، تحتوي على جين الملون الاحمر وبالتالي فالحبوب تكون في الاصل حمراء .ولكن احيانا يقوم الجين القافز بالقفز من مكانه والغاء التلوين لتصبح الحبة صفراء . وكل مرة تقوم الخلية فيه بالانشطار يجري توريث المكان الجديد للجين القافز الى الخلية الابنة بحيث يُحافظ على اللون الاصفر والاحمر في الاجيال اللاحقة الى ان يقوم الجين بالقفز مجددا ليتبدل اللون من جديد .بهذا الشكل يظهر في خلال فترة نمو وتشكل عرنوس الذرة تعدد موزائيكي في الوان حبات عرنوس واحد. وقد اكتشف ان حوالي 90% من جينوم الذره مكون من الجينات القافزه بينما جينوم الانسان يكون حاوي على حوالي 50% من هذه الجينات.

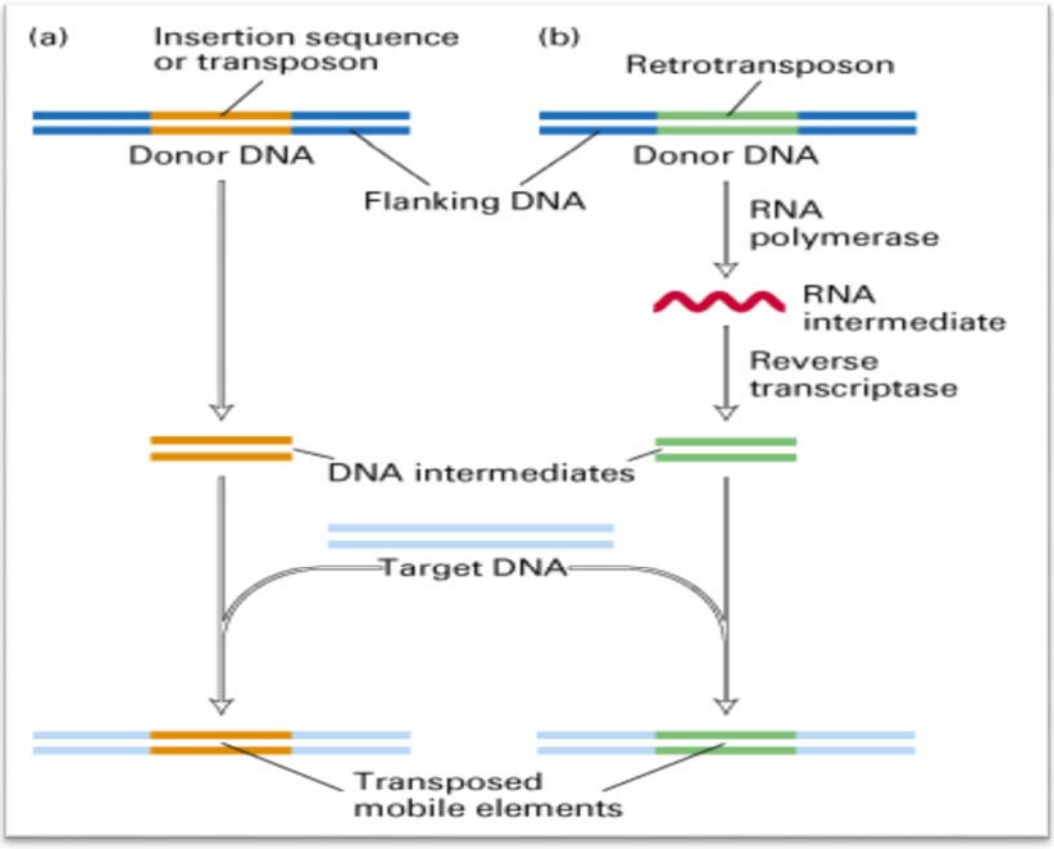
يوجد نوعان من الجينات القافزه اعتمادا على طريقه نقلها للجينات هما

النوع الاول Retrotransposons (استنساخ ولصق)

في هذا النوع يتم استنساخ الـ RNA من قطعه الـ DNA المراد نقلها ثم يعاد تكوين الـ DNA من الـ RNA وقطعه الـ DNA الناتجه يعاد ربطها في موقع اخر من الجينوم , لاجل اتمم هذه العمليه يجب وجود انزيم reverse transcriptase وهذه العمليه مشابهه لما تقوم به مجموعه الـ retroviruses مثل (HIV)

النوع الثاني DNA transposon (قص ولصق)

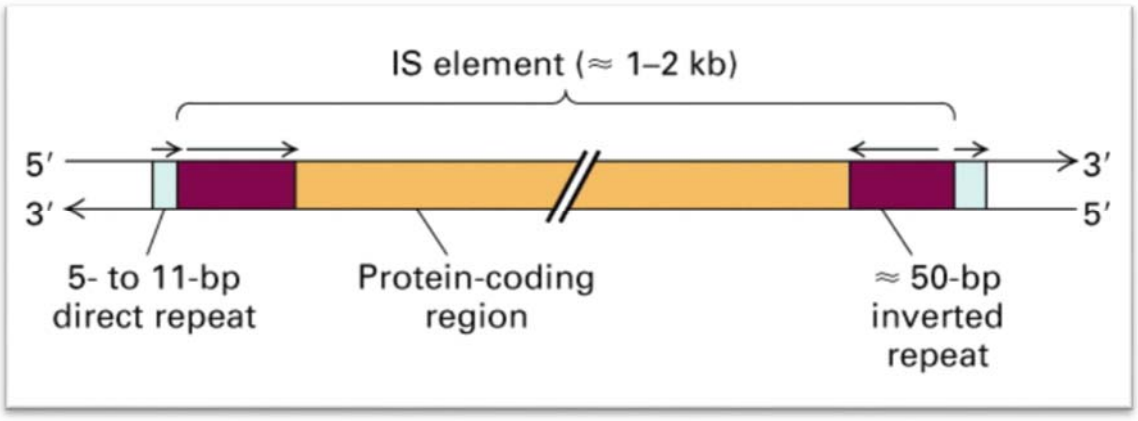
هذه الميكانيكيه لاتتضمن استنساخ الـ RNA و ان عمليه القفز تتم بعده انزيمات (transeposase enzyme) ,عمليه الانتقال تحدث من خلال قص قطعه الـ DNA المراد نقلها و بالتالي تتكون قطعه حامض نووي رايبوزي 5' or 3' معلقه (ذات نهايات دبقه ؟) القطقه التي تم قصها ستلحم في مكان اخر من الجينوم بواسطه انزيمات الـ ligase و يعوض مكانها بشريط جديد من خلال فعاليه الـ DNA polymerase



انواع الجينات القافزه البكتيريه

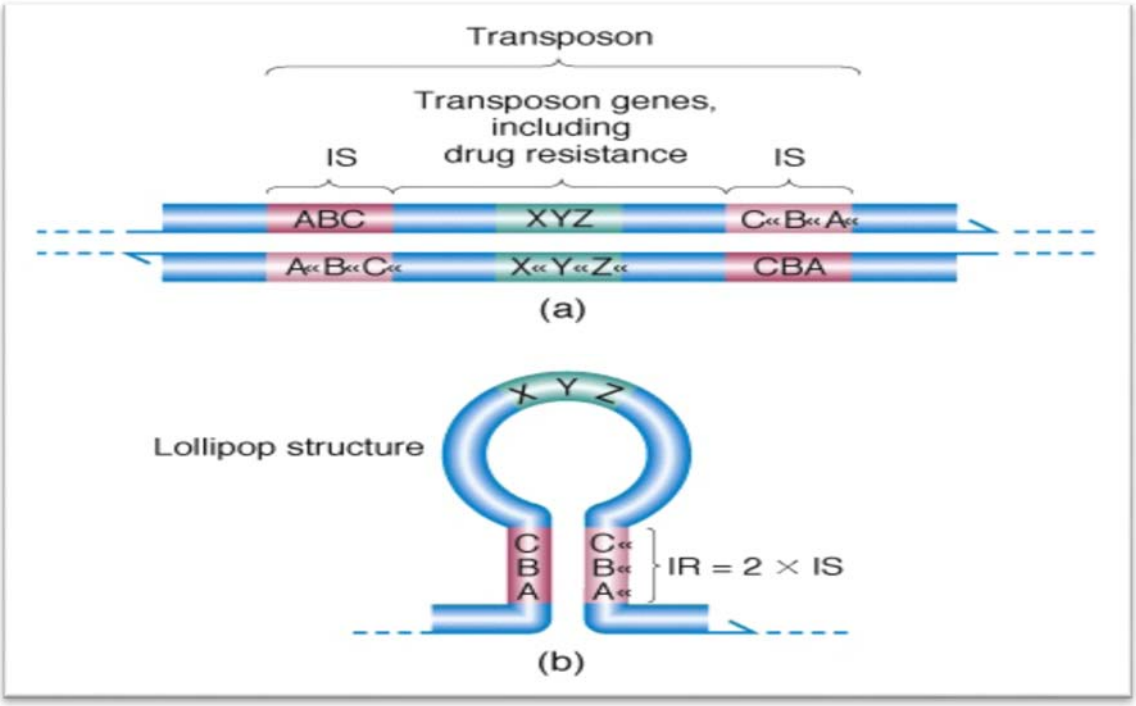
القطع الانحشاريه Insertion Sequence (IS)

وهي عباره عن تسلسلات قصيره من الحامض النووي منقوص الاوكسجين بحدود 50kb و من الامثله عليها IS1 &IS186 الموجوده في بكتريا الـ E. coli . الصوره ادناه تمثل شكل القطع الانحشاريه وهي مكونه من المنطقه الوسطيه تحتوي على واحد او اثنين من الجينات المشفره للانزيمات و قطعتين من التسلسلات القصيره التي تساعد على الدخول و الافلات من الجينوم .



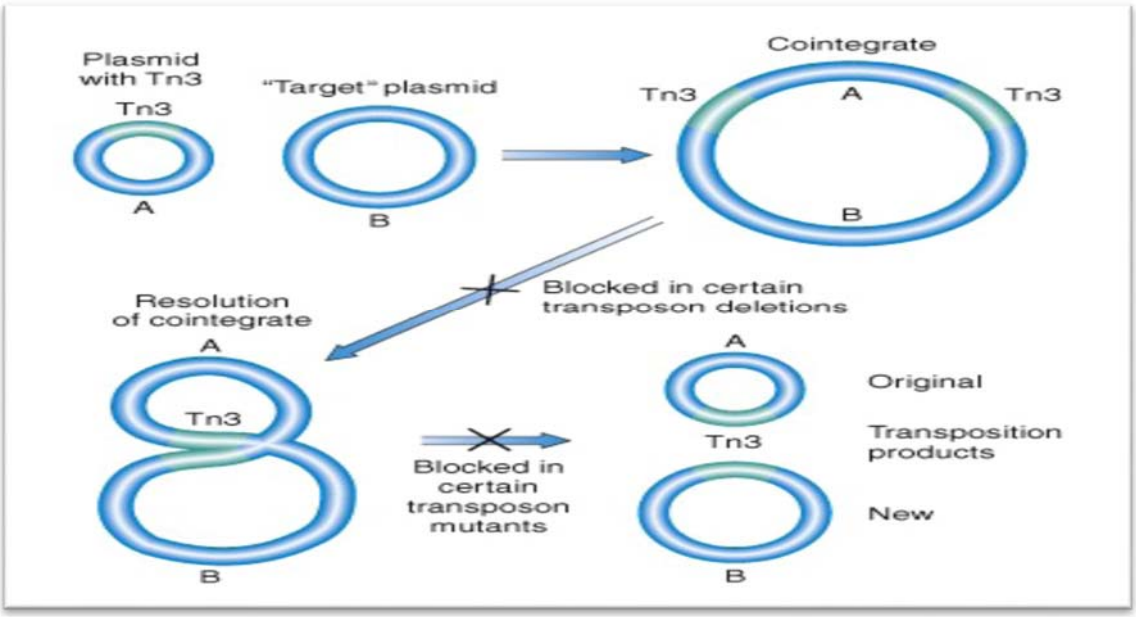
الجينات القافزه المركبه Composite transposon

هي عباره عن قطعتين انحشاريتين يحصرا بينهما واحد او اكثر من جينات المقاومه للمضادات الحياتيه مثل الـ Tn5 ,Tn9 & Tn10



عائله الجينات القافزه Tn3

وهي عباره عن تسلسلا حامض نووي رايبوزي منقوص الاوكسجين حجمها (5000bp) وهي تشفر لانزيمات الـ transposase , β- lactamase & resolvase(يعمل على السيطره على انتاج انزيم الـ , transposase) وتحتوي هذه العائله على التسلسلات النهائيه المعكوسه ITR مثل الـ Tn3



الفاجات القافزه transposable phage

هي عباره عن فايروسات بكتيريه يكون جزء من دوره الاصابه infectious cycle القدره على الانتقال ضمن الجينوم مثل الـ Mu phage وهذه الفايروسات مكونه من مناطق خاصه بالدخول الى خليه المضيف وتضاعف جيناتها فيه و الجينات المسؤوله عن تحلل خليه المضيف بعد انتهاء دوره الاصابه و الجينات المسؤوله عن الغلاف البروتيني للفايروس وهذه الجينات تكون محاطه بالـ ITR

المختبر الثاني عشر

نواقل الكلونه cloning vector

نواقل الكلونه هي قطع صغيره من الـ DNA لها القدره على البقاء ثابته عند ربطها مع قطعه DNA غريبه ,كما تبقى ثابته عند ادخالها الى خلايا المضيف (لاتتعرف عليها انزيمات الـ endonuclease) وهي تمثل قطع من بلازميد ,فايروس , او جزء من كروموسومات الكائنات متعدده الخلايا (خميره,حيوان وانسان)

مواصفات نواقل الكلونه:

1-مواقع ربط وازاله قطع الـ DNA الغريبه cloning site وهذا الموقع يحوي على واحد او اكثر من مواقع قطع الانزيمات القاطعه restriction site

2-يحتوي ناقل الكلونه على صفات انتقائيه selectable marker هي عباره عن صفات يمكن ملاحظتها في خلايا المضيف مثل صفات المقومه للمضادات الحياتيه وبعض الصفات الشكليه وهي ضروريه لغرض تأكيد اخذ المضيف للناقل

3-بعض نواقل الكلونه تحتوي على جينات اضافيه تساعدها في البقاء و التعبير في الكائن الحي مثلا النواقل المستخدمه مع الـ E.coli تحتوي على منطقه تضاعف فعاله (ori)

4-تستخدم بعض نواقل الكلونه انزم الـ Topoisomeraseبدلا من الـ Ligase مما يمكنها من العمل بسرعه بدون الحاجه الى عمليه قطع الناقل وهذه العمليه تسمى Topocloning methods ففي هذه العمليه يمكن تفعيل الانزيم لربط ناقل خطي مباشره مع DNA المضيف او ربط الناقل مع احد منتجات الـ PCR ثم تحرير الانزيم (Topoisomerase) لاعاده تكوين الناقل الحلقي

ملاحظه ماهي اليه عمل انزيم الـ Topoisomerase ؟؟

Shuttle vector نواقل كلونه لها القدره على التضاعف في كائنين (بكتريا وخميره او خميره وخلايا حيوانيه) وتمتاز هذه النواقل باحتوائها على مناطق تضاعف و صفات انتقائيه مناسبه لكلا الكائنين , الفائده منها انها تساعد على اختبار التعبير عن صفه معينه محمله عى ناقل واحد في اكثر من كائن

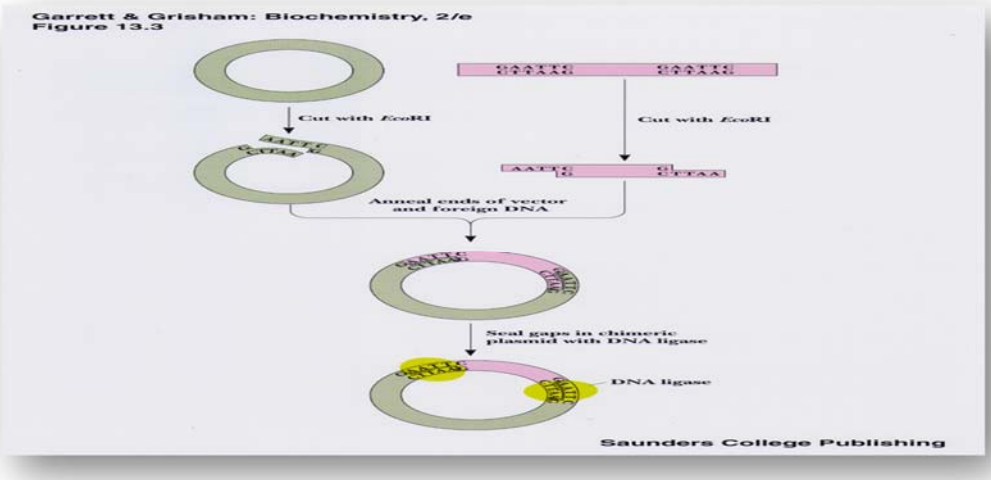
الخطوات الاساسيه للكلونه:

1-تهيئه ناقل الكلونه المناسب وقطعه الـDNA من خلال معاملتها بنفس انزيم التقطيع restriction enzyme وذلك لتكوين نهايات متكامله

2-لحم قطعه الـDNA الغريبه بالناقل باستخدام انزيم الـ ligase

3-نقل الـ DNA الى خلايا المضيف بواسطه عمليه الـ transformation

4-اختيار الخلايا التي تحتوي على قطع الـ DNA الغريبه من خلال التحري عن ظهور الصفات الانتقائيه الشكل التالي يوضح عمليه الكلونه

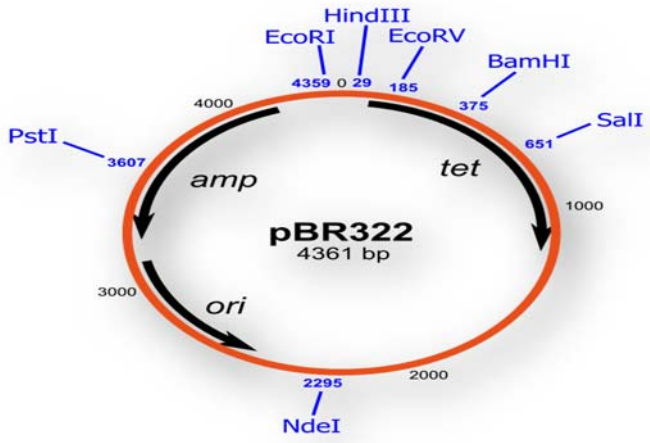


انواع نواقل الكلونه

اولا:- البلازميدات Plasmid

عباره عن قطع DNA حلقيه خارج الكروموسومات ذاتيه التضاعف , تعتبر نواقل كلونه قياسيه وواسعه الاستخدام يمكن اضافه قطع DNA بحجم (0-10Kb) توجد البلازميدات في الخلايا بعدد كبير وهذه الصفه مهمه في الحصول على عدد كبير من نسخ الجين المراد نقله الا ان بعض البلازميدات توجد بنسخ قليله وهو مفيد في بعض الحالات (متى؟؟؟)

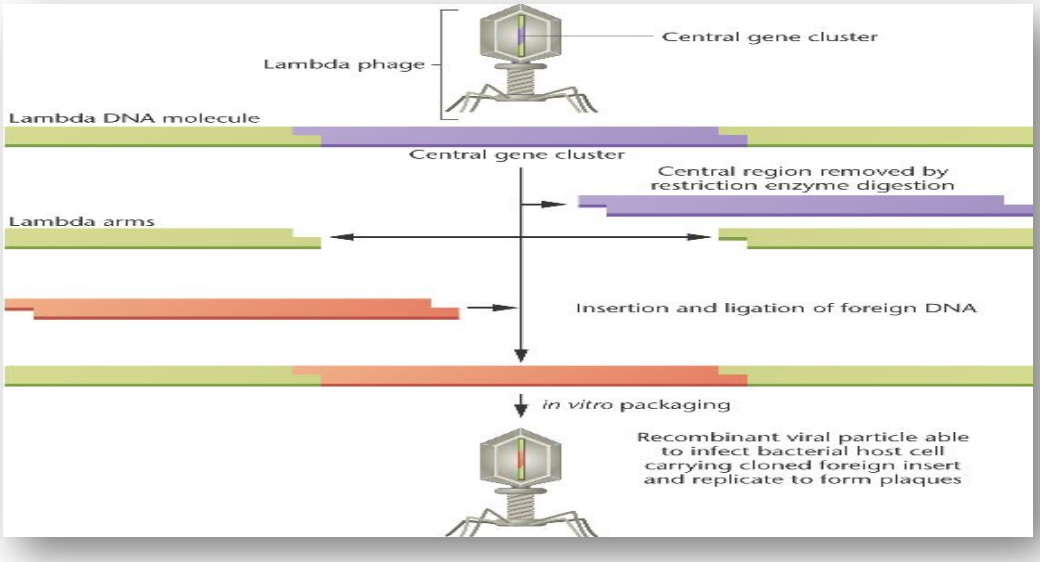
من اكثر الامثله شيوعا عن نواقل الكلونه البلازميديه هو بلازميد الـ PBR322 وهو يمتاز بكونه الاكثر شيوا للاستخدام مع بكتريا E. coli ويحتوي على الـ replicon (rep)مسؤول عن عمليه تضاعف البلازميد,ampR gene جين المقاومه للامبسلين,tetR gene جين مقاومه التتراسايكلين وهو يحتوي على عدد كبير من واقع القطع الانزيمي restriction sitesوان الشكل التالي يوضح البلازميد PBR322



ملاحظه عرف الـ non- replicative plasmid & replicative plasmid وايهما يفضل اكثر كناقل كلونه؟؟؟

ثانيا :- العاثيات البكتيريه Bacteriophage

ان العاثي لمدا والعاثي M13 من اكثر العاثيات البكتيريه استخداما كنواقل للكلونه اذ يجري تحويرها بازاله الجينات الغير اساسيه مثل اواله الجينات المسؤوله عن دوره الـ lysogeny cycle اة الجينات المسؤوله عن lytic cycle لاضافه قطع الـ DNA المراد نقلها وهذه النواقل يمكنها حمل قطع DNAبحجم يتراوح (0-24Kb) الشكل التالي يوضح طريقه حشر قطع الـDNA ضمن جينوم العاثي لمدا

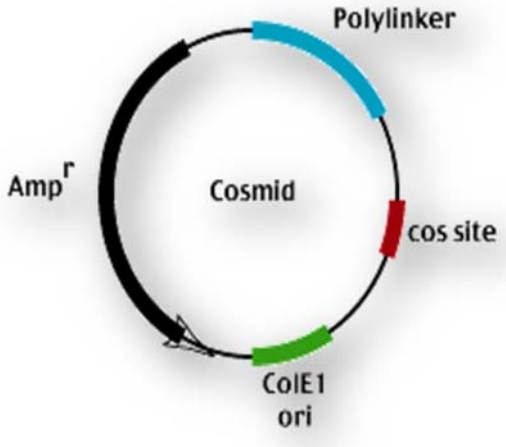


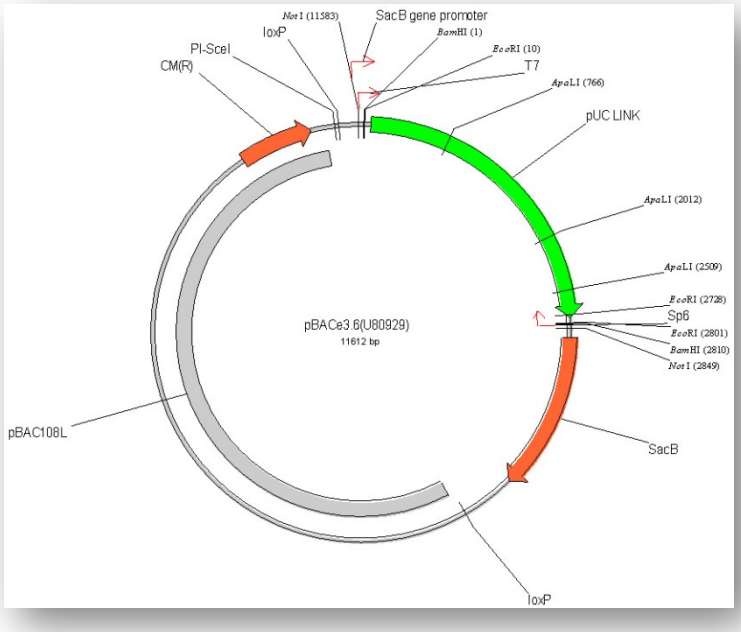
ثالثا:- الكوزميد Cosmid

عباره عن بلازميد مضاف له قطعه من جين العاثي لمدا cos (cohesive end site) وهذه القطعه تحتوي على الجينات الخاصه بتعبئه العاثي . هذا النوع من النواقل له القدره على حمل قطعه DNA يتراوح حجمها بين 50-53) Kb) الشكل التالي يوضح ناقل الكلونه الكوزميد

رابعا:- Bacterial artificial chromosome (BAC)

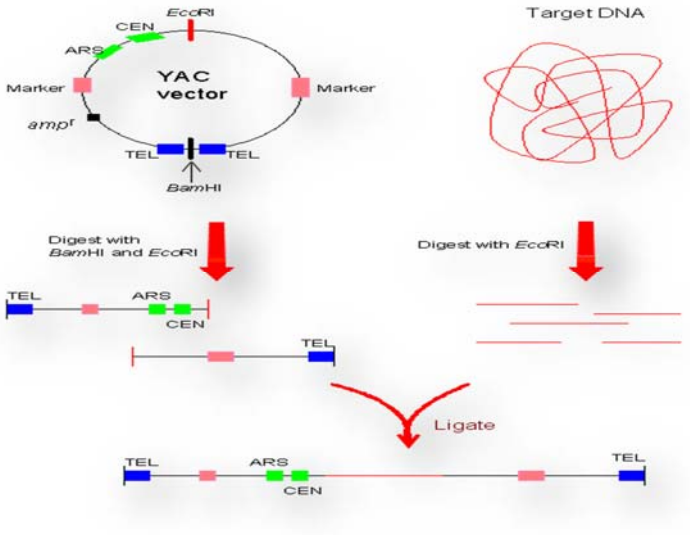
نواقل كلونه تعتمد على F-plasmid لها القدره على حمل قطع DNA بحجم (75-300Kb) والشكل التالي يوضح الـ BAC





خامسا:- Yeast artificial chromosome (YAC)

عباره عن كروموسوم خميره محور يحتوي على الـ Telomer ومنطقه بدء التضاعف ori وسنترومير الخميره بالاضافه الى جينات تشفر لصفات انتقائيه يمكن ملاحظتها في خلايا الخميره , هذه النواقل يمكنها حمل قطع DNA بحجم (100-1000Kb) الشكل التالي يوضح الـYAC cloning vector



المختبر الثالث عشر

تقنية البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction PCR

تعد هذه التقنيه واحده من التقنيات المهمه في علم البايولوجي الجزيئي ,في هذه التقنيه يتم مضاعفه نسخه مفرده او عدد قليل من نسخ الـ DNA الى عدد من النسخ يصل الى عده الالاف او عده ملايين نسخه بعدد قليل من الخطوات التي سيتم توضيحها لاحقا

نبذه تأريخيه

تم وصف تقنيه الـ PCR لاول مره عام 1971 في مقاله نشرت من قبل العالم Kleppe و زملائه ,اوضح فيها امكانيه تضاعف قطعه صغيره من الـ DNA مختبريا باستخدام نظام انزيمي و برايمرات (بادئات) معينه الا ان هذه المقاله لم تلق الاهتمام المطلوب حتى قام العالم Mullis عام 1983 بتطبيق هذه التقنيه بصوره عمليه و منذ ذلك الوقت اصبحت هذه التقنيه تستخدم بكثره في مجالات عديده منها الطب و الصيدله و الكيمياء الحياتيه وغيرها .

الخطوات الاساسيه لتقنيه الـ PCR

يمكن باستخدام هذه التقنيه مضاعفه قطع DNAبحجم يتراوح بين 0.1-10 Kbp الان ان بعض التقبيقات الحديثه لهذه التقنيه مكنت العلماء من مضاعفه قطع DNAبحجم يصل الى 40Kbp ويمكن تلخيص اساس العمل بمرحلتين اساسيتين هما

اولا:- الفصل الفيزياوي لشريطي الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين باستخدام حراره عاليه تسمى هذه العمليه اذابه الـ DNA (DNA melting)

ثانيا:- خفض درجه الحراره للسماح بانزيمات الـ DNA Polymerase من اعاده تصنيع اشرطه متممه لاشرطه الـ DNA الاصليه.

وفيما يلي تفصيل للخطوتين الاساسيتين اعلاه

خطوه البدء Initialization Step هي خطوه ابتدائيه تتطلب تسخين التفاعل لدرجه (94-96 or 98)ْم لمده (1-9 min) لغرض تنشيط انزيم الـDNA Polymerase

المسخ Denaturation step تتضمن هذه الخطوه حراره تصل الى (94-98)ْم لمده (20-30 sec) لغرض فك الارتباط الفيزيائي بين شريطي الـ DNA (تكسير الاواصر الهيدروجينيه)

الارتباط Annealing step في هذه الحاله يتم خفض درجه الحراره لغايه (50-65)ْم لمده (20- 40 sec) مما يسمح للبرايمر بالارتباط مع شريط الـ DNA المفرد , ان درجه الحراره المثاليه مهمه جدا في هذه الخطوه لان الحراره العاليه قد لاتساعد على حصول الارتباط بين البرايمر و الشريط المفرد للـ DNA كما ان الحراره المنخفضه قد تؤدي الى ارتباط غير دقيق و غير كامل بين البرايمر وشريط الـ DNA لذا يجب ان تكون الحراره اقل من الحد الادنى لحراره البرايمر ب 3-5 درجات . بعد حصول الارتباط الدقيق يرتبط الـDNA Polymerase بالبرايمر و تبدأ عمليه تكوين الشريط المتمم Complementary strand of DNA

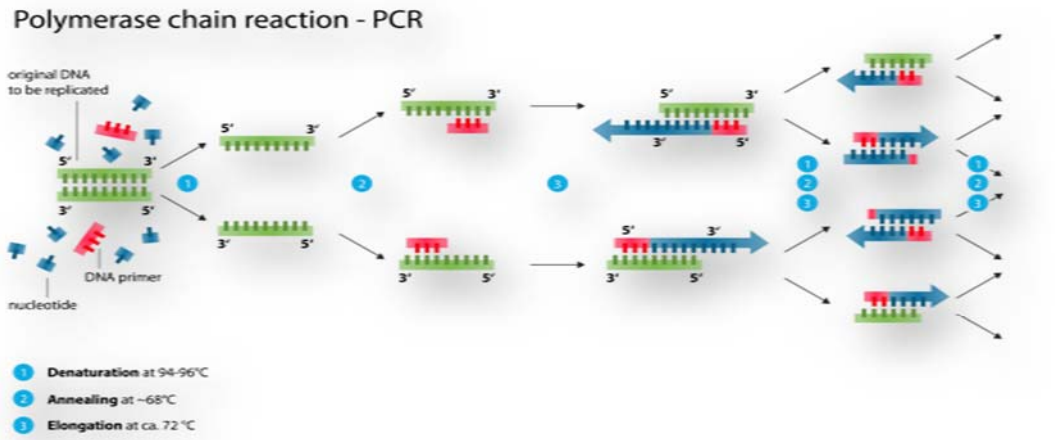
الاستطاله Elongation or Extension step ان درجه الحراره في هذه الخطوه تعتمد على نوع الـ polymerase المستخدم في التجربه , فأذا كان الانزيم هو Taq polymerase فأن الحراره المثلى للفعاليه تكون بين (75- 80) ْم . يبدأ الـ DNA Polymerase في هذه المرحله بتصنيع الشريط المتمم لقالب الـ DNA باضافه dNTPs و باتجاه 5'-3' .ان الوقت الذي تستغرقه هذه الخطوه يعتمد على نوع الـ polymerase المستخدم و طول قطعه الـ DNA المراد مضاعفتها ,على فرض ثبات بقيه العوامل و عدم وجود مثبطات فأن انزيم الـ DNA Polymerase يستطيع بلمره الف زوج قاعدي في الدقيقه

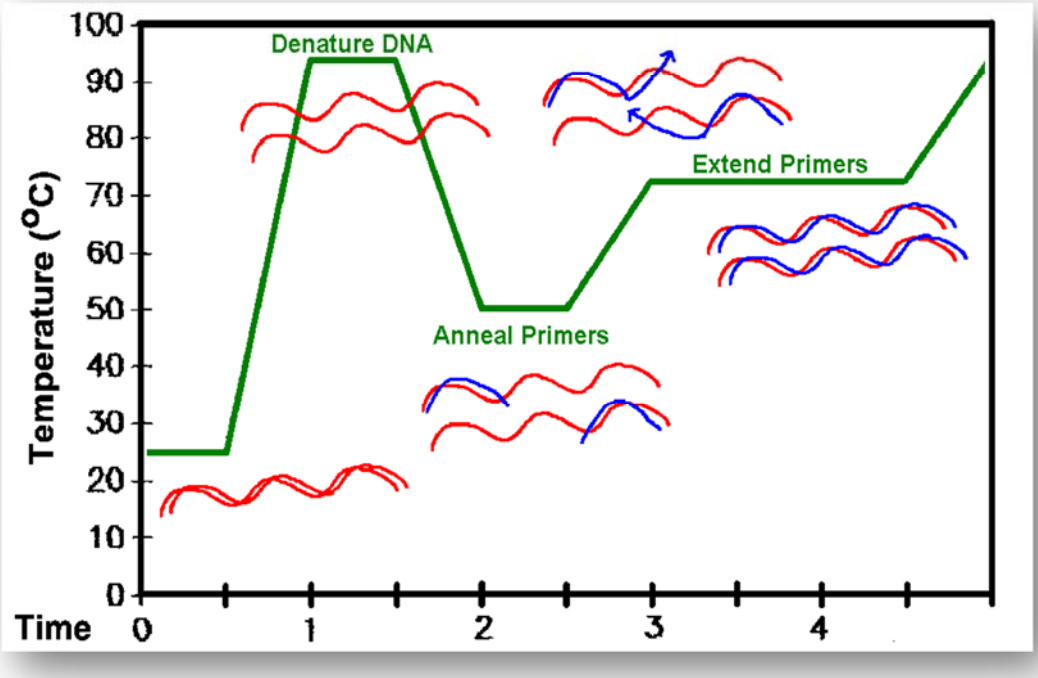
المثبطات التي تؤثر على وقت عمليه الاستطاله

1. قله الماده الاساس dNTPs
2. قله المواد المستخدمه في التفاعل
3. كميه الـ DNA الهدف المتضاعه

الاستطاله الاخيره Final elongation تجري هذه الخطوه بعد الدوره الاخيره من عمليه التضاعف ,اذ تكون درجه الحراره بين (70- 74) ْم لمده (5-15 min) الغرض منها التأكد من ان جميع اشرطه الـ DNA المفرده تم عمل اشرطه مكمله لها

الصور التاليه توضح خطوات هذه التقنيه





لغرض اتمام عمليه الـ PCR يجب توفر عدد من المكونات نذكر منها :

1. قالب الـDNA وهو قطعه حامض نووي رايبوزي منقوص الاوكسجين يحتوي على الجين المراد مضاعفته (target DNA)
2. زوج من البرايمرات التي تكون مكمله لقطعه الـ DNA الهدف و لكلا الشريطين
3. انزيم الـ Taq polymerase او انزيم بوليميريز اخر يتحمل درجه حراره عاليه تصل الى 70 ْم
4. Deoxynucleoside triphosphate (dNTPs) قد تسمى احيانا deoxynucleotide triphosphate وهي عباره عن نيوكليوتيدات تحتوي على مجموعه ثلاثيه الفوسفات وهي الوحدات الاساسيه التي يستخدمها الـ DNA Polymerase لتصنيع اشرطه الـ DNA الجديده
5. محلول بفر يوفر بيئه مناسبه لغرض اعلى فعاليه وثبات لانزيم الـDNA Polymerase

ملاحظه ماهو الـTaq polymerase من اي كائن تم عزله و ماهي مواصفاته؟؟

من الاختبارات التي يستعمل فيها الـ PCR

1. تحديد الانماط الجينيه للفايروسات مثل فايروس التهاب الكب الفايروسي نوع C
2. الكشف عن الامراض الوراثيه قبل ضهور الاعراض
3. الكشف عن الامراض الوراثيه عند الاجنه قبل الولاده
4. تشخيص الامراض السرطانيه بالكشف الجيني
5. تعيين الانماط النسيجيه HLC- tissue typing في مجال زراعه الاعضاء
6. تلعب دورا مهما في الطب الجنائي والشرعي.
7.

هناك عده انواع اخرى من الـ PCR التقليدي الذي تم توضيحه اعلاه و كل نوع يستخدم لهدف معين ذكر من انواع الـ PCR:

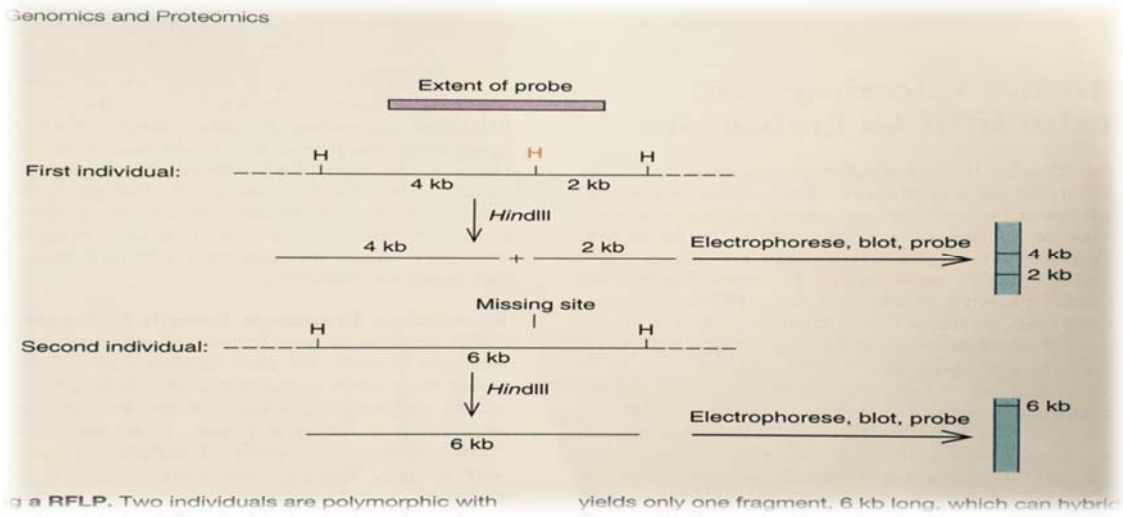
1. Conventional PCR
2. Real Time PCR
3. Quantitative PCR (qPCR)
4. Reverse transcription PCR (RT-PCR)

المختبر الرابع عشر

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

RFLP هي التغايرات في عدد قطع موقع جيني معين مهضوم بنفس الانزيم القاطع بين شخص واخر. ان استخدام هذه التقنيه في اواخر القرن العشرين كان بداعي الحصول على الخارطه الجينيه للجنس البشري الا انها لم تكن نافعه جدا (لماذا)

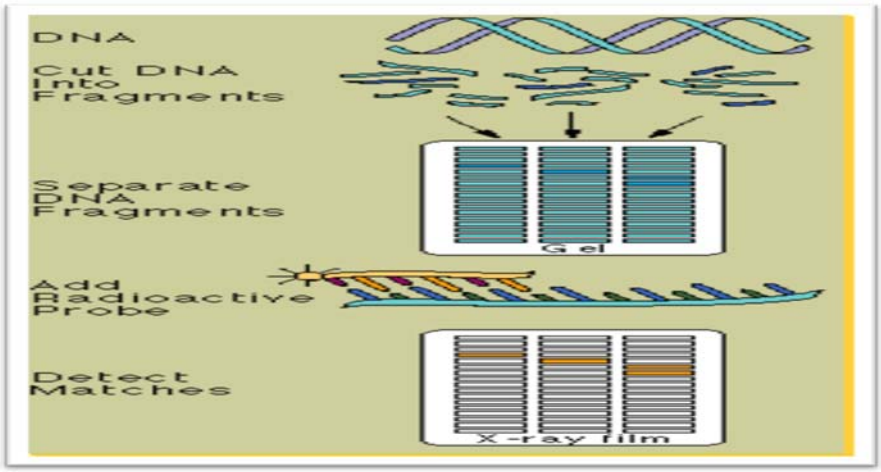
ان اساس العمل بهذه التقنيه هو احتواء الجينوم على عدد من مواقع القطع للانزيمات القاطعه لذا فأن استخدام هذه الانزيمات سيعطي عدد من القطع يختلف من شخص لاخر والاختلاف يكون بعدد القطع وحجمها بين الاشخاص لنفس الموقع الجيني ز لنفترض ان موقعا معينا يحتوي على تسلسل قطع لانزيم HindIII فأن القطع الناتجه من استخدام هذا الانزيم على شخصين مختلفين يعطي للشخص الاول قطعتين بحجم 2&4Kb بينما الشخص الثاني لايحتوي على موقع قطع في وسط الموقع الجيني لذا فأنه يعطي قطعه واحده بحجم 6Kb كما في الشكل التالي



بما ان جينوم الكائنات الحيه يحتوي على مئات الالوف من مواقع القطع لكل انزيم قطع معين لذا كان لابد من وجود طريقه لتوضيح تسلسلات معينه لذا تم استخدام معلمات Radioactive probes مشعه لها القدره على الارتباط بمواقع معينه على الجينات لتوضيحها و في الوقت الحالي نستخدم البرايمرات وتقنيه الPCR للتحري عن عدد القطع الناتجه و مقارنتها مع الافراد الاخرى

الخطوات الاساسيه لتقنيه الـ RFLP:

1. هضم قطعه معينه من الـ DNA باستخدام الانزيمات القاطعه
2. فصل القطع الناتجه على اساس طولها وحجمها باستخدام الترحيل الكهربائي
3. نقل القطع المطلوبه من الهلام باستخدام تقنيه الـ Southern blot
4. استخدام معلم DNA probe مكمل لقطع الـ DNA الناتجه
5. البحث عن الفروقات الفرديه بين عدد القطع وحجمها



استخدامات تقنيه الـ RFLP:

1. اثبات الابوه Paternity
2. التحري عن خط الاصابه بالامراض الجينيه
3. تحديد الجينات المسؤوله عن الاخطاء الوراثيه (genetic disorder)
4. التحري عن اصل الكائنات تامجهريه من المصادر المختلفه (genetic diversity)
5. الطب العدلي
6. Genetic fingerprinting

هندسة وراثيةعملي

(Genetic Engineering)

وتسمى أيضاً بالتعديل الوراثي هي تلاعب إنساني مباشر بالمادة الوراثية للكائن الحي بطريقة لا تحدث في الظروف الطبيعية

الهندسة الوراثية هي التقنية التي تتعامل مع الجينات، البشرية منها والحيوانية بالإضافة إلى جينات الأحياء الدقيقة، أو الوحدات الوراثية المتواجدة على الكروموسومات فصلاً ووصلاً وإدخال أجزاء منها من كائن إلى آخر, لاغراض متعدده منهامعرفة وظيفة (الجين) أو بهدف زيادة كمية المواد الناتجة عن التعبير عنه أو بهدف استكمال ما نقص منه تتم الهندسة الوراثية بعدة طرق تكون بشكل أساسي مؤلفة من خطوات:4

1- عزل الجين المرغوب: يتم العزل من خلال تحديد الجين المرغوب إدخاله إلى الخلايا من خلال معلومات مسبقة عن المورثات والتي يتم الحصول عليها إما من خلال عمل مكتبات من ومن ثم تتم مضاعفة هذه الجينات باستخدام تفاعل سلسلة البوليميرز.(PCR)

2 - إدخال أو تحميل الجين المرغوب في حامل مناسب مثل بلازميد. كما يمكن استخدام حوامل أخرى مثل الحوامل الفيروسية أو الليبوزوم.

3 - إدخال الحامل في خلايا المتعضية المراد تعديلها، وتتم بعدة طرق منها بندقية الدنا.

- عزل وفصل الخلايا أو المتعضيات التي تعدلت وراثياً بنجاح 4 عن الطبيعية. ويتم ذلك بعدة طرق منها: استخدام مسبار الدنا للتحري عن الجين المدخل

مجالات استخدام الهندسه الوراثيه

مجال العلاج الطبي :

و يشمل انتاج بكتريا تحتوي على جينات الانترفيرونات وهي عباره عن بروتينات تعمل (Inter Ferones)البشريه على وقف تضاعف الفيروسات مثل الفيروسات المسببة للنفلونزا وشلل الاطفال وغيرها من الفايروسات من خلال كذلك يشمل رسم الخريطة (Cloning)استخدام تقنية الـ الجينية للانسان والحيوان وتشخيص الخلل الوراثي سواء كان بشريا او حيوانيا وانتاج العديد من المركبات والانزيمات من مصادر نباتية وحيوانية ومايكروبية واستخدامها في المجالات الصناعية المختلفة والتلاعب الجيني لهذه الخلايا لزيادة انتاجها باستخدام تقنيات الوراثة الجزيئية.

مجالات الانتاج الحيواني :

وتشمل انتاج حيوانات معدلة وراثيا ذات قدرة على مقاومة الامراض والمعالجة الجينية للحيوانات لزياده سرعة نموها بتزويدها بالجين الخاص بهرمون النمو السريع وقد تم عالميا

بالفعل انتاج عدد من حيوانات المزرعة المعدلة وراثيا بهدف سرعة نموها ولزيادة قدرتها على انتاج اللحم وانتاج اغنام ذات صوف عالي الجوده وتقسيم جنين الماشية والحصول على توائم ثنائية وثلاثية ورباعيه لزيادة انتاج الثروة الحيوانية.

مجالات الانتاج النباتي :

وتشمل انتاج نباتات مقاومة للامراض الفيروسية والتي يتم من خلالها استخدام الهندسة الوراثية لتحسين الانتاج النباتي حيث لاتوجد وسيلة مباشرة لعلاج المحاصيل المصابة بالفايروسات سوى الوقاية من الاصابة بها وانتاج نباتات مقاومة للحشرات بديلا عن فكرة مقاومة الحشرات من خلال (Bacillus thuringiensisانتاج بروتين تفرزه)بكتريا وانتاج نباتات ذات خصائص غذائية فائقة وانتاج مبيدات لنباتات

اعداد
الدكتورة
هلا عبدالهادي صالح