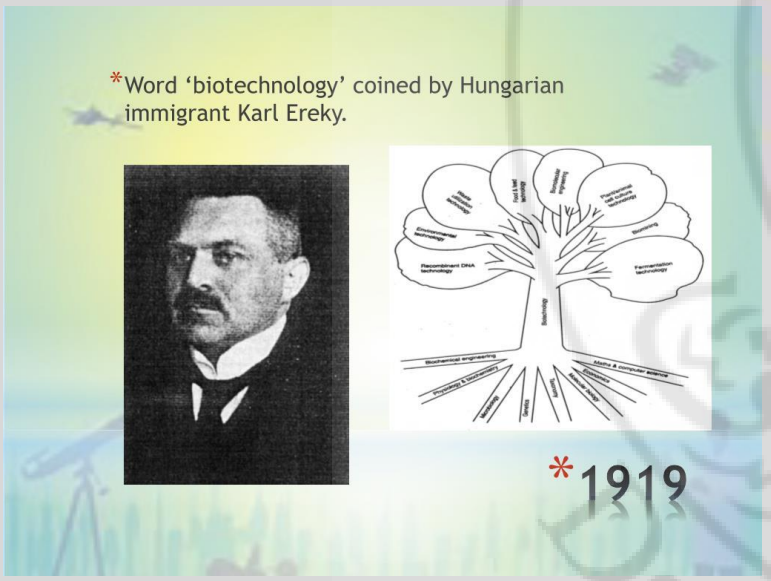
مقرر التقانات الحيوية
(الجزء النظري)
السنة الرابعة، قسم المحاصيل الحقلية

د. نور علي

مدرس في قسم المحاصيل الحقلية

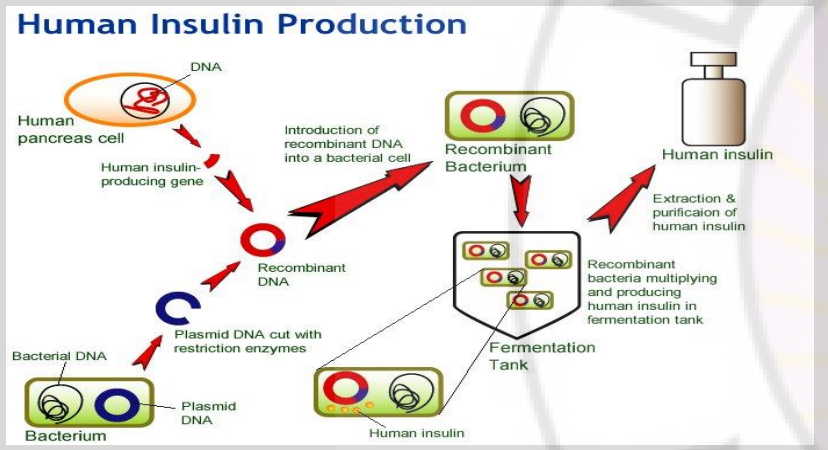
المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين

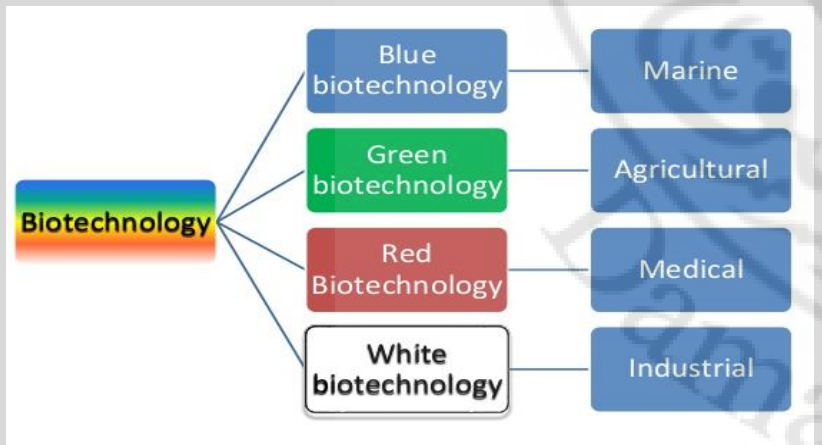
مقدمة



- لكل علم من العلوم مراحل تطور متتالية عبر العصور ولعل الذي يثير الجدل من العلوم اليوم هو علم
- التقانة الحيوية Biotechnology والاسم الشائع له التكنولوجيا الحيوية
- يظن الكثير بأنه علم حديث إلا انه يرجع إلى العصور القديمة حيث استخدمه المصريون القدماء منذ حوالي 4000 سنة قبل الميلاد عندما استخدموا الخميرة في إنتاج الخبز،
- ومع ذلك ظهر مصطلح التقانة الحيوية لأول مرة في عام 1919 بواسطة المهندس المجري Karl Ekery والذي يشير إلى إنتاج المنتجات (غذاء، مشروبات، مواد كيماوية) من المواد الخام بمساعدة الكائنات الدقيقة وهو ما يشار إليه الآن بالتقانة الحيوية التقليدية وبدخول الهندسة الوراثية بدأ عصر التقانة الحيوية الحديثة.

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين

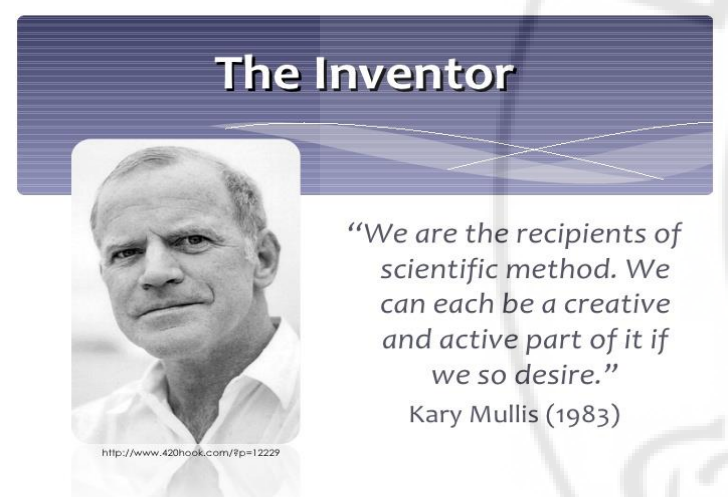


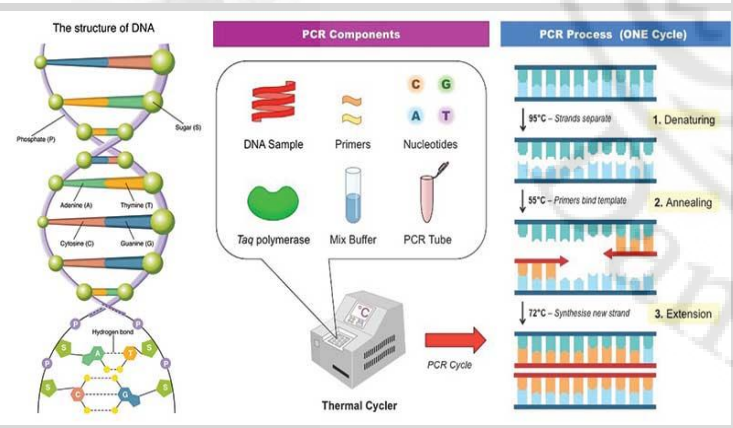


مقدمة

- يتكون مصطلح Biotechnology من مقطعين الأول Bio و هو مشتق من الكلمة اللاتينية "Bios " بمعنى الحياة أمّا الثاني Technologyبمعنى الطريقة المنظمة لعمل الأشياء.
- حصل التطور الكبير في مفهوم التقانة الحيوية في الستينيات من القرن الماضي نتيجة اكتشاف المادة الوراثية DNAبتفاصيلها الدقيقة (الصبغيات ، المورثات، الأسس الآزوتية) و كيفية ترميز المورثات للبروتينات ، أما المحطة الأكثر أهمية للتقانة الحيوية بدأت مع تطور تقانات التعامل معDNA ودخول العلوم الحيوية عصر تقانة DNA المأشوب recombinant DNA technology (إنتاج البروتينات العلاجية مثل الأنسولين بالاعتماد على الجراثيم وذلك عن طريق تأشيب بلاسميد الجرثوم بالمورثة البشرية المسؤولة عن اصطناع الأنسولين وبالتالي مع تضاعف بلاسميد الجرثوم وتعبيره عن هذه المورثة سنحصل في النهاية على الأنسولين)

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين





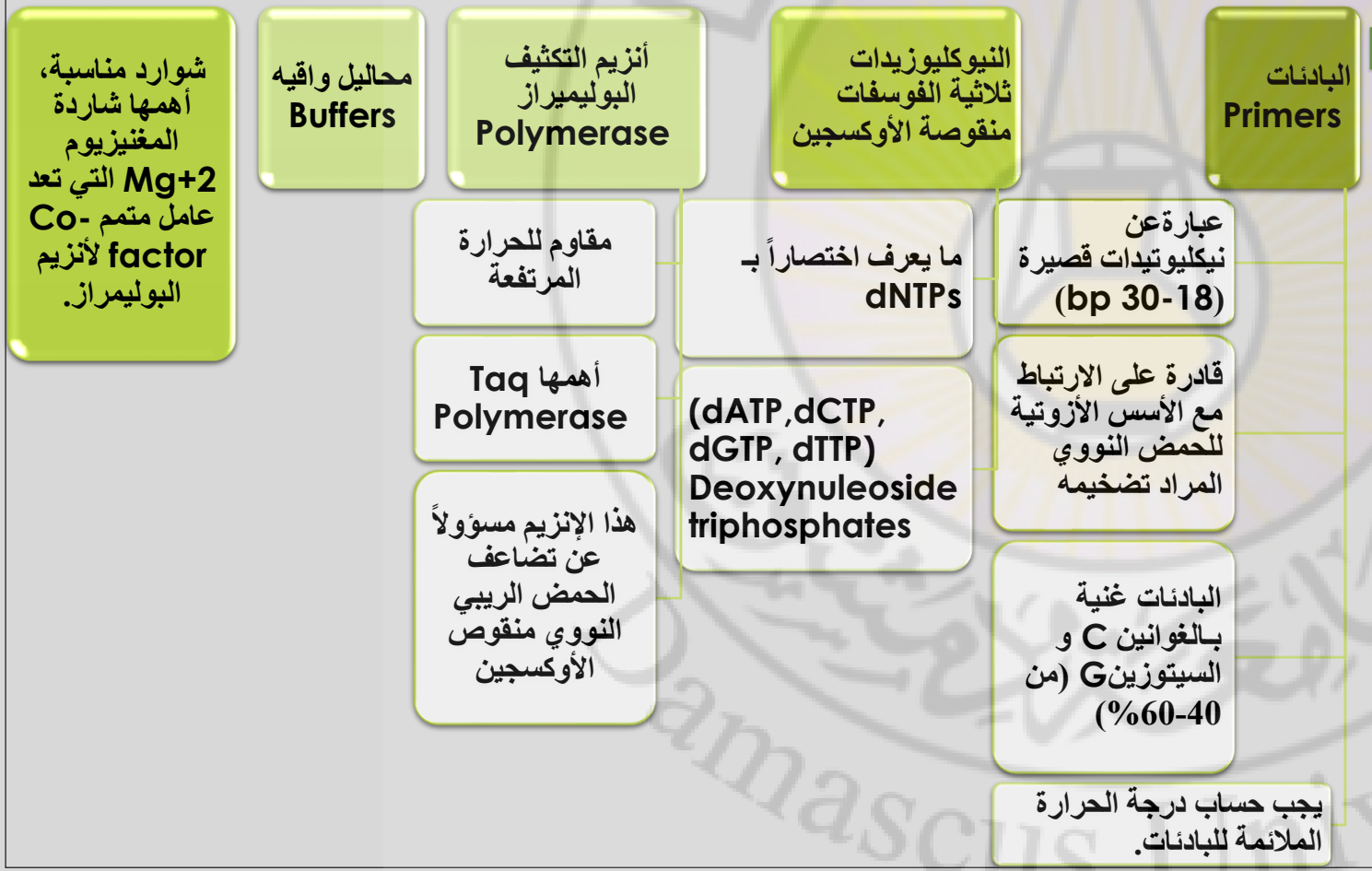
مقدمة

- إن التطور في مجال التكنولوجيا الحيوية والذي يقوم على التعامل مع الحمض النووي (DNA) بشكل أساسي، استدعى العلماء للبحث عن طريقة أو تقنية مماثلة تقوم على مضاعفة كمية الحمض النووي (DNA) بشكل كبير
- فكان هناك عدة محاولات لتنشيط الخلية على الانقسام المستمر بإضافة عوامل النمو Growth factors، ولكن هذه الطريقة لم تكن ذات جدوى لأسباب كثيرة.
- إلى أن توصل العالم Kary Mullis في عام 1985 بنشر اختراعه لتقانة PCR فكانت هذه التقانة بوابةً لكثير من التطورات المتسارعة في مجال التكنولوجيا الحيوية.
- من أهم الأسباب التي ساعدت هذه التقانة على الانتشار عدم اعتمادها على النظام الحيوي (أي الخلية) و التحكم بكمية الحمض النووي (DNA)، أي أنها طريقة لنسخ الحمض النووي في المختبر لذلك فهي تقانة حيوية لاستنساخ قطعة محددة من الحمض النووي بعد استخلاصها من خلايا أو سوائل الجسم و مضاعفة إنتاجها لكي يتسنى إجراء الاختبارات و الفحوصات الإضافية عليها.

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين

تقانة (PCR)
Polymerase Chain Reaction
تفاعل البلمرة المتسلسل

- هي طريقة تستخدم على نطاق واسع لتكوين ملايين النسخ من عينة معينة من الحمض النووي بسرعة ، مما يسمح للعلماء بأخذ عينة صغيرة جدًا من الحمض النووي وتضخيمها إلى كمية كبيرة بما يكفي للدراسة بالتفصيل.
- تعد هذه التقانة سريعة, وسهلة, وحساسة وأوتوماتيكية و هي تحتاج إلى توافر مواد معينة لكي يحدث التفاعل وهي:



المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين

تقانة (PCR)
Polymerase Chain Reaction
تفاعل البلمرة المتسلسل

- يتم تضخيم قطعة من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين باستخدام جهاز التدوير الحراري الآلي Thermocycleو ذلك للتحكم بدرجة حرارة التفاعل بشكل دقيق و متتالي ويقوم هذا الجهاز بتغير درجة الحرارة بشكل سريع، لآن تغير درجة الحرارة هو الأساس الذي تقوم عليه فكرة هذه التقانة. يتم النضخيم بعدد من الدورات يتراوح بين 25-40 دورة و تتكون كل دورة PCRمن ثلاث مراحل كالآتي:

1. Denaturation
2. Primers Annealing
3. Extension

Damascus University

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين

تطبيقات تقانة (PCR) Polymerase Chain Reaction

- الكشف عن الطفرات الوراثية
  - وذلك عن طريق وضع بادىء خاص للطفرة لتضخيم المورث الخاص بها ومنه نقوم بمعرفة المرض إذا كان على زوجي الصبغيات أو على إحداهما (allele).
- تحديد البصمة الوراثية
  - هو العنصر الأهم في عملية الاتحادات الجديدة للحمض النووي Recombinant) الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين) حيث يقوم PCRبتضخيم المورث المراد إدخاله على البلاسميد أو الحمض النووي (DNA) المضيف
- تحديد تتابع النيكليوتيدات في الحمض النووي (DNA sequencer)
- معرفة طول الحمض النووي (DNA).
- الحصول على الحمض النووي المكمل (cDNA)
- تحديد المورث المطلوب من خليط من المورثات.
- مشروع الخارطة الوراثية البشرية Human) genome (project
- في مجال الطب الشرعي

Damascus University

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين

النسخ العكسي المترافق مع التضخيم بواسطة Tag polymerase تقانة RT-PCR
Reverse transcription polymerase chain reaction

- هي تقنية معملية تجمع بين النسخ العكسي للحمض النووي RNA إلى DNA (يسمى في هذا السياق DNA التكميلي أو cDNA, complementary DNA) وتضخيم أهداف الحمض النووي المحددة باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)
- و تعد تقانة RT-PCR ذات أهمية في تحديد التعبير المورثي و تشخيص عوامل العدوى و تشخيص الأمراض الوراثية
- و لا بد من توافر مواد معينة لكي يحدث التفاعل:

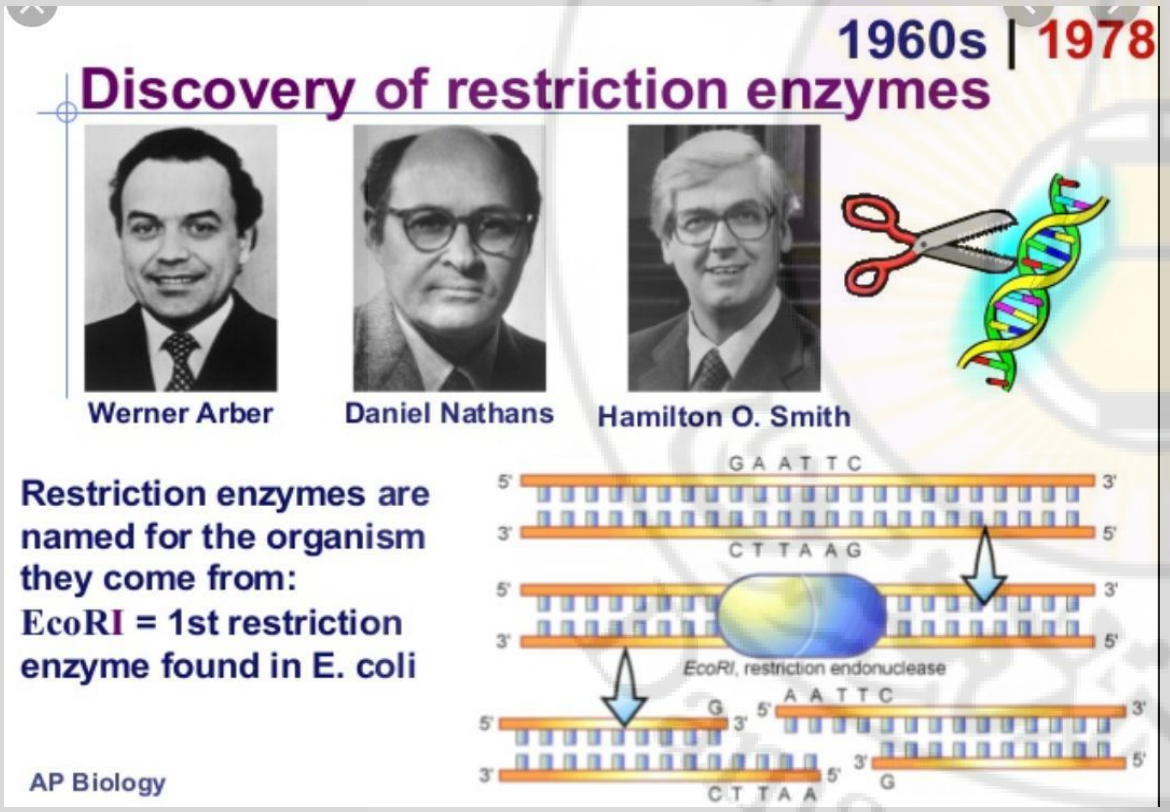
1. إنزيمات النسخ العكسي: و تمثل RNA-dependent polymerases و التي تساهم في بناء الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين المتمم cDNA .
2. البادئات: يستخدم البادئ Oligo-dT (متعدد 12-18 أساس أزوتي) في النسخ العكسي الذي يقتضي تركيب السلسلة الجديدة cDNA ابتداءً من RNAmذو ذيل متعدد الأدنيل (Poly A) A.

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين

تقانة Southern blot (خاصة لـ DNA)

- على الرغم من أن تقانة PCR قد حلت محل تقانة ساوزرن إلا أن هذه التقانة ما زالت ضرورية لكشف بعض التغيرات كبيرة الحجم في DNA و التي لا يمكن كشفها بتقانة PCR حيث طورت هذه التقانة في عام 1975 من قبل العالم Southern.
- مبدأ التقانة: ينقى الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين الصبغي و يقطع باستخدام إنزيمات التحديدrestriction enzymes للحصول على قطع من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين مختلفة الأطوال.

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين



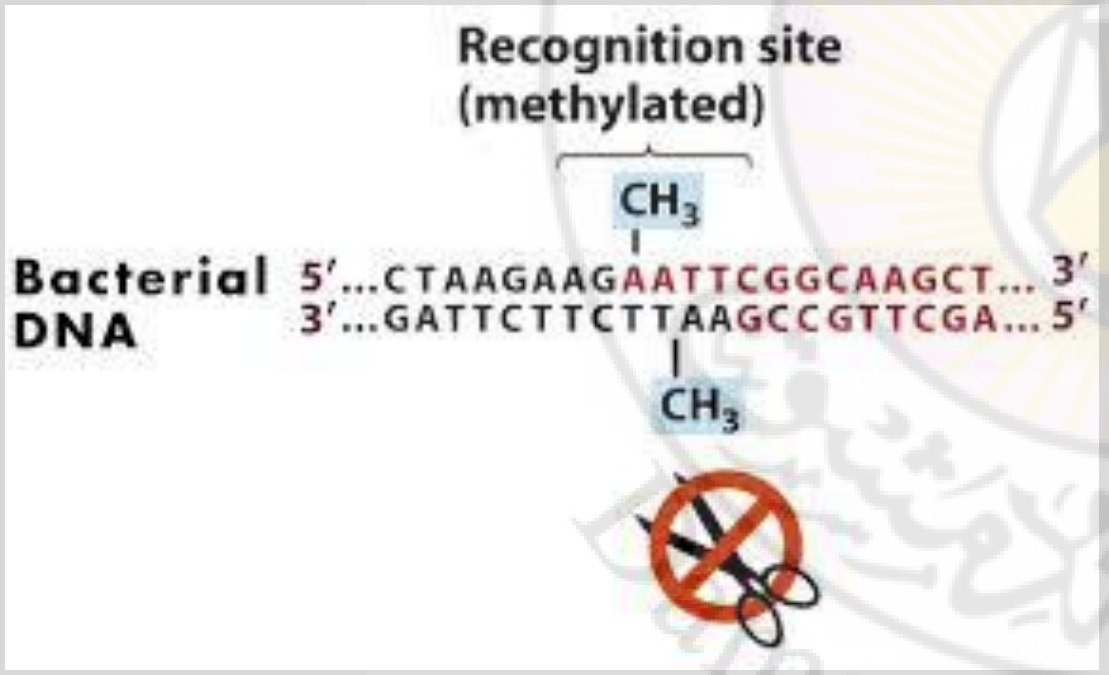
1. **الأنزيمات التي تستخدم في معالجة الـ DNA**

- **هي:**
- - أنزيمات التقييد Restriction Enzyme, أو الحصر و التقيد
- - أنزيمات البلمرة Polymerases E.
- - أنزيمات النيكليوز Nucleases E.
- - أنزيمات التعديل Modifying E.
- - أنزيمات الربط Ligases E.

- اكتشفت هذه الأنزيمات في السبعينيات، حيث قام بتوصيف تلك الأنزيمات العالمان Smith & Nathans وقد حازا على جائزة نوبل عام 1978 لاكتشافهم أنزيمات الاندونيوكلياز المقيدة أو المحددة. و يوجد حالياً أكثر من 500 نوعاً من هذه الأنزيمات متوفرة تجارياً.

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين

إنزيمات التقييد (القطع) Restriction enzymes-cutting



◦ لا شك في أن لكل كائن حي طرق دفاعية مختلفة تحميه من الكائنات الأخرى مثلاً تقوم بعض أنواع من البكتيريا بإنتاج إنزيمات مهمتها تدمير الفيروسات التي تهاجمها, و من هذه الإنزيمات، الإنزيمات القاطعة التي تقوم بقص الحمض النووي (DNA) للفيروس و بذلك يُشل عمله و يُبطل مفعوله.

◦ و بما DNA مادة موجودة بشكل طبيعي في البكتيريا كما هو الحال في الفيروسات والكثير من الكائنات الحية فإن هذه الإنزيمات قد تشكل خطراً على البكتيريا نفسها في قصها للـ DNAالخاص بها.

◦ ولكن هذا لا يحدث و السر في ذلك هو قيام البكتيريا بتحوير أجزاء من DNA الخاص بها عن طريق إضافة مجموعة الميثيل إلى بعض الأسس الأزوتية من نوع الأدنين أو السيتوزين فلا يستطيع الأنزيم Methyl القاطع من قطع الحمض النووي الخاص بالبكتيريا.

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين

إنزيمات التقييد (القطع) Restriction enzymes-cutting

- تصنف إنزيمات القطع في ثلاثة أنواع وهي (I, II و III)
- و تكون معظم الإنزيمات المستخدمة من النوع الثاني II لأنها تقطع تسلسل نوعي من DNA و تتعرف عليه من خلال قطعه لرابطة الفوسفات ثنائية الاستر.
- أما النوعان I و IIIفهما لا يتعرفان على تسلسل معين للقطع و إنما يعملان على إزالة النيكليوتيدات في نهاية RNA و DNA.

- يختص كل إنزيم بمعرفة تتابع محدد من النيكليوتيدات فيDNA و تكون معظم التتاليات أو التسلسلات المعروفة مكونة من أربعة أو خمسة أو ستة أزواج من القواعد طولاً و يمكن أن تصل إلى ثمانية أزواج من القواعد.
- و هذا التسلسل المعين يعرف باسم موقع القطع Restriction site أو موقع التعرف Recognition Site (Sequence).

Types Of Restriction Enzymes

- Type 1: enzymes recognize DNA sequences but cut the DNA in random sites that can be as far as 1,000 base pairs away from the recognized site.
- Type 2: enzymes recognize and cut within the recognized site.
- Type 3: enzymes recognize sequences but cut at a different location within 25 base pairs of the recognized site.

Damascus University

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين

إنزيمات التقييد (القطع) Restriction enzymes-cutting

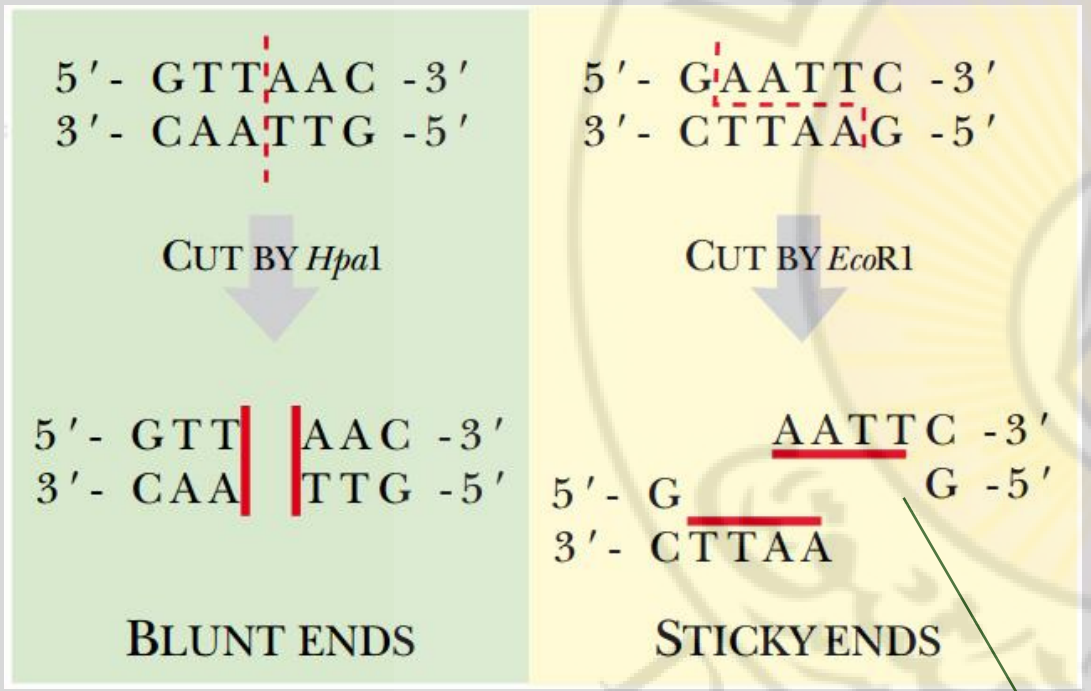
- على افتراض أن هذه الأسس موزعة عشوائياً فانه يمكن حساب تواتر أي تتابع خاص 4^n حيث n هي طولاً للتتابع المحدد للأنزيم
- على هذا الأساس يمكن التنبؤ بالعثور على جزيء رباعي النيكليوتيد ضمن 256 زوجاً قاعدياً، و خماسي النيكليوتيد ضمن 1024 زوج قاعدي و سداسي النيكليوتيد ضمن 4096 زوجاً قاعدياً.
- و عليه فالأنزيم المحدد لتتابع رباعي النيكليوتيد سينتج القطع الأقصر من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين بالمقارنة مع الأنزيم المحدد لتتابع سداسي النيكليوتيد.

أهم أنزيمات القطع المحددة وموقع عمل كل منها:

الإنزيم	التتابع المستهدف Target Sequence	الكائن الحي المنتج للإنزيم
EcoRI	TTC GAA AAG CTT	*Escherichia coli RY13*
BamHI	TCC GGA AGG CCT	*Bacillus amylolique faciens H*
BglII	TCT AGA AGA TCT	*Bacillus globigii*
HaeII	GCpy PuGC CGpu pyCG	*Haemophilus aegypius*
HindIII	CTT AAG GAA TTC	*Haemophilus influenza R*

تعتمد تسمية إنزيم القطع على الاسم اللاتيني للكائن الحي الذي يحوي الإنزيم, حيث يستخدم اسم الجنس للتعبير عن الجزء الأول من اسم الإنزيم و الحروف الأولى من اسم النوع ، كما يمكن أن يضاف إلى اسم الإنزيم بعض الحروف أو الأرقام التي تعبر عن اسم السلالة و رقمها

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين



خصائص إنزيمات التقييد (القطع) Restriction enzymes- cutting

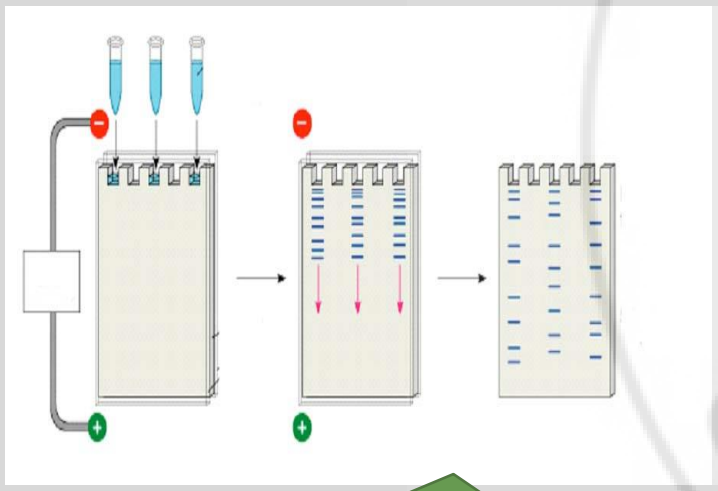
1. غالباً ما يتم عزلها من أنواع البكتريا المختلفة أو فطر الخميرة.
2. تقطع الحمض النووي في نقطة محددة أو مكان وموقع قطع معين Recognition Site
3. تعمل كنظام مناعي مصغر للبكتريا يحميها من جزئيات الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين الغريبة مثل الإصابة الفيروسية.
4. أنزيمات القطع إما أن تترك نهايات لاصقة أو بشكل متعرج cohesive or sticky في '5 و '3 مثل الإنزيم القاطع (EcoR1) الذي يقطع عندما يجد 6 من الأحماض النووية في هذا التسلسل (GAATTC) أو نهايات تامة أو حادة أو بشكل رأسي مستقيم blunt مثل الإنزيم القاطع (Hpa1) الذي يقطع عندما يجد 6 من الأحماض النووية في هذا التسلسل (GTTAAC) يوجد في بكتيريا الهيموفلس بارا انفلونزا (*Hemophilus parainfluenzae*)

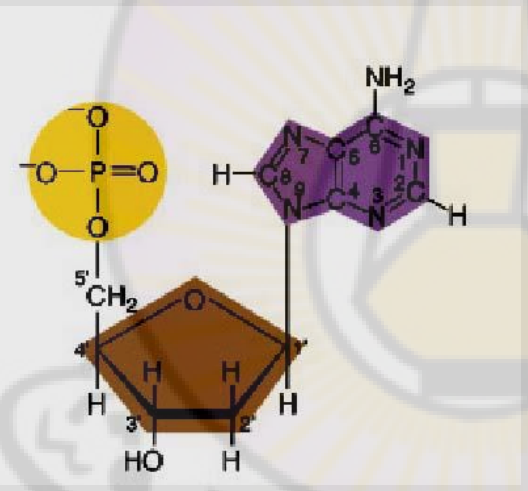
تكون مناطق القطع غالباً متقابلة (ذات تسلسل متعاكس) palindromic sequences

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين

2. الرحلان الكهربائي الهلامي Gel electrophoresis

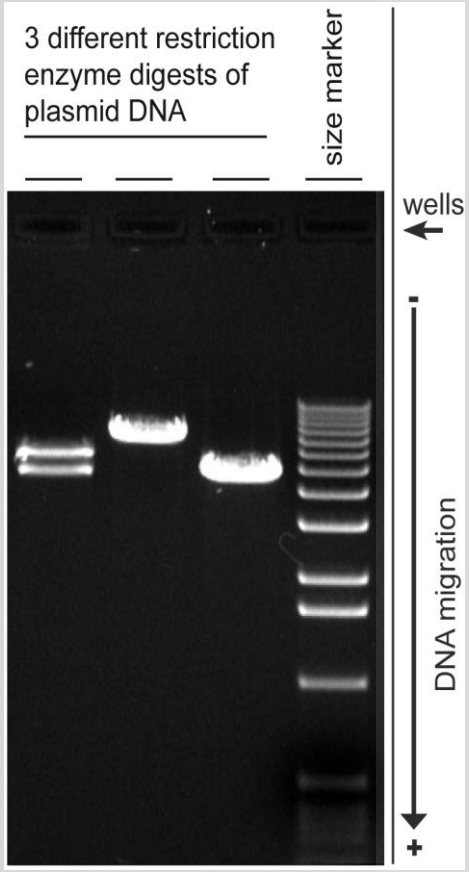
- تعد تقنية الرحلان الكهربائي من المقومات الأساسية للهندسة الوراثية, و التي بواسطتها يتم تصور قطع الحمض النووي مباشرة
- تعتمد هذه الطريقة على طبيعة الحموض النووية التي تمثل مركبات متعددة الشحنة السالبة Polyanionic في درجة pH متعادلة, تحمل الأحماض النووية شحنات سالبة متعددة من خلال المجموعات الفوسفاتية ثنائية الاستر لسلاسل الحمض النووي.
- و يعني ذلك هجرة الجزيئات نحو القطب الموجب عند وضعها في مجال كهربائي.
- يوجد نوعان من الهلامات gel تستعملان بشكل واسع و هما: الأغاروز Agaroseو متعدد الأكريلامايد Polyacrylamide.
-

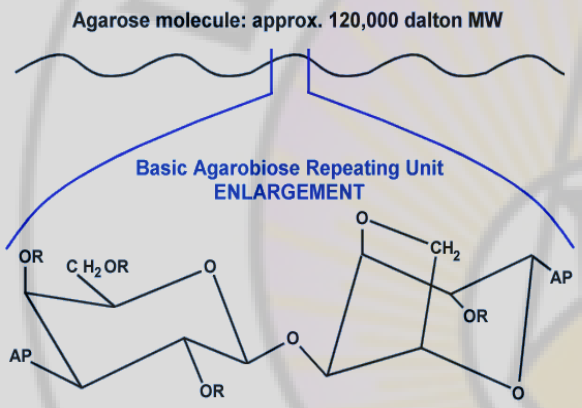


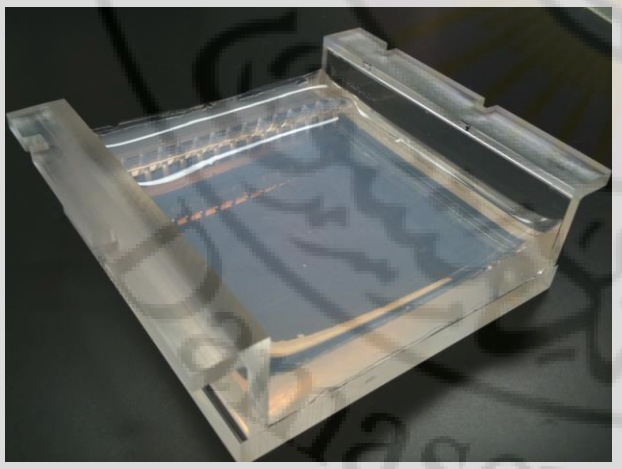


تمر الجزئيات عبر حقل كهربائي متنوع الجهد و تهاجر إلى الالكترود المناسب, **و تعتمد سرعة الهجرة على: الجهد المختلف بين القطبين، شحنة الحموض النووية، المسافة بين الالكترودين، و لزوجة المحاليل (تركيز الهلامة و حجم الثقوب). فبذلك تهاجر القطع الصغيرة (ذات الوزن الجزيئي المنخفض) بسرعة أكبر من هجرة القطع الكبيرة (ذات الوزن الجزيئي المرتفع).**

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين





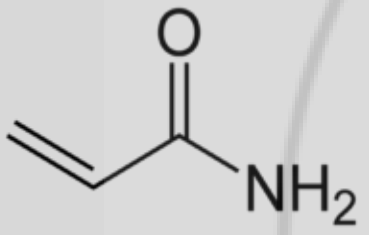


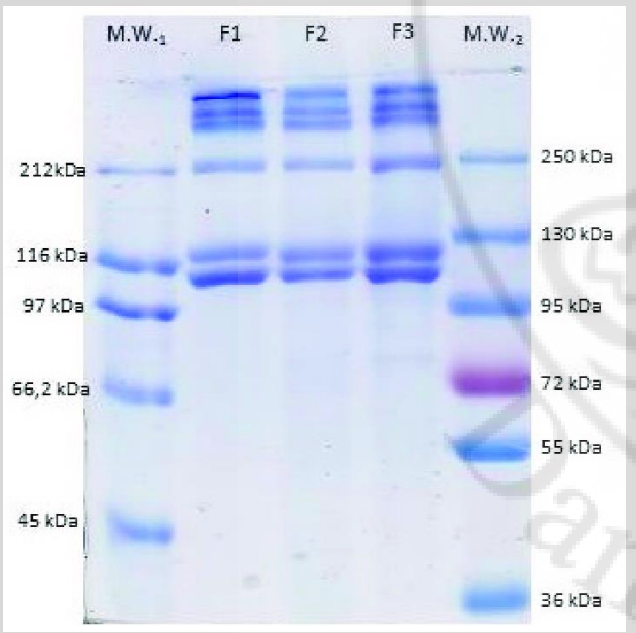
2. الرحلان الكهربائي الهلامي Gel electrophoresis

هلامة الأغاروز

- جزيء الأغاروز عبارة عن متعدد السكاريد الخطي مركب من تكرار وحدة Agarobiose الذي بدوره يتكون من تسلسل للسكر البسيط الغالاكتوز و مستخلص من الطحلب البحري Seaweed
- كما يتميز الأغاروز أيضاً بأنه مادة هشة ضعيفة و تتكسر بسهولة بالتسخين (طورت في عام 1970)
- يترواح تركيز هلامة الأغاروز بين0,7 و 2%.
- تكون المسامات في الهلامة كبيرة في حال التركيز 0,7% و تستخدم لفصل القطع الكبيرة من DNA (Kb 10-5)
- في حين تكون المسامات صغيرة في حال التركيز 2% و تستخدم لفصل القطع الصغيرة من DNA (Kb 1-0.2)
- تستخدم هلامة الأغاروز لإظهار DNA الناتجة عن استخدام أنزيمات القطع, تحديد نقاوة DNA ، فصل قطع DNA أو RNA و تحديد أطوالها.

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين



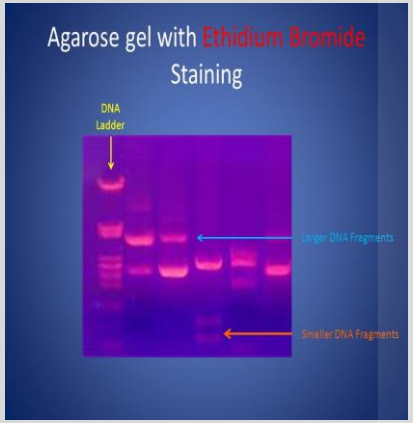


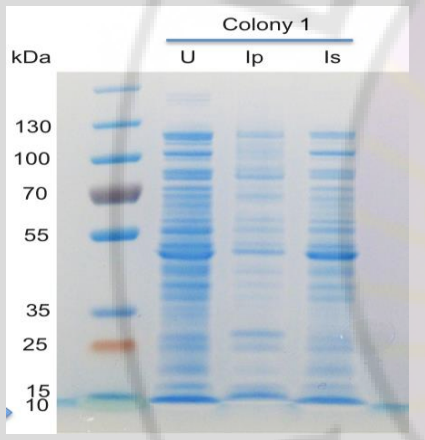
2. الرحلان الكهربائي الهلامي Gel electrophoresis

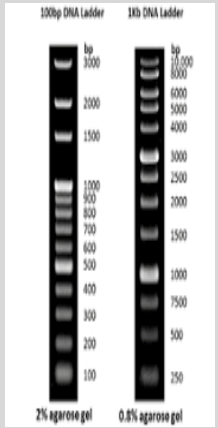
هلامة الأكريلامايد

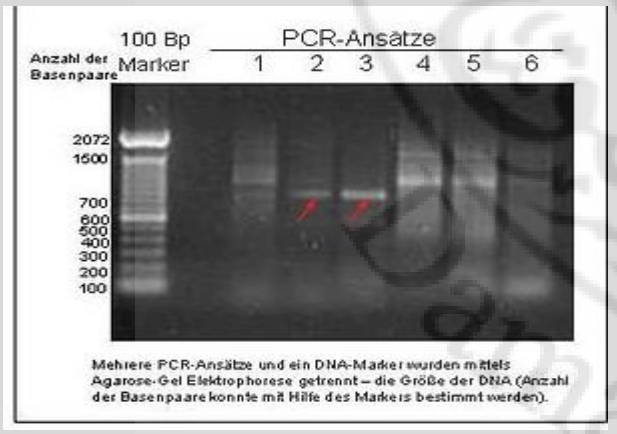
- وصفت هلامة متعدد الأكريلامايد من قبل Raymond and Weintuab عام 1959
- تستخدم هذه الهلامة في فصل جزيئات صغيرة من DNA و يكون ذلك مهماً في عزل القطع التي تختلف في الطول بأساس أزوتي واحد فقط, و ذلك لان حجم مساماتها أصغر و هي أكثر مرونة و تحدد بوضوح الحزم مقارنة بهلامة الأغاروز.
- يتراوح تركيز هلامة متعدد الأكريلامايد بين 3-30%
- و هي تسمح بفصل جزيئات البروتين التي تتراوح أوزانها الجزيئية من 5 إلى2000 KDa
- و تكون الهلامة رقيقة جداً (5 مم أو أقل)
- كما يمكن حفظ هذه الهلامة في الكحول مدة طويلة.
- كما تستخدم هلامة متعدد الأكريلامايد لفصل جزئيات البروتين و متعدد الببتيد و لتحديد تتابع DNA

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين







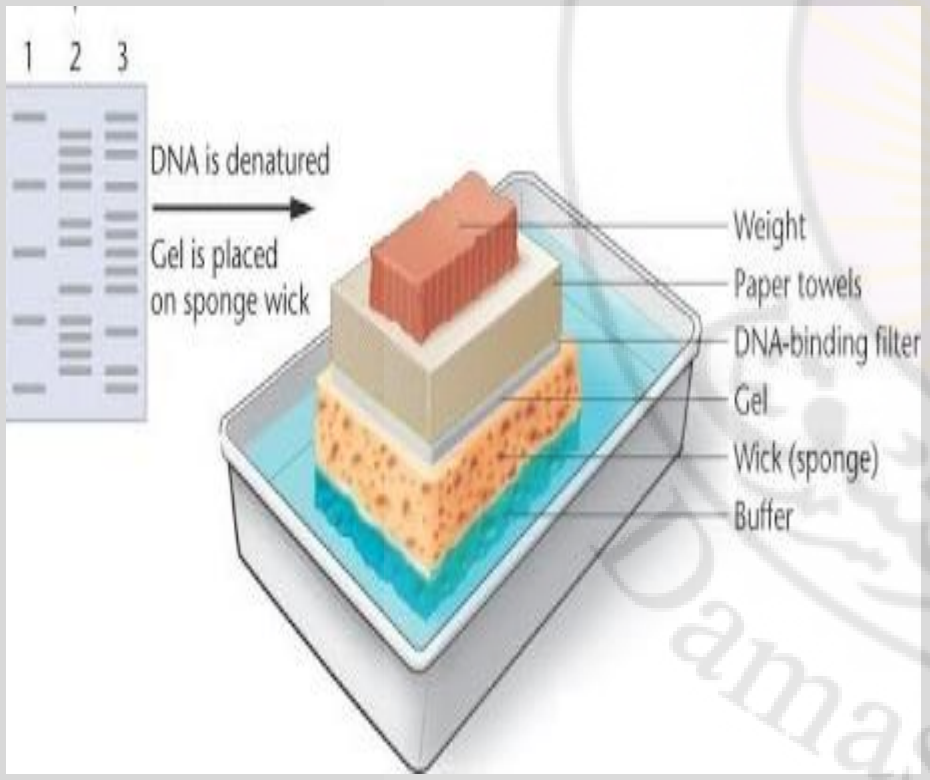


2. الرحلان الكهربائي الهلامي Gel electrophoresis

- يستمر الرحلان الكهربائي حتى وصول الصبغة المرئية المستخدمة (صبغة بروموفينول الزرقاء ذات الوزن الجزيئي 300 bp) إلى نهاية الهلامة (دليل نهاية الرحلان الكهربائي).
- كما يمكن في بعض الأحيان استخدام صبغة Xylene cyanol ذات الوزن الجزيئي 5000bp
- يمكن رؤية الحمض النووي المتوضع على الهلامة بإضافة صبغة الأثيديوم بروماید، التي تتخلل بين الأسس الأزوتية للـ DNA و تتفاعل معها DNA عندئذ ذو وميض وهاج فيسهل تعينها وتصويرها بالأشعة فوق البنفسجيةUV
- و لا بد من إضافة مؤشر يعبر عن الطول الجزيئي (Marker ladder) و هو عبارة عن محلول تجاري يتألف من قطع DNA ذات أطوال معروفة و يستخدم هذا المؤشر للمقارنة

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين

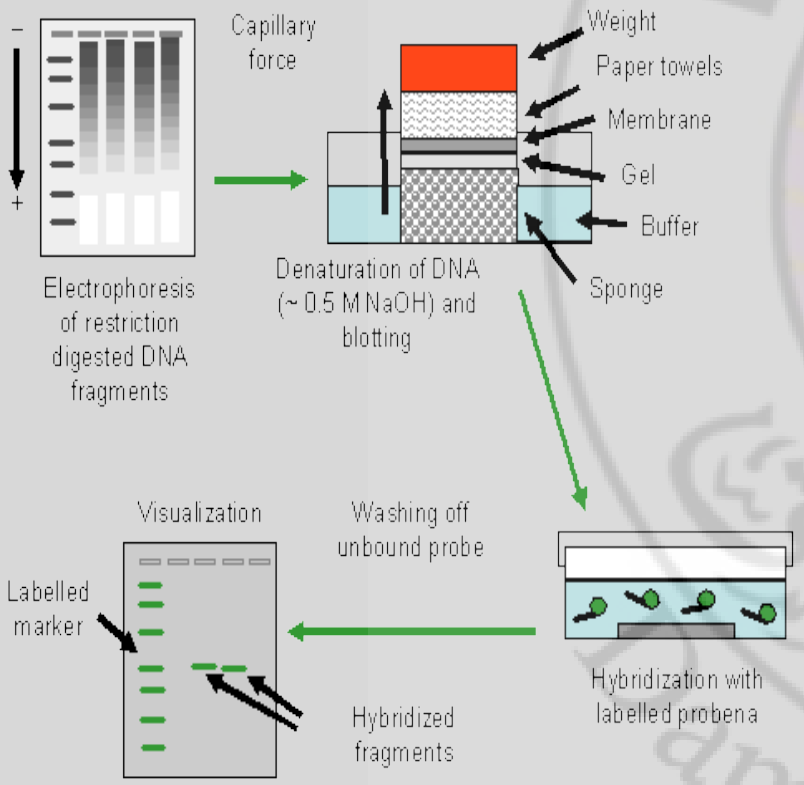
3. نقل الحموض النووية إلى غشاء من النتروسيللوز



- تستخدم هذه الطريقة عند الحاجة إلى توسيم الأحماض النووية بمسابر العناصر المشعة لتحديد طول المورثة وعدد نسخها على المجين.
- من أجل نقل و تثبيت DNA من الهلامة إلى غشاء من النتروسيللوز:

1. تتم معاملة الهلامة على درجة حرارة الغرفة بالمحاليل المخففة مثل (HCl للحصول على قطع كبيرة من DNA لتسهيل عملية النقل)
2. و من ثم توضع في محاليل تحتوي على NaOHو NaClلفصل سلاسل DNA و تحويل هذه القطع من سلسلة مضاعفة double strandsإلى سلسلة مفردة Single strands
3. تنقل الهلامة إلى وعاء يحتوي على محلول النقل و يوضع غشاء النتروسيللوز فوق الهلامة مدة 12 ساعة و ينتقل بالتالي DNA إلى الغشاء عن طريق الخاصة الشعرية.
4. يتم DNA بوضعه مدة ساعتين على درجة حرارة 80°م.

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين



4. التهجين الجزيئي و التوسيم الإشعاعي للحموض النووية

- تكمن أهم مشكلة تواجه أي برنامج لعمليات التنسيل، في الحفاظ على إمكانية تعقب الكمية القليلة من الحمض النووي المستخدم لأن فقدان أي جزء من هذه المادة يعني التناقص في العمل بعد كل خطوة.
- توجد طريقة لتعقب المادة النووية و تتضمن توسيمها (Hybridization) بوساطة جزيء نشط إشعاعياً (عادةً يستخدم النيكليوزيد ثلاثي الفوسفات dNTP) بتوسيم أحد العناصر, H3أو P32الموجودة في بنية النيكليوزيد حيث تستخدم تلك العناصر لأنها ذات طاقة عالية.
- و بذلك يمكن قياس النشاط الإشعاعي بوساطة مقياس إشعاعي لغرض تحديد كمية الحمض النووي ذو النشاط الإشعاعي العالي ضمن تجارب التهجين و يعرف هذا الجزيء بالمسبار النشط إشعاعياً Radioactive probe
- من بعض الطرق المعروفة في توسيم الحموض النووية: التوسيم الطرفي، الترجمة المتممة Nick translationو التوسيم عن طريق استطالة البادىء Primer extension.

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين

5. التهجين المسبق و التهجين فوق المرشحات

- يتوضع محلول التهجين المسبق في المواقع الحرة على غشاء النتروسيللوز و هذا يمنع التثبيت اللانوعي للمسبار(Blocking) .
- و من ثم تفصل سلاسل DNA المزدوجة للمسبار المعلم إشعاعياً عن طريق التسخين بدرجة حرارة 100°م و تضاف إلى الغشاء.
- يجرى التهجين بدرجة حرارة تتراوح بين 65°م و 85°م لعدة ساعات لفسح المجال في تشكيل الازدواج الملائم
- و يمكن تقدير درجة التهجين باستخدام مقياس طيف وميضي Scintillation spectrometer
- يوضع الغشاء في قارورة زجاجية في فرن التهجين مدة 16 ساعة تحت تأثير الرج الخفيف.

6. الغسيل و التصوير الإشعاعي الذاتي للمرشحات

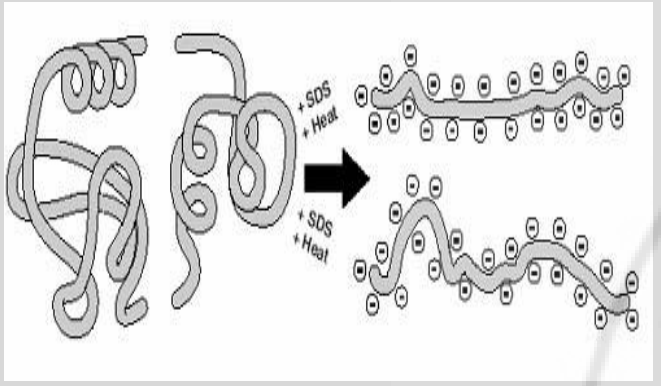
- يتم الغسيل من أجل نزع المسبار غير المهجن و إزالة التهجين اللانوعي
- ثم توضع المرشحات النتروسيللوزية في حقيبة بلاستيكية و توضع في علبة بتماس مع فيلم أشعة X لإنتاج الصورة الذاتية autoradiogram.
- تسمى العملية بالتصوير الإشعاعي الذاتي حيث تظهر عصبات فاتحة اللون على خلفية غامقة في مواضع تتفق مع أوزانها الجزيئية و يمكن مقارنة أطوال هذه الحزم مع أجزاء DNA قياسية توضع كمعلمات في بئر ثاني.
- **و يستفاد من تقانة southern blot لتحديد أطوال المورثات و قطع الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين و عدد نسخ هذه المورثة في المجين.**

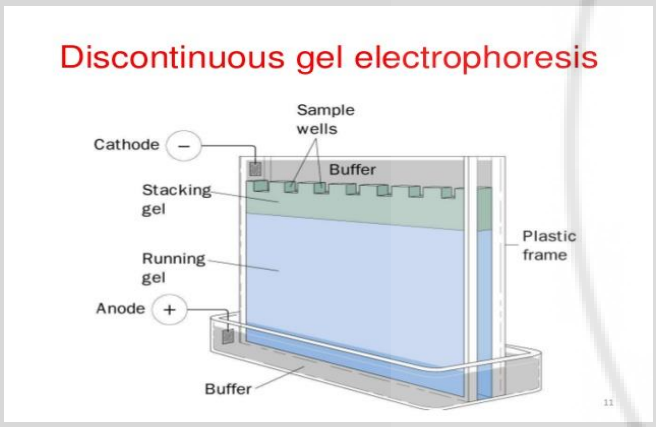
المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين

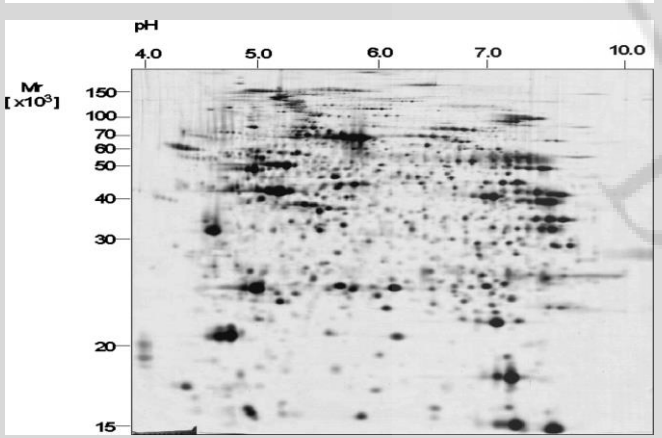
تقانة Northern blot (خاصة لـ RNA)

- يفصل **RNA** بالرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز إلى قطع مختلفة الحجم
- تنقل قطع **RNA** مفردة السلسلة بعد ذلك من الأغاروز إلى غشاء ذو نوعية خاصة Membrane و تدعى هذه العملية بتبقع Northern
- يهجن RNA مع مسابر من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين الموسومة بالفوسفور المشع p32.
- **و يستفاد من تقانة Northern blot في تحديد أماكن نسخ المورثة و التعبير المورثي**

Damascus University







المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين

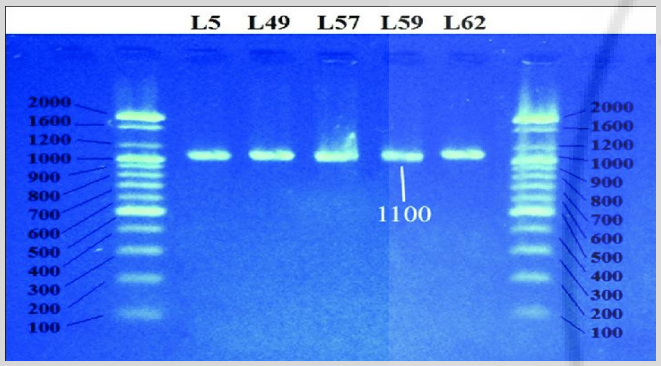
تقانة Western blot (خاصة البروتينات)

- تعتمد هذه الطريقة على استخدام الطريقة المناعية لفحص الناتج البروتيني للمورثة المنسلة في عينة أو مستخلص ما كبديل عن طريقة الفحص بمسابر الحموض النووية.
- يتم الفصل على هلامة متعدد الأكريلامايد ولها نوعان:

1. Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis SDS-PAGE
2. PAGE ثنائي الأبعاد Discontinuous electrophoresis: إنها تقنية مستخدمة على نطاق واسع لفصل البروتينات حسب الحجم والشحنة

- تحافظ مادة SDSعلى سلسلة البروتينات في حالة مفككة (denatured state) مثل تحويل الروابط ثنائية الكبريت S-Sإلى SHو SH و بذلك يسمح لفصل البروتينات حسب وزنهم الجزيئي.
- كما تقوم هذه المادة بشحن البروتينات بالشحنة السالبة ونقلها إلى القطب الكهربائي الموجب

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين



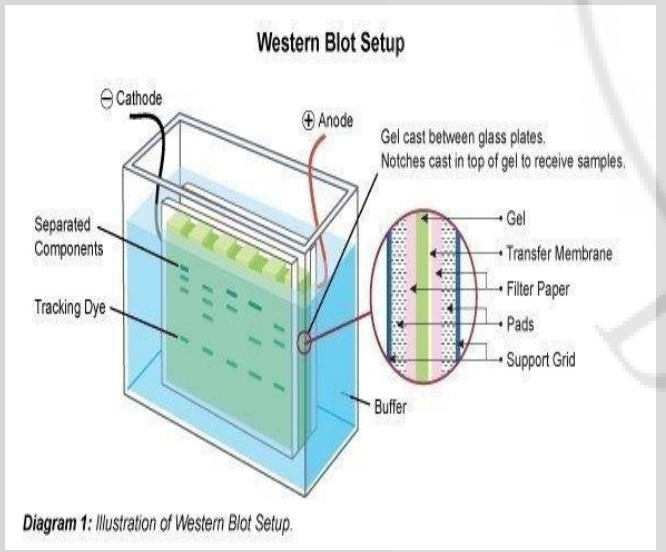


Diagram 1: Illustration of Western Blot Setup.

تقانة Western blot (خاصة البروتينات)

- يمكن رؤية البروتينات المتوضعة على الهلامة بإضافة صبغة أزرق الكوماسي فتظهر البروتينات بشكل حزم ملونة باللون الأزرق (Coomassie Blue)، كما يمكن استخدام التلوين بنترات الفضة عندما يكون التلوين بأزرق الكوماسي غير فعال.
- و لا بد من إضافة مؤشر يعبر عن الطول الجزيئي *KDa*.
- ثم يتم نقل البروتينات باستخدام تيار كهربائي لسحب البروتينات (electrophoresis) من الهلام إلى غشاء مصنوع من النيتروسيليوز بالخاصية الشعرية Capillary action
- إن التصاق البروتينات على الغشاء بسبب تفاعلات كارهة للماء hydrophobic interactions، بالإضافة إلى التفاعلات المشحونة بين الغشاء والبروتين
- يمكن التأكد من نقل البروتين إلى الغشاء بصبغ الغشاء بصبغة أحمر البونسو Ponceau S.

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين

تقانة Western blot (خاصة البروتينات)

- يتم التحقق من وجود البروتين المطلوب على الغشاء عن طريق إضافة جسم مضاد معدل مرتبط بإنزيم ما و يكون هذا جزءاً من الإستجابة المناعية.
- بعد حضن الغشاء في محلول مخفف من البروتين - عادة ما يكون هذا البروتين هو ألبومين مصل البقر Bovine Serum Albuminالمعروف برمز BSAأو حليب مسحوب الدسم مع مقدار صغير من منظف مثل توين 20 Tweenو من الجسم المضاد الأولي (عادة بتركيز بين 0,5 ميكروغرام/مل إلى 5 ميكروغرام/مل) مع التحريك الخفيف.
- بعد ذلك لا بد من غسل الغشاء لإزالة الأجسام المضادة الأولية غير ملتصقة، يتم إضافة جسم مضاد آخر للغشاء، موجه نحو جزء الجسم المضاد الأولي، وهذا يعرف بالجسم المضاد الثانوي، و بسبب خواصه المستهدِفة و عادة ما يكون الجسم المضاد الثانوي مرتبط بجزيئية بيوتين أو إلى إنزيم مثل فسفاتاز قلوي alkaline phosphataseأو بيروكسيداز.
- ثم ستلتصق أن عدة أجسام مضادة ثانوية بجسم مضاد أولي واحد وتقوم بتعزيز الكشف عن البروتين.
- و يتم الكشف عن وجود البروتين و غيابه بإحدى الطرائق التالية: الكشف اللوني Colorimetric detectionو الإضاءة الكيميائية Chemiluminescenceو الكشف المشع Radioactive detectionو الكشف الفلوري . Fluorescent detection
- **يستفاد من تقانة Western blotفي تحديد الوزن الجزيئي للبروتين و تمركز البروتين في المتعضيات**

Damascus University

المحاضرة الأولى
تقنيات الكشف عن المجين

استخلاص و تنقية قطعة الحمض الريبي DNAمن هلامة الأغاروز

- تحتاج معظم أبحاث الهندسة الوراثية إلى استخلاص تسلسل محدد من DNA ، و بالأخص تلك التي تهدف إلى المعرفة الدقيقة لتركيب مورثة ما، أو جزء منها ضمن الذخيرة الوراثية للكائن الحي، أو لعمليات التنسيل الجيني المختلفة
- و لهذا الغرض يتم استخلاص الحمض DNA المعني من خلايا الكائنات الحية المختلفة ومن ثم يقطع بأنزيمات القطع.
- يلي ذلك إجراء الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز لكمية محددة من DNA حتى يتسنى معرفة حجم القطع و من ثم تعيين المطلوب منها بالمقارنة مع الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين الشاهد (يحدد طوله بـالكيلو بازKbp).
- يتم بعد تحديد القطع قطع هلامة الأغاروز بمشرط حاد بحيث تكون قطعة DNA بداخلها ليتم وزنها بدقة (يفضل أن لا يزيد وزن هلامة الأغاروز المحتوية على DNA عن mg300 حتى يتم إذابتها في المحلول المعد لهذا الغرض)
- و بعد ذلك يتم ترسيب DNA .

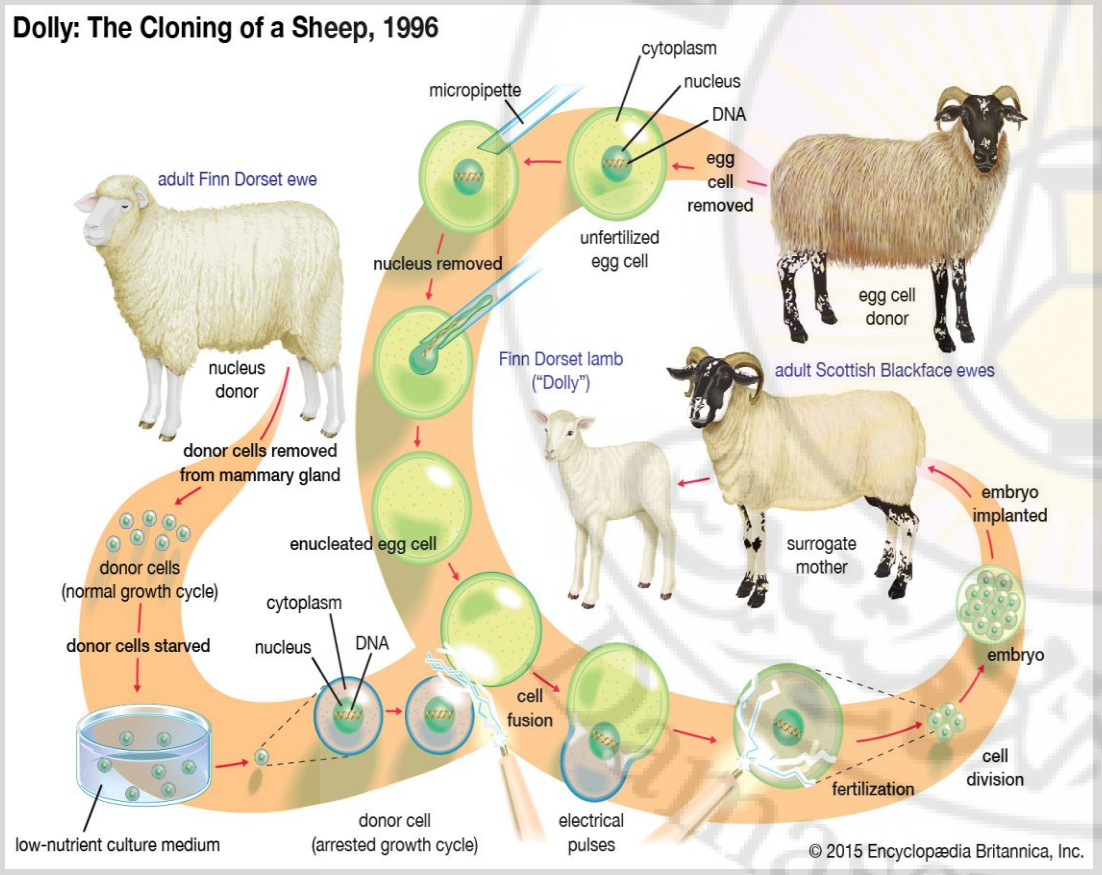
Damascus University

مقرر التقانات الحيوية
(الجزء النظري)
السنة الثانية، قسم المحاصيل الحقلية

د. نور علي

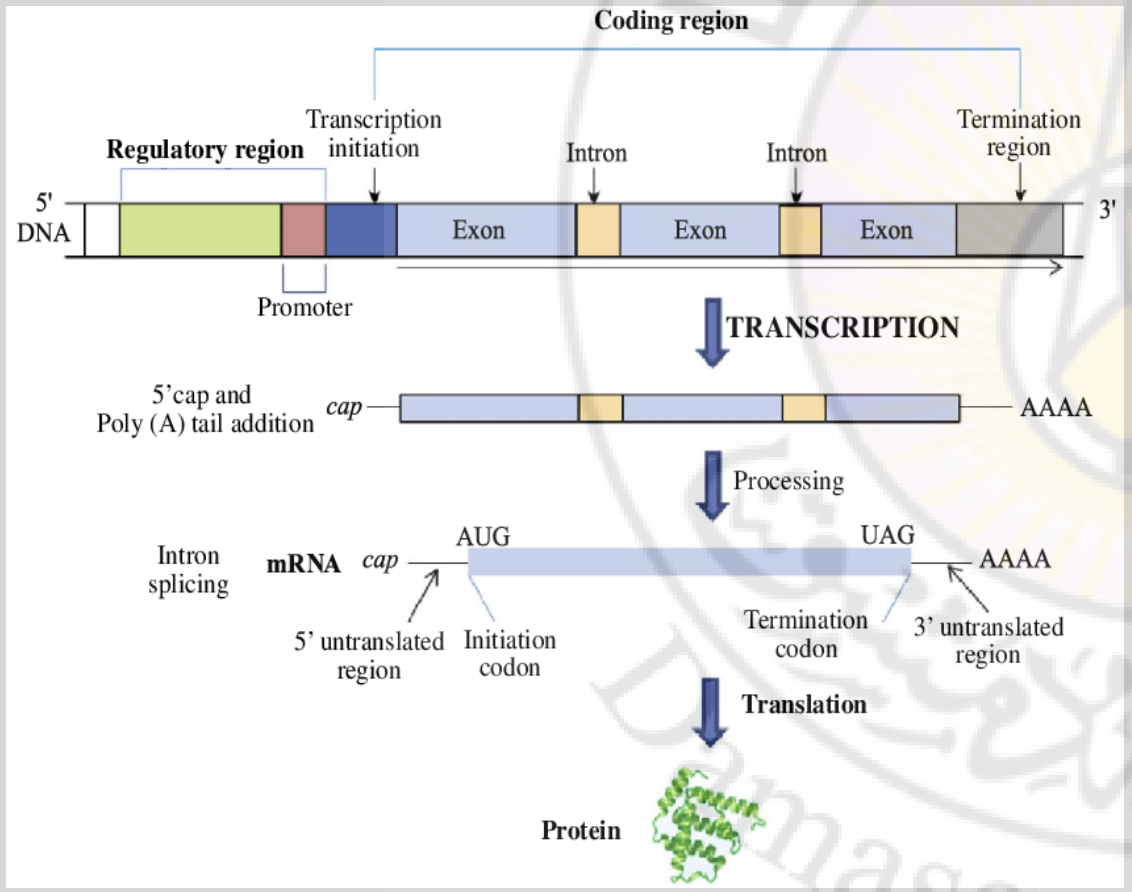
مدرس في قسم المحاصيل الحقلية

المحاضرة الثانية
التنسيل أو الاستنساخ Cloning



- الاستنساخ هو عملية إنتاج أفراد بحمض نووي متطابق أو متطابق تقريبًا ، إما بشكل طبيعي أو اصطناعي.
- في الطبيعة ، تنتج العديد من الكائنات المستنسخة من خلال التكاثر اللاجنسي.
- يشير الاستنساخ في التكنولوجيا الحيوية إلى عملية إنشاء نسخ من كائنات حية أو نسخ من الخلايا أو أجزاء من الحمض النووي (الاستنساخ الجزيئي).

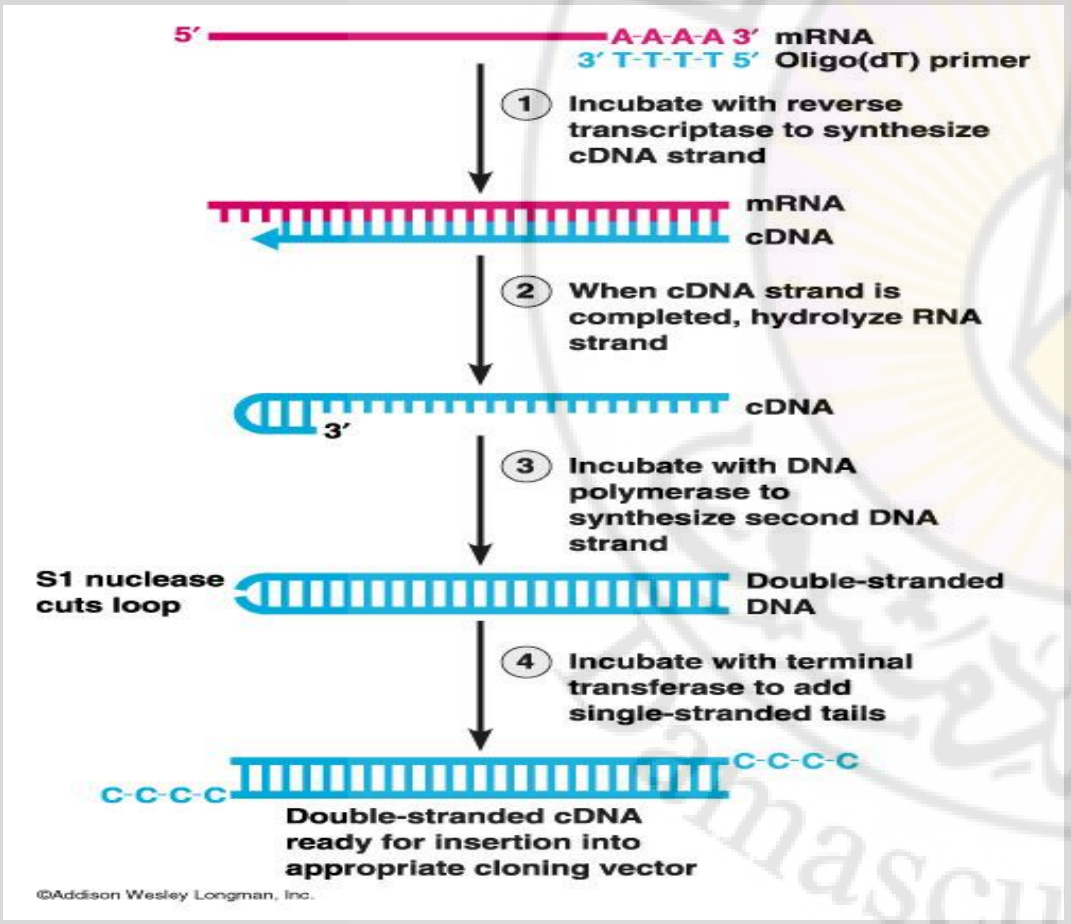
المحاضرة الثانية
التنسيل أو الاستنساخ Cloning



- على الرغم من أن DNA يمثل كامل الذخيرة الوراثية للكائن الحي فإنه من الممكن أن يحتوي على الانترونات (قطع DNA غير المشفر)، مناطق السيطرة (Control Regions)، و تتابعات التكرار (Repetitive Sequences).
- إن وجود تلك القطع أو المناطق يمكن أن تؤدي إلى حدوث بعض الصعوبات في عملية التنسيل, و بشكل خاص إذا كانت الذخيرة الوراثية كبيرة و كان الهدف هو عزل نسخة مفردة من المورثة.

Damascus University

المحاضرة الثانية
التنسيل أو الاستنساخ Cloning



التنسيل من mRNA بناء cDNA:

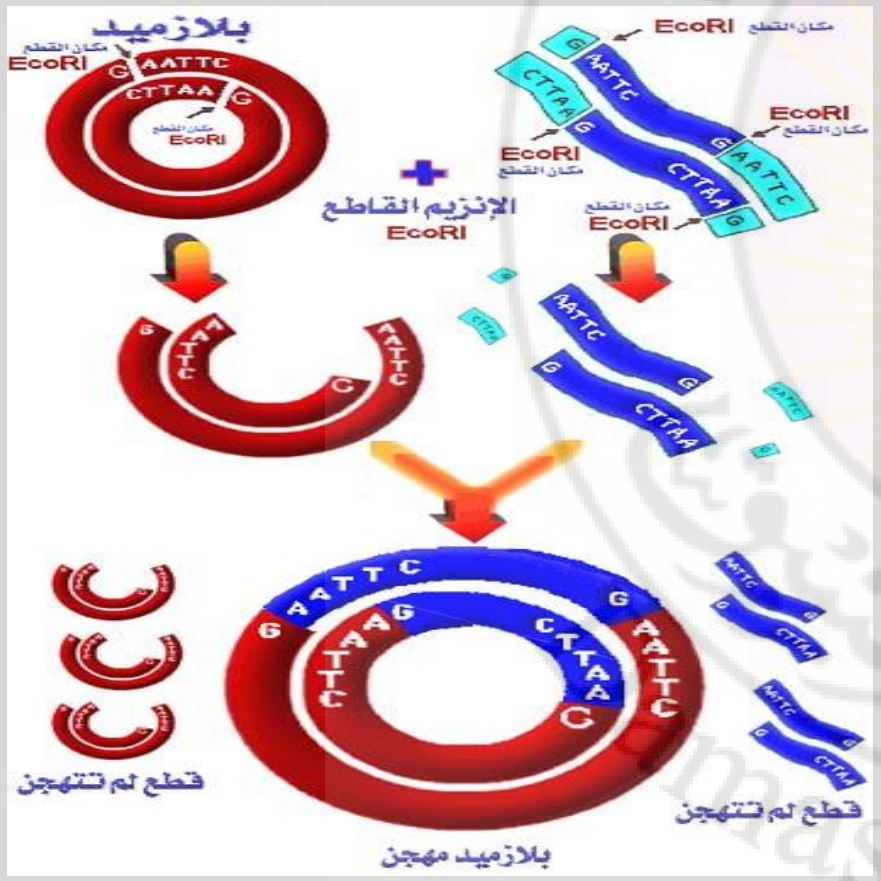
- لا يمكن تنسيل RNAm مباشرة لذا يجب تحويله إلى DNA قبل البدء في عملية التنسيل.
- يحوي mRNA النقي دائماً على ذيل مؤلف من متعددات A بالنهاية '3 ، و يهجن هذا الطرف مع قطع من DNA الصنعية تحوي متعددات T التي تعمل كبادىء لاصطناع سلسلة DNA .
- و من ثم يخلط mRNA مع dNTPs بالإضافة لأنزيم النسخ العكسي الذي يحفز اصطناع سلسلة DNA المكملة لسلسلة mRNA.
- يمكن إزالة mRNA بوساطة الاماهة القلوية
- فيما بعد يتم تحويل cDNA المفرد السلسلة إلى سلسلة مزدوجة و ذلك باستخدام أنزيم DNA-polymerase
- يتم توليد البادىء ('3 – OH) ضمن بناء السلسلة الثانية و ذلك عن طريق مناطق قصيرة تشبه رأس الدبوس و التي تتشكل في نهاية DNAمضاعف السلسلة.
- يشذب cDNA مضاعف السلسلة بعد بناء السلسلة الثانية بوساطة أنزيم (S1 nuclease) ليعطي جزيئة ذات نهاية مسطحة نشطة يمكن فيما بعد تنسيلها ضمن ناقل ملائم.

المحاضرة الثانية
التنسيل أو الاستنساخ Cloning

خطوات التنسيل

- تدخل القطعة المراد نسخها (المورثة) في إحدى النواقل الوراثية (البكتريوفاج، خمائر, بلاسميد أو غيرها) المعروفة بقدرتها على التضاعف الذاتي.
- بغض النظر عن نوع الناقل الوراثي المستخدم فان طريقة إدخال قطعة DNA المراد نسخها إلى الناقل تقريباً واحدة و لا يختلف تنسيل cDNA بنواقل بكترية أو فاجية كقاعدة عامة، عن تنسيل أي قطعة أخرى من DNA .
- علماً بأنه لا توجد طريقة تنسيل واحدة تستطيع تغطية جميع الاحتياجات.

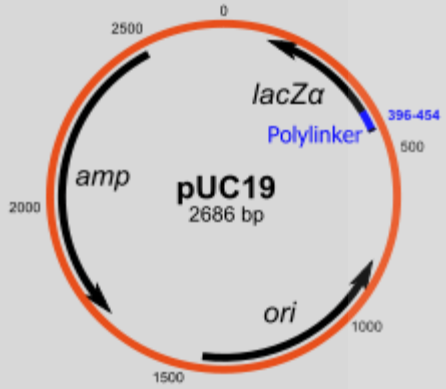
المحاضرة الثانية
التنسيل أو الاستنساخ Cloning

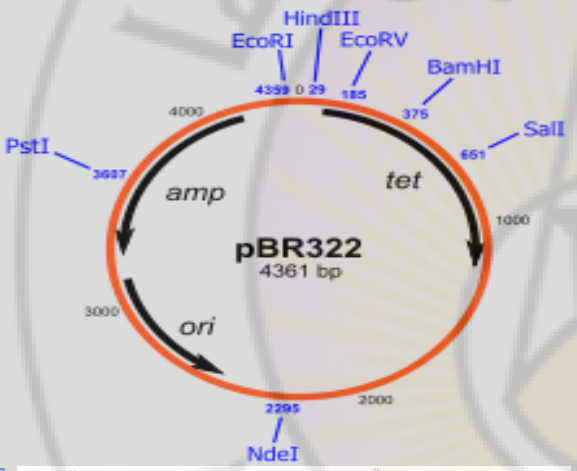


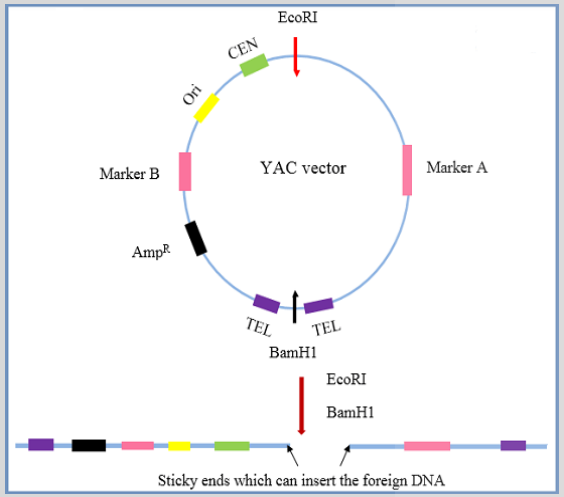
1. **تصميم القطع المهجنة من DNA**

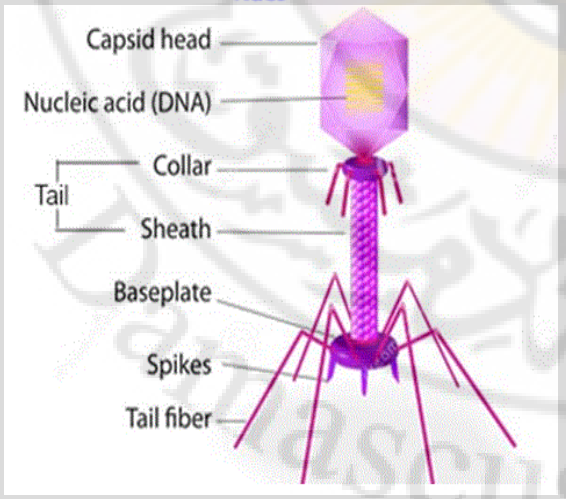
- يضاف إلى قطعة DNA إنزيم قطع محدد و ليكن مثلاً إنزيم (أ) فيقوم هذا الإنزيم بقطع DNA في مكان محدد حسب التسلسل الخاص به و يضاف الإنزيم نفسه للناقل و الذي يقوم بقطعه أيضاً في نفس التسلسل
- من ثم تضاف القطع المراد نسخها (DNA) بعد قطعها بالإنزيم القاطع إلى الناقل المقطّع فتتداخل التسلسلات النووية بين الناقل و بين قطع DNA المراد نسخها.
- و ينتج قطعة مهجنة من الناقل و بداخله القطعة المراد نسخها (مورثة).
- يضاف إنزيم الوصل أو الربط (Ligase) لربط قطعة DNA مع البلاسميد

المحاضرة الثانية
التنسيل أو الاستنساخ Cloning







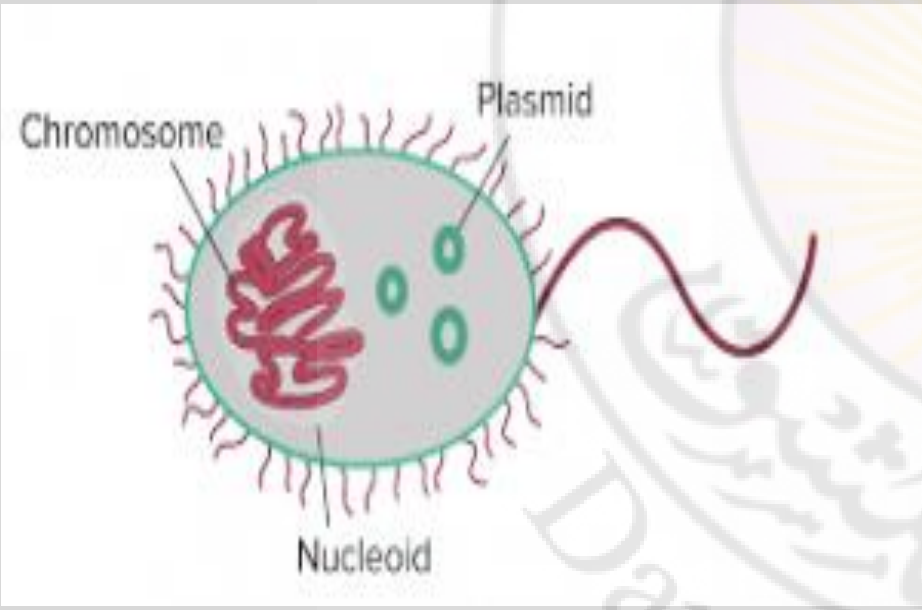


النواقل و انواعها

- النواقل هي في الغالب فيروسات أو بلاسميدات كما أن هناك أنواع مصنعة تستخدم في المختبرات الطبية.
- إن أكثر النواقل استخداماً هي البلاسميد و لكن يمكن استخدام الفاج أو الياك أو أي ناقل أخر و الذي يحدد نوع الناقل المراد استخدامه هو في العادة كبر القطعة المراد استنساخها.
- ففي حالة القطع الصغيرة يستخدم البلاسميد أو الفاج بينما يستخدم YAC أو BAC في حالة القطع الكبيرة من DNA

المحاضرة الثانية
التنسيل أو الاستنساخ Cloning

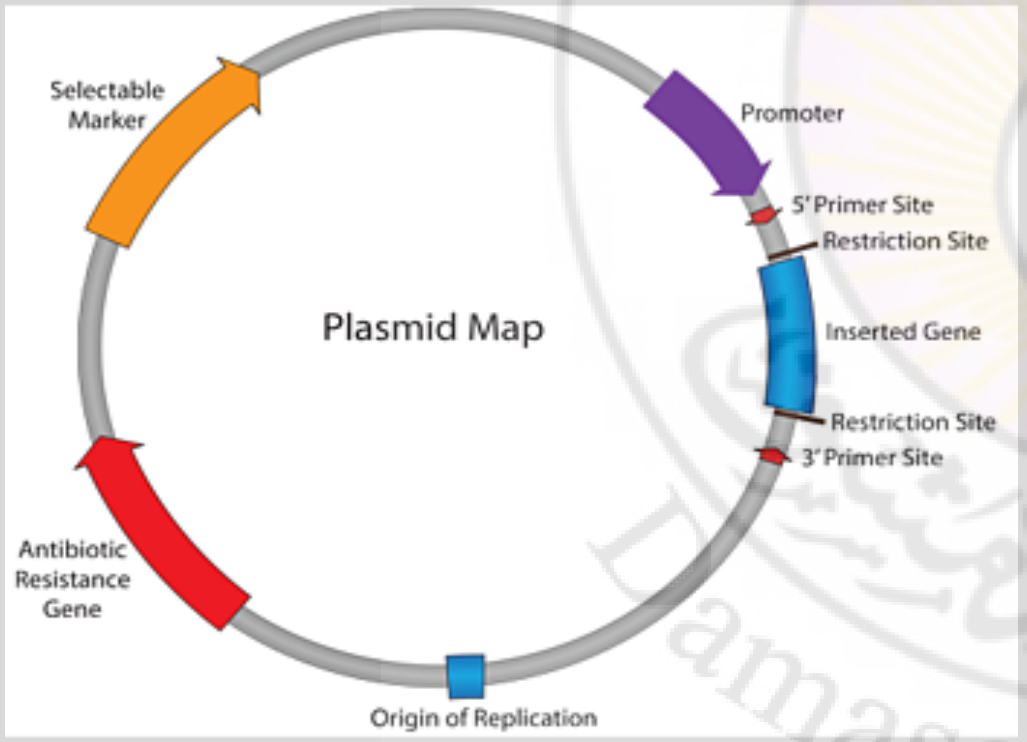
النواقل البلاسميدية المستخدمة في بكتريا E. coli



- البلاسميدات هي عبارة عن جزيئات DNA شبيهة بالفيروسات الصغيرة و لكنها لا تحتوي على غلاف من البروتين.
- تتكون البلاسميدات من جزيئات من DNA، مضاعفة السلسلة، حلقية، و تكون نسبياً صغيرة بالمقارنة مع صبغي الخلية و غالباً موجودة في حالة صبغي إضافي Extrachomosomal.
- تتميز البلاسميدات بقدرتها على التضاعف الذاتي و بمعزل عن بقية الصبغيات الموجودة في الخلية و ذلك لاحتوائها على وحدة التضاعف الذاتي (وهي تسلسل نوعي من DNA مؤلف من 50-100 pb و موجودة ضمن البلاسميد).

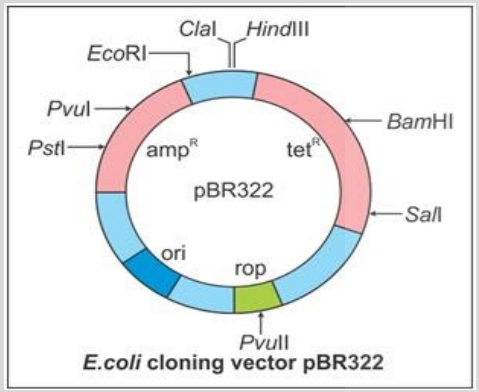
المحاضرة الثانية
التنسيل أو الاستنساخ Cloning

النواقل البلاسميدية المستخدمة في بكتريا E. coli

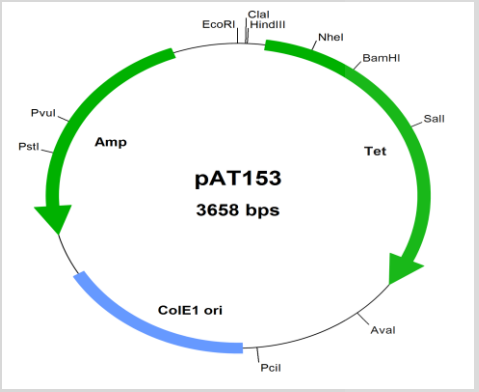


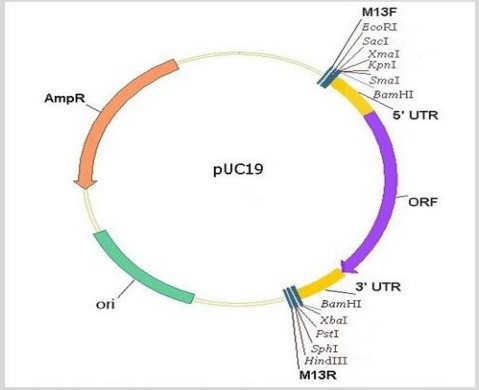
- بالإضافة إلى ذلك فهناك كثير من المورثات التي قد تكون على البلاسميد و هي مفيدة للعلماء في عملية نسخ المورثات، فمثلاً يوجد على البلاسميد مورثة خاصة تكافح المضادات الحيوية Antibiotics كالأمبيسيلين و التتراسيكلين و البنسلين و الكاناميسين و الكلوروموفينيوكول).
- تساعد هذه المورثات الحامية من المضادات الحيوية في التعرف على البكتيريا التي تحتوي على البلاسميد الذي يحمل المورثة الذي نود استنساخها و عزلها.
- كما تمتلك البلاسميدات أيضاً منطقة التنسيل المتعددة (أماكن وجود إنزيمات القطع) و يتم في هذه المنطقة إدخال DNA الغريب
- يوجد بلاسميدات تستطيع التكاثر داخل البكتيريا و الخميرة في آن واحد.

المحاضرة الثانية
التنسيل أو الاستنساخ Cloning



E.coli cloning vector pBR322





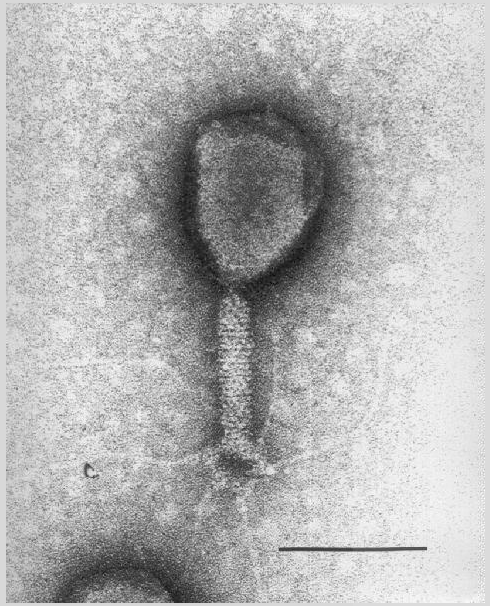
النواقل البلاسميدية المستخدمة في بكتريا E. coli

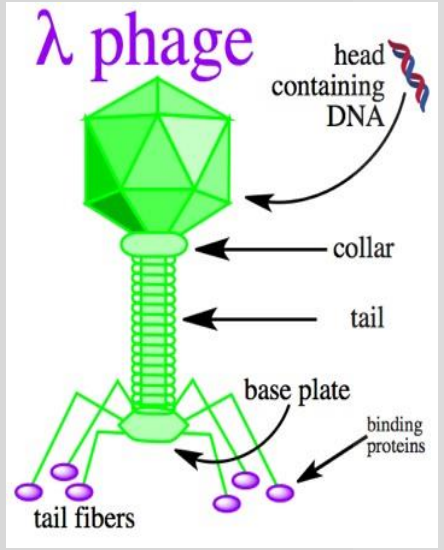
- و من البلاسميدات شائعة الاستخدام:

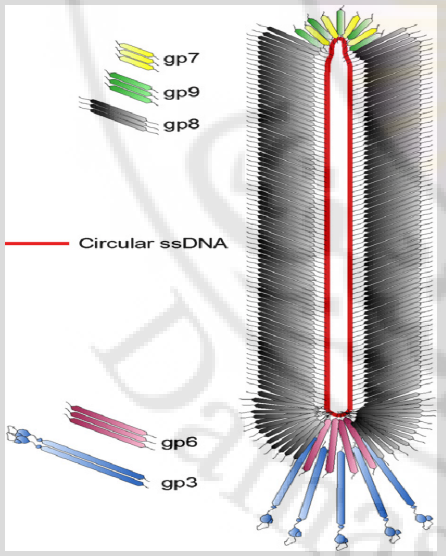
1. البلاسميد pBR322 و pAT153 (يمتلك سمات الناقل الجيد، مثل الوزن الجزيئي المنخفض، و مورثات مقاومة للمضادات الحيوية مثل الأمبيسيلين و التتراسيكلين Tcr, Apr, بالإضافة إلى عدة مواقع أحادية القطع)
2. سلسلة بلاسميدات العائلة البلاسميدية pUC (حيث تمتلك هذه البلاسميدات منطقة تحتوي على عدة مواقع قطع مفردة لإنزيم الأندونيوكلياز ضمن امتداد قصير للـ DNA و التي تكون مفيدة بسبب إمكانية الاختيار للموقع القابل لإدخال قطع DNA)

- على الرغم من امتلاك النواقل البلاسميدية بالعديد من الخواص المفيدة, فهي تمتلك أيضاً عدد من السلبيات، و أحد أهم هذه السلبيات هو حجم قطعة DNA التي يمكن إدخالها إلى البلاسميدات، و التي تكون بأقصى مدى 5 kb من DNA على الأكثر و التي تؤثر بشدة على فعالية التنسيل.
- في بعض التطبيقات فأنه من المهم زيادة حجم القطع التي يمكن تنسيلها و يحتاج مثل هذا النوع من العمل لنواقل لها القابلية لاستقبال قطع أكبر من DNA و منها الفاج البكتيري لميدا Bacteriophage lambda

المحاضرة الثانية
التنسيل أو الاستنساخ Cloning







M13 Phage

الفاجات البكتيرية

- هي ببساطة فيروسات آكلات البكتيريا و تعتمد في توالدها (تضاعفها) على البكتيريا.
- تصنف الفاجات تركيبياً ضمن ثلاث مجموعات رئيسية:
  - عديمة الذنب: (غير مذنبة) Tailless.
  - المذنبة (Head and tail): بحيث يوجد الرأس (الحاوي على DNA الفيروسي) مع الذنب (يستخدم لإصابة الخلايا المضيفة *E. coli*).
  - خيطية Filamentous
- بالرغم من أن النواقل التي بنيت على أساس الفاجات البكتيرية هي أكثر تخصصاً من النواقل البلاسميدية, إلا أنها متشابهة معها في الوظيفة من الناحية الجوهرية, أي أنها تعمل كحاملة لقطع جزيئات DNA و قد طور بشكل واسع نوعان من الفاجات البكتيرية (M13 -λ) (لمبيدا فاج أو Lambda phage) لأغراض التنسيل.

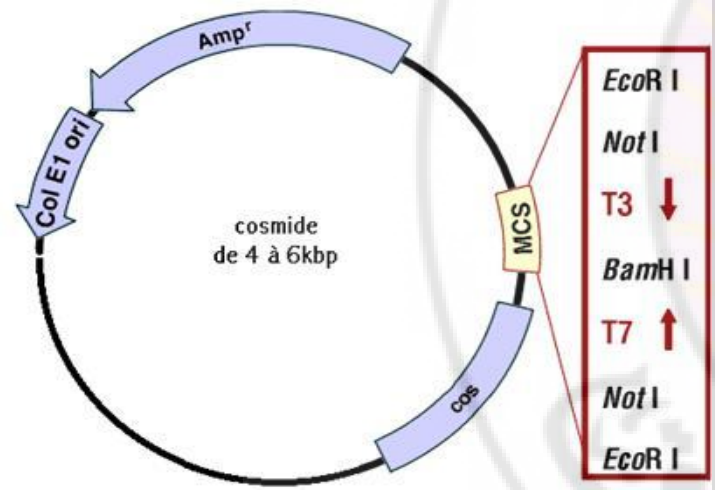
المحاضرة الثانية
التنسيل أو الاستنساخ Cloning

الفاجات البكتيرية

- تعد الفاجات أفضل من البلاسميدات للأسباب الآتية:

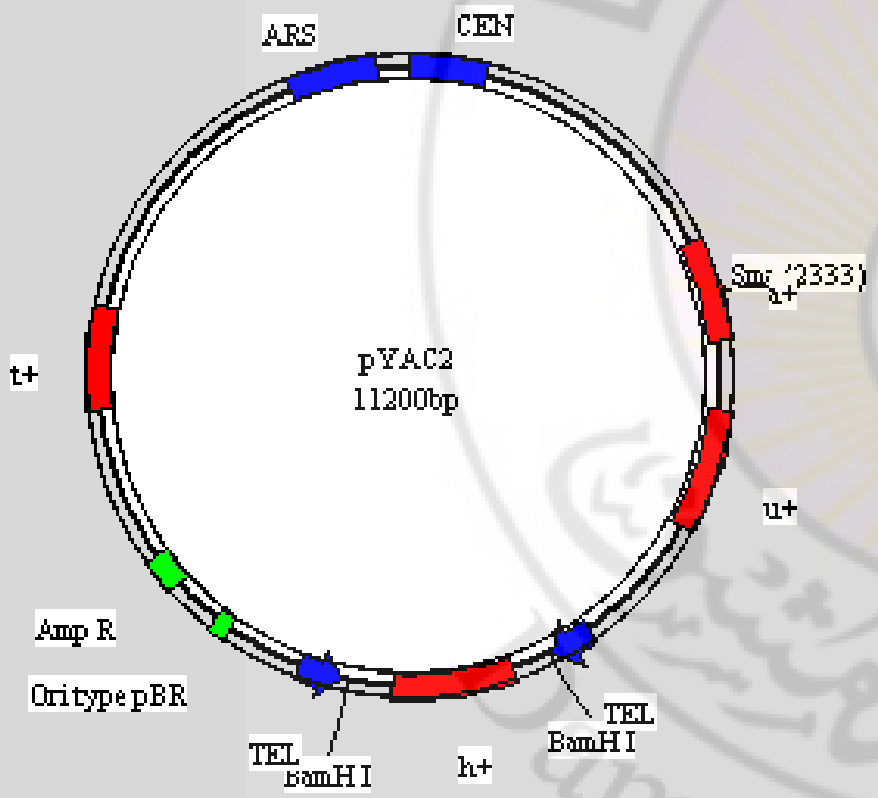
1. تستطيع الفاجات إصابة الخلايا بفعالية أكبر من البلاسميدات.
2. معدل ظهور المستعمرات عادةً يكون أعلى.
3. تعود فعالية الفاج δ لأنها تستخدم في بناء المكتبات الوراثية.

لقد حوّرت هذه النواقل لكي تستطيع حمل أكبر كمية من DNA فعلى سبيل المثال الكوسميد Cosmids عبارة عن تهجين جزء من فاج ليمبدا مع البلاسميد و بذلك تكون ملائمة لتنسيل قطع DNA لما يقرب 47 كيلوباز (kb) في الطول



ori: منطقة التضاعف الذاتي.
ampR: مورثة تكافح المضاد الحيوي.
COS: مورثة β_galactosidase و التي ترمز لنفس الإنزيم بيتا غالاكتوزيداز.
MCS: منطقة إنزيمات القطع.

المحاضرة الثانية
التنسيل أو الاستنساخ Cloning

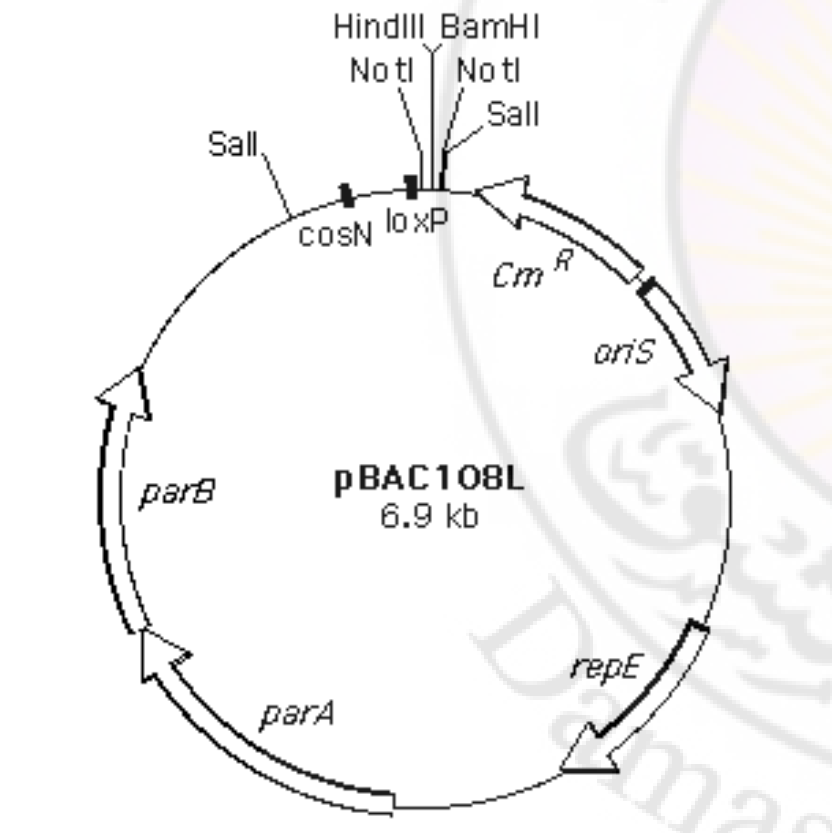


النواقل الصبغية الصنعية Artificial Chromosomes

1. **صبغي الخميرة الصنعي YAC(/Yeast Artificial Chromosomes)**

- يستطيع هذا الناقل نقل قطعة كبيرة من DNA أكبر من 500 كيلوباز (500 kb) و هو عبارة عن قطعة من DNA مترابطة و تحتوي على:
- طرفي الصبغي(Telomeres 2)
- و الجزيء المركزي للصبغي (Centromere)
- و مركز للتضاعف الذاتي (Autonomous replicating sequence ARS).
- و يمكن استخدامه من أجل تنسيل قطع كبيرة جداً من DNA و لإنتاج مكتبة وراثية لكائن حي ما.

المحاضرة الثانية
التنسيل أو الاستنساخ Cloning



النواقل الصبغية الصنعية Artificial Chromosomes

2. صبغي البكتريا الصنعي

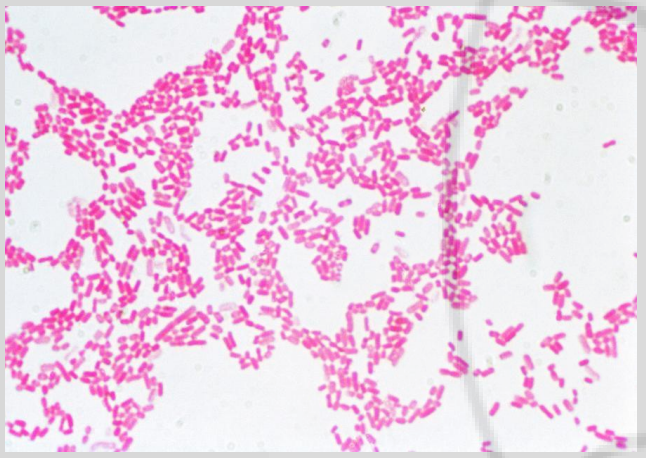
BAC (Bacterial Artificial Chromosomes)

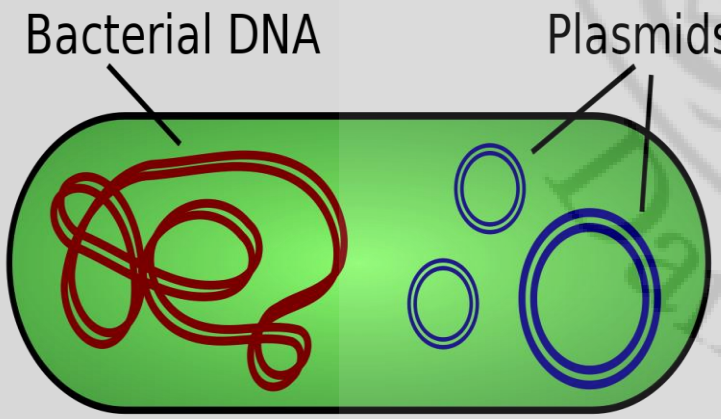
- يستطيع هذا الناقل حمل حتى 150 كيلوباز
- (هو عبارة عن تحوير للبلاسميد المعروف بعامل تكاثر بكتيريا E. coli

(Fertility plasmid-factor)

Damascus University

المحاضرة الثانية
التنسيل أو الاستنساخ Cloning



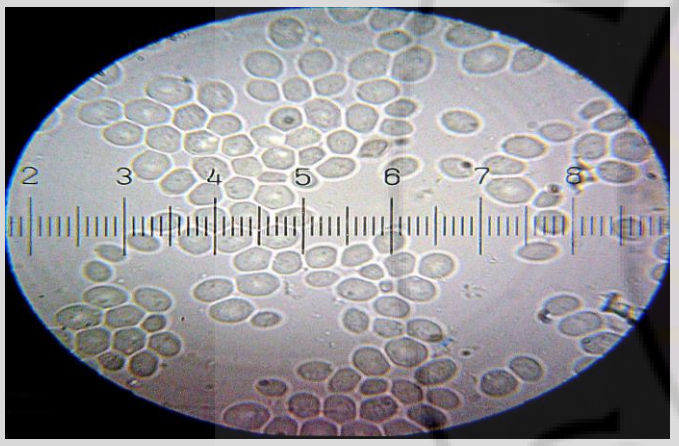


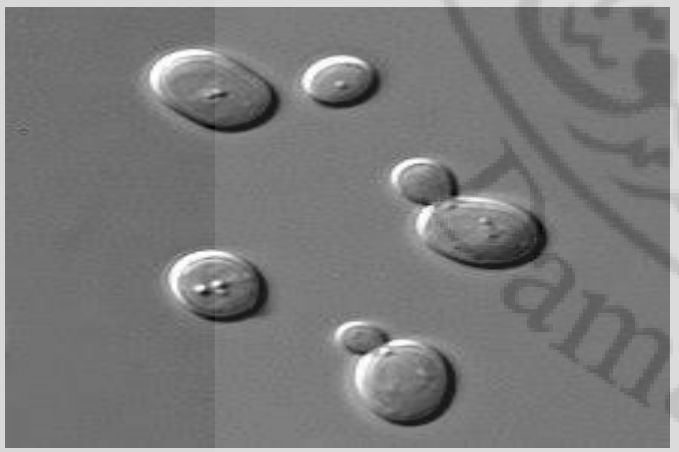
2. نقل القطعة المهجنة المحمولة داخل الناقل إلى خلية حية

1. خلايا بدائيات النوى المضيفة Prokaryotic hosts

- خلايا سهلة الاستخدام و لها القابلية العالية على التكاثر وتتضمن سلالات متنوعة و معروفة وراثياً و كذلك مدى إمكانيتها في استقبال النواقل.
- تستخدم الخلايا البكتيرية و خاصة خلايا *E. coli* و هي خلايا غير مميزة النواة Prokaryotic Cells سالبة غرام، و مفردة الصبغي (الكروموسوم)، حجم ذخيرتها الوراثية bp (10^6x4).
- تعيش هذه البكتريا في أمعاء الإنسان و الثدييات (القولون).
- يتميز سيتوبلازما البكتريا بوجود صبغي حلقي وحيد (يمثل DNA الرئيسي للبكتريا) و جزيئات من DNA حلقي صغيرة الحجم تدعى البلاسميدات عنصر وراثي مستقل Plasmides (كل بلاسميد يضم حوالي 100 مورثة)
- من المعوقات الرئيسية لاستخدام E. coli في عملية التنسيل كونها من بدائيات النوى التي ينقصها الغشاء النووي و يعني ذلك أن مورثات محددة لحقيقيات النوى قد لا يمكنها أداء وظيفتها في خلايا E. coli. فقد لا يكون من السهل التأكد بأن الخلية بدائية النوى تستطيع إنتاج البروتين الكامل الوظيفة.

المحاضرة الثانية
التنسيل أو الاستنساخ Cloning





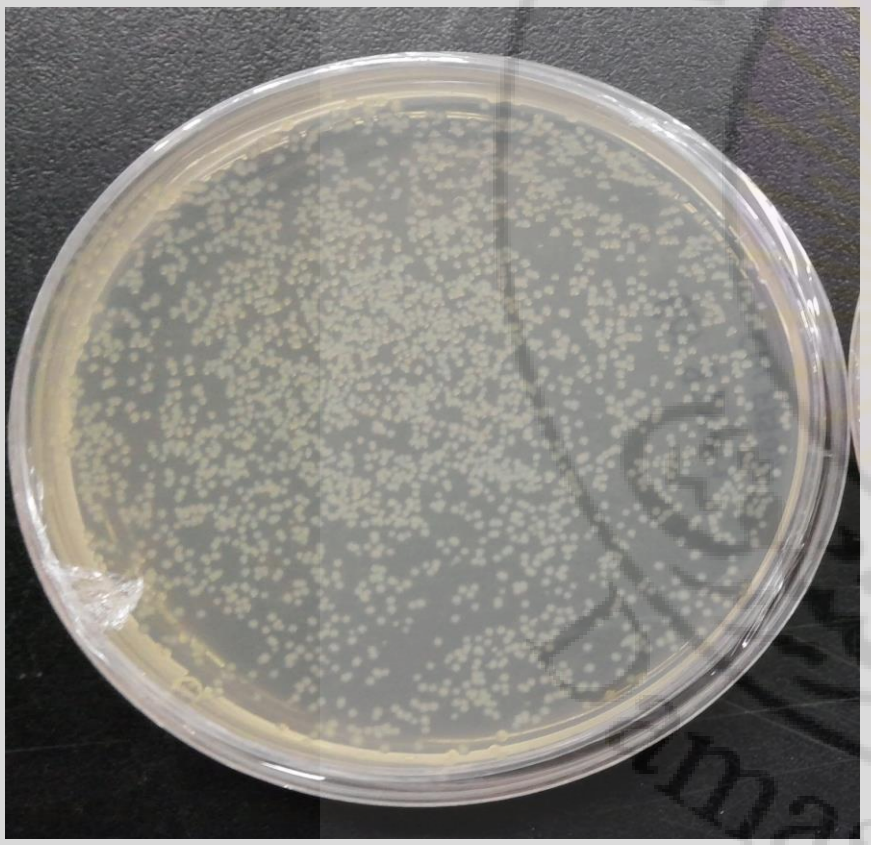
2. **نقل القطعة المهجنة المحمولة داخل الناقل إلى خلية حية**

أنواع الخلايا المضيفة

2. **خلايا حقيقيات النوى المضيفة Eukaryotic cell hosts**

- تعد خمائر Saccharomyces cerevisiae من أفضل الكائنات حقيقية النوى المجهرية استخداماً في الهندسة الوراثية.
- لقد استخدمت هذه الكائنات الحية لقرون عديدة في إنتاج الخبز و صناعة البيرة
- تحتوي ذخيرتها الوراثية على ($1.35x10^{7}$)زوجاً من أزواج قواعد DNA و لذلك تزيد بما يقرب من ثلاثة أضعاف و نصف عن الذخيرة الوراثية لبكتيريا E. coli
- كما تستخدم فطريات أخرى في عمليات التنسيل مثل Aspergillus nidulansو Neurospora crassa

المحاضرة الثانية
التنسيل أو الاستنساخ Cloning



3. **اختيار المستعمرات البكتيرية التي تحتوي على الناقل و القطعة المهجنة**

- ينتج لدينا مع تكاثر الخلايا البكتيرية و تكاثر البلاسميد بداخلها أعداداً كثيرةً من المستعمرات البكتيرية و بها البلاسميد المهجن.
- و لكن قد يكون في داخل الطبق الذي زرعت فيه البكتريا، بعض البكتريا التي لا تحتوي على البلاسميد المهجن
- و يمكن التعرف عليها عن طريق استعمال نواقل تحمل مورثات مقاومة للمضادات الحيوية، كالمورثة المقاومة للمضاد الحيوي الامبيسيلين أو التتراسيكلين و غيرها، فيضاف المضاد الحيوي إلى وسط النمو وهو سوف يمنع تكاثر أي خلية بكتيرية أخرى

المحاضرة الثانية
التنسيل أو الاستنساخ Cloning

4. استخلاص القطع المهجنة و الاستخراج الكمي للـDNA

- بعد أن نميز المستعمرات التي تحتوي على البلاسميد المهجن فإنه يمكن نقلها إلى طبق جديد للمحافظة عليها و التكاثر.
- و يستفاد من قطع DNA المنسوخة في القيام بالمزيد من البحوث أو التجارب عليها (مثلاً إنتاج مكتبة DNA أو محاولة استنتاج التسلسل النووي للقطعة).
- و يمكن الكشف عن البكتريا التي تحمل قطع DNA المهجن و ذلك بوضعIPTG (ISO-propylthiogalactoside) (مصدر لنسخ المورثة LacZ) و X gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside)في وسط النمو.
- حيث تعمل هذه المواد على تلون البكتريا بلون أزرق و هو دليل على أن هذا DNA المهجن لم يدخل ضمن البكتريا, أما إذا تلونت البكتريا بلون أبيض فهو دليل على دخول DNA المهجن إليها

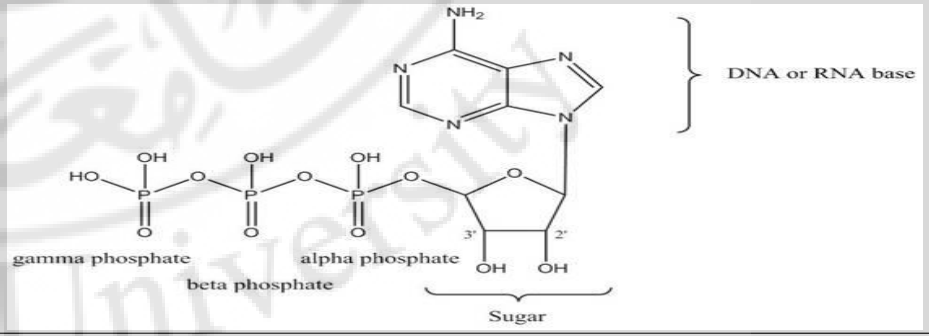
مقرر التقانات الحيوية
(الجزء النظري)
السنة الرابعة، قسم المحاصيل الحقلية

د. نور علي

مدرس في قسم المحاصيل الحقلية

المحاضرة الثالثة
التوسيم الإشعاعي و قراءة التتابعات

- تكمن أهم مشكلة تواجه أي برنامج لعمليات التنسيل في الحفاظ على إمكانية تعقب الكمية القليلة من الحمض النووي المستخدم لان فقدان أي جزء ن هذه المادة يعني التناقض في العمل بعد كل خطوة.
- توجد طريقة لتعقب المادة النووية تتضمن توسيمها بواسطة جزيء تشط إشعاعاً (عادة dNTP) عن طريق H^3 أو P^{32} (ذو الطاقة العالية) أو C^{14}.
- يمكن ان تضاف العناصر المشعة في المواقع (γ,β,α)

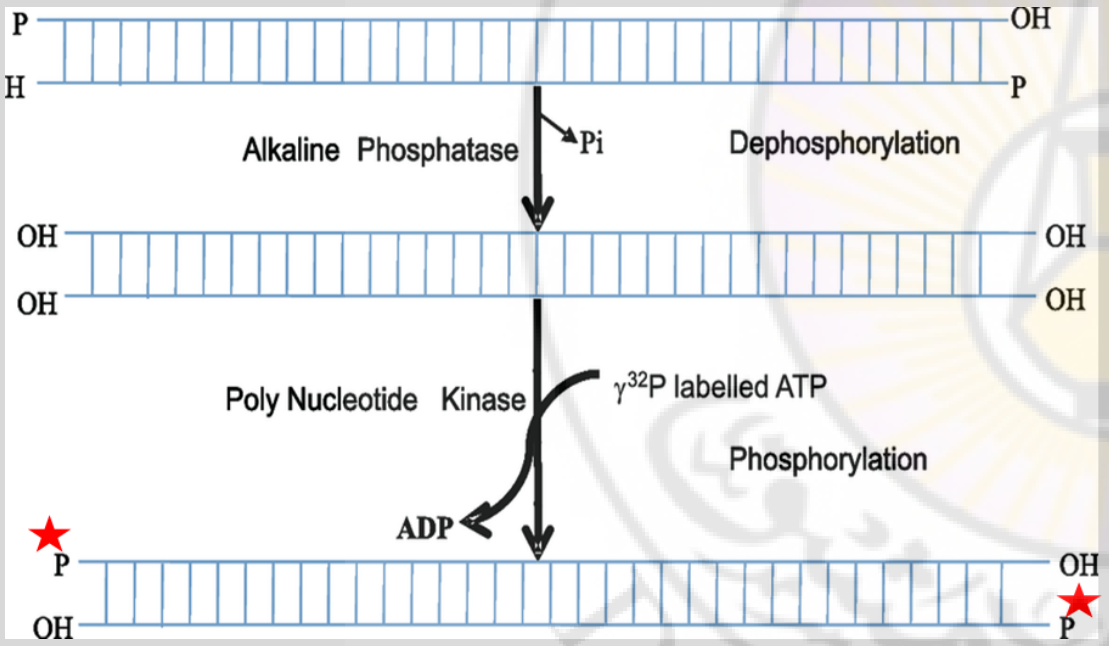


- بالتالي يمكن قياس النشاط الإشعاعي بواسطة مقياس إشعاعي لغرض تحديد كمية الحمض النووي ذو النشاط الإشعاعي العالي ضمن تجارب التهجين و يعرف هذا الجزيء بالمسبار النشط إشعاعياً Radio active probe

- من الطرق المعروفة في توسيم الأحماض النووية:

1. التوسيم الطرفي
2. الترجمة المتممة Nick translation
3. التوسيم عن طريق استطالة البادئ Primer extension

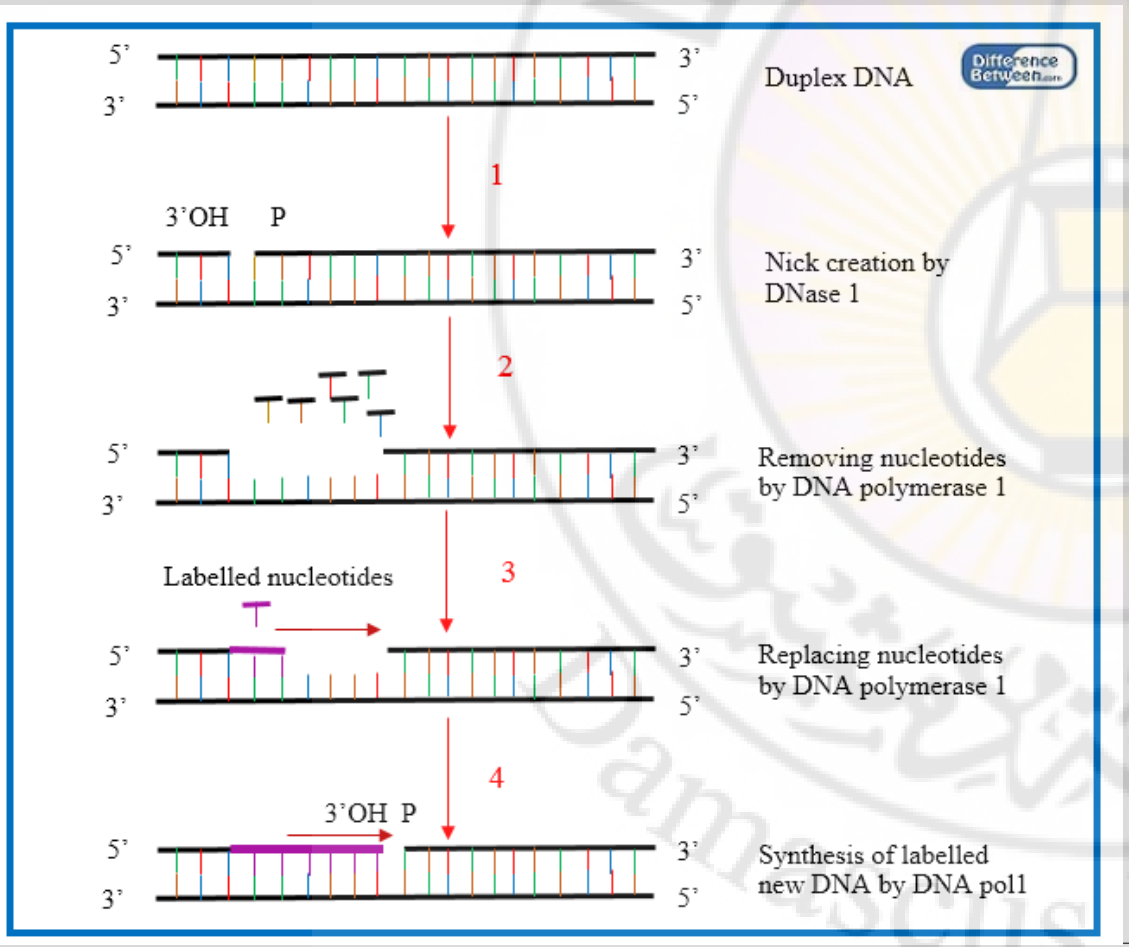
المحاضرة الثالثة
اولاً: التوسيم الإشعاعي



التوسيم الطرفي End labeling

- يستخدم في هذه التقانة إنزيم Polynucleotide kinase من أجل نقل مجموعة فوسفاتية نهائية في ATP إلى النهاية 5' لجزيء النووي.
- فإذا كان الـ ATPالمانح موسوم بعنصر مشع بالتالي ينتج حمض نووي موسوم نسبياً بالنشاط الإشعاعي أي أن النهاية لكل جزيء ستكون فقط نشطة إشعاعياً

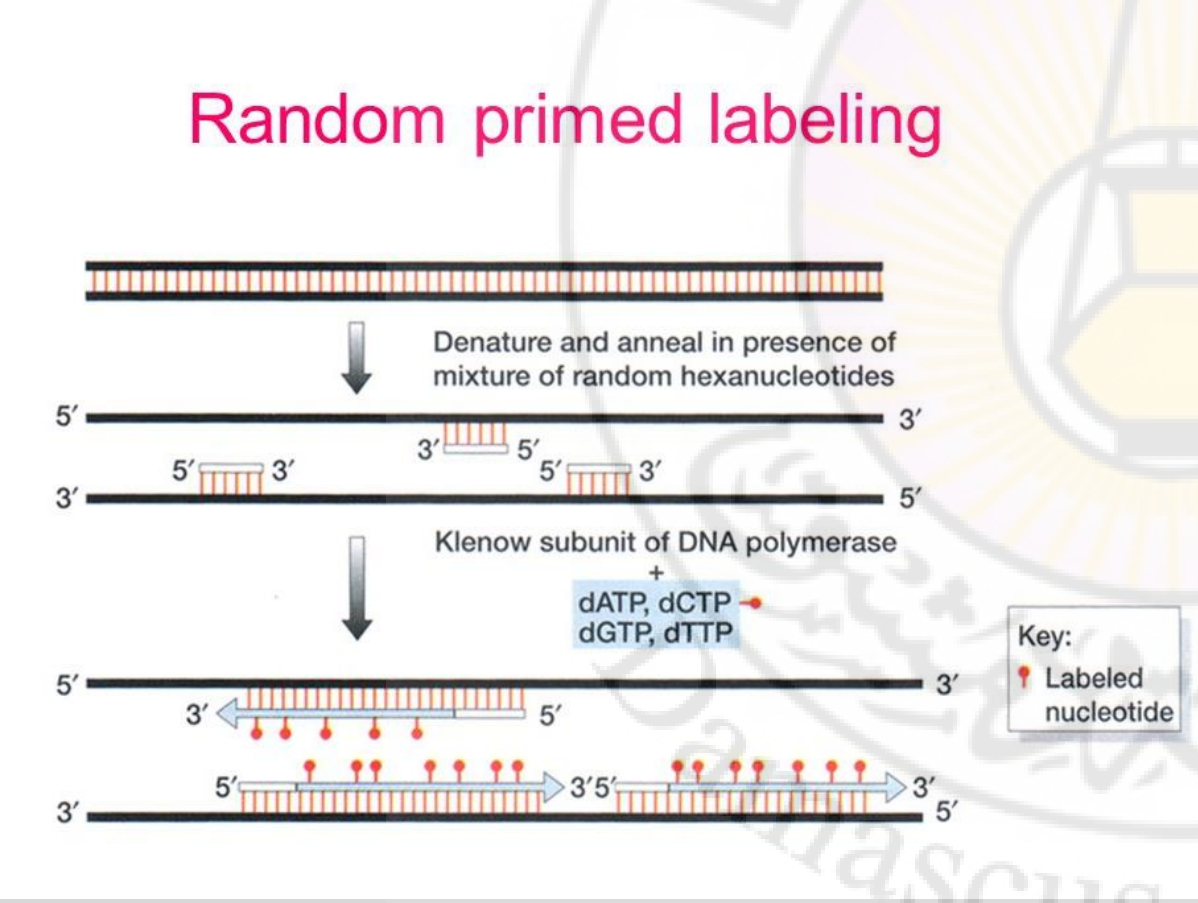
المحاضرة الثالثة
اولاً: التوسيم الإشعاعي



الترجمة المتممة Nick translation

- يمكن التحقق في هذه الطريقة بالاعتماد على قابلية الإنزيم DNA polymerase I تشكيل رابطة فوسفاتية ثنائية الاستر في الحلزون المضاعف للـ DNA .
- يمكن أن يحث هذا المتمم طبيعياً بوجود تركيز منخفض من انزيم النيكليوز DNase في مزيج التفاعل.
- يتوسط إنزيم DNA polymerase I تفاعل تبديل السلسلة و الذي يدمج dNTPs في سلسلة الـ DNA فإذا كان واحد من النيكليوتيدات الأربعة المندمجة تملك نشاطاً إشعاعياً فالنتيجة عي الحصول على جزيء DNA عالي التوسيم

المحاضرة الثالثة
اولاً: التوسيم الإشعاعي



التوسيم عن طريق استطالة البادئ Primer extension

- يستخدم في هذه الطريقة اوليغونيكليوتيد (متعدد نيكليوتيد)أو البادئات مكون من ستة نيكليوتيدات منقوصة الأكسجين لبدء بناء سلسلة الحمض النووي الـ DNA بواسطة إنزيم الـ DNA polymerase.

1. يتم أولاً تحويل سلسلة الـ DNA المضاعفة إلى سلسلة مفردة بالتسخين
2. يتم إضافة لبادئات إلى وسط التفاعل لتندمج و تلتصق بالسلسلة المفردة
3. ثم تضاف قطعة كلينو Klenow fragment المستخلصة من E.coli، حيث يتم البدء ببناء نسخة من القالب بادئة من مجموعة الهيدروكسيل على النهاية 3' للتتابع السابق
4. يتم إضافة الـ dNTPs الموسومة و بالتالي يتم إنتاج جزيء DNA عالي النشاط الإشعاعي

المحاضرة الثالثة
ثانياً: قراءة التتابعات

تحتل القدرة على تحديد تتابع النيكليوتيدات للحمض النووي الـ DNA مكاناً مركزياً في علم الأحياء الجزيئي وذلك لأنها تسمح في معرفة ما هو جوهري في تركيب المعلومات الوراثية.

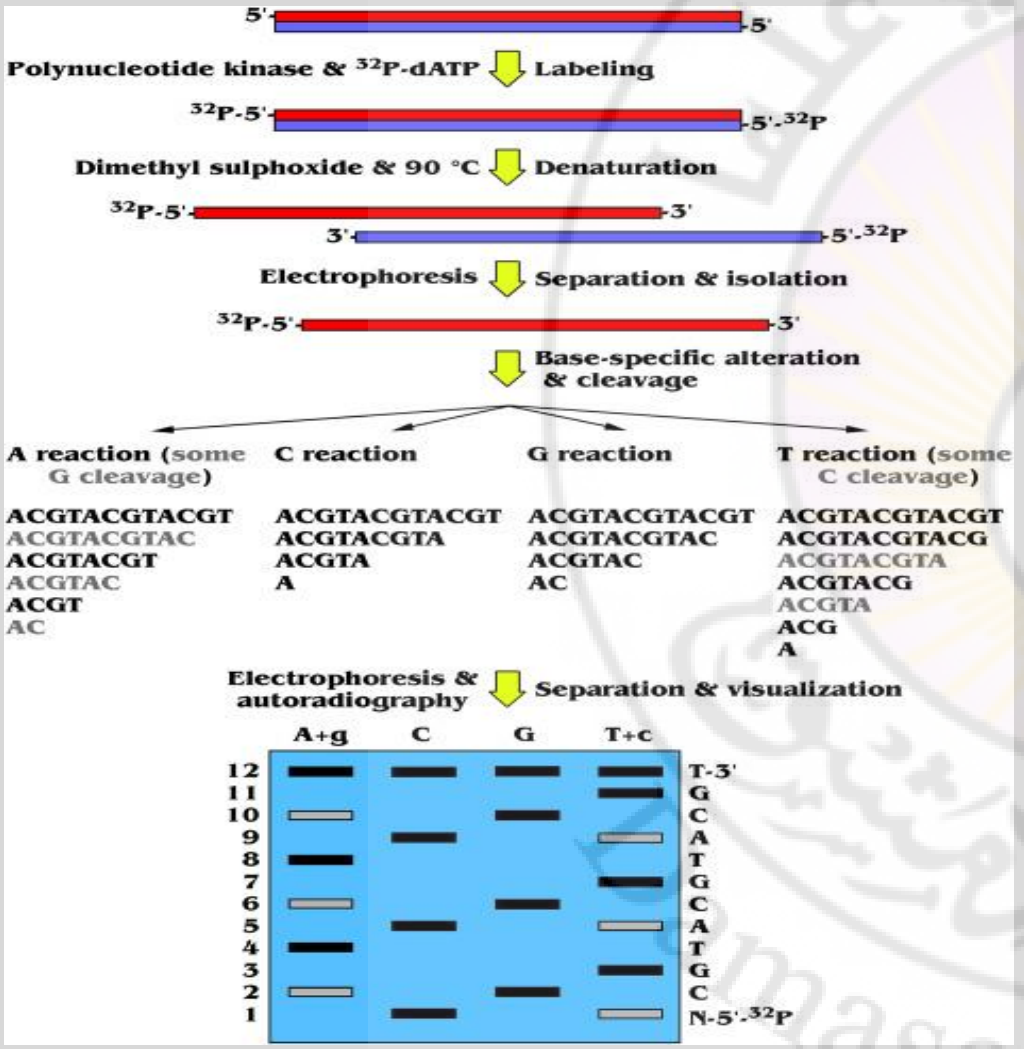
و لقد طورت الطرق السريعة لتحايل التتابع في نهاية السبعينيات، بحيث أصبحت هذه التقانة مستخدمة في المختبرات و على نطاق واسع.

توجد طريقتان أساسيتان في تحديد تتابع النيوكليوتيدات في الحمض النووي الـ DNA، و هما:

1. الطريقة الكيميائية التي كورت من قبل العالمان آلن مكسام و ولتر جلبرت
2. الطريقة الإنزيمية التي طورت من قبل العالمان فريد سنجر و آلن كولسون.

لقد حلت الطريقة الإنزيمية محل الكيميائية بشكل واسع و مرغوب.

المحاضرة الثالثة
ثانياً: قراءة التتابعات



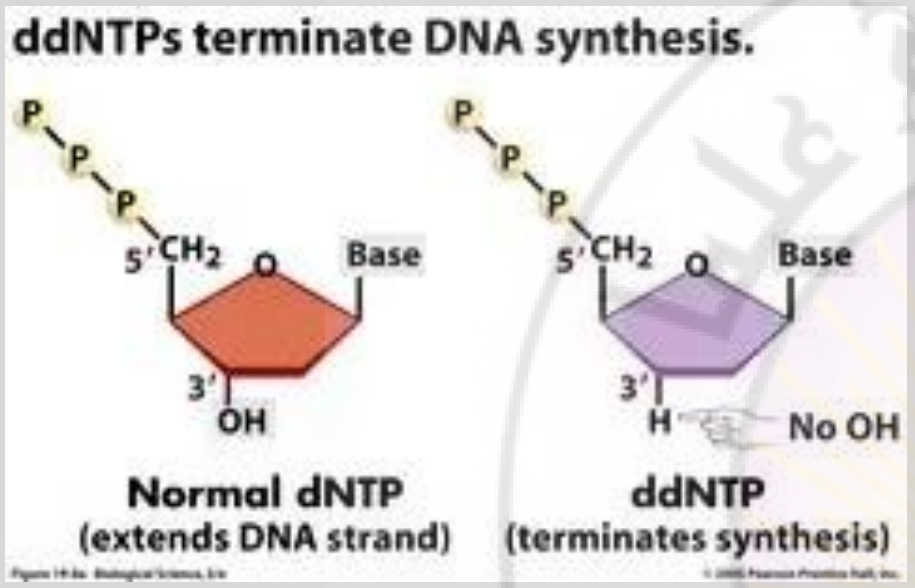
أولاً: طريقة مكسام – جلبرت الكيميائية (Maxam-Gilbert)

1. يتطلب العمل قطعة من الـ DNA معروفة و معلومة التركيب
2. توسم القطعة بمادة مشعة P32 في نهاية 5' لكل سلسلة.
3. عملية عزل و تنقية للسلاسل المحورة لإنتاج عشيرة من السلاسل الموسومة لتستخدم لاحقاً لتحديد التتابع.
4. يتم تحديد التتابع و ذلك بالتحوير الكيميائي لقواعد سلسلة الـ DNA لتزال لاحقاً بمعدل قاعدة واحدة لكل جزيء باستخدام مواد كيميائية مختلفة، و من ثم تحطم الرابطة الفوسفاتية ثنائية الاستر باستخدام مادة البابريدين Piperidine
5. بالنهاية سوف تعطي عدد كبير من الجزيئات لتنتج فيما بعد مجموعة من القطع مختلفة الأطوال بنيكليوتيد واخد معلم في النهاية 5'

المحاضرة الثالثة
ثانياً: قراءة التتابعات

ثانياً: طريقة سنجر و كولسون الإنزيمية (Sanger-Coulson)

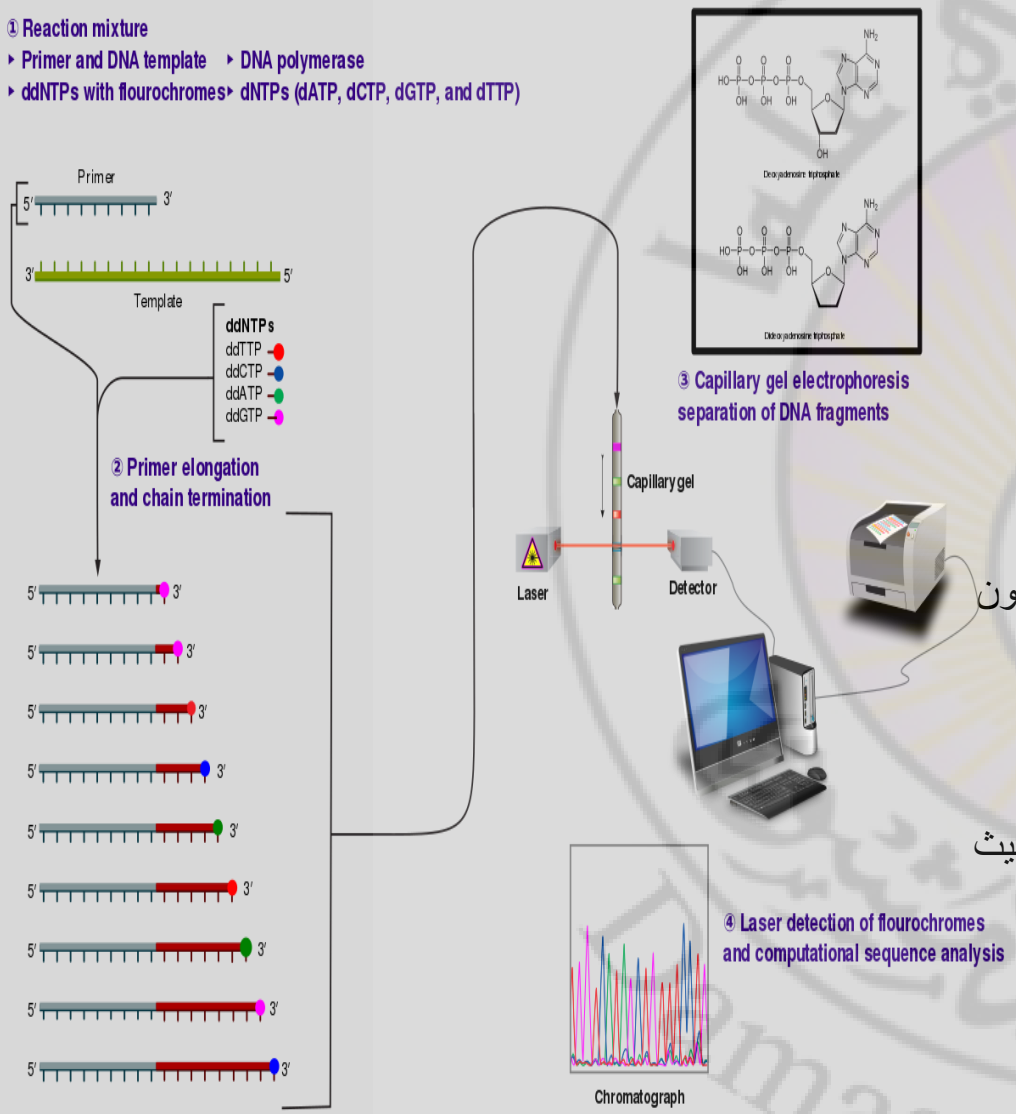
- **كما أنها أيضا تعرف التسلسل عن طريق دي ديوكسي (Dideoxy sequencing)**
- **و ترتكز هذه الطريقة على مفهوم أن شريط DNA في الأساس مبنى من جزيئات من الديوكس نيوكليوتيد(deoxynucleotides (dNTPs) و يوجد على النقطة الثالثة من حلقة السكر الريبوزي مجموعة مؤكسدة أي مجموعة هيدروكسيل (OH-) و هذه النقطة هي التي ترتبط في النقطة الثالثة من الجزيء الذي يليها و هكذا يتم الترابط لتكوّن شريط طويل من DNA.**
- **و لقد قام د. ستنجر بالاستفادة من هذه الخاصية فبدّل الجزيء من(OH) إلى (H) عن طريق إضافة دي ديوكسي نيوكليوتيد (ddNTPs)بدل من ديوكسي نيوكليوتيد (dNTPs) و هذا يؤدي الى توقف ترابط الجزيئات و يكون في طرف كل جزيء نوع واحد من الأحماض النووية.**



- **الخطوات الأساسية للكشف عن تتابع الجزيئات المكونه للمادة الوراثية بطريقة سنجر و كولسون:**

1. إضافة قطعة الـ DNA القالب (سلسلة مفردة)
2. إضافة البادئ ذي نهاية حرة من نوع 3'-OH
3. إضافة dNTPs معلمة إشعاعياً
4. إضافة إنزيم البلمرة من نوع Klenow fragment
5. قسم الخليط إلى أربعة انابيب متساوية بالحجم
6. إضافة الـ ddNPTs حيث يضاف نوع واحد لكل أنبوب.

المحاضرة الثالثة
ثانياً: قراءة التتابعات



ثانياً: طريقة سنجر و كولسون الإنزيمية (Sanger-Coulson)

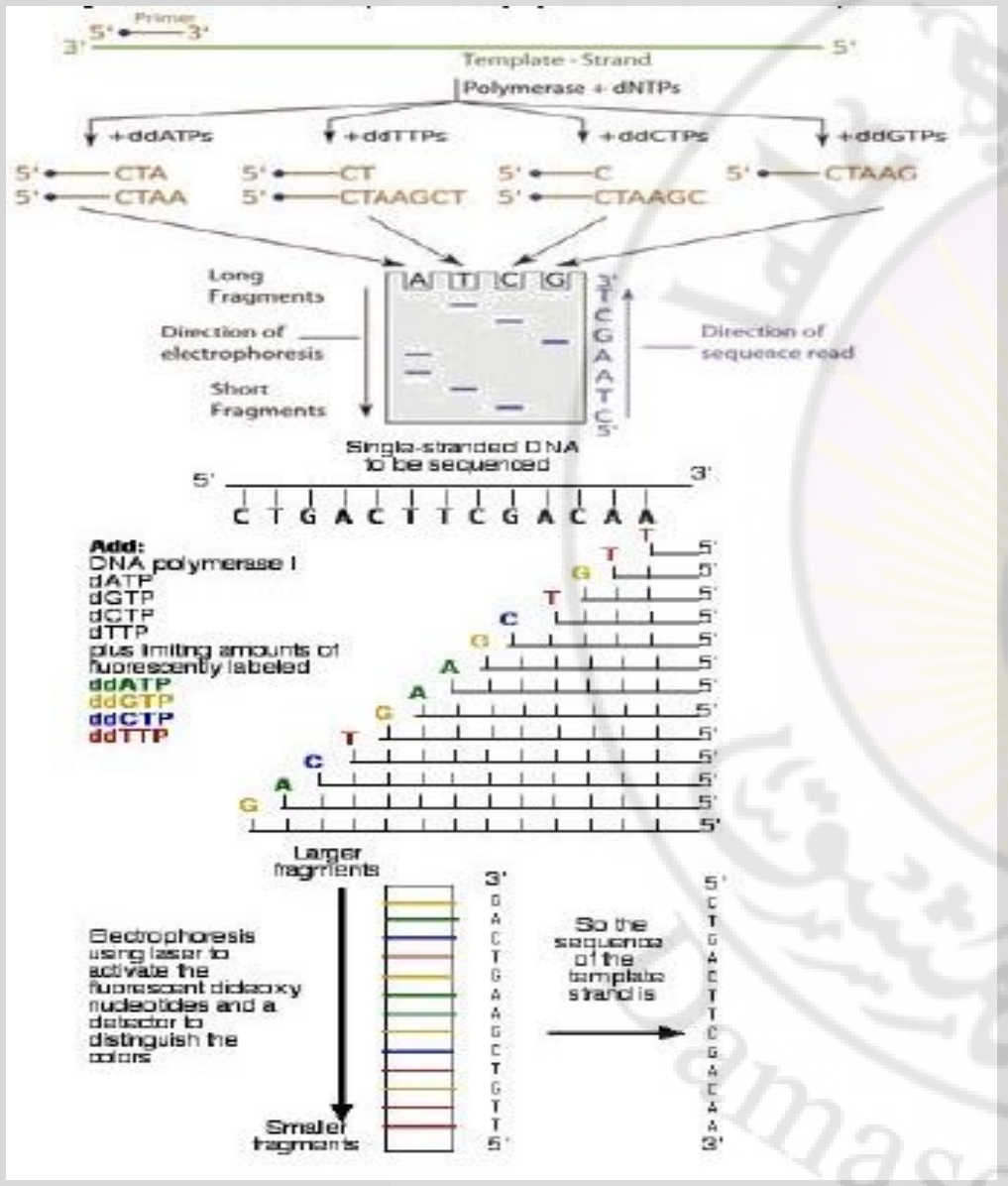
7. وبذلك سيبدأ تخليق شريط جديد أمام كل شريط قديم وسيتوالى ترتيب النيوكليوتيدات الجديدة في بناء الأشرطة الجديدة ولكن عملية بناء أي شريط ستتوقف إذا أخذ جزئ ddNTPs في بناء الشريط الجديد وحدوث هذا الاحتمال الأخير يتم عشوائيا ويؤدى ذلك إلى أن القطع الجديدة ستكون مشعة ومتفاوتة في أطوالها ولكن كل منها ينتهى بالـ ddNTPs في الطرق 3'.

- وبعد انتهاء التفاعل في الانابيب الاربعة سنحصل على خليط من الـ DNA الجديدة المختلفة الاطوال التي تحتوي جميعاً على نفس النوكليوتيد في الطرف 5 ' ولكن تختلف في الطرف 3' حيث قسم منها ينتهي ب ddATP وقسم اخر ب ddTTP وهكذا

8. لاحقاً تتم عملية الرحلان الكهربائي و الفصل على هلامة البولي أكريلاميد

9. ثم يتم تصوير الهلام بطريقة الاشعاعي الالي Autoradiography.

المحاضرة الثالثة
ثانياً: قراءة التتابعات



ثانياً: طريقة سنجر و كولسون الإنزيمية (Sanger-Coulson)

10. تتسم قراءة الهلام او صورة الهلام لتحديد تتابع النيوكليوتيدات بسهولة حيث يتم اولا تحديد الحزمة المهاجرة لأطول مسافة وهي تمثل اصغر قطعة DNA مخلقة في الخليط، وهذا يعني ان نمو هذه القطعة قد توقف عند النيكلوتيد الاول للقالب

- اذا اخدنا الشكل التالي كمثال على هذه الحالة نلاحظ ان اصغر حزمة تقع في المجال Cالذي
- يحتوي على ddCTP مما يعني ان النيكلوتيد الاول في الخيط الجديد هو من نوع C
- الخطوة الثانية هي تحديد موقع الحزمة المهاجرة بمسافة اقل من الاولى وتعيين المجال الذي تحركت فيه والتي تكون اطول من الحزمة الاولى بمقدار نيكلوتيد واحد فقط. كما يلاحظ من الشكل موقع هذه الحزمة في المجال T ايضا مما يشير الى ان النيكلوتيد الثاني في الخيط الجديد هو من النوع T
- اما الحزمة الثالثة من ناحية مسافة الهجرة فتقع في المجال A الذي يحتوي علىddATP وبهذا سيكون النيكلوتيد الثالث من نوع A وهكذا تستمر القراءة لتحديد مواقع الحزم ومجال حركتها لمعرفة تتابع النيوكليوتيدات بالكامل.