الكلية الزراعة

الهندسة الوراثية / العملي **قسم علوم الاغذية**

المرحلة الثالثة **م. م. ضحى صلاح**

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 :

1. المقاومة للمضادات الحيوية .
2. انتاج البكتريوسينات Bacteriosens.
3. انتاج الهيمولايسين Heamolysine .
4. تخمير السكريات
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 :

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

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**

المرحلة الثالثة **م. م. ضحى صلاح**

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 للـ 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.

كلية الزراعة

قسم علوم الاغذية **الهندسة الوراثية / العملي**

المرحلة الثالثة **م. م. ضحى صلاح**

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**

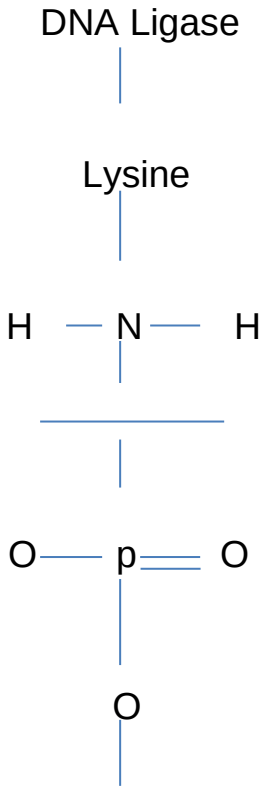
المرحلة الثالثة **م. م. ضحى صلاح**

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 .

كلية الزراعة

قسم علوم الاغذية **الهندسة الوراثية / العملي**

المرحلة الثالثة **م. م. ضحى صلاح**

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.

كلية الزراعة

قسم علوم الاغذية **الهندسة الوراثية / العملي**

المرحلة الثالثة **م. م. ضحى صلاح**

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 .