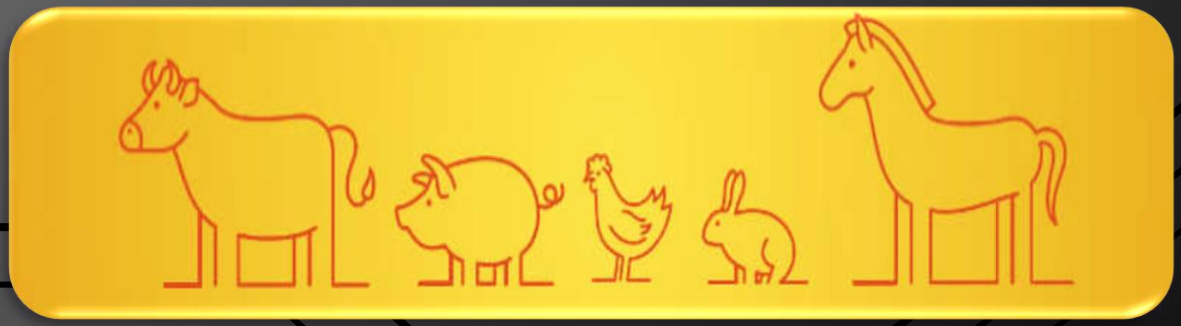
كلية الزراعة

التحسين الوراثي للحيوانات الزراعية

المحاضرة التاسعة

د. عامر دباغ



2019 - 2018

تقنيات في الهندسة الوراثية

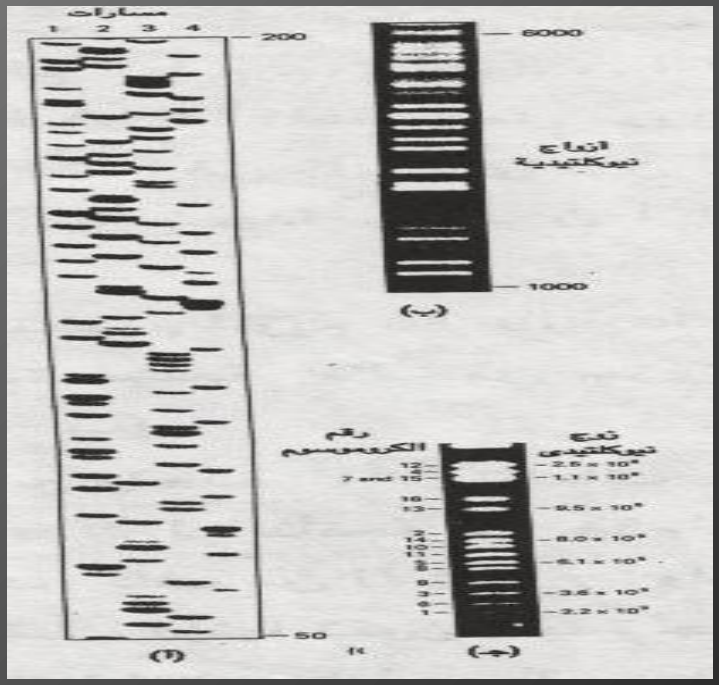
أ.د.عامر دباغ

التفريد الكهربائي للأحماض النووية :

- النيوكلتيدات مشحونة بشحنات سالبة مما يسهل عملية التفريد الكهربائي بدون الحاجة إلى اللجوء إلى استخدام SDS
- استخدام جل البولي أكريلاميد Poly acrylamide ، يمكن فصل الشظايا التي تختلف عن بعضها في الطول حتى ولو بفارق نيوكلتيدة واحدة.
- في حالة شظايا DNA الأكبر حجماً (طولاً) فيستخدم جيل الآجاروز .
- طريقة التفريد الكهربائي بالجيل ذو المجال النبضي Pulsed – field electrophoresis
- تحتاج إلى وقت أطول, الكر وموسوم الكامل للبكتيريا أو الخميرة يظهر كحزمة منفصلة على مثل هذا الجل.

التفريد على الجل

التفريد على الجل الاغاروزي



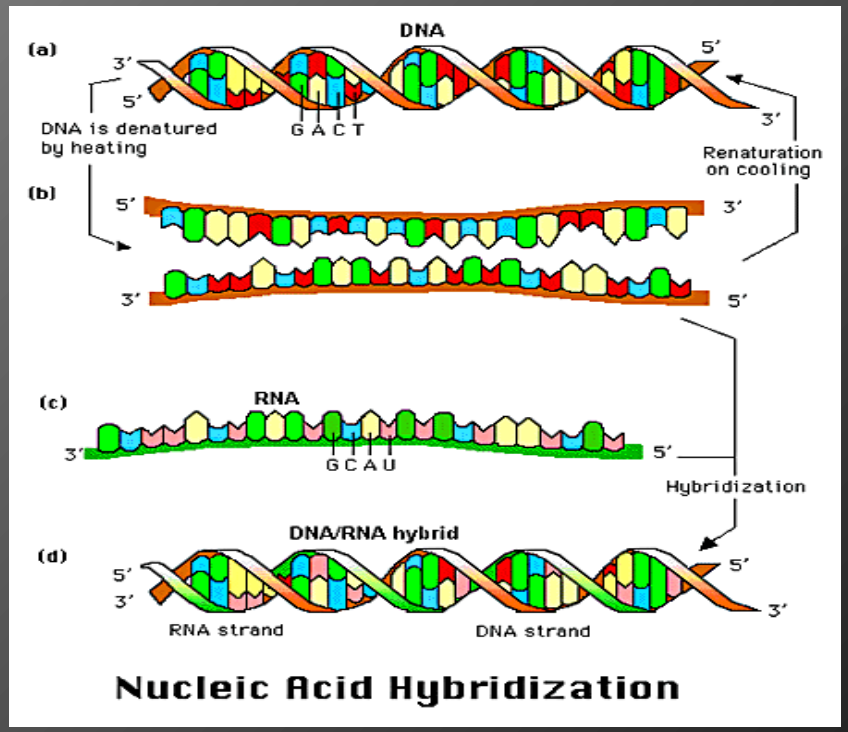
فوائد الرحلان

- التعرف مباشرة على التغيرات الكروموسومية
- تحديد الخريطة الوراثية للجينات على أحد الكر وموسومات في الخميرة عن طريق التهجين مع منقبات كلونات جزيئات DNA الخاصة بجين ما للتعرف على التتابع المكمل لجزيءDNAعلى الجل.
- أفضل الصبغات المستخدمة في صبغة إيثديوم بروميد Ethedium bromide التي تعطي لوناً مشعا تحت الأشعة فوق البنفسجي عندما ترتبط بـ DNA
- تعليم DNA بأحد النظائر المشعة (32P) قبل بدء التفريد الكهربائي.
- التصوير بالإشعاع الذاتي Autoradiography

تهجين الأحماض النووية

- طريقة حساسة للتعرف على تتابعات نوعية من النيوكلتيدات
- تعتمد على خاصية تفكك DNA denaturation سلسلتي الحلزون المزدوج عند تعريضه لدرجة حرارة مرتفعة نسبياً (100م) أو بالمعاملة بمحلول ذو درجة تركيز أس الهيدروجين عالي.
- السلاسل المكملة من DNAيمكن إعادة اتحادها لتكوين حلزون مزدوج عند التبريد البطيء إلى درجة حرارة (65م).
- الحصول على هجين بين أي سلسلتين مفردتين من الأحماض النووية (RNA / DNA RNA : RNA , DNA / DNA) , طالما احتوت السلاسل المفردة على تتابعات مكملة حتى يحدث التزاوج بينها .

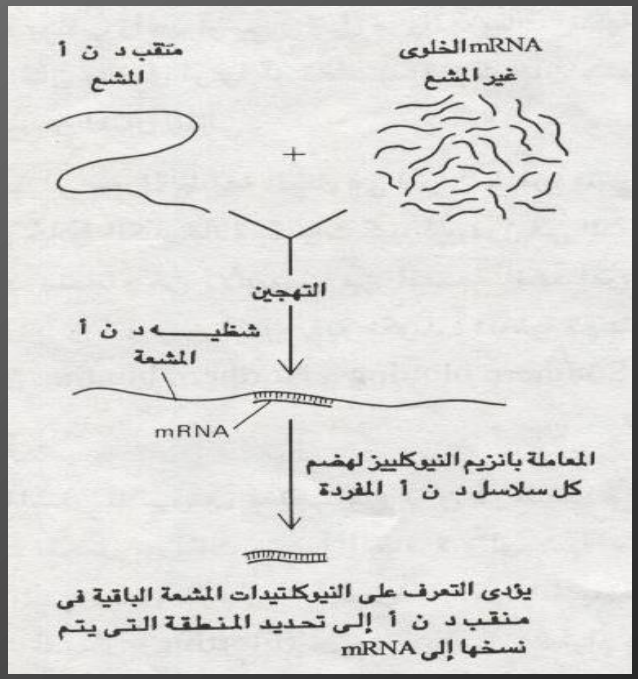
تهجين الأحماض النووية



- تتحدد سرعة تكوين حلزون مزدوج أثناء تفاعل التهجين بالمعدل أو السرعة التي يتم بها الاصطدام العشوائي بين السلاسل المكملة.
- يمكن استخدام معدلات التهجين لتحديد تركيز أي تتابع مرغوب من DNAأو RNA في مخلوط من تتابعات مختلفة .
- تحتاج هذه التقنية إلى سلاسل مفردة نقية من شظايا DNA التي تكون فيها التتابعات مكملة لتلك الموجودة في الحامض النووي DNA أو RNA)
- تفاعل التهجين بالسلاسل المكملة في الحامض النووي حساساً لدرجة أنه يمكن التعرف على جزيء واحد ذو تتابع نوعي مكمل من جينوم الخلية بأكمله

- يمكن تحديد مواقع البدء والإنهاء لعملية نسخ RNA
- يمكن تحديد مناطق الانترونات في الجين و متابعة درجة نشاط الجين في فترات النمو والتمايز المختلفة للكائن
- تساعد هذه التقنية في تحديد مستوى التحكم في تنظيم التعبير الجيني أي ما إذا كان على مستوى عملية النسخ أو تجهيز RNA أو على مستوى الترجمة إلى بروتين
- يمكن رسم خريطة بدء ونهاية جزئ RNA
- يمكن تحديد ورسم خريطة الانترونات الموجودة في جين مميزة النواة بطريقة مشابهة.

عملية النسخ


منقب د ن أ
المشع
mRNA الخلوى
غير المشع
+
التهجين
شظيه د ن أ
المشعة
mRNA
المعاملة بانزيم النيوكلييز لهضم
كل سلاسل د ن أ المفردة
يؤدى التعرف على النيوكلتيدات المشعة الباقية فى
منقب د ن أ إلى تحديد المنطقة التى يتم
نسخها إلى mRNA

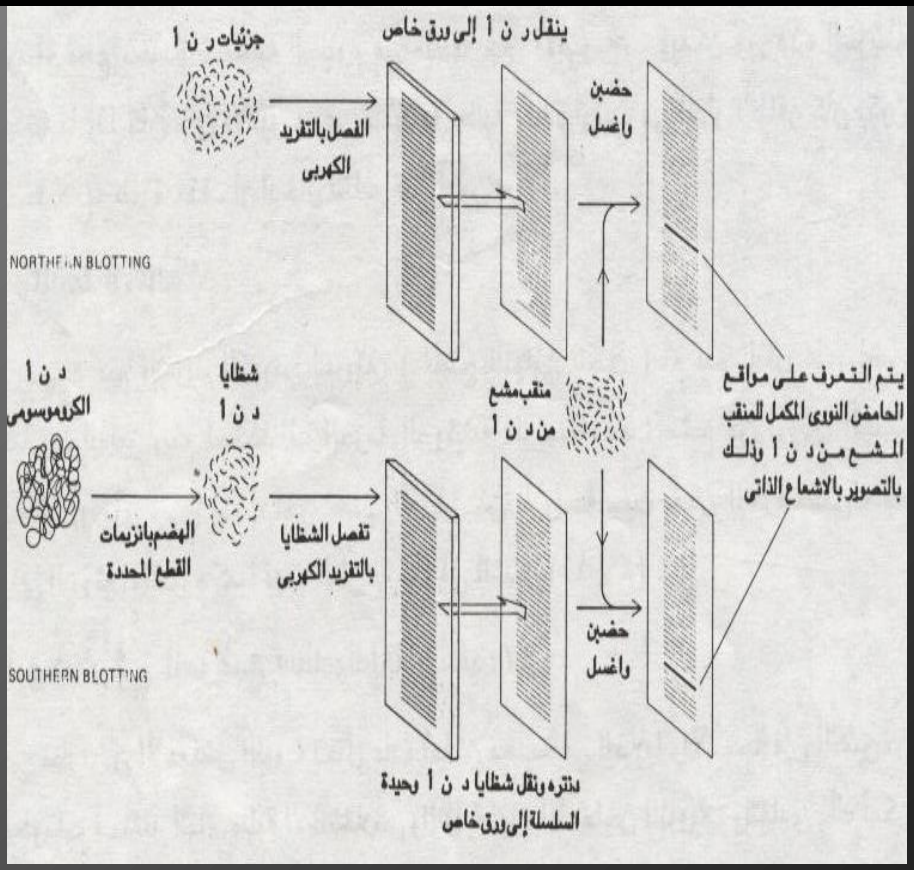
تقنيات نقل الوسط البيئي Blot transfer techniques

- تسهيل التهجين مع حزم من DNAسبق قطعها بالتفريد الكهربائي
- تستخدم عادة منقبات DNAمع تقنية التفريد الكهربائي لمعرفة جزيئات الأحماض النووية المحتوية على تتابعات مكملة لكل أو جزء من تتابعات المنقب المستخدم .
- إذا ارتبطت جزيئات DNA بمنقب واحد أو بعدد قليل من الجزيئات المنقبة بأحجام مختلفة كان ذلك دليلاً على أن التهجين كان بالفعل نوعياً أو تخصصياً

معرفة طبيعة الخلل في فئران طافرة

- استخلاص عينات متماثلة من الألبومين من أنسجة الكبد من كل من الفئران الطافرة والسليمة
- فصل DNA أو RNA من بقية مكونات الخلية
- فصل DNA عن RNA بالطرق المناسبة .
- تحليل RNA المشفر للألبومين بمنقب من DNA تستخدم تقنية تسمى Northern blotting
- فصل جزيئات RNA الطافرة والوحشية بتقنية التفريد الكهربي إلى سلسلة من الحزم
- عمل نسخة مطابقة للجيل Replica بنقل (blotting) حزم RNAعلى غشاء من النتروسيليولوز أو ورق النايلون

تحضين غشاء النتروسيليولوز في محلول محتوي على المنقب
ثم تحديد مكان ارتباط المنقب بحزمة RNA النوعية بالتصوير بالإشعاع الذاتي



- يمكن معرفة حجم جزئ mRNA محل الدراسة بمقارنة طراز التفريد الكهربائي له مع طراز RNA بأحجام معروفة من RNA القياسية

- معرفة إذا كانت خلايا الكبد الطافرة تنتج RNA الألبومين بكميات طبيعية وبأحجام طبيعية أو إذا كان RNAالمنتج طبيعي ولكن بكميات ضئيلة أو أن الRNA الناتج قصير بشكل غير عادي وبالتالي يهاجر بسرعة في الجيل مما يمكن معه إجراء اختبارات تالية لتحديد أي جزء من RNA القصير هو الذي فقد

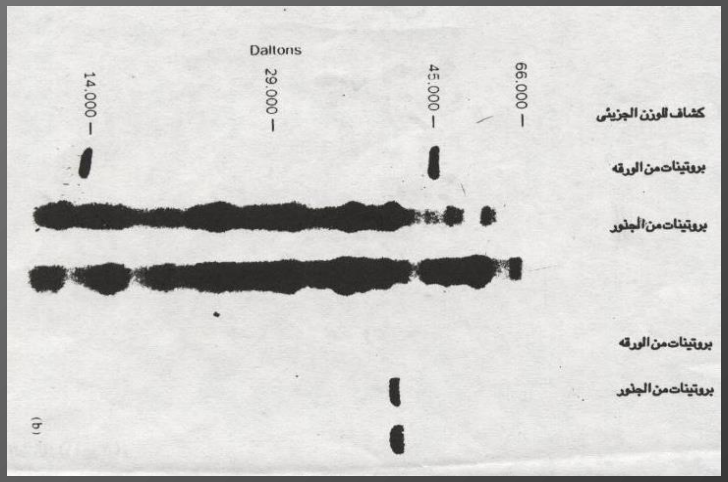
طرق التحليل بـ Northern , Southern blotting

- تفريد جزيئات RNA أو DNA بالهجرة الكهربائية في جل الآجاروز
- نقل الجزيئات المتعددة (الحزم) من RNA أو DNA إلى غشاء نيتروسيليولوز أو نايلون بعملية التشرب boltting .
- تبقى فقط الجزيئات من RNA أو DNA التي يتم تثبيتها نتيجة لتهجينها بالمنقب وتصبح معلمة بالإشعاع وتظهر كحزم في صور الإشعاع الذاتي
-

لتحديد تركيب جين الألبومين الطافر تستخدم طريقة تسمى Southern blotting

- يتم تقطيع DNA المستخلص إلى شظايا قصيرة نسبياً باستخدام أنزيمات القطع المحددة المناسبة .
- فصل الشظايا حسب حجمها على جيل التفريد الكهربائي
- تحديد الشظايا المكملة لمنقب الألبومين DNAالمشع بالنقل على ورق النتروسيليولوز والتهجين كما سبق.
- وبتكرار هذه التقنية يمكن رسم خريطة قطع محددة تفصيلية للجينوم في منطقة جين الألبومين.
- تحديد إذا كان جين الألبومين قد حدثت به عملية إعادة ترتيب في الفأر الطافر كأن يكون قد حدثت به طفرة حذف أو إدخال لتتابع قصير من DNA

طريقة النسخ


Daltons
14.000
29.000
45.000
66.000
كشاف الوزن الجزيئى
بروتينات من الورقه
بروتينات من الجذور
بروتينات من الورقه
بروتينات من الجذور
(b)

Western boltting

- التفريد الكهربائي للبروتين (المنتج النهائي للجين) .
- النقل على غشاء النتروسيليولوز
- استكشاف الحزمة البروتينية المرغوبة بمنقب مشع من بروتين الجسم المضاد أو بأي جزئ منقب آخر حسب الغرض من الدراسة حيث يمكن التعرف على حجم جزئ البروتين وتقديره كمياً بهذه الطريقة

التهجين في الموضع

- الأحماض النووية تحتل عادة أماكن محددة في الخلايا والأنسجة والكثير من المعلومات تفقد أثناء عملية الاستخلاص والتنقية لهذه الأحماض النووية.

- استنباط تقنيات يتم فيها استخدام منقبات متخصصة لتحديد مكان تتابعات نوعية من الأحماض النووية في الموضع الأصلي لها In Situ ويطلق عليها تقنية التهجين في الموضع in situ hybridization

- يمكن إجراء ذلك بالنسبة لتتابعات DNAفي الكر وموسوم أو RNA في سيتوبلازم الخلية

- يمكن تهجين المنقبات المعلمة بوفرة من الإشعاع مع الكر وموسومات التي سبق تعريضها لفترة وجيزة بمعاملة من PH مرتفع($pH \geq 13$) لإحداث انفكاك للروابط الهيدروجينية بين قواعد DNA.

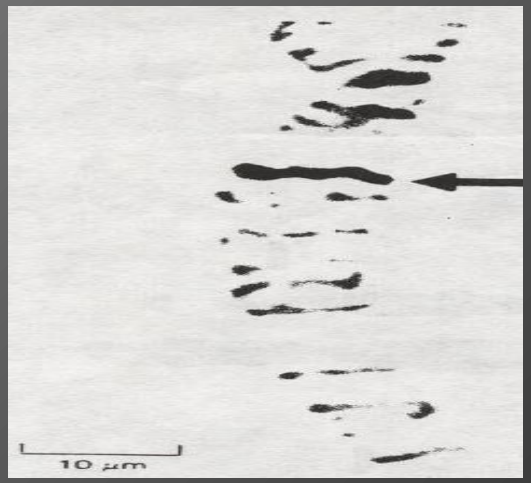
- تحديد المناطق الكروموسومية التي ارتبط بها المنقب المشع بالتصوير بالإشعاع الذاتي.

- زيادة فعالية المنقب بتعليمه كيماوياً (بالبيوتين) بدلاً من الإشعاع .

-

- الكشف عن مواقع التهجين بصبغة ستربتافيدين Streptavidin مع استخدام بعض الجزيئات الكشافة .

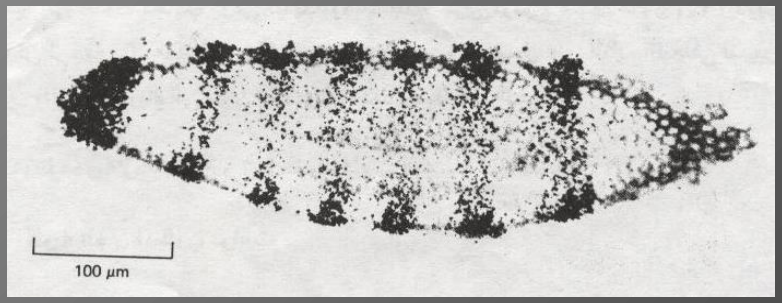
استخدام طريقة Western blotting لتحديد بروتينات نوعية بعد الفصل بالتفريد الكهربائي بجل الاكريلاميد



- **تحديد موقع جين في الدروسفيلا بطريقة التهجين في الموقع بين منقب من DNA المعلم بالبيوتين مع الكر وموسومات البوليتينية الدروسفيل.**
- تمت عملية دنترة جزئية لـ DNA في الكروموسوم العملاق بحيث يمكن المنقب أن يتهجن معه وبعد التهجين والغسيل ، يمكن تحديد موقع المنقب المرتبط بمعاملة الكروموسوم بأنزيم البيروكسيديز المرتبط بمادة ستربتافيدين الذي يعطي رواسب داكنة عند تحضين الكروموسوم المعامل مع ماء الهيدروجين وصبغة مناسبة

- تستخدم هذه التقنية لدراسة توزيع الجزيئات النوعية من RNA في الخلايا المكونة للنسيج وفي هذه الحالة لا تعرض الأنسجة لـ pH مرتفع بحيث يبقى DNA في صورة حلزون مزدوج وبذلك لا تستطيع الارتباط بالمنقب ويتم تثبيت النسيج بلطف بحيث تتم المحافظة على محتواه من RNA بشكل يجعله معرضاً للتهجين مع DNA المنقب المكمل خلال فترة التحضين المناسبة.

- الحصول على طرز متميزة للتعبير الجيني المتغاير حسب مراحل نمو وتمايز الجنين في حشرة الدروسفيلا وقد ساعدت هذه الطرز على معرفة الميكانيكيات التي تلعب دوراً في عملية التمايز بين الخلايا الموجودة في أماكن مختلفة أثناء التمايز والتكوين



صورة بالإشعاع الذاتي لمقطع في جنين صغير جداً للدروسفيلا

طراز حبيبات الفضة المعرضة أن RNA المتكون بين الجين (ويسمى Ftz) يترتب في حزم متبادلة يتكون كل منها من 3–4 خلايا على طول الجنين وعند هذه المرحلة من التكوين (المسماة بلاستوديرم) يحتوي الجنين على حوالي 6000 خلية

تحديد تتابعات القواعد(النيوكليوتيدات) في DNA

- التركيب الدقيق المتناهي لخريطة الجين أو الكروموسوم هو عبارة عن تتابع أزواج النيوكليوتيدات مزوداً بجدول لكل تغيرات أزواج النيوكلتيدات والتي تغير في وظيفة الجين أو الكروموسوم
- أمكن في أواخر السبعينات استنباط تقنيات لتحديد تتابعات النيوكلتيدات لأي شظية مستخلصة منDNAبطريقة بسيطة وسريعة
- التعرف على التتابعات الكاملة لمئات الجينات في الثدييات بما فيها الجينات المشفرة للأنسولين والهيموغلوبين والانتروفيرون ، وكذلك لكروموسومات العديد من الفيروسات مثل كروموسم الفاج ΦX 174 والفاج λ لمبدا

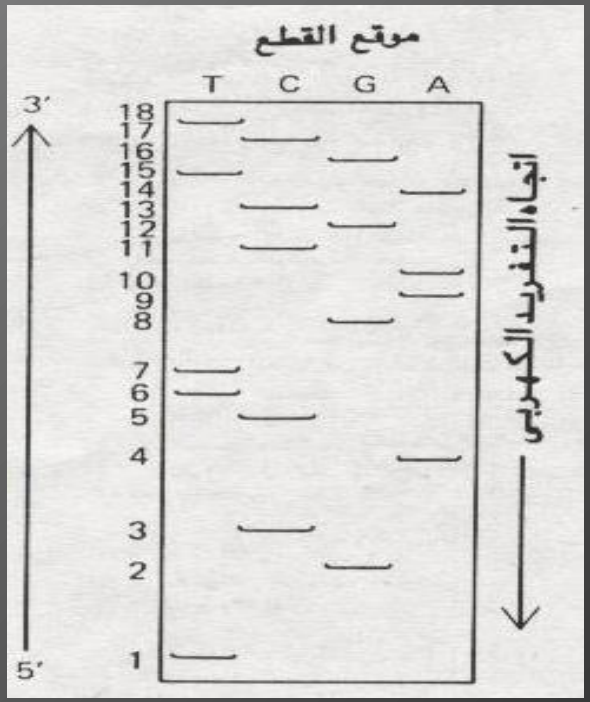
تحديد تتابعات القواعد في جزئ DNA

1. اكتشاف الأنزيمات المحددة واستعمالها في تحضير عينات متجانسة لقطع معينة من الكر وموسومات .
2. تطوير وتحسين طريقة التفريد الكهربائي إلى الدرجة التي يمكن بها تعيين قطع الـ DNA المختلفة عن بعضها في نيوكلتيدة واحدة في الطول .
3. اكتشاف تقنية إكثار الجين gene cloning أعطى فرصة عظيمة لتحضير كميات كبيرة من تتابعات الجين أو DNA المهم
4. اكتشاف طريقتان (كيميائية وأنزيمية) للتعرف بسرعة على تتابعات كثيرة من قطع الـ DNAوالتي لها طرف واحد مشترك (كل طرف به نفس النيوكلتيدة بالضبط) وينتهي عند كل المواقع الممكنة (كل نيوكلتيدة متعاقبة) عن الطرف الآخر

- فصل هذه القطع بناء على طول سلسلتها بواسطة التفريد الكهربائي بالبولي أكريلاميد
- أجريت أربعة تفاعلات متوازية منفصلة وكل منها ينتج مجموعة من القطع منتهية عند واحدة من القواعد الأربعة (A.G.C.T) من الـ DNA
- تعد هاتين الطريقتين سريعتين ودقيقتين لدرجة أنها أصبحت الطرق الأسهل لتحديد تتابعات الأحماض الأمينية عن طريق تحليل التتابعات الموازية للنيوكلتيدات في الجين المسؤول عن ذلك البروتين,حيث يتم تكوين c DNA بالنسخ العكسي على قالب m RNA باستخدام أنزيم النسخ العكسي Reverse transcriptase ، ثم يتم تحديد تتابعات القواعد على جزئ DNA المنسوخ c DNA وتحويلها إلى ما يوازيها من تتابعات الأحماض الأمينية.

الطريقة الكيميائية Chemical method طريقة ماكسيم وجيلبيرت

تصفى شظية DNA التي ستحدد تتابعات القواعد فيها ثم يتم تعليم نهاية واحدة فقط



خطوات تقنية تحديد تتابعات قواعد DNA بهذه الطريقة

الطريقة الإنزيمية Enzymatic method طريقة سانجر :

- تعتمد على التخليق الإنزيمي لنسخة تكميلية معلمة بالإشعاع للحمض الريبي النووي ناقص الأوكسجين أحادي السلسلة وتستعمل لهذا الغرض نسخة تكميلية قصيرة لا DNA أحادي السلسلة كممهد.
- يتم عشوائياً إدماج (َ2، َ3) داعي ديوكي ريبونيوكليوتيدات الثلاثية الفوسفات كمنهيات السلسلة عوضاً عن نوكليوتيد ناقص الأوكسجين ,
- بما أن (َ2، َ3) داي ديوكسي ريبونيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات تفتقد لمجموعة الهيدروكسيل الضرورية للرابطة الفوسفورية ديسترية التالية خلال امتداد السلسلة وبالتالي سوف يتوقف امتداد السلسلة كلما يدمج (َ2و َ3) ديوكسي نيوكليوتيد في السلسلة.

تتم هذه الطريقة باستعمال:

A. ´2، ´3داي ديوكسي ثيميدين ثلاثي الفوسفات (ddTTP)

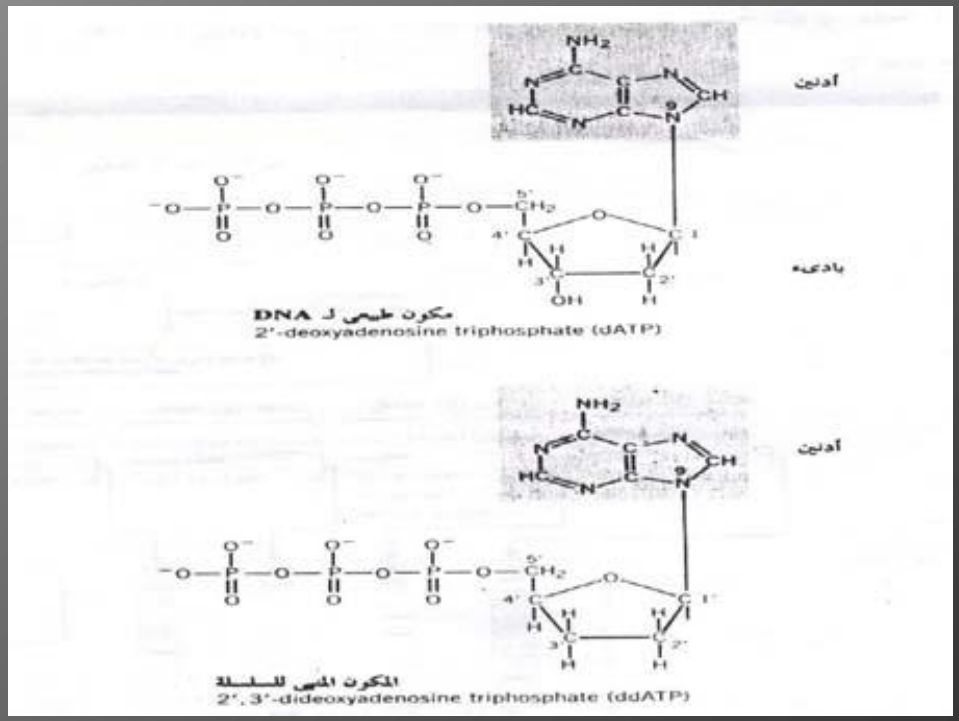
B. ´2، ´3داي ديوكسي سيتوزين ثلاثي الفوسفات (ddCTP)

C. ´2، ´3داي ديوكسي أدينوزين ثلاثي الفوسفات (ddATP)

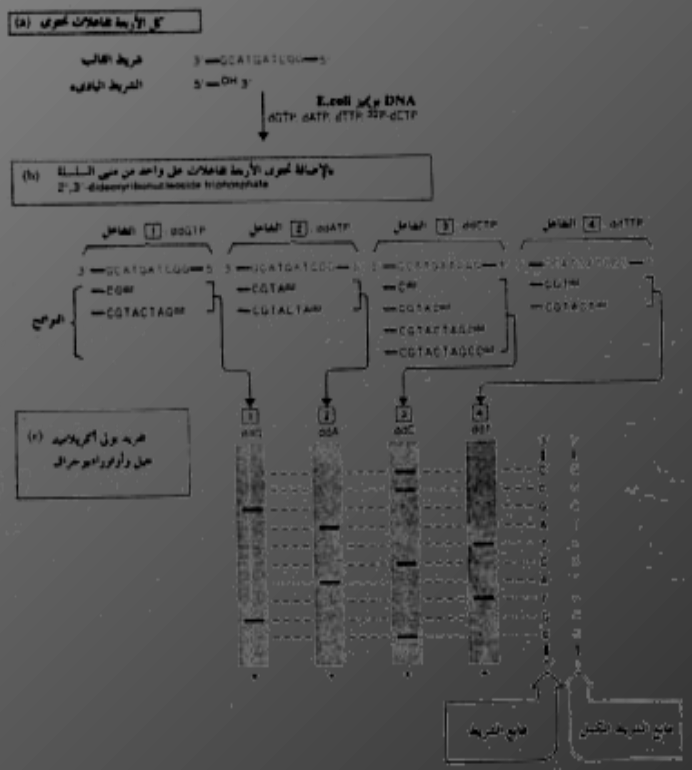
D. ´2، ´3داي ديوكسي جوانين ثلاثي الفوسفات (ddGTP)

- كمنهيات للسلسلة في الأربعة تفاعلات المختلفة للبناء البيولوجي لـ DNA وبالتالي سيتم الحصول على أربعة عشائر من الشظايا وكل عشيرة تحتوي على سلاسل تنتهي كلها بنفس القاعدة T.C.A.G

- تستعمل عادة شظية بوليمراز DNA 1- الكبيرة (شظية كلينو) التي تفتقد لنشاط أنزيمات الحمض النووي الخارجي 3َ – 5َ تستعمل في التفاعل للحفاظ على سلامة النهاية 5َ في الممهد
- تجرى من أجل تحليل تتابعات القواعد أربعة تفاعلات منفصلة في آن واحد (تفاعل لكل نيوكليوتيد) ويتضمن المزيج في كل تفاعل شظية كلينو ، الأربعة نيوكليوتيدات ناقصة الأوكسجين (ويكون واحد أو أكثر معلماً بـ 32P وواحد فقط من الأربعة نيوكلوتيدات ثاني ناقص الأوكسجين.
- بعد إنتاج قطع DNA الوليدة من الأربعة تفاعلات المتوازية فإنها تنطلق من الخيط القالب بواسطة التحلل ومن الممكن فصلهم بواسطة التفريد الكهربائي بواسطة جل البولي أكريلاميد وممكن تعيين موقعهم في الجل بواسطة التصوير بالإشعاع الذاتي سوف ينتج (سلماً) يشير إلى تتابعات النيوكليوتيدات لأطول سلسلة وليدة مختلفة ستذهب أقصر قطعة إلى أطول مسافة معطية حزمة



مقارنة ما بين تركيب DNA البادئ الطبيعي 2- deoxyadenosine triphosphate (dATP) ومنها ت السلسلة 2-3 dideoxyadenosine triphosphate(ddATP)َ المستعملة في تفاعلات التتابع لـ DNA



رسم تخطيطي يوضح تكتيك التتابع لـ DNA باستعمال dideoxyncleoside ◌َ 3–2◌َ داي دي أوكسي نيوكليوتيد ثلاثي الفوسفات كناهي للسلسلة (انظر الشكل 14–38) أجريت أربعة تفاعلات معاً على التوازي . كل منهم يحتوي على واحد من الأربعة نواهي السلسلة : (a) ddGTP . ddATP , ddCTP . ddTTP كل مخاليط التفاعل تحتوي على (1) خيط قالب . تكون تتابعات القواعد به معينة (2) خيط بادئ بمجموعة 3 هيدروكسيل حرة (غالباً ما تحصل عليه من القطع المحددة أو بالتمثيل الكيميائي

استعمال RNA (مضاد المعنى) لتنظيم تعبير الجين

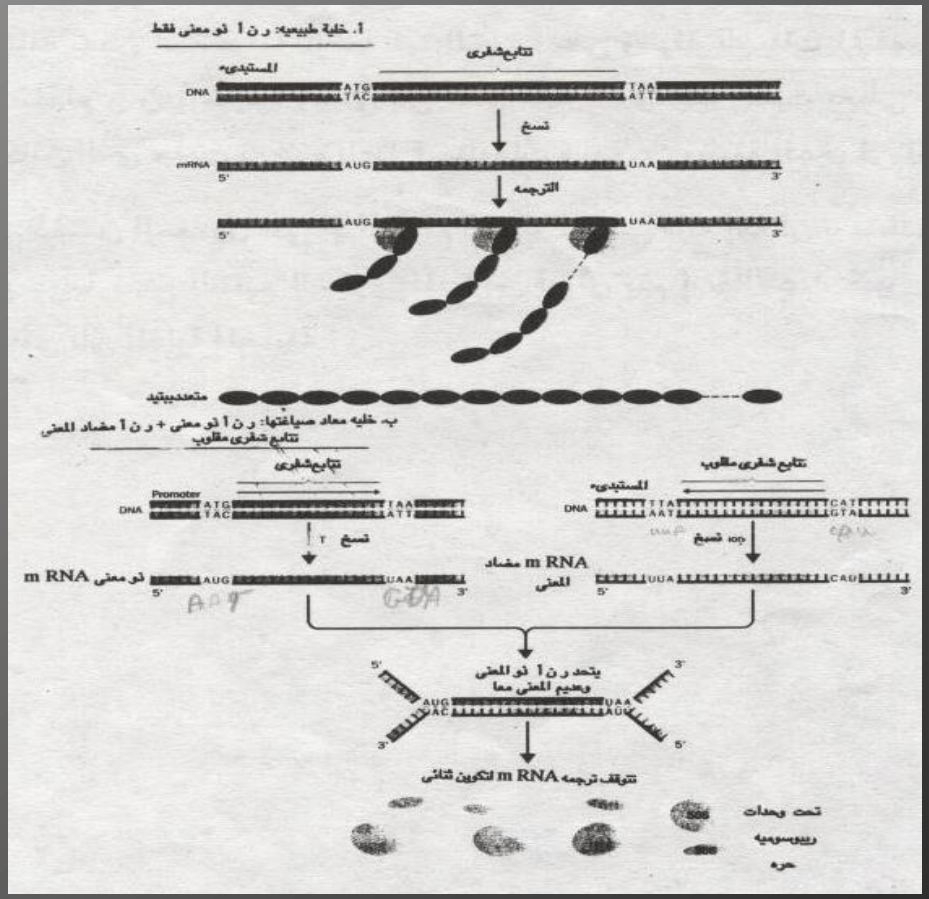
- تعتمد على بناء جزيئات من RNA متكاملة مع RNA المراسل m RNA الناتج من نسخ جين معين (RNA ذو معنى Sense RNA)نظراً لأنه يحمل الكودونات التي تتم قراءتها أثناء عملية الترجمة لإنتاج بروتين فعال
- يحتوي على تتابع نوعي من الأحماض الأمينية ومن جهة أخرى يطلق على النسخة المكملة من RNA (مضاد معنى) Anti sense نظراً لأن تتابع النيوكلتيدات بها يكون معكوس بالنسبة للتتابع على النسخة الأصلية مما يترتب عليه عدم إمكان قراءة كودونات شفرية صحيحة وذات معنى بل تقرأ على أنها كودونات إنهاء الترجمة في أي إطار قراءة من الأطارات الثلاثة لها

- يؤدي توافر RNA مضاد المعنى مع RNA المراسل الطبيعي لنفس الجين في سيتوسول الخلية إلى حدوث تجاذب نوعي بينهما بحيث ينتج جزيء مزدوج هجين من RNA وبديهي أنه لا يمكن ترجمة مثل هذا الجزيء المزدوج معاً يعني عدم الحصول على الناتج النهائي لتعبير هذا الجين (البروتين) وبالتالي يكون بمقدورنا تحديد وظيفة هذا الجين

طريقة إنتاج RNA مضاد المعنى لجين ما في الخلية

1. كلونة الجين المطلوب دراسته
2. فصل التتابع الشفري للجين عن منطقة البروموتور الخاص به باستخدام أنزيمات القطع المحددة المناسبة
3. إعادة اتحاد التتابع الشفري للجين مع نفس البروموتور ولكن في اتجاه معكوس التتابع
4. إعادة إدخال هذا التتابع المعكوس المتحد بالبروموتور ، أي الجين المضاد المعنى ، إلى الخلية المضيفة بإحدى طرق التحول الوراثي.

- المحصلة النهائية لهذه العملية هي أن الخلية المعكوس التتابع سيتم نسخه إلى نسخ من RNAمضاد المعنى وهذه بدورها عند اصطدامها بالنسخ الطبيعية لـ RNA المراسل لنفس الجين (ذو المعنى) تتزاوج معها مكونة جزيء RNA مزدوج لا يمكن ترجمته مما يؤدي إلى توقف إنتاج البروتين الذي يشفر له هذا الجين كما في الشكل



رسم تخطيطي لاستخدام (تقنية RNA) مضاد المعنى لإيقاف التعبير الجيني .
(إلى الأعلى) : خلية طبيعية يتم بها إنتاج سلسلة متعدد الببتيد (الناتج النهائي) من خلال عمليتي النسخ والترجمة .

- استخدام RNA مضاد المعنى في إيقاف تعبير عدد كبير من الجينات في كل من غير مميزة النواة ومميزة النواة
- استخدامه في إيقاف تعبير الجينات معروفة الوظيفة
- استخدامه أيضاً في التعرف على وظيفة الجينات المجهولة الوظيفة إذ يمكن استخدام RNA مضاد المعنى في إنتاج طفرات وظيفية بحيث يعطي الشكل المظهري الطافر للكائن الذي حدثت به هذه العملية معلومات هامة عن وظيفة الجين في الخلية المتأثرة.
- الحصول على إيقاف تام للتعبير الجيني فإنه إما أن يستخدم بروموتور قوي جداً لدفع عملية نسخ التتابع الشفري المعكوس أو أن يتم إدخال عدد كبير من نسخ RNAمضاد المعنى إلى الخلية المضيفة.

شكرا لإصغائكم