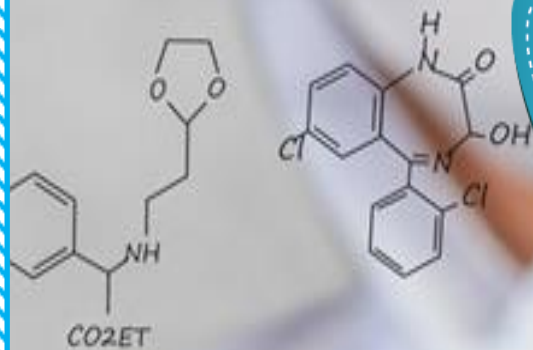
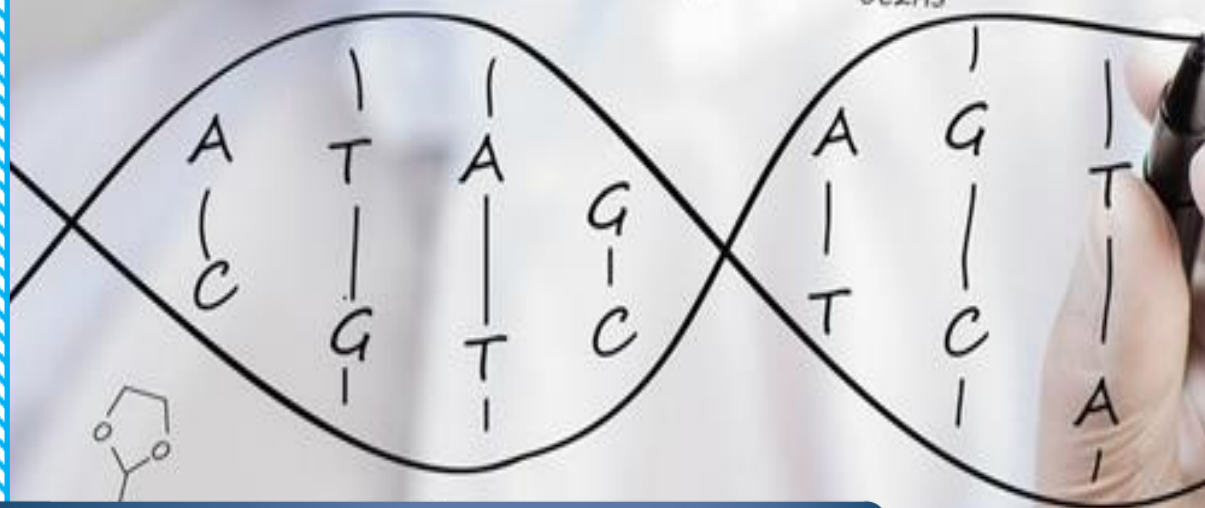
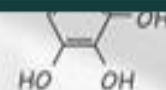


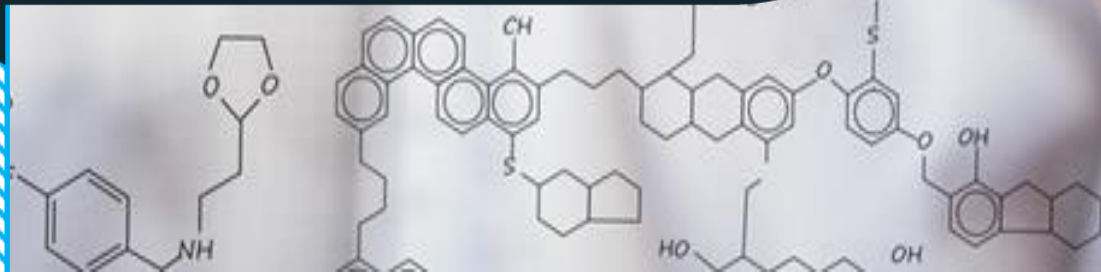
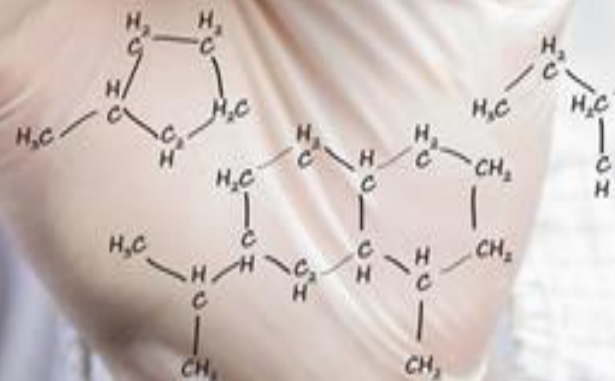
# تقنيات الهندسة الوراثية



NH<sub>2</sub> OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>



أ. د. عامر دباغ



## تقانات الهندسة الوراثية

إن تقدم علم الجينات ودراسة التعبير الجيني وصولاً إلى الهندسة الوراثية والتقانات الجزيئية لتتعرف على آلية التوريث وربطها بالنمط الظاهري لكثير من الأمراض وصولاً للتعرف على الطفرات وآليات حصولها (**التعبير الجيني**) وصولاً لعلاج الأمراض.

# تضخم الدنا: من خواص الدنا الأساسية:

المجين يحوي ٣ مليار شفع نيوكليوتيدي  
الاكسونات تحوي ٣ الاف شفع نيوكليوتيدي كلها تتوضع على  
٢٣ صبغي هذه الاعداد وصلنا إلى معرفتها باستخدام تقنية  
البوليميراز التسلسلي. **PCR**  
ادخالها ضمن الجراثيم الذي ينسخ الصبغى أو البلاسميد  
معتمداً على الدنا المأشوب.

# تفاعل البوليميراز الثقليدي

يعتمد تضخيم الدنا على الآتي:

- ١- فصل طاقى الدنا باستخدام برايمر (مشارع) نوعى
- ٢- فصل روابط الهدروجين باستخدام الحرارة العالية
- ٣- أنزيم البوليميراز ينتج طاقى دنا متممين للأصليين مثل  
تضاعف الدنا فى الخلية بحرارة ٣٧ مع الخلافات التالية:

- فصل الدنا وتحطيم الروابط الهيدروجينية بالتسخين لدرجة ٩٥
- المشاريع للدنا وليس للرنا ( بداية عمل البوليميراز)
- **أنزيم البوليميراز** المستخدم مستخلص من الجراثيم متحمل للحرارة عبر المراحل التالية:

١- فصل طاقي الدنا بحرارة ٩٥/٩٤ (تمسخ او صهر)

٢- ربط مشاريع الدنا في النهاية ٣ من طاقي الدنا (ارتباط)

٣- رصف النيكليوتيدات المتممة واطالة الدنا من ٥-٣ للطاق

الجديد وهي دورة واحدة وتكرر ٣٠/٢٥ خلال ساعات نحصل على

ملايين النسخ

الفصل للشدؑ يتم باستخدام الرحلان الكهربائي وهو دقيق  
يفصل بين نيوكليوتيد واخر على الهلام الاكريلاميدي ويتم  
الكشف عن الطفرات - نستخدم هلام اغاروزي بانايب  
شعرية دقيقة.

# تفاعل بوليميراز النسخ العكسي

نوع اخر لتفاعل البوليمراز وهو للربنا بدل الدنا ويتم من خلال:

١- استخدام مشارع عديد الثيمين

٢- أنزيم نسخ عكسي من الفيروسات القهقرية بهدف غرسه

بالمضيف بنفس آلية البوليميراز التقليدي يستخدم لكشف الايدز

# تفاعل البوليميراز الخطي الكمي

طور خطي تتراكم النواتج

طور الهضبة الاشباع يقاس عدد البدء للدنا

نفرق الخلايا الطبيعية عن السرطانية للثدي

باستخدام صبغات مفلورة.

تقانة الدنا المأشوب (اعادة الارتباط)



تعتمد أنزيم القطع أو التقييد الجرثومي (مواقع التعرف)

تشطر بشكل نوعي الدنا في الطاقين (شطر محدد ثابت)

الدنا المأشوب يعيد ربط جزئي الدنا المقطوعين بانزيم الليغاز

تطبق بإدخال جين في بلاسميد الجراثيم عبر شطر سلاسل الدنا

بهدف التضخيم

تتاليات البلازميد ترمز تتالي نيوكليوتيدي أول لجين بروتين

مقاوم للصادات الحيوية

التتالي الثاني يرمز أحد الأنزيمات (الملونة) أبيض- أزرق

تستخدم تقنية **التأشيب** لنقل الجينات البشرية للتعبير عنها في  
الجراثيم لإنتاج بروتينات بشرية ما شوية مثل هرمون الانسولين  
وهرمون النمو والبروثرميين

## سلسلة الدنا

تقنية يتم من خلالها تحديد تسلسلها للكشف عن  
الامراض والطفرات باستخدام واسمات شعاعية ثم مواد  
مفلورة وصولا لاستخدام رقاقت دنا .

السلسلة الآلية لسانغر مع كواشف المرصاف حسب:  
انزيم بوليميراز دنا مع كمية زائدة من النيكلوتيدات و تتم  
المرصاف- منهيات التفاعل اي عدم احتواء النيكلوتيدات

الهدر زكسيل

مشرع قصير متم للنهاية ٣

تضاف للأنابيب لصنع الدنا المتم

ترحل الانابيب على هلامه والرحلان الكهربائي

تسبر بشعاع ليزري ويقراً المجين البشري

## تقانة التهجين

كشف **دنا** أو **رنا** أو **بروتين** باستخدام كواشف موسومة  
(أضداد موسومة أو ربط ضد مع مولد ضد) منها تقانات:  
التبقيع - المصفوفات الدقيقة - التهجين في الموضع.

## تقانات التبيح ومن عبر المراحل

١

- فصل جزيئات مراد كشفها بالرحلان الكهربائي على الهلام
- نقل الجزيئات من الهلام الى غشاء نايلون او سللوز ليعترك بصمة ثابتة
- تهجين الغشاء بكواشف نوعية موسومة
- يكشف بالمكشافات معرفة الوسم والتبيح منها ساوترن - نورثن - ويسترن

## تتبع ساوثرن

ويتم عملياً كالآتي:

نقل نواتج الرحلان من الهلام إلى ورق خاص مثل ورق  
النشاف يحتوي مواد مفلورة ملونة لنقل شرائط الدنا إليها  
وتحديد الطفرات.

## تتبع نورثن

وهو مشابه لساوثرن في المبدأ باستثناء:

نكشف عن الرنا وليس عن الدنا - غشاء نايلون - الهلامية

آغاروز- مسابر الدنا موسومة لكشف جزيء الرنا المراد

معرفته - تستخدم لمعرفة التعبير الجيني (خلايا طبيعية أم

سرطانية).

## تتبع ويسترن

ويلخص كالتالي:

- ترحيل البروتين على الأكريلاميد
- غشاء نترولوز وليس نايلون لأنه يربط البروتينات
- التتبع يتم بتيار كهربائي
- يعتمد اعداد البروتينات وليس الواسمات
- يستخدم لكشف بروتينات في الخلايا والانسجة الحية.



# التهجين التآلقي في الموضوع (باستخدام الفلورسنت)

يستخدم لدراسة التعبير الجيني في النسج والخلايا

تحديد مواقع الدنا والرنا

التفاعل يتم بين مسبار نيوكليوتيدي موسوم وتتالي نيوكليوتيدي هدف  
متم له

يتم الكشف عن الهجن بالتصوير الشعاعي أو ملونات كيميائية نسيجية

يستخدم للكشف عن العوامل الممرضة ( جراثيم- فيروسات)

يستخدم المجهر المفلور

تستخدم لكافة أطوار دورة حياة الخلية بهدف إظهار الصبغيات خلال مراحل الإنقسام وكذلك بعض الأورام الصلبة.

## أنواع المسابر

- مسابر **سائلة** ترتبط مع القسيم المركزي
- مسابر **رسم** تصبغ صبغي معين
- مسابر **تتالي نوعي** لكشف صبغي أو أمراض
- من التطبيقات الكشف عن **صبغي فيلادلفيا** (ابيضاض الدم) إما أن تلون الصبغيات أو النواة بشكل واضح لاستخدامها الفلورة.

# المصفوفات الصغرى

تستخدم لمقارنة آلاف الجينات بنفس الوقت  
تعتمد ربط شدة الدنا بقطع من جينات مختلفة على صفائح زجاجية  
ثم تهجن بدنا موسوم للربنا المرسل وبعدها نقوم بقياس كمي  
تحدد أنواع السرطانات ليحدد من خلالها التعبير الجيني التفاضلي  
المصفوفات تكون ل: بروتينات - نسج - تستخدم أطباق صغيرة  
تحتوي ثقوب.

# تشخيص الأمراض الوراثية الجزيئي

إما عن طريق تحليل **الدنا** أو **الرنا** أو **البروتين**

ويتم في مخابر المشافي والمراكز البحثية من خلال:

✓ دراسة شجرة العائلة وقصة المرض.

✓ فحوص مخبرية جزيئية للدم والنسج.

✓ تشخيص جزيئي (نمط نووي - طفرات - تضخيم الدنا

أو تفاعل البوليميراز).

# الكشف عن الطفرات بالانزيمات

استخدام البوليميراز مع أنزيمات القطع

التعرف بأنزيمات التقيد

التعرف على الألائل السليمة والمريضة

التعرف على النيكليوتيدات طافرة أم طبيعية

يمكن استخدام أنزيمات غير نوعية - نيوكلياز - لشطر

غير نوعي.

# كشف الطفرات بالاستشراب اللوني السائل

تستخدم عبر طورين:

**الأول ثابت** يستخدم مادة البوليسثيرين

**الثاني متحرك** يستخدم الاسيتو نتريل التي تربط الدنا في عمود

الاستشراب بدرجة حرارة ٥٠ حيث تخرج قطع الدنا الأصغر

فالأكبر (تستخدم لظفرات الاستبدال)

تتم بتفاعل البوليميراز ثم يتم صهر منتجات التفاعل وإعادة

ربطها بحرارة منخفضة لتشكل مثنيات مختلفة.

## كشف الطفرات عن طريق تحليل منحنى الانصهار

بعد إجراء البوليميراز تصهر النتائج باستخدام صبغات مفلورة

منحنى الانصهار يختلف حسب التركيب النيوكليوتيدي

نقطة الانصهار يكون مكان وجود الطفرة

ما ورد يحدد ويكشف الطفرة لكن لا يحدد النيكليوتيد المستبدل أو

المحذوف

**المعالجة الجينية:** تعني تصحيح الخلل الجيني بالاستبدال مثل عوز

المناعة عند الأطفال (غياب فعالية أنزيم أدينوزين دياميناز)

نقص مناعة خلطي وخلوي مع تعرض المريض لانتانات استخدمت تقوية الفيروسات القهقرية وعدوى الاطفال رفع المناعة لكن نتج عنها اصابات سرطانية بسبب الفيروس المستخدم امراض (التليف الكيسي- الحثل العضلي- الناعور....)

**المعالجة الجينية :** تتم اما داخل العضوية من خلال حقن الفيروس المعدل أو الخارجية تعتمد إخراج خلايا المريض عدوى بالفيروس ثم إعادة الخلايا للجسم لتعبر الجينات عن ذاتها مثل خلايا نقي العظام إلى الدم تعاد أو إخراج خلايا تائية وإعادتها بعد العدوى الفيروسية مثل مرض الإيدز



## المتعضيات المحورة وراثياً

هو تعديل في كافة المستويات (نبات – حيوان - جراثيم)  
إلغاء دور جين واستبداله باخر  
استبدال نواة يودي للاستنساخ  
أولاً: إقصاء جين أو استبعاده

تضخيم الجين بتفاعل البوليميراز ومشارع خاص (برايمر)  
غرس تتالي جين اخر مثلا مقاوم للنيومايسين  
نقل الجين المعطل لخلايا فار جنينية عبر التاشيب  
انتقاء الخلايا الايجابية لتشكل فيما بعد خلايا او انسجة طبقت  
عليها مثل الناعور والصادات الحيوية.

ثانيا اضافة جين ويتم كالاتي:

- حقن قطعة دنا ماشوب في البويضة قبل الاخصاب او النطفة

- نقل الزايعوت لام بديلة

مثال الجين المسؤول عن هرمون النمو البشري حيث ادى لتضخم

الفئران

ثالثا نقل النواة الجسدية والاستنساخ:

سببمان وتجاربه على بيوض الضفادع

التكاثر اللاجنسي ( الاستنساخ ) النعجة دولي

سمي استنساخ تكاثري ويوجد الاستنساخ العلاجي

تستخدم في الطب التجديدي

في الطب الدوائي ايضا يستخدم لانتاج هرمون النمو البشري في

حليب الماعز ثالثا نقل النواة الجسدية والاستنساخ:

سببمان وتجاربه على بيوض الضفادع

التكاثر اللاجنسي ( الاستنساخ ) النعجة دولي

سمي استنساخ تكاثري ويوجد الاستنساخ العلاجي

تستخدم في الطب التجديدي

في الطب الدوائي ايضا يستخدم لانتاج هرمون النمو البشري في

حليب الماعز

وتتم عبر المراحل:

- حقن الدنا في نواة احدى البيوض
- نقل الزايجوت المعدلة وراثيا لام بديلة
- تنتج الام بعد الولادة حليب غني بالهرمون
- تستخدم لإنتاج بروتينات علاجية (امراض الدم التليف الكيسي- السرطانات)
- من العنكبوت (خيوط الحرير) للماعز لإنتاج بروتين يحوي خيوط الحرير لاستخدامها في البزات العسكرية مقاومة للرصاص ٥ مرات وخفيفة الوزن .