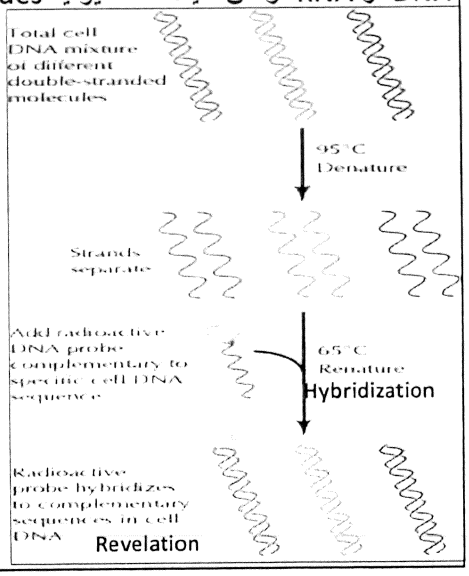
يمكن كشف تسلسل محدد من DNA باعتماد على مبدأ تهجين الحموض النووية.

تسلسل معين يمكن كشفه بين ملاين التسلسلات الأخرى بوساطة مسابر probe موسوم من DNA أو RNA أو من قليلات النكليوتيد Oligonucleotides.

تمسخ عينة من DNA برفع درجة حرارتها إلى الدرجة ٩٥مْ مما ينتج عنها جزيئات أحادية الشريطة تدعى ماتركس **Matrix**.

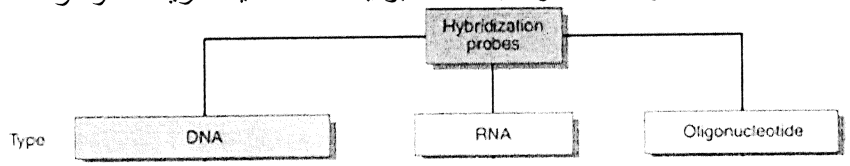
يضاف مسبار موسوم labeled **probe** وتخفض درجة الحرارة إلى درجة الانصهار المناسبة للمسبار، مما يسمح للمسبار بالتشافع pairing مع الشرائط المتممة من DNA وهذا ما يعرف بالتهجين بين المسبار والتسلسل المتتام من الماتركس.

الكشف عن الوسم يسمح بتحديد وجود الجزيئات ثنائية الشريطة double-stranded molecules.



أنماط المسابر المستعملة في التهجين

مسابر من DNA أو RNA أو قليلات نكليوتيدات، أحادية شريطة موسومة



DNA & RNA labeling
وسم DNA و RNA

نكليوتيدات موسومة بنظير مشع

نظائر مشعة:

3H

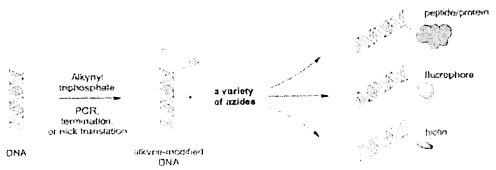
14C

32P

35S

النظير الثقيل: 15N

نكليوتيدات موسومة بمواد غير مشعة



الوسم المشع

نكليوتيدات موسومة بالفوسفور المشع ^{32}P

In vivo labeling: Cell culture

- تقديم للخلايا المزروعة وحدات بناء DNA وRNA موسومة (مشعة)، تيميدين لوسم DNA ويوريدين لوسم RNA.
- يجب أولاً إفقار الوسط بالوحدات غير الموسومة.
- يتم وسم الجزئيات أثناء اصطناعها (على طولها).
- وسم قصير أو طويل الأمد.

In vitro labeling:

يمكن الوسم أثناء الاصطناع أو بعد الاصطناع.
يمكن وسم RNA على طوله أثناء انتساخه في الزجاج.
يمكن وسم DNA على طوله بوساطة PCR.

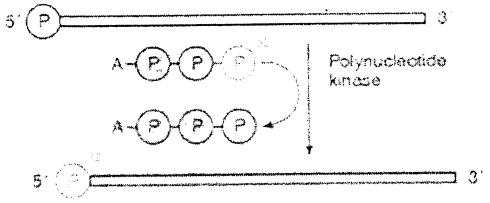
الوسم المشع

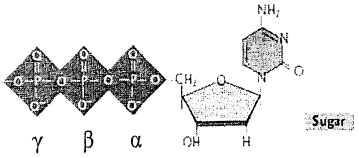
نكليوتيدات موسومة بالفوسفور المشع ^{32}P

الوسم بعد الاصطناع:

وسم النهاية 5′:

يحوي DNA زمرة فوسفات واحدة وRNA عديم القبعة ٣ زمر.
باستعمال بيروفوسفاتاز يمكن إزالة هذه الزمر والحصول على نهاية 5′ تحوي زمرة OH، بعدها يمكن استعمال كيناز (T4 بولينكليوتيد كيناز) بوجود ATP $\gamma^{32}P$، الذي يقوم بنقل أخر زمرة فوسفات من جزيء ATP إلى النهاية نهاية 5′ الحاوية على OH.





الوسم المشع

نكليوتيدات موسومة بالفوسفور المشع ^{32}P

الوسم بعد الاصطناع:

وسم النهاية 3′ :

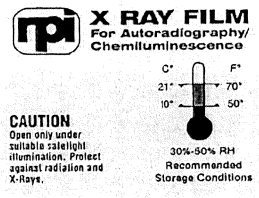
❑وسم DNA يستعمل **أنزيم ديزوكسي نكليوتيديل ترانسفيراز**، الذي يسمح بإضافة نكليوتيدات حرة إلى النهاية 3′ الحاوية على زمرة OH ولذلك نستعمل أحد النكليوتيدات الحرة ثلاثية الفسفات موسومة بالفوسفور المشع في الموقع ألفا مثل $dCTP\alpha^{32}P$.

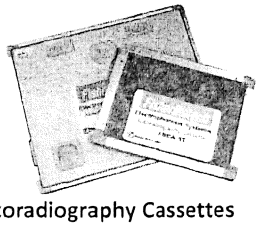
❑وسم RNA باستعمال **أنزيم الليغاز** بتراكيز منخفضة وبوجود نكليوتيدات مفسفرة يقوم بإضافة النكليوتيدات إلى النهاية 3′ ولتفادي الإضافة إلى النهاية 5′ تستعمل نكليوتيدات مسفرة من النهاية 3′ مثال $PCTP\alpha^{32}P$.

Autoradiography التصوير الإشعاعي الذاتي

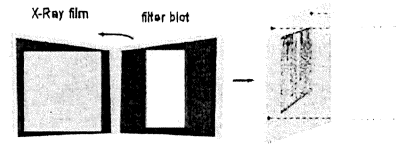
هي طريقة تستعمل لكشف المواد المشعة المثبتة على حامل صلب، عن طريق استعمال أفلام x-ray حساسة لإصدارات الإشعاعية الناتجة عن التفكك الذاتي للمادة المشعة.

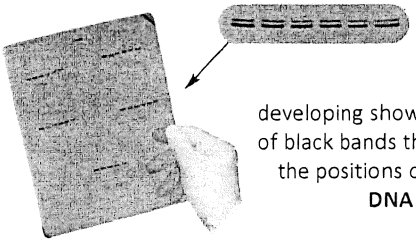
radioactively-labeled biological material makes a "*self-picture*" by exposing X-ray film





Autoradiography Cassettes





developing shows a pattern of black bands that indicate the positions of labeled **DNA**

Revelation of non radiolabeled Probes

إظهار الوسم غير المشع: الوسم بمواد مفلورة أو بجزيئات لها أضداد نوعية مرتبطة بأنزيمات، معروف لها ركائز مولدة للون، تعطي بنتيجة التفاعل الأنزيمي لون مميز.

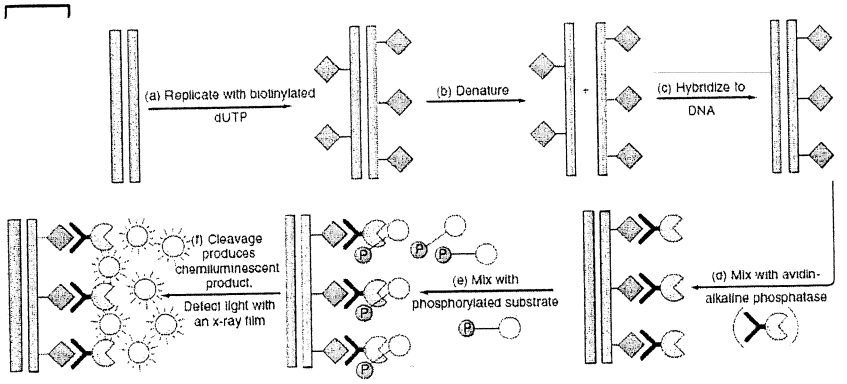
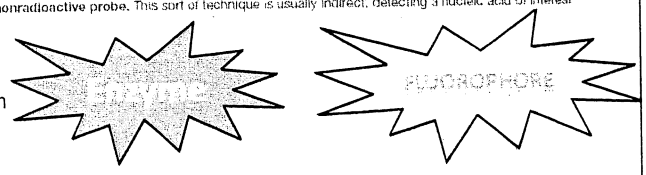


Figure 5.11 Detecting nucleic acids with a nonradioactive probe. This sort of technique is usually indirect, detecting a nucleic acid of interest

Bromodeoxyuridine

BrdU, DiG, ... Antibodiy System

Biotin/streptavin System

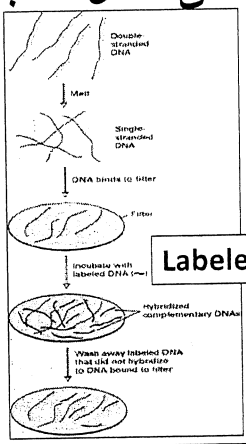


hybridization as tool for molecular biology research

أهم تقانات البيولوجيا الجزيئية المعتمدة على مبدأ التهجين:

-التهجين على حامل صلب (التبصيم Blotting):

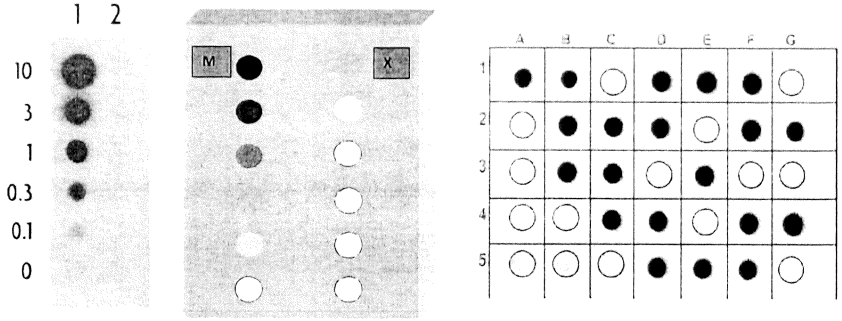
- ❑Dot Blot
- ❑Southern Blot
- ❑Northern Blot



Labeled DNA = Probe

❑Dot Blotting

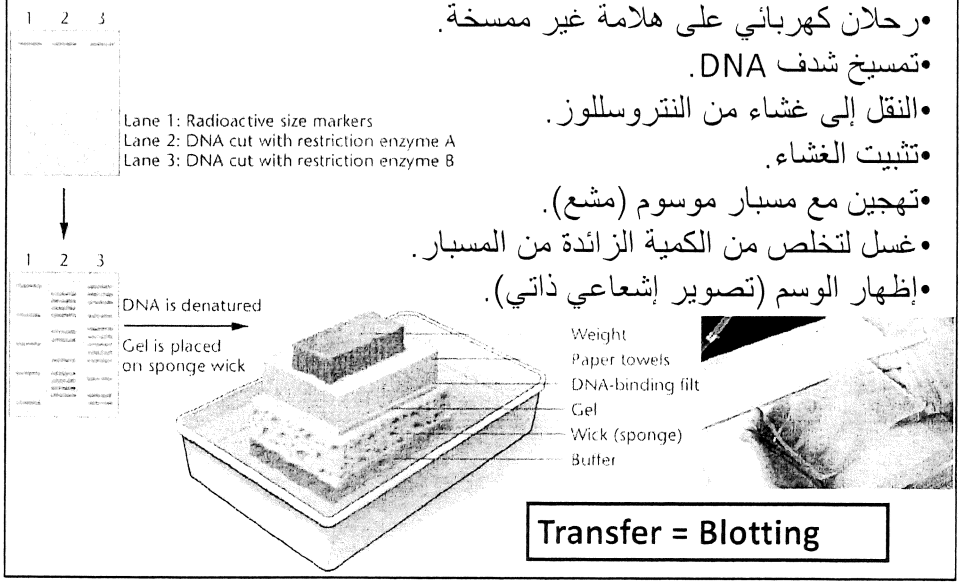
يثبت DNA أو RNA على حامل (غشاء من النتروسللوز) بشكل بقع ويهجن مع مسبار موسوم من DNA أحادي شريطة أو RNA أو قليلات النكلوتيدات.
في حال تثبيت DNA ثنائي شريطة يمسخ مباشرة على الغشاء.
يمكن بوساطة هذه الطريقة كشف عن وجود تسلسل معين ضمن الجينوم، كشف التعبير الجيني عن جين معينة ضمن نمط خلوي معين، حساب "كمي" لرسيل معين .....



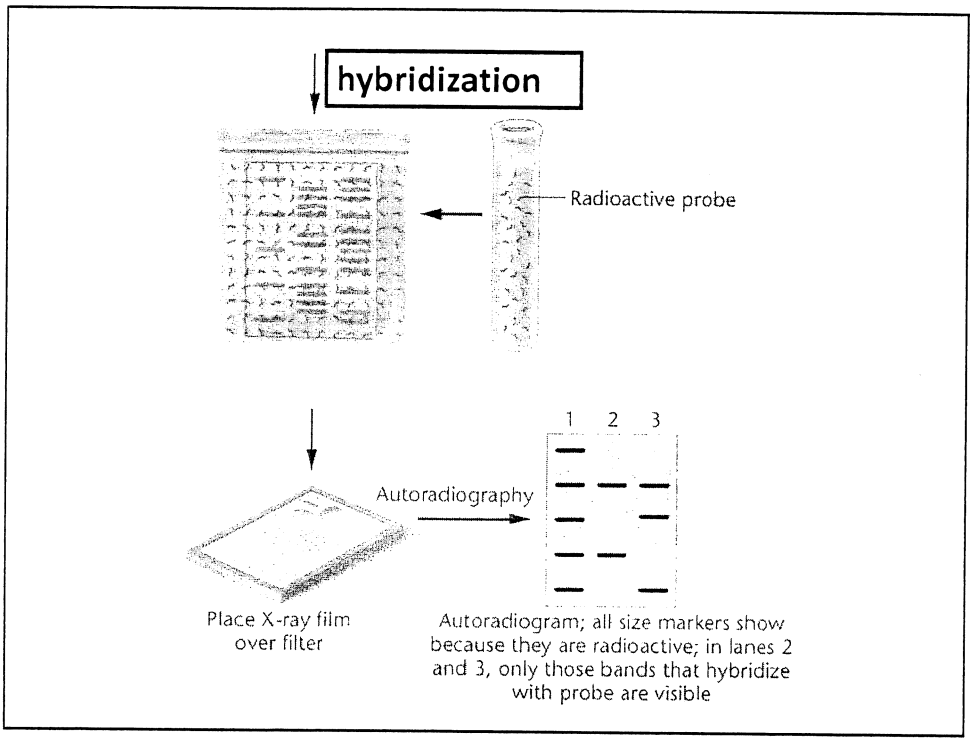
❑Southern Blotting

Edwin Southern

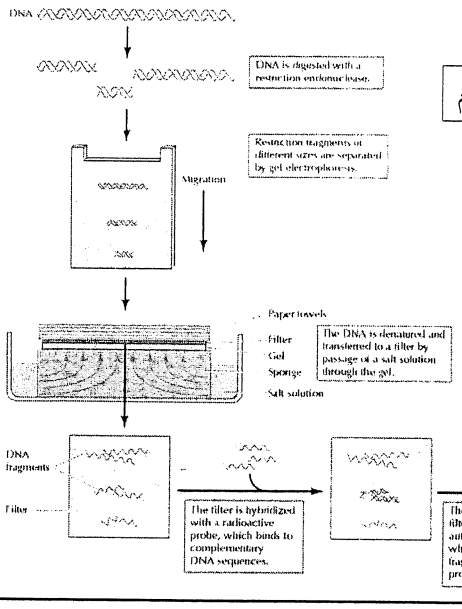
- هضم DNA الجينومي بوساطة أنزيم تقييد أو أكثر.
- رحلان كهربائي على هلامة غير ممسخة.
- تمسيخ شدف DNA.
- النقل إلى غشاء من النتروسللوز.
- تثبيت الغشاء.
- تهجين مع مسبار موسوم (مشع).
- غسل لتخلص من الكمية الزائدة من المسبار.
- إظهار الوسم (تصوير إشعاعي ذاتي).



Transfer = Blotting



❑Southern Blotting



كشف وجود تسلسل معين على الجينوم

مسبار موسوم من DNA أحادي شريطة أو RNA أو قليلات النكلوتيدات

❑Northern Blotting

- استفراد RNA من نمط خلوي معين.
- رحلان كهربائي على هلامة ممسخة، لتخلص من البنى الثانوية
- النقل إلى غشاء من النتروسللوز.
- تثبيت الغشاء.
- تهجين مع مسبار موسوم (مشع).
- غسل لتخلص من الكمية الزائدة من المسبار.
- إظهار الوسم (تصوير إشعاعي ذاتي).

مسبار موسوم من DNA أحادي شريطة أو RNA أو قليلات النكلوتيدات.

كشف وجود RNA معين في خلية.

Probes can be used to detect specific macromolecules

كيف ستكون النتائج في الحالات التالية:

١. عدم وجود الجين على الجينوم.
٢. عدم انتساخ الجين.
٣. عند انتساخ الجين وعدم ترجمة البروتين.
٤. عند حدوث طفرة نقطية لا تلغي انتساخ وترجمة البروتين.
٥. عند حدوث طفرة نقطية تخلق كود توقف بدل الحمض الأميني الثاني.

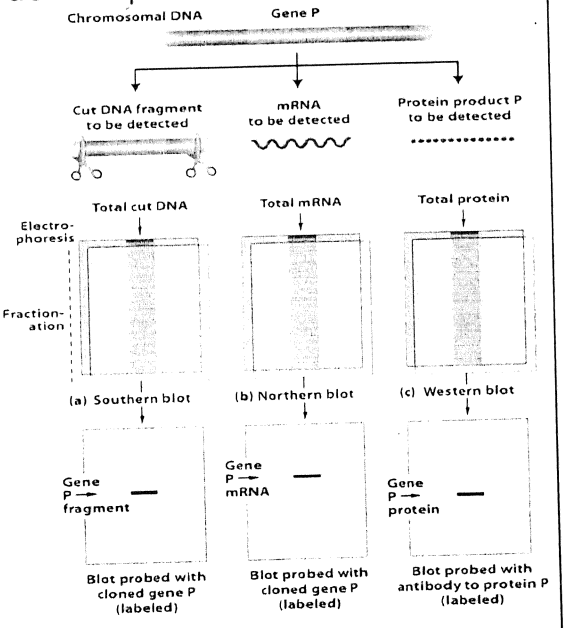
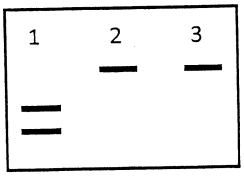


Figure 1-21
Introduction to Genetic Analysis, Tenth Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

لنبرهن على وجود الجين X والتعبير عنها لدى عددٍ من المتعضيات، نقترح اصطناع مسبار جزيئي بطول ١٠٠ نكليوتيد، يتشافع مع جزء من التسلسل المرمز لهذا الجين، ومن ثم استعماله في تجارب Southern Blotting.

Southern Blotting

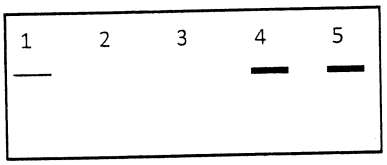


1 - Chick
2 - Mouse
3 - Human

فسر هذه النتائج.

نستخدم تجربة Northern Blotting لدراسة التعبير عن الجين في خلايا بعض النسج لمتعضية واحدة. الصورة التي حصلنا عليها بالتصوير الإشعاعي الذاتي موضحة في الشكل التالي:

Northern Blotting



1 - Hepatic cells
2 - Nerves cells
3 - Erythrocytes
4 - Embryonic cells
5 - Bone Marrow cells

فسر هذه النتائج.

ما هي الوظيفة التي يمكن أن تقترحها لهذا الجين ؟