الجامعة السورية الخاصة
SYRIAN PRIVATE UNIVERSITY

كـلـيـــة الصيدلة
Faculty of Pharmacy

السنـة الثالثة

مقرر الهندسة الوراثية (الجينية)

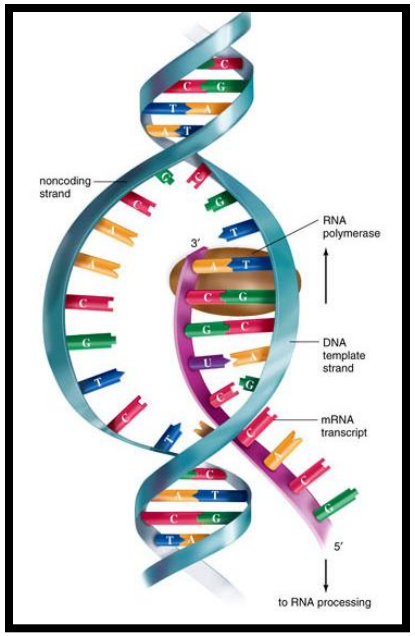
المحاضرة السابعة

2019-2020

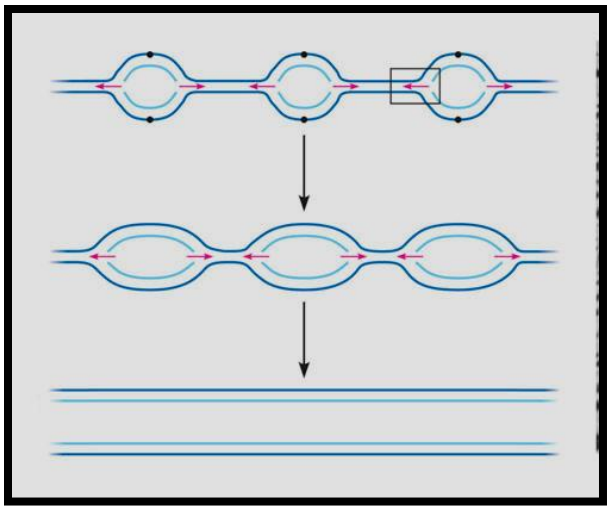
د. شادي سكرية

Nucleic acid hybridization assays
المقايسات المعتمدة على تهجين الأحماض النووية

أثناء تضاعف DNA وأثناء الانتساخ تنفصل شريطتي الحلزون المزدوج بشكل مؤقت transiently وبشكل عكوس reversibly حيث تعود وترتبطان معاً من جديد بعد انتهاء الحادثة البيولوجية.



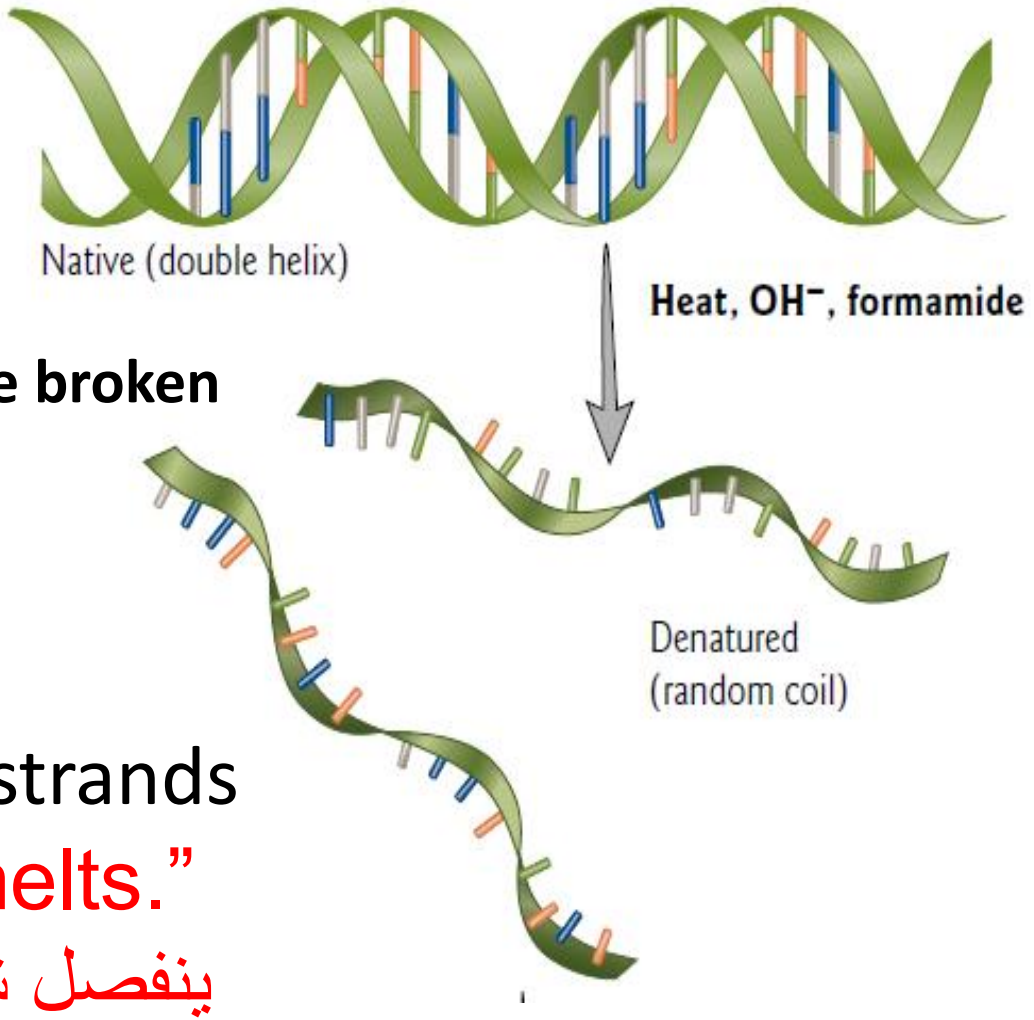
transcription



DNA replication

تمكن هذه السمات التي يتمتع بها DNA في الوسط الحي *in vivo* من التعامل معه manipulation في الزجاج *in vitro* وذلك بفصل الشريطين بشكل صنعي وإعادة تشافعهما من جديد

Denaturation or “melting” التمسخ أو الانصهار



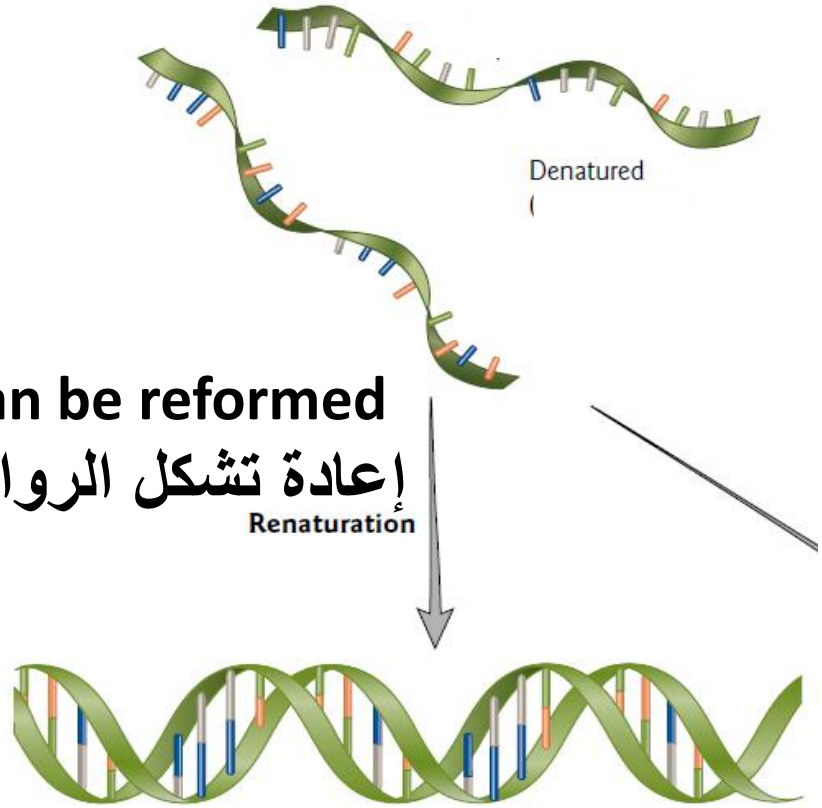
The hydrogen bonds can be broken
تحطم الروابط الهيدروجينية

separation of DNA strands

The molecule “melts.”

ينفصل شريطي DNA فتنصهر الجزيئات

“Renaturation” or “annealing” إعادة التشافع



When heated solutions of denatured DNA are slowly cooled, single strands often **meet their complementary** strands and form a new double helix.

عندما تُبَرَد المحاليل الساخنة الحاوية على DNA مُمَسَخ، ببطء، كل شريط مفرد يعود ويتشافع مع الشريط المتمم، ليعود ويتشكل حلزون مزدوج من جديد.

This strand separation of DNA changes its absorption of ultraviolet (UV) light in the 260 nm range

زيادة في الامتصاصية مع ارتفاع درجة الحرارة أي مع التمسخ التدريجي، من الممكن الاستفادة من هذه الخاصية لرسم منحني حركية تمسخ جزيء من DNA ثنائي الشريط.

منحني التفكك سيني مع نقطة انعطاف تكون عندها نصف كمية DNA ثنائية الشريطة ونصفها أحادية تعرف عندها هذه النقطة **بدرجة حرارة الانصهار**

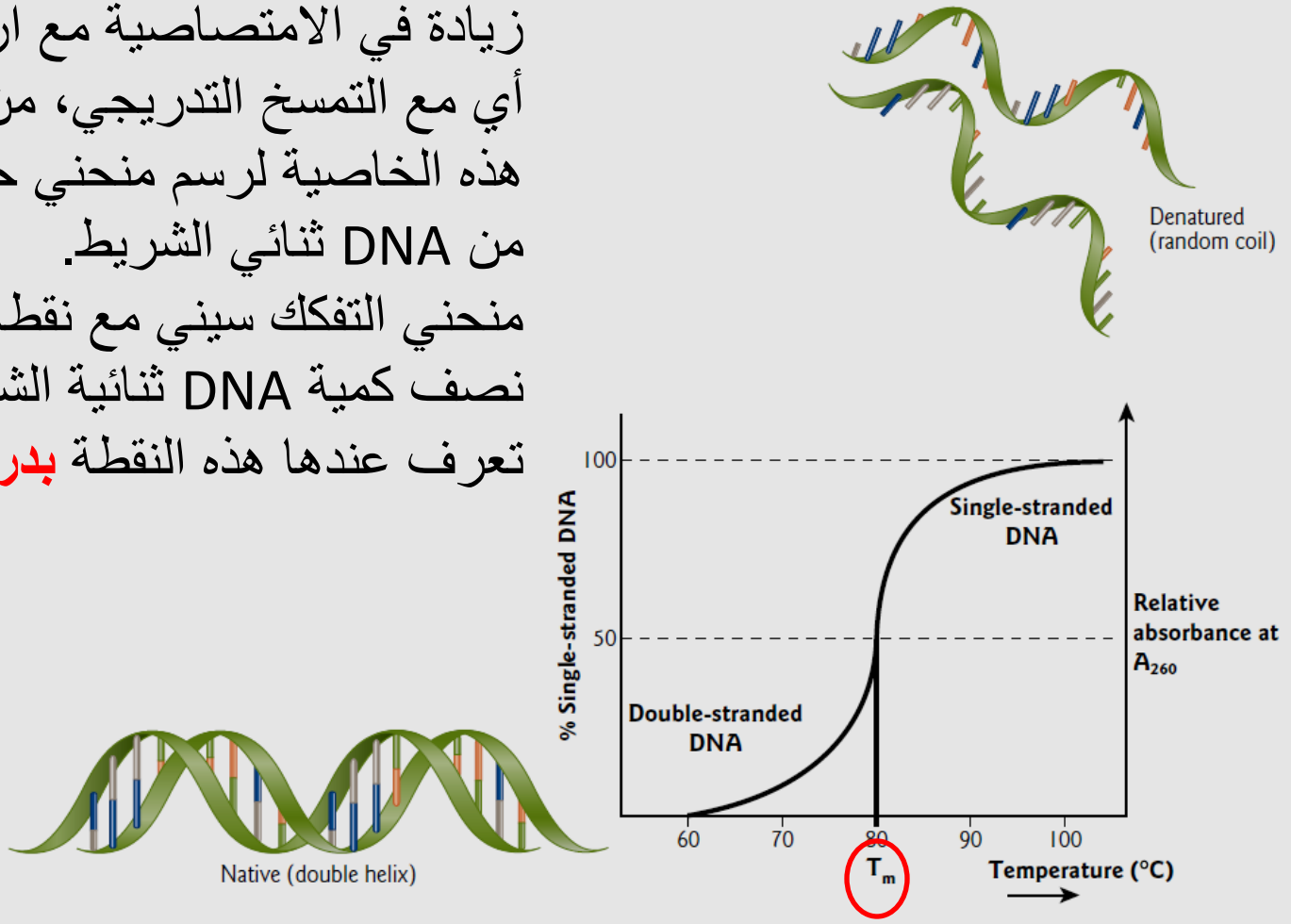


Figure 2.10 DNA denaturation curve. Double-stranded DNA is heated and its melting is measured by the increase in absorbance at 260 nm. The point at which 50% of the DNA is single-stranded is the melting temperature, or T_m. In this example, the T_m is about 80°C.

This strand separation of DNA changes its absorption of ultraviolet (UV) light in the 260 nm range

- زيادة في الامتصاصية مع ارتفاع درجة الحرارة أي مع التمسخ التدريجي، من الممكن الاستفادة من هذه الخاصية لرسم منحني حركية تمسخ جزيء من DNA ثنائي الشريط.
- منحني التفكك سيني مع نقطة انعطاف تكون عندها نصف كمية DNA ثنائية الشريطة ونصفها أحادية
- تعرف عندها هذه النقطة **بدرجة حرارة الانصهار**

The temperature at which half the bases in a double-stranded DNA sample have denatured is denoted the **melting temperature (*Tm*)**

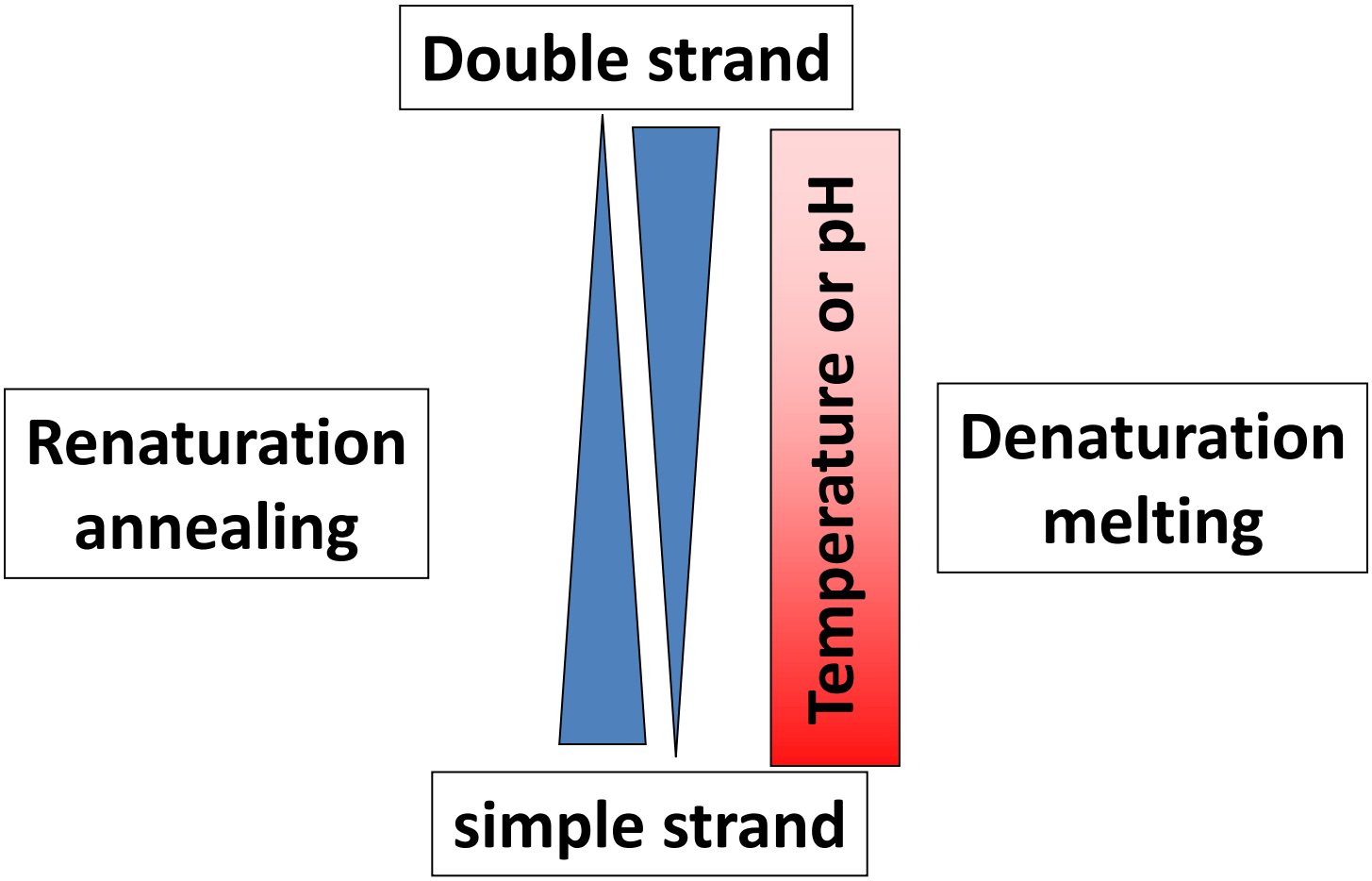
تدعى درجة الحرارة التي توجد عندها نصف كمية عينة DNA بشكل ثنائي الشريطة بدرجة حرارة الانصهار.
وهي درجة حرارة حرجة جداً.

- ستؤدي أي زيادة قليلة في درجة الحرارة فوق درجة حرارة الانصهار (Tm) إلى انفصال تام للشريطين عن بعضهما البعض

- ويحدث الانصهار بسرعة كبيرة على الطول الكامل لجزيء DNA.

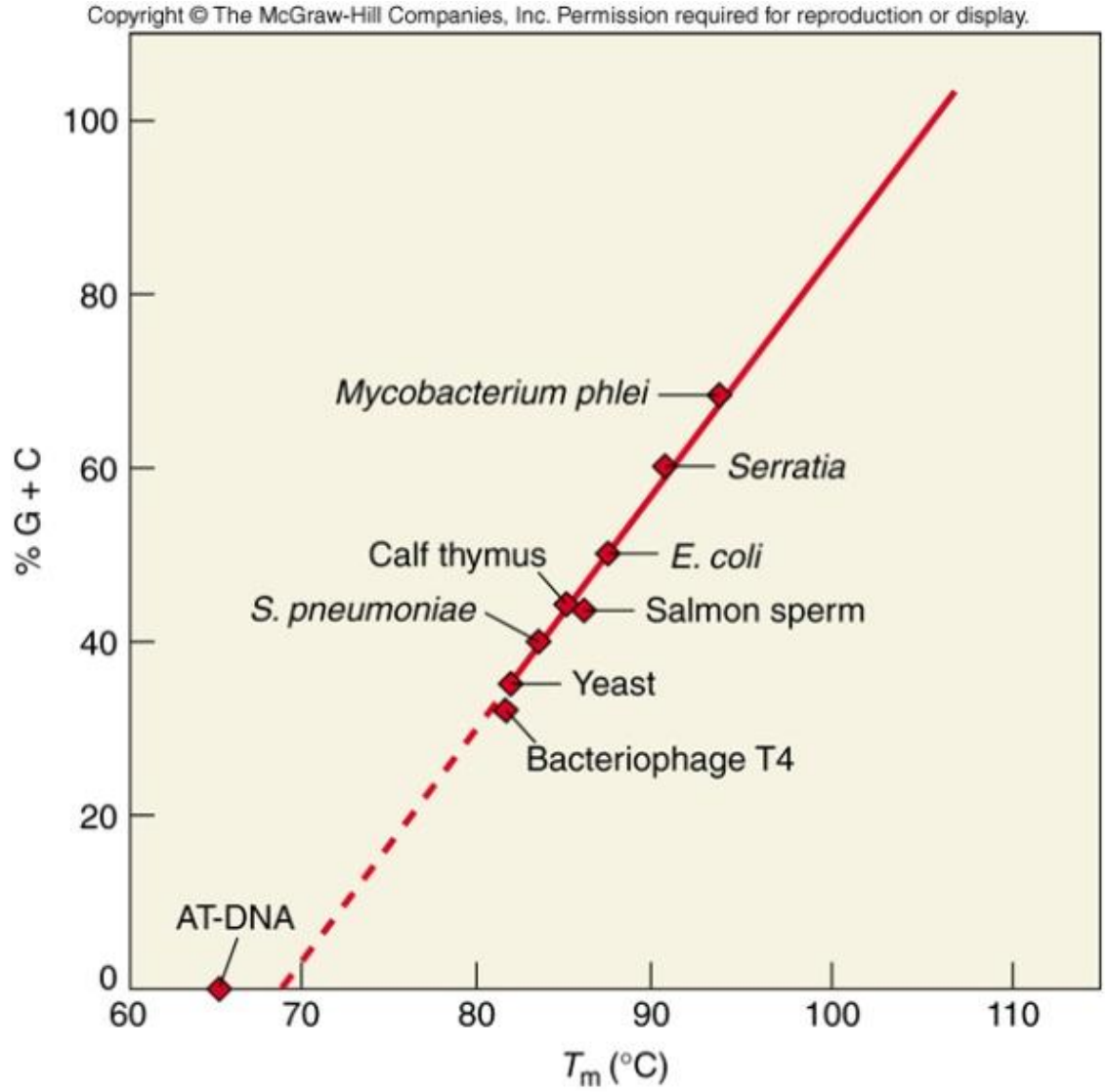
بالإضافة للحرارة يمكن تمسخ DNA بطرق أخرى مثل:

- رفع درجة pH (الأوساط القلوية).
- استعمال المحلات العضوية organic solvents مثل Formamide.



العوامل المؤثرة على Tm :

- محتوى الجزيء من G/C والعلاقة بينهما طردية.



العوامل المؤثرة على Tm :

- أثر الوسط المحل لـDNA:

- الأملاح: انخفاض تركيزها (انخفاض القوة الأيونية للدارئة)←انخفاض Tm.

ليس للشوارد الموجبة أحادية التكافؤ في التراكيز الملحية العالية 1M فما فوق أي أثر ملموس على Tm.

- المحلات العضوية خاصة الفورم أميد، حيث يخفض هذا المركب بشدة Tm. محلول يحوي 50% فورم أميد يخفض Tm بحوالي 30مْ.

Nucleic acid hybridization assays

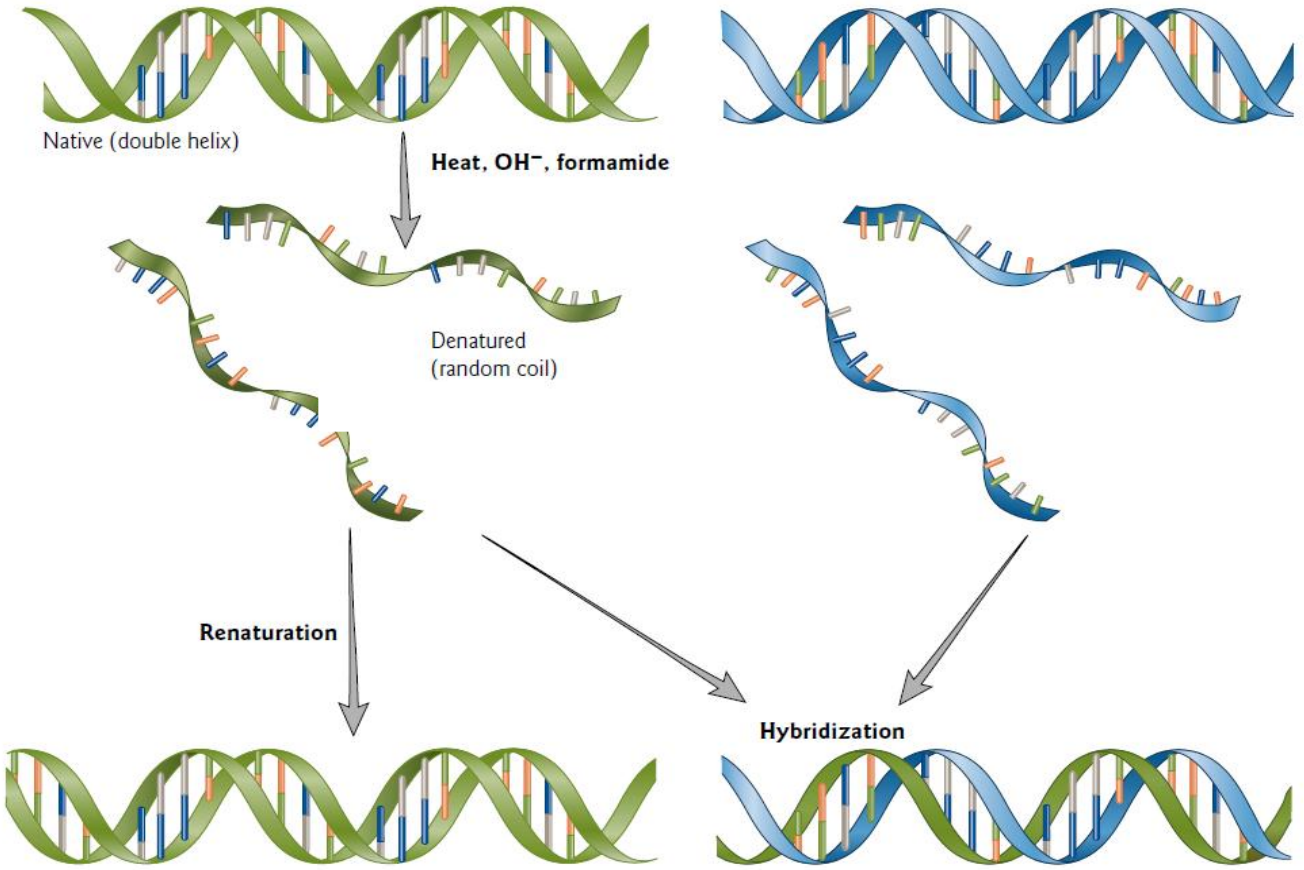


Figure 2.9 The denaturation, renaturation, and hybridization of double-stranded DNA molecules. DNA is denatured to separate the two strands. The denatured DNA molecules are allowed to renature (anneal) by incubation just below the melting temperature. Alternatively, denatured complementary DNA from two different sources can be hybridized.

DNA الممسخ (أحادي الشريطة) والمتتام من مصدرين مختلفين يمكن لهما أن يتهجنا

التهجين: تشكيل لجزيء ثنائي الشريطة بتشافع شريطين من مصدرين مختلفين

Hybridization التهجين

تشافع الأسس base pairing المتتامة لشريطتين مفردتين من مصدرين مختلفين two different sources

2 conditions necessary & sufficient :

الشرطين الضروريين والكافيين لحدوث التهجين

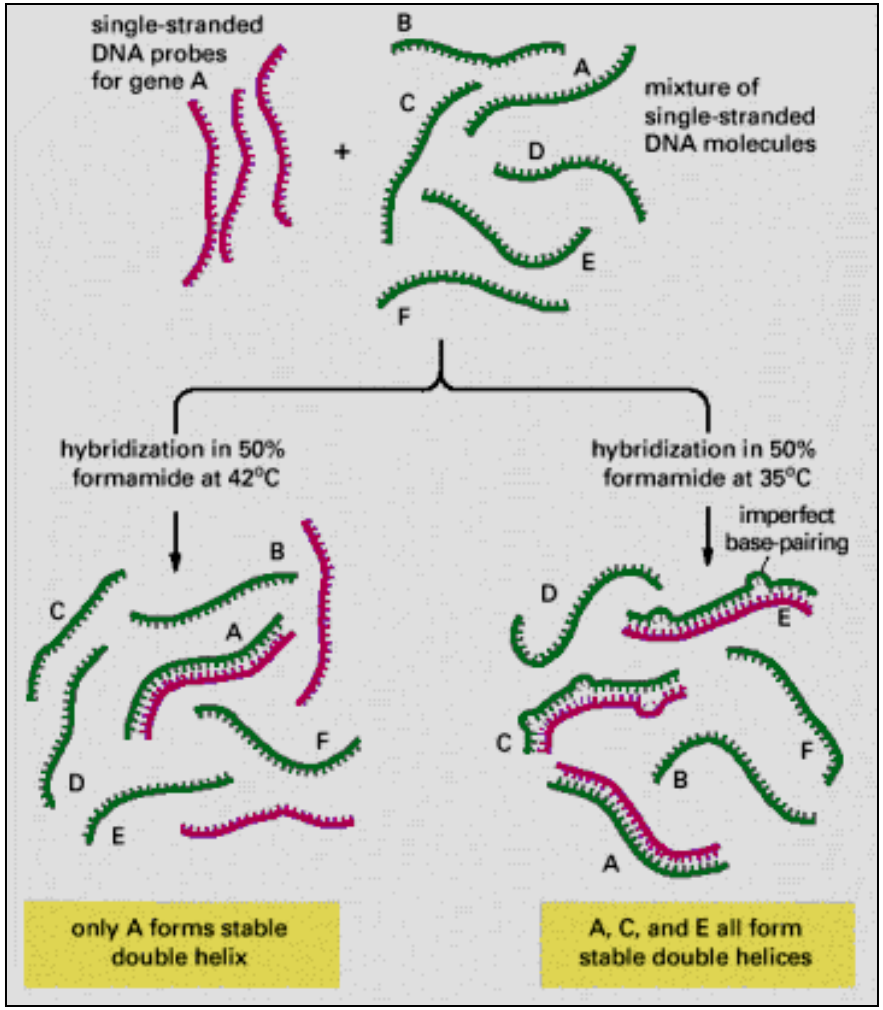
- **base-pair Complimentary** تتامية الأسس المتشافعة
- **Antiparallel strands** تضادية التوازي

Possibilities:

1. DNA-DNA
2. DNA-RNA
3. RNA-RNA

مفهوم الصرامة Stringency

أثر تركيز الشوارد الملحية ودرجة الحرارة على استقرار الهجين.



يمكن للتهجين أن يحدث حتى في حال عدم التشافع التام.

لا يحدث التهجين إلا عند التشافع التام.

شروط صرامة منخفضة

شروط صرامة مرتفعة

أثر تركيز الشوارد الملحية ودرجة الحرارة على استقرار الهجين.

كلما كان محتوى الدارئة من الشوارد الموجبة منخفضاً (التركيز منخفض) كلما كان استقرار الهجين منخفضاً.

كلما كانت درجة الحرارة مرتفعة كلما كان استقرار الهجين منخفضاً.

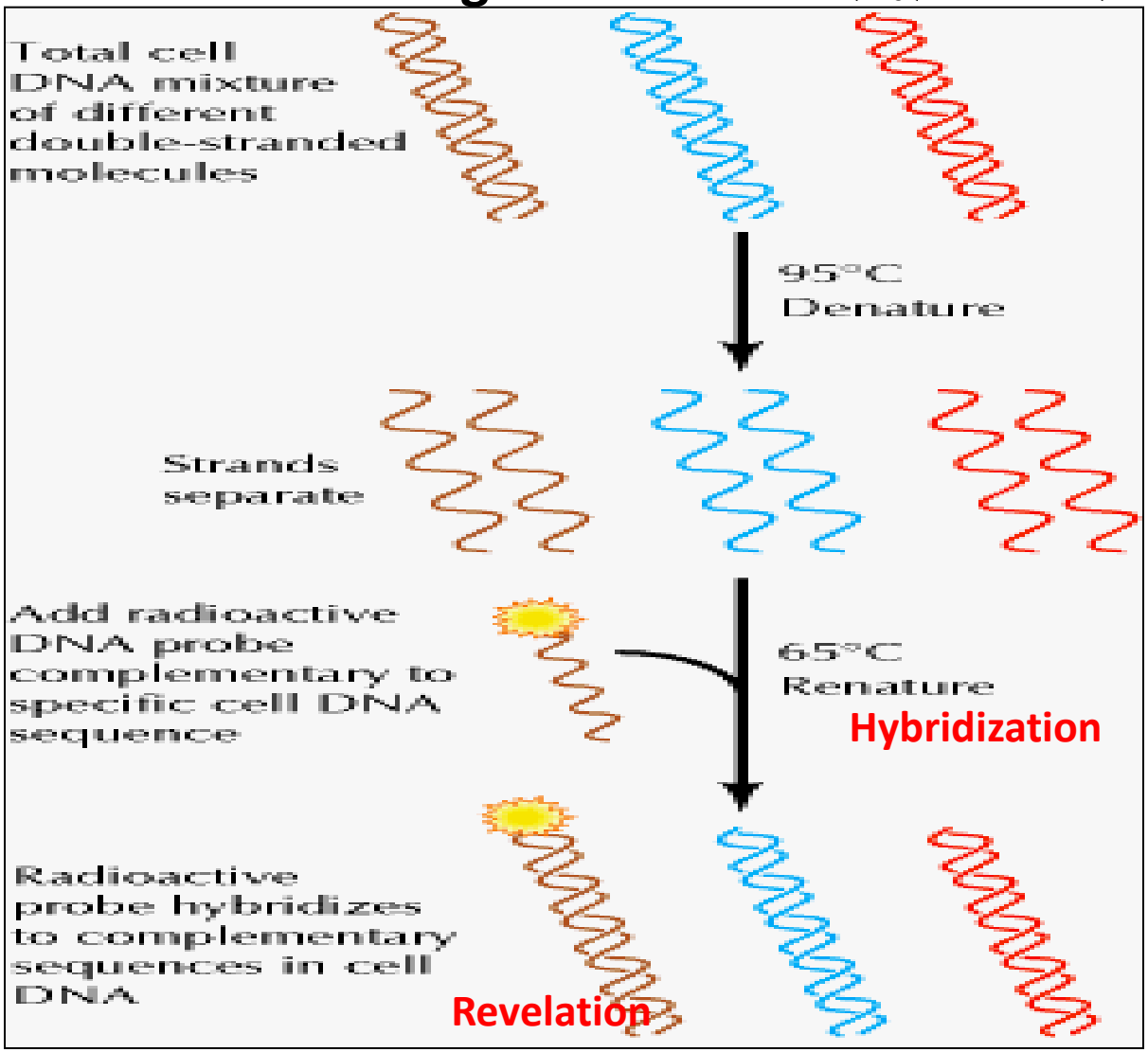
شروط الصرامة المنخفضة: دارئة مرتفعة القوة الأيونية + درجة حرارة منخفضة.

شروط الصرامة المرتفعة: دارئة منخفضة القوة الأيونية + درجة حرارة مرتفعة.

تهجين عالي النوعية أو منخفض النوعية؟

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.



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 95مْ 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.