

كلية الصيدلة

Faculty of Pharmacy

السنة الثالثة

مقرر الهندسة الوراثية (الجينية)

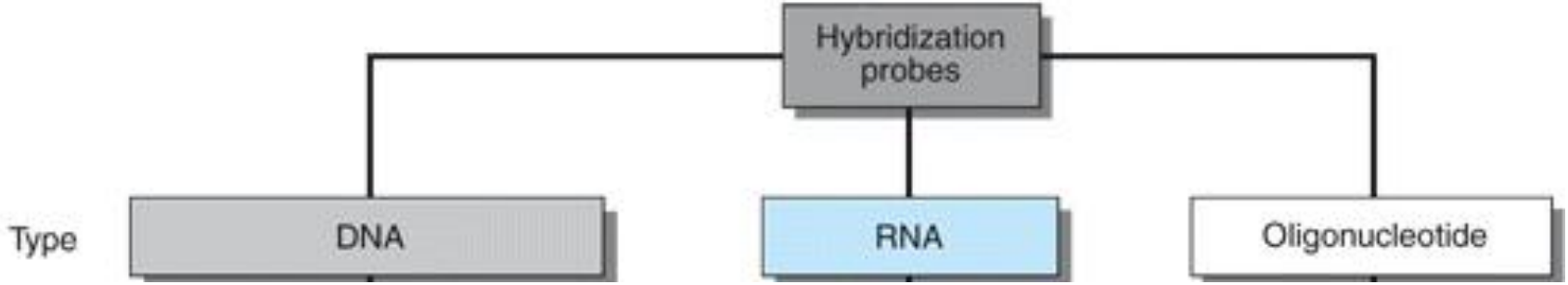
المحاضرة الثامنة

2019-2020

د. شادي سكرية

أنماط المسابر المستعملة في التهجين

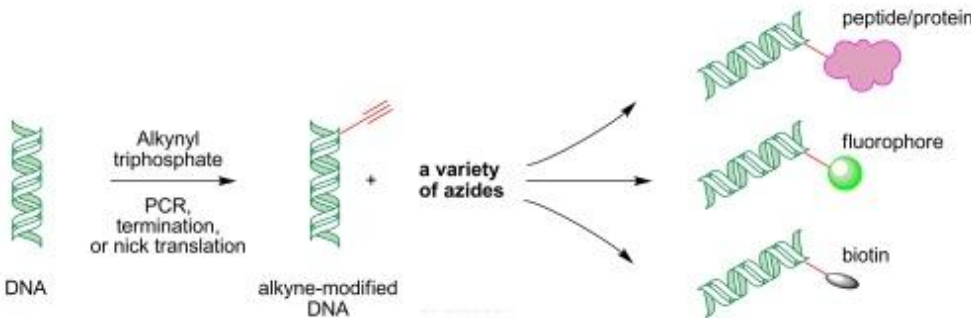
مسابر من DNA أو RNA أو قلييات نكليوتيدات، أحادية شريطة موسومة



DNA & RNA labeling وسم DNA و RNA

نكليوتيدات موسومة بنظير مشع
نظائر مشعة:

نكليوتيدات موسومة بمواد غير مشعة



3H
14C
32P
35S

النظير الثقيل: 15N

الوسم المشع

نكليوتيدات موسومة بالفوسفور المشع ^{32}P

In vivo labeling: Cell culture

- تقديم للخلايا المزروعة وحدات بناء DNA و RNA 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 طولها أثناء انتساخه في الزجاج.
- يمكن وسم DNA على طولها بواسطة PCR.

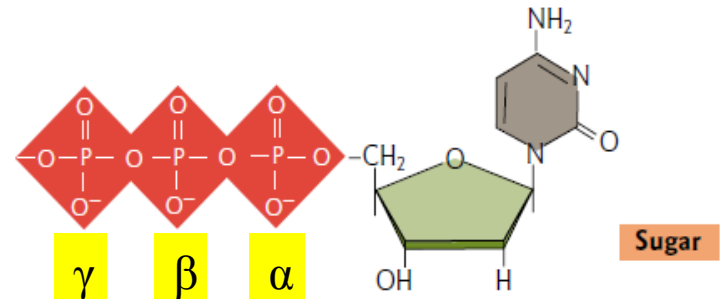
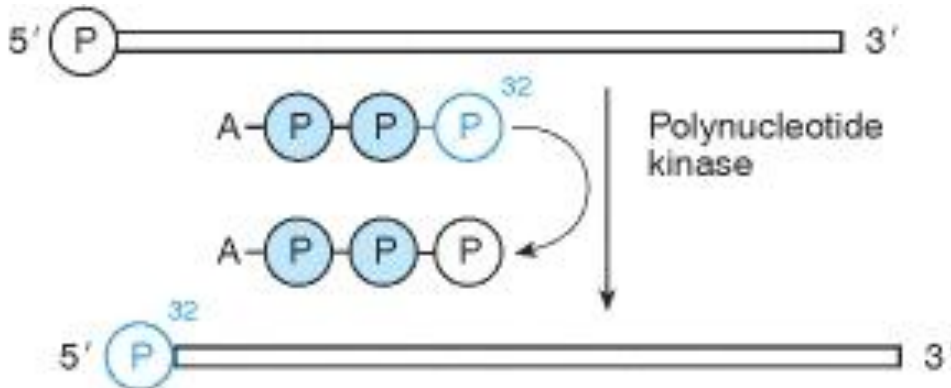
الوسم المشع

نكليوتيدات موسومة بالفوسفور المشع ^{32}P

الوسم بعد الاصطناع:

وسم النهاية $5'$:

يحتوي DNA زمرة فوسفات واحدة و RNA عديم القبة ٣ زمر. باستعمال بيروفوسفاتاز يمكن إزالة هذه الزمر والحصول على نهاية $5'$ تحوي زمرة OH، بعدها يمكن استعمال كيناز (T4 بولينكليوتيد كيناز) بوجود $\text{ATP } \gamma^{32}\text{P}$ ، الذي يقوم بنقل آخر 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 $\alpha^{32}\text{P.dCTP}$.

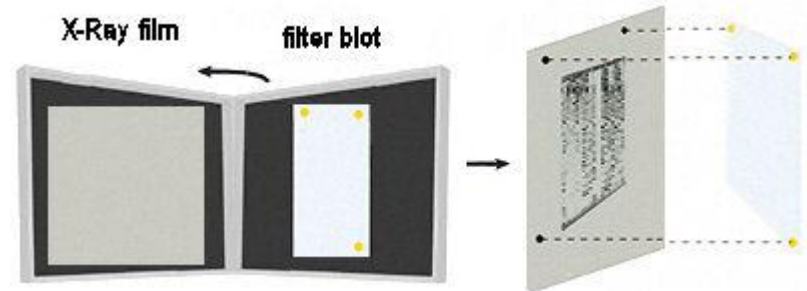
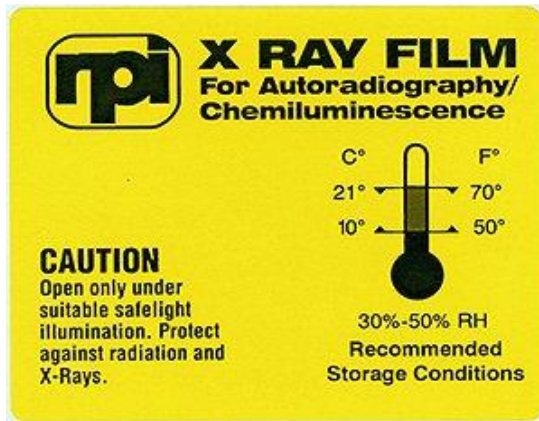
□ وسم RNA باستعمال **أنزيم الليغاز** بتركيز منخفضة وبوجود نكليوتيدات مفسفرة يقوم بإضافة النكليوتيدات إلى النهاية 3' ولتفادي الإضافة إلى النهاية 5' تستعمل نكليوتيدات مفسفرة من النهاية 3' مثال $\alpha^{32}\text{P.PCTP}$.

التصوير الإشعاعي الذاتي

Autoradiography

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 أعداد نوعية مرتبطة بأنزيمات، معروف لها ركائز مولدة للون، تعطي بنتيجة التفاعل الأنزيمي لون مميز.

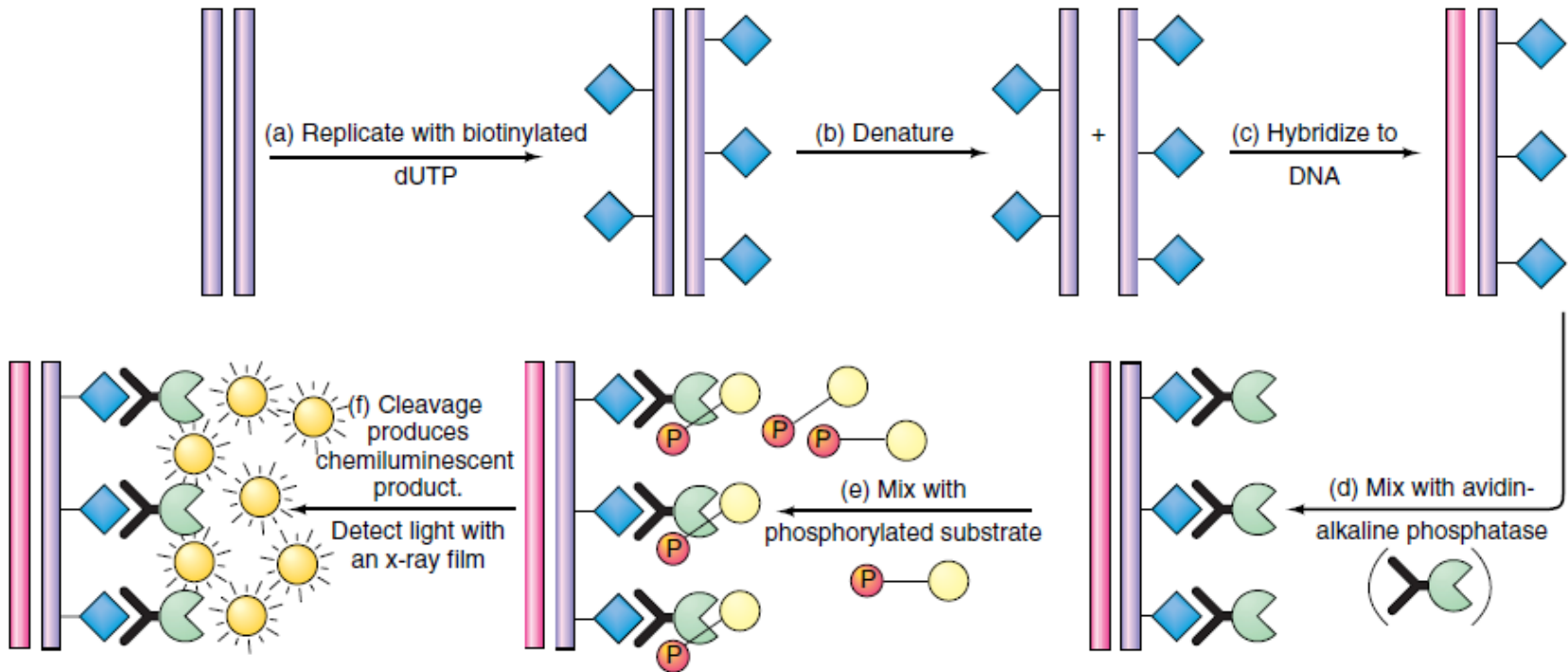


Figure 5.11 Detecting nucleic acids with a nonradioactive probe. This sort of technique is usually indirect; detecting a nucleic acid of interest

Bromodeoxyuridine
BrdU, DiG, ... Antibody System
Biotin/streptavidin System



hybridization as tool for molecular biology research

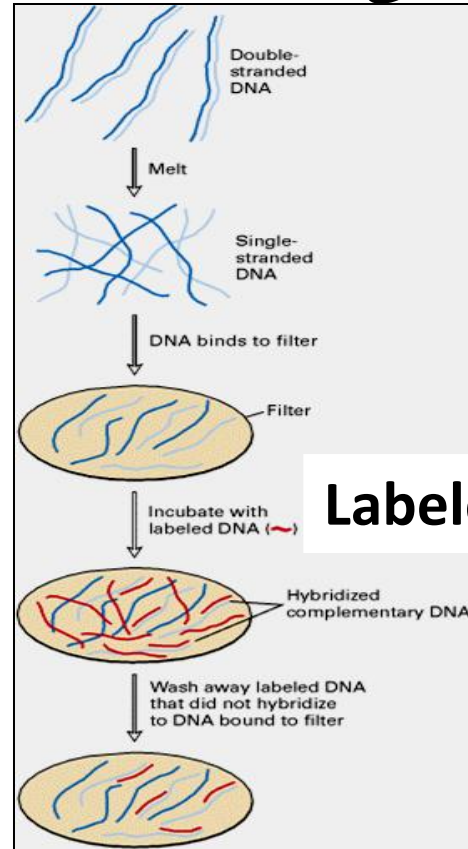
أهم تقانات البيولوجيا الجزيئية المعتمدة على مبدأ التهجين:

-التهجين على حامل صلب (التبصيم Blotting):

Dot Blot

Southern Blot

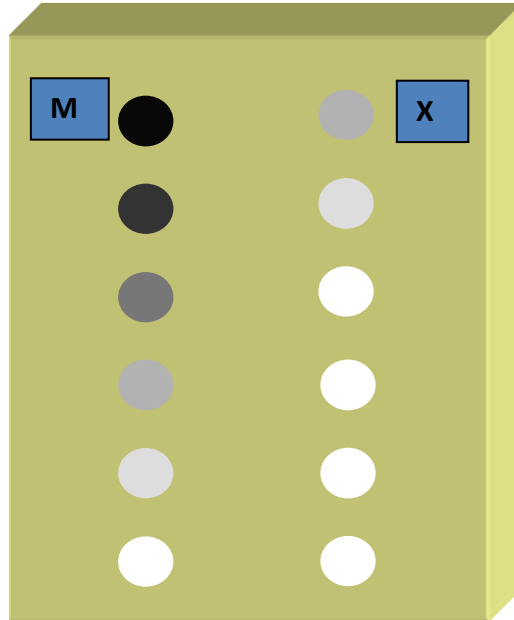
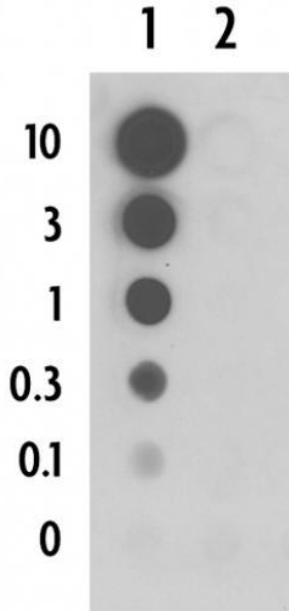
Northern Blot



Labeled DNA = **Probe**

□ Dot Blotting

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



	A	B	C	D	E	F	G
1	●	●	○	●	●	●	○
2	○	●	●	●	○	●	●
3	○	●	●	○	●	○	○
4	○	○	●	●	○	●	●
5	○	○	○	●	●	●	○

Southern Blotting

Edwin Southern

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

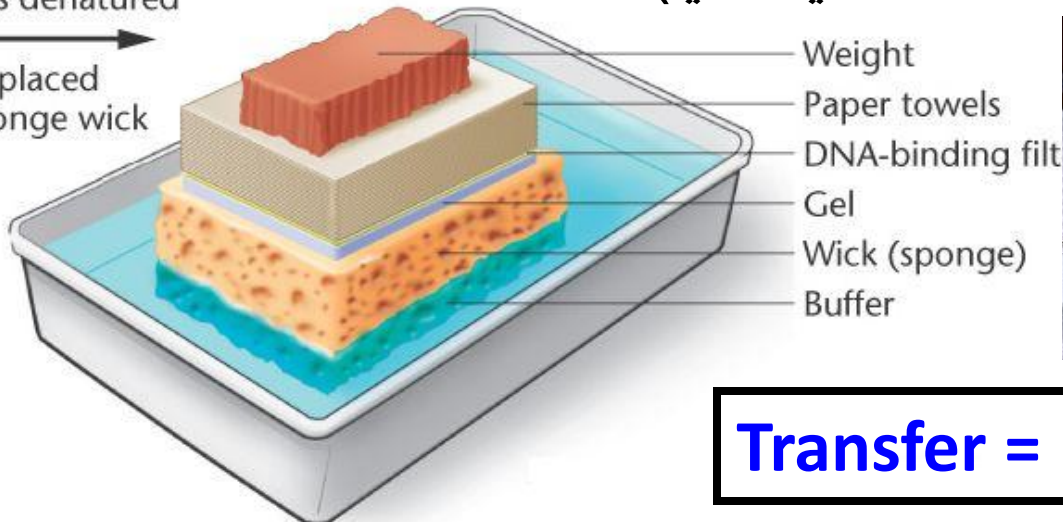
1 2 3

Lane 1: Radioactive size markers
Lane 2: DNA cut with restriction enzyme A
Lane 3: DNA cut with restriction enzyme B

1 2 3

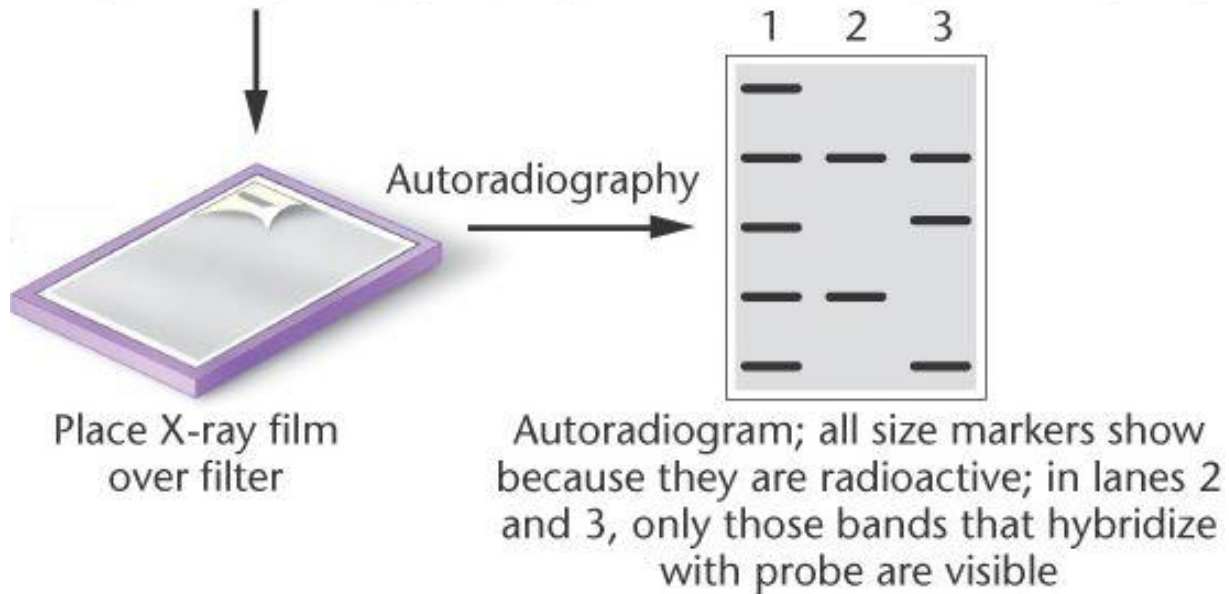
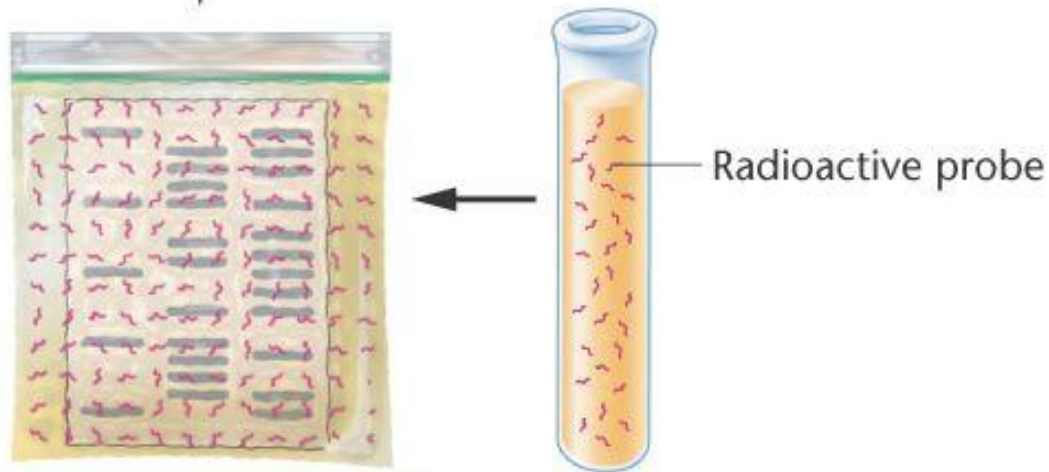
DNA is denatured

Gel is placed
on sponge wick



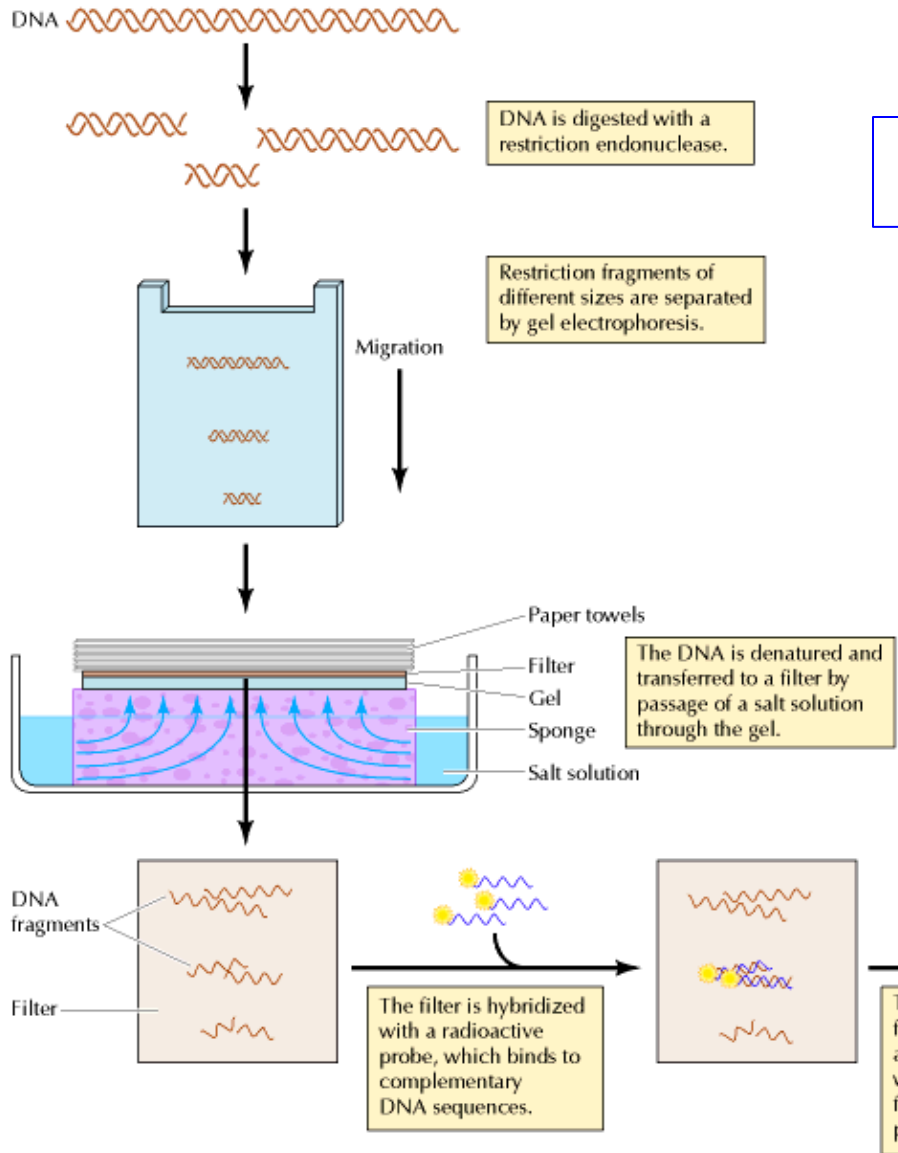
Transfer = Blotting

hybridization



Southern Blotting

كشف وجود تسلسل معين على الجينوم



مسبار موسوم من DNA أحادي شريطة أو RNA أو قليات النكلوتيدات

□ Northern Blotting

- استفراد RNA من نمط خلوي معين.
- رحلان كهربائي على هلامة ممسخة، لتخلص من البنى الثانوية.
- النقل إلى غشاء من النتروسيلوز.
- 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

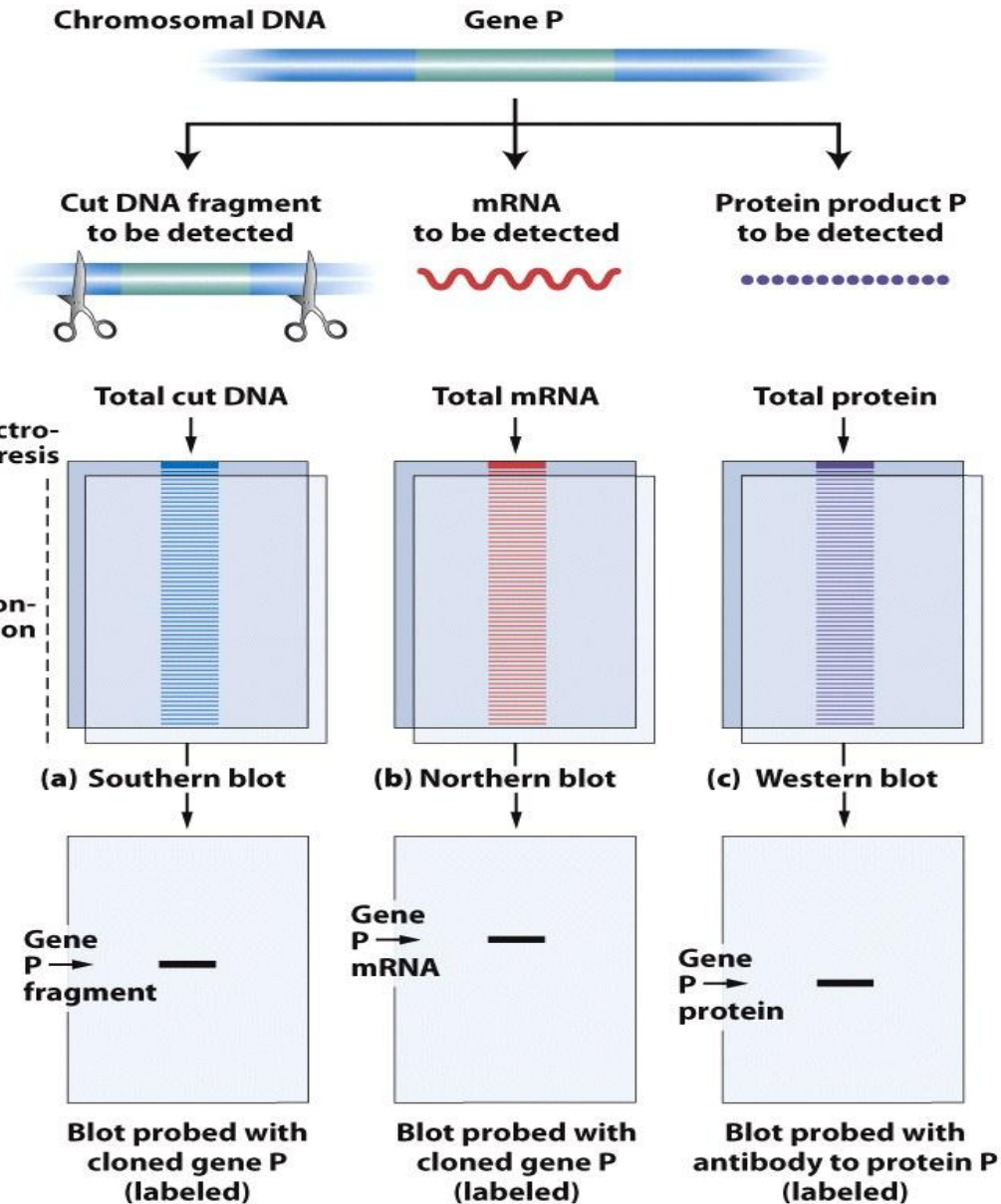


Figure 1-21

Introduction to Genetic Analysis, Tenth Edition

© 2012 W. H. Freeman and Company

كيف ستكون النتائج في الحالات التالية:

١. عدم وجود الجين على الجينوم.

٢. عدم انتساخ الجين.

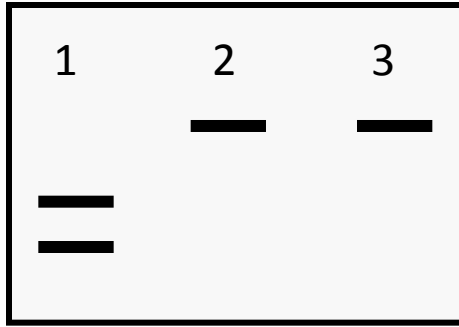
٣. عند انتساخ الجين وعدم ترجمة البروتين.

٤. عند حدوث طفرة نقطية لا تلغي انتساخ و ترجمة البروتين.

٥. عند حدوث طفرة نقطية تخلق كود توقف بدل الحمض الأميني الثاني.

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

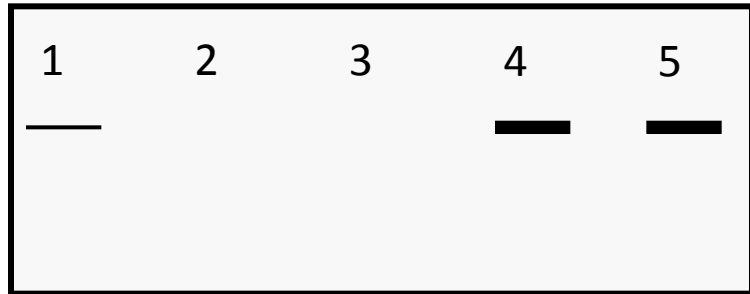


- 1 - Chick
- 2 - Mouse
- 3 - Human

فسر هذه النتائج.

نستخدم تجربة Northern Blotting لدراسة التعبير عن الجين في خلايا بعض النسيج 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 ؟