

كلية الصيدلة
Faculty of Pharmacy

السنة الثالثة

مقرر الهندسة الوراثية (الجينية)

المحاضرة الحادية عشرة

2019-2020

د. شادي سكرية

سلسلة DNA

DNA Sequencing

هي معرفة تتالي الأسس الأزوتية التي تكون تسلسل معين من DNA

تستخدم عادة طريقة سنجر للسلسلة **Sanger sequencing method**

يتعمد مبدأ السلسلة على استخدام نكليوتيدات ثنائية منزوعة الأوكسجين منهي

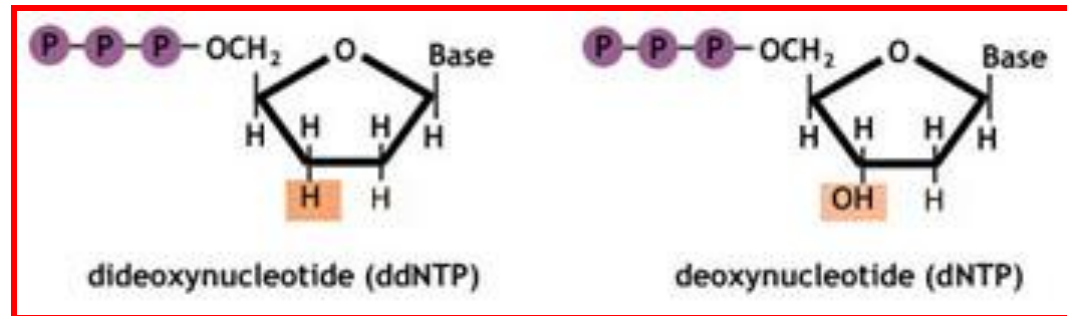
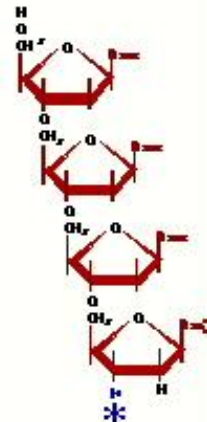
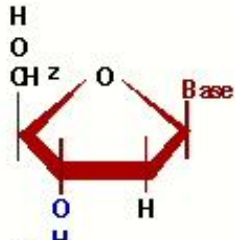
للسلسلة chain-terminating dideoxynucleotides يضيفها أنزيم DNA

بوليميراز أثناء تضاعف DNA في الزجاج *in vitro* DNA replication إلى

السلسلة النامية بشكل عشوائي.

عندما يتم إضافة نكليوتيد منهي ddNTP يتوقف نمو (اصطناع) السلسلة.

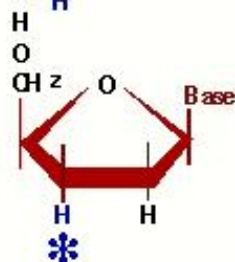
Normal nucleotides:



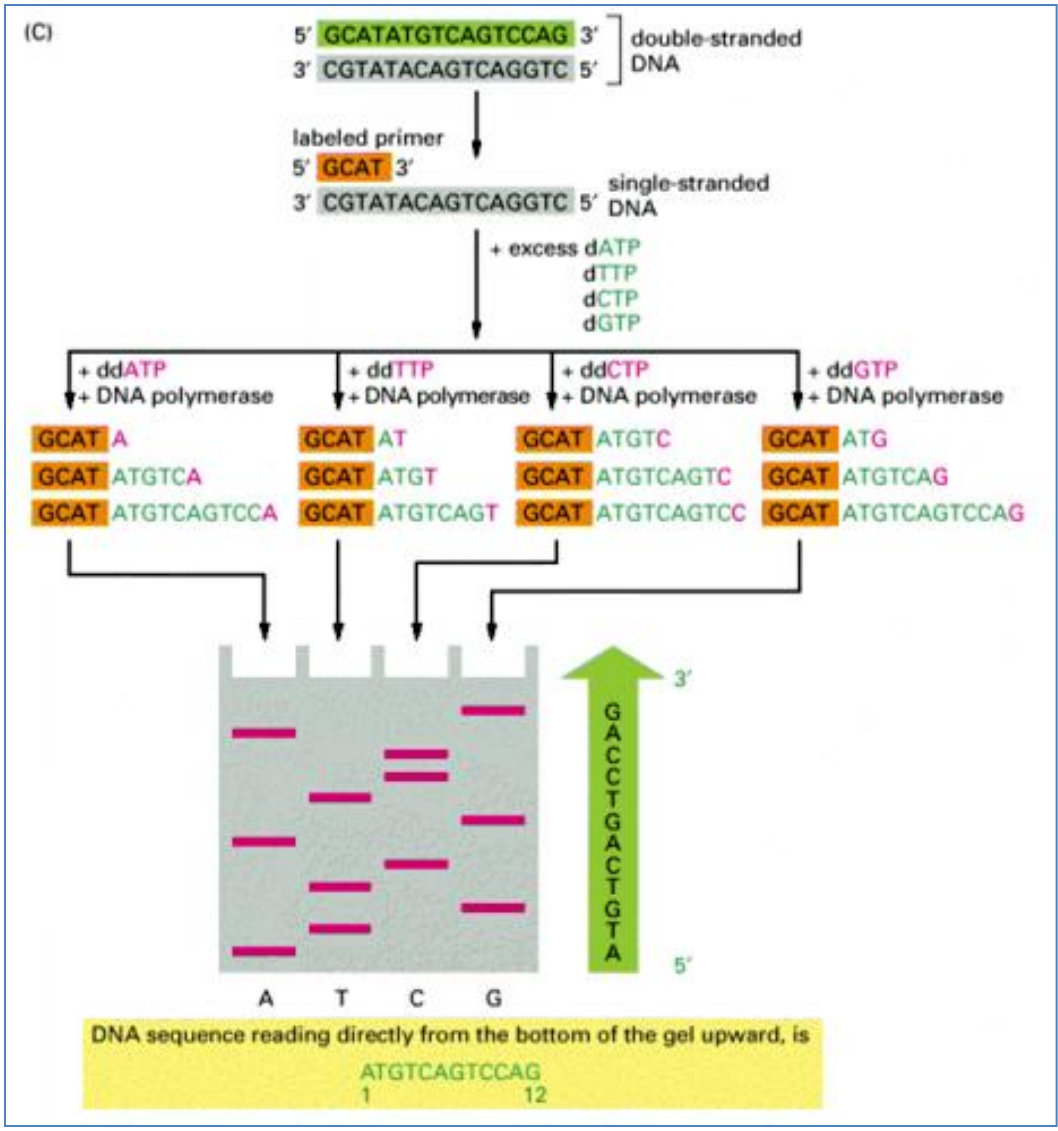
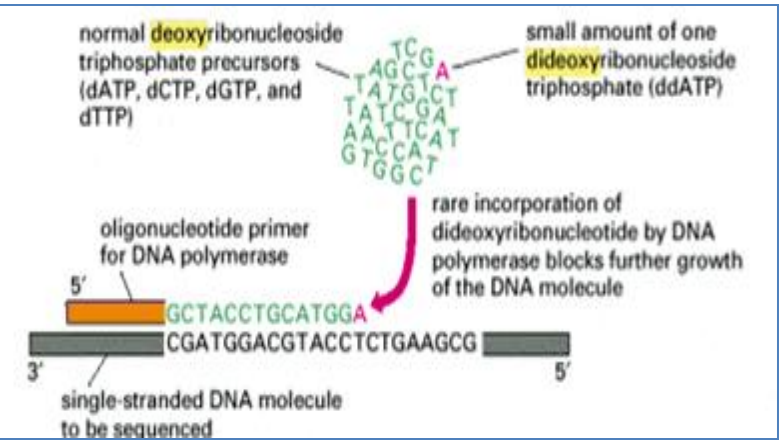
dideoxynucleotide (ddNTP)

deoxynucleotide (dNTP)

Dideoxy Chain Terminators:

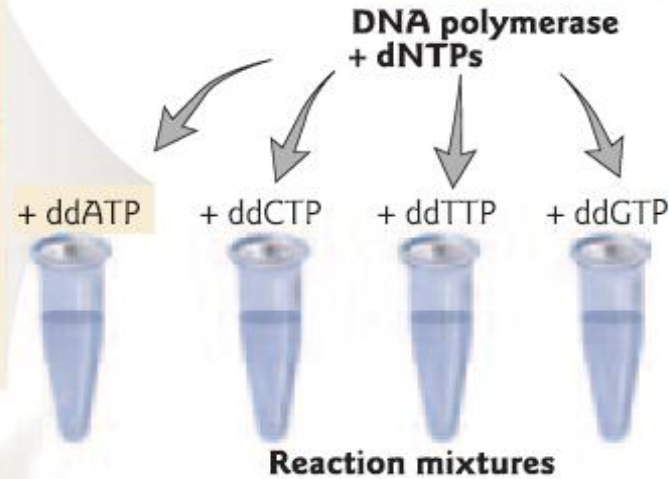
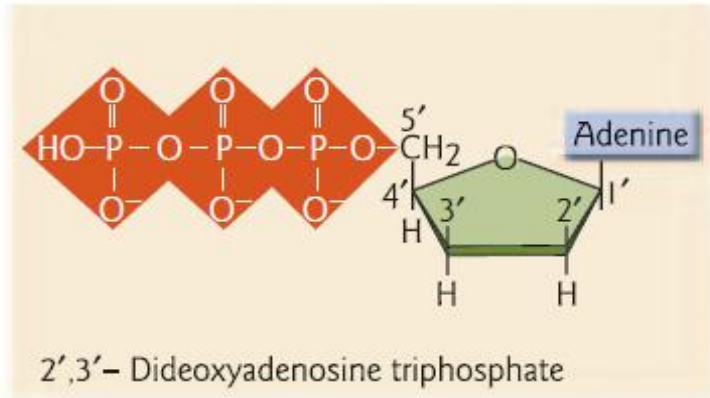
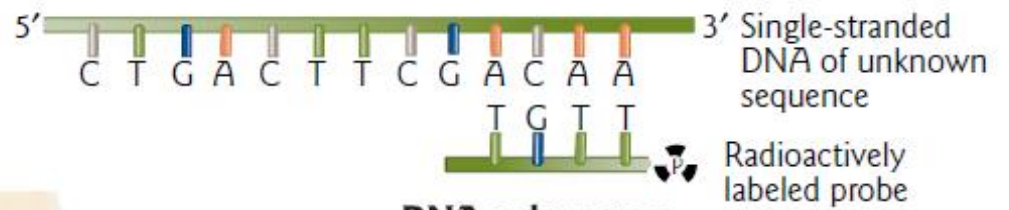


The dideoxy method for sequencing DNA :

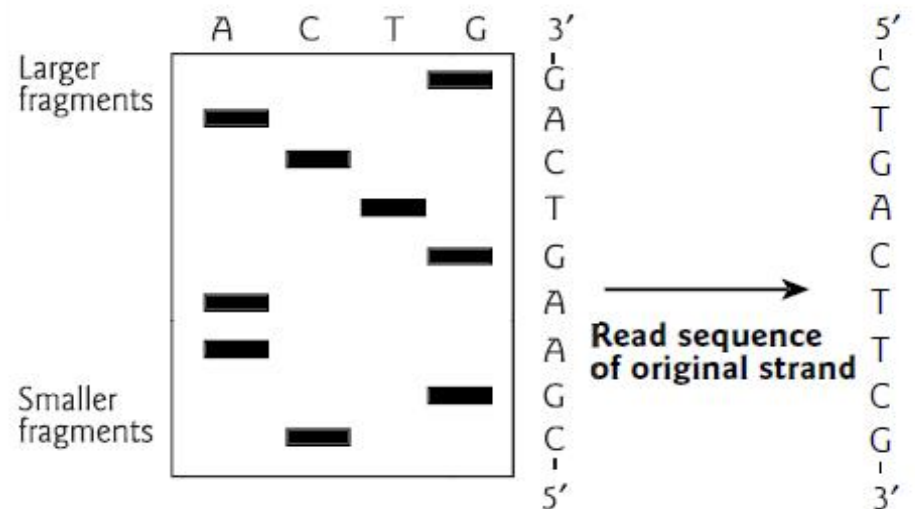
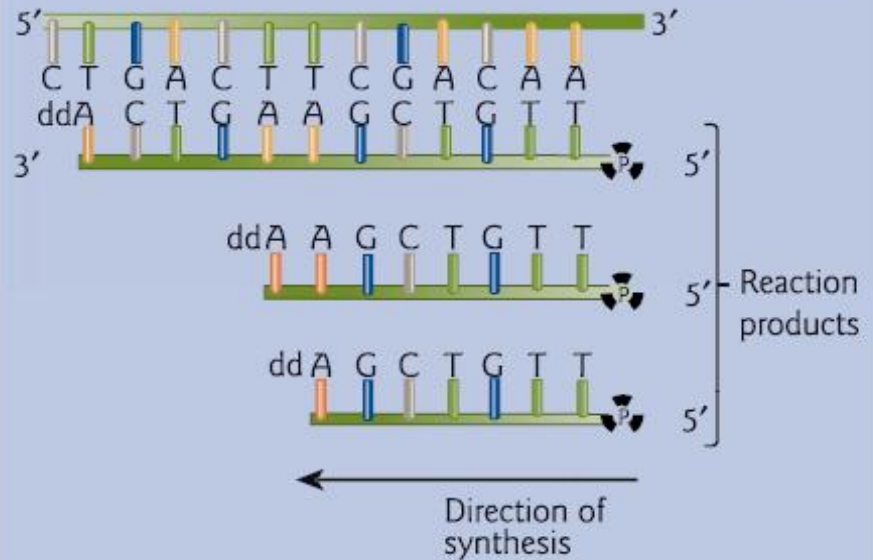


يعمد إلى إجراء أربع تفاعلات اصطناع
 DNA في الزجاج بشكل منفصل،
 يوضع في كل تفاعل النكليوتيدات
 الأربعة منزوعة الأوكسجين وكمية
 معينة مدروسة بدقة من نكليوتيد ثنائي
 منزوع الأوكسجين.
 يتوقف اصطناع السلسلة عند ضمه
 عشوائياً.

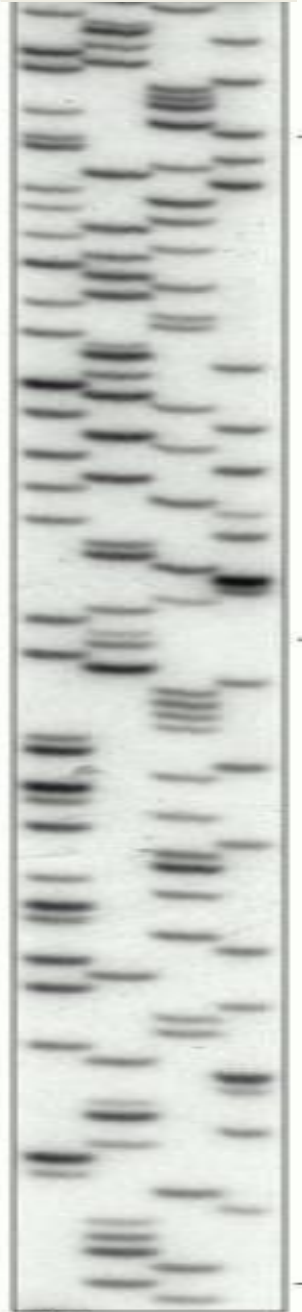
بعد الرحلان الكهربائي سنحصل في
 كل تفاعل على شذفة منتهية بالنكليوتيد
 ثنائي منزوع الأوكسجين في كل مواقع.



Denature and separate by polyacrylamide gel electrophoresis
 Expose gel to X-ray film

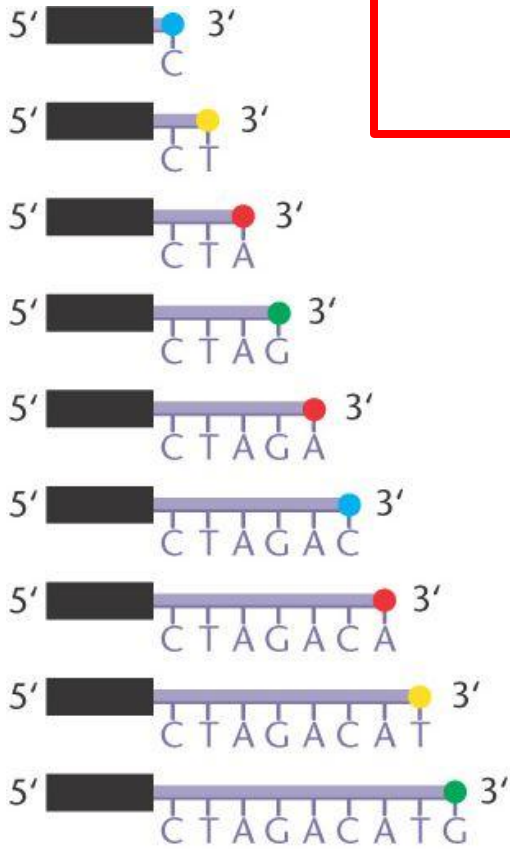


A C G T



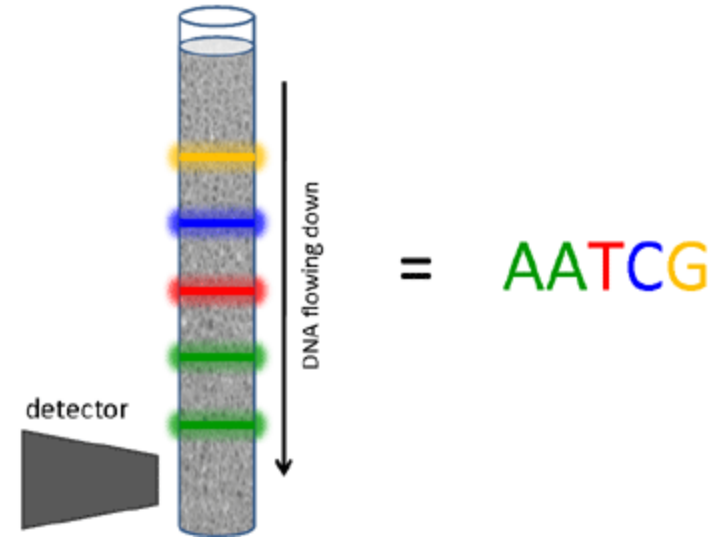
(A)

السلسلة الآلية



4. Electrophoresis, imaging, data analysis

Capillary electrophoresis



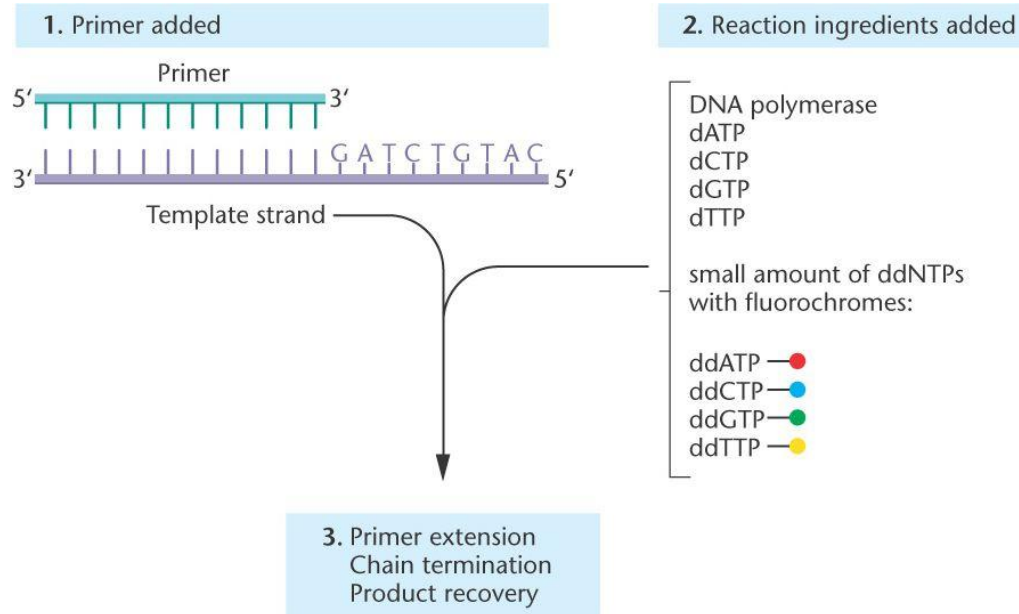
Automatic sequencing machine



DNA sequencer : Genome Analyzer

السلسلة الآلية

- نحتاج لإنجاز تفاعل السلسلة الآلية إلى:
DNA، أنزيم بوليميراز، بادئة، نكليوتيدات حرة dNTPs، نكليوتيدات منهيّة ddNTPs موسومة بصباغ فلورة (fluorescent dyes) كل نكليوتيد بصباغ فلورة معين.
تضاف هذه النكليوتيدات المنهيّة بتراكيز محسوبة بدقة بحيث يتم إضافتها بشكل عشوائي أثناء تفاعل البناء. يتوقف نمو السلسلة بعد إضافتها.

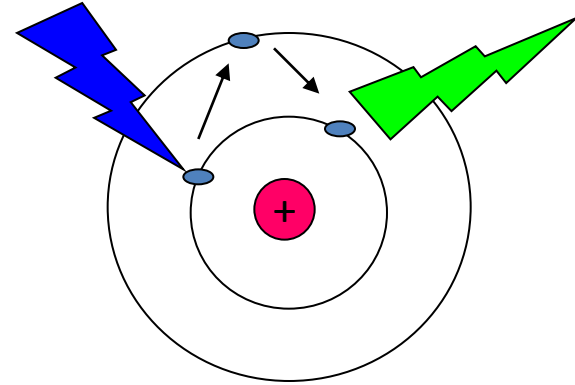


FLUOROPHORES

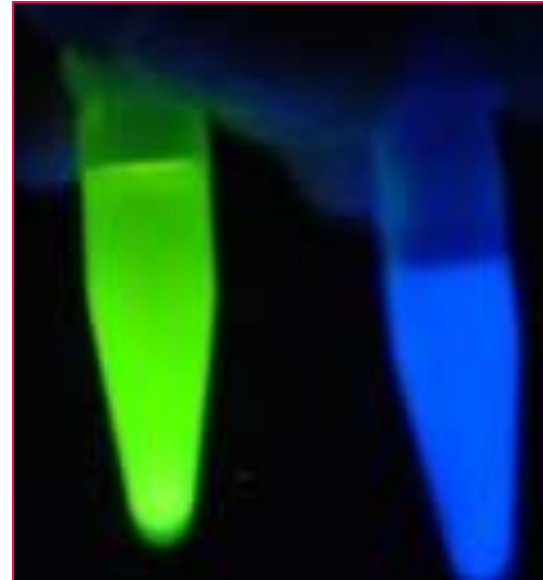
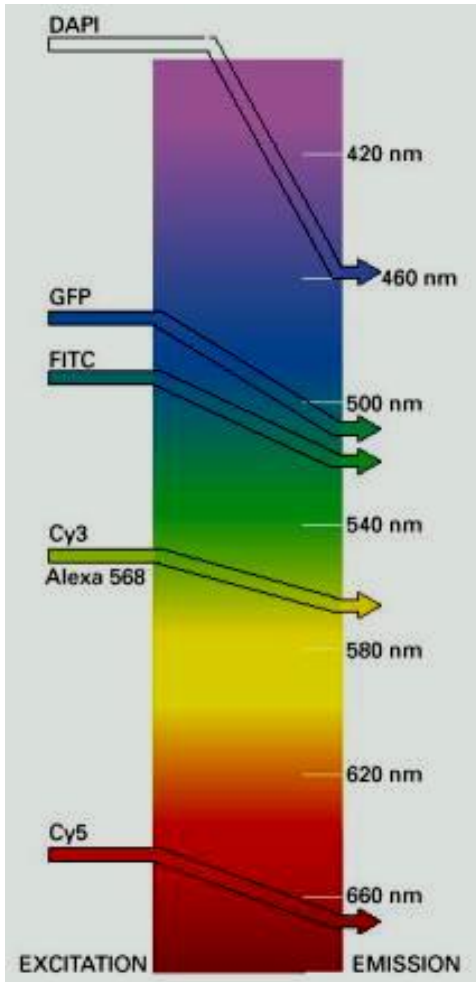
الفلورسين / الرودامين

CY3 / CY5

Alexa 488 / 568 / 645



ترى هذه الجزيئات مضيئة إذا تمت استثارتها بشعاع ضوئي طول موجته تعادل طول موجة الامتصاص (التهييج، استثارة) الخاصة بها. اللون الذي تتألق به هو لون طول موجة الإصدار.

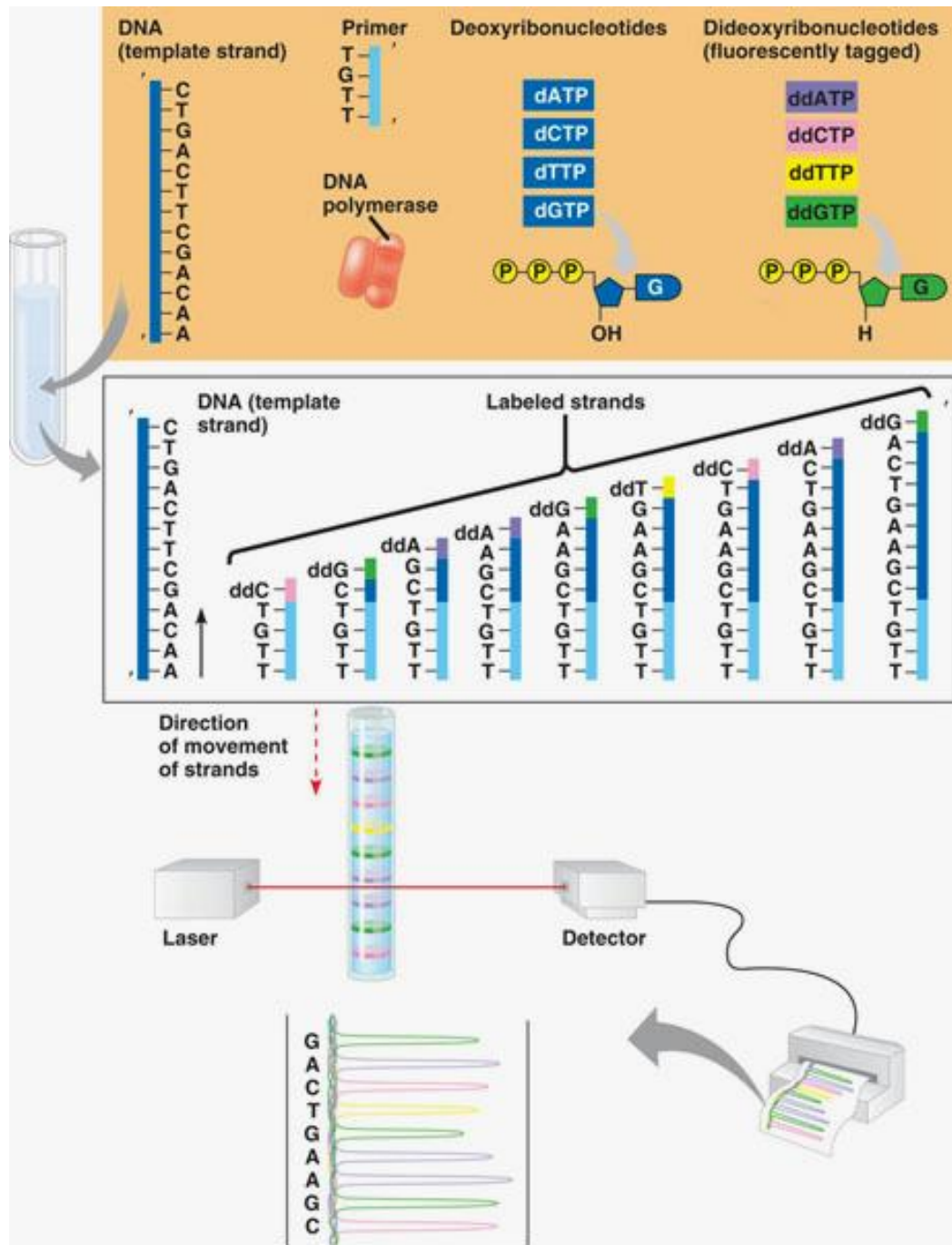


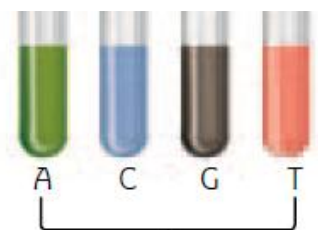
• بما أن النكليوتيدات الأربعة ثنائية منزوعة الأوكسجين
موسومة بألوان مختلفة يمكن
انجاز تفاعلات الإصطناع
الأربعة ضمن نفس الأنبوب.

• يمكن فصل المنتجات في خط
واحد (بئر واحدة) من الهلامية.
• يستعمل عمود رحلان شعري.

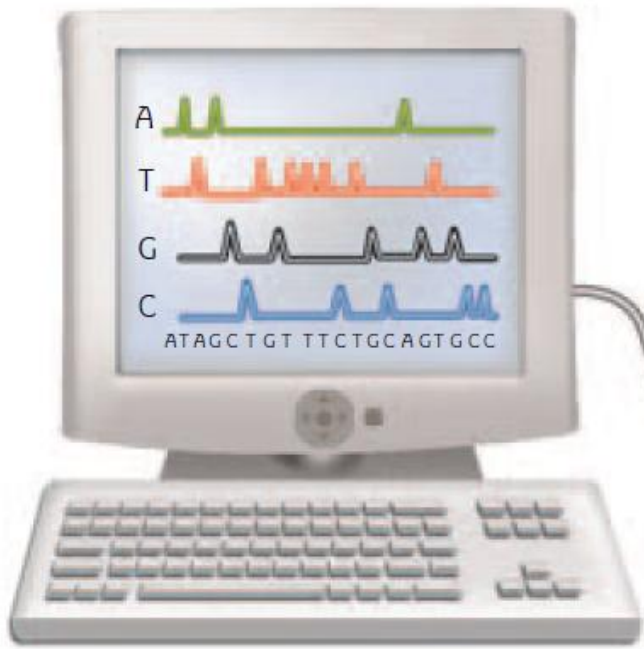
• في أسفل العمود ليزر لاستثارة
الصبغ المفلور في كل عصابة
وكاشف Detector (حساس)
للون الفلورية.

• كومبيوتر مبرمج لقراءة اللون
وتحول إلى النكليوتيد الموافق



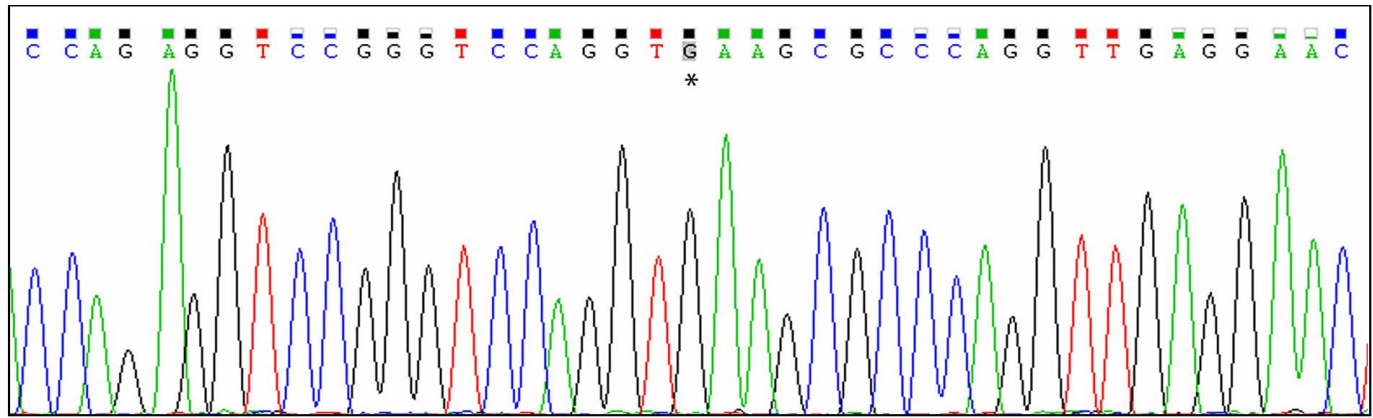


Computer



Detector

Laser beam



Electrophoretogram

Electropherogram

PCR in presence of fluorescent, chain-terminating nucleotides

