

الجامعة السورية الخاصة

كلية الصيدلة

مقرر الهندسة الوراثية (الجينية)

يستند التقدم في اي مجال علمي على توافر التقانات اللازمة وهذا هو حال الهندسة الوراثية والتي ساهمت التقانات الحيوية في ظهورها وتطورها بسرعة كبيرة في جميع انحاء العالم حيث يتم عزل الحمض النووي الخاص بمورثة واحدة لدى الكائنات المختلفة وصولا الى تحديد تسلسله وتحديد وظيفته وقد تم ذلك من خلال من خلال باحثين بارعين في مختبرات الابحاث المتقدمة.

اما عن اساس هذه التقنية فهو ينطلق من ان المعلومات الوراثية عبر مورثات والتي يمكن ان نتناولها بطرق مختلفة لاهداف بحثية او تطبيقية او طبية تهدف على سبيل المثال في مجال العلوم الاساسية للبحث في تركيب الجين ووظيفته او لانتاج بروتينات مفيدة او الوصول الى كائنات منقول اليها مادة وراثية .وتعتبر نقطة الانطلاق لهذه التقنية هو عزل تتابع مفرد من الحمض النووي لجين محددة يلي ذلك غرسها في ناقل او جزيء حامل ومن ثم ادخاله في الخلية المضيفة او العائل للتضخيم ويلي ذلك انتخاب التتابع المطلوب ، تمثل الخطوات السابقة المراحل التي يتم من خلالها تسهيل جين ما .

غدت الهندسة الوراثية كثيرة الاستعمال لدى كل الكائنات وقد تم العمل الى استخدامها لفائدة الانسان كالعلاج الجيني و انتاج العقاقير والمنتجات الغذائية.

وهنا لابد من التنويه ان فكرة الهندسة الوراثية كما هو الحال بالنسبة للاختراقات العلمية التي حصلت هي محاكاة للطبيعة والهندسة الوراثية هي محاكاة لما يتم لدى الجراثيم حيث يتم انتقال الصفات من جرثوم الى اخر نتيجة انتقال المادة الوراثية ولكن بشكل عشوائي عبر ظواهر حيوية كالتحول الجرثومي و التحول الانتقالي والاقتران الجرثومي اما في الهندسة الوراثية فيتم بشكل محدد بحيث يؤدي الى قيمة مضافة(ايجابية) عند الكائن المتلقي .

What Is Genetic Engineering?

ما هي الهندسة الجينية

An Introduction to Genetic Engineering

Third Edition

Desmond S. T. Nicholl

CAMBRIDGE

Genetic engineering is a set of technologies used to change the genetic makeup of cells, including the transfer of genes within and across species boundaries to produce improved or novel organisms.

الهندسة الوراثية هي مجموعة التقانات المستعملة في تعديل التركيب الجيني (الوراثي) للخلايا والتي تتضمن نقل الجينات بين الأفراد ضمن النوع الواحد أو بين الأنواع، بهدف إنتاج متعضيات محسنة أو متعضيات جديدة.



CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

تختص الهندسة الوراثية بالتعامل Manipulation مع المادة الوراثية (الجينية) genetic material باستعمال تقنيات خاصة يمكن من خلالها تعديل DNA.

تستعمل عدة طرائق للتعامل مع الجين، يتضمن أغلبها إزالة removal وإدخال insertion مادة جينية ضمن متعضية.

مثلاً قطع DNA من مكان محدد بدقة بالغة من جينوم كائن معين ووصله مع قطع أخرى في مكان آخر ضمن جينوم كائن آخر.

- تستعمل أحياناً عدة مصطلحات أخرى لوصف الهندسة الوراثية وذلك بحسب المراجع، معظم هذه المصطلحات تصف تقانات يمكن جمعها بمصطلح أوسع هو الهندسة الجينية.

Several terms may be used to describe the technologies involved in manipulating genes.

من هذه المصطلحات:

- المناولة الجينية gene manipulation.
- التنسيل الجيني gene cloning.
- تقانة DNA المؤشب recombinant DNA technology.
- التعديل الجيني genetic modification.
- الوراثة الحديثة new genetics.

أهم ٦ تقنيات لازمة ومختصة بالهندسة الجينية:

١- قص أو قطع تسلسلات من DNA وإعادة ربطها مع تسلسلات أخرى

مختلفة أو ما يعرف **بالتأشيب recombination**.

٢- عزل قطع من DNA بعضها عن بعض باستعمال **الرحلان الكهربائي**

.Gel Electrophoresis

٣- معرفة التسلسل النكليوتيدات أي ترتيبها في قطعة محددة من DNA أو

ما يعرف **بسلسلة DNA sequencing**.

أهم ٦ تقنيات لازمة و تختص بالهندسة الجينية:

٤- تقنية تهجين الحمض النووي **Nucleic acid hybridization**،

والتي تمكننا من معرفة أحجام القطع من الحمض النووي والكشف عن القطع المحددة من الحمض النووي في خليط معقد من القطع المتشابهة.

٥- **تنسيل DNA cloning DNA**، والتي تسمح بإنتاج نسخ عديدة

ومتطابقة من تسلسل محدد من DNA.

٦- **تقنية تعديل DNA modification DNA** وهي تتعلق بخلق

تغيرات في تسلسل DNA، والتي تسمح بإنتاج نسخة معدلة من جين ما ثم أعادته مرة أخرى إلى الخلية.

التطور التاريخي للهندسة الوراثية

- حتى عام ١٩٧٠ كان إجراء الأبحاث على الحموض النووية من أصعب الأمور التي كانت تواجه علماء الوراثة والكيمياء الحيوية، حيث كانت معظم الأبحاث تجرى على البروتينات.
- و لكن مع تطور كلاً من البيولوجيا الجزيئية وعلم الوراثة ومع تطور التقانة واكتشاف الأدوات الجزيئية التي تمكننا من التعامل مع الحموض النووية بدأت تتغير المعطيات بشكل كامل، حيث بدأنا **نفهم وظيفة الجينات وآلية عملها** وبدأت تتوفر طرق التعامل معها مما سهل بشكل كبير تناول ودراسة ال DNA حتى أصبح اليوم غدا **التعامل مع DNA** امرا روتينيا جداً وأصبحت الهندسة الوراثية من أكثر فروع البيولوجيا تطوراً.

التطور التاريخي للهندسة الوراثية

- أصبح من السهل صنع نسخ عديدة من أي جين، كما أمكن معرفة تسلسل الأحماض النووية بسرعة كبيرة جداً. كما استطاع العلماء بعد اكتشاف الجينات الموجودة في الكروموسومات من تغييرها و تعديلها بالشكل الذي يريدونه وليس هذا فحسب بل استطاعوا أن يعيدوا هذه الجينات المعدلة إلى الخلية و غرزها في كروموسوم محدد.

- كما أمكن إنتاج كميات كبيرة من البروتينات كالهرمونات واللقاحات المختلفة والتي كانت تنتج في السابق من الحيوانات والتي كانت لا تخلو من المخاطر والاضرار من انتقال العدوى إلى الإنسان.

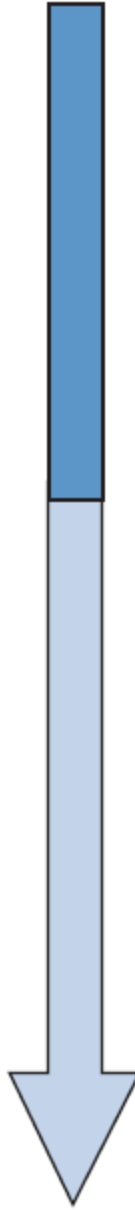
• كما أن هذا الاختراق و الثورة العلمية فتحت المجال أمام الكثيرين من محبي هذا المجال في اختراع واكتشاف طرق جديدة وحديثة في التعامل وحفظ وتغيير المادة الجينية في الإنسان والحيوان والنبات.

• لهذا العلم الحديث الكثير من المفاهيم والتطبيقات الطبية مما دفع الكثير من الكليات الطبية إلى تعديل مناهجها واطلاع مقرراتها لتزويد طلابها بالمزيد عنه وعن مجالات استثماره .

MENDELIAN OR CLASSICAL GENETICS ماندل والوراثة التقليدية

تطور علم الوراثة منذ عام ١٩٠٠

1900 —
1910 —
1920 —
1930 —
1940 —
1950 —
1960 —
1970 —
1980 —
1990 —
2000 —
2010 —



Genetic mapping رسم الخرائط الجينية

Transformation demonstrated

MICROBIAL GENETICS وراثه الأحياء الدقيقة



Molecular genetics الوراثة الجزيئية

GENE MANIPULATION منابله الجينات



Development of techniques
تطور التقانات

Applications التطبيقات

سلسلة الجينوم البشري
Human genome sequence

The post-genomic era

تقوم الهندسة الوراثية على محاولة جمع صفة
(صفات) مفيدة تؤخذ من كائن (كائنات) وتنقل
إلى كائن آخر، وذلك بعزل الجينات المسؤولة
عنها وإضافتها للكائن الجديد مما يكسبه وظائف
جديدة لم يسبق له أن امتلكها سابقاً (أي القدرة
على إعادة برمجة الكائن بمعلومات وراثية
مأخوذة من كائن آخر).

- التحكم بالجينات بطريقة تسمح **بظهور صفات جديدة مفضلة** لدى كائن لا يمتلكها (إضافة صفة)؛ أو أنها **تزيل صفات** غير مرغوبة كانت موجودة لدى الكائن (مرض وراثي)؛ أو تسمح بالاستفادة منها في إنتاج مواد أو توفير خدمات محددة.



تعديل الجينات بما فيه
الفائدة للبشر.
فأر معدل جينياً (مهندس
جينياً) يحمل صيوان أذن
بشرية على ظهره.



هناك مجالات عديدة للمناولة الجينية :genetic manipulation

- البحوث الأساسية في بنية structure ووظيفة function الجينات.
- إنتاج بروتينات مفيدة useful proteins بطرق جديدة novel methods (عقاقير وهرمونات ولقاحات).
- خلق نباتات وحيوانات محورة جينياً transgenic.
- التشخيص الطبي Medical diagnosis.
- المعالجة treatment (المعالجة الجينية).
- تحليل الجينوم Genome analysis و سلسلة DNA sequencing.

موقع الهندسة الوراثية من العلوم الأخرى

البيولوجيا
الجزئية

علم
الوراثة

الهندسة
الوراثية

التقانة
الحيوية

تعد الهندسة الوراثية إحدى
الفروع التطبيقية لعلم الوراثة
.genetics

ويمكن القول بأنها تجمع علم
الوراثة بالبيولوجيا الجزئية.

وتعد التقانة الحيوية من مخرجات
الهندسة الوراثية.

عصر ما بعد الجينوم:

• إنتاج العقاقير الحيوية

• ولقاح DNA

• والمعالجة الجينية

تذكرة ببعض المفاهيم الرئيسية في البيولوجيا الجزيئية:

• بنية DNA

• بنية البروتينات

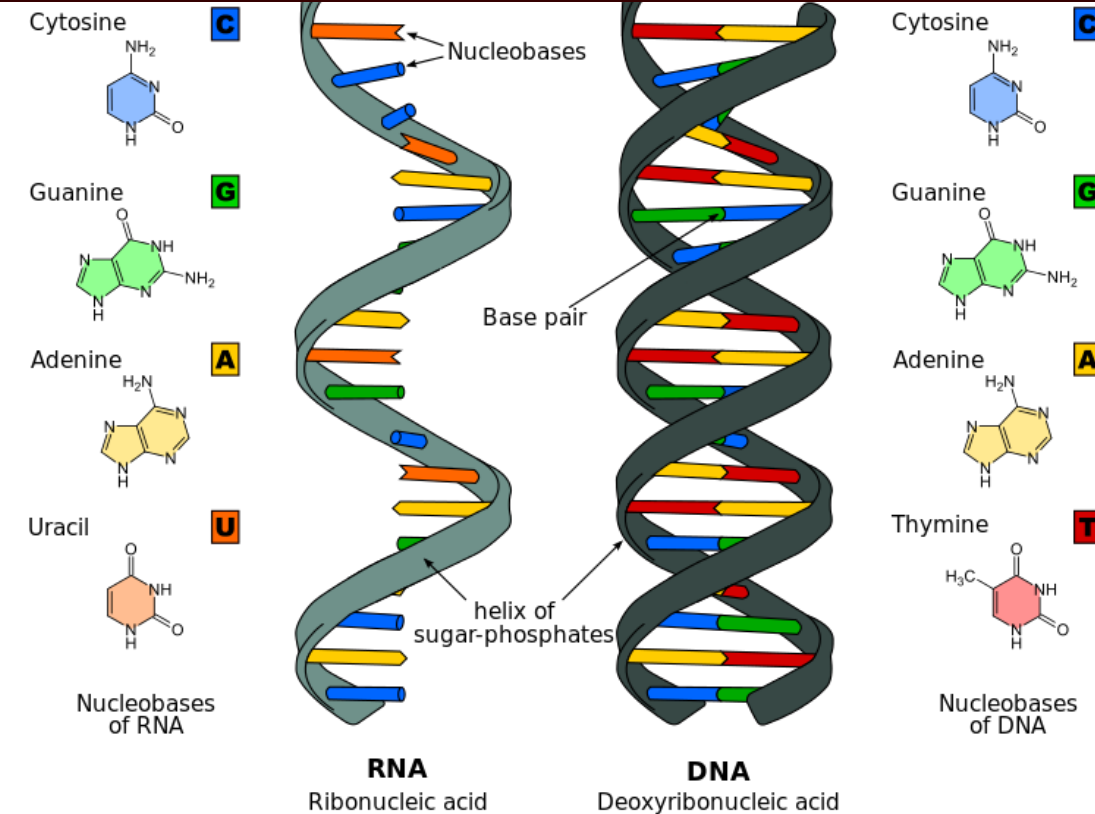
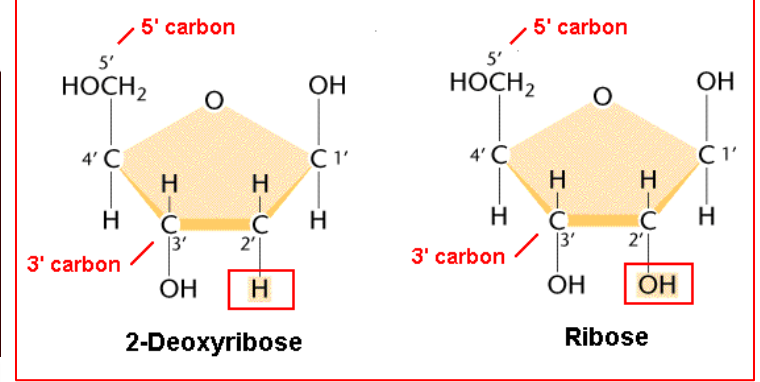
• بنية الجين المرمنة للبروتين

• آلية التعبير الجيني: الانتساخ والترجمة

الحموض النووية والبروتينات

الحموض النووية: DNA & RNA

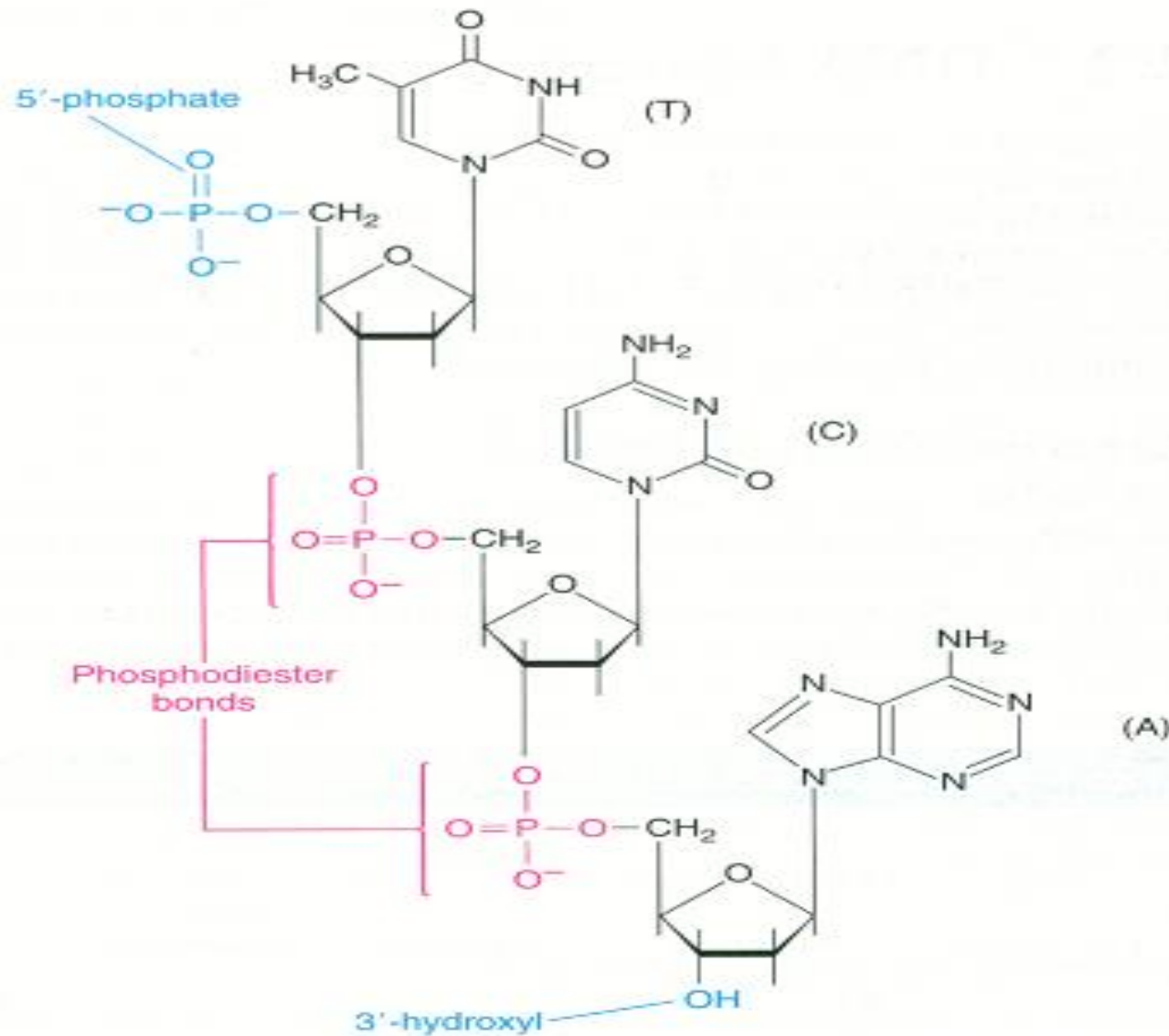
DNA	RNA
Has the sugar deoxyribose	



هي عبارة عن بوليمرات
للكليوتيدات أو ما يعرف
بالبولينكليوتيد.
يصطنع البولينكليوتيد
بربط نكليوتيدين
متجاورين برابطة
الفوسفورية ثنائية الإستر

ب- البنية الأولية للـ DNA Primary structure of

تتمثل البنية الأولية لجزيء الـ DNA بارتباط النيكلوتيدات منقوصة الأوكسجين مع بعضها لتشكل بنية خطية، ترتبط هذه الوحدات بفعل مجموعة الفوسفات التي تربط بشكل دائم بين ذرتي الكربون ٣' و ٥' لنيكلوتيدين متجاورين. يتألف العمود الفقري لجزيء DNA من تتالي السكر منقوص الأوكسجين والفوسفات، في حين ترتبط الأسس الأزوتية بالربوز منقوص الأوكسجين في المواقع ١' بشكل هامشي. استعملت سلاسل الـ DNA المفردة كمادة وراثية في بعض الفيروسات. وقد أمكن التعرف على خمسة أنواع من الفيروسات التي تحتوي كروموسوماتها على خيوط مفردة من الـ DNA، غير أن الأكثر شيوعاً هو الـ DNA مضاعف السلسلة.

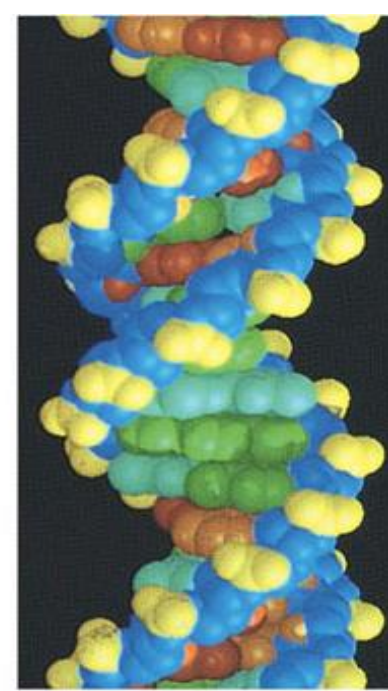
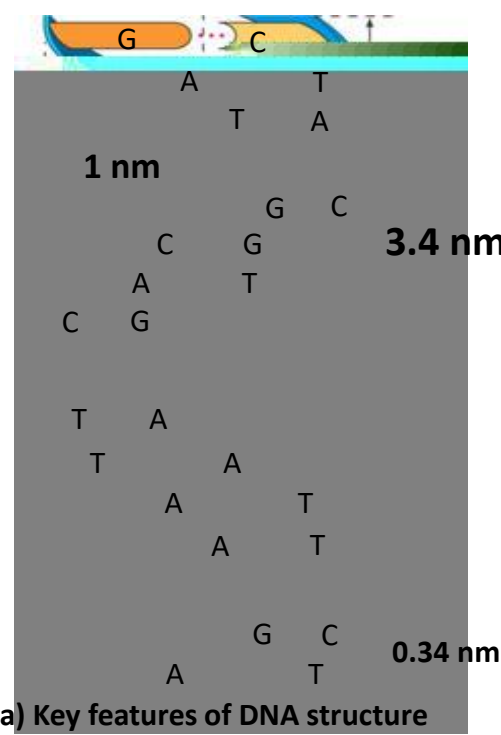


شكل يبين نمط ارتباط النيكلوتيدات لتعطي البنية الأولية لجزيء الـ DNA، من خلال تشكيل الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر.

DNA

The three-dimensional structure

حلزوناً مزدوجاً يمينياً
معاكساً الالتفاف.



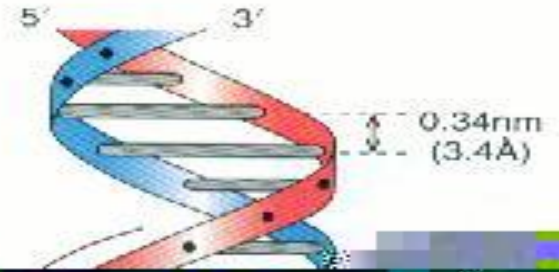
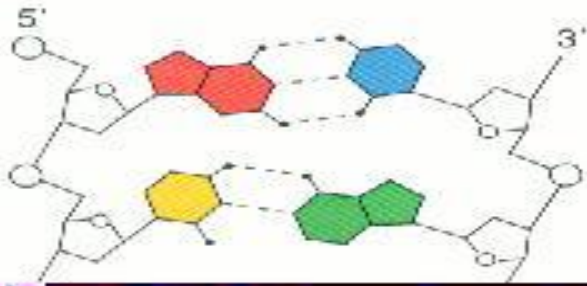
(c) Space-filling model

بينت المعطيات الكيميائية و انعراج الأشعة السينية البنية ثلاثية الأبعاد

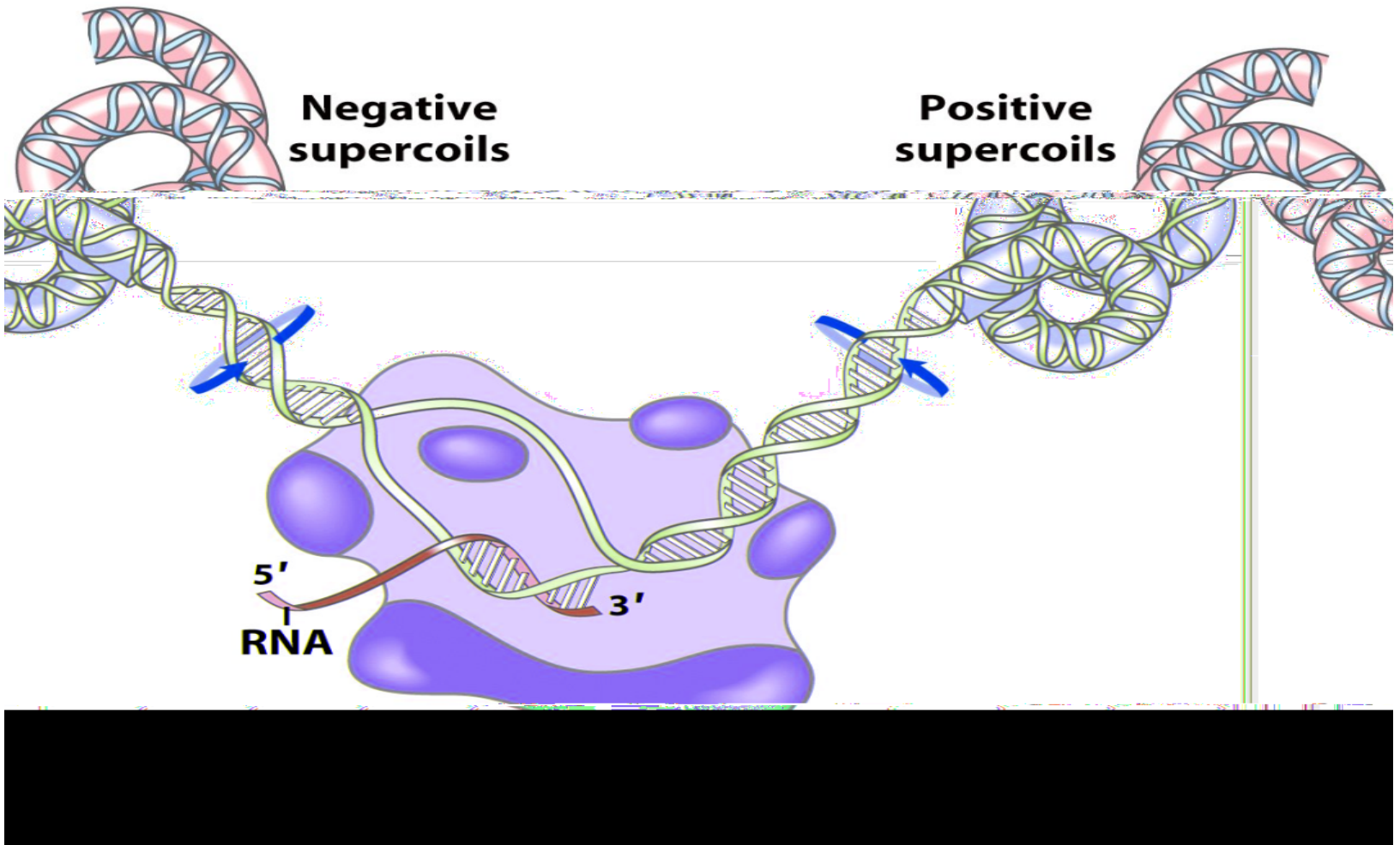
three-dimensional shape لجزيء DNA:

تتألف هذه البنية من ارتباط شريطين Strands ملتفتين حول محور
وهي التفافاً حلزونياً باتجاه اليمين المعاكس **مشكلةً حلزونياً Helix**
مزدوجاً يمينياً الالتفاف.

يتألف اللفة الواحدة من **عشرة نكليوتيدات**، طوله ٣,٤ نانومتر (34
انغستروم (A°) ونصف قطر الحلزون يساوي ١ نانومتر $(10^\circ \text{A}^\circ)$.

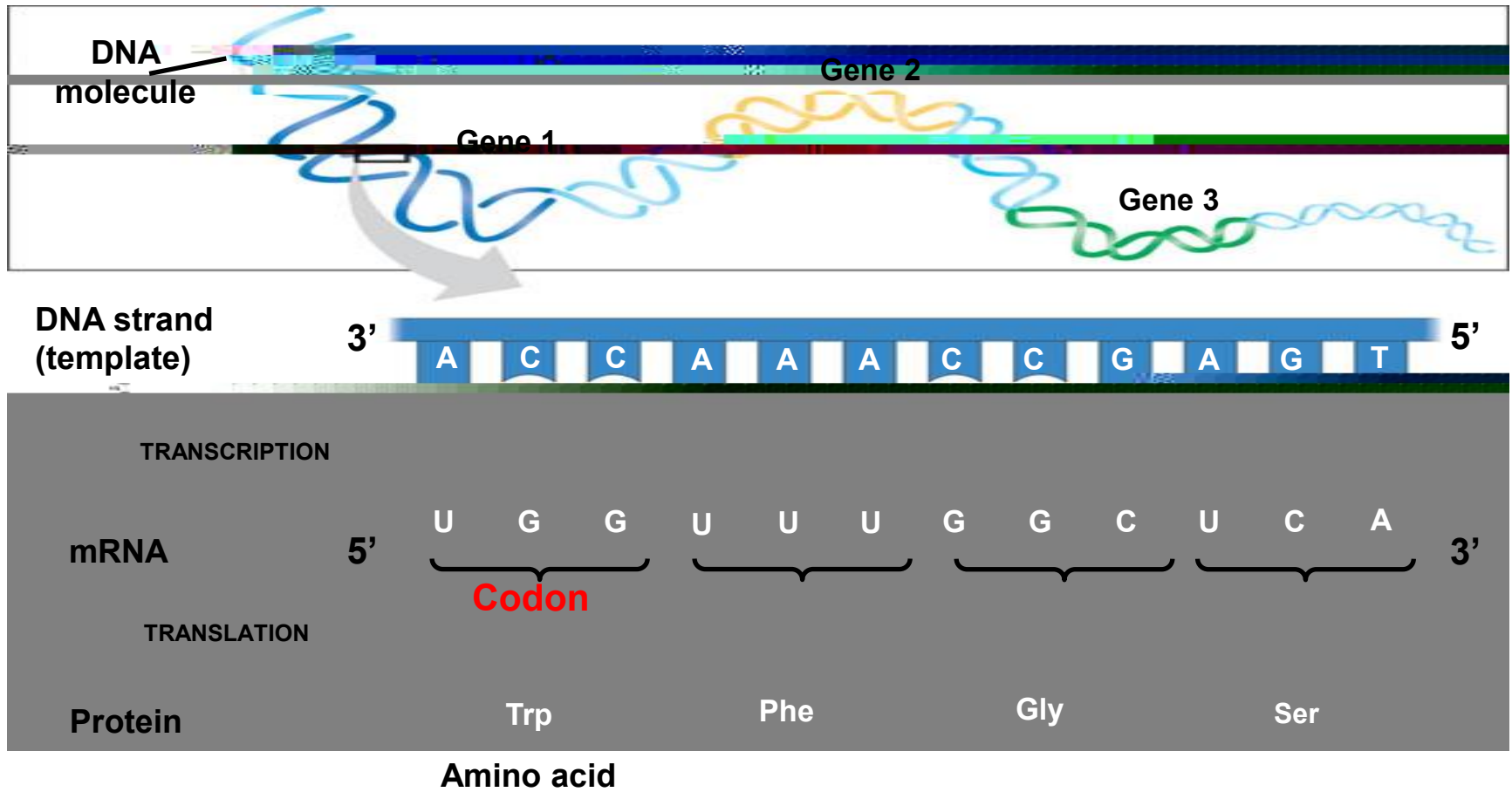


شكل يبين في الجزء الأيمن منه البنية الحلزونية لجزيء الـ DNA وفقا لفرضية واتسون وكريك، والذي يلتف التفافاً حلزونياً يمينياً معاكساً ومنتظماً، ويبين الجزء الأيسر نمط الارتباط بين السلسلتين بالروابط الهيدروجينية



RNA

يبين آلية نسخ الأنماط المختلفة من



• أثناء الترجمة، تتم قراءة الكودونات بالاتجاه 5' ← 3' (نزلاً) على طول الرسول.

• يرمز كل كودون واحد من الحموض الامينية العشرين التي سوف يتم إضافتها إلى الموضع المناسب على طول السلسلة الببتيدية polypeptide.

الكودون الموجود في RNA الرسول إما أن يترجم وعددها ٦١ إلى حمض أميني أو يستخدم كإشارة توقف للترجمة = كودون توقف

يحدد الكودون (والإنهاء) نقطة بدء الترجمة ويرمز الحمض الأميني المتيونين.

هذا ما يحدد مجال القراءة حيث تقرأ الكودونات في مجموعات من ثلاثة نكليوتيدات كلمات ثلاثية الأحرف.

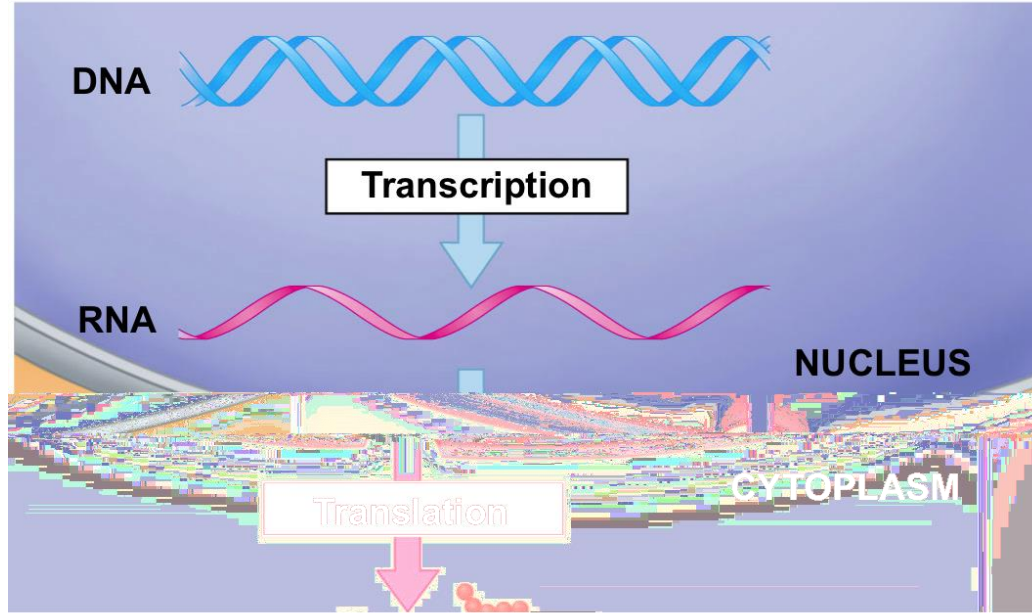
		Second mRNA base						
		U	C	A	G			
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
	UUC		UCC		UAC		UGC	
	UUA	Leu	UCA	UAA Stop	UGA Stop	Trp	UGG	
	UUG		UCG	UAG Stop				
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
	CUC		CCC		CAC		CGC	
	CUA		CCA		CAA	CGA		
	CUG		CCG		CAG	CGG		
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
	AUC		ACC		AAC		AGC	
	AUA	ACA	AAA		AGA	Arg		
	AUG Met or start	ACG	AAG		AGG			
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
	GUC		GCC		GAC		GGC	
	GUA		GCA		GAA	GGA		
	GUG		GCG		GAG	GGG		

- يمكن لعدة كودونات أن ترمز نفس الحمض الأميني، لكن **لا يمكن** للكودون الواحد أن يرمز أكثر من حمض أميني.
- الوفرة في الكود الجيني ليست عشوائية، في أغلب حالات الكودونات المرزمة لنفس الحمض الأميني يكون الاختلاف في **الأساس الثالث** من الثلاثية.

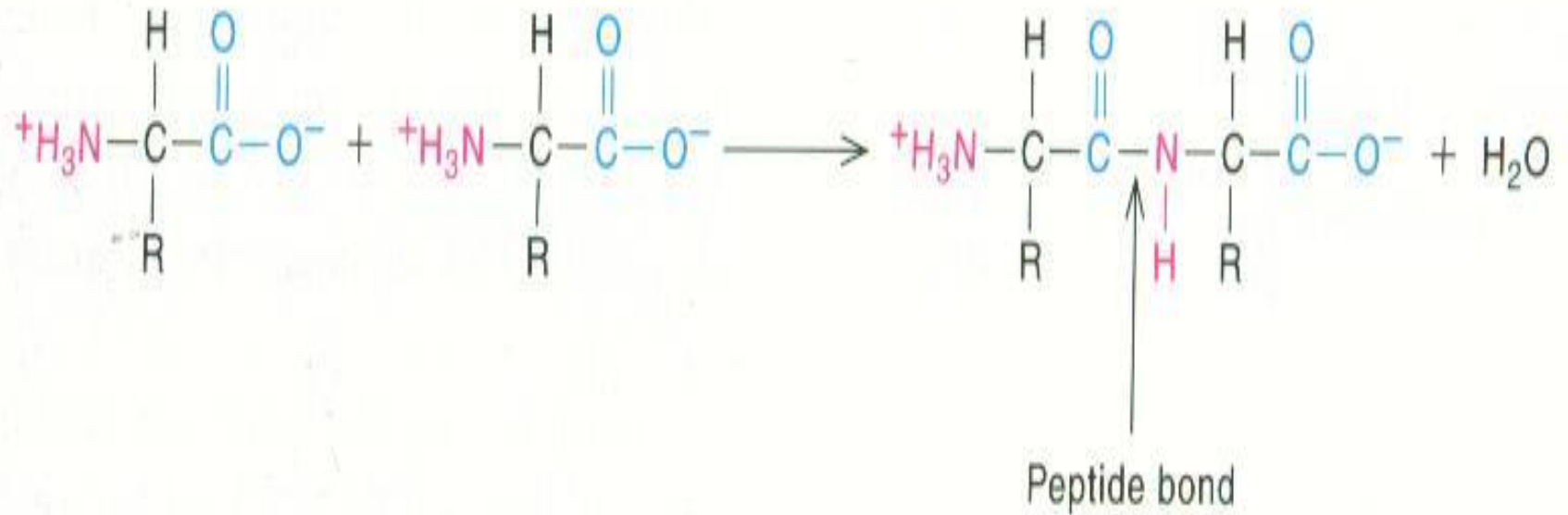
الكود الجيني عام تقريباً شامل لكل الأحياء حيث
تتشارك كافة المتعضيات الحية بالكود الجيني من
أبسطها وهي البكتيريا إلى أكثر النباتات والحيوانات
تعقيداً. وهذا ما اتاح نقل الجينات من نوع إلى آخر.

يجب على الكود الجيني أن يكون قد تطور باكراً جداً
أثناء تاريخ الحياة حتى يكون موجوداً في السلف
المشترك لجميع الكائنات الحية الحالية

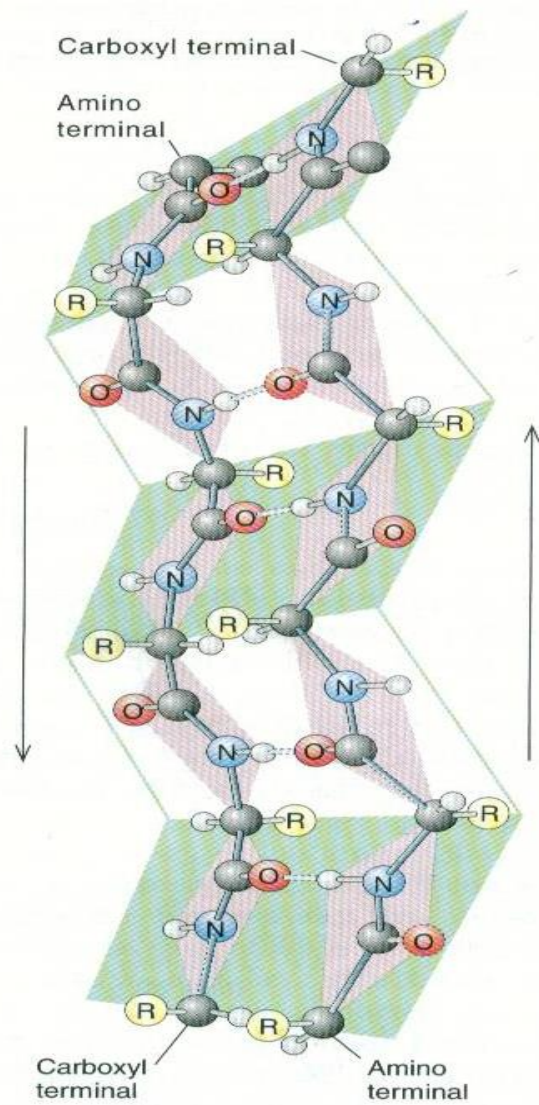
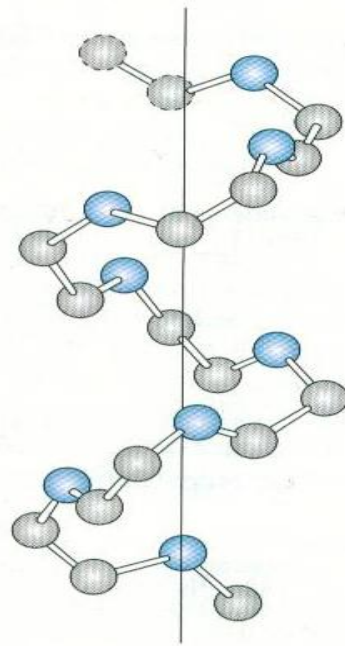
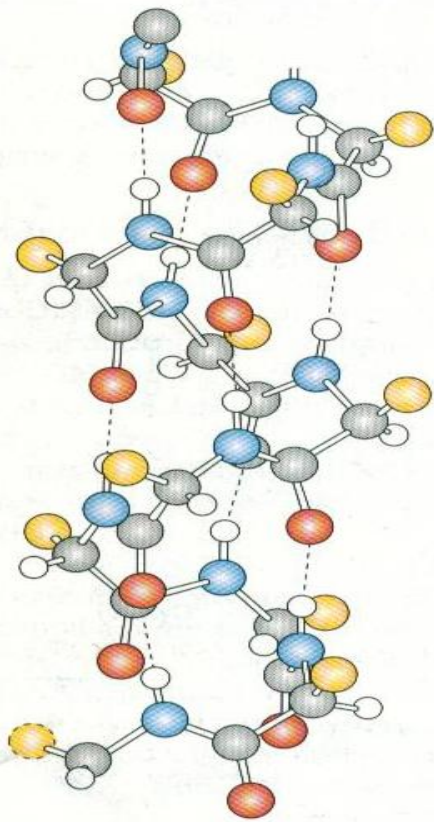
The Flow of Genetic Information



التعبير الجيني Gene expression: هي العملية التي يوجه فيها
DNA اصطناع البروتينات، بمرحلتين تعرفان بـ **الانتساخ**
والترجمة.

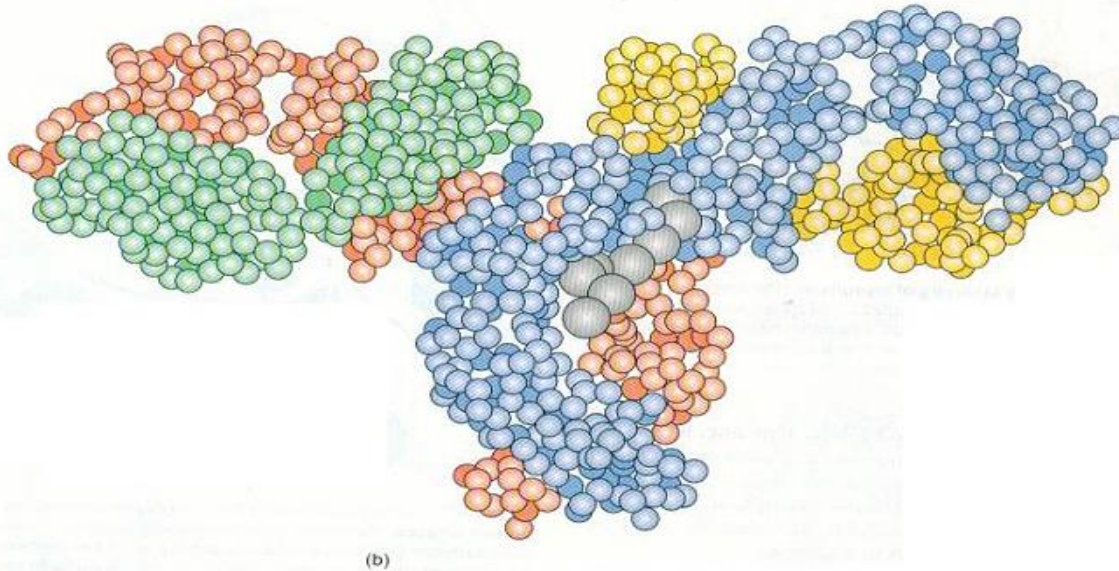
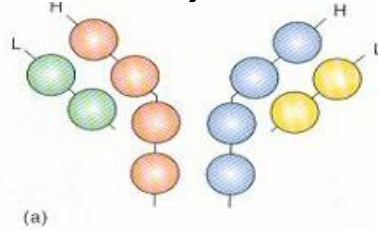


يبين الرابطة الببتيدية المشكلة بين حمضين آمينيين.



يبين تخطيط البنية الثانوية للبروتين من النمطين ألفا α (الجزء الأيسر) ومن النمط بيتا β (الجزء الأيمن).

يؤدي الانطواء الحلزوني للبنية الثانوية للبروتين وبتشكيل روابط فاندر فالس والروابط الملحية والروابط ثنائية الكبريت S-S إلى إعطاء البنية الثالثة (شكل ٢٩).



يبين البنية الرابعة للبروتين (للأمينو غلوبلين) والمؤلف من أربعة أنماط من السلاسل الببتيدية، بعد أخذها للشكل الثانوي، ومن ثم الثالثي.

Evolution of the Genetic Code

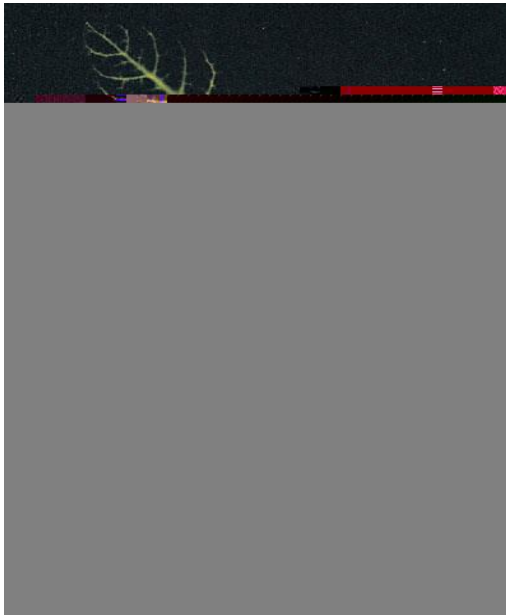
تطور الكود الجيني

هذا ما سمح لنا ببرمجة البكتيريا لجعلها تصنع بعض البروتينات البشرية بعد إدخال الجين البشرية المرزمة للبروتين المطلوب ضمنها.

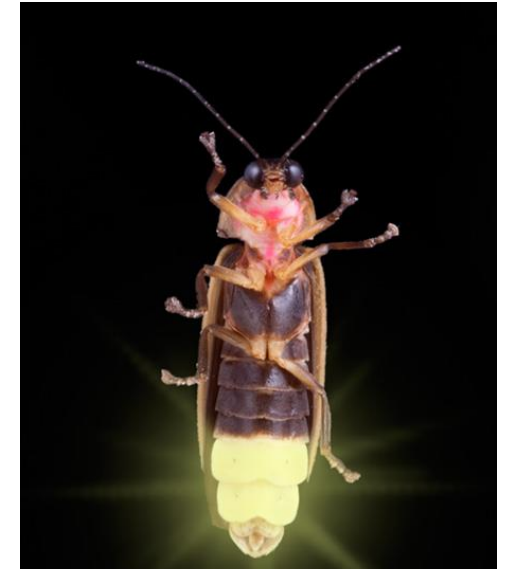
• في التجارب المخبرية

يمكن للجينات أن تنتسخ وأن تترجم بعد أن يتم نقلها من نوع حي إلى آخر حتى بين حيوان ونبات

The firefly is one of a number of bioluminescent insects capable of producing a chemically created, cold light.



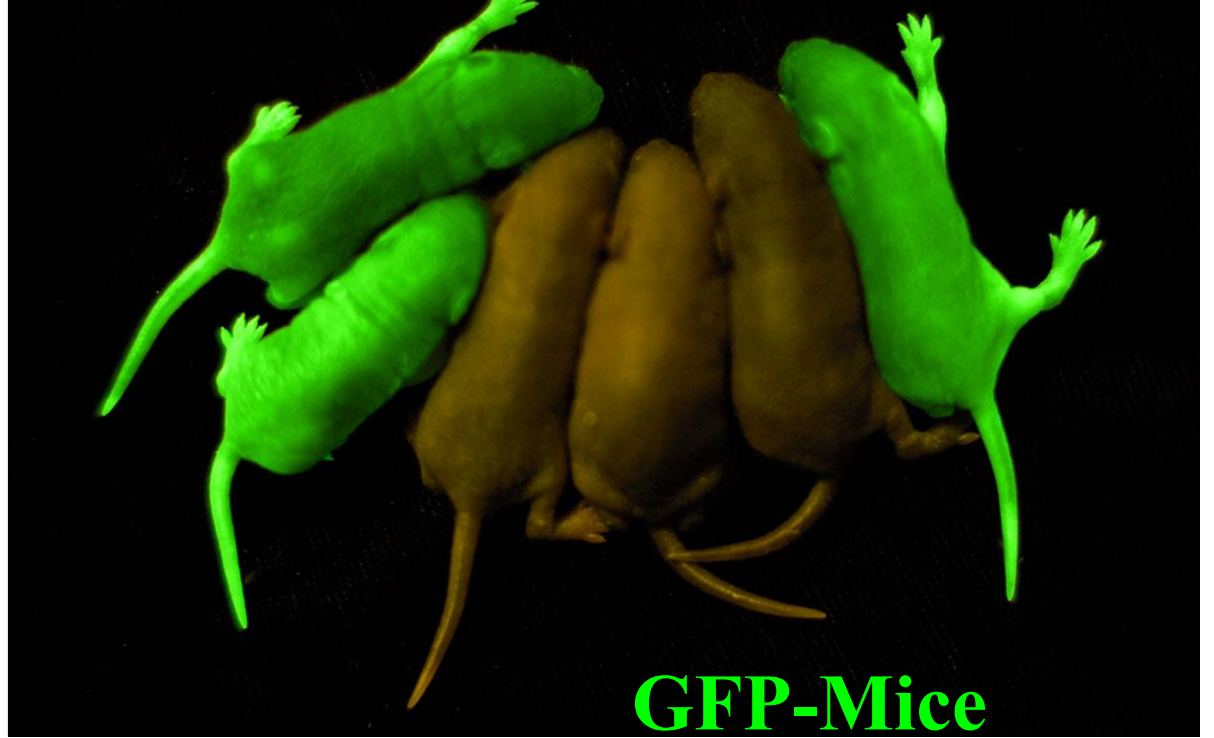
Encarta Encyclopedia, Gregory Scott/Photo Researchers, Inc.



A tobacco plant expressing a firefly gene

Transferring Gene encoding Green fluorescent protein (GFP) from jellyfish *Aequorea victoria* to mice

نقل الجين المرمزة للبروتين المتألق الأخضر من قنديل البحر إلى الفأران.



Such applications are exciting developments in biotechnology

هذه التطبيقات ناتجة عن التطور الكبير للتقانة الحيوية

تقانات في الهندسة الجينية

Techniques in genetic engineering

١- تحضير الحموض النووية

Nucleic acid preparation

١- تحضير الحموض النووية

Nucleic acid preparation

تتطلب جميع الدراسات في مجال الهندسة الجينية والتطبيقات الطبية الروتينية الحصول على عينة من الحموض النووية **DNA** و**RNA**.

الكميات المطلوبة من هذه المواد البيولوجية للقيام بالدراسة صغيرة جداً لا تتجاوز بضعة ميكروغرامات.

يمكن الحصول على DNA من أي نمط خلوي يحوي على نواة، لكن في كثير من الأحيان يتم اللجوء إلى الدم كمصدر لـ DNA لدى الإنسان للسهولة، في حين يتطلب تحضير mRNA اللجوء إلى نمط خلوي معين (النمط الخلوي الذي يعبر عنه).

خطوات التحضير:

- حل الخلايا: دارة حل Lysis Buffer مناسبة والحصول على محلول يحوي الخلاصة الخلوية المؤلفة من مزيج من الحموض النووية والبروتينات والبيدات وغيرها.
- يتم اثر ذلك:
- التخلص من البروتينات والمواد العضوية الأخرى بالمعالجة الفينولية.
- ترسيب DNA: بوساطة الكحول (الترسيب الكحولي).
- غسل DNA بالكحول ٧٠%.
- إعادة حل DNA بالماء أو بدارئة ملحية.

طريقة تحضير DNA من الدم:

تفجير كريات الدم الحمراء بهدف التخلص منها والبيض بهدف الحصول على النوى.

حل النوى بدارئة تحوي مزيج من منظف **Detergent**

(سولفات ديدوسيل الصوديوم **SDS**) ومن بروتيناز عالية

الفعالية كالبروتياز **K**. تؤدي المعالجة بهذا المزيج إلى تحطيم

الأغشية النووية وتخریب البروتينات المرتبطة بالـ **DNA**

وبالتالي تحرر DNA النووي.

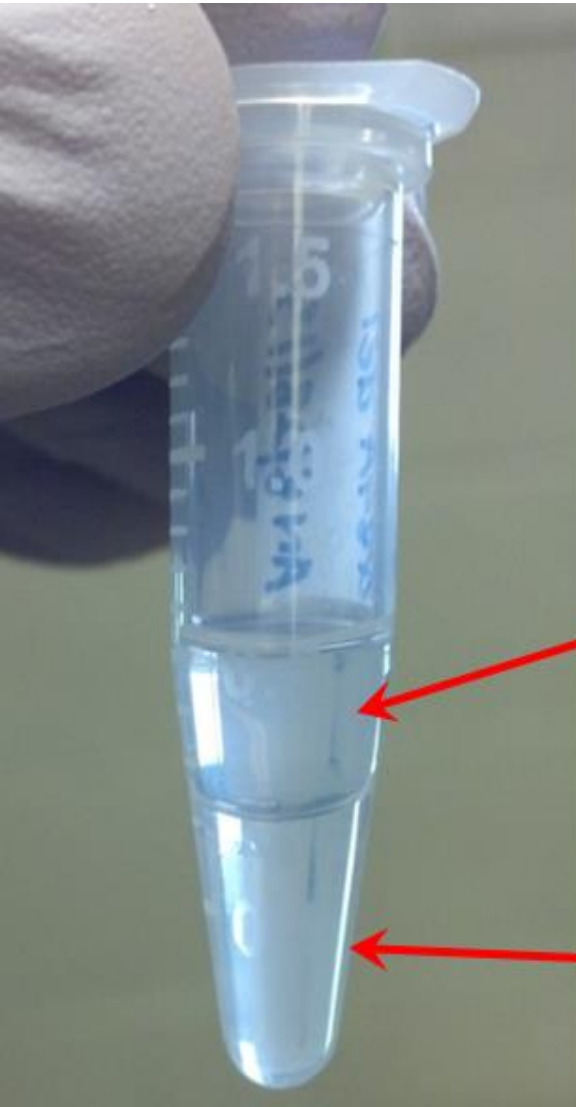
الاستخلاص الفيولي

للتخلص من البروتينات والمواد العضوية الأخرى (البيدات) ضمن الخلاصة الخلوية الحاوية على الحموض النووية، يتم استعمال **محلات عضوية** حيث تنحل الحموض النووية في المحاليل المائية في حين تنحل البروتينات والبيدات في **المحلات العضوية** التي لا تحل الحموض النووية.

عادة ما يستعمل الفيول.

الفينول محل عضوي لا يمتزج مع الماء

يستعمل لتخلص من البروتينات والليبيدات التي تشوب محلول ما من الحموض النووية.



Aqueous
Layer

حيث تبقى الحموض النووية منحلة

في المحاليل المائية في حين أن

Organic
Layer

البروتينات والليبيدات تتحلل

بسهولة في الفينول الذي لا

يستطيع حل الحموض النووية.

الترسيب الكحولي

يهدف الترسيب الكحولي إلى الحصول على الحموض النووية الموجودة في محلول ما بشكل صلب مما يمكننا من إعادة حلها في محلول جديد بغية تغيير تركيز هذه الحموض، أو تغيير الدارئة المنحلة فيها.

أهم أنواع الترسيب الكحولي:

- الترسيب باستخدام الكحول الإيثيلي (الإيتانول):

إن إنجاز هذا النوع من الترسيب يتطلب شرطين:

الأول: استخدام دارة ذات قوة أيونية عالية تحوي على ملح أحادي التكافؤ

الثاني: استخدام إيتانول عالي التركيز (ثلاثة حجوم من الإيتانول المطلق لكل حجم من العينة).

في هذه الشروط تترسب الحموض النووية بشكلٍ كاملٍ تقريباً.

يقدر الزمن اللازم للترسيب **بعده ساعات** وذلك حسب تركيز الحموض النووية

في العينة حيث يزداد هذا الزمن مع انخفاض تركيز الحموض النووية في

المحلول ويمكن أن **تسرع العملية بالتبريد** إلى الدرجة -20 م°.

ومهما كانت الطريقة المستخدمة للترسيب يجب **غسل**

الرسابة بعدها **بالكحول الإيثيلي بتركيز 70%**

(لاحتوائه على كمية من الكحول كافية لإبقاء DNA

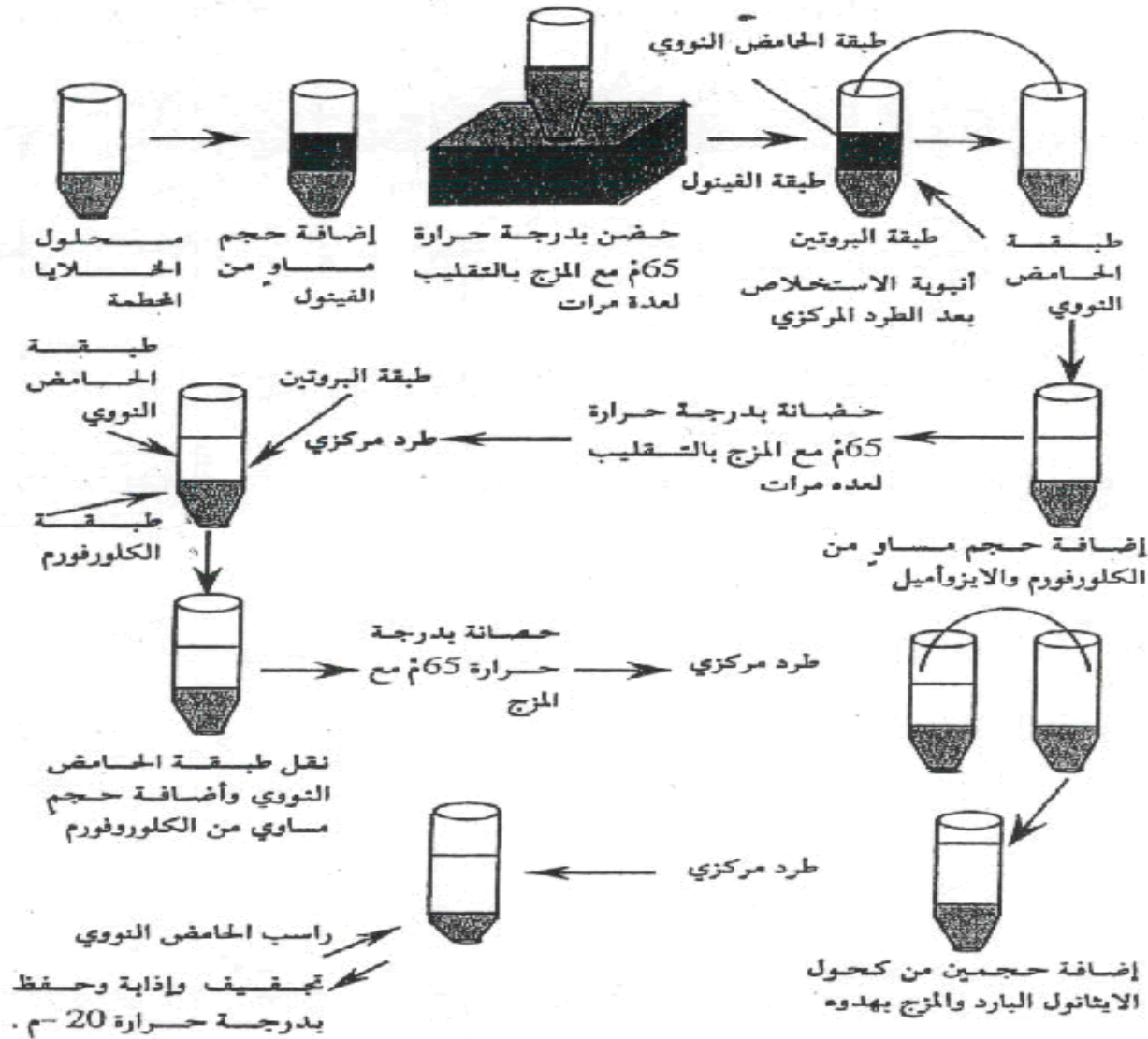
مترسب وكمية كافية من الماء لحل الأملاح) لإزالة

الأملاح العالقة بالحموض النووية وبعدها تجفف

الرسابة ويعاد حلها ضمن الماء المقطر أو ضمن

دارئة من TE (Tris+EDTA).





يبين الطريقة التي يتم من خلالها عزل الـ DNA وتنقيته بشكل تفصيلي بواسطة الفينول والكلوروفورم والأيزوبرينول

تحضير RNA الكلي Total RNA:

تعتبر دراسة RNA أكثر صعوبة من دراسة DNA وذلك لضعف بنيتها في مقاومة الريبونكلياز كـ RNaseA.

يتم معالجة النسيج أو الخلايا التي يراد استفراد RNA ابتداءً منها، وذلك ضمن دائرة مناسبة تحوي مواد مثبطة لعمل الريبونكلياز.

نحصل على جناسه تحوي البروتينات والحموض النووية.

للحصول على RNA غير المشوب بـDNA يمكن اللجوء إلى طريقة سريعة تقوم على **الترسيب التفاضلي لكل من DNA وRNA** بالاعتماد على pH الوسط والتركيز الكحولي المستخدم

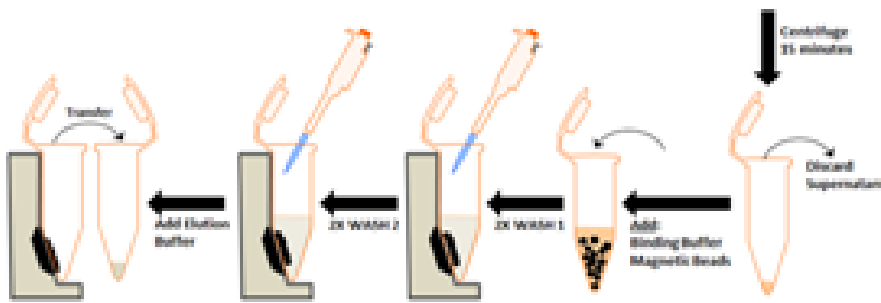
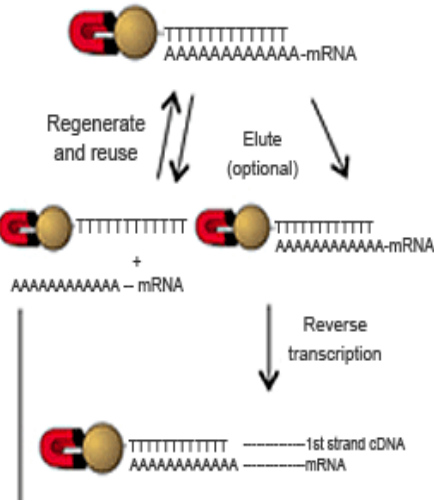
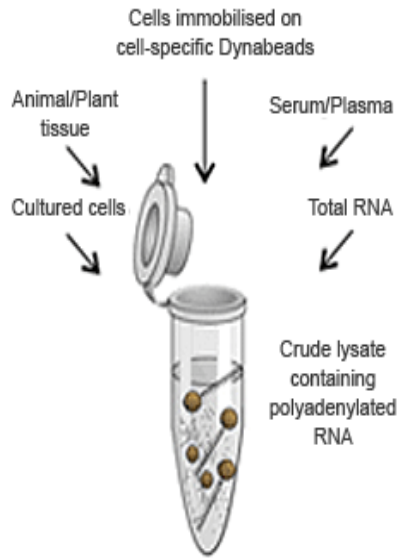
كما يمكن تحطيم DNA بواسطة أنزيم نكلياز مناسب.

نلجأ إلى الاستخلاص الفينولي لتخلص من البروتينات.

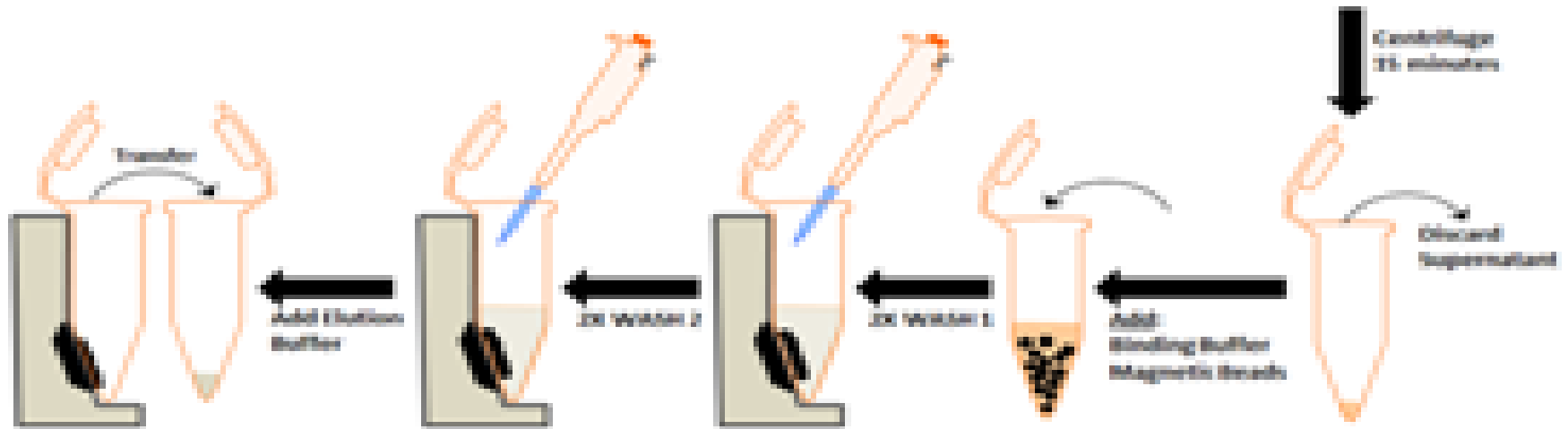
والترسيب الكحولي للحصول على RNA الكلي.

تحضير mRNAs (Messenger) الكلي

يملك السواد الأعظم من mRNA لحقيقيات النوى ذيلًا مؤلفاً من تسلسل طويل من عديد الأدينين الذي يمكن أن يتجاوز طوله ٢٠٠ نكليوتيد أحياناً. يمكن الاستفادة من هذه الخاصية لتنقية رنا الرسول بواسطة أطقم Kits جاهزة للاستعمال تحوي على كرات مكروية معدنية مغطاة بمغطة بتسلسلات من قليل التيميدين Oligo-dT تستخدم لعزل الرسول.



حيث تخلط بالمحلول الحاوي على RNA الكلي
فيرتبط mRNA بقليلات التيميدين، يجمع بعدها
الرسول بسهولة باستخدام مغناطيس يوضع على
حافة الأنبوب فترتبط الكرات الممغنطة بحافة
الأنبوب الملاصق للمغناطيس رابطةً معها الرسول،
يتم عندها التخلص من السائل المحيط بالكرات
الحاوي على باقي أنواع RNA.



تنقية الحموض النووية باستعمال التثفيل الفائق على مدروج كثافة مستمر من محلول لكلور السيزيوم

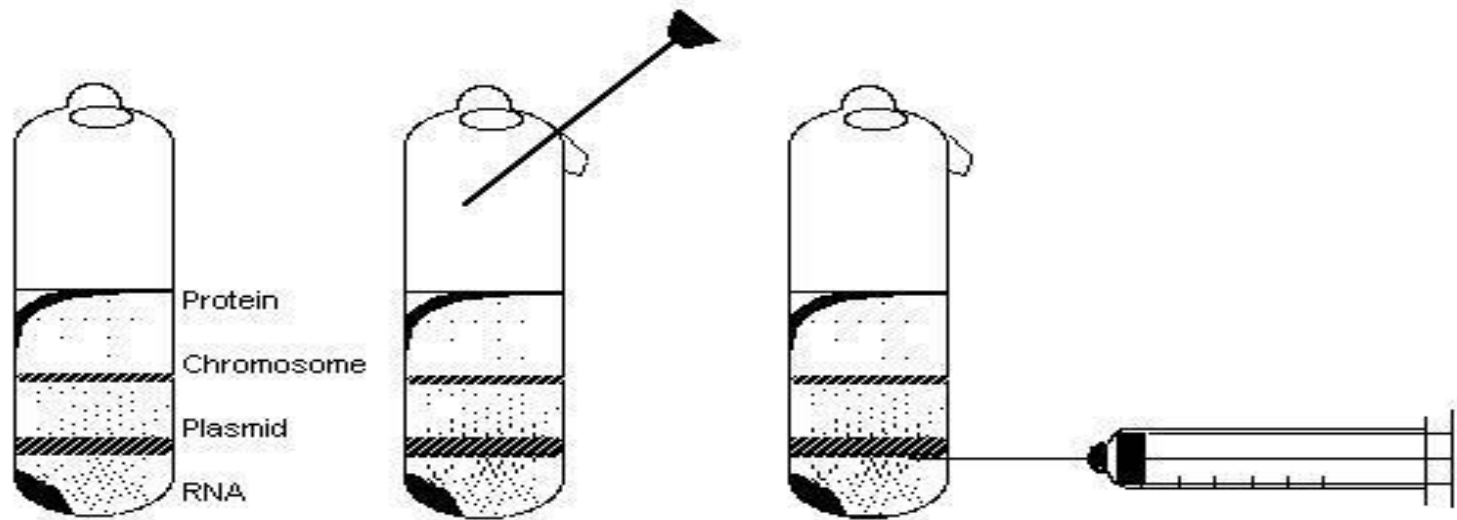
- تعرف هذه الطريقة بتسدم التوازن equilibrium sedimentation حيث يستعمل فيها محلول عالي التركيز من كلور السيزيوم (6M) الذي يتمتع بخاصية فيزيائية نوعية تتمثل بقدرته على تشكيل مدروج كثافة مستمر **continuous** **density gradient** عند تثفيله بسرعات فائقة 40000 g .

• تمزج العينة مع محلول كلور السيزيوم في الأنبوب وتتفل بسرعة معينة، يتشكل أثناء عملية التثقيل مدروج الكثافة وتتفصل مكونات العينة بتحريكها أعلى وأسفل حتى الوصول إلى المكان المناسب من المدروج الذي يصبح فيه كثافة العينة تساوي كثافة المدروج حيث تعرف هذه الكثافة بكثافة الطفو **Buoyant density**، ولا يمكن لها أن تتحرك بعد ذلك مهما طال زمن التثقيل.

تعد هذه الطريقة حساسة للغاية يمكن باستعمالها الفصل بين DNA و RNA والبروتينات.

كما يمكن فصل DNA النووي عن DNA الميتوكوندري أو البلازميدي.

كما يمكن بوساطتها فصل بين جزئين من DNA متماثلين أحدهما يحوي النظير الثقيل heavy isotope والأخر النظير الخفيف مثل $14N$ و $15N$.



2- معايرة الحموض النووية باستعمال جهاز المطياف الضوئي

Spectrophotometer

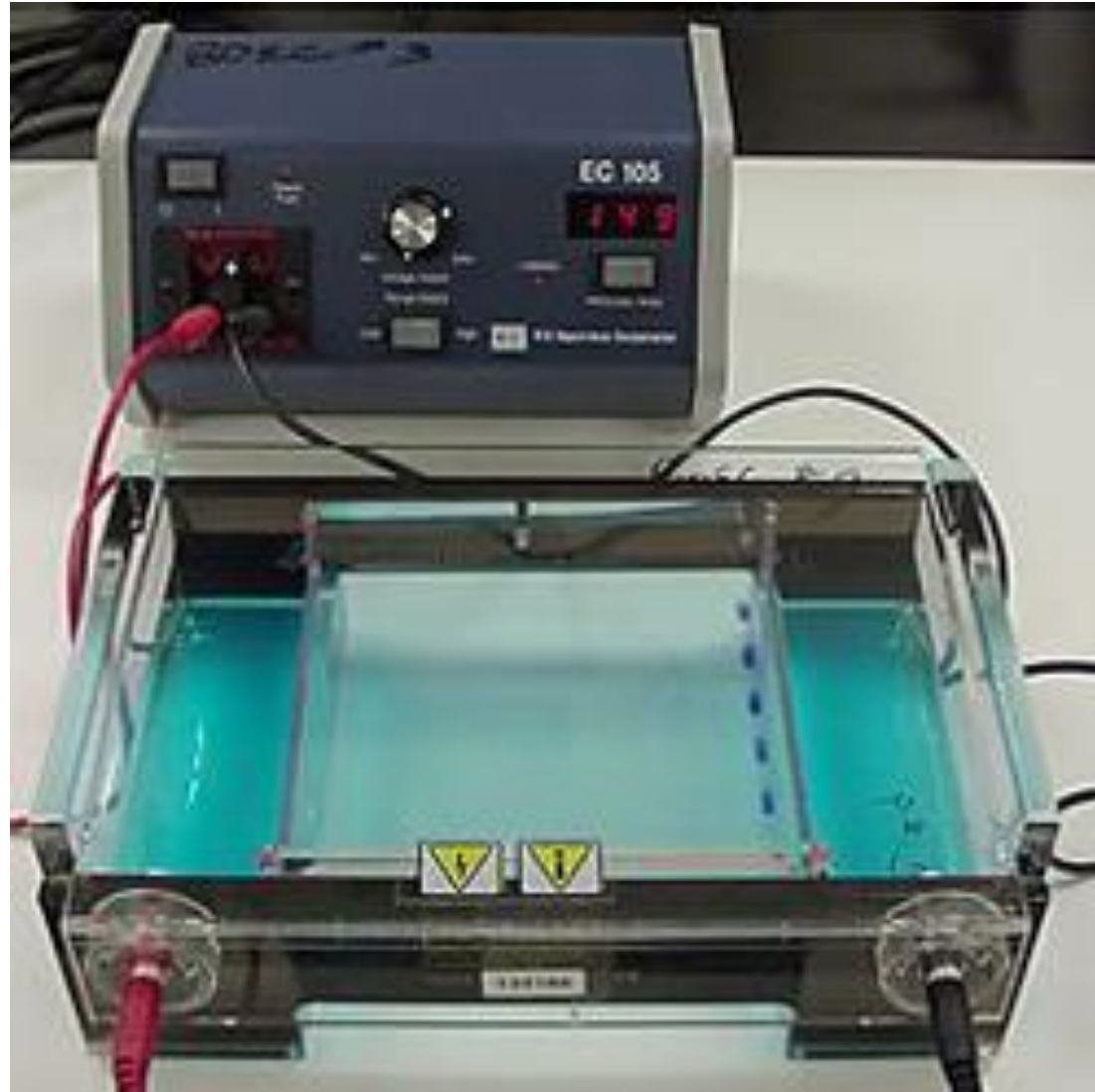
تجرى معايرة محاليل الحموض النووية كأى مادة كيميائية أخرى ماصة للضوء باستخدام جهاز المطياف الضوئي، حيث يمكننا الكشف عن الحموض النووية المنحلة في مُحلٍّ ما وذلك بقياس درجة امتصاص المحلول للأشعة فوق البنفسجية بطول موجة قدرها 260nm، وهو طول الموجة الذي تمتص عنده الحموض النووية الضوء.

تقاس شدة امتصاص محلول ما للضوء بوحدة الكثافة الضوئية **Optic Density**. ولحساب تركيز محلول ما من الحموض النووية نستخدم العلاقة التالية:

_ شدة امتصاص قدرها وحدة كثافة ضوئية واحدة على طول موجة 260nm تعادل تقريباً محلول تركيزه 50µg/ml من DNA ثنائي السلسلة و 40µg/ml (ميكروغرام) من RNA أو DNA أحادي السلسلة.



٣- الرحلان الكهربائي Electrophoresis



٣- الرحلان الكهربائي Electrophoresis

- تعتبر الحموض النووية واحدة من الجزيئات الكبيرة (الضخمة) Macromolecules المشحونة سلباً في الأوساط المعتدلة أو الأسسة (القلوية) وهذا يجعل من الممكن ترحيلها ضمن حقل كهربائي من القطب السالب إلى القطب الموجب.
- ولكن نسبة الشحنة إلى طول جزيء ما من DNA نسبة ثابتة مهما اختلف طول الجزيء
- فلتحديد طول شدة ما من DNA و لفصل مجموعة من الشداف المختلفة الطول يجب استخدام هلامة مسامية لإجراء الرحلان الكهربائي.
- حيث أن فصل الشداف حسب طولها يعود إلى القدرة الترشيحية للهلامة (خاصية الفلتر) الناتجة عن المسامية.

بشكل عام تتعلق حركية جزيء ما ضمن هلامة في حقل كهربائي بالكتلة الجزيئية للجزيء المرحل وحجم مسام الهلامة.

يمكن باختيار نوع المادة التي تصنع منها الهلامة وبتغير تركيز هذه المادة التحكم بحجم مسامها.

وتعد أكثر الهلامات استخداماً في الرحلان الكهربائي وفقاً لنوع المادة التي تصنع منها:

الهلامة المحضرة من عديد الأكريلاميد Polyacrylamide،

والهلامة المحضرة من الأغاروز Agarose .

تكون عادة المسافة التي تقطعها شذفة ما من DNA أثناء الرحلان الكهربائي على علاقة عكسية مع اللوغاريتم العشري لعدد أشفاح الأسس المكونة لها.

الهلامية المحضرة من عديد الأكريلاميد Polyacrylamide Gel

تتمتع هذه الهلامية بقوة فصل كبيرة بفضل المسام الصغيرة الناتجة عن بلمرة عديد الأكريلاميد.

يستعمل هذا النوع من الهلاميات بشكل عام لفصل شدة صغيرة من الحموض النووية أقل من 500 أساس (في حال RNA) أو شفع من الأسس (في حال DNA).

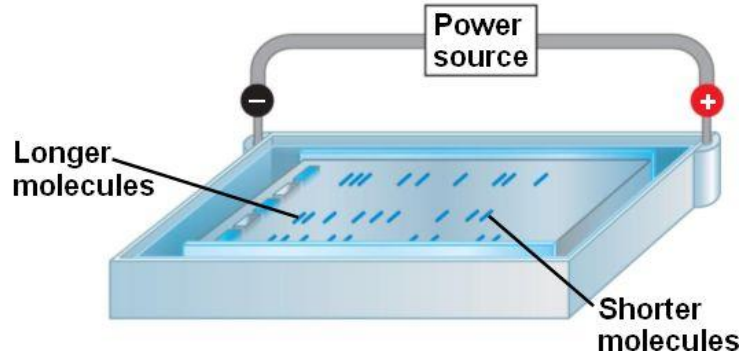
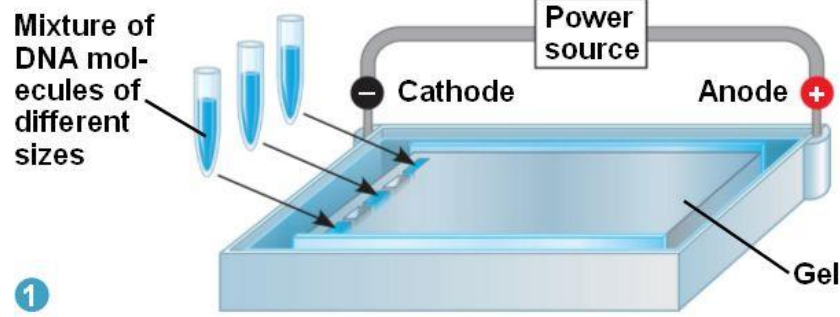
كما يستعمل هذا النمط من الهلاميات لفصل شدفتين من الحموض النووية لا يزيد طول احدهما عن الأخرى إلا بأساس واحد.

الهلامة المحضرة من الأغاروز Agarose Gel

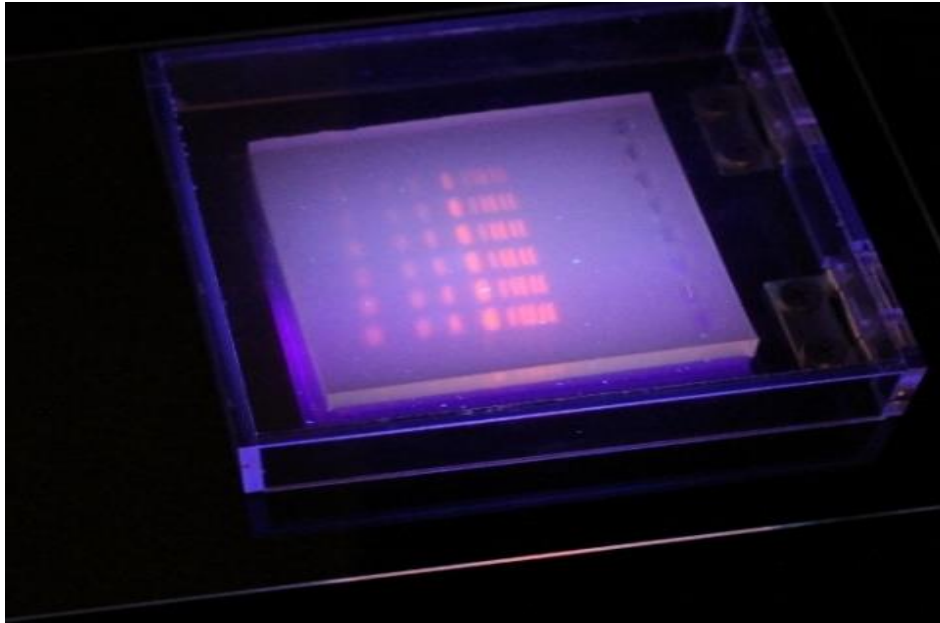
تعتبر هلامة الأغاروز الأكثر استخداماً في فصل الشداف المختلفة الطول من الحموض النووية، تتراوح الأطوال التي يمكن فصلها بسهولة بين 0.5 و 20 كيلو أساس وذلك لأن المسام التي تحويها هذه الهلامة أكبر من مسام هلامة عديد الأكريلاميد.

كما أنه يمكن التحكم بحجم هذه المسام بتغير تركيز الأغاروز المستخدم لتحضيرها.

وبحسب حجم الشدفة المراد فصلها نستخدم تراكيز مختلفة من الأغاروز وهذه التراكيز تتراوح عادة بين 0.5% و 2%.
إذ تستخدم التراكيز العالية لفصل الشداف الصغيرة (500 شفع من الأسس) والتراكيز المنخفضة لفصل الشداف الكبيرة حتى 20kb.



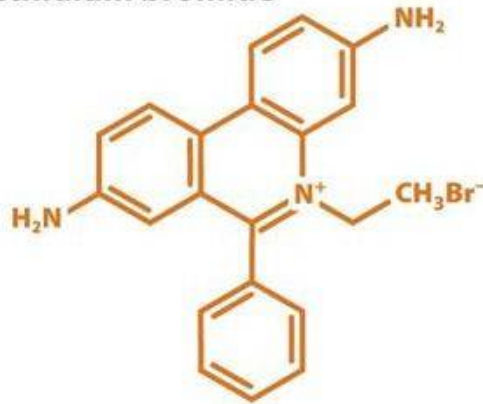
في حين لا يمكن فصل الشدفة الكبيرة جداً والتي يتجاوز طولها عشرين كيلو أساس بتقانة الرحلان الكهربائي التقليدي على هلامة الأغاروز مهما خفضنا من تركيز الهلامة.



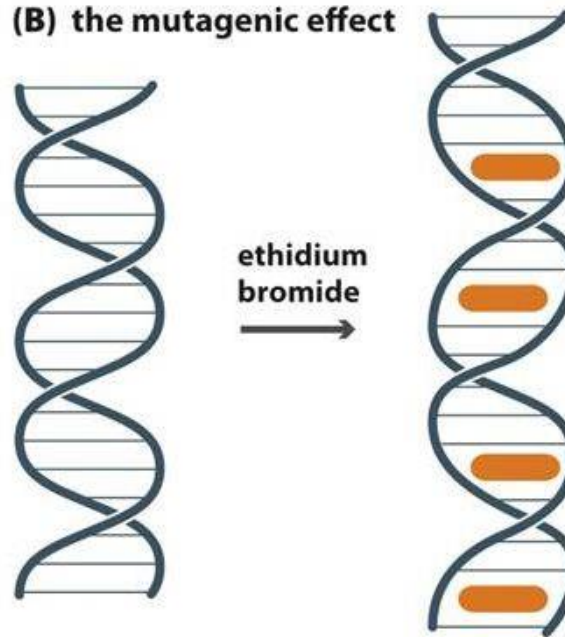
إظهار وقراءة هلامة الأغاروز بعد عملية الرحلان الكهربائي:

تستخدم لتظهير شدة DNA المرحلة على هلامة الأغاروز عدة أصبغة ملونة للـDNA، والأكثر شيوعاً واستخداماً هو **الأثيديوم برومايد Ethidium Bromide**. وهو عبارة عن مادة كيميائية غير متألقة في الحالة العادية وله القدرة على التداخل Intercalate بين شريطي الحلزون المزدوج لـDNA في هذه الوضعية ضمن الحلزون المزدوج يتألق بلون برتقالي إذا ما تمت إضاءته بالأشعة فوق البنفسجية قصيرة الموجة. تضاء الهلامة بالأشعة فوق البنفسجية على طول موجة تتراوح بين 250nm و300nm عندها يظهر DNA بشكل عصابات ملونة باللون البرتقالي كما هو موضح في الشكل السابق.

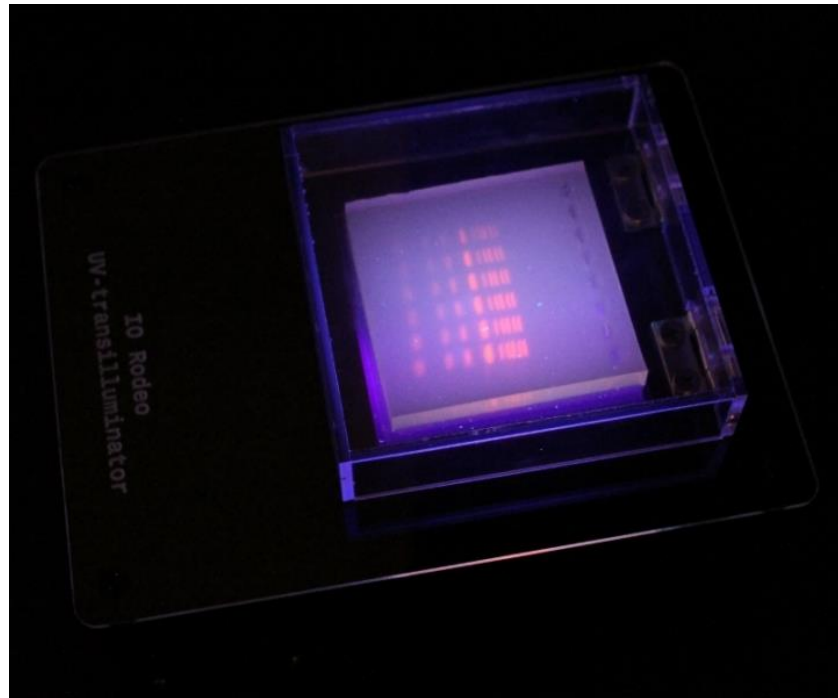
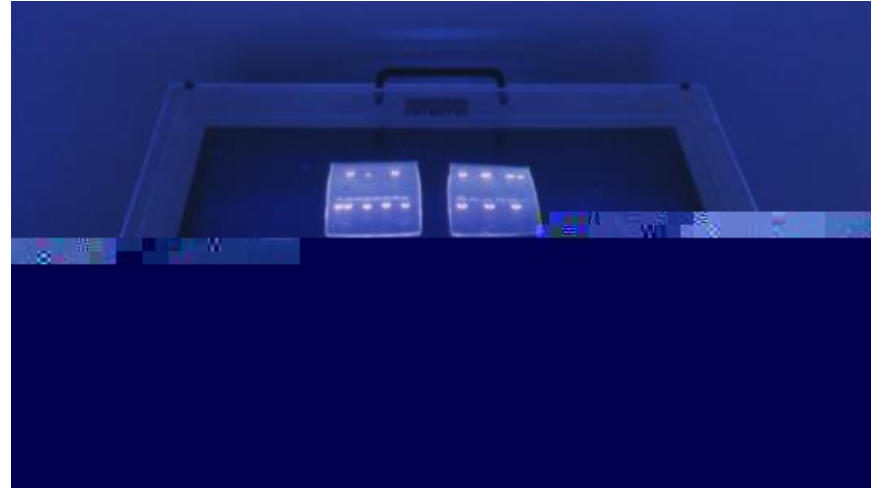
(A) ethidium bromide



(B) the mutagenic effect



Intercalation

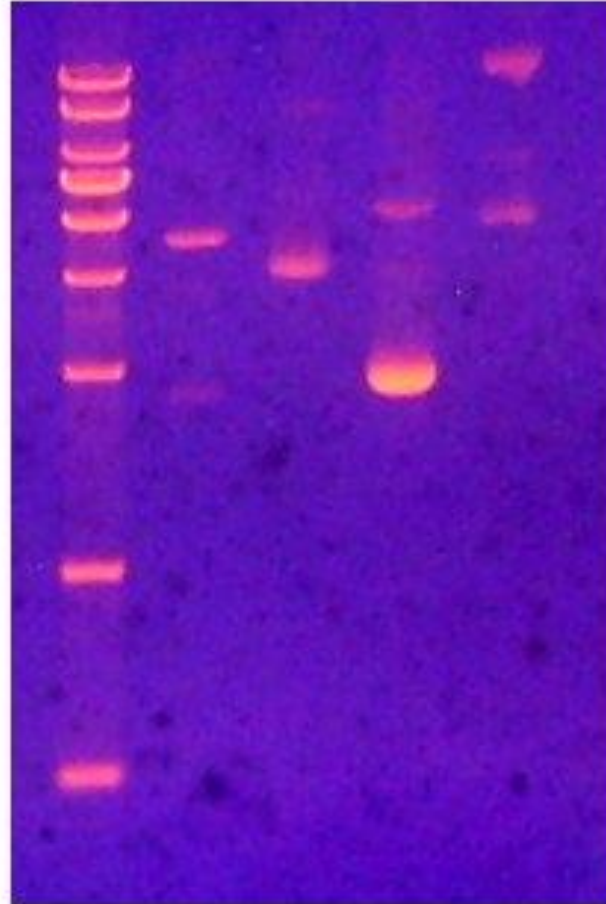
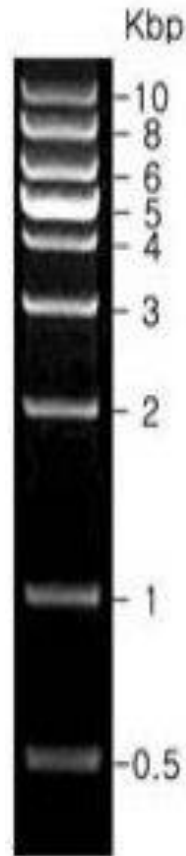


ولتوثيق نتائج الرحلان يمكن تصوير الهلامية باستخدام آلة تصوير حساسة للأشعة فوق البنفسجية UV أو آلة تصوير رقمية مزودة بمرشحة (فلتر) UV.

ويجب في كل مرة يجري فيها الرحلان الكهربائي وضع في أحد آبار الهلامية، وبجوار آبار العينات، كمية معينة من واسمات أطوال معيارية (عصائب معيارية) أو DNA معياري DNA sizes standards أو ما يعرف أيضاً بسلم DNA Ladder بحيث يصبح من السهولة التعرف على طول الشداف المرحلة بمقارنتها بالعصائب الواسمة المعيارية.

كمية معينة من واسمات أطوال معيارية (عصائب معيارية) أو DNA معياري DNA sizes standards أو ما يعرف أيضاً بسلم DNA Ladder بحيث يصبح من السهولة التعرف على طول الشداف المرحلة بمقارنتها بالعصائب الواسمة المعيارية.

[Figure 1]



- Lane 1 : 1kb DNA ladder
2 : pSB3C5
3 : pSB3T5
4 : pSB1A3-GFP
5 : pSB2K3-RFP

استعمالات الرحلان الكهربائي

As **an analytical technique** to estimate the size, (the quantity) of nucleic acid molecules by comparison with the migration of molecules of known length (known concentration)

Check an enzymatic reaction : digestion restriction, PCR.....

رحلان كهربائي تحليلي: يهدف إلى **تقدير طول الشداف** المختلفة من DNA **وتحديد كمياتها** وذلك بالمقارنة مع أطوال واسمات معيارية (سلم DNA) كما يهدف إلى **تحليل نتائج تفاعلات كيميائية تجري على DNA، نواتج تقطيع** DNA أو نواتج تفاعلات PCR.

Electrophoresis is used

As **a preparative technique** to separate one DNA fragment

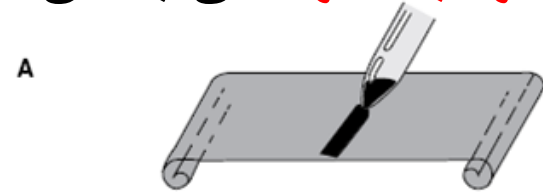
رحلان كهربائي تحضيري: يهدف إلى فصل شداف DNA عن بعضها ومن ثم **تنقية الشداف** من الهلام، عن طريق **قطع الهلام** حول الشدفة بالطول المطلوب ومن ثم تنقية DNA.

الرحلان الكهربائي للبروتينات Protein electrophoresis

هي طريقة تحليلية لدراسة البروتينات سواءً كانت منقاة أو بشكل خلاصة بروتينية.

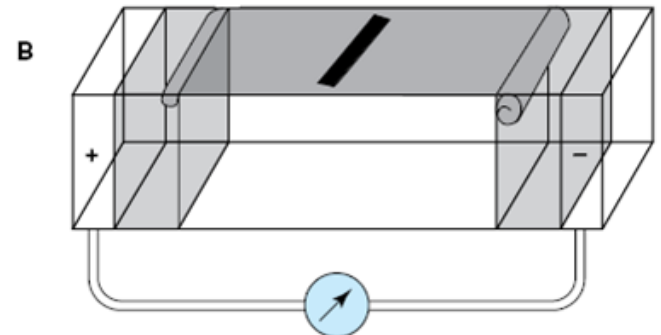
Since proteins exist as charged particles, this method is widely used for the separation of proteins in biological fluids.

بما أن البروتينات جزيئات مشحونة ، يمكن الاستعمال الرحلان الكهربائي لفصلها بعضها عن بعض في أي سائل بيولوجي أو في أي خلاصة خلوية



The technique was first used by Tiselius in 1937; named frontal electrophoresis.

(Nobel Prize in 1948)



أنماط الرحلان الكهربائي للبروتينات

الرحلان العمودي

الرحلان الأفقي

Support Medium for Electrophoresis

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

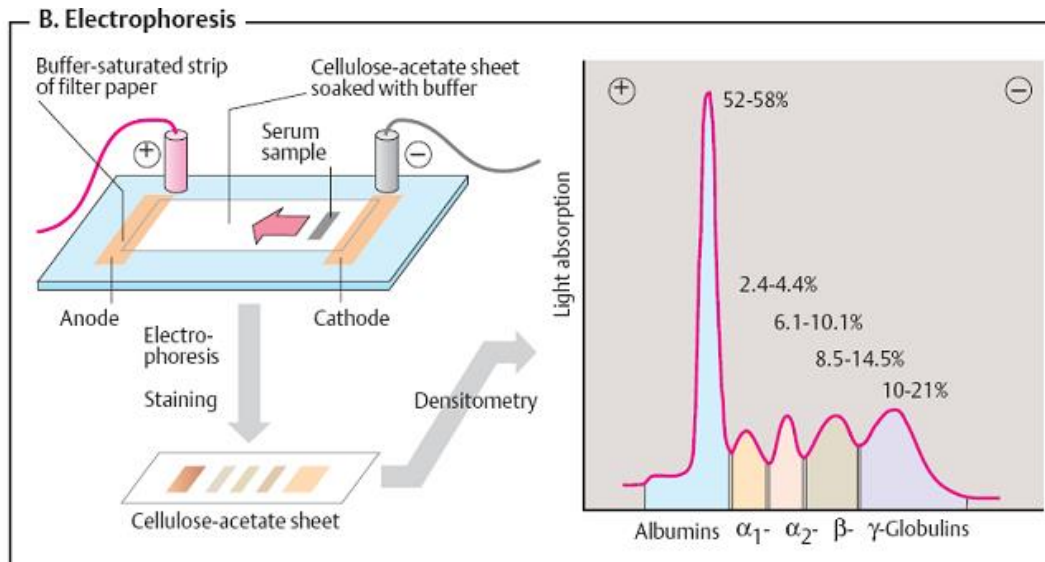
Filter Paper أوراق ترشيح

Cellulose Acetate sheet أوراق خلاص السللوز

Agar or Agarose

يمكن استعمال الرحلان الكهربائي **لأهداف طبية تشخيصية أو لأهداف بحثية.**

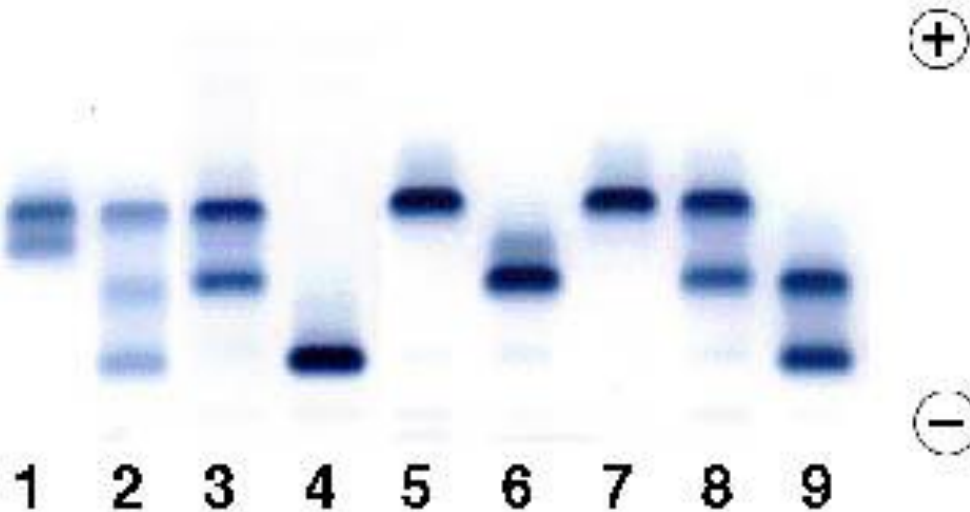
رحلان بروتينات مصل الدم: لتحديد كمية الأنماط المختلفة من البروتينات في مصل الدم؛ ألبومينات، وغلوبيينات ألفا وبيتا وجاما، يمكن بوساطته كشف بعض أبيضاضات الدم من الامثلة ايضا الانيميا المنجلية حيث يختلف الهيموغلوبين المنجلي عن الطبيعي بالشحنة مما يمكننا من تشخيصه بواسطة الرحلان الكهربائي.



وبالتالي يمكن استعمال الرحلان الكهربائي لأهداف طبية
تشخيصية أو لأهداف بحثية.

رحلان الخضاب: يكشف بواسطة الهيموغلوبينات غير
الطبيعية؛ فقر دم منجلي، وتلسميا. والانماط الأخرى.

Hemoglobin Electrophoresis on Agarose Gel



الرحلان الكهربائي ثنائي البعد Two-dimensional -Gel Electrophoresis

يعتمد على فصل البروتينات حسب شحنتها في المرحلة الأولى ثم حسب كتلتها في المرحلة

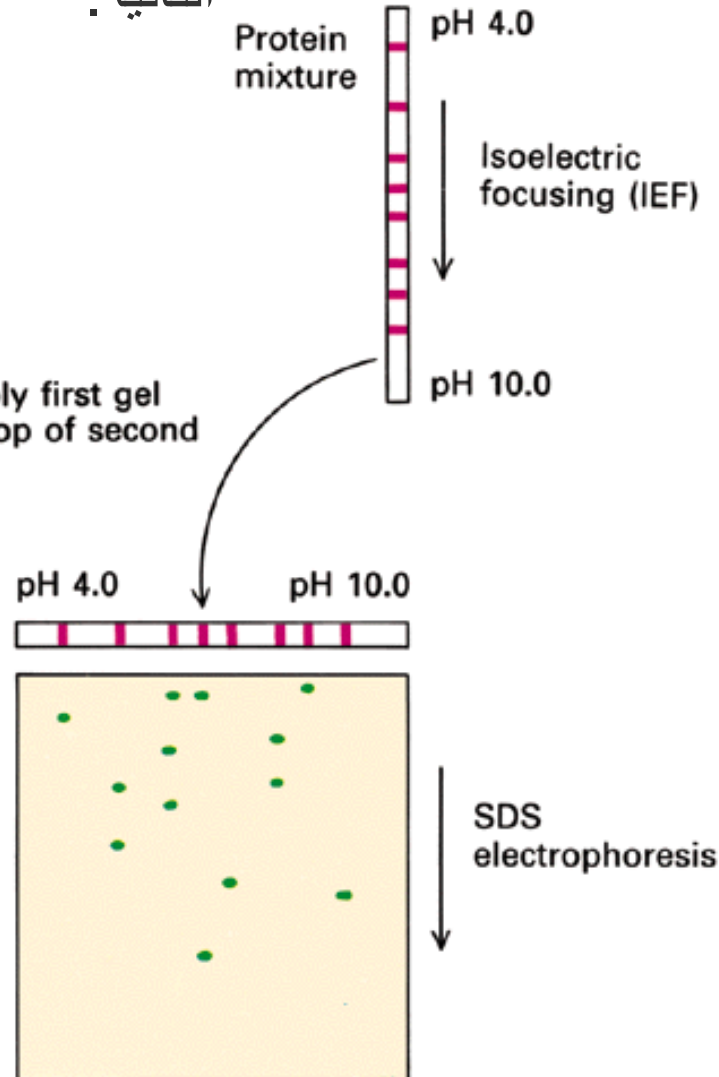
الثانية.

(a)

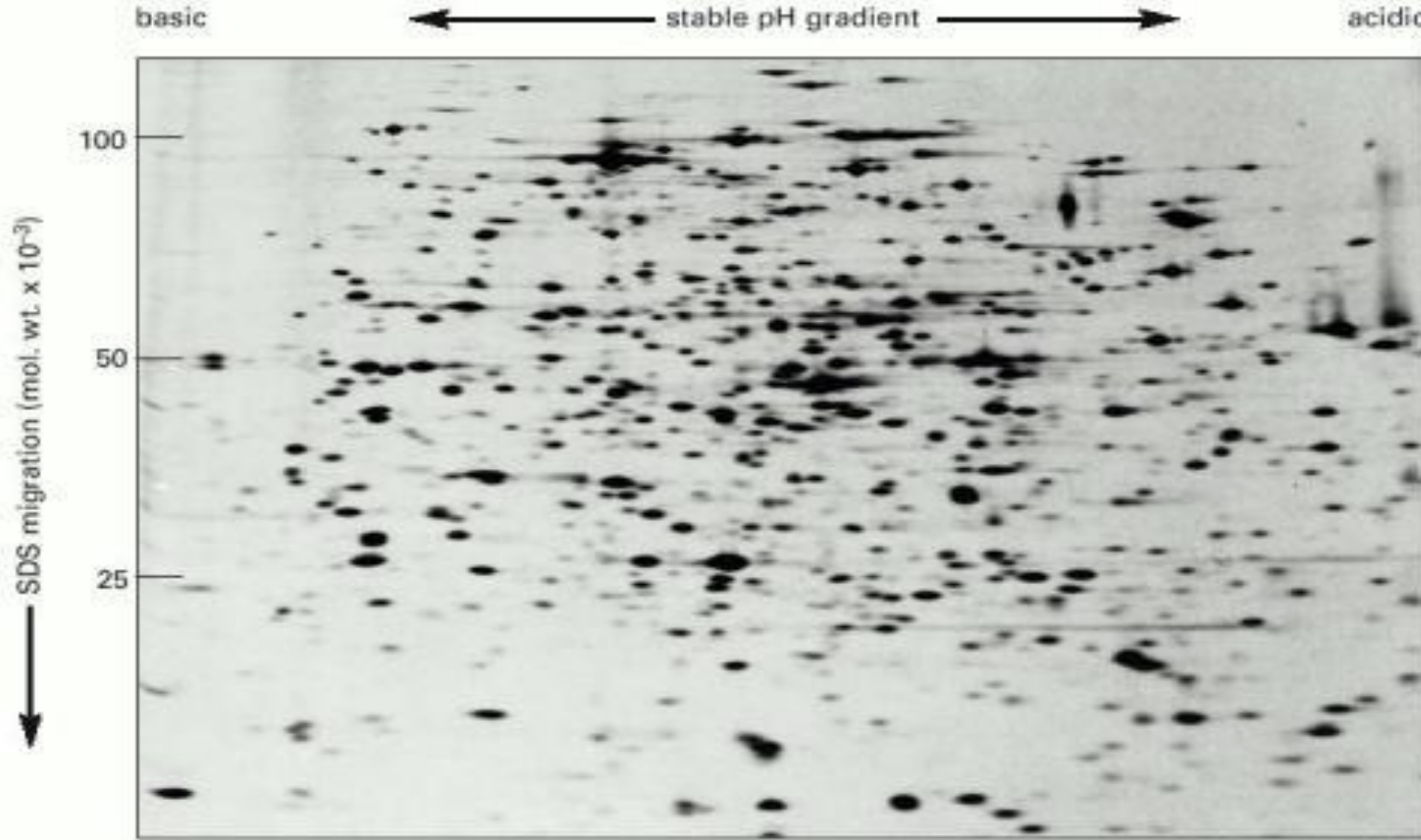
**Separation
in first
dimension
(by charge)**

Apply first gel
to top of second

**Separation
in second
dimension
(by size)**



الرحلان الكهربائي ثنائي البعد Two-dimensional -Gel Electrophoresis



الخريطة البروتينية ثنائية البعد two-dimensional protein map
الجراثيم لأحد أنماط

الرحلان الكهربائي ثنائي البعد Two-dimensional -Gel Electrophoresis

يعتمد على فصل البروتينات حسب شحنتها في المرحلة الأولى ثم حسب كتلتها في المرحلة الثانية.

The technique has such great resolving power that it can distinguish between two proteins that differ in only a single charged amino acid.

تتمتع هذه الطريقة بدقة فصل عالية حيث يمكن بواسطتها الفصل بين بروتينين يختلفان عن بعضهما بحمض أميني واحد مشحون.