



جامعة الجزيرة الخاصة
ALJAZEERA PRIVATE UNIVERSITY

Cloning-I

Pharmaceutical Biotechnology -Spring 2018-2019

Lectures # 6-7

of Students Slides: 51

Lina Albitar, *R.Ph., M.D., Ph.D.*

Faculty of Pharmacy
Aljazeera Private University

Lecture Outline

- فئات الاستنساخ

- استنساخ خلية

- استنساخ جزيئي (المبدأ والخطوات)

- اختيار حوامل الاستنساخ والخلية المضيفة

Clone

نسخة

- النسخة: خلية أو منتج خلية أو كائن مطابق جينياً للوحدة أو الفرد الذي اشتق منه

Cloning in Biotechnology

الاستنساخ في التقنية الحيوية

- العمليات المستخدمة لخلق نسخ من جزيئات الدنا (استنساخ جزيئي) أو الخلايا (استنساخ خلية) أو كائنات حية

Cell cloning

استنساخ خلية

- اشتقاق كامل مجموع الخلايا بدءاً من خلية واحدة

Cell Cloning- Unicellular

استنساخ خلية – وحيدة الخلية

- استنساخ خلية في كائنات وحيدة الخلية (البكتيريا و الخميرة) بسيط فهو يتطلب فقط تطعيم **inoculation** الخلايا في وسط الزرع المناسب



Cell Cloning- Multi-cellular

استنساخ خلية – متعدد الخلايا

- استنساخ خلية من كائن متعدد الخلايا مهمة صعبة لان الخلايا لن تنمو بشكل تلقائي
- يزرع معلق الخلايا بشكل تكون الخلايا وحيدة (معزولة عن بعضها) في وعاء مناسب بتمديد كبير لتشكيل مستعمرات معزولة: كل منها تبدأ من خلية وحيدة (تكاثرت)
- هذا يمكن انجازه في:
 1. طبق ب 96 حجيرة
 2. طبق زرع الخلايا

(1) طبق 96 حجيرة

- يوزع معلق خلايا ممدد جداً على طبق فيه 96 حجيرة باستخدام ممص متعدد القنوات بحيث تنزل خلية واحدة في كل حجيرة، فالحجيرات التي يسقط فيها أكثر من خلية يتم حذفها



2) Cell Culture Plate

(2) طبق زرع الخلايا

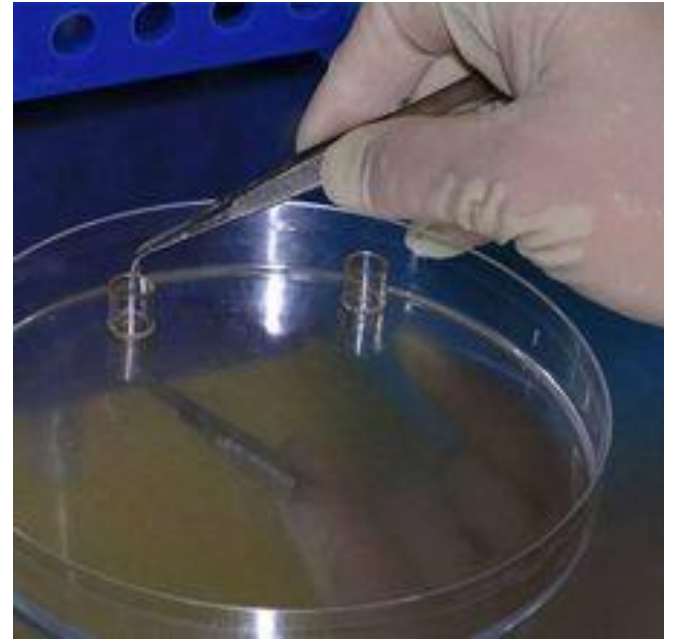
- لاستنساخ نسل (ذرية) مستقلة ومختلفة من الخطوط الخلوية في طبق زرع الخلايا، تستخدم خواتم الاستنساخ **cloning rings** لضمان زرع متجانسة وعدم اختلاط الخلايا ببعضها ولحذف المجموعات المختلطة



Cell Culture Plate

طبّق زرع الخلايا

- في طور النمو الباكر عندما تشكل الخلايا المفردة مستعمرات من بضعة خلايا، توضع خواتم الاستنساخ العقيمة فوق مستعمرات فردية



- تحصد الخلايا بسهولة من طبق 96 حجيرة أو من خواتم الاستنساخ بمساعدة كمية قليلة من التربسين (بعد ازالة وسط الزرع) والحضن لفترة قصيرة



• تجمع الخلايا المستنسخة من داخل الخواتم أو الحجيرات كل على حدة وتنقل الى طبق زرع صغير (أكبر من الحجيرة بطبق 96 ومن سعة خاتم الاستنساخ) لمتابعة النمو



- تنقل الخلايا من أوعية صغيرة الى أكبر فأكثر بشكل متتابع مما يضمن نمو جيد للخلايا
- تجمد الخلايا للاحتفاظ بمخزون للتجارب المستقبلية



الاستنساخ الجزيئي Molecular Cloning

- بالتعريف: هو عملية الحصول على نسخ متعددة لمتواليّة محددة من الدنا عن طريق عزل الدنا وتجميعها في جزيء دنا مأشوب (دنا + الحامل) وتوجيه تكرره داخل كائنات حية مضيّفة (في الزجاج)

Molecular Cloning – Principle

استنساخ جزيئي – المبدأ

- نحصل على جزئ الدنا من خلية حية ويستخدم الاستنساخ الجزيئي لإنتاج مجموعة كبيرة من الخلايا المتطابقة تحوي جزيئات دنا متطابقة

– حيث يتكرر جزئ الدنا المأشوب مع تكرر الدنا المضيف

• بالتالي:

– يتم تحريض خلية بكتيرية مفردة لقبط (أخذ) وتكرار جزئ دنا مأشوب

– يجب أن يكون الدنا المأشوب قادراً على التكرار الذاتي (يحتوي أصل التكرار)

– وهذه الخلية الوحيدة تتضاعف بشكل سريع فتولد كمية كبيرة من البكتيريا التي تحوي نسخ متطابقة من الجزئ المأشوب الأصلي

History of Molecular Cloning

تاريخ و نظرة عامة على الاستنساخ الجزيئي

- تم انتاج ودراسة أول جزيء دنا مأشوب في بداية السبعينات والذي أمكن انجازه لأن:

– التركيب الكيميائي للدنا هو نفسه بشكل أساسي في جميع الكائنات الحية

– فبينما كان الكيميائيون الحيويون يحاولون فهم الآليات الجزيئية التي تلجم البكتيريا من خلالها نمو فيروسات تهاجمها (bacteriophage تدعى العاثيات)، عزلوا بعام 1970 أنزيمات قطع سموها نوكلياز الاقتطاع الداخلية (restriction endonucleases)

Restriction Enzymes

أنزيمات الاقتطاع (التقييد)

- تقطع الرابطة الفوسفورية ثنائية الاستير بين النكليوتيدات في الحموض النووية لذا تدعى Phosphodiesterases أو Nucleases وتقسم الى مجموعتين حسب طريقة عملها:

– النوكلياز الداخلية: تهاجم الحموض النووية من داخلها

– النوكلياز الخارجية: تهاجم الحموض النووية من أطرافها

- نوكلياز الاقتطاع الداخلية (restriction endonucleases) هي إنزيمات قاطعة يمكنها أن تقطع جزيئات الدنا فقط عندما تتعرف على متواليات محددة من الدنا و تستخدم كوسيلة دفاع في البكتيريا ضد أي دنا غريب يدخلها (فتقوم بتقطيعه والتخلص منه)

- إن تقطيع جزيئات الدنا على امتداد الصبغي في مواقع محددة بواسطة نوكلياز الاقتطاع الداخلية يسمح بتنقية هذه الأجزاء المقطعة من الجزيء الأكبر (جينوم) عن طريق تجزئة الحجم size fractionation (فصل الأجزاء تبعاً لحجمها)

- وباستخدام إنزيم ثانٍ، **ligase DNA**، يمكن ضم الأجزاء المتولدة من استخدام نوكلياز الاقتطاع الداخلية في مجموعات جديدة، تسمى الدنا المأشوب
- ومن خلال انضمام قطعة الدنا التي تهمننا مع دنا الحامل (مثل العاثيات أو البلازميدات)، والتي تتكاثر بشكل طبيعي داخل البكتيريا، يمكن بسهولة إنتاج كميات كبيرة من جزيئات الدنا المأشوب المنقى

Steps in Molecular Cloning

خطوات الاستنساخ الجزيئي

- (1) اختيار حوامل الاستنساخ vector والكائن الحي المضيف (الذي سوف يتكاثر فيه الدنا المأشوب)
- (2) إعداد الدنا الحامل (قطعه وفتحه باستخدام انزيم اقتطاع محدد)
- (3) إعداد الدنا المراد استنساخه:
 1. يتم الحصول عليه من الكائن الحي الذي يهمنا
 2. يعزل من الدنا الأصلي
 3. يقطع بأنزيم الاقتطاع نفسه لتوليد شدف دنا أصغر

4) إنشاء الدنا المأشوب: يتم الجمع بين شدف الدنا و دنا الحامل المفتوح وضمهم بواسطة أنزيم **Ligase**

5) يتم إدخال الدنا المأشوب الى كائن حي مضيف (سواء من بدائيات النواة أو حقيقيات النواة) لتكرارها

6) اختيار الكائنات الحية التي تحتوي على الدنا المأشوب: تزرع الخلايا في أوساط زرع والتي يمكن فقط لخلايا تحتوي على الدنا المأشوب أن تقاوم و تبقى فيها

7) الكشف عن نسخ الخلايا ذات الدنا المحدد المرغوب والخصائص البيولوجية التي تهمننا

1. CHOICE OF HOST ORGANISM AND CLONING VECTOR

اختيار حوامل الاستنساخ والكائن الحي المضيف

Vectors

- الحامل (الناقل): عبارة عن جزيء دنا يستخدم كوسيلة لحمل / نقل المواد الوراثية الأجنبية إلى خلية أخرى (مضيفة)
- ينشأ الحامل من فيروس أو بلازميد أو خلية كائن أعلى (الخميرة والإنسان) والذي يمكن دمج جزء آخر من الدنا فيه دون فقد قدرة الحامل (الناقل) على التكاثر الذاتي

الهدف من الحامل Purpose of a Vector

- نقل معلومات وراثية (دنا مدخلة insert) إلى خلية، عادةً للمضاعفة أو التعبير عن هذا الدنا المدخل في الخلية المضيفة وبالتالي، هناك نوعان رئيسيان من الحوامل هما:

- حوامل الاستساخ (المضاعفة)
- حوامل التعبير الجيني (انتاج بروتين)

الهدف من الاستنساخ Purpose of Cloning

1) خلق كميات كبيرة من الدنا المدخلة **interest**:

– مما يمكننا من استخدام الدنا في بعض طرق التحليل أو لمعرفة تسلسل الدنا... الخ

- إذا كان تكرر الدنا في كائنات مختلفة (species) مطلوبًا، فقد يتم اختيار حامل متعدد المضيف (حامل مكوك)

الحامل المكوك Shuttle Vector

- حامل مكوك: Shuttle vector يملك أصل تكرر لمضيفين ويمكن أن يتكرر في أكثر من كائن حي مضيف أو نوعين مختلفين من الخلايا على سبيل المثال خلية بدائية النواة وخلية حقيقية النواة
- يمكن أن يتضاعف حامل مكوك الخميرة Yeast shuttle vector داخل خلايا E.coli والخميرة
- يمكن أن يتضاعف حامل مكوك الفيروس الغدي Adenovirus shuttle vector في E.coli وخلايا الثدييات

Purpose of Cloning

الهدف من الاستنساخ

(2) إنتاج منتج جيني (بروتين):

– لحصد بروتين معين من الكائن المأشوب، يتم اختيار حامل تعبير جيني يحتوي على إشارات مناسبة للانتساخ والترجمة transcription and translation في الكائن الحي المضيف المطلوب

1. اختيار حوامل الاستنساخ والكائن الحي المضيف

- تم تجربة واستخدام عدد كبير جدًا من الكائنات المضيئة وحوامل الاستنساخ؛ إلا أن الغالبية العظمى من تجارب الاستنساخ الجزيئي يتم تنفيذها باستخدام سلالة المختبر من بكتيريا الإشريشيا القولونية (E. Coli) كخلية مضيئة وحامل استنساخ البلازميد، لأنه قد تمت دراسة الكائن **E. coli** بدقة وبشكل موسع

لماذا تستخدم بكتيريا *E. coli* وحوامل البلازميد بشكل كبير في الاستنساخ الجزيئي؟

• لأن *E. coli* وحوامل البلازميد:

1. متنوعة Versatile
2. حميدة
3. متوفرة على نطاق واسع
4. تتطلب حد أدنى من المعدات
5. تنمو *E. coli* بسرعة وسهولة
6. الحوامل متطورة تقنيا

Transformation Efficiency

كفاءة التحويل

- هي الكفاءة التي تقبض الخلايا (تدخل اليها) بها الدنا الخارج الخلوي مثل الدنا المأشوب:

- هذا يعتمد على:

(1) جدارة الخلايا

(2) نوع الحامل **vector**

- يمكن حساب كفاءة التحور عن طريق قسمة عدد المحورات الناجحة على كمية الدنا المستخدمة أثناء إجراء التحور

$$TE = \frac{\text{مهورات ناجحة}}{\text{كمية الدنا المستخدمة}} \times \text{\# successful transformants}$$

amount of used DNA

- المحورات Transformants هي خلايا أخذت (أدخلت إليها) دنا غريب أو اصطناعي أو معدّل

الجدارة Competence

- هي قدرة **the ability** الخلية على قبط الدنا خارج الخلوي من بيئتها
- الجدارة الطبيعية: قدرة طبيعية محددة وراثيا للبكتيريا على قبط الدنا دون أي علاج خاص (لا في الطبيعة ولا في المختبر)
- الجدارة المستحدثة أو المصطنعة: تنشأ عندما يتم علاج الخلايا في الزروع المختبرية لجعلها قابلة لاختراق الدنا بشكل عابر

الجدارة الطبيعية Natural Competence

- تحمل البكتيريا مجموعات من الجينات التي تنتج البروتينات اللازمة لجلب الدنا عبر غشاء الخلية

Artificially Competence

الجدارة الصناعية

• يتم تحفيز الجدارة الصناعية عن طريق إجراءات مختبرية

لجعل الخلية نفوذة للدنا عن طريق تعريضها لظروف لا

تحدث عادة في الطبيعة

• طريقتان رئيسيتان هما:

1. شوارد الكالسيوم

2. التنقيب الكهربائي Electroporation (ستتم دراسته لاحقاً)

CLONING VECTORS

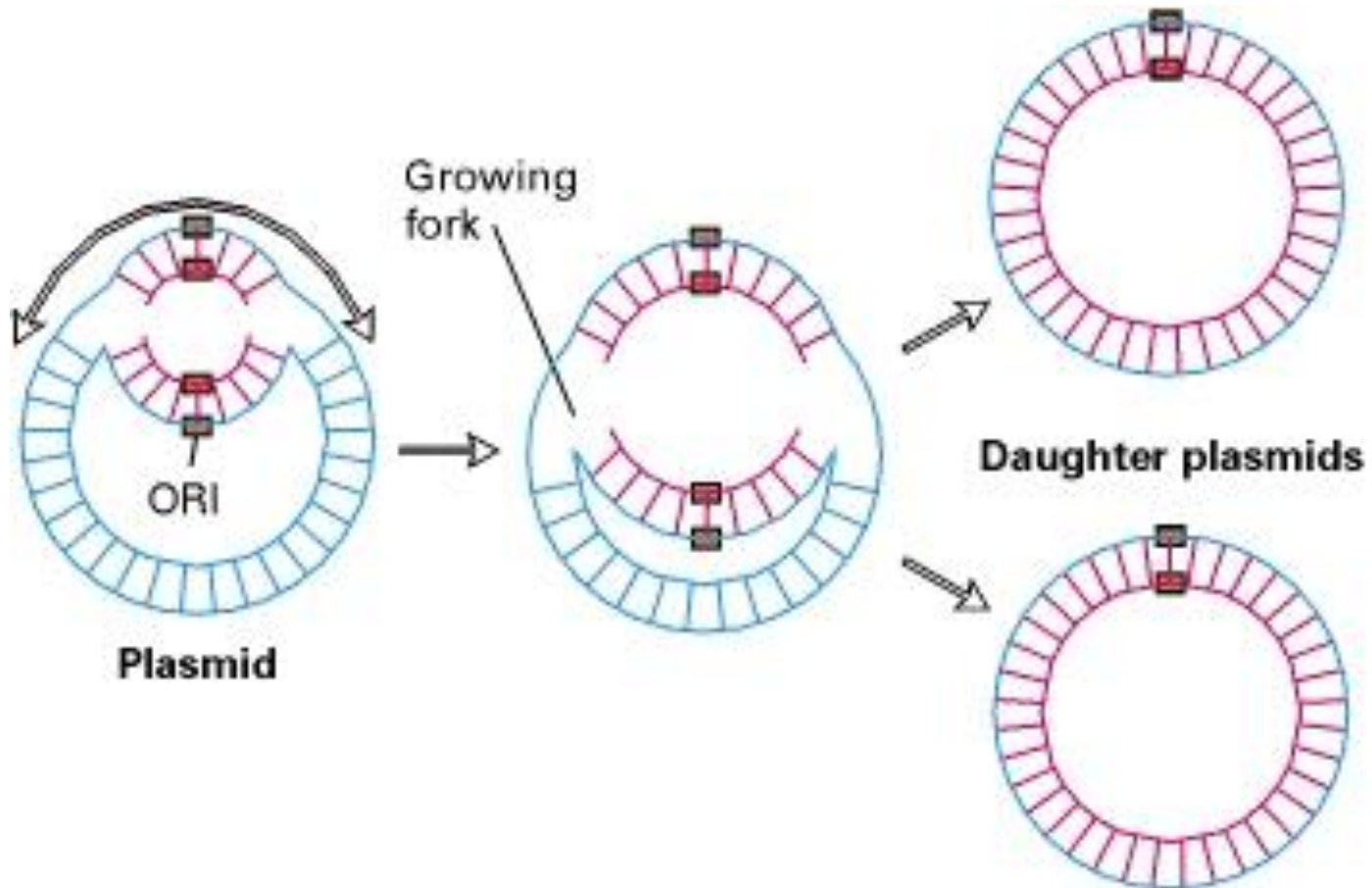
حوامل الاستنساخ

The Essential Characteristic of a Vector

السمة الرئيسية للحامل

- السمة الرئيسية للحامل هي وجود أصل تكرر الدنا (ORI) مما يجعل نسخ الحامل والدنا المدخلة insert في الخلية المضيفة ممكناً

- ترتبط إنزيمات الخلية المضيفة بأصل التكرار (Ori)، ويبدأ تكرار البلازميد الدائري. بمجرد بدء تكرار الدنا في Ori، فإنه يستمر حول البلازميد الدائري بغض النظر عن تسلسل النوكليوتيدات (ناقل أم دنا مدخلة insert)



- وبالتالي يتم تكرار أي تسلسل للدنا في البلازميد مع بقية دنا البلازميد. هذه الخاصية هي أساس استنساخ الدنا الجزيئي

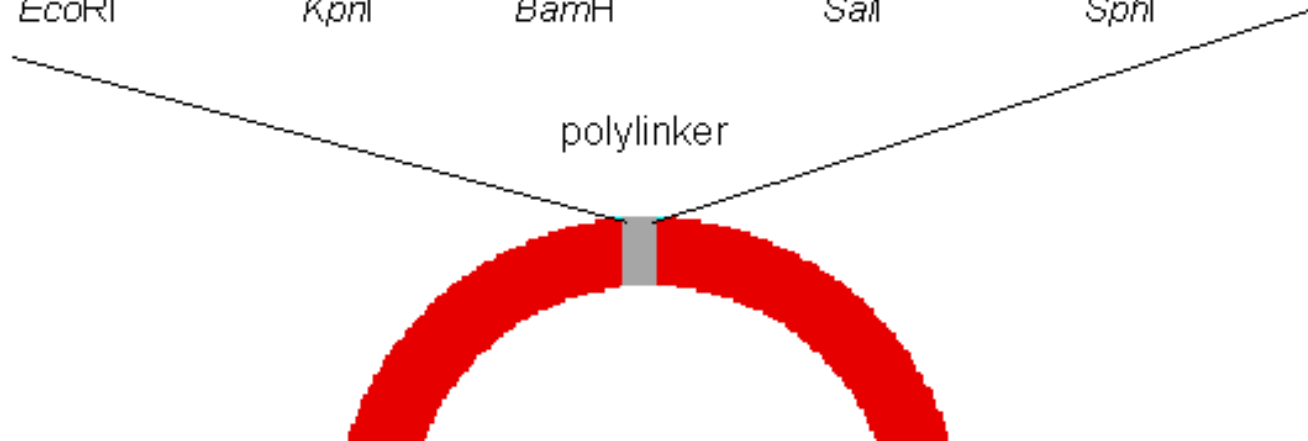
– لاستنساخ عينة الدنا، يجب استخدام نفس إنزيم الاقتطاع لقطع كل من الحامل وعينة الدنا

Polylinker

- يحتوي الناقل عادةً على متواليات مصنعة بالمخبر، تُدعى polylinker أو موقع استنساخ متعدد (MCS multiple cloning site) والذي يمكن للعديد من إنزيمات الاقتطاع التعرف على متواليات ضمنه مما يسهل عملية الإدخال لأي شذفة من الدنا

- تعريف موقع استنساخ متعدد Polylinker: شريحة قصيرة من الدنا تحتوي على العديد من مواقع الاقتران (حتى 20 موقع) ويعد توفر هذه الشريحة ميزة اساسية (معيارية) للحوامل المصنعة. عادةً تكون مواقع الاقتران داخل MCS فريدة من نوعها، أي تحدث مرة واحدة فقط داخل حامل معين وذلك لتسمح بقطع الحامل مرة واحدة فقط بأنزيم اقتران معين

SacI SmaI XbaI PstI HindIII
 GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT
EcoRI KpnI BamHI SalI SphI



• تشمل حوامل الاستنساخ المستخدمة ما يلي:

1. البلازميد Plasmid

2. العاثية لامبدا Lambda Phage

3. كوزميد Cosmid

4. صبغي الخميرة الصناعي Yeast Artificial

Chromosome (YAC)

البلازميد – Cloning Vectors

- البلازميد الطبيعي: جزيئة دنا دائرية مزدوجة الطاق خارج صبغية ذاتية التكرار، تختلف عن جينوم البكتيريا الطبيعي وعادة لا تكون ضرورية لبقاء الخلية
- يشفر البلازميد السمات "غير الأساسية" بشكل عام مثل عوامل الخصوبة ومقاومة المعادن الثقيلة ومقاومة الصادات الحيوية وسمات الاستقلاب الخاصة التي تمكن من هضم المواد غير المعتادة، على سبيل المثال التولوين وحمض الساليسيليك

- يصنع حامل البلازميد من البلازميدات الطبيعية عن طريق إزالة الأجزاء غير الضرورية وإضافة تسلسلات أساسية للعمل كحامل، ويتوفر عدة أجيال من البلازميدات (أكثرها استخداماً الجيل الثالث)

- تمتلك بعض البلازميدات نطاق مضيف واسع بينما تملك البلازميدات الأخرى نطاق ضيق جداً من الكائنات المضيفة التي تقوم بتكررها

Cloning Vectors - Plasmids

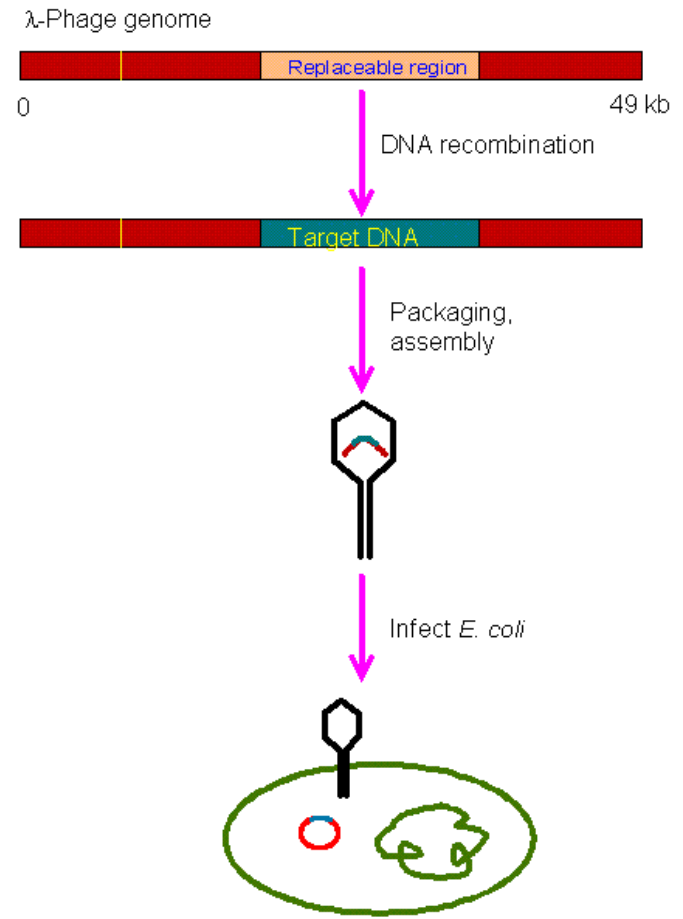
- يتراوح حجم البلازميدات من بضعة kb إلى ما يقرب من 100 kb ويمكن أن يحمل ما يصل إلى 15 kb من الدنا الأجنبي

Cloning Vectors - Lambda Phage

- العاثية لامبدا عبارة عن فيروسات يمكنها أن تصيب البكتيريا، وهي أحد النواقل الفيروسية المستخدمة في الاستنساخ
- تتمثل الميزة الرئيسية لحامل العاثية لامبدا λ phage في كفاءة التحور العالية فهو أكثر كفاءة بنحو 1000 مرة من حامل البلازميد

Cloning Vectors - Lambda Phage

- طول الجينوم 49 kb
- يمكن أن تحمل ما يصل إلى 25 kb من الدنا الأجنبي



كوزميد Cosmid – Cloning Vectors

- ناقل استنساخ مصطنع ، مزيج من ناقل البلازميد والعائية لامبدا

مميزات الكوزميد Cosmid – Advantages

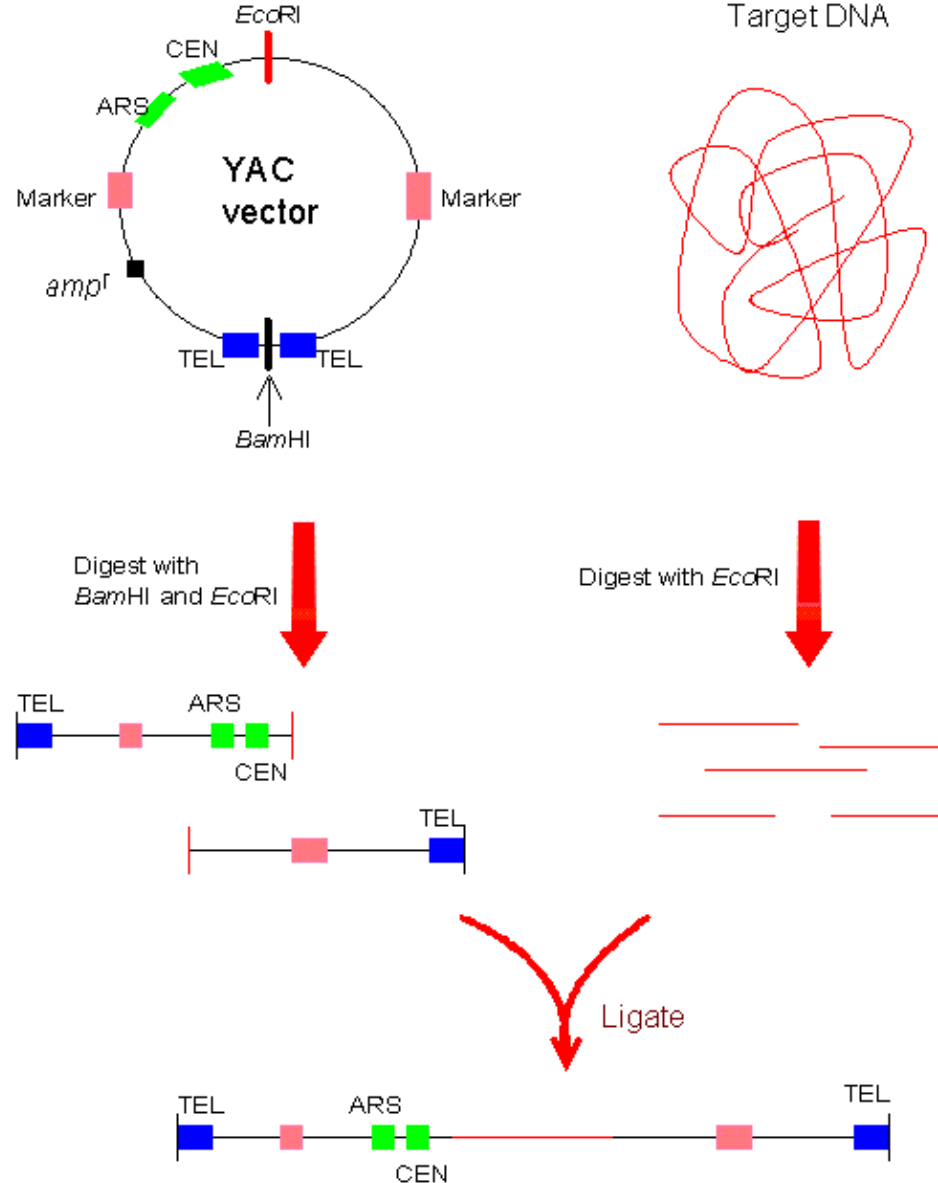
1) Cosmids يمكن تعبئتها في جزيئات العاثية لامبدا وادخالها للعدوى في البكتيريا E. coli. وهذه الطريقة أكثر كفاءة بكثير من التحور transformation؛ لذلك، نحصل على كفاءة أكبر من البلازميدات ويطلق عليها اسم Transduction

2) يمكن أن يحمل الحامل cosmid ما يصل إلى 45 KB من الدنا المدخلة في حين تقتصر ناقلات البلازميد و phage على 15 و 25 على التوالي

Cloning Vectors - YAC

- إذا كان الدنا المراد استنساخه كبيرًا بشكل استثنائي، أي يمتد مئات الآلاف إلى ملايين الأزواج الأساسية bp، فغالبًا ما يتم اختيار ناقل صبغي اصطناعي (YAC) لتكرار الدنا المستنسخ داخل خلايا الخميرة
- اذ يتم تحويل خلايا الخميرة باستخدام YAC، وهو قادر على حمل جزء كبير من الدنا، يبلغ طوله من 0.2 إلى 2 مليون زوج من الأسس bp، لكن كفاءة تحوره منخفضة جدًا

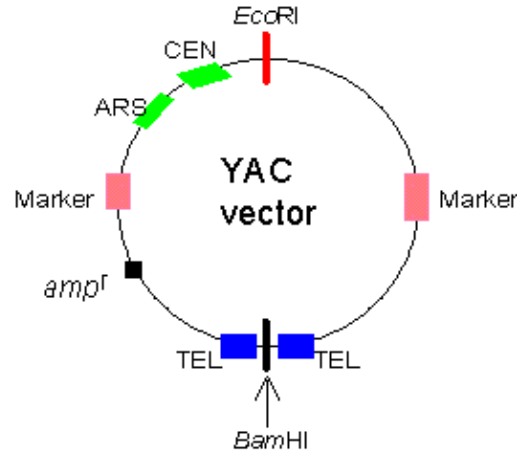
- العمود الفقري هو من البلازميد وفيه 4 متواليات أساسية لتكرار الخميرة
- ARS: متواليات التكرار الذاتي (أصل التكرار)
- Cen: متواليات القسم المركزي Centromere
- Tel: متواليات للقسيمات الطرفية Telomere



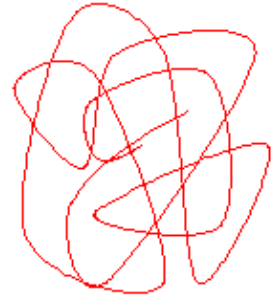
Cloning Vectors - YAC

• يتم قطع الدنا المستهدف بواسطة أنزيم **EcoRI** ويتم قطع الحامل YAC بواسطة أنزيمين **EcoRI** لإدخال الدنا (و بأنزيم **BamHI** لجعل الناقل خطي)

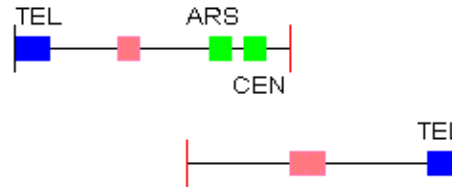
• ويتم ربط الحامل وجزء الدنا المشقوقان لتشكيل صبغي اصطناعي



Target DNA



Digest with **BamHI** and **EcoRI**



Digest with **EcoRI**



Ligate

