Cloning-II
الاستنساخ II

Pharmaceutical Biotechnology -Spring 2018-2019

Lecture # 8

# of Students Slides: 42

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

Faculty of Pharmacy
Aljazeera Private University

Lecture Outline

- حوامل التعبير الجيني
- تحضير الحامل والدنا المراد استنساخه
- أنزيمات الاقتطاع الداخلية
- انتاج الدنا المؤشب

Expressing Vectors
حوامل التعبير الجيني

- هي الحوامل المستخدمة **للتعبير عن مورثة** معينة في شدفة الدنا وبالتالي **ترجمتها**

- تملك حوامل التعبير المختلفة عناصر مختلفة للتعبير الجيني

  – فحامل التعبير البكتيري يعبر عن البروتين في البكتيريا

  – و حامل التعبير الثديي يعبرعن البروتين في الثدييات

- تتحدد **ثباتية التعبير** (الترجمة) **بثباتية الانتساخ** transcription (انتاج mRNA) والذي يعتمد بشكل عام **على المعززات** promoters (مكان ارتباط أنزيم RNAبوليميراز) في الحوامل

- وهناك نمطين من حوامل التعبير الجيني بالاعتماد على أنماط مختلفة من أنماط المعززات promoters' expression patterns

Expression Pattern
نمط التعبير الجيني

- **بنيوي** Constitutive: وبالتالي تعبير **مستمر**

- **قابل للتحريض** Inducible: فقط تحت تأثير **شروط أو مركبات** معينة

Constitutive Expression
التعبير الجيني البنيوي

المعززات الفيروسية **Viral promoters**:

- تستخدم غالباً للتعبير الجيني **المستمر** في الحوامل لأنهم بشكل طبيعي يفرضوا **انتساخاً (انتاج mRNA) ثابتاً**

constant transcription

Inducible Expression
التعبير الجيني القابل للتحريض

- التعبير الجيني **المحرض** يعتمد على المعززات promoters التي تستجيب لشروط تحريض معينة:

– المعززات المنظمة كيميائياً **Chemically-regulated promoters**: هي المعززات التي تنظم (تضبط) فعاليتها الانتساخية transcriptional بوجود أو غياب مركبات كالكحول، التتراسكلين، الستيروئيدات، المعادن وغيرها

– المعزازات المنظمة فيزيائياً **Physically-regulated promoters**: هي المعزازات التي تنظم (تضبط) فعاليتها الانتساخية transcriptional بوجود أو غياب **الضوء**، درجات **حرارة** منخفضة أو مرتفعة

Expression Vectors –Features
ملامح حوامل التعبير الجيني

- 1) المتواليات الضرورية للانتساخ (**لبدء وانتهاء وتحسين** الترجمة بما فيها ارتباط الرايبوزوم) وعلى رأسها **المعزاز Promoter:** اذ أن وجود المعزاز **عنصر رئيسي** في جميع حوامل التعبير الجيني لعملية انتساخ transcription الجين الذي يحمله الحامل

والحوامل الحديثة قد تحوي أحد او بعض ما يلي:

2) **مقاومة الصادات الحيويةAntibiotic resistance:**

- تسمح ببقاء الخلايا التي قبطت الحامل في أوساط نمو تحوي على الصادات

3) الجزء من المستضد الذي يرتبط بها الضد **Epitope**:

– يحتوي الحامل بهذه الحالة على متوالية ل**Epitope** معين يعبر عنها بشكل **مدموج مع البروتين** الناتج فيتيح وجود الepitope تعرف الاضداد على الخلايا التي تنتج البروتين الهدف

4) متوالية تعمل في **الاخبار عن نجاح التأشيب** (جين LacZ): اذا نجح التأشيب فيتخرب جين LacZ ولا يتم التعبير عن أنزيم البيتاغالاكتوزيداز

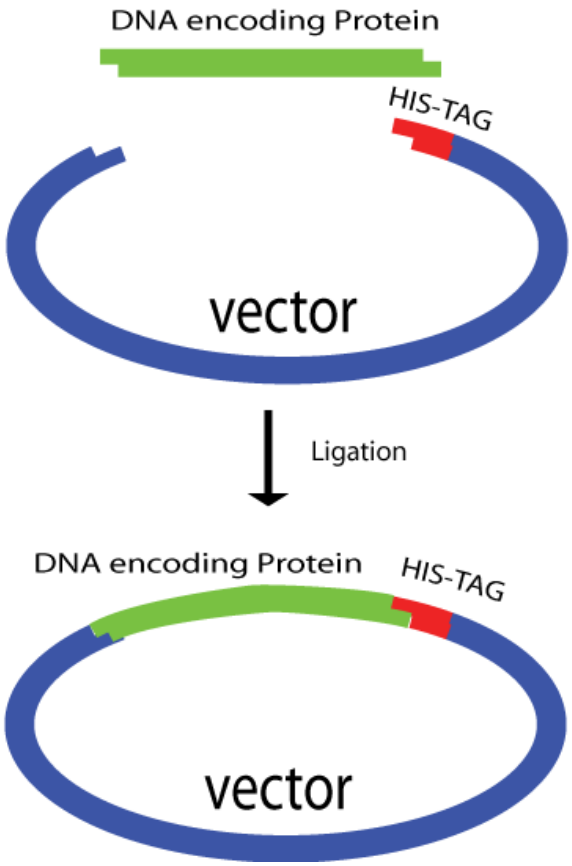
5) متوالية **الاستهداف**targeting

- متوالية مرمزة لتسلسل معين يعمل لاستهداف البروتين النهائي اذ توجه متوالية **الاستهداف** البروتين المعبر عنه الى **مكان محدد في الخلية**

6) متوالية **الوسم** Tagging

- متوالية مرمزة لتسلسل معين يعمل لوسم البروتين النهائي اذ يسمح **واسم/ علامة تنقية البروتين** Protein purification tag **بتنقية أسهل للبروتين** المعبر عنه مثل واسم عديد الهستيدين (polyhistidine-tag)

- واسم عديد الهستيدين polyhistidine (His-tag)عبارة عن عنصر يتكون من **5 بقايا على الأقل من الهستيدين** (الأكثر استخدامًا هو 6 بقايا)



- تمكن الكشف عن البروتين عن طريق **الأجسام المضادة للواسم** عديد الهستيدين والتنقية من خلال **الاستشراب** (تنقية الألفة)

2. Preparation of Vector
تحضير الحامل

- يتم قطع دنا حوامل الاستنساخ بواسطة **أنزيم الاقتطاع الداخلي** (حيث سيتم إدخال الدنا الغريب) لخلق ترتيب في موقع الانقسام في الحامل **متوافق** مع ذلك في نهايات الدنا الغريب

- تحتوي معظم الحوامل الحديثة على مجموعة متنوعة من مواقع الانقسام المناسبة التي:

1. **تعتبر فريدة** داخل جزيء الحامل: لا يمكن تقطيع الحامل إلا في موقع واحد مع إنزيم اقتطاع معين
2. يمكن أن يتم حشرها داخل **جين وهو (LacZ) بيتا غالاكتوزيداز عادة**: والذي يمكن أن يقود تعطيله لتمييز الكائن الحي المؤشب من الكائنات الحية غير المؤشبة في خطوة لاحقة من العملية

3. Preparation of DNA to be cloned
تحضير الدنا المراد استنساخه

DNA of Interest: Gene Amplification
الدنا موضع الاهتمام: تَضْخيمٌ جينِيّ

- تهتم معظم تكنولوجيات البيولوجيا الجزيئية بدراسة الجين، الذي عادة ما يتم عزله وتكثيره

- الا أنه يمكن استخدام الاستنساخ الجزيئي (سواء في الجسم الحي أو في المختبر) لتضخيم أي **متوالية للدنا** وليس فقط الجينات:

1. المعززات promoters
2. متواليات غير مرمزةnon-coding sequences
3. متواليات قَليلُة النُّوكليوتيدات مصنعة كيميائيا oligonucleotides
4. الدنا المجزأة عشوائيا randomly fragmented DNA

DNA Sources
مصادر الدنا

يمكن الحصول على الدنا لتجارب الاستنساخ من:

1) الدنا الجينومي **Genomic DNA** بحيث يتم استخراج الدنا المراد استنساخه من الكائن الحي المعني

يمكن أيضًا الحصول على الدنا لتجارب الاستنساخ من:

2) **الحمض النووي الاصطناعي** (التَخْليقِيّ) **Synthetic** :

يستخدم تخليق الجينات الاصطناعي Artificial gene synthesisللحصول على أي تسلسل محدد باحكام precise يصممه الباحث

3) من **الرنا باستخدام الانتساخ العكسي** reverse transcriptase: فاستنساخ الدنا التكميلي **(cDNA)** يستخدم للحصول على نسخ clones تمثل مجموعة الرنا المرسال mRNAمن الخلايا ذات الاهتمام

- افتراضياً، يمكن استخدام أي مصدر للأنسجة (حتى الأنسجة من الحيوانات المنقرضة) ، طالما أن الدنا لم يتحلل بشكل كبير

3.Preparation of DNA تحضير الدنا

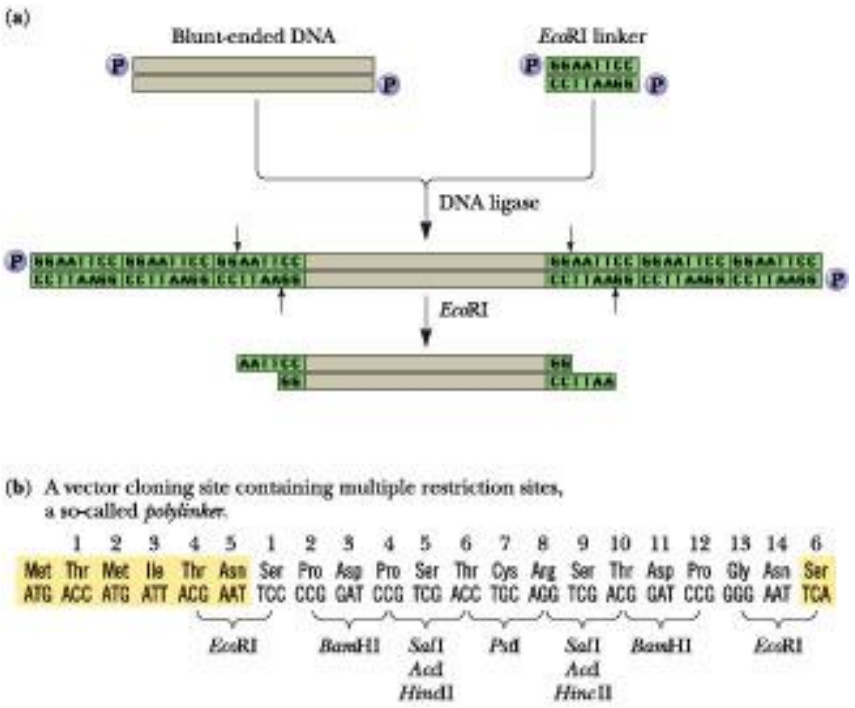
- أ) يتم تنقية الدنا باستخدام طرق بسيطة لإزالة:

1. **البروتينات** (الاستخلاص بالفينول)
2. **الرنا** (Ribonuclease ريبونوكلياز، RNase)
3. **الجزيئات الأخرى** (الترسيب precipitationو / أو الاستشراب chromatography)

- ب) يعامل الدنا المنقى بعد ذلك بأنزيم اقتطاع داخلي (مقيد) restriction enzyme لتوليد شظايا ذات نهايات يمكن ربطها بنهايات الحامل

3.Preparation of DNA

- ج) إذا لزم الأمر، يمكن إضافة شرائح قصيرة من الحبل المزدوج (DNA) تدعى **linkers**) تحتوي على مواقع تقييد مرغوب فيها تتعرف عليها أنزيمات الاقتطاع لإنشاء بنيات بنهاية الدنا متوافقة مع الحامل (مثل مبدأ الpolylinker بالحامل لكن هنا بالدنا)



Restriction Endonucleases
نوكلِيازات الاقتطاع الداخلية

- تشير كلمة "الاقتطاع/ التقييد" restriction باسم هذه الإنزيمات إلى **وظيفتها في البكتيريا** التي يتم عزلها منها: يدمر نوكلياز الاقتطاع الداخلي (يقيد) الدنا الغريب الوارد (على سبيل المثال دنا العاثيات) عن طريق قطعه في جميع مواقع التقييد الأنزيمية الموجودة في الدنا

- تتعرف النوكلياز المقيدة على متوالية نوكلوتيدات محددة، قصيرة إلى حد ما، ضمن جزيء الدنا، يسمى موقع التقييد، ويقطع الدنا ضمن موقع التعرف هذا أو في أي مكان آخر، اعتمادًا على نوع الإنزيم

- هناك ثلاث فئات رئيسية من نوكلِيازات الاقتطاع (التقييد) الداخلية يعتمد تجميعهم ضمن فئات بشكل أساسي على:

1) **نوع المتوالية** المتعرف عليها

2) **طبيعة القطع** المنجز في الدنا

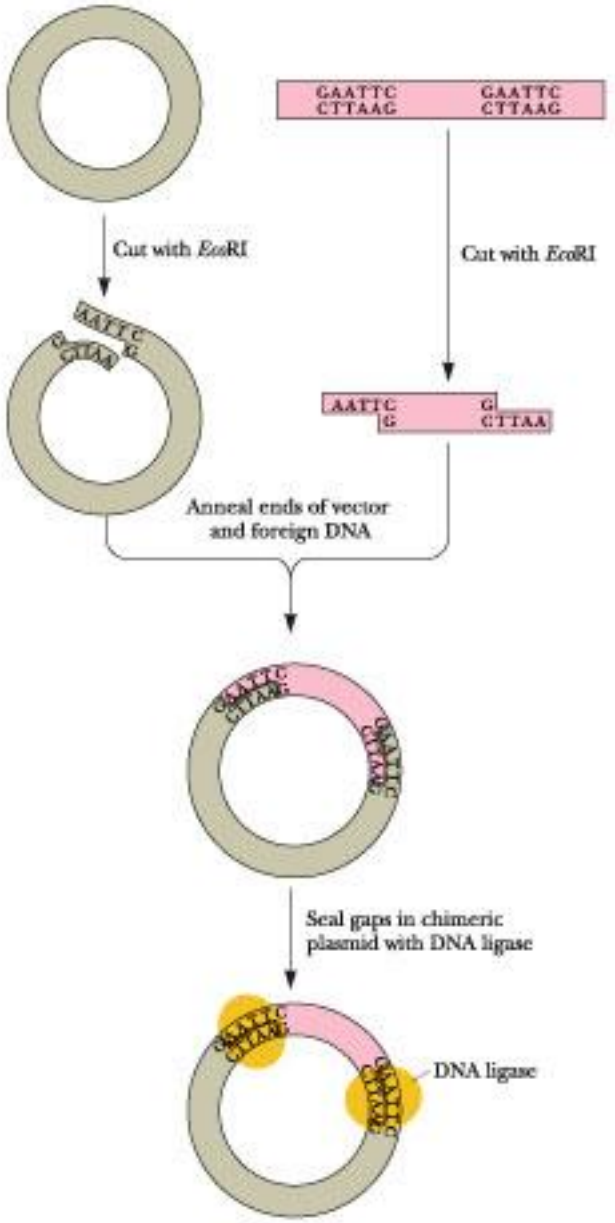
- النوع الأول **Type I**: يقوم بقص كلي الطاقين في موقع غير محدد يبعد> **1000 bp** عن موقع التعرف

- النوع الثاني **Type II** : يقص كلي الطاقين في موقع محدد 4–8 (bp)، عادة ما يكون راجعاً / متناقصًا بسِياقٌ مُتَناظِر (يقرأ من اليمين لليسار مثل من اليسار لليمين)

*Eco*RI recognition site

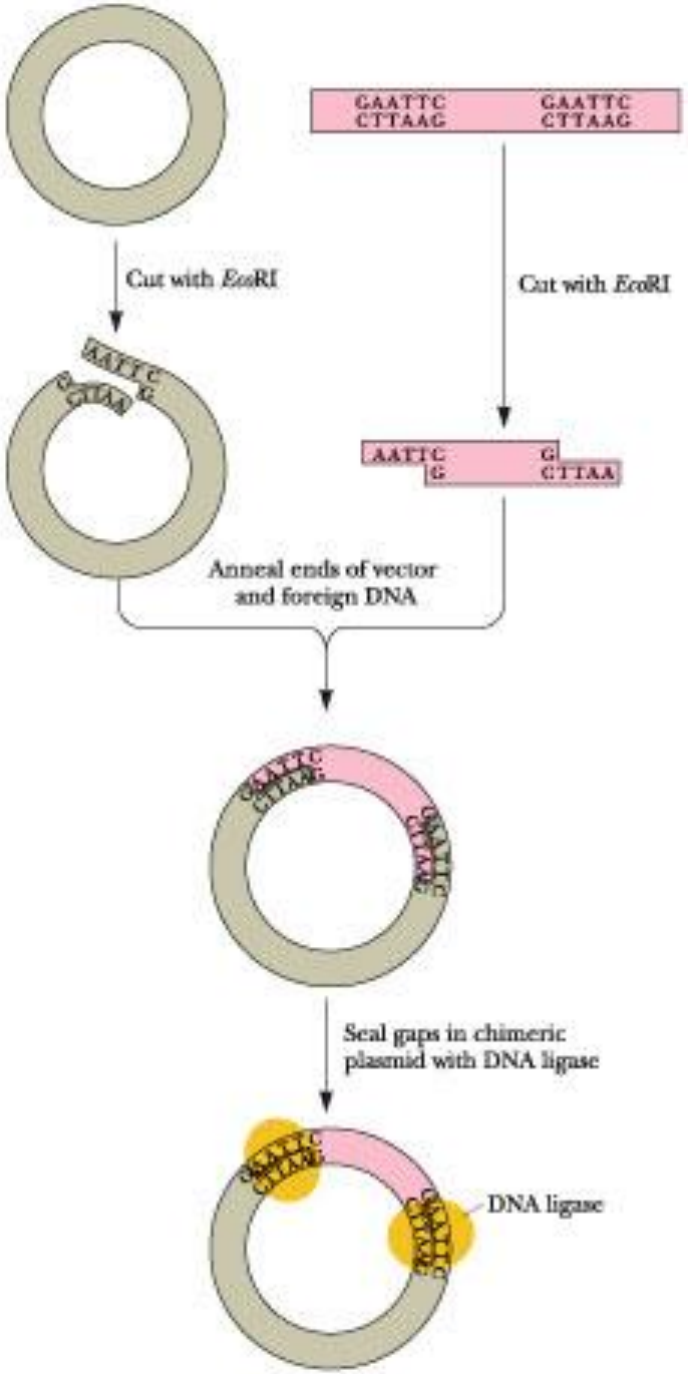
- النوع الثالث **Type III** : انقسام لحبل واحد فقط، **24–26 bp** باتجاه 3′ (المصب) بعد موقع التعرف

- تقوم EcoRI بالقطع وانتاج شظايا لها "ذيل" واحد في كلا الطرفين



- الذيول على الأجزاء اللصوقة التي تم إنشاؤها في موقع تقييد معين هي **متممة** لتلك الموجودة على جميع الأجزاء الأخرى التي تم إنشاؤها بواسطة نفس إنزيم التقييد

- في درجة حرارة الغرفة، يمكن لهذه المناطق ذات الطاق المفرد، والتي تسمى غالبًا "أطراف لصوقة" ، أن تقترن بشكل مؤقت مع تلك الموجودة على شظايا الدنا الأخرى المتولدة بنفس إنزيم التقييد، بغض النظر عن مصدر الدنا
- يسمح اقتران الأسس للنهايات اللصوقة بأن يتم ربط الدنا من الأنواع المختلفة على نطاق واسع، مما يشكل جزيئات **chimeric** (من مصدرين مختلفين)



- نوكلِيازات الاقتطاع الداخلية من النوع الأول والثالث لا تفيد في الاستنساخ الجيني لأنهما يقطعان الدنا في مواقع أخرى غير مواقع التعرُّف، وبالتالي يتسببان في أنماط انقسام عشوائي

- على النقيض من ذلك، تُستخدم نوكلِيازات الاقتطاع الداخلية من **النمط الثاني** على نطاق واسع لرسم **التموضع الجيني** mapping **وإعادة بناء الدنا** في المختبر لأنها تتعرف على تسلسل محدد وتقطع العمود الفقري للدنا في كل حبل في موقع معين داخل التسلسل تاركًا نهاية فوسفات 5’ و نهاية 3’-OH

- إذا أخذنا متوالية من 6 bp يتعرف عليها أنزيم قاطع فسيحدث ذلك في المتوسط كل $4^6 = 4096$ bp في متوالية دنا عشوائية التسلسل

5’ GAATTC 3’ *Eco*RI recognition site
3’ CTTAAG 5’

- وبالتالي، سيتم تقطيع جزيء كبير من الدنا إلى أجزاء محددة يبلغ متوسطها 4kb بواسطة هذا الإنزيم

- تتم تسمية نوكلِيازات الاقتطاع الداخلية باسم الكائن الحي الذي اكتشفت فيه، باستخدام نظام من الحروف والأرقام تختصر بكلمة (جنس)

- اكتشف HindIII في المستدمية النزلية Haemophilus influenza (strain d)
- "ج" يأتي من الحرف الأول للجنس
- "ن" يأتي من أول حرفين من اسم النوع
- "س" هي من أجل السلالة
- "III" مخصص للإنزيم الثالث (ترتيب تحديد هوية الأنزيم في الكائن الحي)

- تم اكتشاف EcoRI (تلفظ "echo-r-one") في الاشريشيا القولونية سلالة (R) وI لأنه الإنزيم الأول من هذا النوع

- تم عزل وتوصيف الآلاف من نوكلِيازات الاقتطاع الداخلية (التقييد) من النوع الثاني

- حتى الآن المئات متاحة تجاريا للاستخدام من قبل علماء أحياء البيولوجيا الجزيئية

- إن الخصوصية العالية للغاية لإنزيمات التقييد لمواقع عملها في متوالية الدنا تسمح بقطع جزيئات وحوامل الدنا الكبيرة بشكل متكرر إلى أجزاء محددة

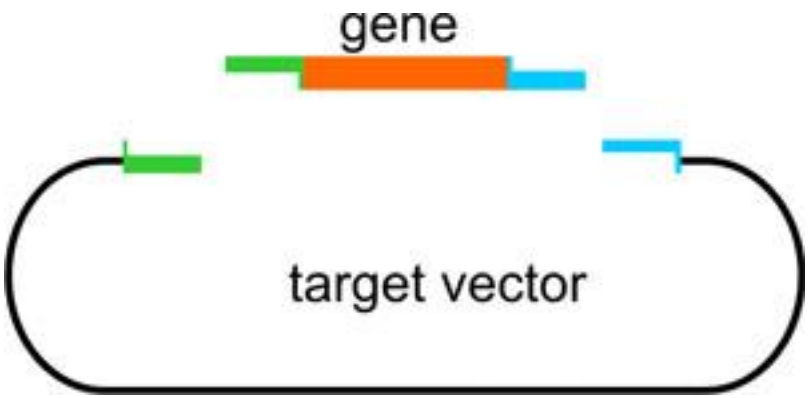
- يستخدم أنزيم الميثيلاز **Methylase** لإضافة مجموعة ميثيل إلى قاعدة C أو A ضمن متواليات التعرف recognition sequences في الدنا الخلوي نفسه

- هذا التعديل يجعل الدنا المضيف **مقاومًا للقطع** بواسطة نوكلِيازات الاقتطاع الداخلية

4. Creation of Recombinant DNA with DNA Ligase

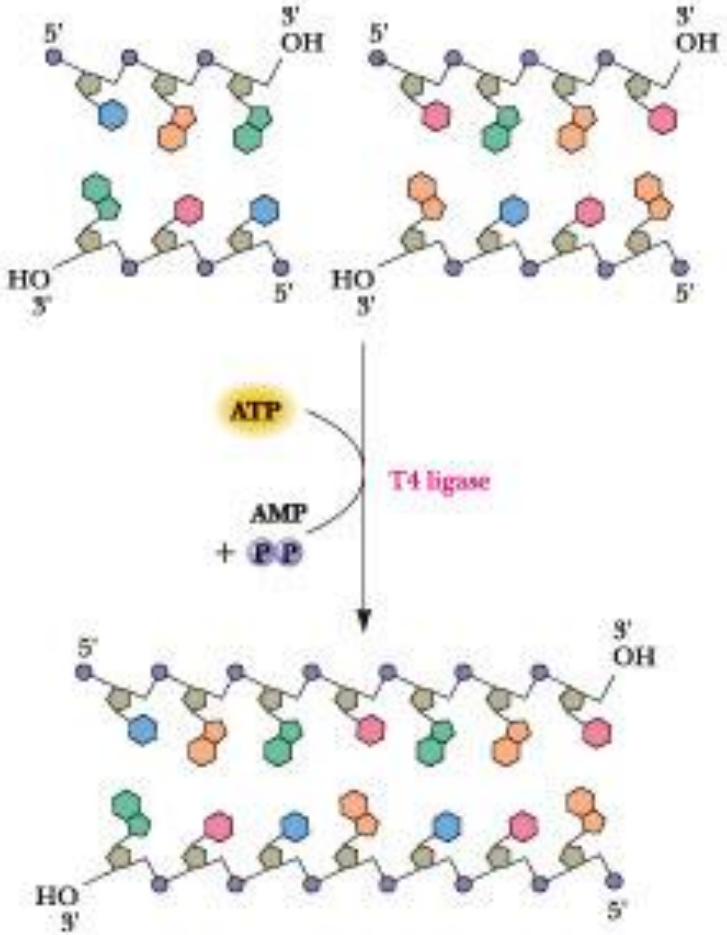
تصنع الدنا المأشوب بligase الدنا

- يعد إنشاء الدنا المأشوب من نواح كثيرة أبسط خطوة في عملية الاستنساخ الجزيئي



- يتم خلط الحمض النووي المحضر من الحامل والمصدر الأجنبي معًا بتركيزات مناسبة وبوجود الإنزيم (ligase DNA) الذي يربط النهايات ببعضها معًا بعملية انضمام

- تربط ligaseالدنا قطعتين من الدنا عن طريق تكوين روابط فوسفودي استير phosphodiesterبين هيدروكسيل 3 من حبل الدنا والفوسفات 5 'من الآخر



- بعد الربطligation، يتم أخذ الدنا المأشوب في الخلايا المضيفة