قسم المحاصيل الحقلية	عنوان المحاضرة / الكلونة
المرحلة الرابعة	الساعة 2 مساء
علم الوراثة الجزيئي	13-2-2021/ السبت

الكلونة cloning:

تعرف الكلونة على انها عملية تصنيع نسخ متعددة من نفس الجين، وبالتالي الحصول على كمية اكبر من المنتج لايمكن ان نحصل عليها في الحالة الطبيعية وتسمى ايضا بالمكاثرة او المضاعفة او الاستنسال ، وممكن تلخيص هذه التقنية ، بتضخيم الجين target gene المراد مكاثرته او مضاعفته بواسطة تقنية البلمرة المتسلسل pcr وهي مختصر لـ polymerase chain reaction أي التفاعل التسلسلي البوليميرايزي(المتعدد)، ثم تهيئة الجين المراد نقله بعد تضخيمه بأستخدام انزيم قاطع معين ligation enzyme ، ثم تهيئة ناقل الكلونة cloning vector بقطعه في نفس الانزيم القاطع الذي عومل به الجين , بعدها يتم نقل الجين المهيأ الى ناقل الكلونة لاتمام عملية الالتحام ligation، واخيرا يتم اختبار العملية للتاكد من نجاح عملية الكلونة.

نواقل الكلونة : تركيبها وانواعها.

الناقلات vectors

هي في الغالب فايروسات virus أو قطع من الحامض النووي DNA fragment موجودة في البكتريا . كما ان هناك انواع صناعية تم تصنيعها في المختبرات الطبية وهي في العادة مواد

شبه صناعية لانها في الاصل مصنعة من مواد موجودة في الطبيعة.

نواقل الكلونة cloning vectors

هي قطع صغيرة من جزيئات الـDNA لها القدرة على البقاء ثابتة Stability عند ربطها مع قطعة الـDNA ، كما انها تبقى ثابتة عند ادخالها الى خلايا المضيف host لا تتعرف عليها أنزيمات القطع الداخليةEndonuclease، وهي تمثل قطع من بلازميد plasmid الخلايا(خميرة او حيوان او انسان).هذه الجزيئات من DNA تستخدم لنقل الجينات الى خلايا المضيف (مايكروبات او حيوانات او نباتات)ولتوفير عناصر السيطرة على التضاعف والتعبير الجيني Expression gene.

مواصفات نواقل الكلونة:

1-مواقع cloning site ربط ligation وازالة delete قطع DNA الغريبة Target gene وهذا الموقع يحوي على واحد أو أكثر من مواقع قطع الانزيمات القاطعة restriction sites.

2- يحتوي ناقل الكلونة cloning vectorsعلى صفات انتقائية selectable markerوهي عبارة عن صفات يمكن ملاحظتها في خلايا المضيف host مثل صفات المقاومة للمضادات الحيوية antibiotic وبعض الصفات الشكلية phenotype وهي ضرورية لغرض تأكيد اخذ المضيف الناقل.

أ / بعض نواقل الكلونة تحتوي على جينات اضافية تساعدها في البقاء والتعبير في الكائن الحي مثلا النواقل المستخدمة مع E. Coli تحتوي على منطقة تضاعف فعالة (ori).

ب / تستخدم بعض نواقل الكلونة إنزيم ربط الناقل المباشر Topoisomerase بدلا من ligase ، مما يمكنها من العمل بسرعة دون الحاجة الى عملية قطع الناقل وهذه العملية تسمى Topocloning methods ، وفي هذه العملية يمكن تفعيل انزيم topoisomerase لربط ناقل خطي مباشرة مع الـDNA المضيف أو ربط الناقل مع احد منتجات PCR ثم تحرير أنزيم Topoisomerase لاعادة تكوين الناقل الحلقي.

انواع نواقل الكلونة Type of cloning vectors:

تقسم نواقل الكلونة بصورة عامة وحسب الغرض منها الى:

1-نواقل الكلونة الى الخلايا البكتيرية vectors for bacterial cells.

2- نواقل الكلونة الى الخلايا النباتية vectors for plant cells.

3-نواقل الكلونة الى خلايا اللبائن vectors for mammalian cells.

- وسيتم التركيز على اهم نواقل الكلونة الى الخلايا البكتيرية vectors for bacterial cell والتي تشمل على مايلي :

اولا : نواقل بلازميدية plasmid vectors.

ثانيا : نواقل الفايروسات المفترسة (أكلة البكتريا او العاثية) bacteriophage vectors.

ثالثا : الكوزميدات cosmids.

رابعا: الفاجميدات phagemids او الفازميداتphasmid .

وبما ان نواقل الكلونة لها القدرة على التضاعف في كائنين shuttle vector اما بكتريا و خميرة أو خميرة وخلايا حيوانية، لذا فهي تمتاز بأحتوائها على مناطق تضاعف cloning site وصفات انتقائية selectable marker مناسبة لكلا الكائنين ، الفائدة منها أنها تساعد على اختبار التعبير expression عن صفة معينة محملة على ناقل واحد في اكثر من كائن.

علم الوراثة الجزيئي / المرحلة الرابعة / قسم الامحاصيل الحقلية

المصادف يوم السبت / 9-1-2021

الشبكة الاندوبلازمية والرايبوزومات:

(The endoplasmic reticulum and the ribosomes)

الشبكة الاندوبلازمية عبارة عن أنابيب وانبعاجات عشوائية تنتشر في السايتوبلازم على شكل شبكة وتتصل من الخارج مع الغشاء الخلوي ومن الداخل في بعض النقاط مع الغشاء النووي. ومن ناحية التركيب فلها التركيب نفسه للغشاء البلازمي وهي تعمل على توصيل ونقل المواد داخل الخلية أو خارجها وخاصة البروتين.كما انها تعمل على دعامة الخلية من الداخل نظرا لانتشارها داخل الخلية. وتقسم الشبكة الاندوبلازمية الى نوعين، الاول هو الشبكة الاندوبلازمية الناعمة soomth endoplasmic reticulum (SER) لاتحمل رايبوزومات ولكنها تساهم في نقل المواد وبناء المواد الدهنية، اما النوع الثاني فهو الشبكة الاندوبلازمية الخشنةRough endoplasmic reticulum(RER) والتي تحمل رايبوزومات.

والرايبوزومات عبارة عن جسيمات صغيرة توجد اما على الشبكة الاندوبلازمية او منتشرة في السايتوبلازم وقد تتجمع لتكون مايعرف بالاجسام العديدة (بولي سوم)polysome،وتتكون من البروتينات والحامض النووي،وهي مراكز تصنيع البروتينات التي تنتقل داخل الشبكة الاندوبلازمية او تخزن بالحويصلات الغشائية من اجسام كولجي ليتم شحنها الى الجهة المطلوبة. وتمتاز خلايا

الكبد والبنكرياس بأحتوئها على كمية كبيرة من الشبكة الاندوبلازمية الخشنة نظرا لنشاطها الكثيف في صنع الروتينات. إذ ان الخلايا التي تتميزبصنع الدهنيات تحتوي على كمية اقل نسبيا من الشبكة الاندوبلازمية الخشنة، وتحتوي الشبكة الاندوبلازمية على مراكز تخزين مؤقت تدعى الجسم المركزي cistern.

الاحماض الامينية: تعرف الاحماض الامينية بأنها أصغر وحدة بنائية في تركيب البروتين، إذ تعد اللبنة الاساسية لبناء جميع البروتينات، وهي احماض عضوية تحتوي على مجموعة أمين نوع(الفا) والتي يبنى منها البروتينات بصورة عامة في الطبيعة هو عشرون حامضا أمينيا وتنتج هذه الاحماض اما عن التحلل الكيميائي أو الانزيمي للبروتين أو تصنع بالطرق الكيميائية.

الببتيدات Peptides:

هو عبارة عن حامضين أمينين مرتبطين مع بعضهما بوساطة اصرة الببتيد Peptide bond والتي تسمى ايضا اصرة أميد Amide ond.

البروتينات Proteins:

مواد عضوية نيتروجينية معقدة التركيب ذات اوزان جزيئية عالية، موجودة في جميع الخلايا الحيوانية والنباتية إذ تكون نسبة عالية من بروتوبلازم الخلية وجدارها وتتحلل بفعل الاحماض والقواعد والانزيمات الى وحدات جزيئية أصغر تسمى الاحماض الامينية

والتي تتكون بصورة رئيسية من عناصر(الكاربون والهيدروجين والاوكسجين ويدخل النيتروجين عنصرا اساسيا في تركيب البروتينات.

الوظائف الحيوية والفسيولوجية للبروتينات:

1- حاجة الجسم في النمو وبناء أنسجة الجسم.
2-ترميم وتعويض وبناء انسجة الجسم.
3-مصدرا للطاقة.
4-الحفاظ على التوازن المائي في الجسم.
5-يحافظ على توازن الحامضية والقاعدية في الجسم.
6- تدخل في تركيب عدد من المركبات المهمة حيويا كالانزيمات وعدد من الهرمونات والاجسام المضادة.
7-تزود البروتينات والاغذية البروتينية بصورة غير مباشرة بكثير من العناصرالغذائية الضرورية الاخرى.
8-البروتينات تكون الاساس التركيبي للكروموسومات من خلال المحافظة عليها بترتيب وشكل معين باستخدام البروتينات القاعدية مثل الهستونات Histons.

الهستونات (Histones):

الهستونات بروتينات تذوب في الماء وفي المحاليل المخففة وتتخثر بالحرارة ويغلب على تركيبها الاحماض الامينية القاعدية ومنها الارجنين واللايسين وكذلك حامض التايروسين ويفتقر الى حامض التربتوفان وتحتوي على كمية قليلة نسبيا من الاحماض الامينية المحتوية على الكبريت.وتتحلل بأنزيمات الببسين والتربسين وتتحد بسهولة

مع المجموعة السالبة للاحماض النووية مكونة البروتينات النووية (النيوكليو بروتينات)Nucleoproteins ولها دور منظم في مجال الوراثة مثال،الهستونات النووية Nucleohistones في نوى الخلايا.

البروتينات النووية Nucleoproteins:

البروتينات النووية هي بروتينات مرتبطة ومكونة من جزء بروتيني مع اخر غير بروتيني يدعى المجموعة الترقيعية Prosthetic group منها الاحماض النووية وتتكون من ارتباط الاحماض النووية مع جزيئة أو أكثر من البروتين في داخل النوية ويكون البروتين مرتبط مع الـDNA وعادة يكون البروتين من نوع (البروتامين والهستون) وفي السايتوبلازم مع الـ RNA ويكون مايسمى بالرايبوسومات Ribosomesالذي له دور في بناء البروتينات.

خواص الاحماض النووية (properties of nucleic acid)

تمتص القواعد النتروجينية من نوع البيورين والبريميدين الموجودة في الاحماض النووية الاشعة فوق البنفسجية بدرجة كبيرة عند موجة ذات طول 260 نانوميتر. وتستخدم هذه الخاصية لتقدير هذه القواعد النتروجينية(كميا) من خلال تقدير نيوكليوتيداتها وايضا الاحماض النووية الداخلة في تركيبها. وعلى كل حال فإن للحامض النووي DNA معامل امتصاص نوعي عند طول الموجة 260 نانوميتر لكنه يقل بمقدار حوالي 35-40% عن معامل الامتصاص النوعي المتوقع عن حاصل جمع الامتصاص لكل قاعدة (على حدة)من القواعد الداخلة بتركيب الحامض النووي الـ DNA.

وهذه النظرية تسمى بنظرية التأثير الهيبوكرومي Hypochromic influence theory. وهنا الانخفاض في درجة الامتصاص النوعي للاشعة فوق البنفسجية بالنسبة للقواعد النتروجينية المتحدة بجزيئات الحامض النووي DNAعن نظيرتها الحرة يرجع ذلك لتكوين روابط هيدروجينية بين القواعد النتروجينية المتراكبة الواحدة فوق الاخرى في كل من السلسلتين الحلزونيتين للحامض النووي DNA. وهذه الخاصية مفيدة في تقدير درجة الحلزنة Helicity للحامض النووي الـDNA.

وعند تسخيت الحامض النووي DNA المبلمر بدرجة كبيرة لكن ببطئ فإن السلسلتين الحلزونيتي الشكل تبتعدان عن بعضهما

وتسمى عملية الابتعاد هذه بعملية الانفصال أو تشتيت السلسلتين Melting . وهذا التحول من الشكل الحلزوني ذو السلسلتين الى أي شكل عشوائي يحدث من خلال رفع درجة الحرارة ونتيجة لهذا التحول تزداد درجة الامتصاص النوعي.وتسمى درجة الحرارة التي يحدث عندها الزيادة المفاجئة في الامتصاص للاشعة فوق البنفسجية بدرجة حرارة الانفصال (Melting temperature Tm).للحامض النووي . ولكل نوع من أنواع الاحماض النووية DNA درجة Tm خاصة به. أما عند اعادة تبريد المحلول ببطئ فإنه يحدث اعادة لتكوين الشكل الحلزوني ذو السلسلتين مع امكانية حدوث تبادل بين السلاسل وتسمى هذه العملية بالالتحام Annealing.

<u>خواص جزئ الـ DNA:</u>

1-ثبات التناظر Stability of Turmeric form:

تبين ان ذرات الهيدروجين المرتبطة بالاوكسجين تفضل صورا ارتباطية معينة، وتميل للبقاء في اماكن معينة ولا تنتقل بين ذرات الاوكسجين أو النتروجين في القواعد حيث أن عدم الاستقرار يعني ان ذرات الهيدروجين تكون حرة الحركة مما ينتج عنه امكانية ارتباط القواعد البريميدينية مع القواعد البيورنية بدون تحديد ، مما يؤدي الى الاخلال في تتابع القواعد بين السلسلتين وتفقد صفة التكامل .كذلك تفقد المادة الوراثية أهم خاصية من خصائصها وهي التناسخ الذاتي بدون اخطاء ، حيث أن حركة الهيدروجين يؤدي الى زيادة الاخطاءمما ينتج عنه ظهور الطفرات الوراثية بنسب عالية جدا .

2-الدنترة واعادة الاتحاد Denaturation and Annealing

من خصائص الحلزون المزدوج القدرة على الانفصال من الداخل والابتعاد عن بعضهما، وتتم هذه العملية تحت ظروف معينة. تعرف هذه العملية بالدنترة Denaturation، وعادة ماتتم عند درجات حرارة تصل الى 100م مئوية ، بحيث ينتج عنه كسر الروابط الهيدروجينية ، كما ان حرارة الدنترة أو نقطة الانصهار Tm تعتمد على نسبة C+ Gو T+A.واذا ماتم التبريد البطئ لجزئ الـ DNA فإن السلسلتين سيعود اتحادهما بعودة تجاذب الروابط الهيدروجينية Redenaturation او Annealingبحسب قاعدة شاركاف وبذلك يستعيد الجزئ التركيب الحلزوني الاصلي.

3- الخواص القاعدية – الحامضية.

تمت المحاضرة.