التقانة الحيوية
Biotechnology
المحاضرة الأولى

د. صفاء دلا

جَامعة
المَنارة
MANARA UNIVERSITY

مقدمة في التقانة الحيوية

❖ **التكنولوجيا (التقانة) الحيوية:**

استخدام كائن حي أو جزء من كائن حي أو منظومة حيوية لأغراض صناعية.

التعامل مع الكائنات الحية على المستوى الخلوي والمستوى الجزيئي لتحقيق فائدة اقتصادية مثل إنتاج أغذية، أدوية، تحسين خصائص وصفات وراثية لرفع مستوى الإنتاج نوعا وكما.

استخدامات التقانة الحيوية
Applications of biotechnology

Ancient Biotechnology

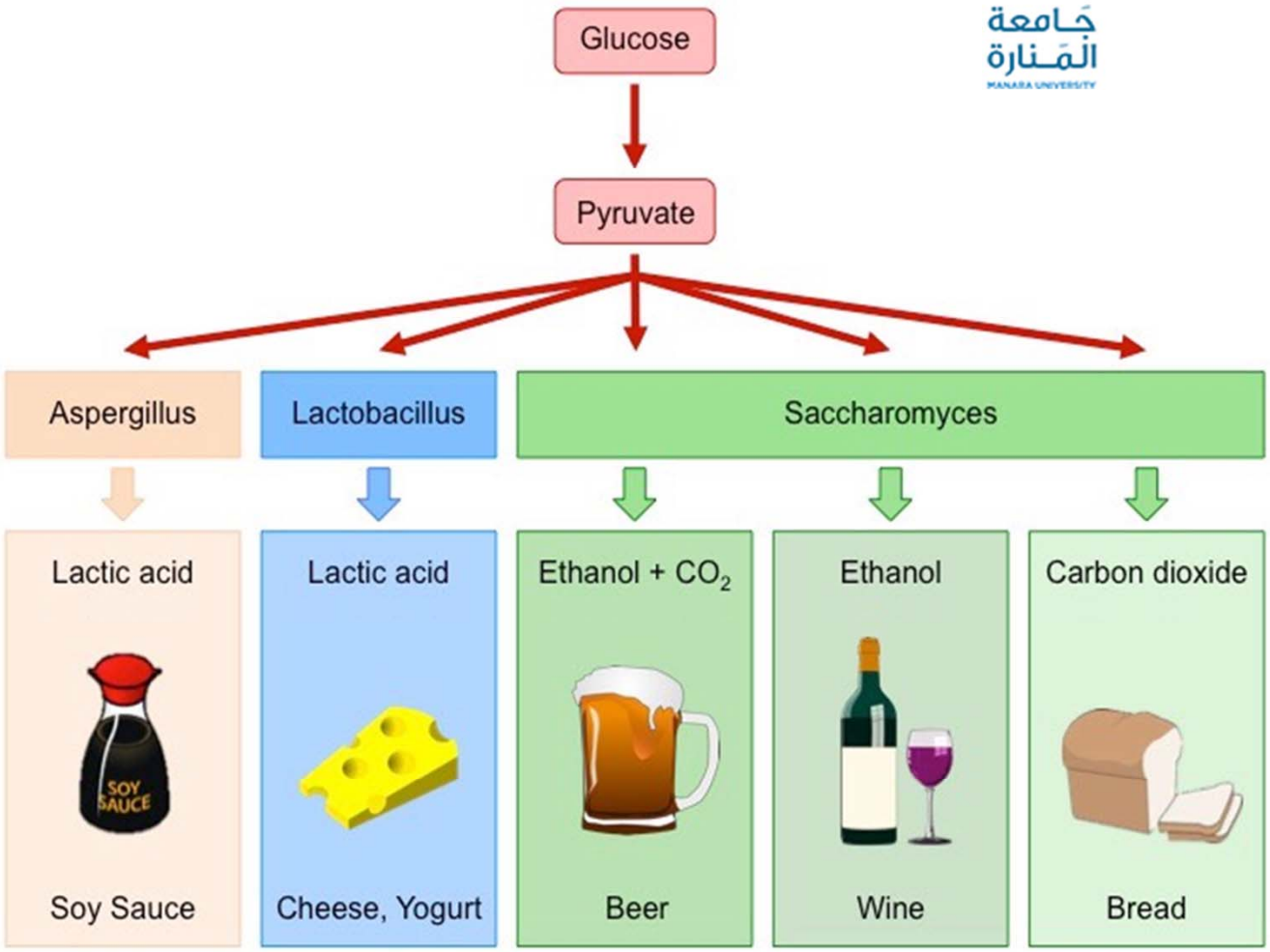
Animal and Plant Breeding

استخدامات التقانة الحيوية

Applications of biotechnology

استخدام الأحياء الدقيقة
في الصناعات الغذائية

Using micro - organisms to make cheese, yoghurt, bread, beer and wine.

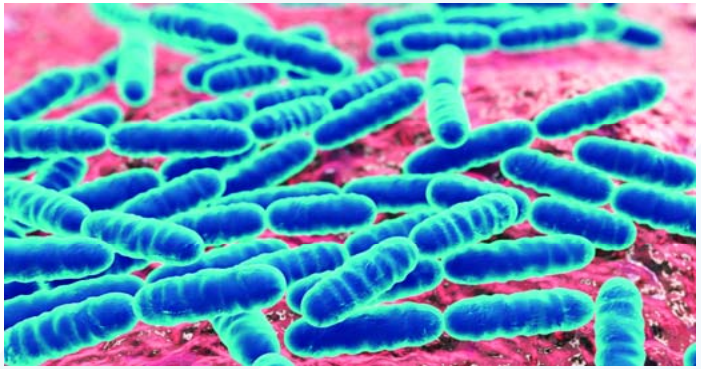


في الصناعات الغذائية: يتم استخدام كائنات حية دقيقة لاستقلاب السكر وتحويله إلى مواد عضوية أخرى من خلال عملية كيميائية حيوية تدعى التخمير.

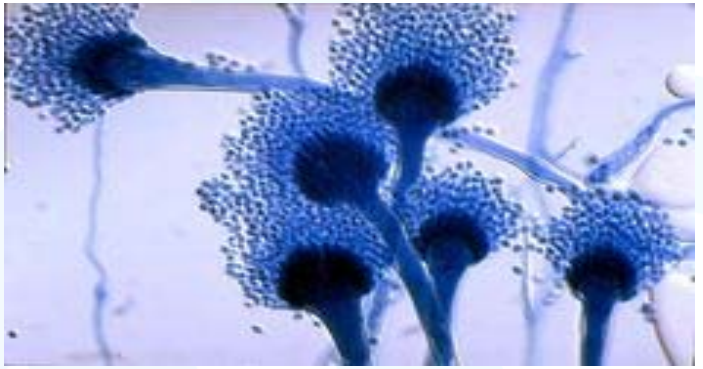
Fermentation is a metabolic process that produces chemical changes in organic substrates through the action of enzymes. In biochemistry, it is defined as the extraction of energy from carbohydrates in the absence of oxygen.

Microorganisms used in food production

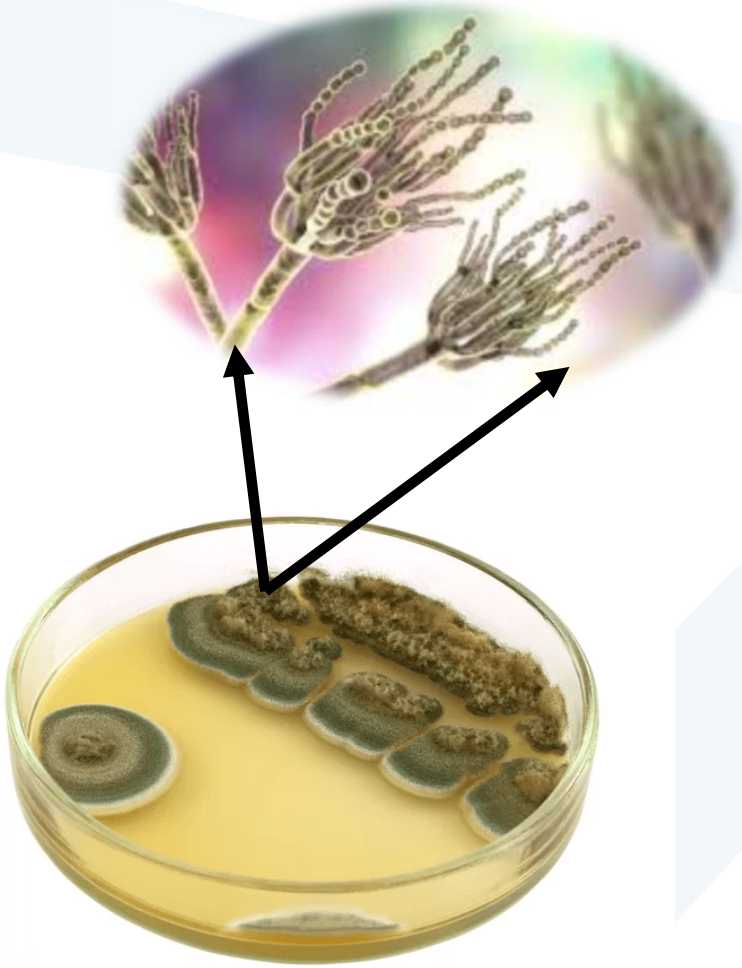
Saccharomyce



Lactobacillus



Aspergillus



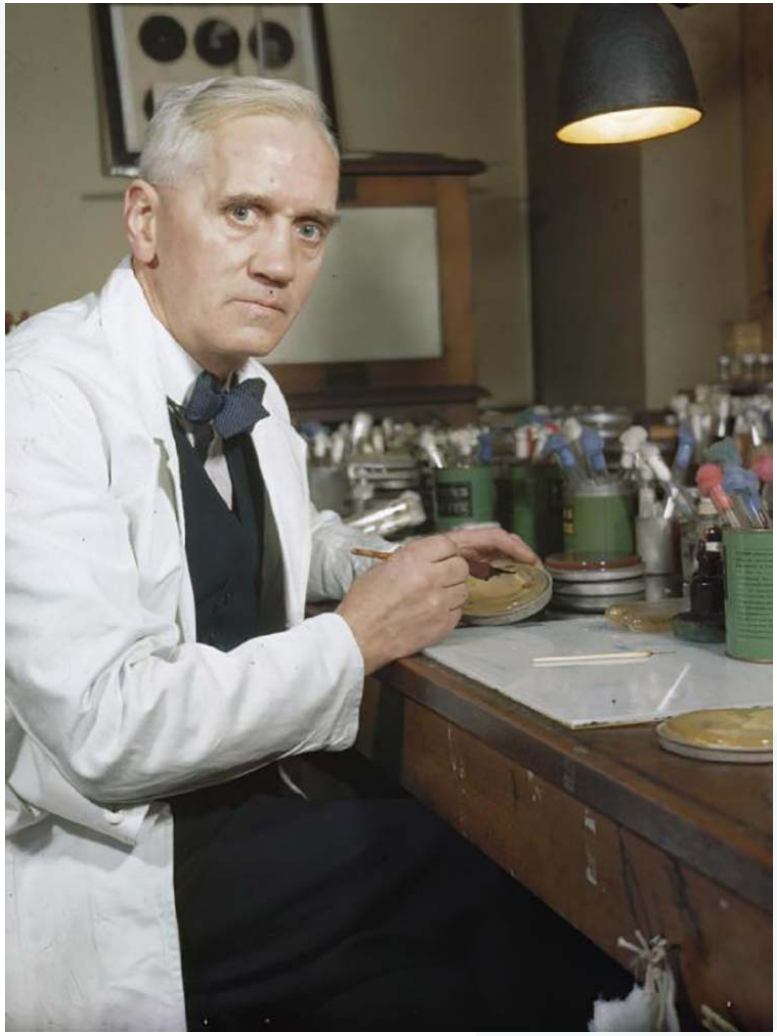
استخدامات التقانة الحيوية
Applications of biotechnology

إنتاج البنسيلين

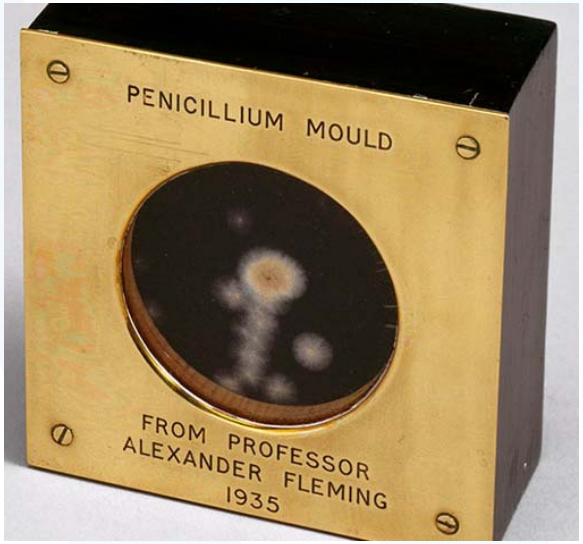
استخدم فطر البنسيليوم (*Penicillium notatum*) لانتاجه

فطر رمي يعيش على الفواكه المتعفنة

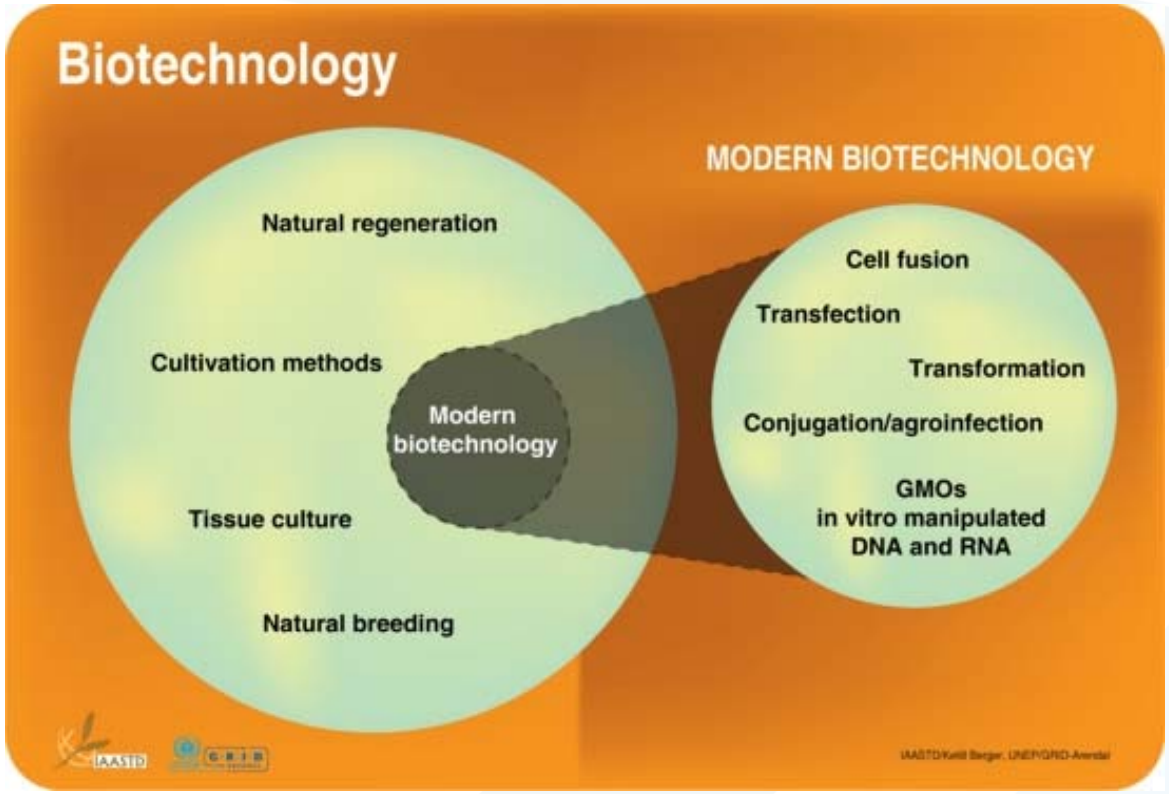
Penicillin antibiotic is used for the treatment of Gram-positive bacteria.



"When I woke up just after dawn on September 28, 1928, I certainly didn't plan to revolutionize all of medicine." — Alexander Fleming



استخدامات التقانة الحيوية
Applications of biotechnology



Modern Biotechnology

استخدامات التقانة الحيوية
Applications of biotechnology

Modern Biotechnology

تلاعب محدد بالكائنات الحية تحديدا على مستوى المادة الوراثية لتحقيق عدة أهداف:

1. الحصول على منتجات جديدة مثل اللقاحات, الهرمونات, الأضداد وغيرها
2. إنتاج خلايا وكائنات معدلة وراثيا
3. العلاج الجيني

تعتبر الهندسة الوراثية أهم تطبيقات التقانة الحيوية الحديثة

Key applications of modern biotechnology

DNA profiling

DNA cloning

Transgenesis

Genome analysis

Cell culture and tissue engineering

Xenotransplantation

الأهداف الطبية والصيدلانية للتقانة الحيوية

- التعديل الوراثي والتلاعب بالمادة الوراثية لإنتاج بروتينات علاجية بشرية في الخلايا أو كامل الكائن الحي
- رفع فعالية الصادات الحيوية واللقاحان المنتجة بواسطة الأحياء الدقيقة
- تطوير العلاج الجيني لعلاج بعض الأمراض مثل مرض السرطان وباركنسون
- زراعة خلايا أو نسج أو أعضاء

Color code of Biotechnology

Red	Medical
Yellow	Food Biotechnology
Green	Agriculture
Blue	Aquatic
White	Gene-based industry
Grey	Fermentation
Brown	Arid
Gold	Nanotechnology/Bioinformatics
Purple	Intellectual
Dark	Bioterrorism/Warfare

مجالات عمل تخصص التقانة الحيوية

- شركات تصنيع الأدوية
- شركات تصنيع المواد الكيميائية
- الجامعات
- مراكز البحث العلمي
- المستشفيات
- الشركات الزراعية وشركات تصنيع المحاصيل
- مصانع الأغذية والمشروبات

التقانة الحيوية
Biotechnology
المحاضرة الثانية والثالثة

د. صفاء دلا

فكرة هامة جدا!!!!!

تحديد الفرق بين تطبيقات البيولوجية الجزيئية وتطبيقات التقانة الحيوية

البيولوجية الجزيئية

تستخدم تطبيقاتها للكشف عن جزيء سواء كان حمض نووي أو بروتين وتعتبر الأغراض التشخيصية أهم تطبيقاتها الطبية

التقانة الحيوية

تستخدم تطبيقاتها لأغراض إنتاجية و علاجية يشترط في التقانة الحيوية وجود كائن حي ومنتج

جَامعة المَنارة
MANARA UNIVERSITY

تطبيقات البيولوجية الجزيئية

التشخيص الجزيئي للأمراض

- **التشخيص الجزيئي Molecular Diagnosis:** الاختبارات التي تستخدم **لتحديد مرض أو الأهبة للمرض** عن طريق **تحليل الدنا أو الرنا أو البروتين**. تؤمن هذه التحاليل الكشف المبكر عن الخلل الجزيئي مما يسهم باتخاذ القرار العلاجي المناسب قبل ظهور الأعراض السريرية.
- **يعتمد التشخيص الجزيئي على حزمة من الوسائل المتكاملة ما هي؟**

1. القصة العائلية و الأعراض السريرية لدى المرضى
2. الفحوص المخبرية الأولى التي تكشف عن الاضطراب الحاصل في الواسمات الحيوية المرافقة للخلل الوظيفي
3. تقدير الفعالية الإنزيمية للمرض
4. التشخيص الجزيئي

ماهي الشذوذات الجزيئية التي يتم الكشف عنها بالتشخيص الجزيئي؟

1. الطفرات
2. التعدد الشكلي وحيد النكليوتيد Single Nucleotide Polymorphisms (SNP)
3. الشذوذات الصبغية
4. إصابات بفيروسات أو بكتيريا معينة

جَامعة المَنارة
MANARA UNIVERSITY

الخطوة الأولى في العمل المخبري سواء كان باستخدام تطبيقات البيولوجية الجزيئية أو التقانة الحيوية هي كيفية استخراج الحموض النووية مخبريا

استخراج وتنقية الحموض النووية

Extraction and purification of nucleic acids

Phenol-Chloroform Extraction

STE-buffer

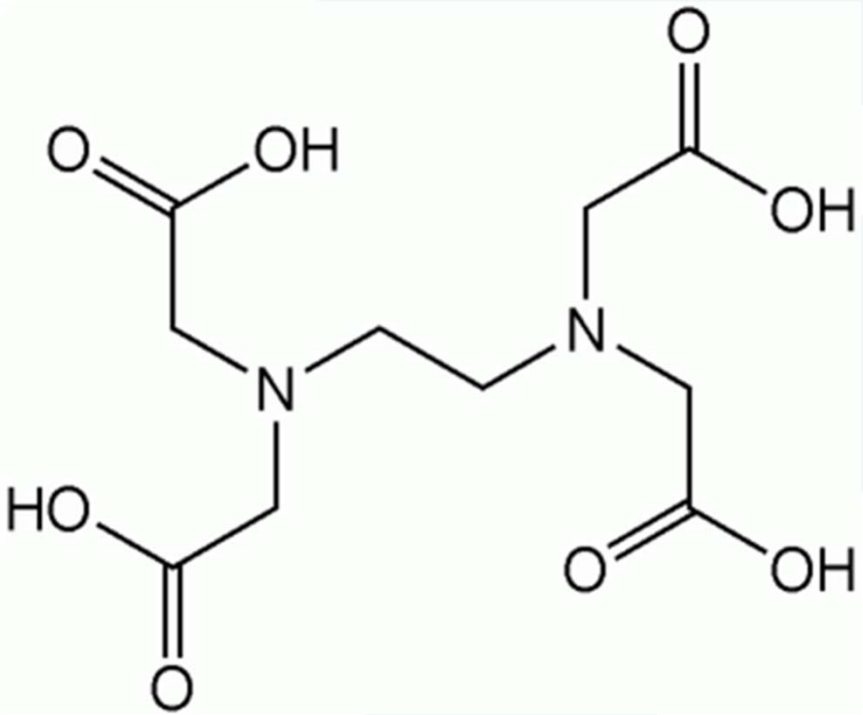
The composition of Buffer STE (Sodium Chloride-Tris-EDTA) is:

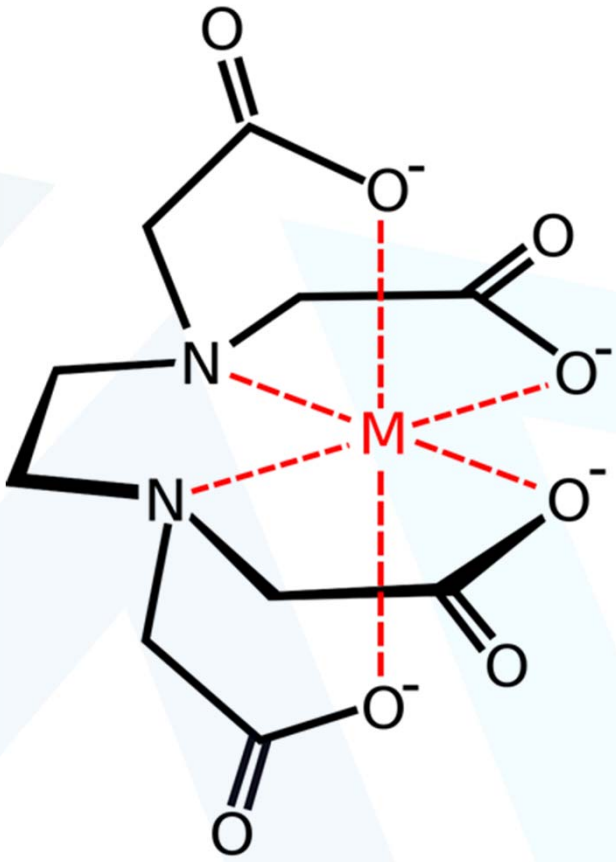
- 100 mM NaCl
- 10 mM Tris-HCl, pH 8.0

Tris=(hydroxymethyl) aminomethane, $C_4H_{11}NO_3$

- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), $C_{10}H_{16}N_2O_8$

EDTA

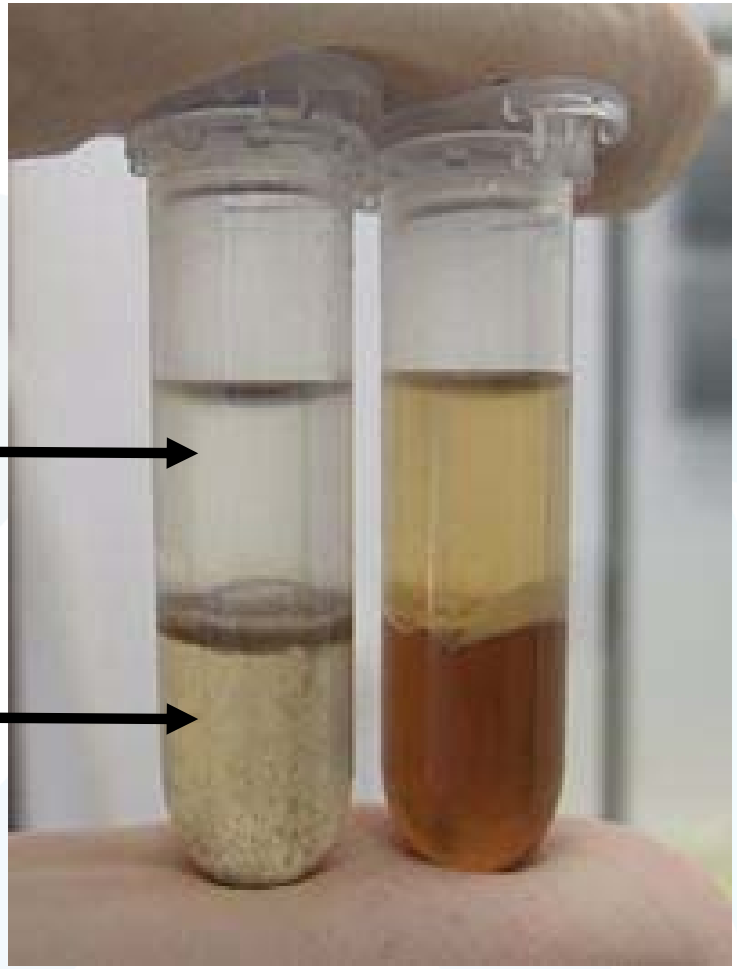




Phenol-Chloroform

Nucleic acids

Proteins

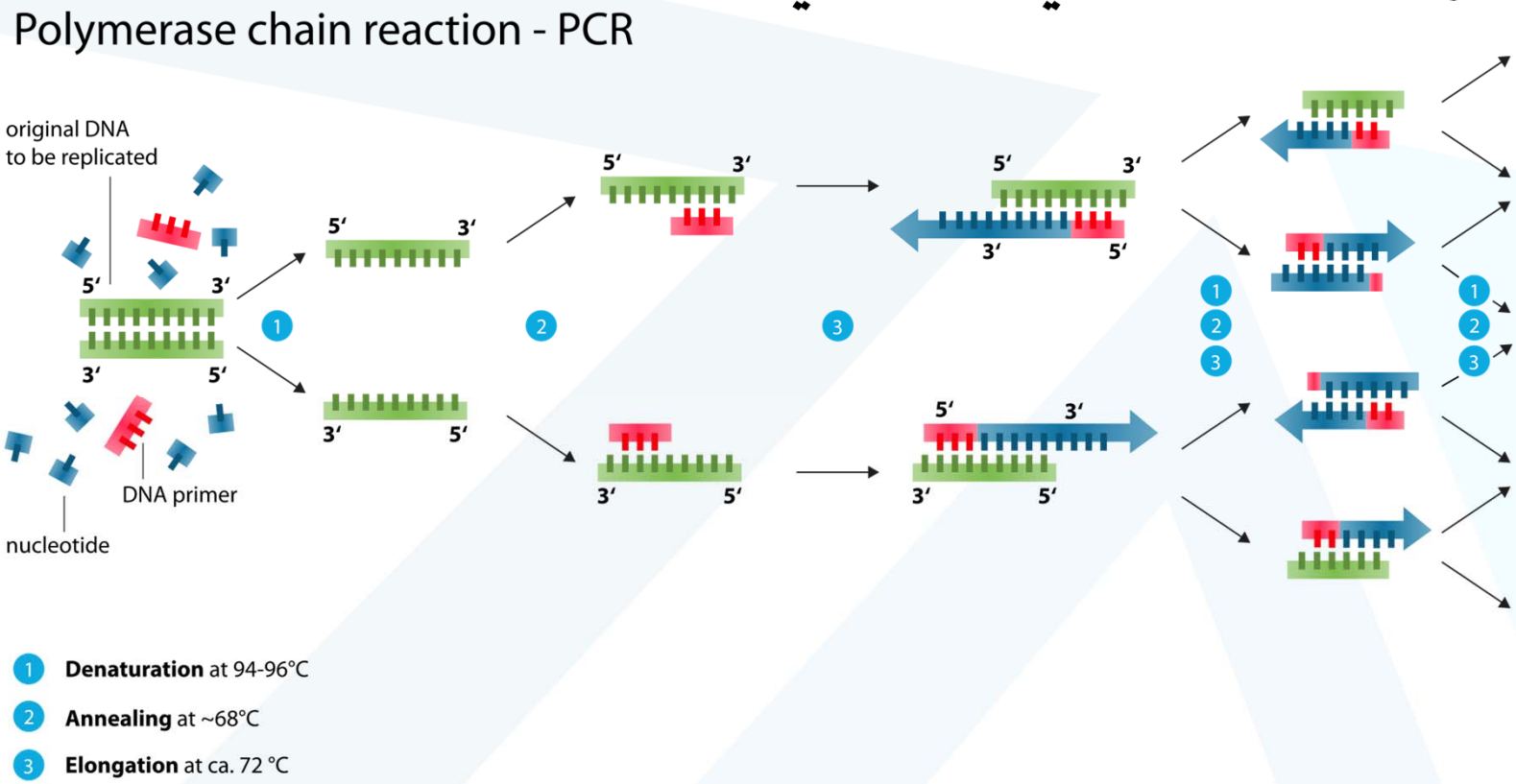


تفاعل البوليميراز السلسلي التقليدي
Conventional Polymerase Chain Reaction (PCR)

آلية التفاعل:

1. فصل طاقي الدنا الأصليين
2. استخدام مشارع Primers نوعية للتتالي المراد تضخيمه
3. ينفصل طاقي الدنا الأصليين وتتفكك الروابط الهيدروجينية بين النكليوتيدات المتقابلة بفعل الحرارة العالية
4. ترتبط المشارع بالتسلسل النكليوتيدي المتمم لها
5. يقوم إنزيم بوليميراز الدنا DNA Polymerase بإنتاج طاقين متممين لكل من الطاقين الأصليين
6. يحدث التفاعل بشكل متوالية هندسية لتنتج مئات ملايين النسخ من قطعة دنا واحدة في غضون ساعات قليلة

تفاعل البوليميراز السلسلي التقليدي



تفاعل البوليميراز السلسلي التقليدي وتضاعف DNA في الخلية

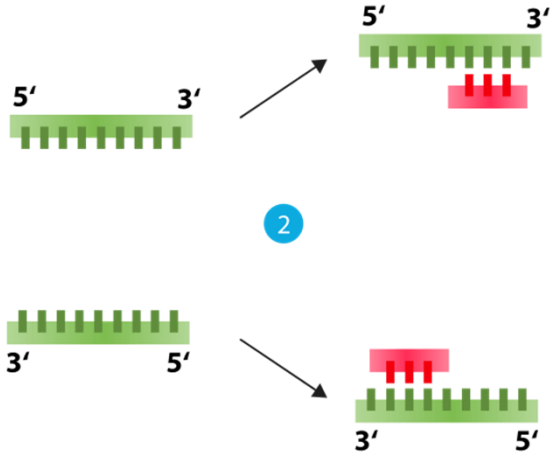
يعتمد تفاعل البوليميراز السلسلي من حيث المبدأ على عملية تضاعف الدنا في الخلية ويختلف عنه فيمايلي:

تضاعف الدنا	تفاعل البوليميراز السلسلي
يتم فصل طاقي الدنا باستخدام أنزيم الهيليكاز	يتم فصل طاقي الدنا بتسخين عينة الدنا إلى الدرجة 95 درجة مئوية
المشارع من الرنا	مشارع من الدنا
أنزيم الدنا بوليميراز يعمل في درجة حرارة 37 درجة مئوية	أنزيم الدنا بوليميراز يسمى Taq DNA Polymerase يعمل في درجة حرارة 72 درجة مئوية

تفاعل البوليميراز السلسلي التقليدي وتضاعف DNA في الخلية

- **ماهي مواصفات المشارع في تفاعل البوليميراز السلسلي؟**

1. طولها 18 إلى 25 أساس نكليوتيدي
2. متممة في تسلسلاتها للنهاية `3 لكل من طاقي الدنا الأصلي
3. بعد ارتباطها بالدنا تشكل نقطة البداية لعمل بوليميراز الدنا



- **من أين استخلص انزيم بوليميراز الدنا Taq DNA Polymerase المستخدم في تفاعل البوليميراز السلسلي؟**

من جراثيم Thermus aquaticus تعيش عل سفوح البراكين وتصنف من أليفات الحرارة ويتحمل حرارة تصل إلى مئة درجة مئوية

خطوات تفاعل البوليميراز السلسلي التقليدي وتضاعف DNA في الخلية

خطوات دورة تفاعل البوليميراز السلسلي	درجة حرارة الخطوة (درجة مئوية)	هدف الخطوة
الصهر (Melting) أو التمسخ (Denaturation)	94 أو 95	فصل طاقي الدنا المراد تضخيمه
الارتباط (Annealing)	50 إلى 60	ارتباط مشارع الدنا بالتسلسلات المتممة لها في النهاية `3 من كل من طاقي الدنا
الإطالة (Extension)	72	رصف النكليوتيدات المتممة لتسلسل دنا الطاقين الأصليين من قبل أنزيم Taq معتمدة على المشارع المرتبطة بالدنا ويقوم الأنزيم بتطويل الطاقين بالاتجاه ´5 إلى `3

يتم تكرار الدورة السابقة حوالي 25 إلى 30 مرة باستخدام جهاز المدور الحراري Thermocycler

الرحلان الكهربائي

- **ماهي الغاية من هذه التقنية؟**

فصل شدف الدنا الناتجة من التضخيم في تفاعل PCR

- **مبدأ التقنية؟**

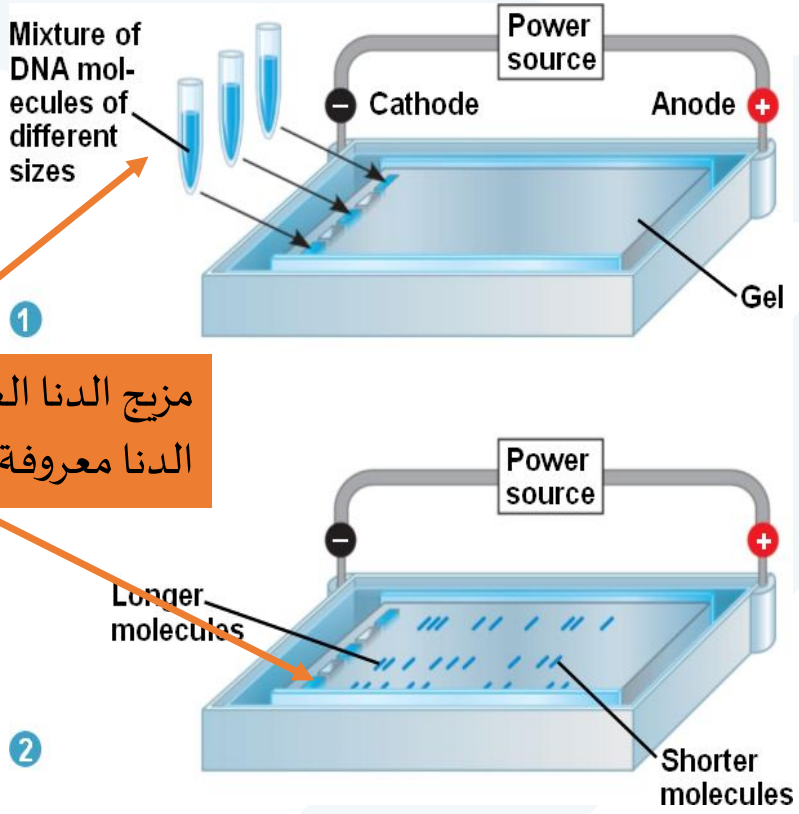
عبور الدنا ذو الشحنة السالبة عبر مادة هلامية ضمن حقل كهربائي من القطب السالب إلى الموجب تبعا لحجومها

- **ماهي بنية هذه المادة الهلامية؟**

بولي أكريل أميد, أو الآغاروز

- **ماهو الرحلان الكهربائي الشعري؟**

فصل قطع الدنا عبر هلامات معلقة مسبقا في أنابيب شعرية تحقق درجة عالية من التمييز بين شدف الدنا المختلفة بطولها



مزيج الدنا العياري: قطع من الدنا معروفة الوزن الجزيئي

الرحلان الكهربائي

- **هلامة بولي أكريل أميد**

1. تمتاز بالفصل الجيد لشدف الدنا المختلفة بالطول
2. عند استخدام تراكيز عالية منها يمكن لهذه الهلامات أن تفرق بين قطعتي دنا تختلفان بنكليوتيد واحد
3. تمكن من كشف طفرات الإقحام أو الخبن
4. صعبة التطبيق لتطلبها جهد ووقت طويل بالإضافة إلى سمية مادة بولي أكريل أميد العالية

- **هلامة الآغاروز**

1. ليست عالية الدقة
2. تحضيرها سهل لا يكلف جهد ووقت طويل
3. غير سامة

تفاعل البوليميراز السلسلي بالناسخة العكسية
Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

يعتمد هذا التفاعل على مايلي:

- المادة الوراثية عبارة عن جزيئات رنا مرسال بدلا من دنا
- وجود عديد الأدنين Poly A في النهاية `3 لجزيء الرنا المرسال
- استخدام مشارع مؤلفة من عديد الثايمين Poly T التي ترتبط بعديد الأدنين في النهاية `3 للرنا المرسال
- استخدام إنزيم الناسخة العكسية Reverse Transcriptase

تفاعل البوليميراز السلسلي بالناسخة العكسية
Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

- **من أين تستخرج أنزيمة الناسخة العكسية Reverse transcriptase؟**

من أحد أنواع الفيروسات القهقرية Retroviruses والتي تملك مجينا من الرنا

- **ماهو الجزيء المنتسخ من الرنا المرسال خلال عملية النسخ العكسي؟**

جزيء دنا متمم لجزيء الرنا المرسال Complimentary DNA (cDNA)

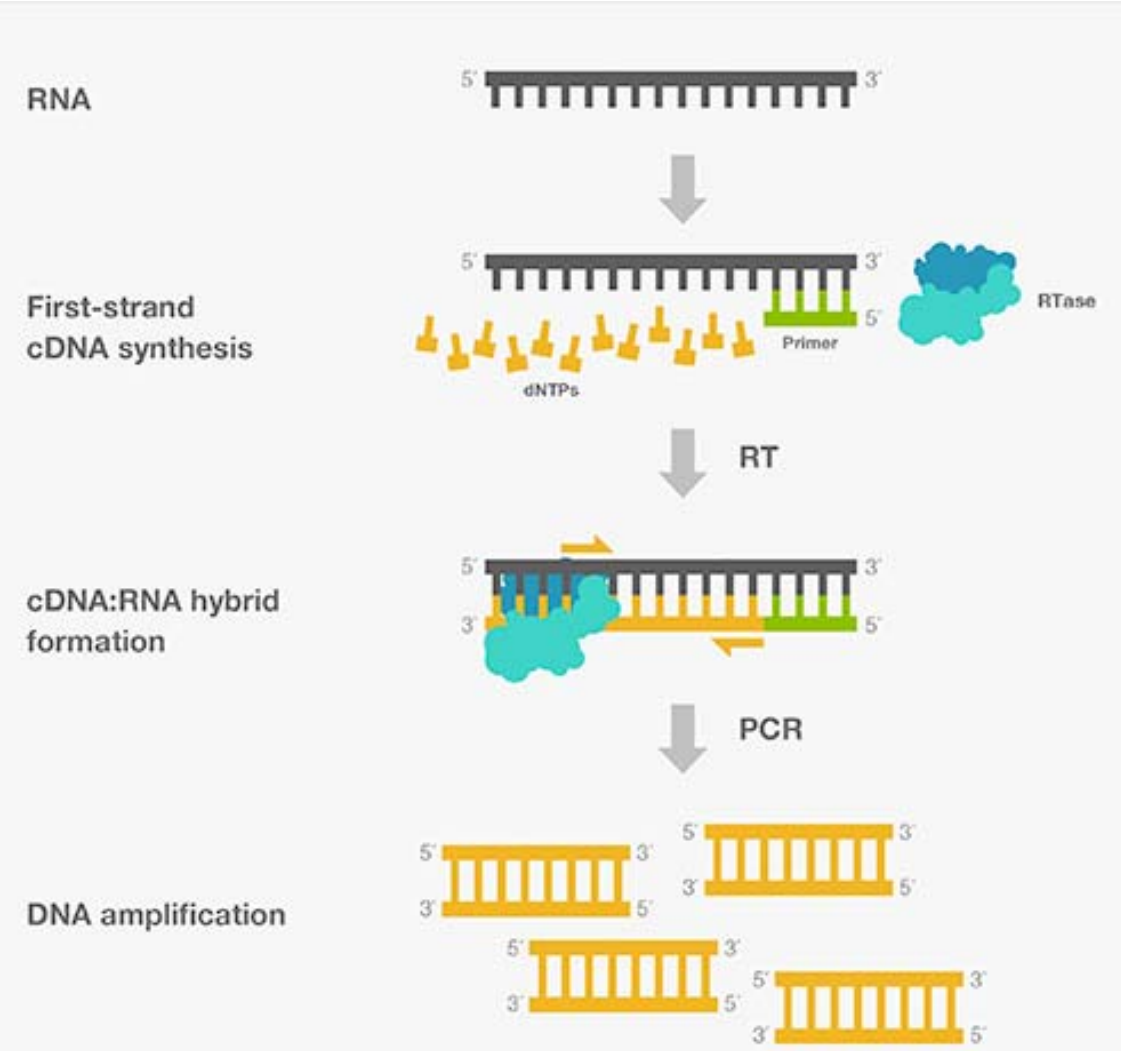
- **ماهو مصير جزيء الرنا المنتسخ خلال عملية النسخ العكسي؟**

يقوم إنزيم RNAase بتفكيكه وحلمهة الروابط بين نكليوتيداته الريبية

- **هل يمكن تضخيم cDNA الناتج من عملية النسخ العكسي؟**

نعم تتم عملية التضخيم باستخدام مشارع الرنا المتبقية أو مشارع دنا نوعية

تفاعل البوليميراز السلسلي بالناسخة العكسية
Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

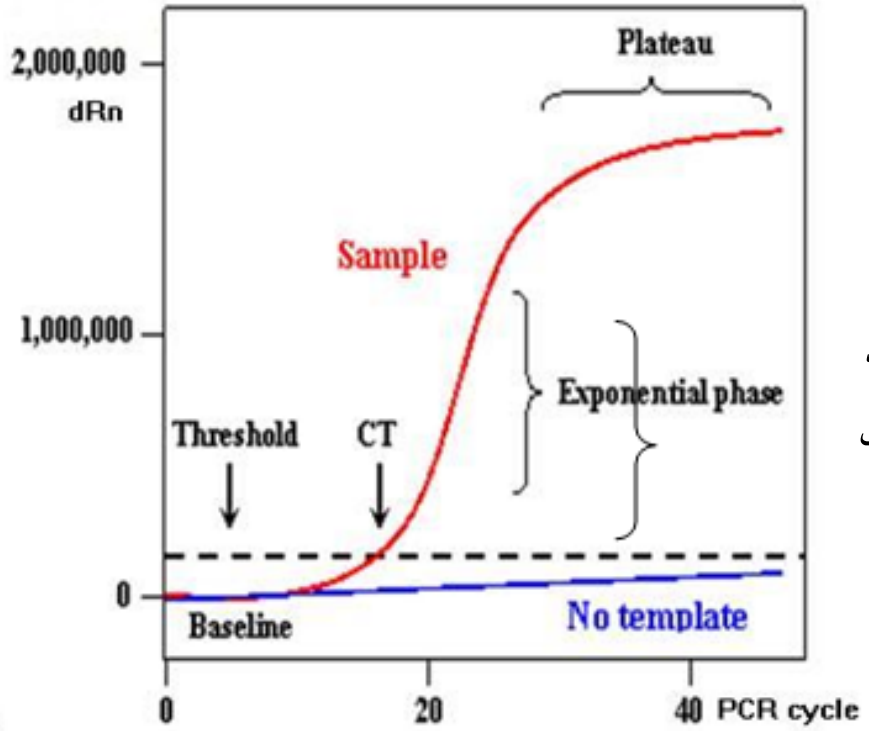


تفاعل البوليميراز السلسلي بالناسخة العكسية
Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

من أهم تطبيقات RT-PCR التحري عن جزيئات الرنا الفيروسي في مصل الأفراد الذين يشك بإصابتهم بفيروس معين كفيروس الإيدزويتم ذلك عبر الخطوات التالية:

1. يستخلص الرنا من بلاسما الدم
2. يجرى تفاعل RT-PCR
3. يرحل ناتج التضخيم
4. يقارن مع عينات شاهدة غير مصابة
5. تظهر عصابة في عينة المريض ولاتظهر في العينة الشاهدة

تفاعل البوليميراز السلسلي اللحظي والكمي
Quantitative Real Time PCR (Q-PCR)



- كل تفاعل أنزيمي يتألف من طورين:

1. **الطور الخطي Linear Phase:** تتراكم فيه نواتج التفاعل بشكل أسي ومتزايد
2. **طور الهضبة Plateau Phase:** يحصل فيه اشباع للمواقع الأنزيمية بركازات التفاعل أو يثبط الإنزيم المحفز ببعض ركازات التفاعل

- **يخضع تفاعل PCR لكلا الطورين**
- **من ميزات تفاعل PCR قياس العدد البدئي لنسخ الدنا الموجودة في العينة**
- **يخضع تفاعل PCR للتثبيط بعد عدد معين من دورات التضخيم**
- **لذلك من الصعوبة تحديد عدد النسخ البدئية لتفاعل PCR التقليدي**

تفاعل البوليميراز السلسلي اللحظي والكمي
Quantitative Real Time PCR (Q-PCR)

تفاعل q-PCR يقيس تراكم منتجات الدنا المضخم بشكل لحظي Real-Time وكمي Quantitative خلال الطور الخطي للتفاعل وليس في نهاية التفاعل كما هو حال ترحيل نواتج التفاعل التقليدي على الهلامة

- **من أهم تطبيقات تفاعل q-PCR:**
  - ❖ **قياس الفرق في التعبير الجيني لجين** ما في **مجموعتين خلويتين** مختلفتين
  - ❖ حيث يستخدم تفاعل RT-PCR متبوع بتفاعل qPCR
  - ❖ مثلا يمكن تحديد الفارق في التعبير الجيني لإحدى الجينات الورمية بين خلايا الثدي السليمة والسرطانية

تفاعل البوليميراز السلسلي اللحظي والكمي
Quantitative Real Time PCR (Q-PCR)

- **ماهي الكواشف المستخدمة في هذه التقانة؟**

تستخدم **صبغات مفلورة** ترتبط **بجزيئات الدنا ثنائية الطاق وتزداد شدة فلورتها** بشكل طردي مع **تشكيل جزيئات دنا جديدة**

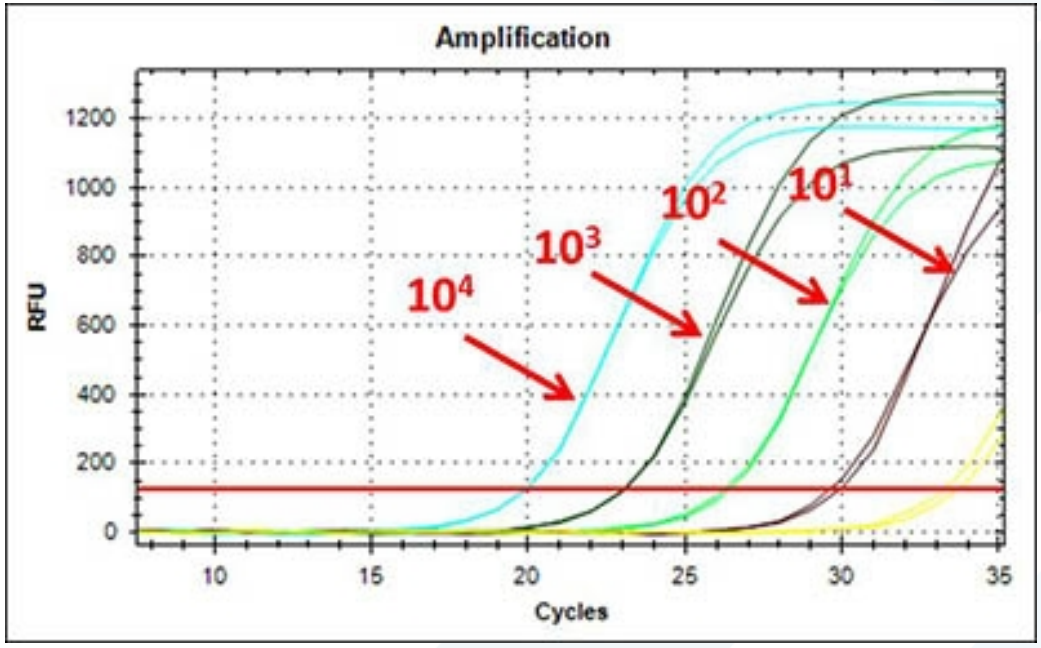
- **ماهو معيار دورة العتبة Threshold cycle أو Ct؟**

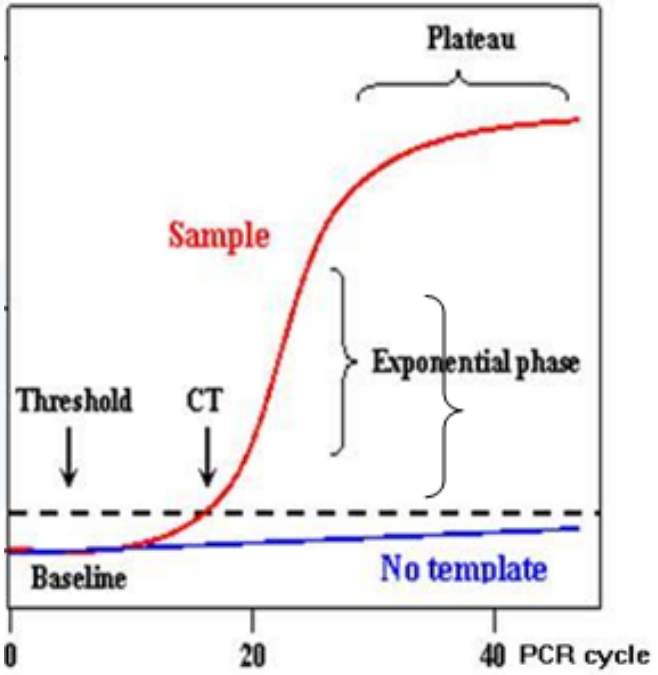
الدورة التي تبدأ فيها **نواتج تفاعل التضخيم بالتراكم** فوق **مستوى الفلورة البدئي Threshold**

- **ماهي العلاقة بين Ct وعدد النسخ البدئية للدنا؟**

علاقة عكسية.. كلما **زاد** عدد جزيئات **الدنا البدئي (التعبير الجيني عالي) انخفض رقم Ct**

تفاعل البوليميراز السلسلي اللحظي والكمي
Quantitative Real Time PCR (Q-PCR)





سلسلة الدنا DNA Sequencing

- مكتشف هذه التقانة العالم الإنكليزي **Frederick Sanger** تمكن هذه التقانة مما يلي:

1. تحديد جزء من التسلسل النكليوتيدي للجين أو كامل الجين
2. تحديد تسلسل مجين كامل
3. تكشف اذا كان هنالك طفرة أم لا في التسلسل النكليوتيدي

- **ماهي الكواشف المستخدمة في هذه التقانة؟**

1. كواشف موسومة شعاعيا (كواشف قديمة)
2. كواشف موسومة بالفلورة (كواشف حديثة)

سلسلة الدنا DNA Sequencing

- **ماهي التقانة الأكثر تطورا حاليا والمستخدمة في سلسلة الدنا؟**

تقانة الجيل التالي للسلسلة Next Generation Sequencing ظهرت في بدايات القرن الحادي والعشرين

- **ماهي الآلية المستخدمة في تقانة الجيل التالي للسلسلة؟**

رقاقات دنا خاصة تعمل بسرعة مذهلة توفر الكثير من الوقت, على سبيل المثال استغرق تحديد التسلسل النكليوتيدي لكامل المجين البشري (3 مليارات نكليوتيد) حوالي 13 سنة من 1990 إلى 2003. الجيل التالي للسلسلة يقوم بذلك اليوم في أقل من أسبوع واحد.

سلسلة الدنا DNA Sequencing
طريقة العالم سانغر

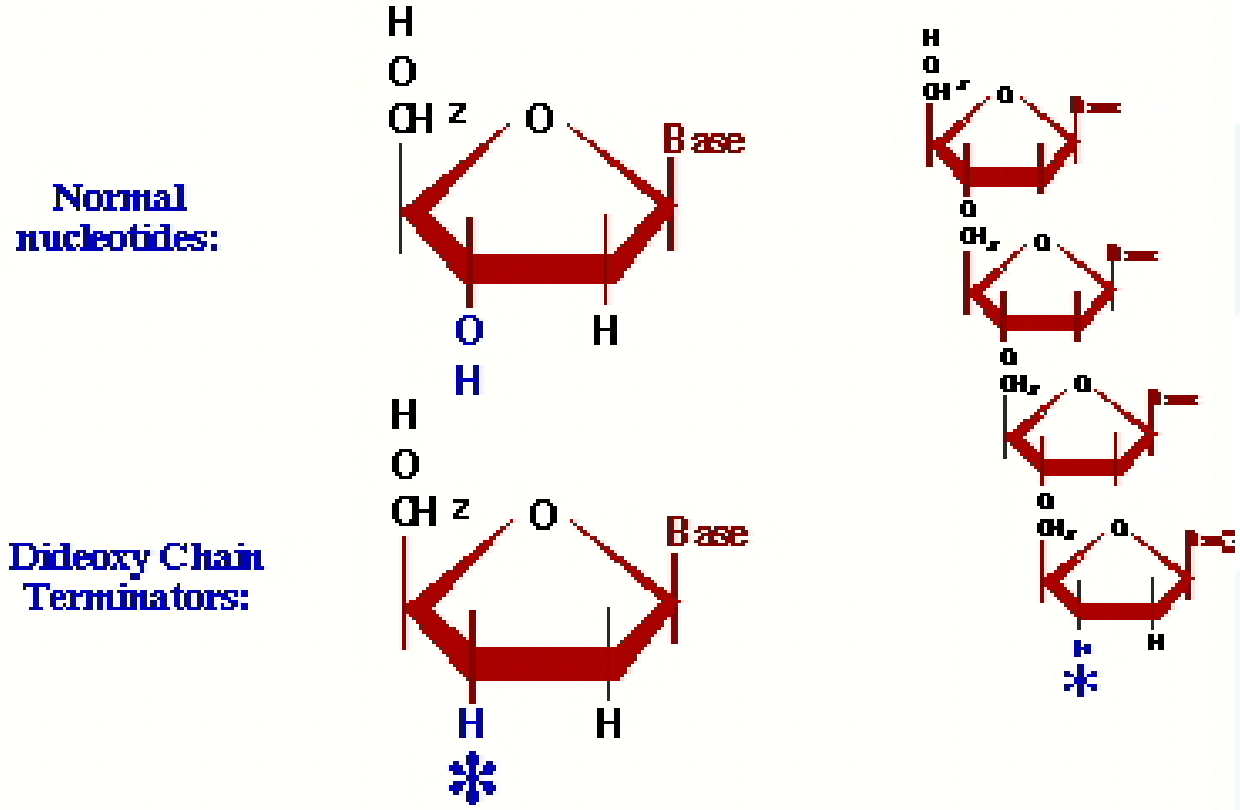
- تعتمد هذه الطريقة على تفاعل البلمرة لذلك تتطلب ما يلي:

1. إنزيم بوليميراز الدنا
2. كمية زائدة من النكليوتيدات الريبية منقوصة الأوكسجين (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
3. كمية قليلة من منهيات التفاعل
4. مشرع قصير متمم للنهاية `3 للدنا المرصاف موسوم بالفلورة, يمكن الكشف عن جزيئات الدنا بتعريضها لليزر

- **ماهي منهيات التفاعل المستخدمة في سلسلة سانغر؟**

نكليوتيدات ريبية منقوصة الأوكسجين على كل من الكربونين `2 و `3 لسكر الريبوز أي لا تحتوي على هيدروكسيل على أي من الكربونين تدعى (ddNTPs) **Dideoxy** NTPs بأنواعها الأربعة:

ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP



- **ماهي الألية التي تعمل بها منهيات التفاعل؟**

تقوم بإنهاء تفاعل البلمرة لعدم احتوائها على هيدروكسيل على الكربون رقم 3` وهذا يؤدي إلى انعدام إمكانية تشكيل الرابطة الفوسفورية ثنائية الإستر مع نكليوتيد تالي في مكان وجودها

آلية سلسلة الدنا DNA Sequencing

1. يضاف الدنا و النكليوتيدات والمشرع والدنا بوليميراز إلى جميع الأنابيب التي سيتم فيها اصطناع الدنا المتمم للدنا المراد سلسلته
2. يضاف كل من منهيات التفاعل إلى أحد الأنابيب الأربعة
3. عند اصطناع الدنا المتمم يحصل تنافس بين النكليوتيدات الطبيعية dNTP وddNTP في كل أنبوب تفوز به النكليوتيدات الطبيعية
4. يتوقف التفاعل في كل موقع يرتبط فيه منهي التفاعل النوعي
5. بعد انتهاء التفاعل تنتج بعض القطع الأقصر من الدنا بسبب ارتباط منهيات التفاعل
6. في كل أنبوب نحصل على جزيئات دنا متمم لكامل الدنا المرصاف وتسلسلات دنا متمم أقصر
7. يتم ترحيل نواتج التفاعل كهربائيا على هلامة بولي أكريل أميد
8. يتم سبر الهلامة بشعاع ليزر وقراءة الهلامة من القطب الموجب باتجاه السالب في الأنابيب الأربعة ومعرفة التسلسل المتمم للدنا واستنتاج التسلسل الأصلي للدنا المرصاف

تقانات التهجين Hybridization Technologies

- **ما هو هدف هذه التقانات؟**

الكشف عن جزيئات دنا أو رنا أو بروتين باستعمال كواشف موسومة ترتبط نوعيا بهذه الجزيئات

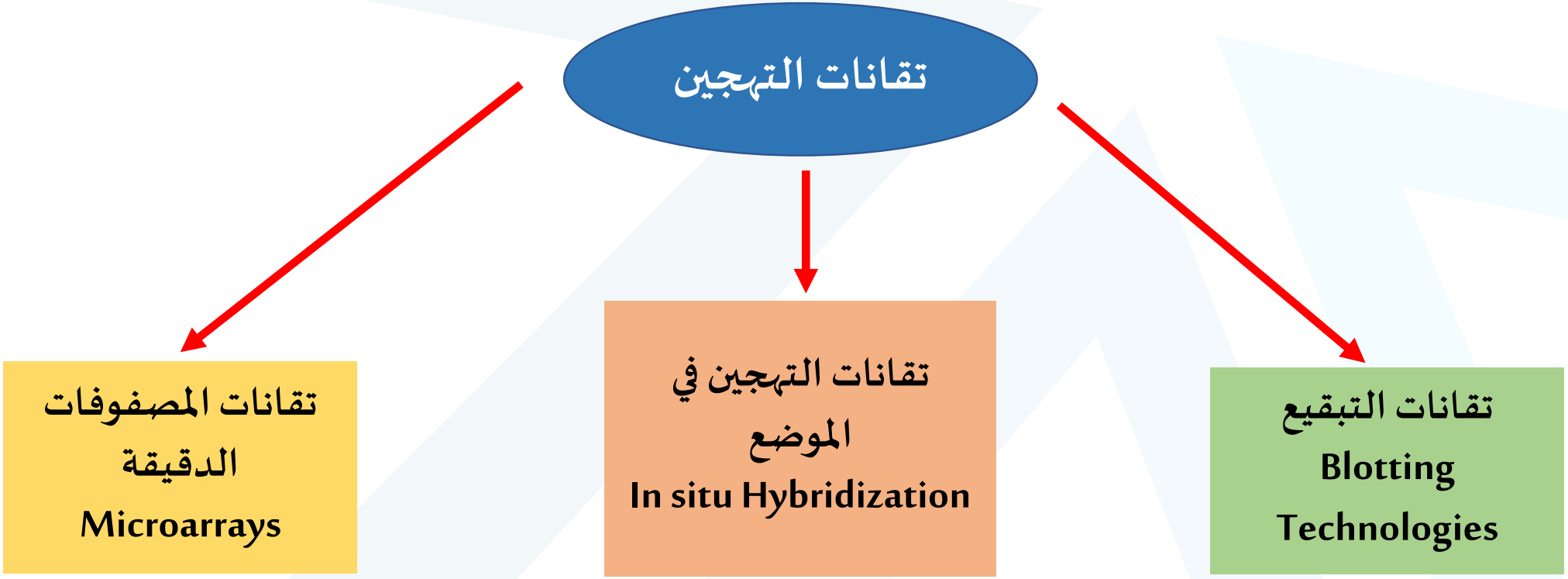
- **ماهو المبدأ العام لهذه التقانات؟**

1. في حال تهجين الحموض النووية: ارتباط جزيئتين متكاملتين مع بعضهما في التتالي النكليوتيدي
2. في حال تهجين البروتينات: ارتباط ضد Antibody مع مستضد Antigen

- **ماهي شروط نجاح هذه التقانة؟**

1. ألفة الارتباط بين الجزيئات المهجنة
2. شروط غسل قاسية للتخفيف من الارتباطات غير النوعية (مع جزيئات غير نوعية)

تقانات التهجين Hybridization Technologies



تقانات التبقيع Blotting Technologies

- تشترك جميع تقانات التبقيع بالخطوات التالية:

1. فصل الجزيئات المراد الكشف عنها على الهلام باستخدام الرحلان الكهربائي

2. نقل الجزيئات من الهلامة إلى غشاء من النايلون أو السللوز بحيث ترتبط الجزيئات على هذا الغشاء كل حسب موقعه على الهلامه

3. تهجين غشاء النايلون أو السللوز مع كواشف موسومة ونوعية للجزيء أو التتالي المراد الكشف عنه

4. الكشف عن إيجابية التهجين عن طريق مكشافات تتحرى إشارة الوسم في الغشاء

تبقيع ساوثرن Southern Blotting

تختص هذه التقانة **بالكشف عن جزيئات دنا نوعية** عبر **تهجينها بمسابير نوعية موسومة** ومتممة لها بالتسلسلات النوكليوتيدية.

- **آلية هذه التقانة:**

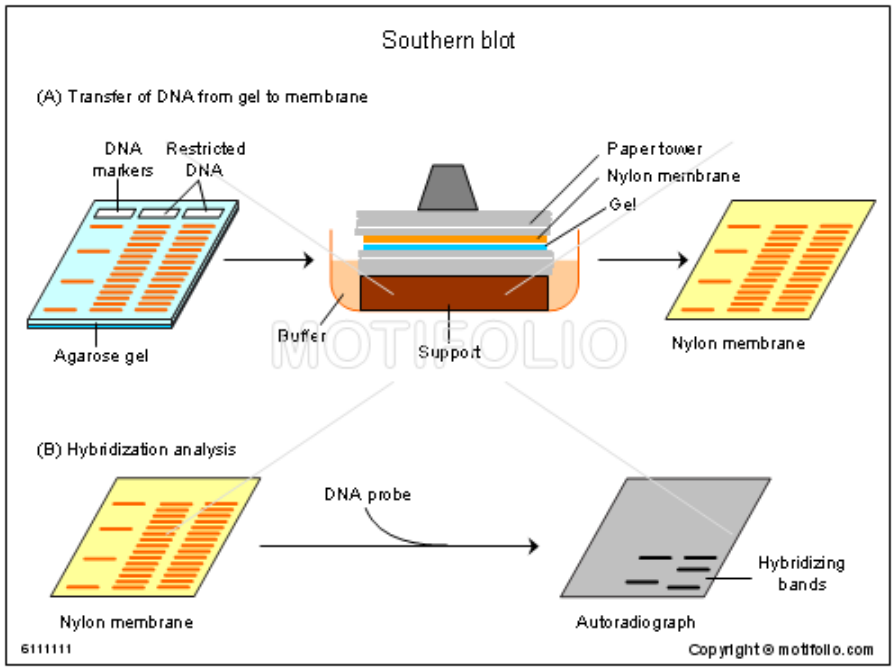
1. شطر جزيئات الدنا جزئيا بواسطة أنزيمات الاقتطاع
2. ترحيل جزيئات الدنا المشطورة في الأغاروز
3. نقل جزيئات الدنا من هلامة الأغاروز إلى غشاء النايلون باستخدام منظومة التبقيع
4. حضن غشاء النايلون مع مسبار نوعي
5. الكشف عن إشارة الوسم

تطبيقات هذه التقانة:

- تحري الطفرات في الدنا باستخدام مسابير متممة للتسلسل الطافر ترتبط به فقط
- الكشف عن عدد نسخ جين ناتج عن شذوذات وراثية

- **منظومة التبقيع:**
- حوض يحوي وقاء التبقيع
- وضع الغشاء فوق الهلامة وبشكل ملاصق لها
- وضع عدد من أوراق الترشيح تحت الهلامة
- وضع عدد من أوراق الترشيح فوق الغشاء
- يوضع فوق جميع الأجزاء ثقل لتثبيت كامل منظومة التبقيع

تبقيع ساوثرن Southern Blotting



ألية عمل منظومة التبقيع:

تسحب أوراق الترشيح الموجودة تحت الهلامة وقاء التبقيع الموجود في الحوض بالخاصة الشعرية وتنقل جزيئات الدنا كل حسب موقعه إلى غشاء النايلون

أوراق الترشيح الموجودة فوق الغشاء تزيد من سحب الوقاء وتثبيت الدنا على الغشاء

آلية الكشف عن الدنا المنقول إلى الغشاء:

1. يتم حضن الغشاء مع مسبار دنا موسوم DNA Probe وهو عبارة عن قطعة دنا موسوم شبيه بالمشارع لكن أكبر حجم
2. يتم غسل الغشاء بمحاليل مختلفة التراكيز للتخلص من الارتباطات غير النوعية للمسبار على الغشاء
3. يعرض الغشاء إلى مكشاف لتحري إشارة الوسم وتحديد موقع الدنا المرتبط بالمسبار

تبقيع نورثرن Northern Blotting

- من حيث المبدأ و الآلية تشبه هذه التقانة تقانة ساوثرن وتختلف عنها في أن الجزيئات المتحرى عنها هي جزيئات رنا

تطبيقات هذه التقانة:

مقارنة مستوى التعبير الجيني لجين معين بين الخلايا

تبقيع ويسترن Western Blotting

- يختلف عن التبقيعين السابقين بما يلي:

1. الجزيئات المتحرى عنها هي بروتينات وترحل على هلامة أكريل أميد وفقا لشحنتها ووزنها الجزيئي إلى القطب الموجب للرحلان
2. يستخدم غشاء من النتروسللوز بدلا من النايلون
3. يجري التبقيع باستخدام تيار كهربائي لنقل البروتينات من الهلامة إلى الغشاء
4. لا يستخدم أي مسابير وإنما أضداد بروتينية موسومة ونوعية ترتبط بشكل نوعي وألفة عالية بالمستضد البروتيني المثبت على الغشاء

تستخدم هذه التقانة:

- الكشف عن وجود بروتينات في خلاصات خلايا أو نسج معينة
- الكشف عن فعالية البروتين باستخدام أضداد نوعية للبروتين الفعال

التهجين في الموضع
In situ Hybridization (ISH)

- *in situ* Hybridization (ISH) التهجين في الموضع عبارة عن تقانة متميزة تتداخل من خلالها **التقانات الحيوية الجزيئية والنسيجية** لدراسة **التركيب والتعبير الجيني في مقاطع النسج والمحضرات الخلوية** ويتم بواسطتها **تحديد مو اقع نوعية للدنا والرنا في نوى الخلايا.**

- **ماهو مبدأ هذه الطريقة؟**

تفاعل تهجين بين مسبار نوكليوتيدي موسوم وتتالي نوكليوتيدي هدف متمم له

- **كيف يتم التحري عن ناتج عملية التهجين؟**

1. التصوير الشعاعي الذاتي للمسابير الموسومة شعاعيا
2. استخدام ملونات نسيجية كيميائية للمسابير غير المشعة

التهجين التألقي في الموضع
Flourescent *in situ* Hybridization (FISH)

- في نهاية السبعينات تم تطوير الوسم التألقي غير الشعاعي وتقانة التهجين التألقي في الموضع **Flourescent *in situ* Hybridization**
- **تطبيقات هذه التقانة**

1. في **مخابر التشخيص المرضي** كوسيلة **تشخيصية جزيئية وطريقة للكشف عن العوامل الممرضة** كالجراثيم والفيروسات في المقاطع النسيجية
2. تحديد نوع الصبغي
3. تظهير تضاعف الجين الشاذ في بعض الأورام الصلبة
4. تحديد الخلايا الورمية ضمن النسيج الطبيعي

- **كيف يظهر ناتج التهجين في هذه التقانة؟**

باستخدام مجهر مفلور (تألقي)

- **ماهو مبدأ هذه التقانة؟**

تهجين مسبار مفلور من **الدنا** مع تسلسله المتمم على **مستحضرات الصبغيات** المثبتة مسبقا على صفائح زجاجية

التهجين التألقي في الموضع
Flourescent *in situ* Hybridization (FISH)

- أكثر تطبيقات FISH هو الكشف عن **حالة الإزفاء Translocation** بين الصبغيين **9** و22 أو مايسمى **بصبغي فيلادلفيا Philadelphia Chromosome** الشائع لدى بعض مرضى **ابيضاض الدم الحاد Acute Leukemia**

- **ما الذي يتنج عن عملية الإزفاء بين الصبغيين 9 و22؟**

اندماج جين *BCR* المتوضعة على الصبغي 22 مع جين *ABL* المتوضع على الصبغي 9

ما هي الفائدة التطبيقية من تقانة FISH في حالة ابيضاض الدم الحاد؟

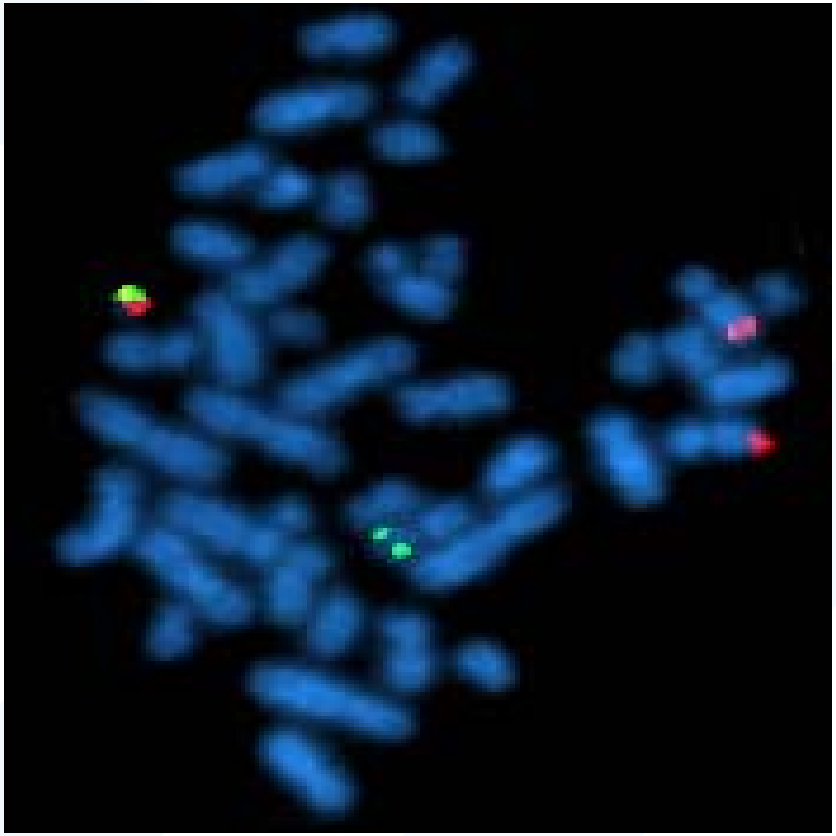
تشخيص الحالة من خلال تحري اندماج جينتي *BCR* و *ABL* نتيجة الإزفاء

كيف يتم استخدام تقانة FISH للكشف عن حالة صبغي فيلاديلفيا؟

1. يتم استخدام مسباران نوعيان: الأول يرتبط بجزء من جين *BCR* والثاني يرتبط بجزء من جين *ABL*
2. تمتلك الخلية الطبيعية إشارتين من الصبغي 9 وإشارتين من الصبغي 22 نتيجة وجود أليلين لكل جين على صبغي الأب و الأم
3. الخلايا التي حصل فيها إزفاء t(9,22) تظهر:

- إشارتين متجاورتين بألوان فلورة مختلفة
- أو إشارة مدمجة بلون متوسط بين اللونين

مثلا إذا كان مسبار *BCR* موسوما بمادة الفلوروسيئين الخضراء ومسبار *ABL* بمادة الرودامين الحمراء تظهر عندها إشارة صفراء تعكس اندماج اللونين المفلورين



المصفوفات الصغرية Microarrays

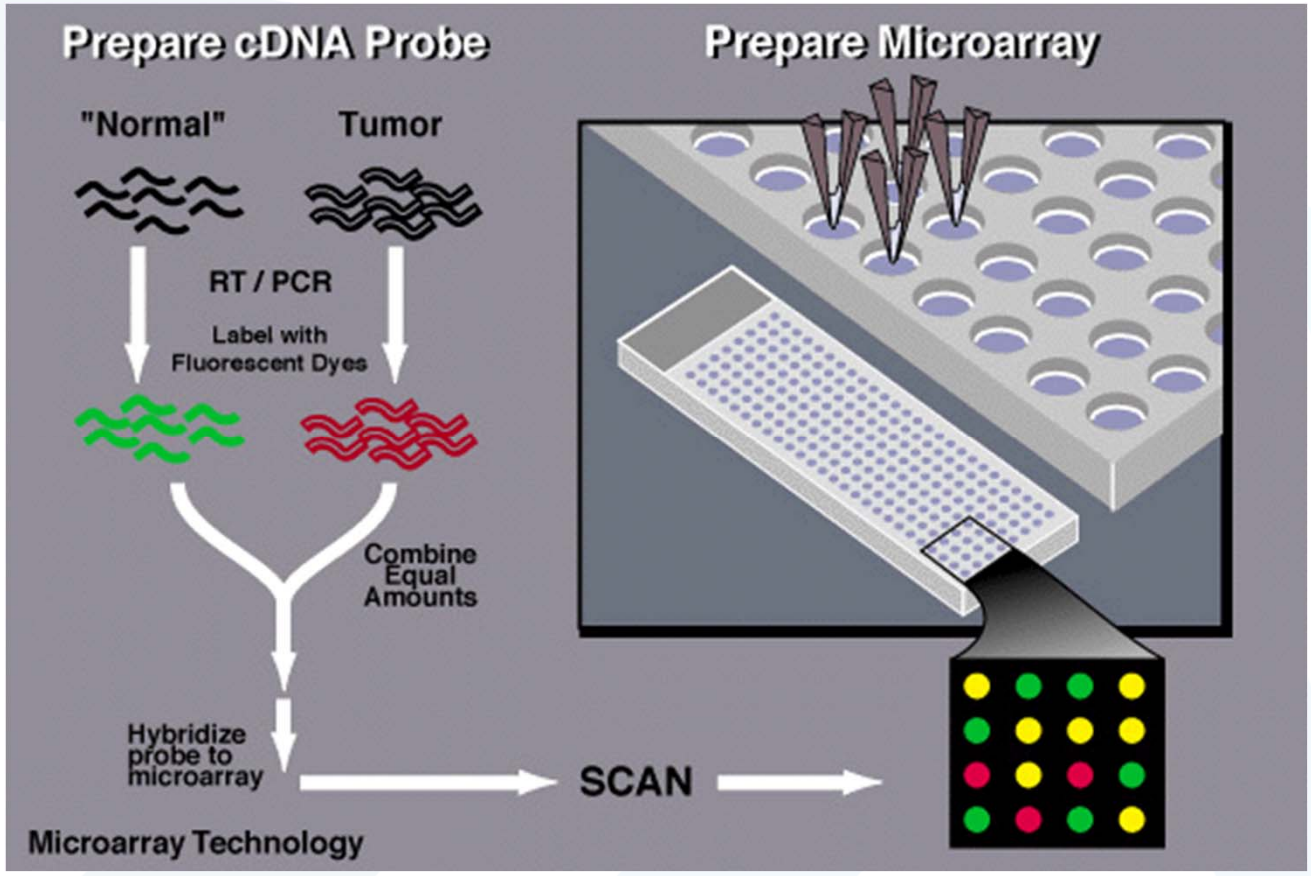
- **تطبيقات التقانة:** مقايسة التعبير الجيني لعدد كبير جدا من الجينات يصل إلى عدة آلاف في الآن نفسه

- **ماهو مبدأ التقانة؟**

1. ربط كثير من شدف الدنا الخاصة بقطع من الجينات مختلفة على صفائح زجاجية وبشكل بقع صغرية Micro-Spots
2. تهجين قطع الدنا السابقة مع عينات مختلفة وموسومة من الدنا المتمم للرنا المرسال المستخلص من العينة المدروسة
3. قياس كمي لشدة الإشارة الصادرة عن جميع الشدف بما يعكس كمية الرنا المرتبطة بالتسلسلات المتممة لها والخاصة بكل جين

كيف يتم تحديد التعبير الجيني للجينات المرتبطة بأحد أنواع السرطانات في عينة مريض باستخدام المصفوفات الصغرية؟

1. استخلاص الرنا المرسال الخاص بهذه العينة
2. تشكيل الدنا المتمم للرنا المرسال بعملية النسخ العكسي
3. وسم cDNA بواسم فلورة معين
4. استخدام cDNA متمم لرنا عياري (من شخص سليم) موسوم بواسم فلورة آخر
5. تهجين عينتي الدنا المتمم في نفس الوقت مع الصفيحة الحاوية على شدف الجينات المثبتة عليها
6. تحديد التعبير الجيني التفاضلي Differential Gene Expression لجينات معينة بعد تحديد كمية الواسمات المرتبطة في كل بقعة على الصفيحة


Prepare cDNA Probe
Prepare Microarray
"Normal"
Tumor
RT / PCR
Label with
Fluorescent Dyes
Combine
Equal
Amounts
Hybridize
probe to
microarray
SCAN
Microarray Technology

التقانة الحيوية
Biotechnology
المحاضرة الرابعة

د. صفاء دلا

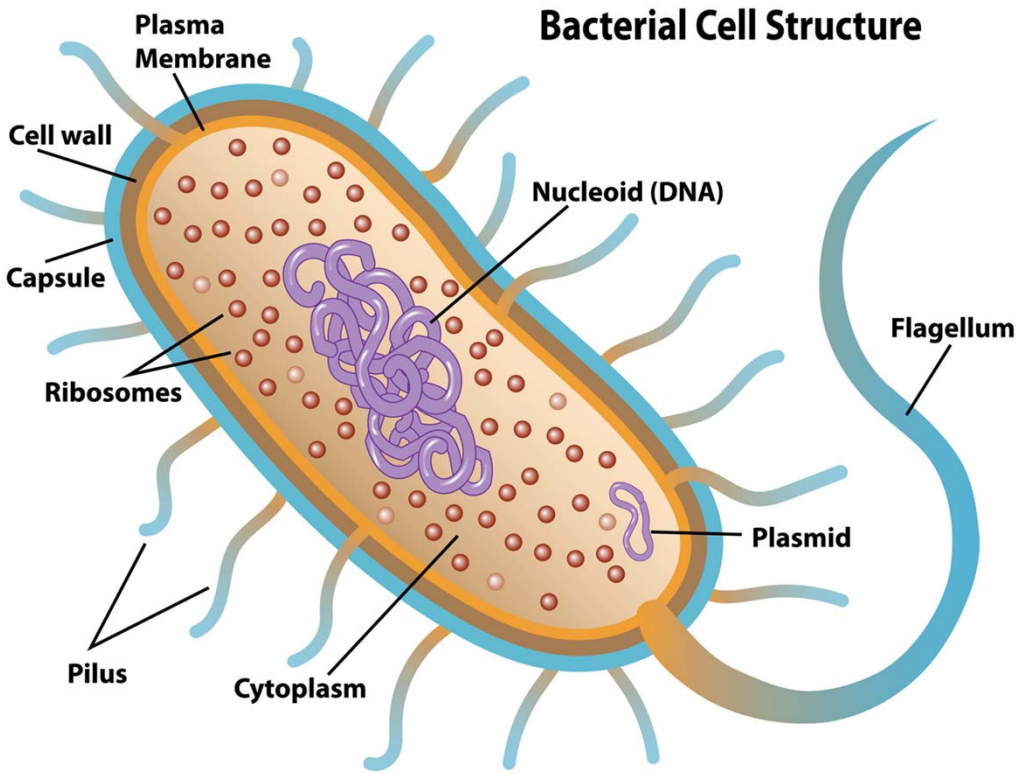
Recombinant DNA technology / DNA cloning; Gene cloning; Cloning

A technology that uses enzymes to cut and paste together DNA sequences of interest. The recombined DNA sequences can be placed into vectors that carry the DNA into a host cell. In this host cell, the customized recombined DNA sequence can be copied or translated.

الأسئلة التي قادت لهذه التقانة...

- هل يمكن وصل قطع دنا غريبة عن بعضها خارج الكائن الحي (*In vitro*)
- هل يمكن الوصول إلى تنسيل وتكثير مورثة ضمن منظومة حيوية غريبة عنها
- بما أن المورثة مسؤولة عن صفة ووظيفة.... هل يمكن الوصول إلى التعبير الجيني لهذه المورثة أيضا خارج الكائن الحي الذي أتت منه...ضمن منظومة حيوية جديدة...

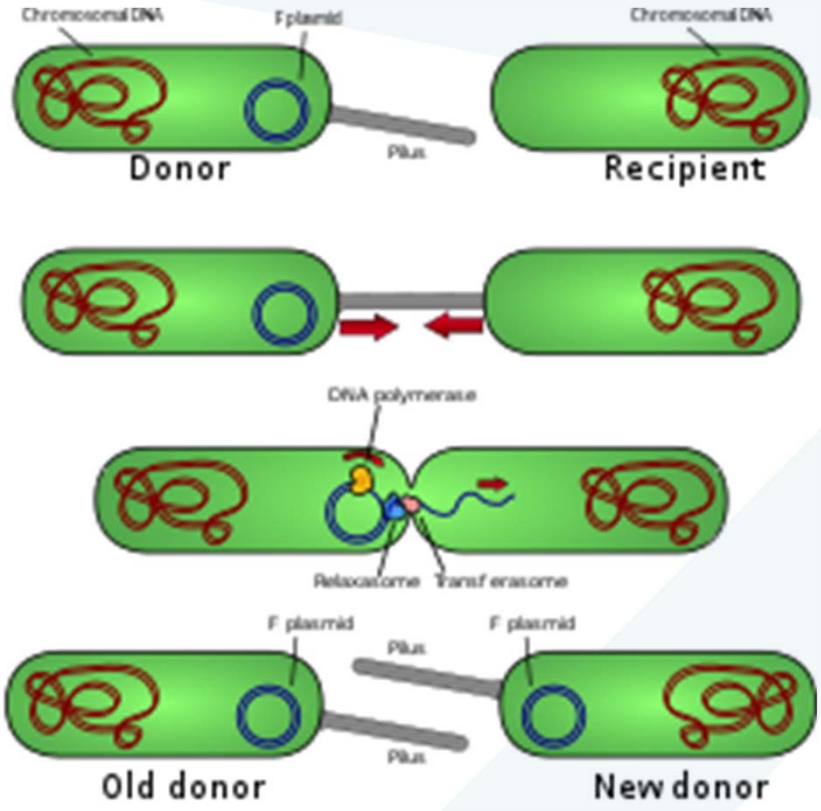
الاكتشافات التي أسست لهذه التقانة...

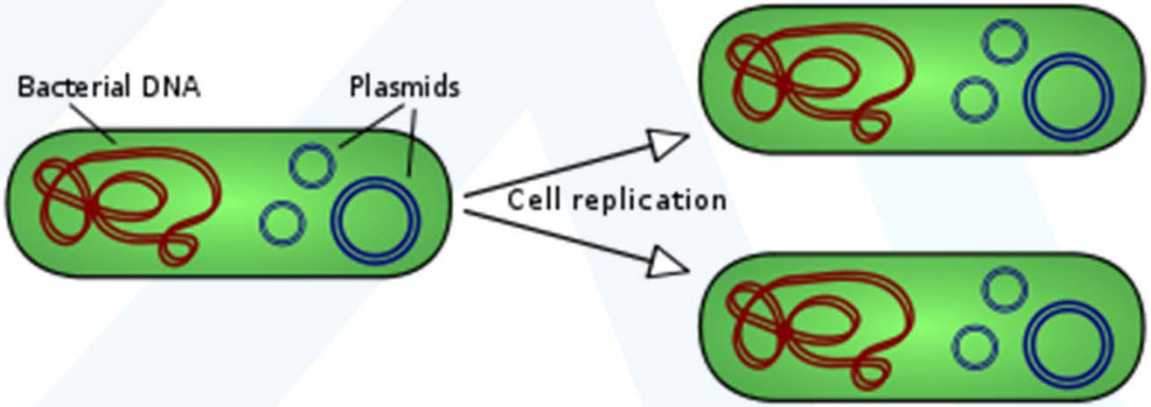


عند دراسة الخلايا البكتيرية ومقاومتها للصادات عام 1940 لوحظ وجود DNA حلقي الشكل مضاعف السلسلة منفصل عن الـ DNA الكروموزومي هذا الجزيء قادر على التضاعف الذاتي بمعزل عن تضاعف المادة الوراثية الخاصة بالبكتريا. سمي هذا الجزيء Plasmid من قبل العالم يوشع ليدربيرغ عام 1950

كيف يتضاعف البلاسميد ذاتيا؟

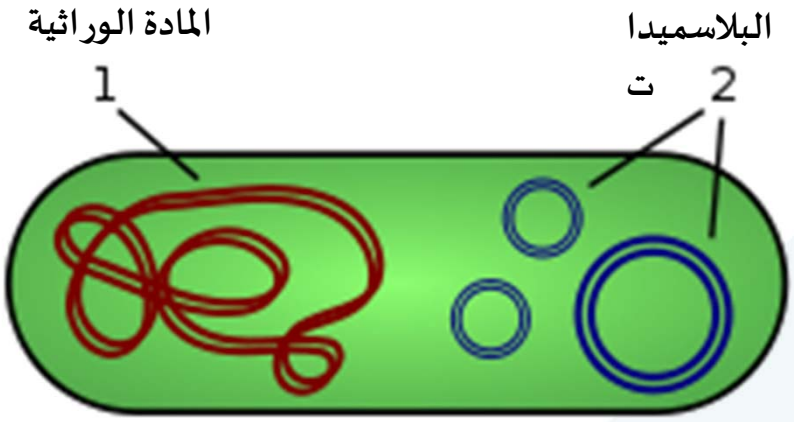
يحتوي على مورثات منظمة للتضاعف الذاتي والانقسام
داخل الخلايا المضيفة
(***ORI، Origin of Replication***)





أنواع البلاسميدات Plasmids

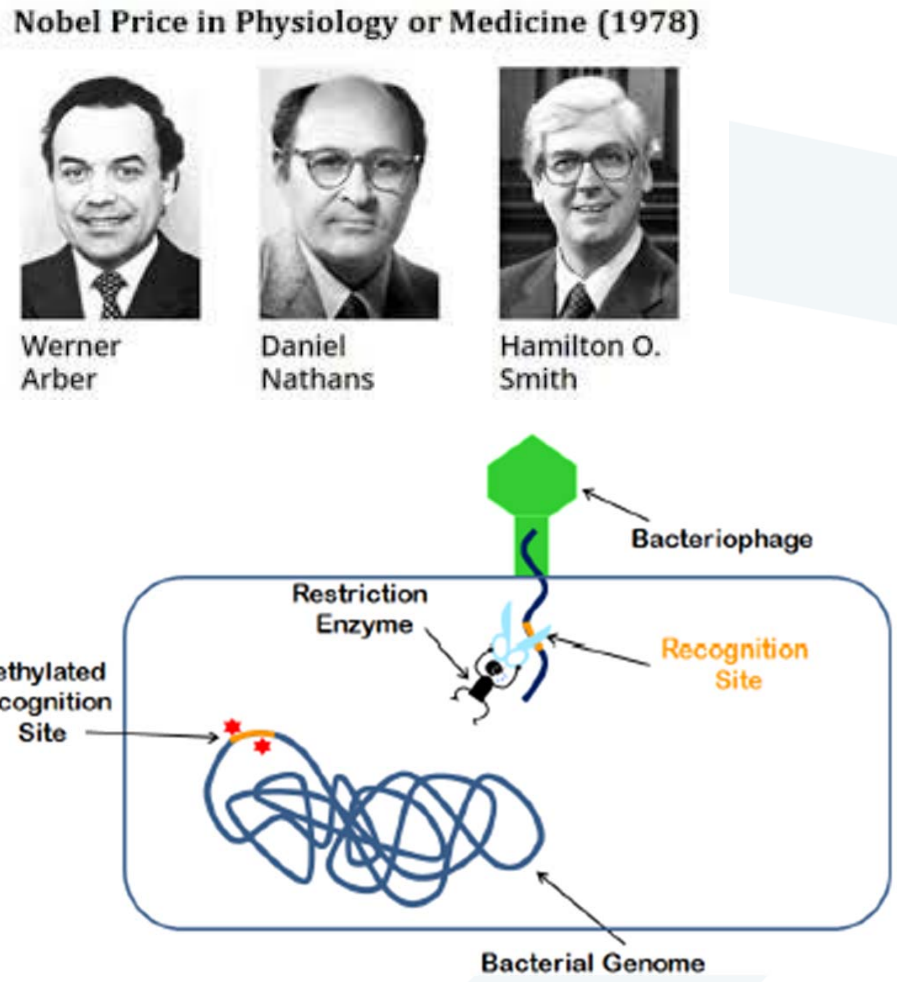
1. بلاسميدات الجنسية Fertility factors or F plasmids
2. بلاسميدات مقاومة Resistance plasmids
3. بلاسميدات Col Colicin plasmids
4. بلاسميدات التحلل Degradative plasmids
5. بلاسميدات الخبيثة Virulence plasmids



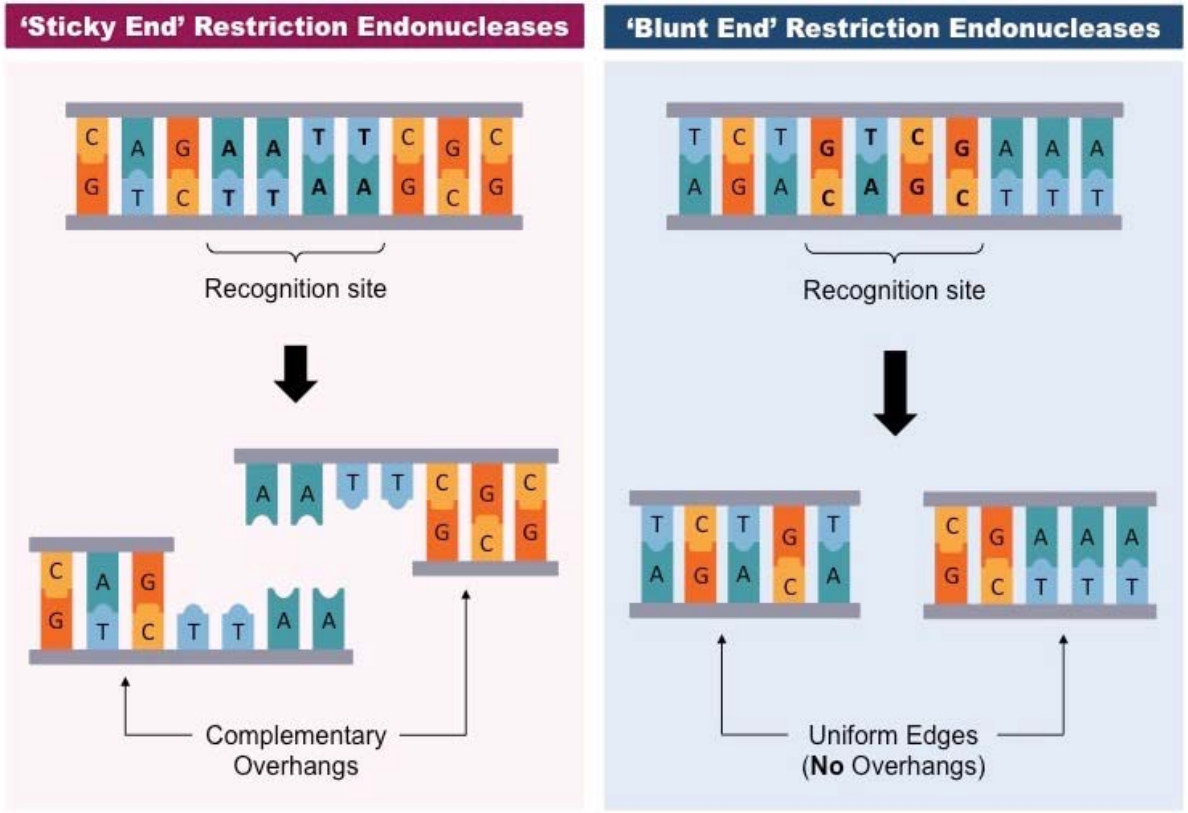
الخلية البكتيرية

الاكتشافات التي أسست لهذه التقانة...

- أيضا أثناء دراسة البكتيريا عام 1950 لوحظ أن هناك سلالات بكتيرية مقاومة لفيروسات Bacteriophages
- عام 1960 العالم Werner Arber لاحظ أن هنالك تغير جذري في DNA هذه الفيروسات حيث يقطع إلى قطع صغيرة عند دخوله إلى الخلية البكتيرية
- عام 1970 العالم Hamilton Smith قام بعزل أحد الأنزيمات التي تقص الـ DNA الفيروسي ووضح أنه يتعرف عليه من خلال Recognition Site موجود على الـ DNA الفيروسي



الاكتشافات التي أسست لهذه التقانة...



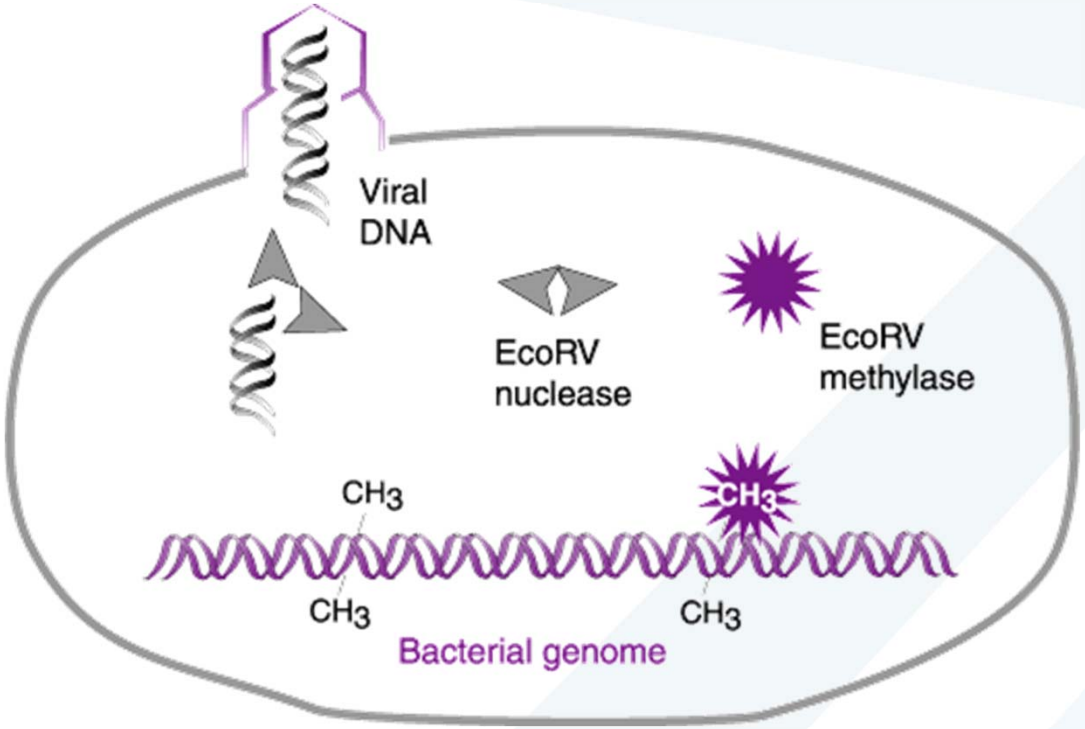
سميت هذه الجزيئات بأنزيمات التحديد Restriction enzymes حدد فيما بعد حوالي 3000 أنزيم

آلية عمل أنزيمات التحديد:

- هذه الأنزيمات هي أنزيمات Endonuclease تقوم بقص شريط الدنا المضاعف السلسلة في مواقع محددة تدعى Restriction sites (تتاليات نكليوتيدية خاصة بين 4 إلى 8 نكليوتيدات لكل أنزيم موقع قص خاص فيه)
- تقص هذه الأنزيمات بنموذجين:

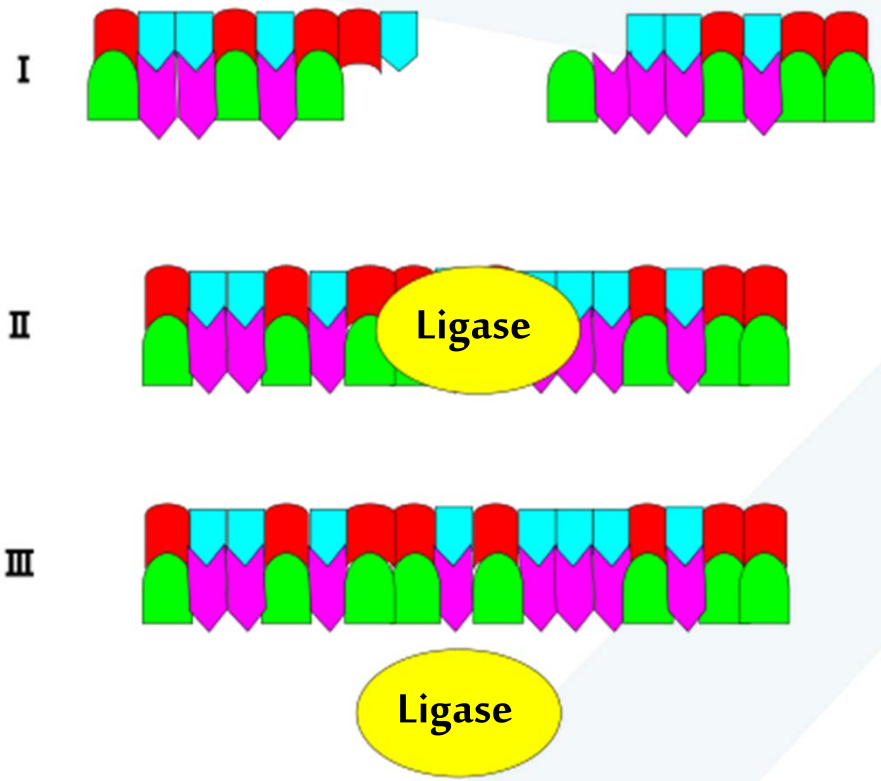
a. Sticky ends
b. Blunt ends

كيف لا يتأثر DNA البكتيريا بهذه الأنزيمات؟؟؟؟؟؟؟؟؟؟؟؟؟



يحتوي دنا البكتيريا وكل الكائنات الحية على مو اقع أنزيمات التحديد عند حقيقيات النوى تتم حماية الدنا من خلال ارتباطه مع الهيستونات من جهة وتغليفه ضمن النواة من جهة أخرى أما عند بدائيات النوى تتم حماية الدنا الخاص بها من التخرب بواسطة هذه الأنزيمات من خلال متيلة مو اقع القص الخاصة بأنزيمات التحديد.

الاكتشافات التي أسست لهذه التقانة...



- من أهم الأنزيمات العاملة على مستوى الدنا أنزيم Ligase الذي يلعب دورا هاما في تضاعف الدنا وإصلاحه
- اكتشف هذا الأنزيم عام 1967 من قبل Gellert, Lehman, Richardson, and Hurwitz laboratories
- يصل هذا الأنزيم النكليوتيدات المتجاورة في شريط الدنا الواحد والمضاعف بتشكيل رابطة فوسفاتية ثنائية الاستر بين هذه النكليوتيدات

Proc. Nat. Acad. Sci. USA
Vol. 70, No. 11, pp. 3240–3244, November 1973

Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*

(R factor/restriction enzyme/transformation/endonuclease/antibiotic resistance)

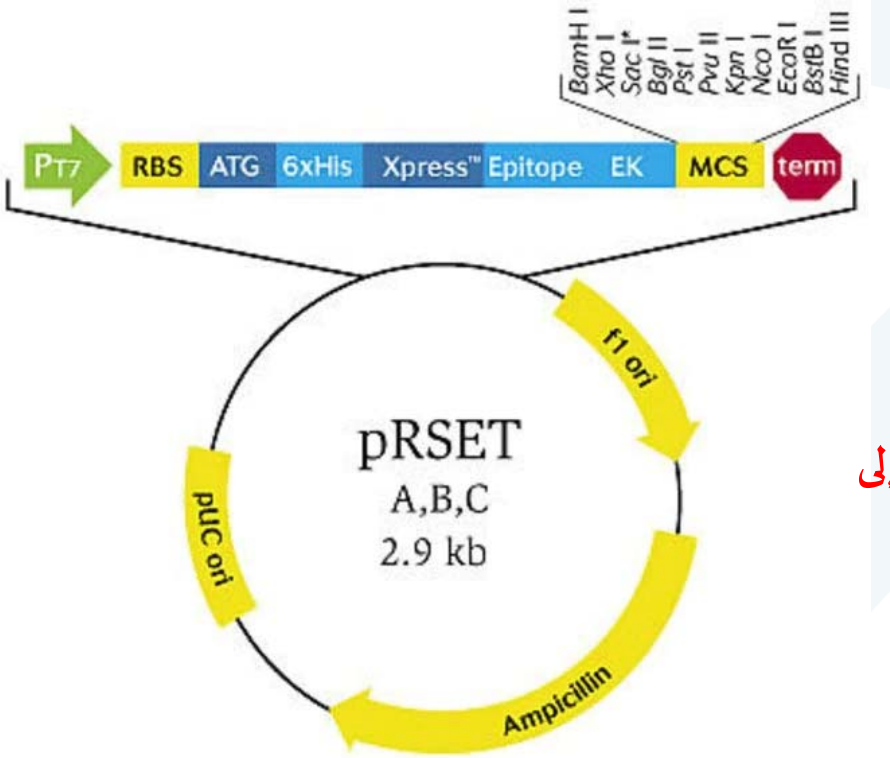
STANLEY N. COHEN*, ANNIE C. Y. CHANG*, HERBERT W. BOYER†, AND ROBERT B. HELLING†

* Department of Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305; and † Department of Microbiology, University of California at San Francisco, San Francisco, Calif. 94122

Communicated by Norman Davidson, July 18, 1973

Genetically engineered plasmids

Expression plasmids

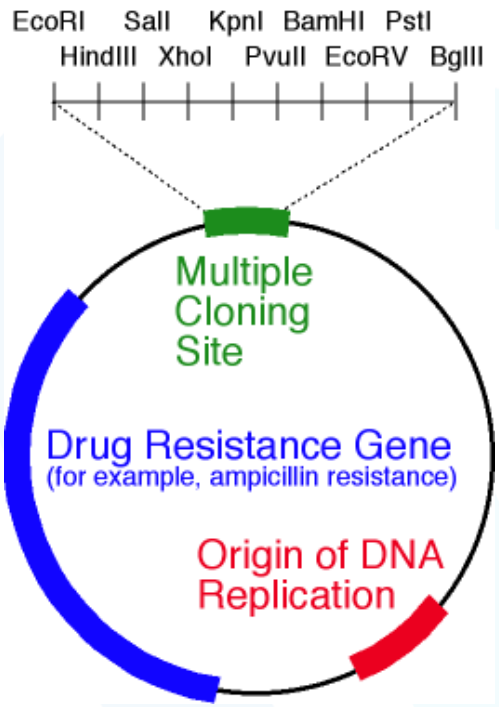


Multiple Cloning Site

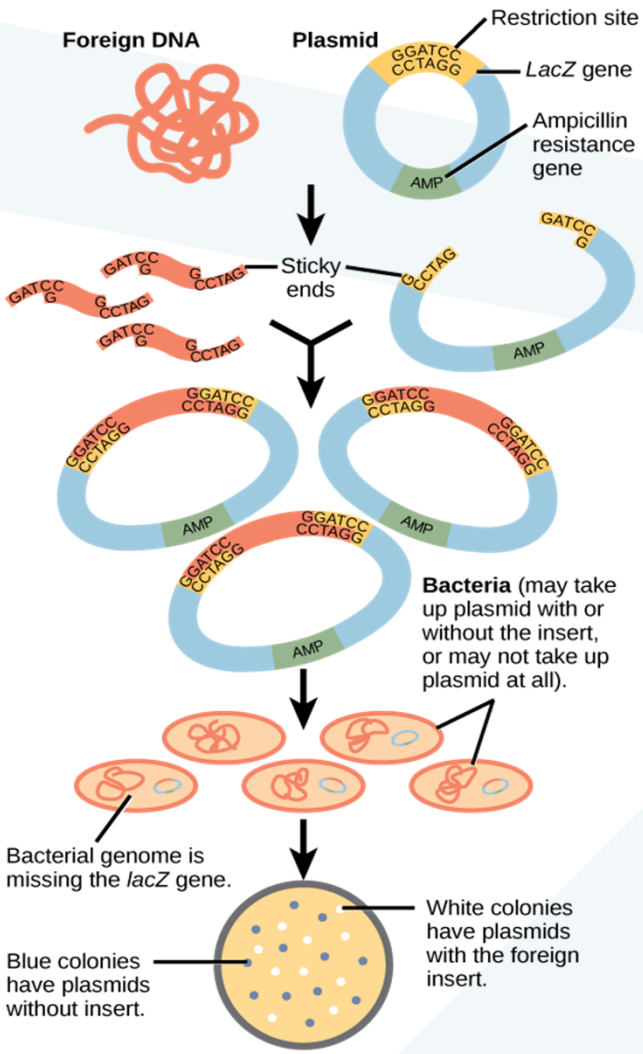
MCS

لإدخال المورث المراد العمل عليها إلى البلاسميد

Cloning plasmids



Recombinant DNA cloning



- **خطوات هذه التقانة:**

1. **إعداد الـDNA المؤشب:**

a. قطع تسلسل الجين وتسلسل البلاسميد بنفس أنزيم الاقتطاع

ربط الجين مع البلاسميد باستخدام أنزيم Ligase

b. إدخال البلاسميد المؤشب إلى الجراثيم Transformation

- **ماهو الهدف من إدخال البلاسميد المؤشب إلى الخلايا الجرثومية؟**

1. تضخيم الجين عبر تضاعف البلاسميد الذي يحصل بشكل طبيعي في الخلية الجرثومية

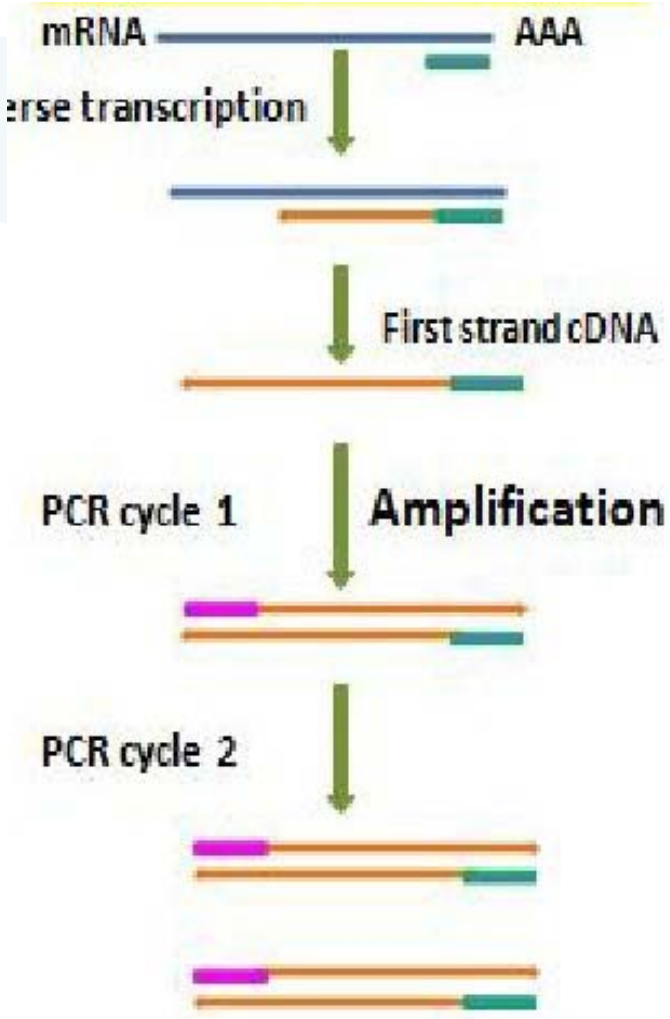
2. التعبير الجيني عن الجين المحمل على البلاسميد عن طريق نسخ الرنا المرسال للجين وترجمته إلى بروتين

إعداد الـDNA المؤشب

- إعداد المورثة المؤشبة:

مايهمنا دائما من المورثات المستهدفة في تقانة التأشيب هو نسخها والوصول إلى المنتج النهائي للمورثة (البروتين الوظيفي) لذلك ليس من الضروري الحصول على كامل التسلسل النكليوتيدي للمورثة وإنما فقط الجزء المرمز للبروتين. من الضروري تحديد أنزيمات القطع التي ستستخدم للقطع والتأكد أنها لاتقطع ضمن المورثة. تضم إضافة جهة القطع الخاصة بالأنزيم الأول قبل رامز البدء للتسلسل المرمز للمورثة وإضافة جهة القطع الخاصة بالأنزيم الثاني بعد رامز التوقف للتسلسل المرمز للمورثة تجرى هذه الخطوة باستخدام بوادئ خاصة محملة بجهات القطع هذه وتطبيق تقانة الـPCR

إعداد المورثة المؤشبة

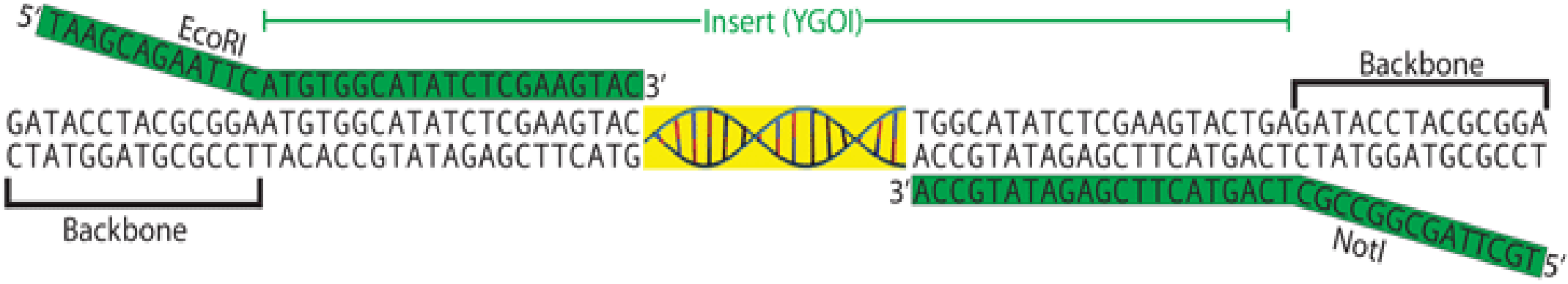


- RNA isolation
- RT-PCR (cDNA synthesis)
- PCR based cloning

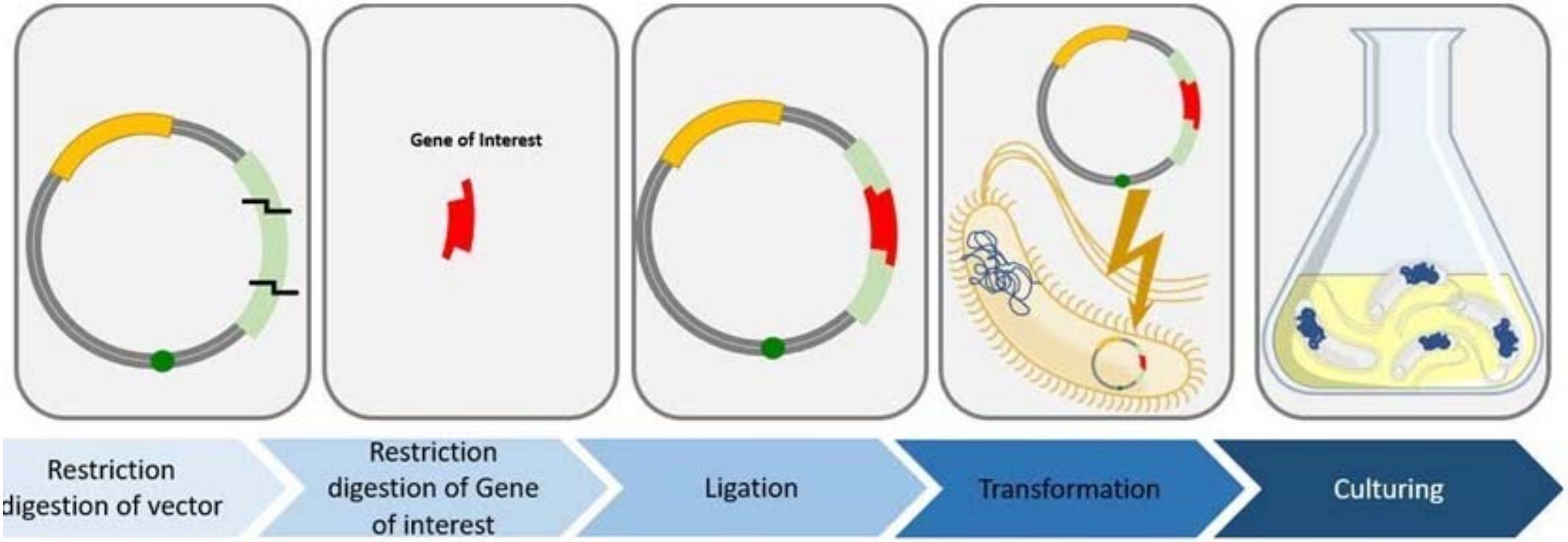
PCR based cloning

- **Primer Design for Restriction Enzyme Cloning**

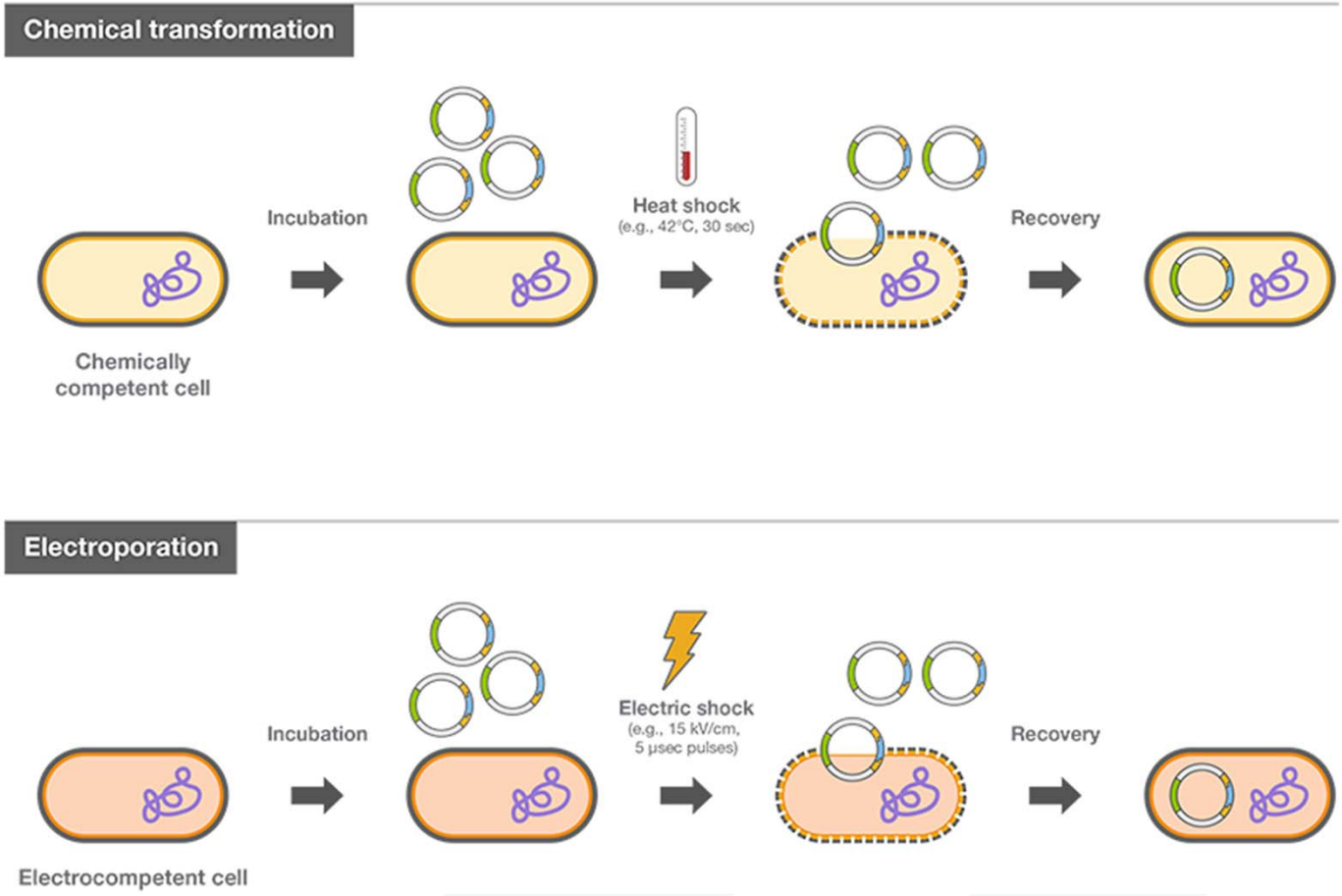
- **PCR based cloning is about making a copy of a piece of DNA and at the same time adding restriction sites to the ends of that piece of DNA so that it can be easily cloned into a plasmid of interest.**



Steps of DNA cloning



Transformation of *E. coli*



- إدخال DNA غريب إلى خلايا بدائيات النوى
- يتم إدخال البلاسميدات المؤشبة باستخدام الصدمة الحرارية أو التثقيب الكهربائي
- تحفظ الخلايا البكتيرية دائما بحرارة -80 وعند استخدامها توضع على الجليد
- يتم استخدام أوساط زرعية من الآغار للخلايا البكتيرية

Steps of transformation

- تحضير الخلايا البكتيرية على الجليد
- إضافة البلاسميد المؤشب إلى الخلايا البكتيرية
- حضن الخلايا البكتيرية مع البلاسميد على الجليد مدة نصف ساعة
- تعريض المحتوى لصدمة حرارية ضمن حمام مائي بدرجة حرارة 42 درجة مئوية مدة 30 ثانية
- إعادة المحتوى بسرعة إلى الجليد لمدة دقيقتين ثم حضن المحتوى ضمن حاضنة خاصة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية مدة ساعة
- توزيع المحتوى على أطباق الآغار الحاوي على الصاد الحيوي الملائم وكواشف عزل المستعمرات الإيجابية
- حضن الأطباق مقلوبة رأسا على عقب ضمن الحاضنة الخاصة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة

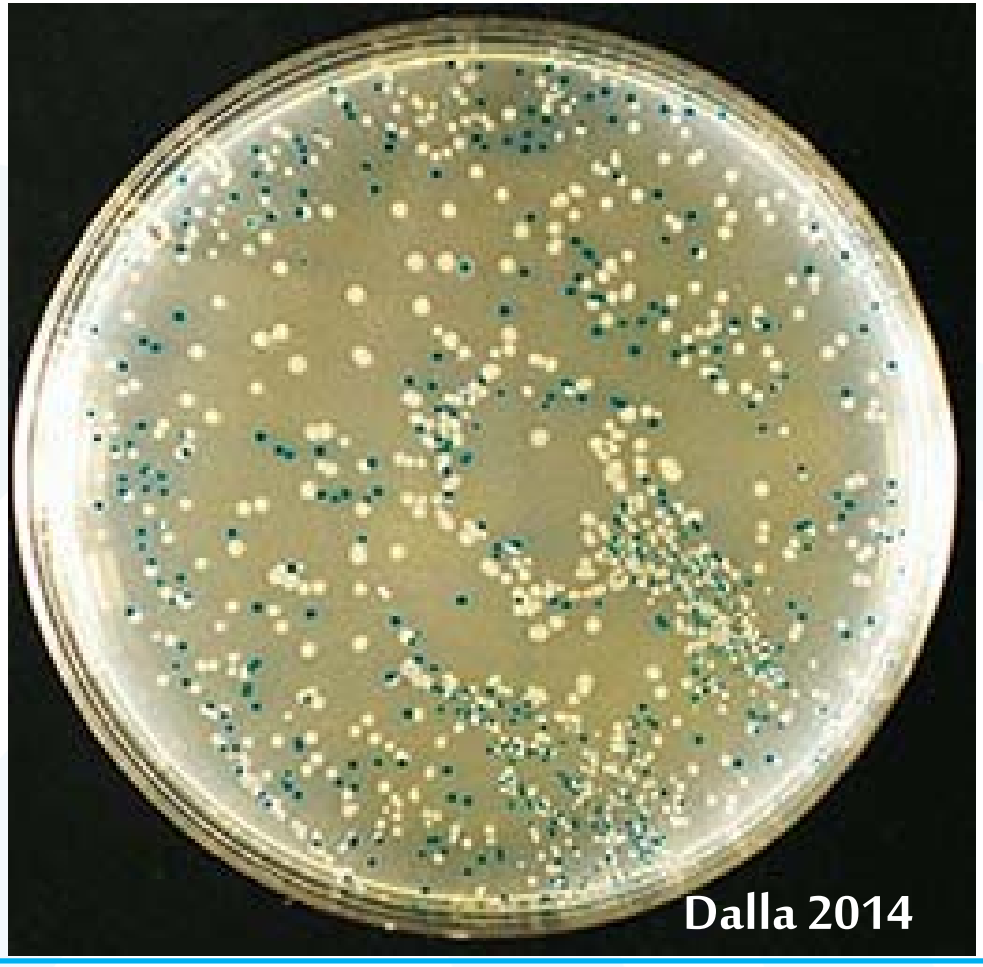
هل تحصل كل الخلايا الجرثومية على الدنا المؤشب الصحيح؟؟؟؟

- **عند محاولة ربط الجين المقتطع و البلاسميد المقتطع بأنزيم Ligase لايتم ربط جميع الجزئيات في نفس العينة بالشكل المطلوب.. فيمكن أن يعاود طرفي البلاسميد المقتطع الاتصال معا أو أن يرتبط طرفي المورثة المقتطعة مع بعضهما**
- **كيف يمكن تمييز الخلايا الجرثومية التي حصلت على البلاسميد المؤشب (المتضمن للمورثة)؟**

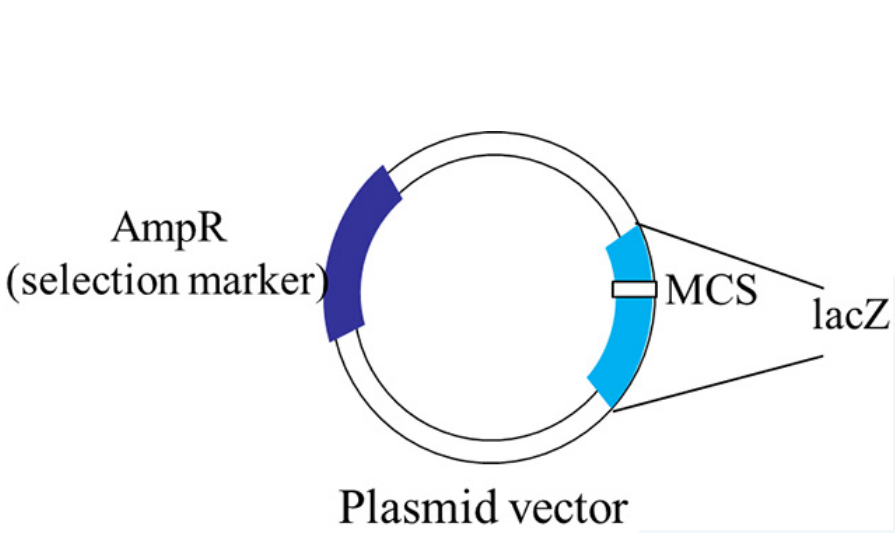
باستخدام بلاسميدات تحتوي التتاليين النكليوتيديين:

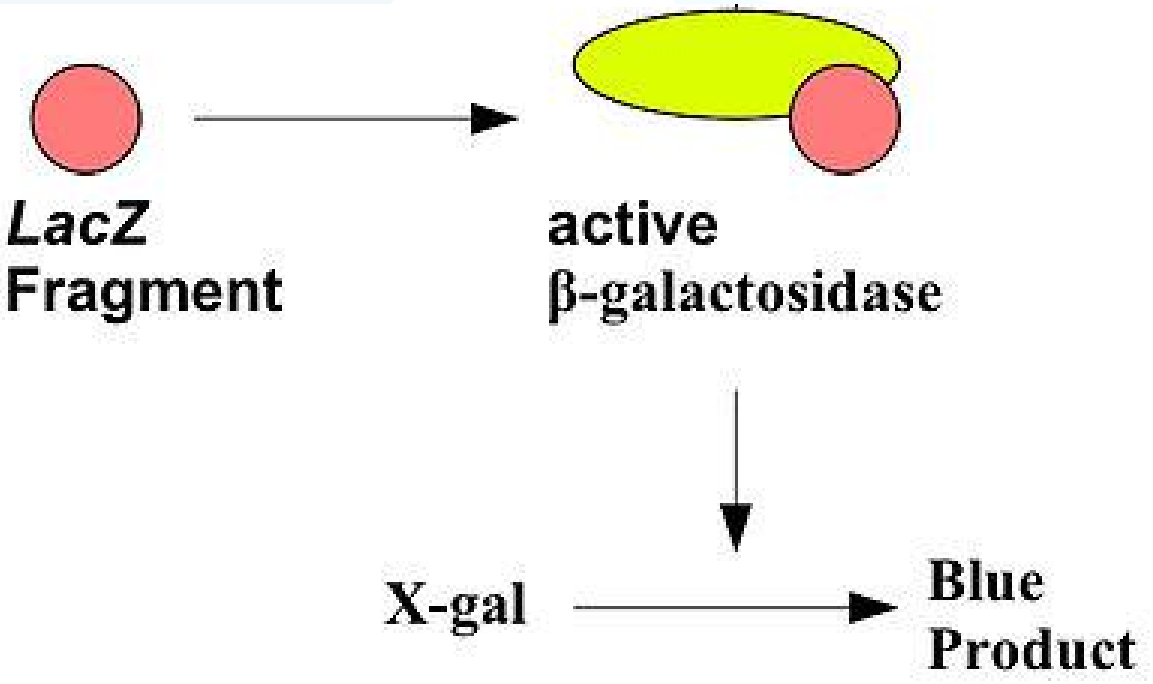
1. يرمز أحد بروتينات المقاومة لنوع من الصادات الحيوية بالتالي عند استزراع الجراثيم على أوساط تحتوي هذا الصاد تستطيع فقط تلك الحاوية على البلاسميد النمو على هذه الأوساط
2. التتالي الثاني يرمز أحد الأنزيمات التي تتواسط تحويل إحدى الركازات اللونية من الأبيض إلى الأزرق هذاااااااااااااااااا التتالي يحوي على موقع شطر أنزيم الاقتطاع

Transformed *E. coli*

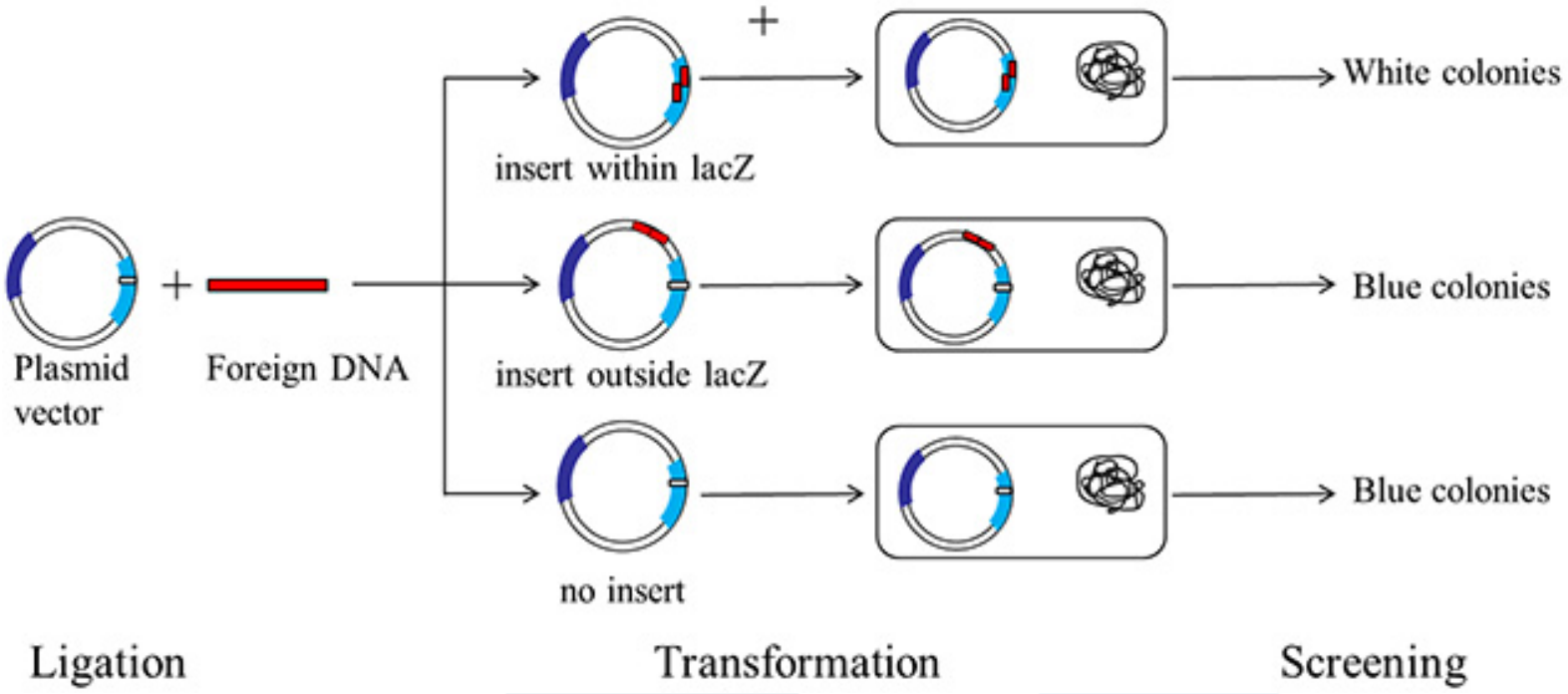


Mechanism of blue white screening





Selection of positive transformed cells



1. في حال حصل تأشيب تتداخل الجين المؤشبة في تسلسل الجين المولد للون وتكون المستعمرات بلون أبيض

2 و 3. في حال لم يحدث تأشيب: ارتبط الجين خارج موقع الشطر (الجين المولد للون) أو لم يرتبط نهائيا على البلاسميد تكون المستعمرات بلون أزرق

التقانة الحيوية
Biotechnology
المحاضرة الخامسة

د. صفاء دلا

Historical events in the development of cell culture

- 1878: Claude Bernard proposed that physiological systems of an organism can be maintained in a living system after the death of an organism.
- 1885: Roux maintained embryonic chick cells in a saline culture.
- 1897: Loeb demonstrated the survival of cells isolated from blood and connective tissue in serum and plasma.
- 1903: Jolly observed cell division of salamander leucocytes *in vitro.*
- 1907: Harrison cultivated frog nerve cells in a lymph clot held by the 'hanging drop' method and observed the growth of nerve fibers *in vitro* for several weeks. He was considered by some as the father of cell culture.
- 1910: Burrows succeeded in long term cultivation of chicken embryo cell in plasma clots. He made detailed observation of mitosis.

Historical events in the development of cell culture

- 1911: Lewis and Lewis made the first liquid media consisted of sea water, serum, embryo extract, salts and peptones. They observed limited monolayer growth.
- 1913: Carrel introduced strict aseptic techniques so that cells could be cultured for long periods.
- 1916: Rous and Jones introduced proteolytic enzyme trypsin for the subculture of adherent cells.
- 1923: Carrel and Baker developed 'Carrel' or T-flask as the first specifically designed cell culture vessel. They employed microscopic evaluation of cells in culture.
- 1927: Carrel and Rivera produced the first viral vaccine - Vaccinia.
- 1933: Gey developed the roller tube technique.

Historical events in the development of cell culture

- 1940s: The use of the antibiotics penicillin and streptomycin in culture medium decreased the problem of contamination in cell culture.
- 1948: Earle isolated mouse L fibroblasts which formed clones from single cells. Fischer developed a chemically defined medium, CMRL 1066.
- 1952: Gey established a continuous cell line from a human cervical carcinoma known as HeLa (Helen Lane) cells. Dulbecco developed plaque assay for animal viruses using confluent monolayers of cultured cells.
- 1954: Abercrombie observed contact inhibition: motility of diploid cells in monolayer culture ceases when contact is made with adjacent cells.
- 1955: Eagle studied the nutrient requirements of selected cells in culture and established the first widely used chemically defined medium.
- 1961: Hayflick and Moorhead isolated human fibroblasts (WI-38) and showed that they have a finite lifespan in culture.
- 1964: Littlefield introduced the HAT medium for cell selection.
- 1965: Ham introduced the first serum-free medium which was able to support the growth of some cells.

Historical events in the development of cell culture

- 1965: Harris and Watkins were able to fuse human and mouse cells by the use of a virus.
- 1975: Kohler and Milstein produced the first hybridoma capable of secreting a monoclonal antibody.
- 1978: Sato established the basis for the development of serum-free media from cocktails of hormones and growth factors.
- 1982: Human insulin became the first recombinant protein to be licensed as a therapeutic agent.
- 1985: Human growth hormone produced from recombinant bacteria was accepted for therapeutic use.
- 1986: Lymphoblastoid γIFN licensed.
- 1987: Tissue-type plasminogen activator (tPA) from recombinant animal cells became commercially available.
- 1989: Recombinant erythropoietin in trial.
- 1990: Recombinant products in clinical trial (HBsAG, factor VIII, HIVgp120, CD4, GM-CSF, EGF, mAbs, IL-2).

Cell Culture

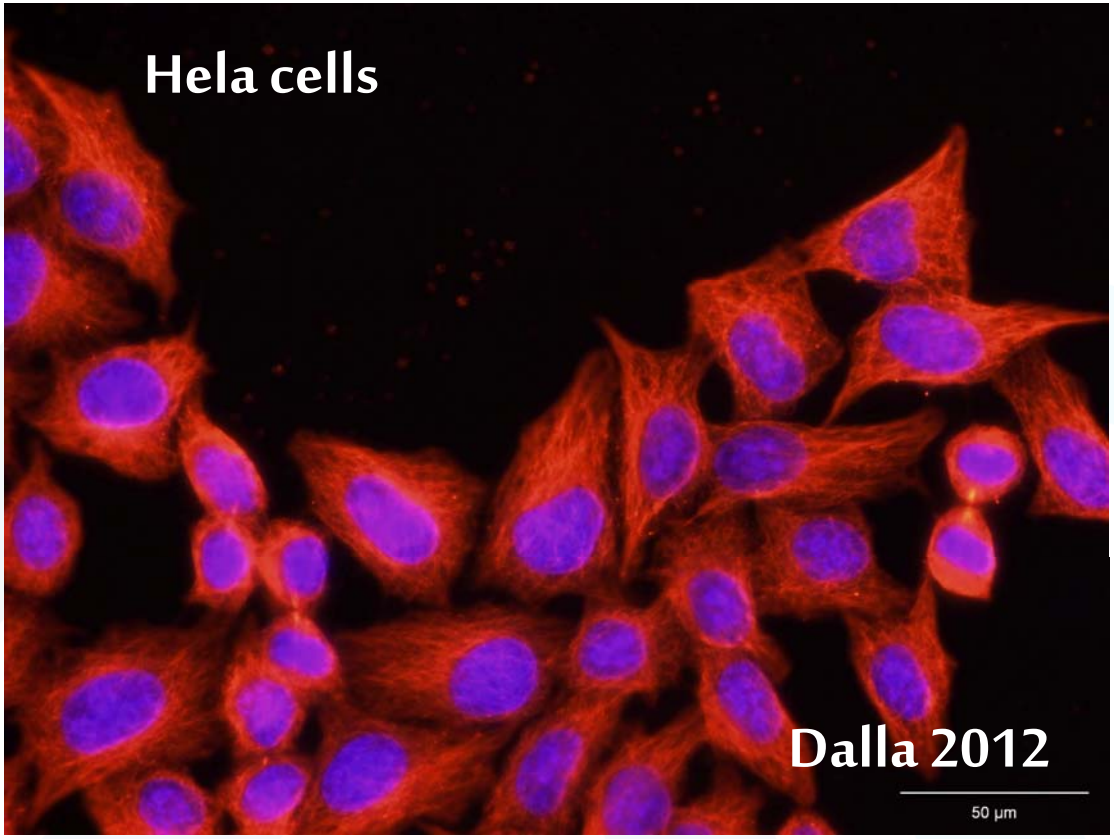
- بدأت الفكرة مع إمكانية حفظ أعضاء بحالة حيوية جيدة خارج جسم الكائن أواخر القرن التاسع عشر
- ثم عزل نسج عصبية من حيوانات ومحاولة الحفاظ عليها ضمن محلول فيزيولوجي
- في أوائل القرن العشرين تم عزل خلايا من جنين دجاج ومحاولة إكثارها في المختبر
- في منتصف القرن العشرين تم عزل أول خط خلوي بشري من سرطان عنق الرحم لمريضة Henrietta Lacks

سميت بخلايا Hela cells

Immortal cell line

Derived from cervical cancer cells

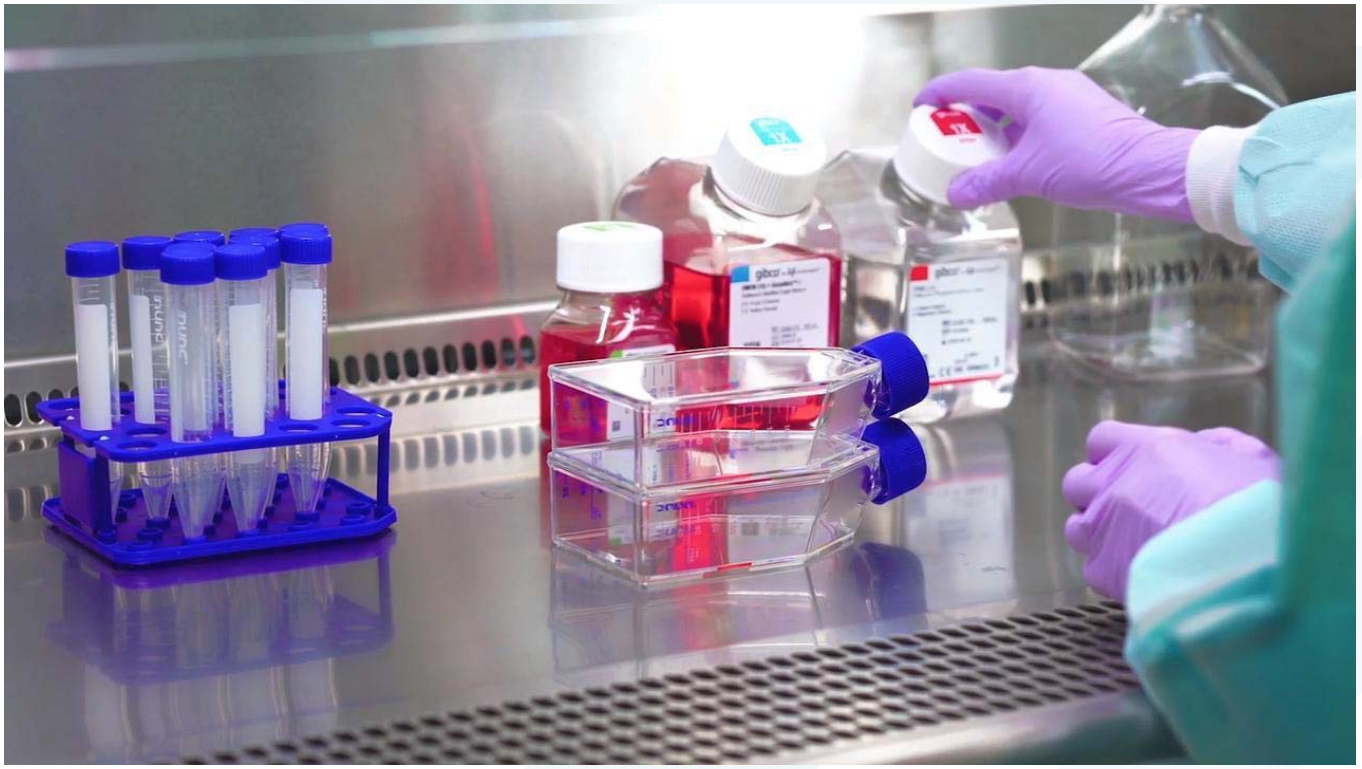
Gey *et al.,* 1952



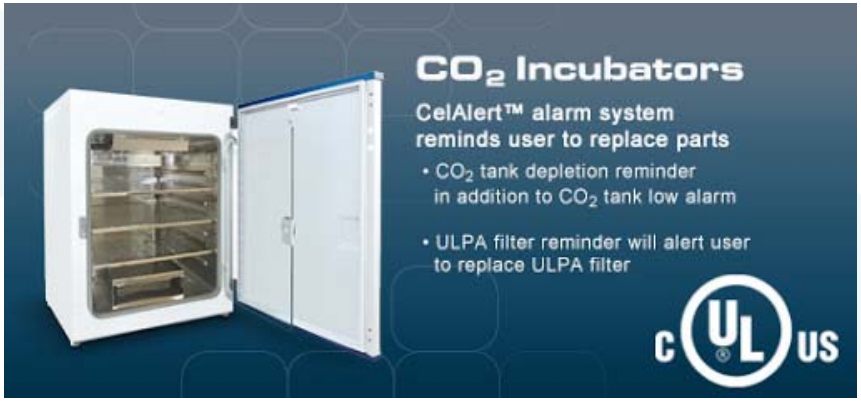
Cell Culture

استزراع أو استنبات الخلايا هو العملية التي يتم من خلالها تنمية خلايا تحت شروط متحكم بها خارج منظومتها الحيوية الطبيعية

Culture conditions



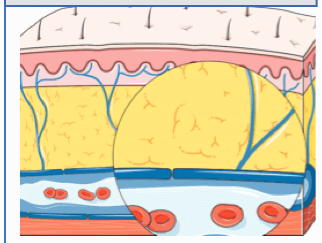
- وعاء استزراع ملائم
- محلول مغذي يؤمن العناصر الغذائية الرئيسية من أحماض أمينية كربوهيدرات فيتامينات ومعادن
- عوامل نمو
- هرمونات
- والغازات الضرورية (CO2, O2)
- درجة حرارة وpH ملائمة



جَامعة المَنارة
MANARA UNIVERSITY

How can we obtain cells for a cell culture?

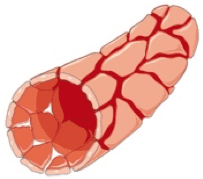
Tissue Acquisition



Dissection

Process tissue, removing fatty and necrotic cells

Disaggregation



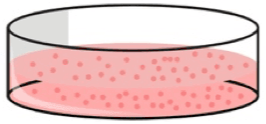
Mechanical or enzymatic disaggregation

collagenase

trypsin

pronase

Incubation & Growth

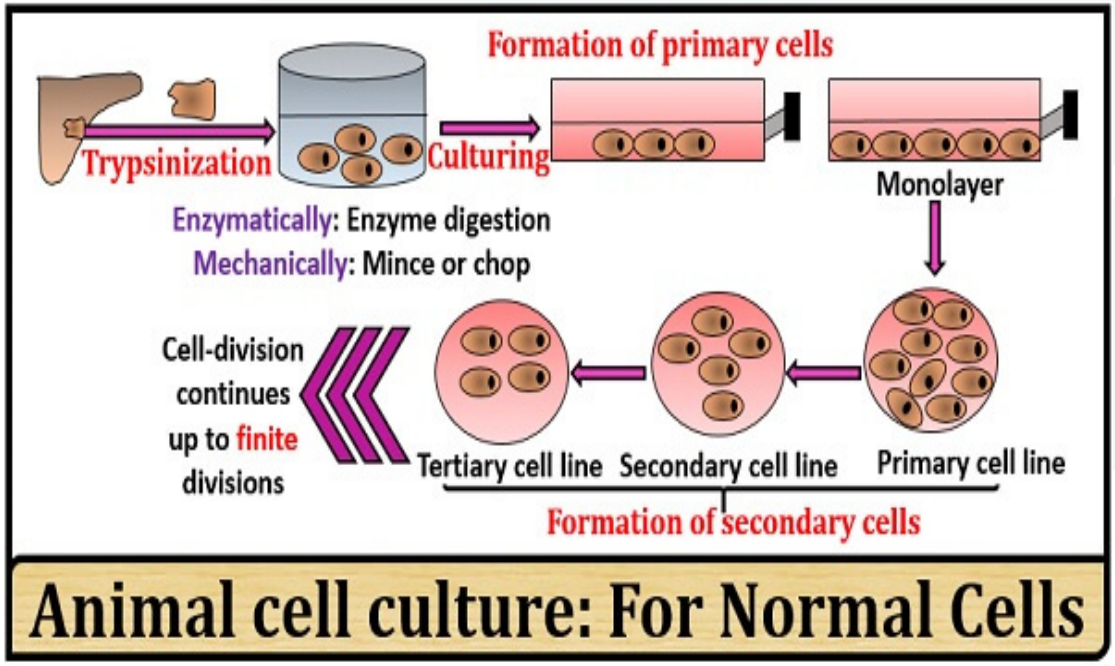


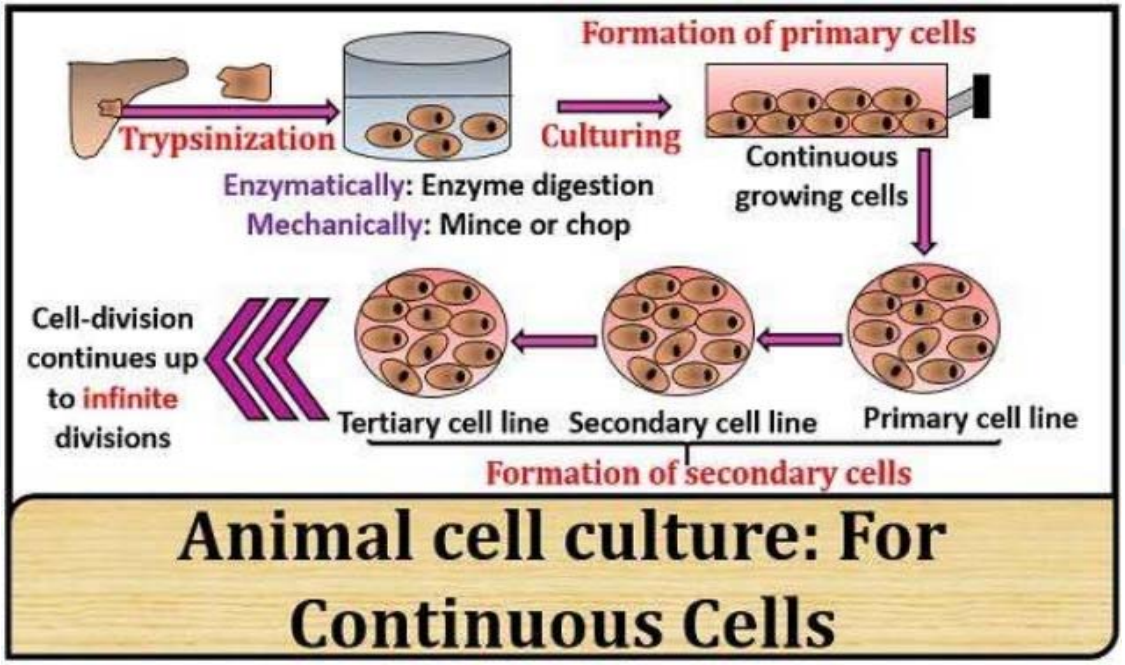
- Incubate dispersed cells
- Change medium 24 hours after initiation to remove loose debris & unattached cells

Separation & Purification

- Further purification of primary cells achieved by: selective media, remove cells at different levels of attachment, immunomagnetic beads

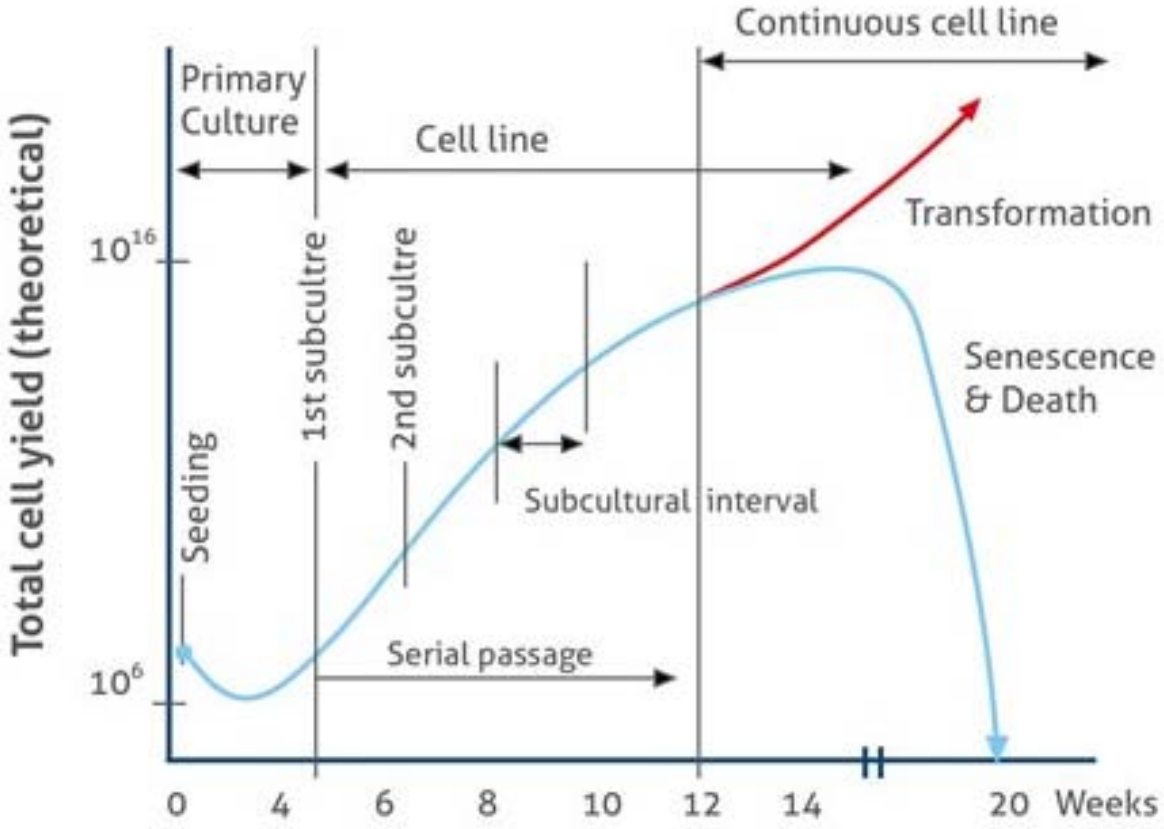
Continuous cells





Cancer cells, Embryonic stem cells, Germ cells

Continuous cell line



Cell Morphology Types

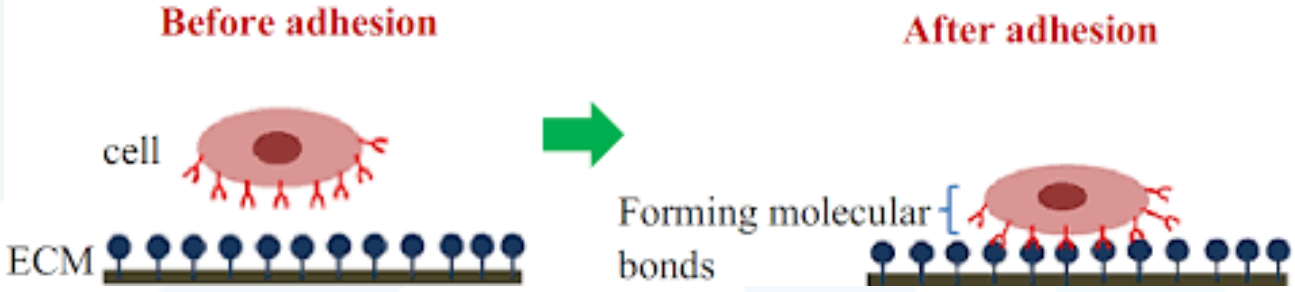
Fibroblast-like

Epithelial-like

Lymphoblast-like

Cell culture systems

- طبقة واحدة من الخلايا تتكاثر على سطح وسط الاستزراع
- سطح وسط الاستزراع مغطى بطبقة من البروتينات أو عديدات الببتيد تستطيع الخلايا أن ترتبط إليها لأنها تملك مستقبلات لها على سطحها
- تسمى هذه العملية بالالتحام Adhasion والخلايا التي تستزرع بهذه الطريقة adherent cells



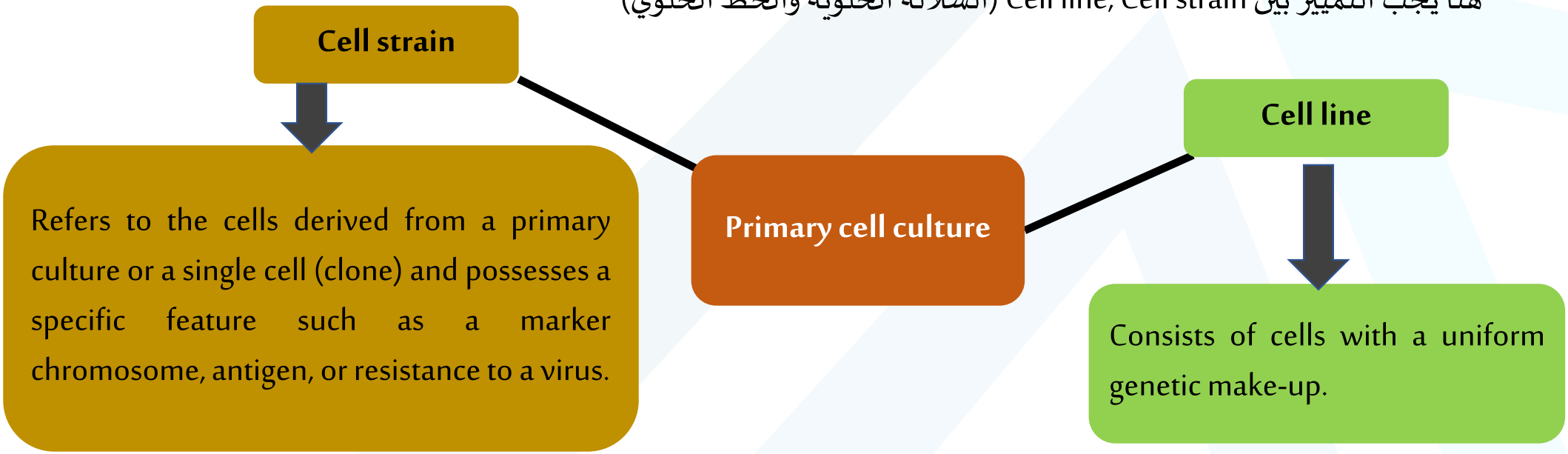
Cell culture systems

- **Suspension culture system**

- تتكاثر الخلايا هنا ضمن محلول على شكل معلق
- يجب الحفاظ على مثل هذا النوع من الخلايا بحالة حركة أثناء استزراعها
- يتم إكثارها ضمن Shaker-incubator
- يستخدم هذا النوع من الخلايا بشكل شائع لأغراض إنتاجية

What is the difference between cell line and cell strain?

- المزارع الخلوية يمكن أن تكون من بدائيات النوى أو حقيقيات النوى ولكن الشائع عندما نتحدث عن مزارع خلوية ان يكون القصد الخلايا المعزولة من الحيوانات
- هنا يجب التمييز بين Cell line, Cell strain (السلالة الخلوية والخط الخلوي)



What is cell culture used for?

- **Model systems**

✓ تستخدم كنماذج لدراسة بيولوجيا وفيزيولوجيا الخلايا

✓ دراسة التفاعل بين العوامل المسببة للمرض والخلايا

✓ تأثير العقاقيرعلى الخلايا

- **Toxicity testing**

✓ دراسة تأثير العقاقير ومستحضرات التجميل والمواد الكيميائية على نمو وسلامة نماذج مختلفة من الخلايا خاصة المزارع الخلوية المشتقة من الكبد والكلية

What is cell culture used for?

- **Cancer research**

✓ دراسة الاختلافات بين الخلايا السرطانية والخلايا الطبيعية

✓ يؤمن إمكانية تحويل الخلايا الطبيعية إلى خلايا سرطانية باستخدام مواد كيميائية, فيروسات ومواد مشعة بالتالي دراسة الآليات الخلوية والجزيئية لعملية التحول هذه

✓ المزارع الخلوية السرطانية تؤمن نظام اختبار للعقاقير المناسبة للتدمير الانتقائي للخلايا السرطانية

- **Virology**

✓ وسط لإكثار الفيروسات لإنتاج اللقاحات المضادة لها (تستخدم كبديل للحيوانات المخبرية)

✓ عزل الفيروسات والكشف الطبي عنها ودراسة الآليات التي تستخدمها في العدوى والنمو في الخلية المضيفة

What is cell culture used for?

- **Cell-based manufacturing**

✓ إنتاج كميات كبيرة من الفيروسات المستخدمة في إنتاج اللقاحات

✓ إنتاج كميات كبيرة من خلايا معدلة وراثيا لاستخدمها في إنتاج بروتينات علاجية ومواد طبية أو حتى تجارية مهمة

- **Genetic counseling**

✓ تقانة تشخيصية للكشف المبكر في المراحل الجنينية الأولى عن أي تشوهات خلوية أو صبغية من خلال عزل خلايا جنينية ودراستها في مخبر استزراع الخلايا

What is cell culture used for?

- **Genetic engineering**

✓ إمكانية برمجة المزرعة الخلوية بإدخال دنا جديد إليها يؤمن وسيلة جزيئية هامة في دراسة التأثيرات الخلوية على التعبير الجيني والتحكم بكمية البروتين المنتج في هذه الخلايا

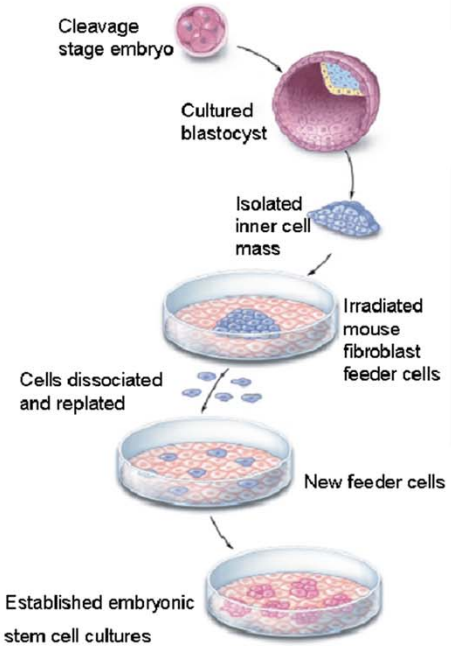
- **Gene therapy**

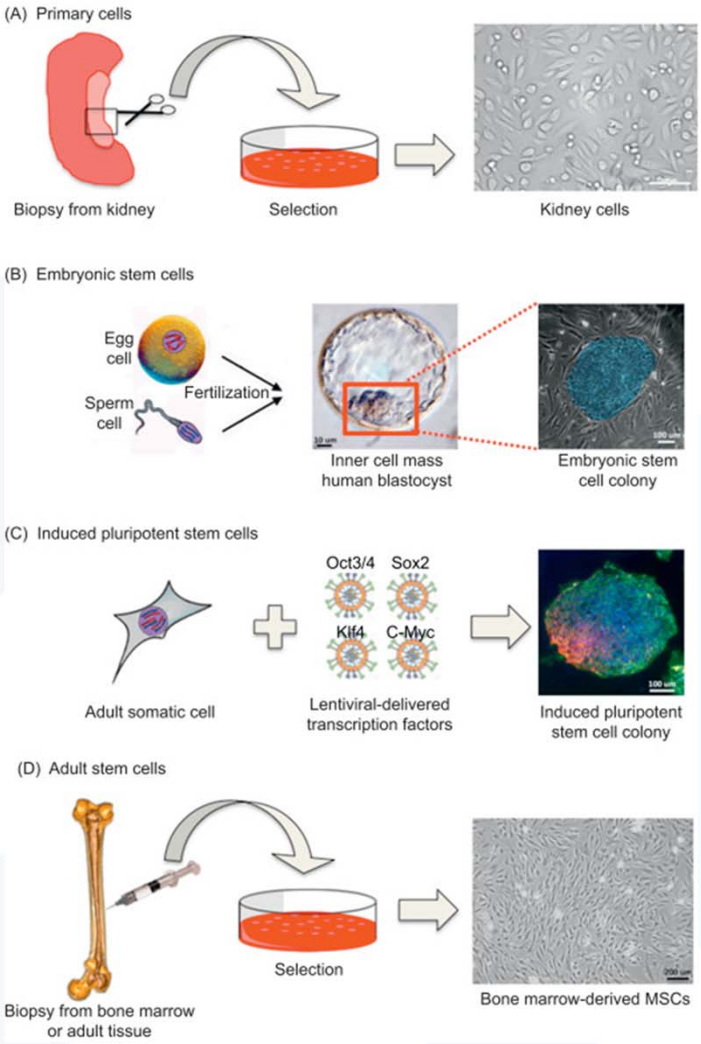
✓ عزل خلايا من نسيج مريض تنقصها جينات وظيفية أو تعرضت لخلل وراثي معين وتعديلها وراثيا لإصلاح هذا الخلايا للشخص المصاب

What is cell culture used for?

- **Drug screening and development**

✓ للتحاليل المعتمدة على الخلايا أهمية متزايدة في الصناعات الدوائية ليس فقط لاختبار سمية عقار ولكن أيضا لاختبار إمكانية استخدام مركبات عديدة كعقاقير دوائية


Cleavage stage embryo
Cultured blastocyst
Isolated inner cell mass
Irradiated mouse fibroblast feeder cells
Cells dissociated and replated
New feeder cells
Established embryonic stem cell cultures


(A) Primary cells
Biopsy from kidney
Selection
Kidney cells
(B) Embryonic stem cells
Egg cell
Sperm cell
Fertilization
Inner cell mass human blastocyst
Embryonic stem cell colony
(C) Induced pluripotent stem cells
Adult somatic cell
Oct3/4
Sox2
Klf4
C-Myc
Lentiviral-delivered transcription factors
Induced pluripotent stem cell colony
(D) Adult stem cells
Biopsy from bone marrow or adult tissue
Selection
Bone marrow-derived MSCs

التقانة الحيوية
Biotechnology
المحاضرة السادسة

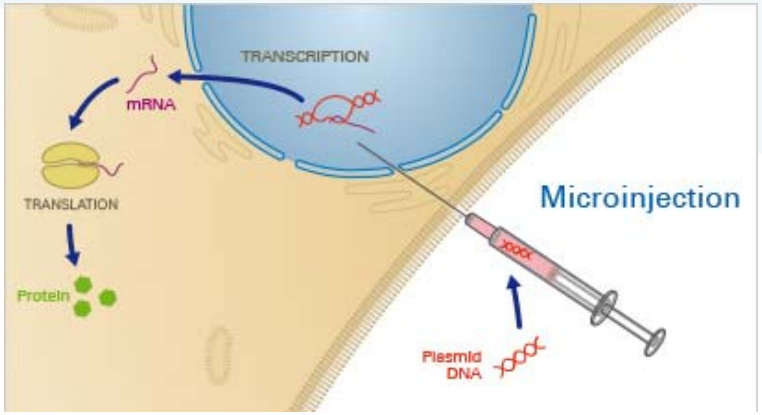
د. صفاء دلا

تقانات إدخال DNA غريب إلى الخلايا الحية
Introducing foreign DNA into livin cells

- تقانة الحقن الدقيق Microinjection
- تقانة اندماج الخلايا Cell fusion
- تقانة الامتصاص المباشر لـ DNA DNA Direct Uptake

1. الطرق الكيميائية Chemical methods
2. التثقيب الكهربائي Electroporation
3. الصدمة الحرارية Heat shock

Microinjection



Microinjection

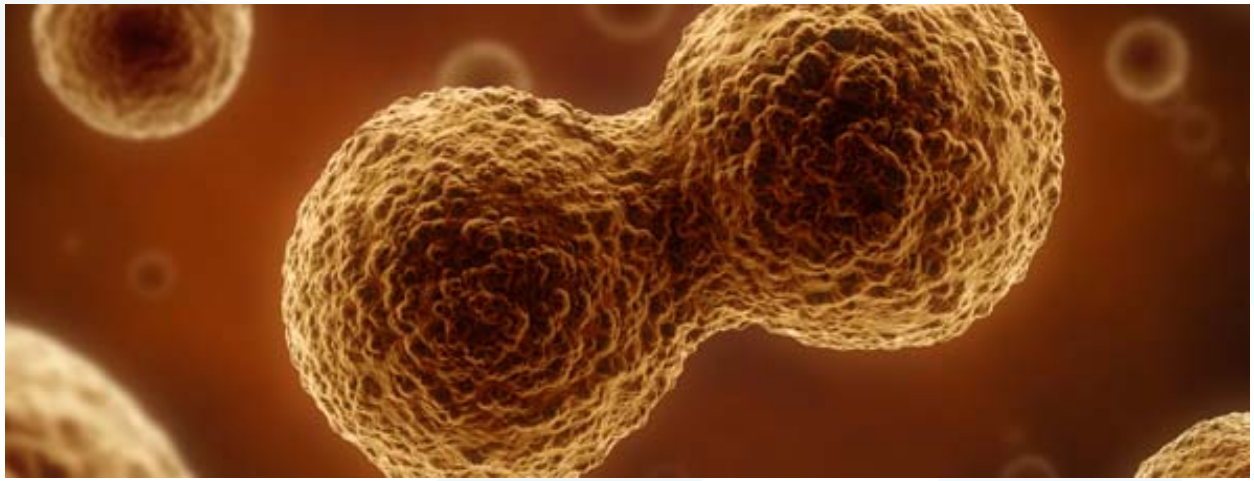
- **Microinjection:** is the use of glass microinjection needles with very fine tip (0.1 to 0.5 µm) to directly inject foreign gene fragments into **pronuclear embryos or cultured cells**.
- **Magnification power of around 200x**
- **Substances that can be injected:** various organelles, sperms, kinases, histochemical markers (such as horseradish peroxidase or fluorescent materials), proteins, metabolites, micro-heads, ions, antibodies, genes, mRNA and DNA.

Microinjection applications

- تستخدم تقانة الحقن الدقيق في عمليات الإخصاب المخبري ***In vitro fertilization***
- تعتبر طريقة واسعة الاستخدام كناقل وراثي لمواد وراثية غريبة إلى الخلايا
- طريقة هامة جدا للوصول إلى حيوانات معدلة وراثيا ***Transgenic animals*** من خلال حقن جينات, خلايا جذعية جنينة, ناقلات حيوانات منوية, خلايا جسدية
- تمكن هذه التقانة من حقن كميات صغيرة جدا من مادة كيميائية تصل إلى Picoliter إلى خلية واحدة أو مجموعة من الخلايا لاختبار عقار دوائي ***Pharmacological drug test***

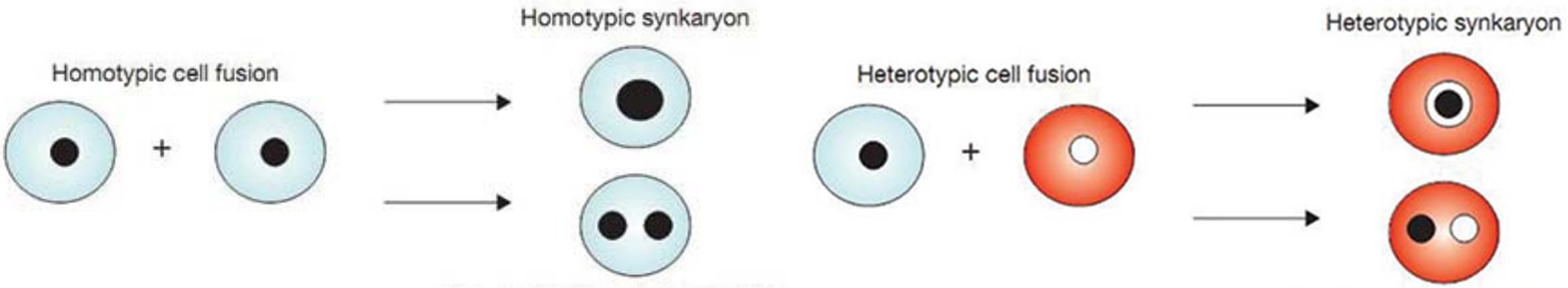
A picoliter is a trillionth (one millionth of a millionth, or 10 to the -12th power) of a liter

Cell fusion



- الاندماج الخلوي هو عملية خلوية مهمة يتم من خلالها اتحاد العديد من الخلايا أحاديات النواة لتشكل خلية متعددة النواة
- يحدث الاندماج الخلوي طبيعيا أثناء تمايز العضلات والخلايا الجنينية والتمايز الشكلي
- يعتبر حادثة مهمة في نضج الخلايا بحيث تحصل على وظائفها الخاصة

Cell fusion types



Homotypic cell fusion

Heterotypic cell fusion

Cell fusion methods

أكثر الطرق المستخدمة في اندماج الخلايا مخبريا هي طريقة دمج الخلايا الكهربائي Electrical cell fusion

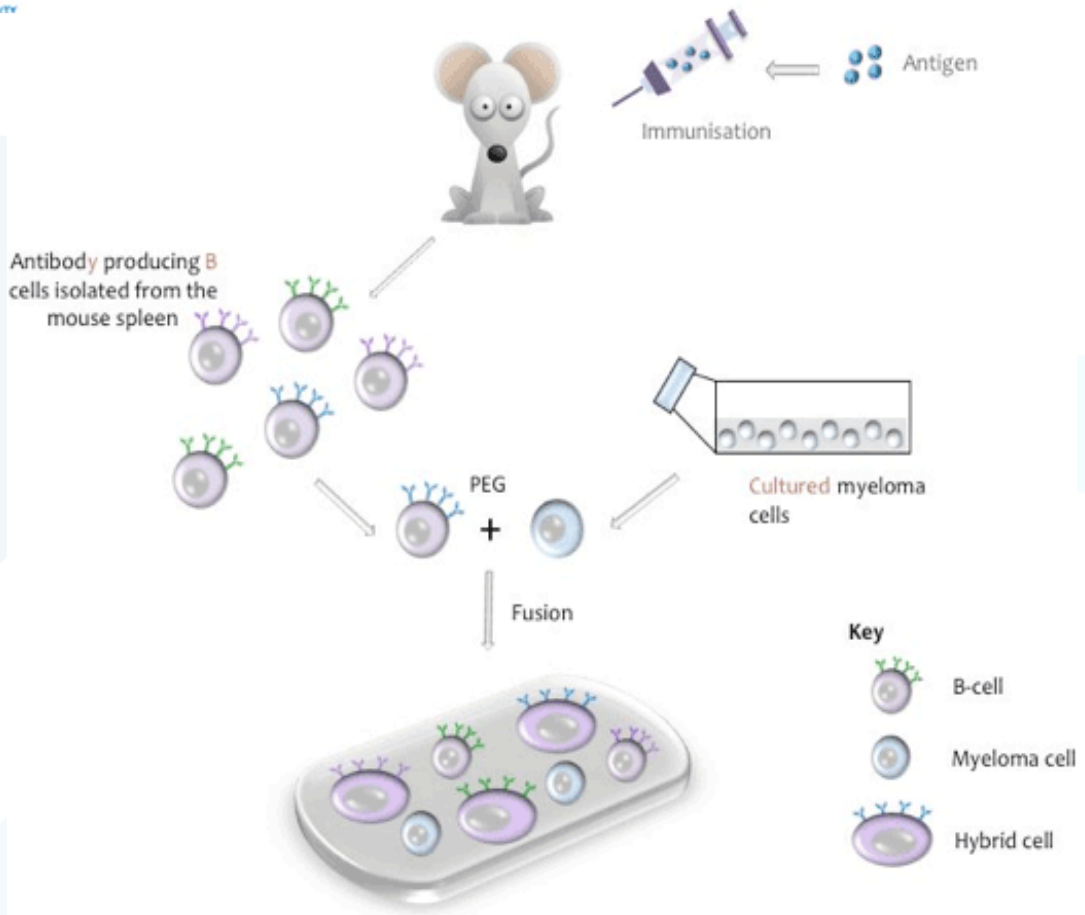
يتم وضع خلايا بالقرب من بعضها ضمن رحلان متقطع

عندما تقترب الخلايا كثيرا من بعضها يتم تطبيق نبض كهربائي يؤدي إلى نفوذية الأغشية الخلوية للخلايا المتجاورة وبالتالي اتحاد الخلايا.

Cell fusion applications

- **Hybridoma Production**

Hybridoma is a cell line arising from one **hybrid cell** that is capable of **secreting a monoclonal antibody**. The hybrid cell is produced through the **fusion** of **specific antibody producing B-cell** from an immunized animal (usually a mouse, rat or rabbit) and which has a **finite lifespan**, with a **cell from an "immortal" cultured myeloma cell line** (e.g. mouse NS-1 or NS-0).



Cell fusion applications

- **Twist of fate**

a. اندماج النطفة بالبويضة بشكل نوعي وليس عشوائي

b. الألياف العضلية المتأذية والحاوية على مئات النوى يتم إصلاحها باندماجها بالخلايا العضلية غير المتمايزة

c. قدرة الخلايا الجذعية الجنينية على الاندماج بخلايا عصبية أو خلايا نقي العظم

d. دمج خلايا جذعية وخلايا سرطانية مخبريا أدى لتشكيل خطوط خلوية بمواصفات سرطانية وجذعية وتظهر مقاومة عالية للعقاقير الطبية

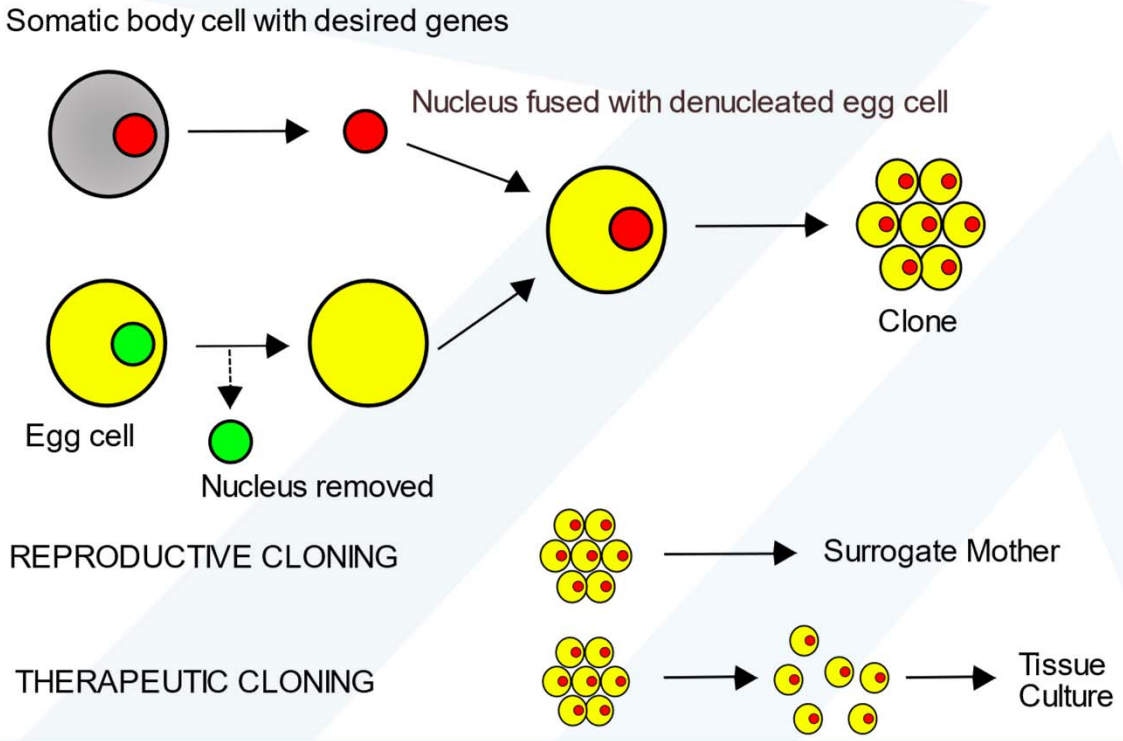
Cell fusion applications

- **Nuclear transfer for transgenic development**

The technique of nuclear transfer allows the reconstruction of an embryo by the transfer of genetic material from a single donor cell, to an unfertilized egg from which the genetic material has been removed.

- تسمح هذه التقنية بإعادة تصميم جنين من خلال نقل مواد وراثية من خلية متبرعة وحيدة إلى بيضة غير مخصبة منزوعة المادة الوراثية

Nuclear transfer for transgenic development



تقانة الامتصاص المباشر لـDNA DNA Direct Uptake

- عندما نتحدث عن هذه التقانة يجب التمييز بين مفهومين:

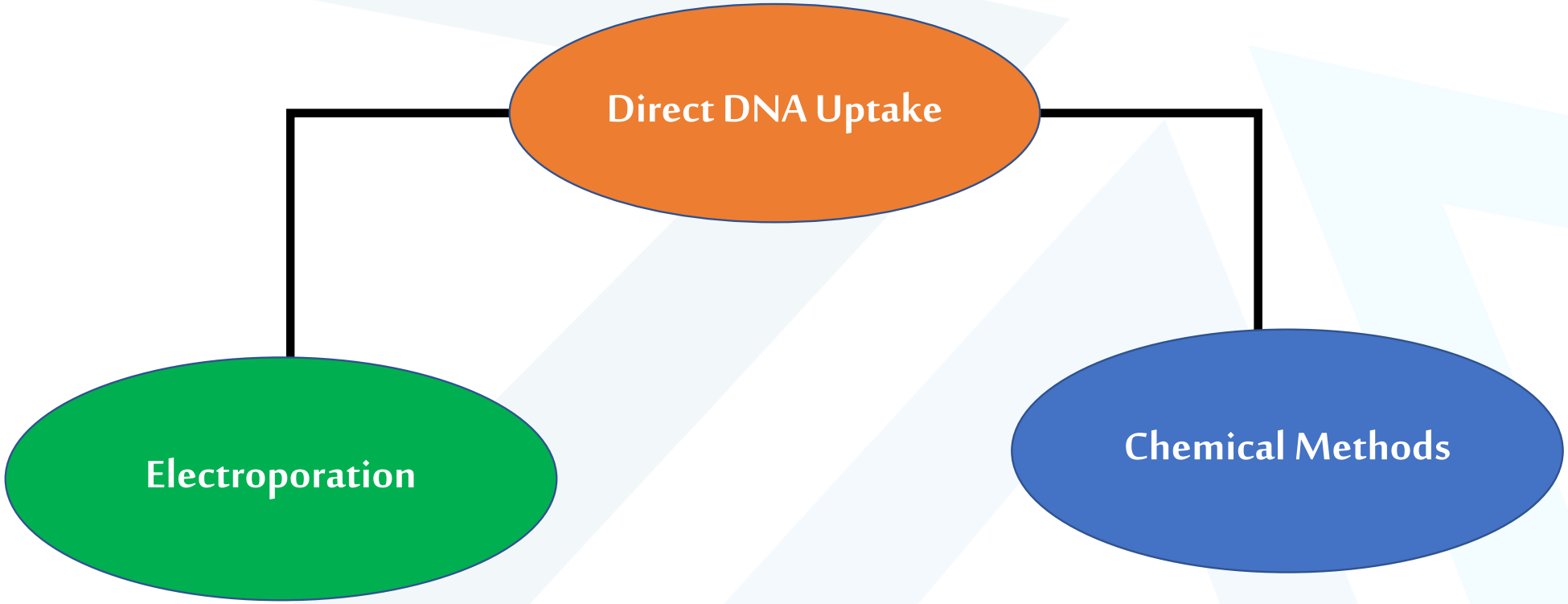
1. **Transformation**

عملية إدخال DNA غريب إلى خلايا بدائيات النوى

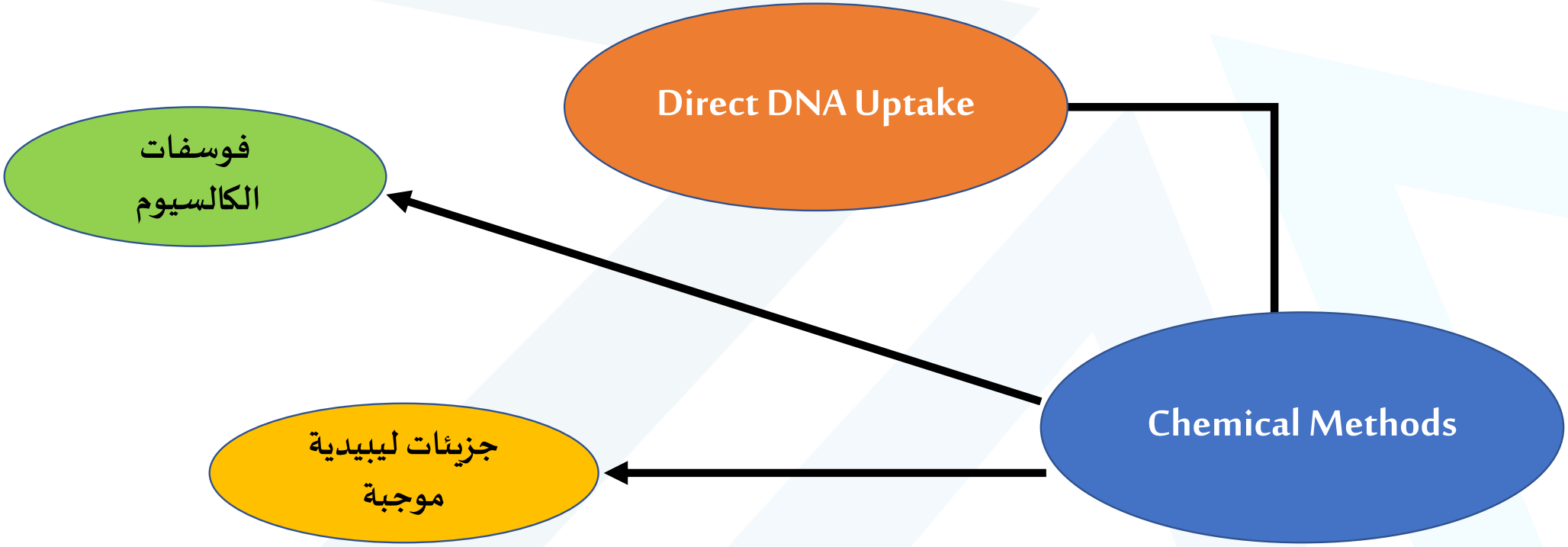
2. **Transfection**

عملية إدخال DNA غريب إلى خلايا حقيقيات النوى

تقانة الامتصاص المباشر لـDNA

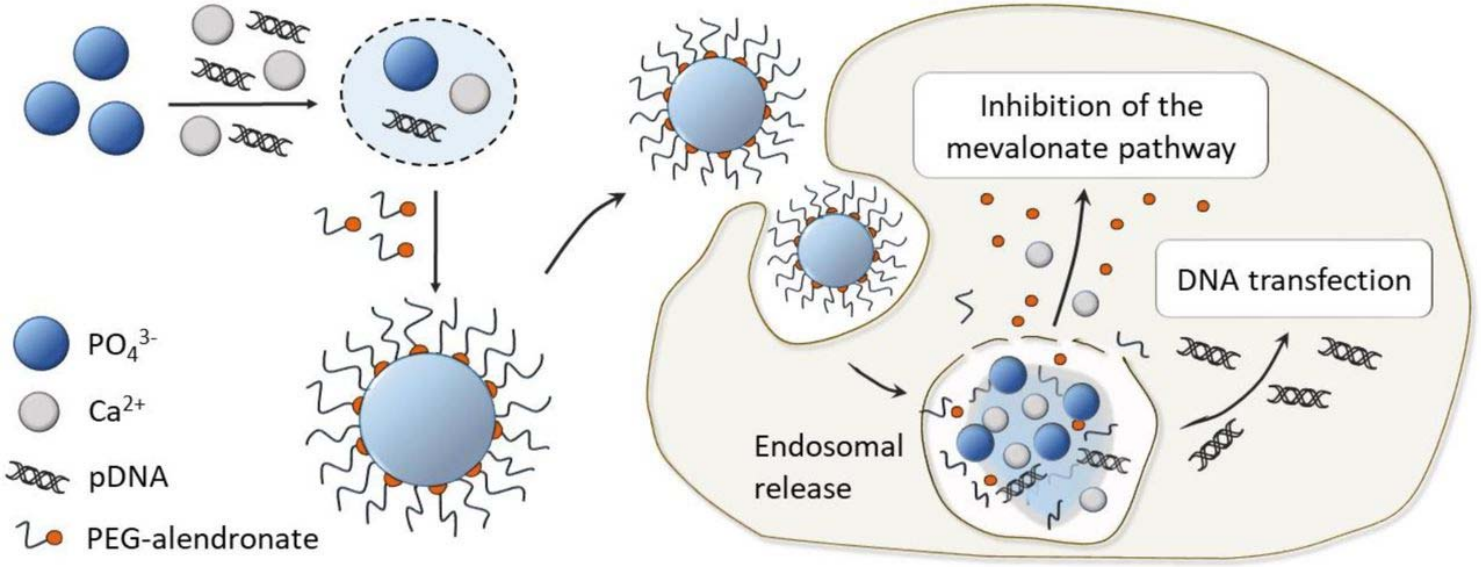


تقانة الامتصاص المباشر لـDNA



Calcium phosphate transfection

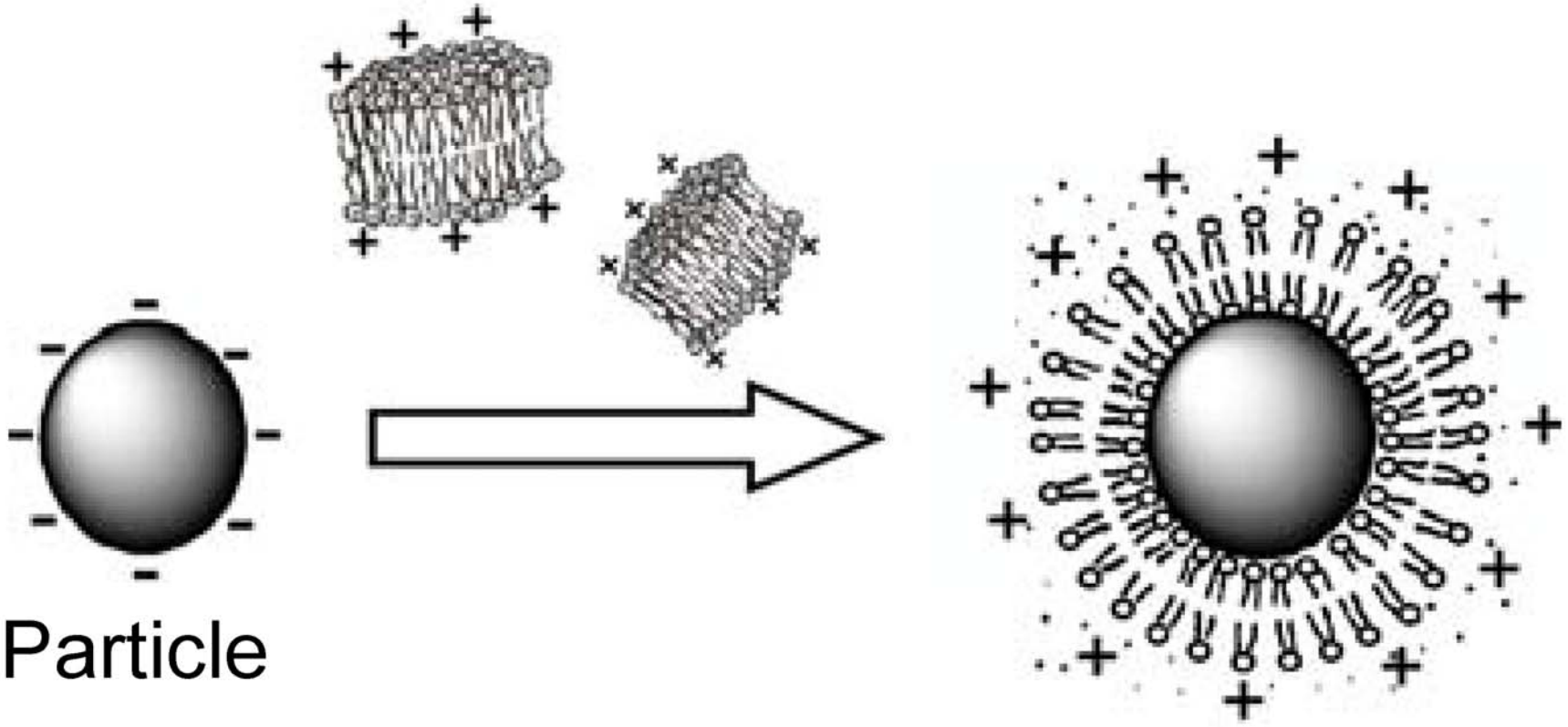
يشكل الدنا المؤشب معقد مع فوسفات الكالسيوم هذا المعقد يغلف الدنا وله شكل بلوري إبري عند وضعه على تماس مع الخلايا تقوم ببلعمته **Phagocytosis** بعد دخوله إلى السيتوبلاسما يتحلل الغشاء السيتوبلاسمي للحويصلة المبلعمة **phagosome** بواسطة الجسيمات الحالة وتتحرر مكوناتها ضمن الخلية مما يؤمن وصول الدنا إلى داخل الخلايا



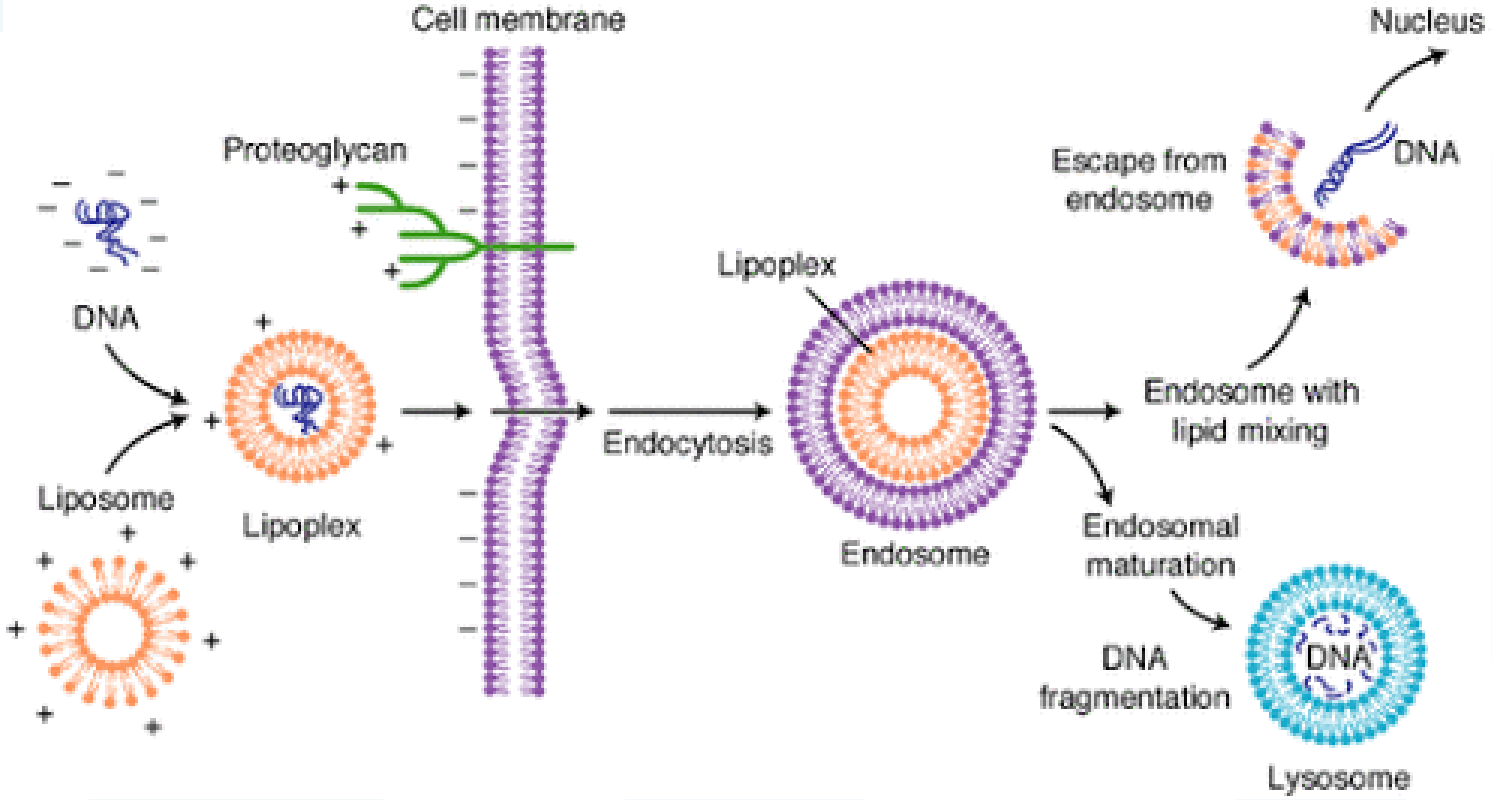
Issues of calcium phosphate transfection

- أقدم الطرق المستخدمة لإدخال دنا غريب إلى الخلايا
- قليلة الكلفة مع إمكانية تجهيز كل المواد مخبريا
- تعتبر خطيرة على الخلايا, تسبب البلورات أذية لقسم كبير من المزرعة الخلوية
- ذات سمية عالية
- كفاءة منخفضة **low effeciency**

How can this issue be resolved?



Cationic lipids mediated transfection



Cationic lipids advantages

- الطريقة الأكثرل شيوعا عالميا لإدخال الجزيئات التالية إلى الخلايا

plasmid DNA, antisense oligonucleotide, and RNA interference (RNAi) molecules

- تتميز بكفاءة عالية نسبيا
- سمية ضعيفة

Transient and stable transfection

Transient transfection

Cells express the foreign gene

Cells do not integrate foreign gene into their genome

New gene will not be replicated.

For studying the effects of short-term expression of genes or gene products, or protein production on a small scale

Stable transfection

Cells express the foreign gene

Cells integrate foreign gene into their genome

New gene will be replicated.

Long-term gene expression

protein production on a large scale, longer-term pharmacology studies, gene therapy or research on the mechanisms of long-term genetic regulation.

Begins with a transient transfection and followed with selection process of transfected cells

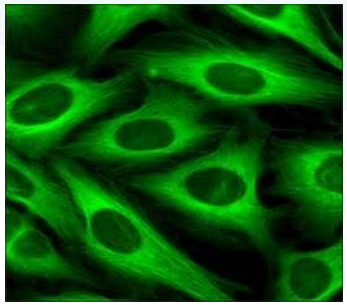
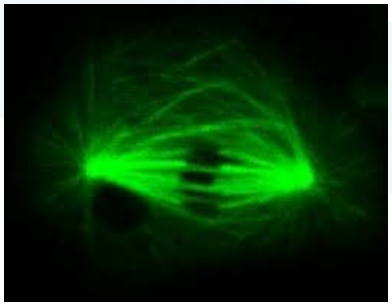
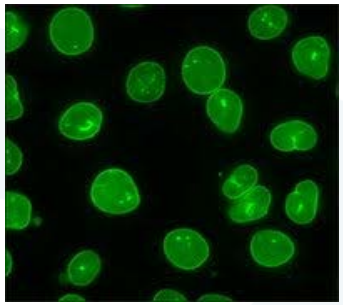
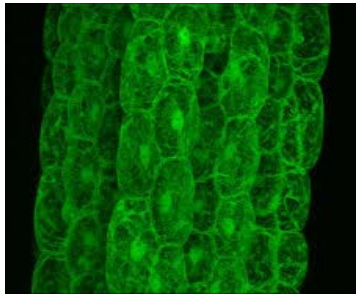
تقييم كفاءة إدخال DNA غريب إلى الخلايا

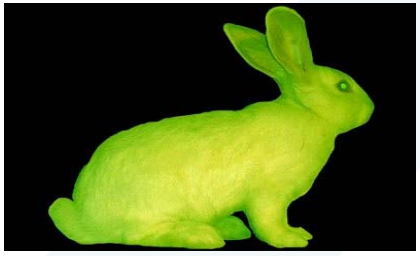
- أهم المعايير المستخدمة هو البروتينات الفلورية الخضراء

(GFP) **G**reen **F**luorescent **P**rotein

بروتينات تتكون من 238 حمض أميني وتشع بلون أخضر فلوري عند تعرضها لضوء أزرق اللون. تتواجد هذه المادة في الكثير من الأحياء البحرية وبشكل خاص في قنديل البحر من نوع إيكووريا فكتوريا. تم اكتشاف هذا البروتين و عزله عام 1962 و لكن بدأ علماء البيولوجيا باستخدامه في التجارب الحيوية و التقانات الوراثية في التسعينيات من القرن الماضي.

البروتينات الفلورية الخضراء من أهم المواد المستخدمة في مجالات العلوم الحيوية الحديثة، حيث تستخدم لمراقبة عمليات نمو الخلايا العصبية في المخ، وكيفية انتشار الخلايا السرطانية



Monkey

NFP-1

التقانة الحيوية
Biotechnology
المحاضرة السابعة

د. صفاء دلا

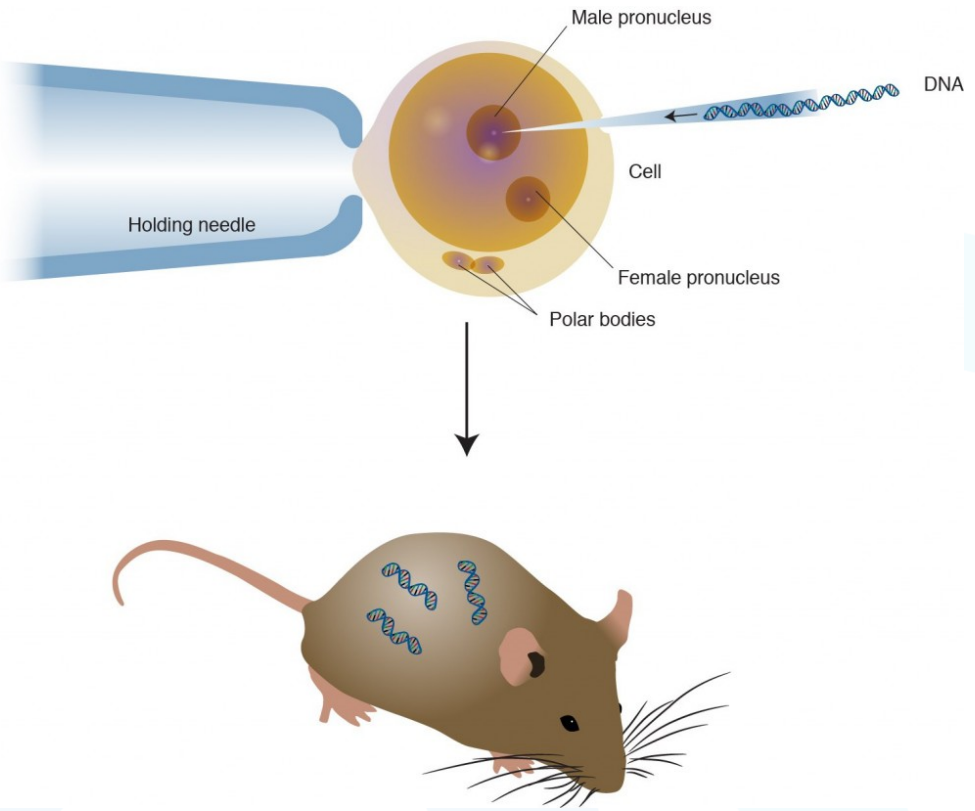
Genetic engineering and Transgenic Organisms

- Genetic engineering: Modifying the genomes of living organisms
- Genes of one species can be modified, genes can be transplanted from one species to another, or somatic cell nuclear can be transferred
- Genetic engineering is made possible by recombinant DNA technology
- Organisms that have altered genomes are known as **genetically modified organisms**

Genetic engineering and Transgenic Organisms

Transgenesis: is the process of introducing a gene (referred to as a transgene) from one organism into the genome of another organism. The aim is that the resulting transgenic organism will express the gene and exhibit some new property or characteristic.

- Most transgenic organisms are generated in the laboratory for research purposes
- Transgenic organisms have also been developed for commercial purposes



Examples of transgenic organisms with commercial value

Vaccine producing bananas

Vaccine for hepatitis B virus (HBV)

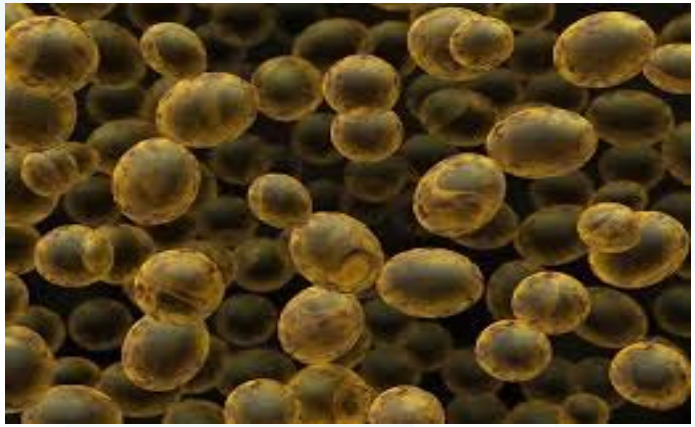
Golden rice

produces beta-carotene

Examples of transgenic organisms with commercial value

Goats that produce important proteins in their milk

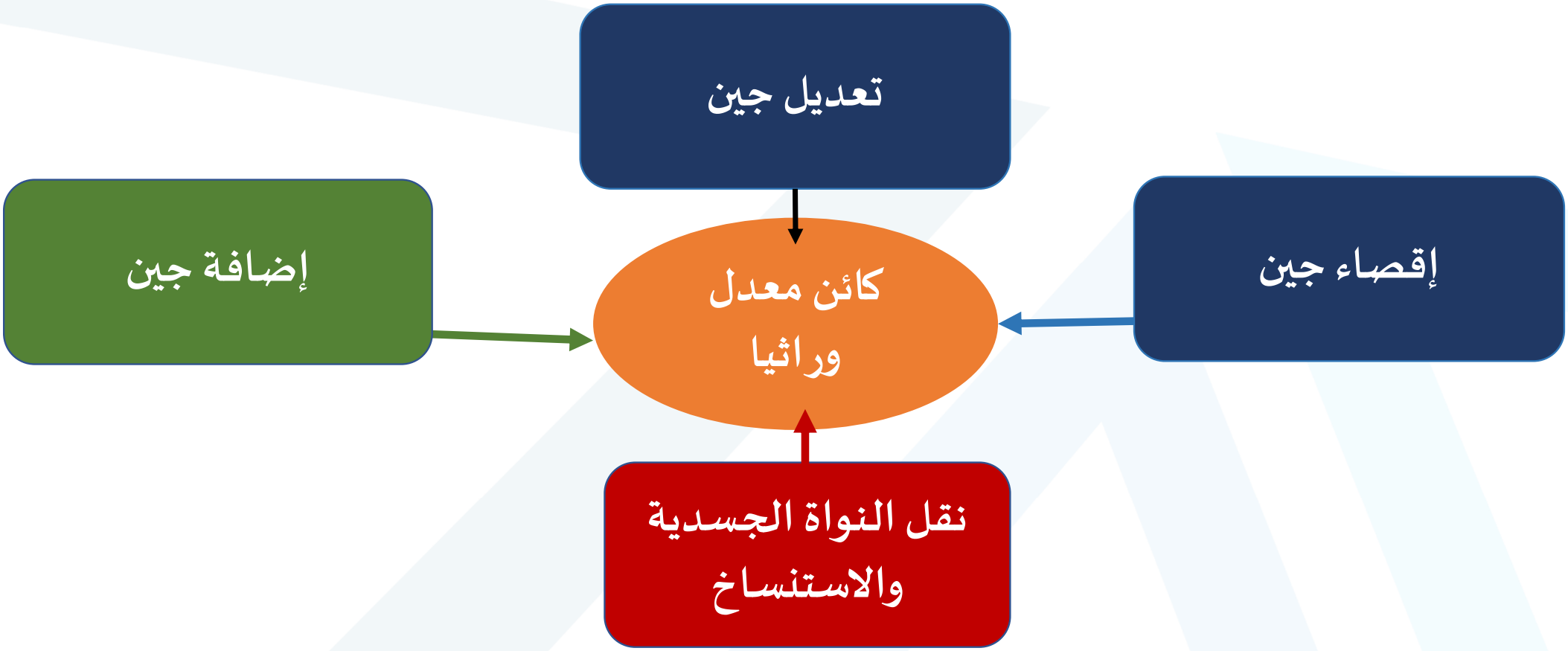
Human antithrombin, Growth hormone, Insulin, Spider silk



Chymosin producing microorganisms

Modified to produce the enzyme chymosin, which splits milk to make cheese

كيفية الحصول على كائن محوروراثياً؟



إقصاء جين

- **الهدف من هذه التقانة:**

1. الحصول على نماذج حيوانية يلغى فيها التعبير عن البروتينات التي ترمزها هذه الجينات
2. دراسة تأثير إقصاء الجين في النمط الظاهري للكائن الحي
3. استقراء وظيفة الجين في حال كانت الوظيفة مجهولة أو غير محددة بدقة

الخطوات المتبعة لإقصاء جين في الفأر

- تضخيم الجين المراد إقصاؤه بتفاعل PCR واستخدام مشارع نوعية للجين
- غرس تتالي جين يرمز بروتين مقاوم لأحد الصادات الحيوية (النيومايسين) داخل تتالي الجين المراد إقصاؤه مما ينتج عنه تعطيله
- تنقل الجين المعطلة في المختبر إلى خلايا فأرية جنينية:

1. تتداخل مع تسلسل الجين الأصلي الموجودة في مجين الخلايا بواسطة التأشيب المتماثل (Homologous Recombination)
2. ينغرس الجين المعطل مكان الجين الأصلية

- انتقاء الخلايا الجنينية التي نجح فيها انغراس الجين المعطل مكان الجين الأصلي (الخلايا إيجابية الانغراس)
- حقن الخلايا إيجابية الانغراس في جنين فأر آخر لتتطور إلى خلايا وأنسجة لا تعبر عن منتج الجين المعطل

إضافة جين

- **ماهو الهدف من التقانة؟**

❖ دراسة وظيفة جين بشرية ما بإضافة هذا الجين إلى مجين حيوان آخر واستقراء النتائج على النمط الظاهري للحيوان

❖ إضافة جين غريب معروفة الوظيفة لمجين كائن آخر بغرض التجريب على وظائف هذا الجين أو الانتاج

- **ماهي خطوات هذه العملية؟**

1. تحقن قطعة من الدنا البشري حاوية على الجين المراد إضافته داخل طليعة النواة للنطفة أو البويضة قبل اندماج طليعتي النوى وتشكيل الزيجوت
2. تنقل الزيجوت إلى رحم فأرة أم بديلة وينمو الجنين لتكون نحو 30% من الذرية إيجابية تعبر عن الجين البشرية

- **ماهو المثال الشائع لهذه التقانة؟**

إضافة جين هرمون النمو البشري إلى الفأر

- **ماذا يسمى الفأر الذي تلقى جين غريب؟**

Transgenic Mouse

نقل النواة الجسدية والاستنساخ

- **متى كانت بداية محاولات عمليات الاستنساخ وماهي هذه التجارب؟**

بدايات القرن العشرين من قبل العالم الألماني هانز سبيمان.

التجربة كانت نقل نواة إحدى خلايا القسيم الأرومي الجنيني لجنين الضفدع إلى خلية منزوعة النواة. عملية النقل هذه أدت إلى تطور الخلية التي اكتسبت النواة لتعطي شرغوفا سليما.

- **ماهي النتائج المطورة لعملية الاستنساخ؟**

كانت عام 1996 من قبل العالم إيان ويلموت بإنتاج حيوان ثدي بطريقة نقل نواة الخلية الجسمية Somatic cell nuclear transfer (SCNT)

- **ماهو تصنيف عمليات الاستنساخ من حيث تطبيقاتها العملية؟**

1. الاستنساخ التكاثري Reproductive cloning: إنتاج كائن حي تعرف صفاته الوراثية بشكل مسبق
2. الاستنساخ العلاجي Therapeutic cloning: إنتاج خلايا جذعية جنينية معروفة الصفات الوراثية يمكن تحريض تمايزها إلى خلايا ونسج تفيد في الطب التجديدي Regenerative medicine

الاستنساخ التكاثري Reproductive cloning

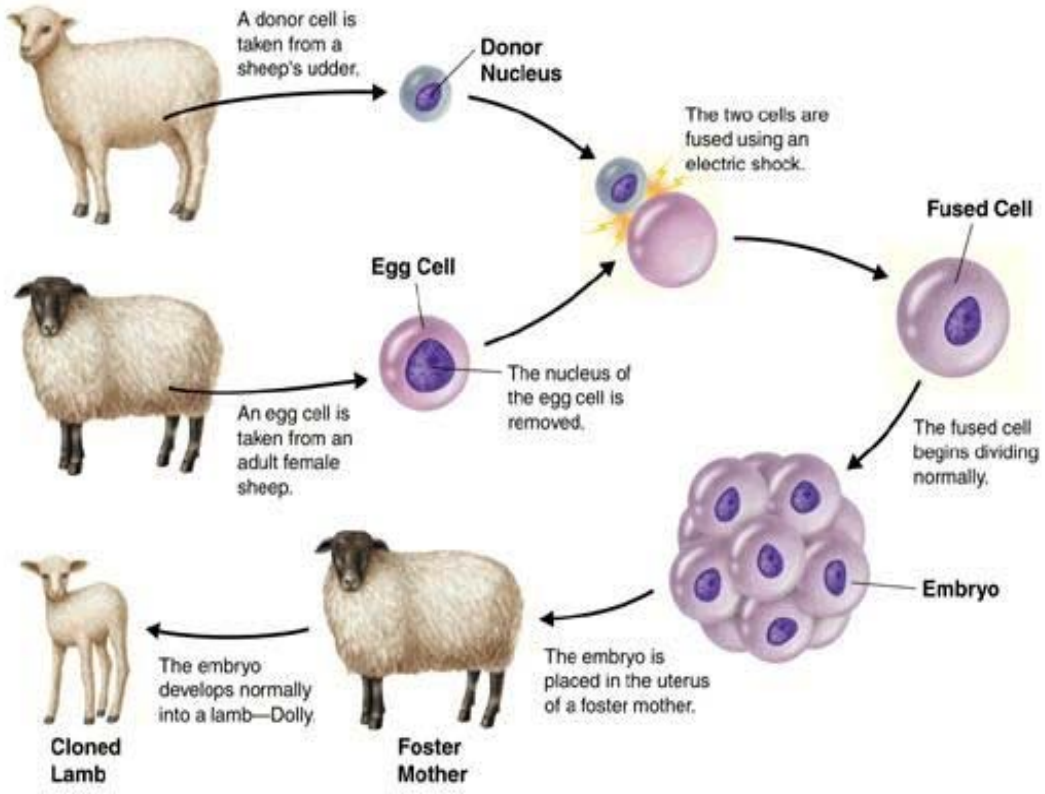
- **ماهي الخطوات المتبعة في استنساخ النعجة دولي؟**

1. استزراع خلايا ظهارية من الغدد الثدية للنعجة الأم من فصيلة أغنام تسمى **Poll Dorsets بيضاء لون الوجه**
2. اختيار إحدى الخلايا المستزرعة وسحب **النواة** منها
3. الحصول على **خلية بيضية سحبت نواتها** لأغنام من فصيلة أخرى تسمى **Scottish Blackface سوداء لون الوجه**
4. من خلال عملية الاندماج الخلوي تم **صهر النواة من الخلية الثدية مع الخلية البيضية منزوعة النواة** يتم حقن النواة داخل الخلية البيضية
5. تنتج خلية هجينة بنواة وهيولي من فصيلتين مختلفتين من الأغنام

هذه الخلية تطورت وانقسمت بتوفير الظروف الملائمة حتى شكلت **الكيسة الأريمية Blastocysts**

6. نقلت هذه **الكيسة** إلى رحم أم بديلة Surrogate mother **لأنثى من فصيلة Scottish Blackface**
7. بعد حدوث الحمل عند هذه الأنثى ولدت **النعجة دوللي ذات الوجه الأبيض**

الاستنساخ
Cloning



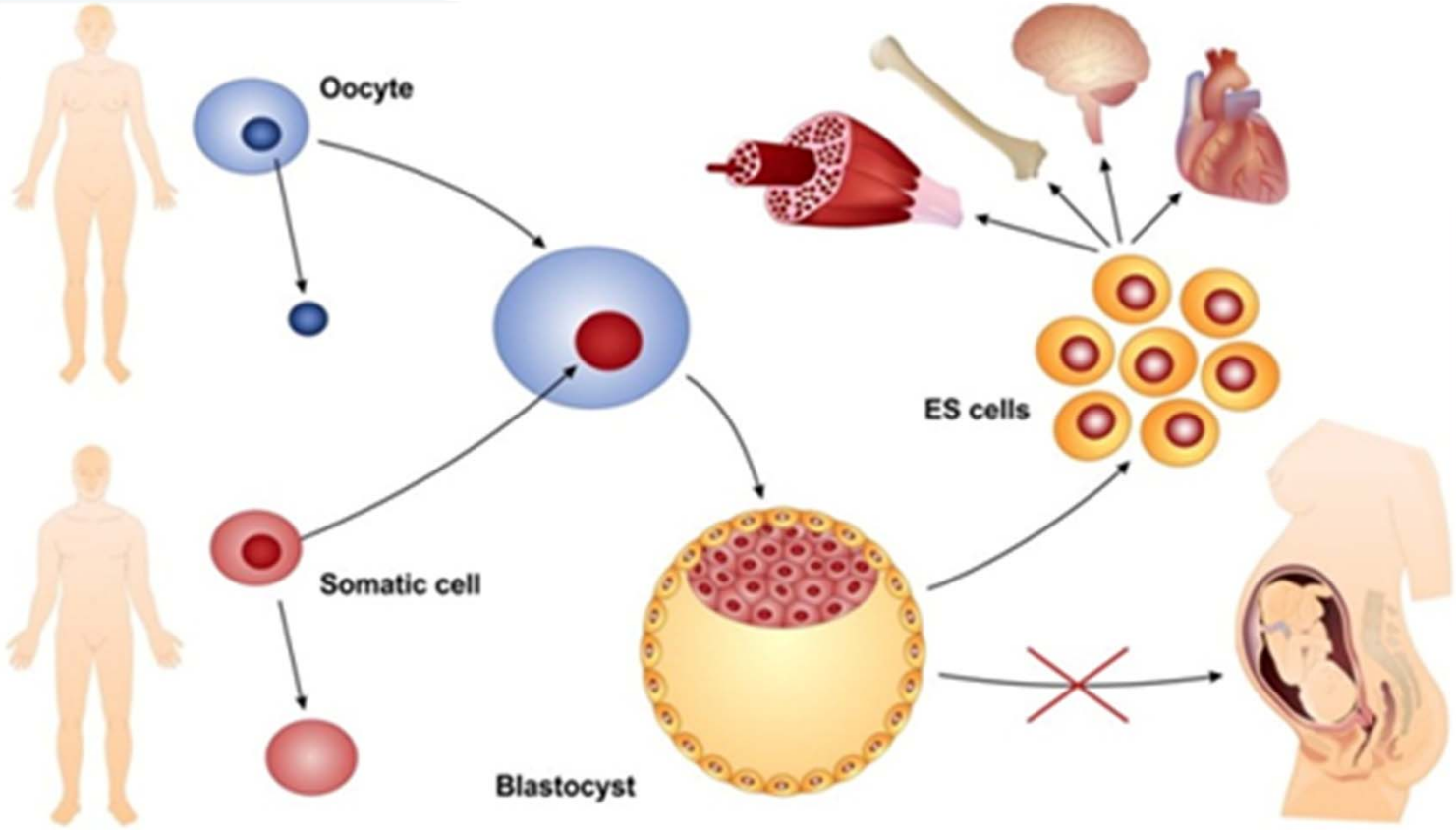
الاستنساخ العلاجي Therapeutic cloning

- **إنتاج خلايا جذعية جنينة بصفات وراثية معروفة مسبقا**

خطوات هذه التقانة:

1. تؤخذ خلية جسمية بشرية معروفة الصفات الوراثية في الطور الخلوي G0
2. تنزع نواة الخلية السابقة وتزرع في خلية بيضية منزوعة النواة
3. تتطورالخلية الهجينة لتصل إلى مرحلة الكيسة الأريمية
4. تشتق الخلايا الجذعية الجنينية Embryonic stem cells من الكيسة الأريمية
5. هذه الخلايا يمكن تحريضها لتتمايز إلى خلايا ونسج يمكن أن تستخدم في تجديد النسج لدى نفس الشخص المعطي للخلايا الجسمية

الاستنساخ العلاجي....



الصيدلة الجينية Gene Pharming

- **هي إحدى التطبيقات المهمة في عالم تصنيع الدواء في الكائنات الحية من خلال دمج تقانتي إضافة الجينات ونقل النواة الجسمية معا**

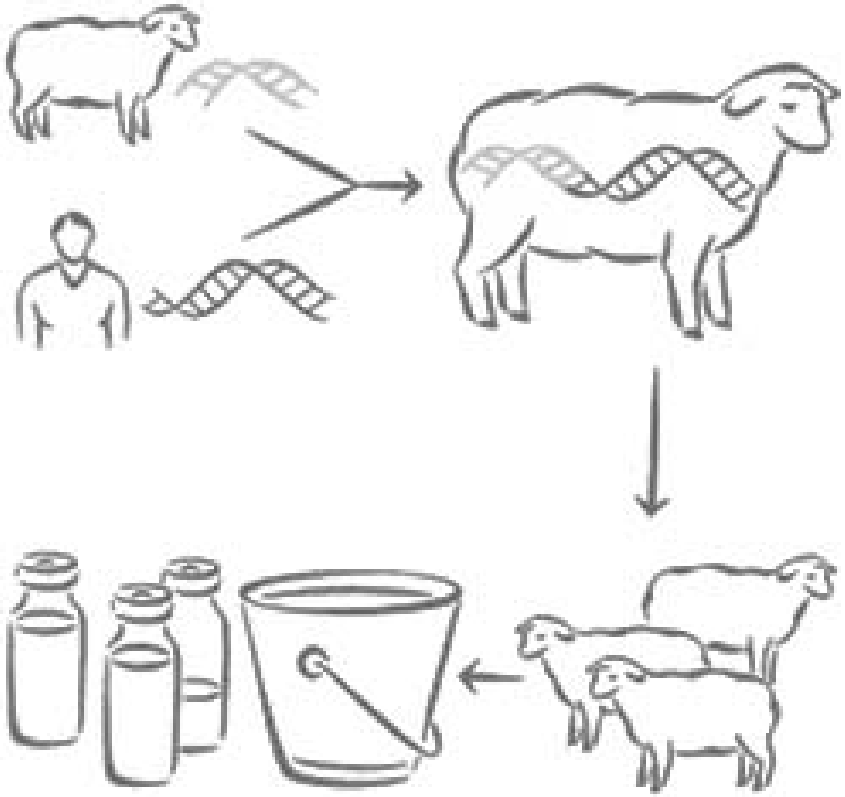
- **مثال عن هذه التقانة:**

إنتاج هرمون النمو البشري وجمعه في حليب الماعز عبر توليد أنثى ماعز Transgenic تعبر عن جين هرمون النمو البشري ثم استنساخها بنقل بعض من نواها الجسدية إلى بيوض منزوعة النوى

خطوات إنتاج هرمون النمو البشري في حليب الماعز

1. تحرير جين هرمون النمو من الدنا البشري
2. حقن جين هرمون النمو بشكل مجهري في نواة إحدى البيوض المخصبة للماعز
3. يتم تطوير البيوض الملقحة والمعدلة وراثيا لتشكل جنين
4. ينقل هذه الجنين إلى رحم أم بديلة
5. بعد الحمل والولادة تنتج ماعز معدلة وراثيا تفرز هرمون النمو في حليبها
6. يتم جمع بروتين هرمون النمو وتنقيته من الحليب لاستخدامه كدواء
7. **يتم استنساخ الماعز المعدلة وراثيا والتي تعبر عن هرمون النمو بنقل نواتها إلى بيوض مخصبة منزوعة النواة مأخوذة من ماعز معطي Donor لاستنساخ عدد كاف من الماعز المحورة وراثيا و إنتاج كمية كافية من هرمون النمو**

Biotech gene pharming



إنتاج بروتينات تستخدم في الصناعة باستخدام الماعز المحورة وراثياً

- إنتاج خيوط حرير العنكبوت Spider Silk عبر التعبير الجيني عن جين حرير العنكبوت في الغدد الثديية لإناث ماعز معدلة وراثيا
- يتم جمع البروتين وتنقيته من الحليب
- يمكن الاستفادة من بروتين الحرير المأشوب في تصنيع بزات عسكرية مقاومة للرصاص
- هذا الحرير قساوته أعلى بخمس مرات من الفولاذ لذلك أطلق عليه الفولاذ الحيوي Biosteel

أحدث التقنيات المستخدمة في التعديل الوراثي على مستوى الجين In vivo

- CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)

- التكرارات العنقودية المتناظرة القصيرة منتظمة التباعد:
- هي جزء من النظام المناعي البكتيري
- نوع من تسلسلات دنا توجد في بدائيات النوى كالبكتيريا
- تستخدمها البكتيريا ضد العناصر الجينية الدخيلة التي يتعرض لها الكائن مثال : فيروس بكتيريوفاج

CRISPR

كريسبر كآلية دفاع:

- عندما يصيب البكتريوفاج الخلايا البكتيرية فإنه يحقن حمضه النووي داخل البكتيريا ليتكاثر داخل البكتريا بأعداد كبيرة قد تقتلها
- عندها تطلق البكتيريا أنزيمات لتقوم بجمع قطع من الحمض النووي لذلك لفيروس، ومن ثم تخزين تلك الشيفرة في أرشيف يدعى "كريسبر"
- عند تعرض البكتيريا لفيروس مماثل مرة أخرى، تقوم البكتيريا بنسخ الحمض النووي المخزن في كريسبر على هيئة RNA، يسمى crRNA
- يقترن crRNA ببروتين القطع cas9، يبحث عن تطابق بين جزء من الـcrRNA الذي يحمله وبين الحمض النووي الخاص بالفيروس.
- عند التعرف على الحمض النووي للفيروس يتم تحفيز cas9 قطع سلسلتي DNA الخاصة بالفيروس، مسبباً تدميره.

CRISPR

- سخر العلماء نظام كريسبر الموجود في البكتيريا ، للتعديل على الجينوم لأي نوع من الكائنات الحية،
- عن طريق قص جزء معين من الحمض الوراثي DNA الخاص بها بدقة لإزالة جينات مسؤولة عن إظهار صفة وراثية غير مرغوبة في الكائن الحي، أو استبدالها بجينات أخرى.
- هناك مكونان رئيسيان في نظام كريسبر- كاس9 وهما:
- بروتين cas9، أو CRISPR associated protein 9
- جزيء guide RNA

تطبيقات كريسبر-كاس9:

- العلاج الجيني لفيروس HIV

في عام 2017 ، نجح فريق من الباحثين الصينيين في زيادة مقاومة الفئران لفيروس نقص المناعة البشرية عن طريق تكرار طفرة في الجين الذي يمنع الفيروس بشكل فعال من دخول الخلايا.

تطبيقات كريسبر-كاس9:

عام 2018، قام عالم صيني يُدعى خه جيان كوي بتطبيقه للتقنية على خلايا أجنة بشرية وزرعها في رحم الأم قبل أن تولد الأجنة التوأم "لولو" و"نانا .

حيث قام بتعديل الشيفرة الوراثية الخاصة بهما لتصبحا مقاومتين لفيروس HIV المسبب لمرض الإيدز وذلك عن طريق استخدامه تقنية كريسبر في تعطيل الجين المنتج للمستقبل البروتيني CCR5 الذي لوحظ أن الأشخاص الذين تفتقر بنيتهم الوراثية إلى الشكل الوظيفي لهذا المستقبل ينزعون ليكونوا مقاومين بشكل غير اعتيادي لمرض الإيدز وفيروس HIV، ما أحدث ضجة كبيرة في الأوساط العلمية لأسباب أخلاقية.