معمل وراثة الأحياء الدقيقة
351 MIC

إعداد:
أ.أمل الغامدي

مثال من الهندسة الوراثية للأحياء الدقيقة

<u>الجنس وانتقال الصفات الوراثية فى البكتريا</u>

- **قبل عملية انقسام النهائي للخلية البكتيرية يتضاعف كروموسوم الخلية إلى نسختين متماثلتين ويذهب كل كروموسوم الى خلية بنوية جديدة ويختلف حجم هذا الكروموسوم حسب نوع الخلية البكتيرية حيث تمتلك بكتريا *Escherichia coli* كروموسوما له القدرة على تخليق 4000 مركب تقريبا إضافة الى الكر وموسوم فان بعض انواع البكتريا تمتلك اجزاء حلقية منفصلة من الحامض النووي DNA تستطيع تكرار نفسها بصورة منفصلة من الكر وموسوم وهي ليس لها اي دور في تضاعف وتكاثر البكتريا الاانها تكسب البكتريا صفات هامة كالمقاومة للمضادات الحيوية وإكساب البكتريا القدرة على تكوين الاسواط والأوبار .**

مثال من الهندسة الوراثية للأحياء الدقيقة

- **<u>انتقال المادة الوراثية من خلية بكتيرية الى خلية اخرى</u>**
- **ظاهرة التحويل transformation : انتقال حامض نووي يمتلك صفات وراثية الى خلية اخرى محدثا تغيرات وراثية في الخلية الجديدة. فينشأ عن ذلك تغيير الطراز الجيني للخلية أو الكائن الحي بنقل حمض نووي غريب Foreign DNA.**
- **ظاهرة التوصيل transduction : تشبه سابقتها غير انها تحصل بواسطة عامل مساعد قد يكون فيروسا**
- **ظاهرة الاقتران conjugation: وفيها تلتصق خليتان بكتيريتان مع بعضهما وتنتقل المادة الوراثية وذلك بمساعدة بلازميدات خاصة**

تجربة التحويل الوراثي
Transformation

1- تجربة عزل البلازميد البكتيري

2- تجربة تحضير الخلايا المستقبلة Competent Cells بطريقة كيميائية

3- تجربة الكشف عن الخلايا التي تم فيها التحويل الوراثي

التحويل الوراثي
Transformation

- يتم عن طريق البلازميد وهو كروموسوم (حمض نووي DNA) خارجي يتواجد في معظم الخلايا البكتيرية وبعض الخمائر.
- *معظم البلازميدات Plasmids حلقية الشكل circular وتختلف في الحجم والعدد داخل الخلية الواحدة.
- يتم تطويعها modified لاستخدمها كنواقل vectors للحمض النووي المعاد تكوينه recombinant DNA (rDNA) الهام في تطبيقات الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية.
- إن عملية تغيير الطراز الجيني genotype للخلايا أو الكائن الحي بنقل حمض نووي غريب foreign DNA تسمى بالتحول الوراثي Transformation.
- الحمض النووي المنقول قد يظل داخل الخلية كعنصر خارج الكروموسوم extra-chromosomal elements أو يتداخل مع الجينوم الخلوي Integrated .

تجربة عـــزل البـــلازميـــــــــد
Experiment: PLASMID ISOLATION
Extraction of Bacterial Plasmid DNA from *Escherichia coli*

الهدف

- عزل الحمض النووي منقوص الأكسجين البلازميدي plasmid DNA من خلايا بكتيريا القولون. يحتوي هذا البلازميد على جين المقاومة للمضاد الحيوي Ampicillin مثل البلازميد pUC 18.
- أمثلة على البلازميدات: bacteriophage lambda, pBR322, and pUC19
- plasmid DNA
- يحتوي البلازميد pUC18 على تتابع لجين Lac Z الذي يشفر إنزيم الجالاكتوسيداز b-galactosidase.

مبدأ العمل
:Principle

- يتم فصل البلازميد pUC18 من مزرعة نقية لخلايا بكتيريا القولون Escherichia coli بطريقة النحلل الخلوي بالمواد عالية القلوية Alkaline Lysis Method.
- تعتمد على تعريض معلق الخلايا البكتيرية إلى منظف عالي القطبية في وسط عالي القلوية مما يساعد على تحلل الجدار الخلوي وتشويه الحمض النووي الكروموسومي DNA والبروتينات المختلفة بينما ينطلق البلازميد سابحاً في الرائق supernatant.
- بالرغم من تعرض الحمض النووي الكروموسومي للتشوه denature نتيجة لوجود المحلول القلوي لا تتمكن البلازميدات الحلقية من الانفصال عن بعضها لأنها متداخلة ومتطابقة في الشكل.
- خلال عملية التحلل، يبقى كل من الحمض النووي الكروموسومي المشوه والبروتينات البكتيرية وبقايا الجدار الخلوي مشتركة في معقدات كبيرة مغلفة داخل المادة المنظفة من SDS. يتم ترسيب هذه المركبات جيداً عند استبدال أيونات البوتاسيوم بأيونات الصوديويم في محلول ترسيب البروتينات. بعد التخلص من المواد المشوهة بالترسيب والطرد المركزي يمكن ترسيب الحمض النووي البلازميدي plasmid DNA النقي من الرائق.
- يمكن استخدام طريقة المحلول القلوي بكفاء عند فصل البلازميد منكل سلالات بكتيريا القولون او حجم من المزرعة يتراوح بين 1 مل حتى 500 مل. حيث يكون البلازميد المفصول بهذه الطريقة خالي من الحمض النووي الكروموسومي.

ثانياً: تجربة تحضير الخلايا القابلة لاستقبال البلازميد
Experiment: PREPARATION OF COMPETENT CELLS

الهدف

- تحضير الخلايا المستقبلة* TOP 10 Competent cells بطريقة كلوريد الكالسيوم Calcium chloride.

المبدأ

- بالرغم من إمكانية حدوث التحول الوراثي طبيعياُ إلا أن خلايا بكتيريا القولون يجب معالجتها كيميائياً للتحول إلى خلايا قابلة لاستقبال الحمض النووي الغريب.
- تعرف الخلايا المستقبلة Competent بقابلية الخلية لاستقبال حمض نووي خارجي من الوسط الذي تنمو فيه هذه الخلية. يمكن حث هذه القابلية صناعياً بمعالجة الخلايا بمحلول من كلوريد الكالسيوم قبل إضافة الحمض النووي DNA للوسط.
- يقلل الكالسيوم من ثبات الغشاء الخلوي ويلتصق بسطح الجدار الخلوي مما يكون ثقوب تسمح بدخول الحمض النووي الغريب foreign DNA.
- تتم بزرع خلايا في مرحلة الطور اللوغاريتمي وتعريضها لكلوريد الكالسيوم في الحمام الثلجي.
- للبلازميد pUC18 (المفصول من التجربة السابقة).

ثالثاً: تجربة الكشف عن الخلايا التي تم فيها التحويل الوراثي

الهدف:

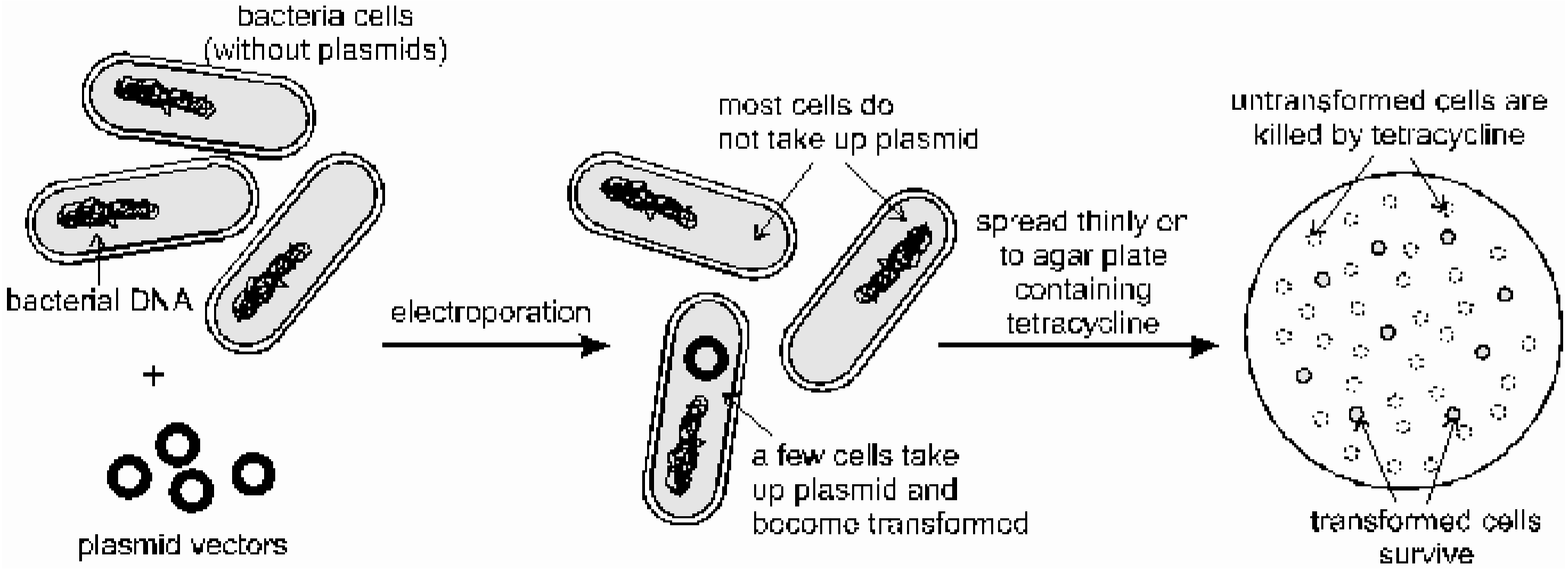
- تحويل (تعديل او تغيير) المادة الوراثية في الخلايا المستقبلة Competent cell مثل المحضرة مسبقاً (او TOP 10 cells) مع البلازميد المفصول ligated product of extracted plasmid(pUC18-λDNA ligated product).
-

ثالثاً: تجربة الكشف عن الخلايا التي تم فيها التحويل الوراثي

- المبدأ:
- الحمض النووي DNA المنقول قد يظل منفصلاً عن الحمض النووي DNA الكروموسوم -extra chromosomal elements للبكتيريا المستقبلة competent cell أو يندمج integrated كجزء داخل الجينوم.
- في هذه التجربة، سوف يتحول الطراز الجيني للبكتيريا الحساسة للمضاد الحيوي الأمبسلين (*E.coli* strain TOP10) إلى طراز جيني مقاوم للأمبسلين عن طريق نقل البلازميد الحامل لجين صفة المقاومة للمضاد الحيوي الأمبسلين (pUC18 plasmid). يتم انتخاب الخلايا البكتيرية التي يجري عليها التحويل الوراثي بزرع الخلايا على بيئة انتقائية selective تحتوي على المضاد الحيوي البنسلين.
- النواقل من نوع البلازميد pUC18 بها قطعة قصيرة من الحمض النووي DNA الخاص ببكتيريا القولون *E. coli* ، تحتوي على التتابع المشفر والمنظم لجين Lac Z الذي يشفر انزيم b- galactosidase.

ثالثاً: تجربة الكشف عن الخلايا التي تم فيها التحويل الوراثي

- كما تُستخدم مادة Isopropyl thiogalactoside (IPTG) كعامل محفز للتعبير الجيني لهذا الجين.
- يتفاعل إنزيم مع مادة التفاعل الصبغية 5-bromo-4-chloro- β-D-Galactoside (X-gal) وتعطي منتج أزرق اللون.
- يتشكل موقع للنسخ المتعدد MCS (multiple cloning site) داخل منطقة التشفير للجين Lac Z. تكون هذا الموقع لا يؤدي إلى تعطيل إطار قراءة التعبير الجيني reading frame وينتج عنه مجرد إدخال عدد من الأحماض الأمينية الإضافية في القطعة الطرفية للأحماض الأمينية للإنزيم b-galactosidase.
- وبالتالي، تظهر المستعمرات بلون أزرق في وجود مادة التفاعل الصبغية IPTG و X-gal.
- عند إدخال جين جديد لمنطقة النسخ المتعدد MCS فيصبح إدخال ضار للخواص الوظيفية للإنزيم b-galactosidase ولا يمكنه التفاعل مع X-gal وهكذا تظهر المستعمرات باللون الأبيض. ويعد هذا التفاعل اللوني البسيط يمكن استخدامه لمسح آلاف المستعمرات لتعريف الخلايا التي انتقل اليها البلازميد أو الحمض النووي الغريب فأصبح الحمض النووي بها معاد تركيبه Recombinant DNA.


bacteria cells
(without plasmids)
bacterial DNA
+
plasmid vectors
electroporation
most cells do
not take up plasmid
a few cells take
up plasmid and
become transformed
spread thinly on
to agar plate
containing
tetracycline
untransformed cells are
killed by tetracycline
transformed cells
survive

النتائج