بريك ٥ دقايق لتجديد النوايا☐
اذا الدنيا ليلة امتحان والساعة بعد ال١٢ فskip طبعاً وبترجعله بعد الامتحان

خاطرة

الأربعاء ٢٦/١٠/٢٠٢٢ ،اليوم الي بدأت فيه بتفريغ هالمحاضرة واليوم الي تعرض فيه زملائنا في جامعة الزرقاء للحادث المؤسف ورغم إنه المعظم أخذ الموضوع من منظور المواصلات الي بحاجة لتحسين وهو منظور صحيح تماماً ،لكن أنا كان إلي منظور مختلف شوي عن الموضوع ،كل إلي خطرلي أول ما شفت بوست بالخبر إنه شو كان راح يصير لو كنت أنا ،شولي كان راح يصير لو كنت في يوم من الأيام بخطط لعمل معين بالجامعة وأنا في طريقي ربنا إختارني من بين كل الناس لملاقاة وجهه الكريم وفي عز ما الواحد في هالموقف بكون محتاج لأي عمل يكون بميزان حسناته يأتوك بالعمل الي كنت مخطط تعمله في الجامعة، وتخيلت مقدار السعادة لو كان هذا العمل صالح وراح أنال أجره مع إني ما عملته وتخيلت موقفي لو كان هذا العمل معصية وراح أحاسب عليه شو ممكن يكون شعوري فعلياً كل أعمالي راح تكون بكفة والعمل هذا راح يكون في كفة ثانية ،مشان هيك لازم نستمر في تقويم المسار دائماً وتجديد النوايا تجاه أعمالنا هالحكي بخص فيه نفسي أولاً قبل الجميع كوني أحد الخطائين وفي لحظة في ٢٧ من رمضان الماضي ربنا كتبلي أكون مكانهم وأتعرض لنفس الموقف رغم إني كنت أكثر شخص مستبعده عني وفضلت كتابته في التفريغ عن البوست لأجل يضل موجود لأي شخص بفتح التفريغ في أي وقت .

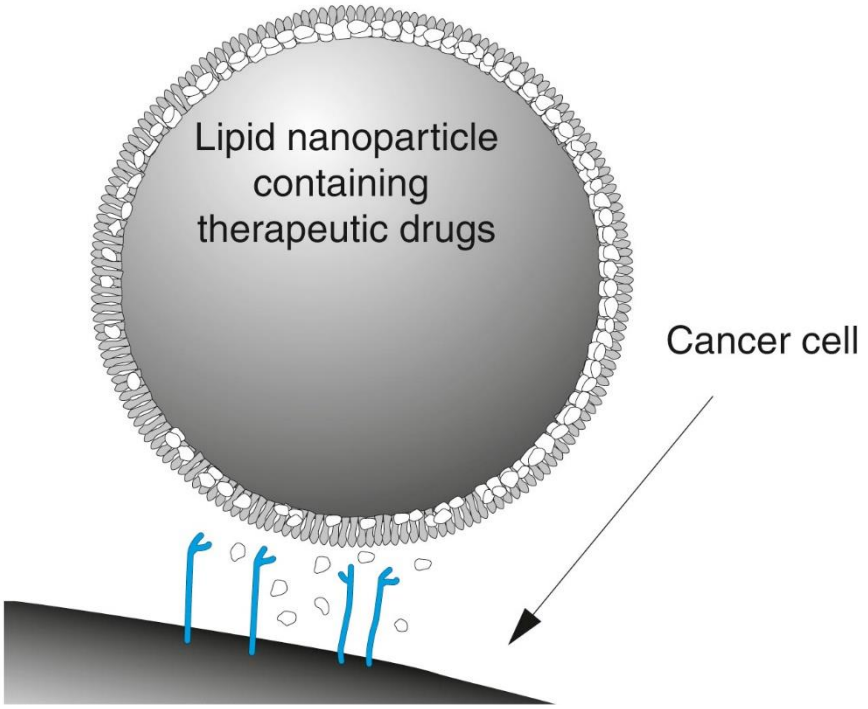
في النهاية ربنا يرحم زملائنا ويغفرلهم ويتقبلهم من شهداء العلم ويشفي مصابهم ونسأله تعالى أن يهدينا ويكتب لنا النجاح في حياتنا و يرزقنا حسن الخاتمة .

Biological Challenges of the 21st Century

- **How will medical biotechnology change our lives in the years ahead?**
  - **Nanotechnology**

بنستخدمها لما ما يكون بدنا الدوا يصيرله Penetration بالمعدة او لما بدنا نستهدف lipid or ironنسيج معين بتكون مغلفة ب
او شغلات ثانية

- Applications that incorporate extremely small devices
- Small particles that can deliver drugs to cells



Biological Challenges of the 21st Century

- **How will medical biotechnology change our lives in the years ahead?**
  - **Nanotechnology**
    - فكرتها بنغلف فيها الدوا زي الانسولين بما بدنا نعطيه بالفم بنعمله على شكل nanoparticles مشان ما يصيرله degradation من حمض المعدة فبنصير نقدر نعطي الانسولين بالفم وبنكون حلينا مشكلة الناس الي عندهم مشكلة مع الابر
    - فهي بتحسن ال drug delivery للأدوية

Biological Challenges of the 21st Century

- **Gene therapy technology**
  - Replacing or augmenting defective genes with normal copies of the gene
    - Still have barriers to overcome before this technology becomes safe and effective

بشيلوا الpathogenic part من dnaالفايروس وبحطوا بدالها ال dnaسليم وبنخلي الجزء كمان الي بدخله جوا الخلية وبربطه بال dna وبنحقن الفايروس وبدخل جوا الخلية وبحقن الdna في النواة وبعمل expression للجين الي بدنا اياه

* مش كل أنواع الفايروسات ممكن تستخدم في البيوتكنولوجي في أنواع راح نحكي عنها لقدام ما بنقدر نستخدمها

Biological Challenges of the 21st Century

- **Gene therapy technology**
  - Obstacles include:
    - How can normal genes be delivered to virtually all cells in the body?
    - زي ال cystic fibrosis في بكون مشاكل بالخلايا التنفسية والمعدة وبمناطق مختلفة بالجسم فاحنا بس بنقدر نعالج المشكلة الموجودة بالجهاز التنفسي بينما باقي الجسم بضل يلزم يسخدم الانزيمات الي بتقلل الزوجة
    - What are the long-term effects of introducing extra genes in humans?
    - زي الخضار المعدلة جينياً شو ممكن يكون تأثيرها على الجسم على المدى البعيد وغالباً الحين بضل حوا الخلية من ٦ -١٢ شهر وبعدين بنطرد
    - What must be done to ensure the proper protein is made after the genes are delivered to the body?
    - انا بس ادخل الجين في الخيلة هل خربلي جينات ثانية موجودة جواها ولا لاء هذا سؤال لازم ينسأل برضو

Biological Challenges of the 21st Century

- **Small interfering RNA (siRNA)** is emerging technology to silence genes that are involved in disease progression

- قطع RNA صغيرة
- زي الناس الي عندها جين مسؤول عن سرطان الثدي فبكون استعدادهم الوراثي اكثر من غيرهم فبدل ما يعملوا عمليات استأصال للاهم بربطوا الجين المسؤول عن السرطان عندهم بقطع الRNA هاي فببطل يصيرله expression
- لنفترض انه عنا جين "GTCAACD" فبعملوا RNA مكمل لهاض الجزء
- RNA CAGUUGC
- فبس يزرعوا ال RNAالمكمل لاله ببطل يصيرله expression

Biological Challenges of the 21st Century

- **Stem cell technology**
  - هي خلايا لما يصير damageلاي عضو بالجسم بتتمايز لتعوض الأذى الي صار بالعضو
  - هي موجودة عند البالغين كمان لكن مشكلتها عمرها قصير وما بصيرلها differentiation لجميع أنواع الخلايا عكس خلايا البيبي
  - Stem cells are immature cells that grow and divide to produce different cell types
  - Most stem cells are from embryos called embryonic stem cells (ESCs) but they are controversial since the process involves death of an embryo
  - Some stem cells are from adult cells (ASCs)
    - Either type of stem cell can be coaxed to grow into cells of interest to replace damaged tissue or failing organs (liver, pancreas, retina)

- **Embryonic vs. adult stem cells?**

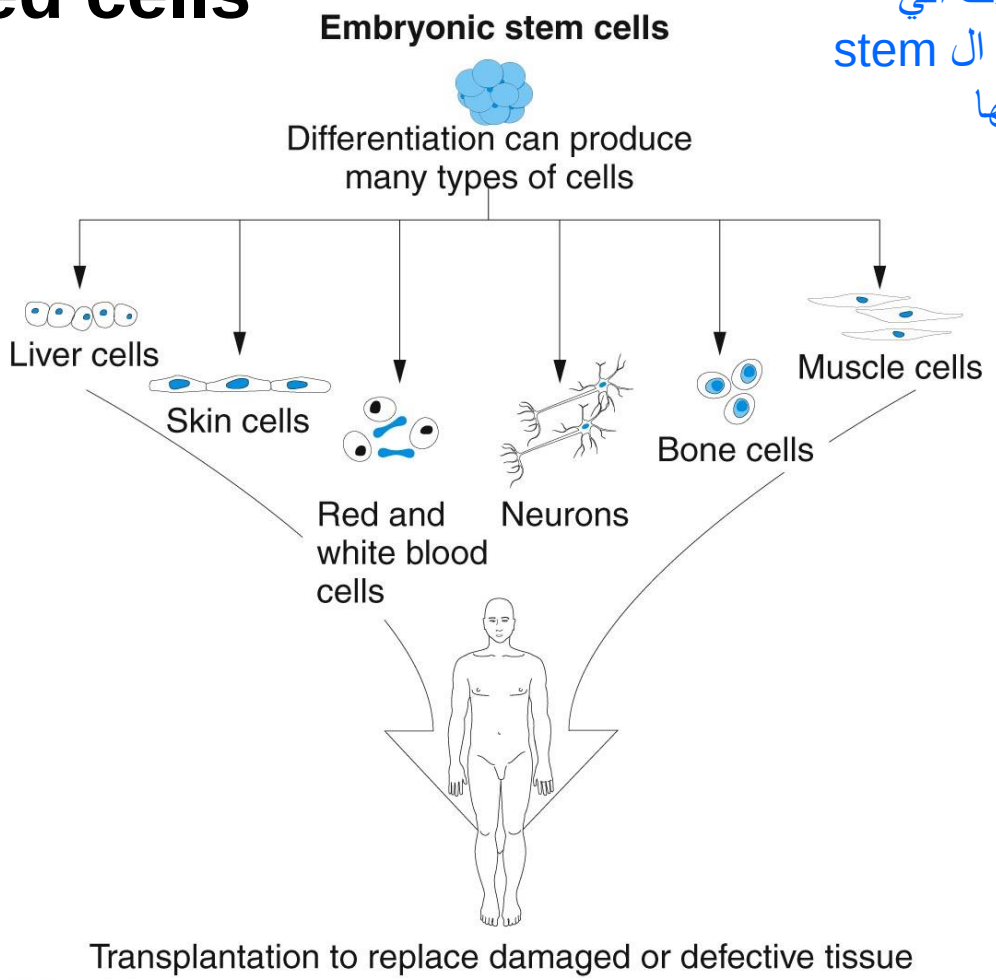
Biological Challenges of the 21st Century

- **Embryonic vs. adult stem cells?**
  - همة بوخذوا الخلايا من المشيمة وبزرعوها وبس يحتاجوا بضيفولها مواد مشان تتمايز لنوع الخلايا المطلوب خلايا كبد او بنكرياس او غيره بدل ما نوخذ أعضاء من متبرعين هالحكي بصير كله بالمختبر

Biotechnology in the 21st Century

- **ESCs can give rise to many types of differentiated cells**

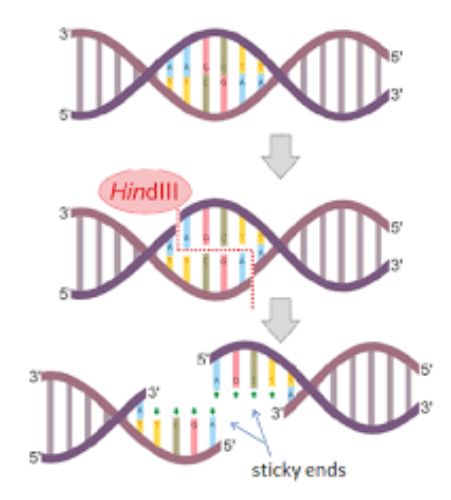
هاي الشغلات الي بنقدر نمايز ال stem cells لالها



بدونها ما في
بيتكنولوجي
ووجودها أحدث
ثورة بهالمجال

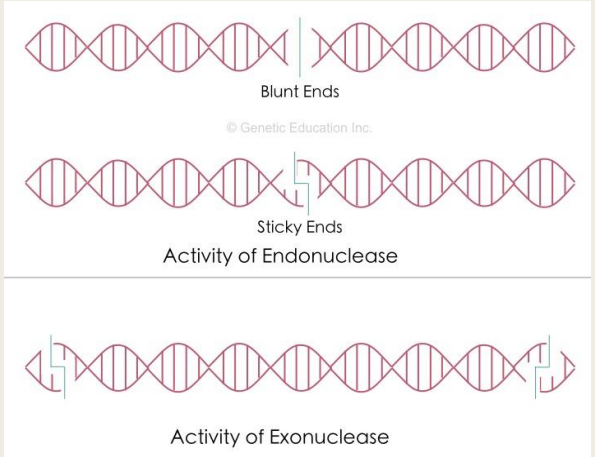
RESTRICTION ENDONUCLEASES

Dr. Iman Mansi



Restriction Enzymes

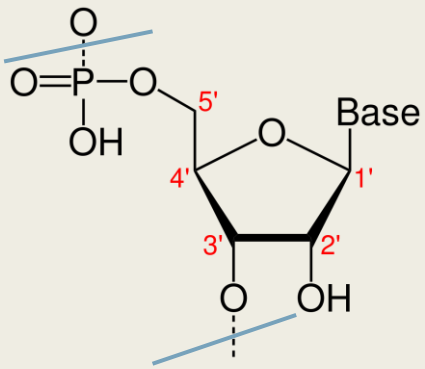
- Restriction enzymes are endonucleases **(Endo (inside), nuclease(cuts nucleic acid),** which catalyze the cleavage of the phosphodiester bonds within both strands of DNA.



الendonuclease هو لما ينقطع من جوا او منتصف ال sequence تبعه بينما الexonuclease لما ينقص على الأطراف الDNA

Restriction Enzymes

- They require Mg^{+2} or MgCl2 as co factor for activity and generate a 5 prime (5') phosphate and a 3 prime (3') hydroxyl group at the point of cleavage.



الشكل هذا مش موجد بالسلايد لكن ركزت عليه
الدكتورة فركزوا معي شوي فيه:
هسة ال DNAبكون مكون عنا من مجموعة من
الحلقات زي الموجودة على جنب، كل ذرة اوكسجين
موجودة على الـ3prime بتكون مرتبطة بذرةP موجودة
على 5prime من حلقة ثانية وبالتالي ذرة الP الي
على الـ5prime بالشكل المجاور مرتبطة بذرةO
موجودة على 3 prime موجودة على حلقة ثانية وهكذا
بهذا التسلسل حتى يتكون عنا DNA هسة المهم عنا
بالبيوتكنولوجي لما ييجي الانزيم يقطع بقطع من
المناطق الي عندها خط ازرق فذرة الP بتضل مرتبطة
بال 5prime وبتفصل عن ال 3prime

- The distinguishing feature of restriction enzymes is that they only cut at very specific sequences of bases. This specific DNA sequence is called **recognition sequence.**

recognition هاي الانزيمات ما بتقطع بشكل عشوائي بتقطع من مكان معين بنسميه sequence وبقص من عندها

- Restriction enzymes are traditionally classified according to the subunit composition, cleavage position, sequence-specificity and cofactor requirements.معظمهم الكو فاكتور الهم مغنيسيوم

- A restriction enzyme requires a specific double stranded recognition sequence of nucleotides to cut DNA.

- Recognition sites are usually 4 to 8 base pairs in length.

معظمهم بكون طولهم 6 base pairs

- Cleavage occurs within or near the site.

معظمهم القطع بصير عند او بجانب ال recognition site

Enzyme Activity

اول اشي بعمل الانزيم scanning forDNA
بس يوصل لGAATTC بقص بين الG andA
اذا بتلاحظوا بتلاقوا انه الtwo strans of dna
فيهم GAATTC ولكن معكوسات مشان هيك
بس يقطع الانزيم بطلع معنا زيادات بنسميها
الsticky ends راح نحكي عنها بعدين

Scanning

GGACGCTAGCTGAT**GAATTC**GCATCGGATCCGAATCCGCTCTTTCAA
CCTGCGATCGACTA**CTTAAG**CGTAGCCTAGGCTTAGGCGAGAAAGTT

Recognition Sequence

GGACGCTAGCTGAT**GAATTC**GCATCGGATCCGAATCCGCTCTTTCAA
CCTGCGATCGACTA**CTTAAG**CGTAGCCTAGGCTTAGGCGAGAAAGTT

Cleavage

GGACGCTAGCTGAT**G**
CCTGCGATCGACTA**CTTAA**

AATTCGCATCGGATCCGAATCCGCTCTTTCAA
GCGTAGCCTAGGCTTAGGCGAGAAAGTT

Biological Function

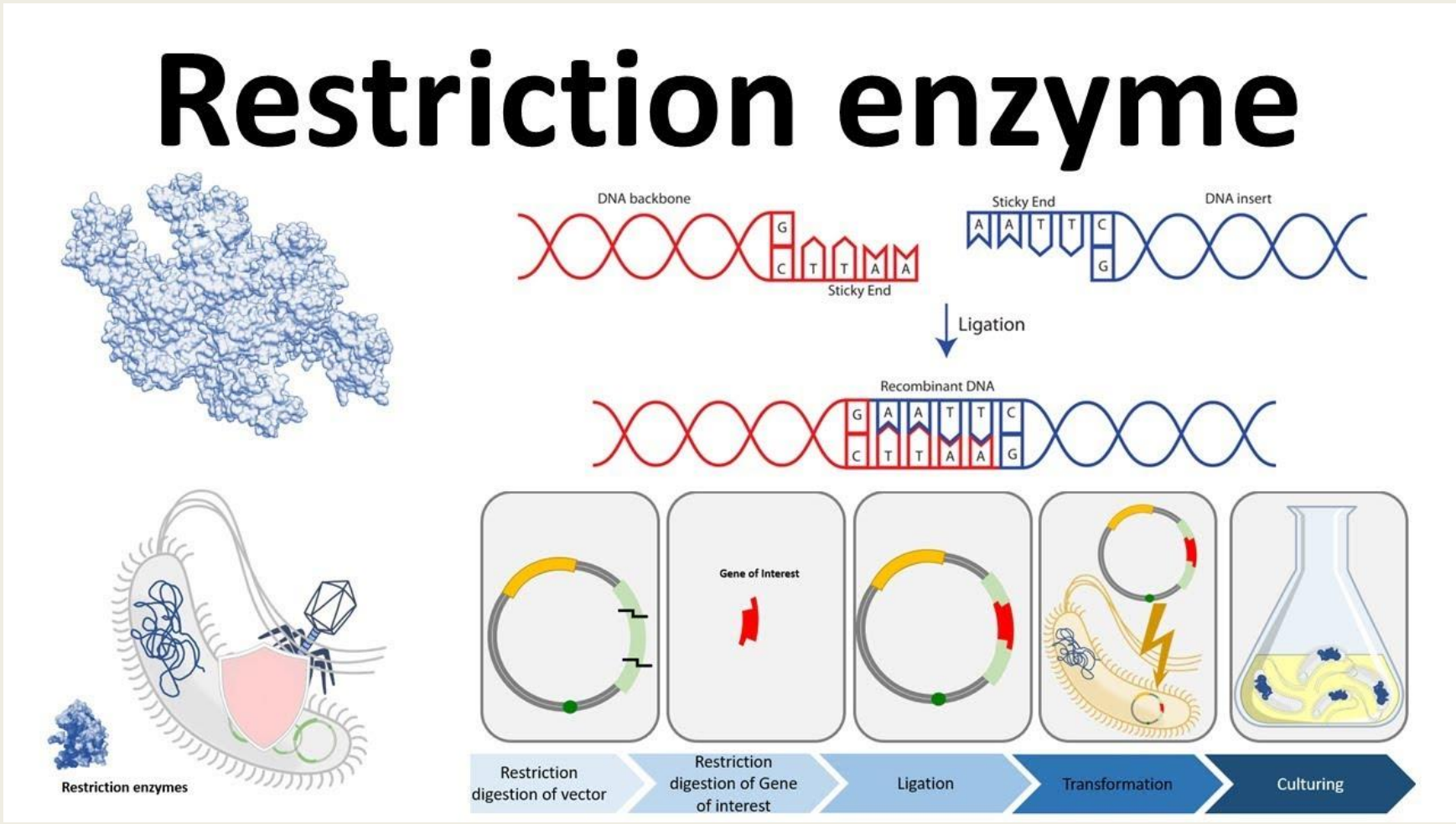
- Restriction enzyme is part of the cell's restriction-modification system in bacteria. لذلك هي اكتشاف مش اختراع
- The phenomenon of restriction modification in bacteria is a small scale immune system for protection from infection by foreign DNA.

اكتشفوا البكتيرياعندها ميكانيزم حماية لما يفوت عليها فايروس بتفرز انزيمات بتقطع الdna تبعه فبس اخذوا الانزيمات هاي وجدوا انه هذي الانزيمات بتقطع دايماً بنفس الrecognition site
ووجدوا كمان انه هاي البكتيريا مشان تحمي حالها من هاي الانزيمات فبس تفرز هاي الانزيمات بتفرز معها methylase بيعمل للmethylation recognition site الي حوا الحمض النووي للبكتيريا فبتبطل تتأثر بهاي الانزيمات بينما الفايروس بتكسر وهاي العملية مؤقتة لحد ما ينتهي هجوم الفايروس

Biological Function

- Bacteria can protect themselves only after foreign DNA has entered their cytoplasm (as bacteriphages).

Biological Function



Biological Role of RE

- Restriction Modification System -restriction enzymes are paired with methylases.
- Methylases are enzymes that add methyl groups to specific nucleotides within the recognition sequence. The methylation prevents recognition by the restriction enzyme.
- Therefore, the restriction enzyme within a cell doesn't destroy its own DNA. However the restriction enzyme can destroy foreign DNA which enters the cell such as bacteriophage.

Naming of Restriction enzymes

- Restriction enzymes are named according to the organism from which they are isolated.
- This is done by using the first letter of the genus followed by the first two letters of the species and additional letter or number represent the strain or serotypes.
- Only certain strains or sub-strains of a particular species may produce restriction enzymes.

Example of restriction enzymes

EcoRI	*Escherichia coli* R	G/AATTC
BamHI	*Bacillus amyloliquefaciens* H	G/GATCC
HindIII	*Haemophilus influenzae* Rd	A/AGCTT
PstI	*Providencia stuartii*	CTGCA/G
PmeI	*Psuedomonas mendocina*	GTTT/AAAC

Recognition Sequences

EcoRI	G/AATTC
BamHI	G/GATCC
HindIII	A/AGCTT
PstI	CTGCA/G
PmeI	GTTT/AAAC
HincII	GTY/RAC
FunII	G/AATTC

لاحظوا مكان القطع ممكن يكون من بداية الـrecognition site وممكن من المنتصف وممكن من الاخر اذا كان القطع من المنتصف بنسمي blunt واذا كان من الأطراف بنسميه sticky وهو الي بنفضل نستخدمه في البيوتكنولوجي

* EcoRIIIII كثير مستخدم بالبيوتكنولوجي مشكلته انه بعمللنا blunt end الدكتورة حكت سجلوها عندكوا لانه احتمال ييجي بالامتحان

 نفس مبدأ سؤال الكلينيكال الي عطتنا إياه في المحاضرة بونص

لاحظوا الـHincII في عنا Y and R الـY تمثل C orD والـR تمثل A orG

Digestion Conditions

بنحتاج مشان يعمل ال enzyme substrate الي هو بالحالة هون الdna الي بدي اقصه وبنحتاج كمان phمناسبةودرجة الحرارة المناسبة وال co factor

- XbaI
  - *Buffer 2: (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl2, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7.9 at 25°C.*
  - *100 µg/ml BSA*
  - *Incubate at 37°*
  - *لانه غالباً بستخلصوها من بكتيريا او خلايا حية فدرجة الحرارة المثالية الهم بين ال٣٧-٤٠*
  - *1 Unit digest 1 µg DNA in 1 hour*
  - *وحدة واحدة بتكون كافية بس احنا غالباً بنستخدم ١٠ اضعاف الكمية المطلوبة*
  - *Heat inactivate 65° for 20min*

Typical RE Reaction

20 µl reaction.

10 µl DNA (~1 µg total)

7 µl water

2 µl 10X reaction buffer

1 µl RE 10units/µl

Incubate 1 hour at appropriate temperature

Note:

1. 10 fold excess enzyme ensures complete digestion.
2. Enzyme should never exceed 1/10th of reaction.
3. BSA is often recommended because it stabilizes the enzyme.
   add 0.2 µl of BSA stock for 20 µl reaction.

- BSAبعمل stablization للانزيم وهو غير مستخدم لجسم الانسان
  لانه مستخرج من البقر غالباً بنستخدم HSA

1. For plasmid minipreps – add 1 µl RNase the last 5 min of digestion.

- لما يكون عنا plasmidمحطوط في DNA بنضيفله RNA مشان يصيرله purification ونتخلص من ال RNA . طبعاً الدكتورة بتحكي هالحكي على أساس انا عارفينه ♂□□ □ □

شرح ميكانيزم ال doublingفي السلايد الي بعده

Double Digest

Enzyme	Supplied NEBuffer	% in B1	% in B2	% in B3	% in B4
SacI	NEBuffer 1 + BSA	100	50	10	100
SacII	NEBuffer 4	25	75	10	100
SalI	NEBuffer 3 + BSA	0	0	100	0
SapI	NEBuffer 4	75	50	0	100
Sau3AI	NEBuffer 1 + BSA	100	50	10	100
Sau96I	NEBuffer 4	50	100	100	100
SbfI	NEBuffer 4	75	50	0	100

Double Digest Option

1. Mix the enzymes in the same compatible buffers
2. Conduct sequential digest

Caution: some enzymes display star activity in certain buffers which causes them to digest the DNA at sites other than the standard recognition site.

Double Digest

Enzyme	Supplied NEBuffer	% in B1	% in B2	% in B3	% in B4
SacI	NEBuffer 1 + BSA	100	50	10	100
SacII	NEBuffer 4	25	75	10	100
SalI	NEBuffer 3 + BSA	0	0	100	0
SapI	NEBuffer 4	75	50	0	100
Sau3AI	NEBuffer 1 + BSA	100	50	10	100
Sau96I	NEBuffer 4	50	100	100	100
SbfI	NEBuffer 4	75	50	0	100

معظم الشركات بتعطيك الbuffer الخاص بالانزيم بس تشتريه
النسب هاي بتمثل كمية الdna الي راح يصيرله digestion في ساعة واحدة .
هسة الفكرة انه غالباً احنا بنعمل combinationبين الbuffers لانه بدنا نقطع اكثر من مكان فبنحاول نختار ال bufferالي عنده اعلى نسبة من كل نوع فمثلاً لو بدنا نستخدم الانزيمين sacI and sacII بنوخذ الb4 كbuffer ولو بدنا نستخدم sacI and salI فعنا خيارين كا بنستخدم B3 وبنستنا وقت طويل ليقطع sacI او بستخدم B1 وبقطع sacI وباخذه على خطوة ثانية بحطه بB3 وبقطعلي salI بشكل كامل واحنا بنفضل نشتغل بهالطريقة لانه الانزيم لو قعد مع ال dna فترة طويلة بصير يقطع على جمب وطرف ببطل يميز الrecognition site

Many recognition sequences are palindromic

بمعنى انه الstrian الي فوق عكس ال strianالي تحت من 5-3

فوق هي نفسها من 5-3 تحت ولكن معكوسة

For example,

5’ GAATTC 3’
3’ CTTAAG 5’

palindromic: read the same in the opposite direction

Not all restriction endonucleases cut symmetrically and leave blunt ends Sticky and Blunt end cutters

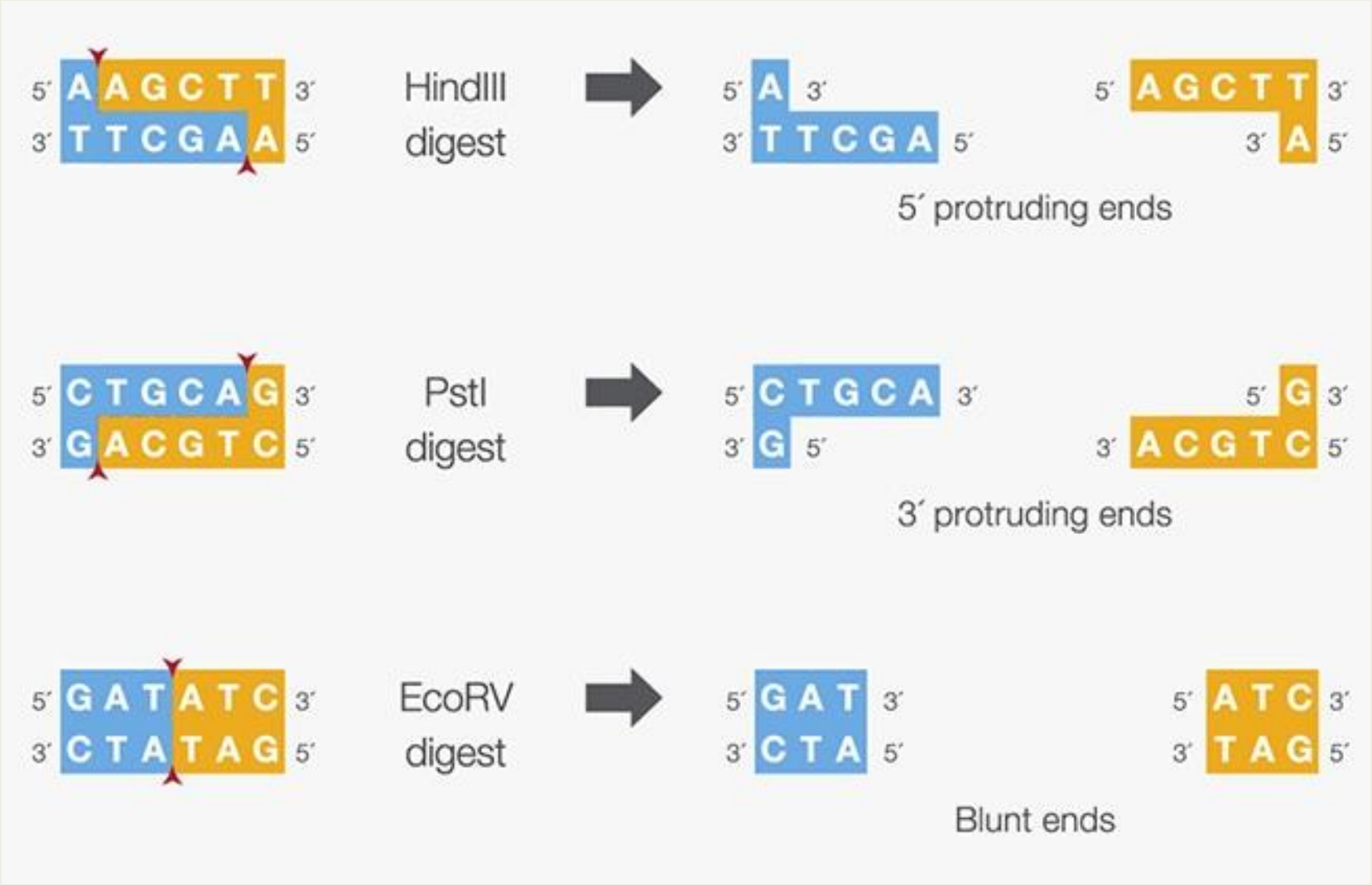
زي ما حكينا سابقاً انه ال blunt اصعب للربط والقطع مرة أخرى بانه ممكن يركبوا بطريقة خطأ فما يتعرف عليهم الانزيم

Many endonucleases cleave the DNA backbones in positions that are not directly opposite each other or can make staggered cuts, which produce single stranded “sticky-ends”

DNA from different sources can be spliced easily because of these sticky-end overhangs

ال sticky احسن لشغلنا لانه زي ما حكينا قبل فيه زيادات هاي الزيادات بتساعدنا بالربط مرة ثانية

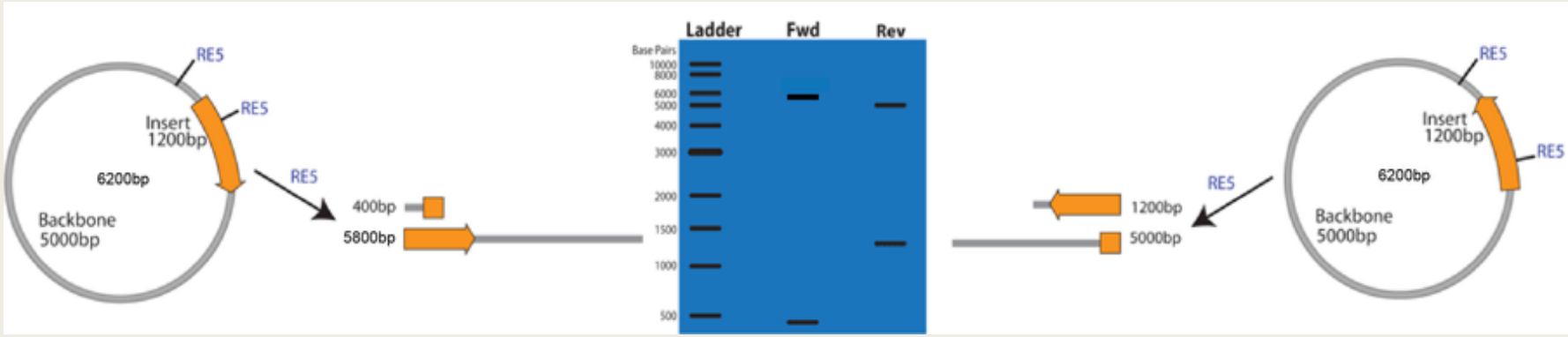
Example of RE that produce sticky end cutters:



How to determine orientation of the insert

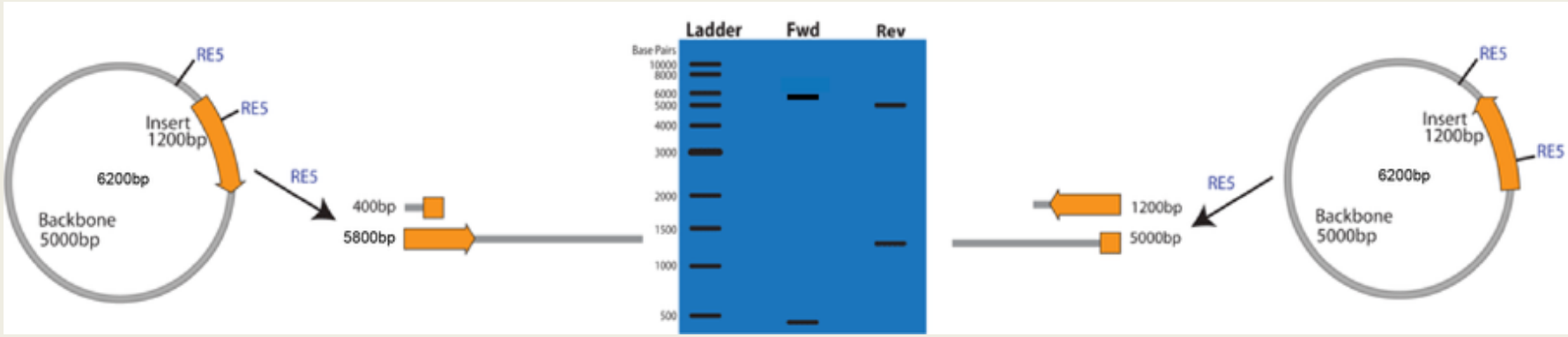
لنفترض انه احنا قطعنا ال dna بانزيم معين واجينا بدنا نحط الحين الي بدنا إياه ممكن يركب بالاتجاه الصحيح ويعملي expression صح للحين وممكن يركب معكوس ويعمل expression بشكل خاطئ للحين فكيف نعرف انه ركب صح او معكوس ؟! هذا ما سنعرفه في السلايد الي القادم

Digest with enzymes to cut internal site and external site–analyze by electrophoresis



How to determine orientation of the insert

طيب ركزوا معي يا خريجين
لنفترض انه عنا جين ركبناه على dna فركب على قطعتين مرة بشكل صحيح ومرة بشكل معكوس بنجيب انزيمين انزيم س بيقطع بين الG/A وانزيم ص بيقطع بين T/C ولنفترض انه G/A موجودة على ال plasmid dna والT/C موجودة على القطعة الي ركبناها وبنقطع قطعتين الdna الي نتجوا عنا في ال dnaالي ركب بشكل صحيح راح تكون المسافة محسوبة بين G/A على الdna وبين T/C الي على القطعة الي ركبناها مثلاً 500bp وفي القطعة الي ركبت بشكل معكوس راح تكون المسافة بين G/T الي على الdna وبين الT/C مختلفة 700bp في المثال الي طرحته الدكتورة وبنمسك جوز الdna الي طلعوا معنا لنفترض انه طولهم 3000bp وبنحطهم بالجل الي رايح منه 500bp اكيد بكون الdna الي ركب بشكل سليم والي رايح منه 700bp بكون ال dna الي ركب بشكل معكوس وبنكبه ما بنسفيد منه وبس كدا يا مؤمن والسلام عليكم



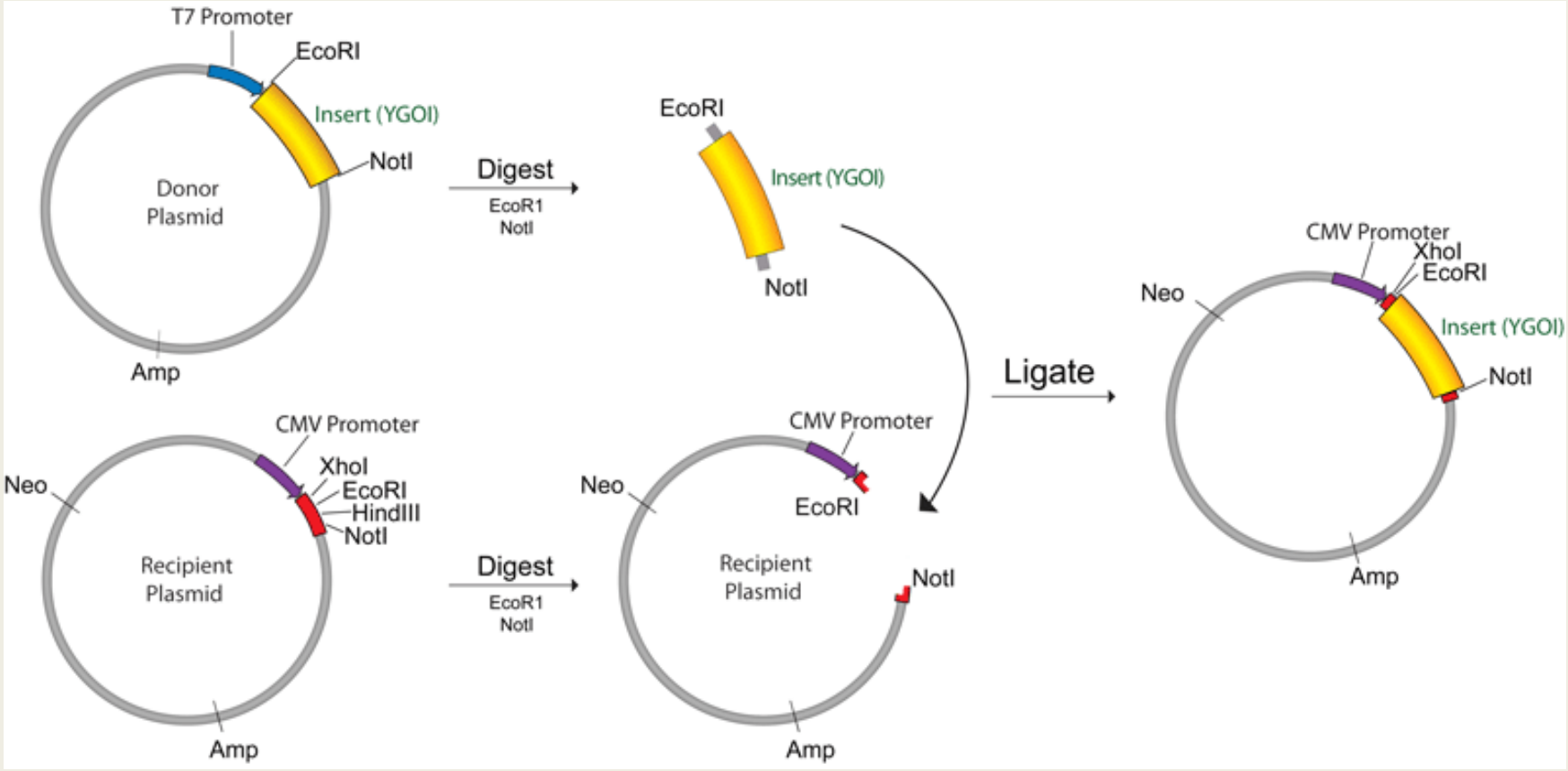
Uses of Restriction Enzyme

1. Recombinant DNA technology

ي تصنيع الانسولين او أي هرمون بتجيب dna من دم الشخص غالبا ومن خلايا الدم البيضاء تحديداً

- Discovery of enzymes that cut and paste DNA make genetic engineering possible.
- Restriction enzyme cuts DNA and generates fragments
- Ligase joins different DNA fragments
- DNA fragments from different species can be ligated (joined) to create Recombinant DNA

1. Recombinant DNA technology



2. Cloning

Replicates a sequence inserted into a host cell

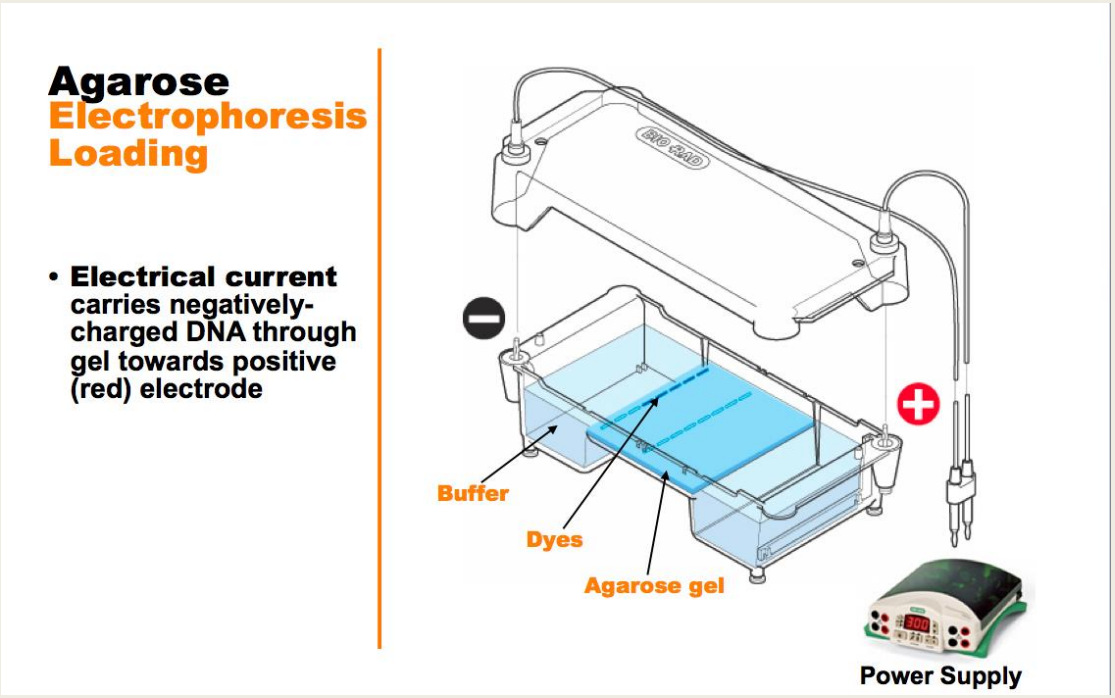
زي لما نلاقي دم او شعرة في مكان الجريمة اول اشي بنعمله عليات استنساخ للdna بال pcr بعدين بنقطعها و وبعدين بنقطعها بالأنزيمات وكل قطعة dna بنقطع بنفس الانزيم تسمى ال dna restriction mapping وبعدين بنحطها بالجل

3. DNA restriction mapping

The location of the restriction enzyme cleavage sites on the DNA molecule.

Separating Restriction Fragments, I

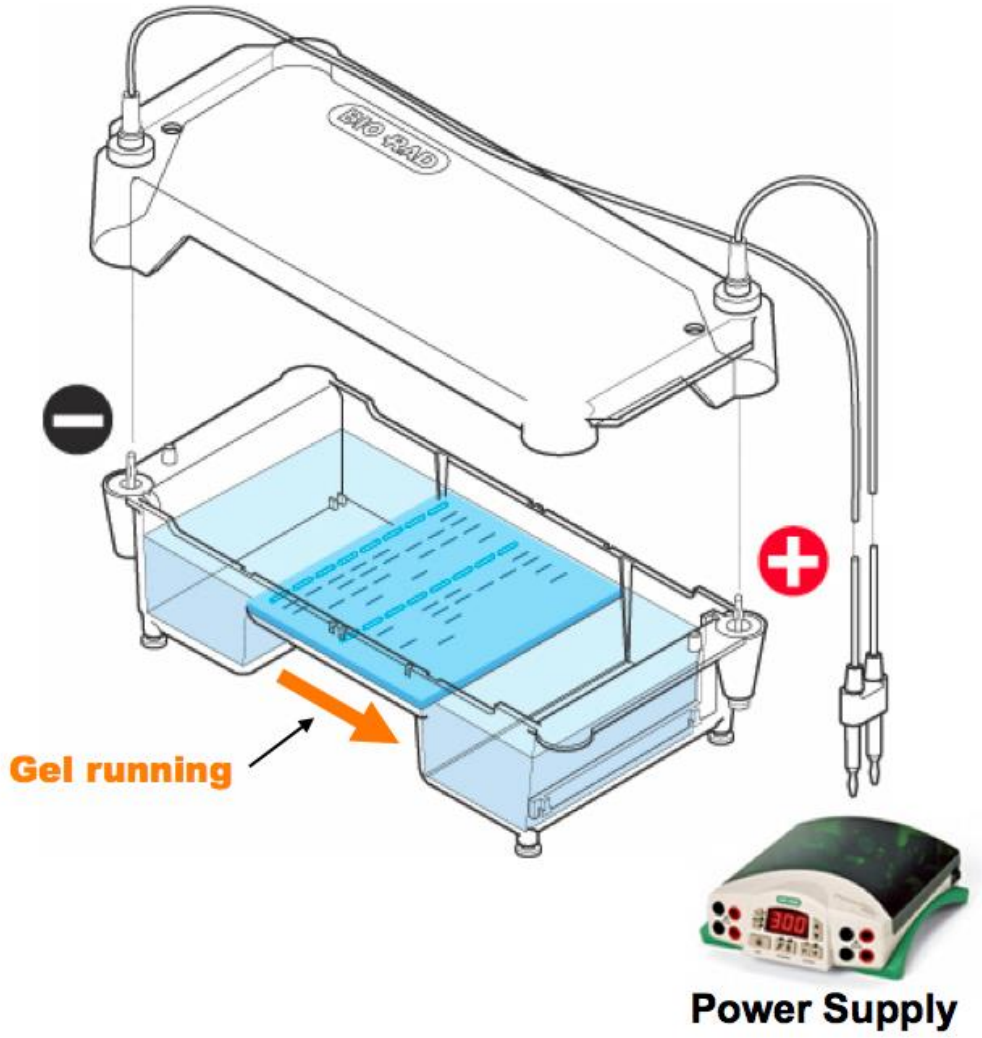
هذا الجل اله قالب واله مشط بعمل الفتحات في الagarose وبنحطه في المايكرويف وبنتركه بعدها ليجمد ، وبنحط العينات ال dna تبعتنا بتكون مشحونة شحنة سالبة وبتمشي من السالب للموجب حسب الكتلة المولية الها وبعد هيك بنرجع نربط الdna تبعنا ب lybase enzyme وبنستخدمه



Separating Restriction Fragments, II

Agarose Electrophoresis Running

- **Agarose gel sieves DNA fragments according to size**
  - **Small fragments move farther than large fragments**



راح نتعلم بهذا التشابتر كيف نبرمج جهاز الpcr

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR)

- PCR is a means to amplify a particular piece of DNA
  - *Amplify= making numerous copies of a segment of DNA*

زي لما حكينا عن العينات القليلة الي
بنلقاها بالجرائم لازم ننسخها لكمية اكبر
مشان اعرف استخدمها

- PCR can make ***billions*** of copies of a target sequence of DNA in a few hours
- PCR was invented in the 1984 as a way to make numerous copies of DNA fragments in the laboratory
- حل كثير مشاكل بعالم البوتكنولوجي
- Its applications are vast and PCR is now an integral part of Molecular Biology

DNA Replication vs. PCR

- PCR is a laboratory version of DNA Replication in cells
  - The laboratory version is commonly called "*in vitro*" since it occurs in a test tube while "*in vivo*" signifies occurring in a living cell.

DNA Replication in Cells (*in vivo*)

- DNA replication is the copying of DNA
- It typically takes a cell just a few hours to copy all of its DNA
- DNA replication is semi-conservative (i.e. one strand of the DNA is used as the template for the growth of a new DNA strand)
- This process occurs with very few errors (on average there is one error per 1 billion nucleotides copied) والجسم بصلحه
- More than a dozen enzymes and proteins participate in DNA replication

- **Key enzymes involved in DNA Replication**
- DNA Polymerase
- DNA Ligase
- Primase
- Helicase
- Topoisomerase
- Single strand binding protein

DNA Replication in Cells (*in vivo*)

هسة زي ما بنعرف انه الdna بكون ملفوف داخل النواة مشان انسخه لازم نفك اللفة هاي عن طريق الtopoisomerase وفي عنا الhelicase بفك الa helix ومشان اخليهم مفصولين عن بعض بحتاج single strand binding proteins زي مبدأ البكلة ما بعرف كيف بس الدكتورة حكت هيك
هسة ال polymerase enzyme في جسم الانسان ما بمشي الا من 5 to3 prime معناته هو بنسخ من 3to 5 prime لانه زي ما حكينا انه ال strands معكوسات بكونوا وبضل ماشي مع فتح الdna وبنسخ عنه ومن الstrand الي تحت نفس الموضوع 5to3 prime لكن لنه القطع بصير فيها بشكل عكسي من 5 to 3 فبس بحط rna primer كل ما يقطع شوي بعدين بيجي الpolymerase بنسخها وبصير في زي فراغات بين كل قطعة وقطعة فبيجي ال lypase enzyme بربطها مع بعض