MIRACLE
Academy

قال تعالى (يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ)

تفريغ البيوتكنو
زميلتكم حلا عبد الجابر

لجان الدُّفعات

هي معناها بس نقرأ القطعة الأولى (فوق) من اليمين لليسار، نفسها لما نقرأ القطعة الثانية (اللي تحت) من اليسار لليمين

Many recognition sequences are palindromic. For example,

الإتجاه اللي رح نقرأ فيه، و عادي ممكن تعكسوا الأسهم يعني القطعة اللي فوق من اليسار لليمين و اللي تحت من اليمين لليسار

1. 5' GAATTC 3'
2. 3' CTTAAG 5'

palindromic: read the same in the opposite direction

GAATTC ← من 3' إلى 5' ← القراء من اليمين لليسار ← قطعة 1

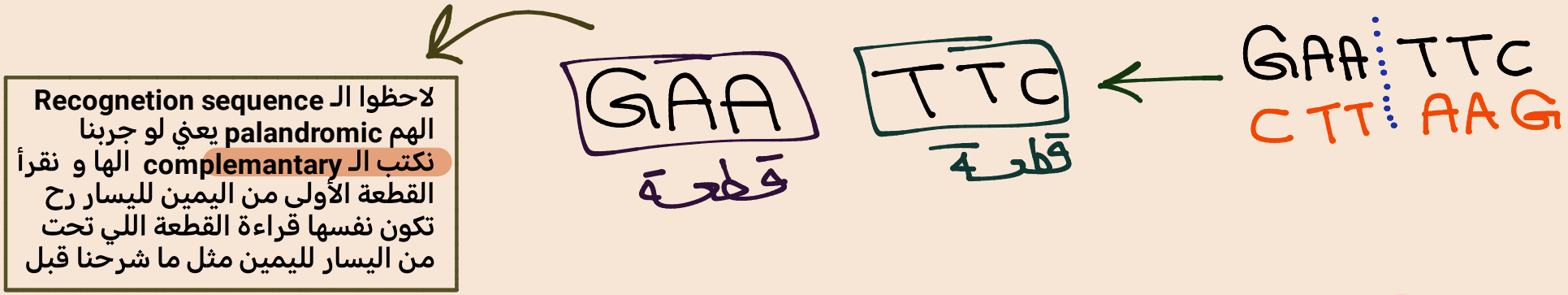
CTTAAG ← من 5' إلى 3' ← من اليسار لليمين ← قطعة 2

Sticky & Blunt ends

🔴 هي خاصيةكثير مهمة بالـ Biotechnology

Blunt

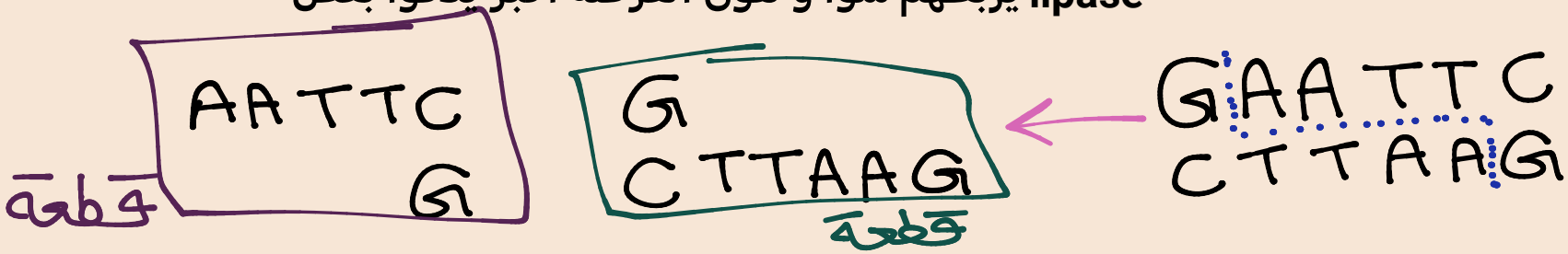
معناها إنه عم ينقطع الـ DNA من النص بالضبط بشكل متساوي
فبالتالي ما بكون عنا زوائد بالـ DNA و بعد القطع بطلع عنا حافة ناعمة
بدون زوائد، هسا مشكلتها إنه عملية تلزيقها مرة ثانية أصعب ولكن
Sticky أسهل إنهم يلاقوا بعض و نربطهم



لاحظوا الـ Recognetion sequence
الهم palandromic يعني لو جربنا
نكتب الـ complemantary الها و نقرأ
القطعة الأولى من اليمين لليسار رح
تكون نفسها قراءة القطعة اللي تحت
من اليسار لليمين مثل ما شرحنا قبل

Sticky

ما بنقطع من النص و إنما بشكل طرفي هسا بالمثال بتوضح كيف، و فعلياً بالواقع
بأغلب الإنزيماتاللي بصير هي الطريقة، و بنلاقي فيها زوائد و تسمى Sticky end
يعني إذا لقت الـ Complement اللي الها بتلزق فيه مباشرة و بس بضل بدنا
lipase يربطهم سوا و هون الفرصة أكبر يلاقوا بعض



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

unsymmetrical

symmetrical

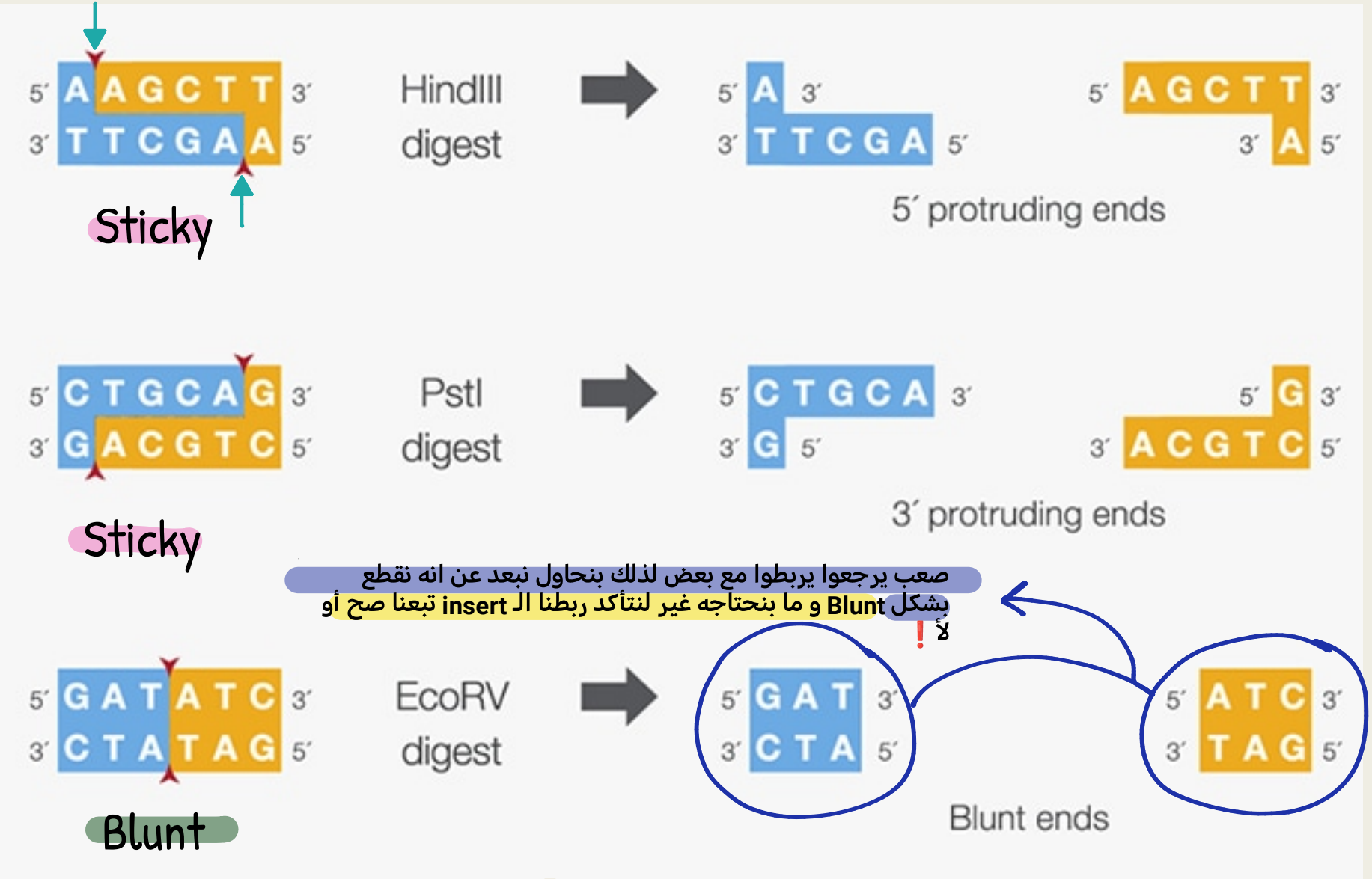
Many endonucleases cleave the DNA backbones in positions that are not directly opposite each other or can make staggered cuts, which produce single stranded "sticky-ends"

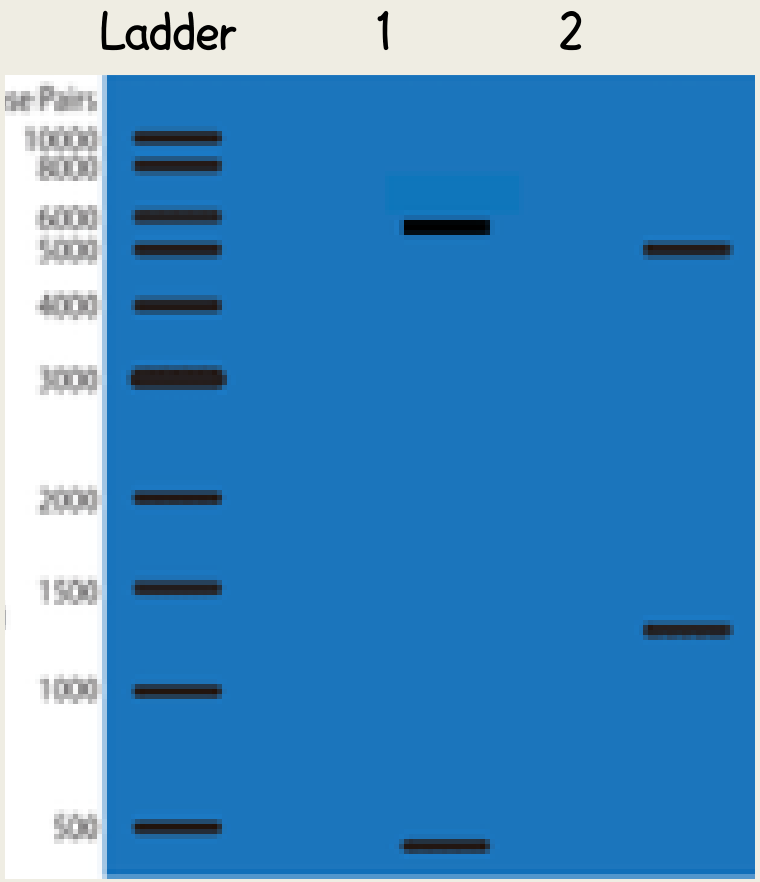
* DNA from different sources can be spliced easily because of these sticky-end overhangs *

زوائد DNA

مهم: لازم نعرف كل إنزيم مين Blunt و مين Sticky... وفعليا عدد الـ Blunt أقل فأحفظوهم واعرفوا إنه الباقي Sticky ✅

Example of RE that produce sticky end cutters:




Ladder
1
2
se Pairs
10000
8000
6000
5000
4000
3000
2000
1500
1000
500

حكينا هسا عنا لـ نتأكد ركبناه صح طب فعليا شو قصة الـ Insert إنه ربطته صح أو لأ ؟

رح اشرحلكم ياها واوضح كل التفاصيل بس أهم شي ركزوا لإنه بدها شوية تركيز...✅

1️⃣ أول شي أنا لازم أقطع الـ DNA بإستخدام Restriction enzyme

2️⃣ بعدين بدي أدخّل وأركّب هاد الـ DNA على plasmid

عبارة عن DNA دائري موجود بالبكتيريا مجرد ما نركّب عليه DNA ببلش ينسخ نسخ كثيرة منه!
و البلازميد هو نفسه الـ Vector.

3️⃣ هسا هون بيجي دور اهم نقطة إنه اعرف إتجاه إدخال عالـ DNA عالـ Plasmid ❗

عملية تحديد الإتجاه تسمى insert orientation مهمة لإنه تؤثر على:

تعبير الجين (هل يُترجم بشكل صحيح؟)

موقع مواقع القطع (restriction sites)

نتائج التجربة كلها.

الاتجاه الصحيح المطلوب: Forward (Fwd)

الاتجاه المعاكس: Reverse (Rev)

4️⃣ نختار إنزيمين بقطعوا بمكانين مختلفين :

- Internal site ← يقطع داخل الإدخال ← يعني بقطع بموقع جوا تسلسل الإدخال مش جوا البلازميد
- External site ← يقطع خارج الإدخال ← يعني يقطع جوا البلازميد

يعني بقطعوا

5️⃣ هدول الإنزيمين بهضموا البلازميد بطلعلي قطع بتعتمد ع اي اتجاه دخلت DNA بال Vector

6️⃣ بنحلل النتائج بزنه بنحطها بـ Gel مثل Aragose gel و بتطلع عنا قطع بينهم مسافة، المسافة الأقصر هي الإتجاه الصحيح اللي هو إتجاه Forward أما المسافة الأطول بكون الـ insertion بالإتجاه العكسي اللي هو الغلط.

الإتجاه اللي أدخلنا القطعة فيه	المسافة بين الانزيمين	طول القطعة
Forward	أقصر	قطعة قصيرة
Reverse	أطول	قطعة أطول

7️⃣ هسا بتطلع النتائج على الجل الكهربائي :

مكونات الجل الكهربائي

- DNA ladder
- الـ Fwd و هو ناتج هضم أي قطع البلازميد بإتجاه Forward
- الـ Rev و هو ناتج قطع البلازميد بإتجاه Reverse

هاد هو الـ DNA ladder و هو يمثل الـ Refrence للـ Bands بحيث نتأكد من أحجام الـ Bands اللي طلعت معنا حيث انه قطعتين الـ Forward الهم حجم مثل ماهو مبين و هدول بدنا ياهم و قطعتين الـ Reverse ببينوا هون بنشوف اكم حجمهم حسب الـ Reference و هدول بنكبهم بدناش ياهم.

شرح مثال تطبيقي

الدائرة هو حجم البلازميد الأصلي = 5000bp

و السهم الأصفر هو القطعة اللي بدنا ندخلها =1200bp

يعني المجموع = 6200bp

هون كان الإدخال بالإتجاه المطلوب فبالتالي لاحظوا حجم القطع اللي طلعت معنا تساوي 400 و 5800 .

يعني شوفوا وين حطينا السهم و امشوا معه بإتجاهه اللي هو باتجاه عقارب الساعة، واول RES رح يطلع بوجهنا رح يقص أول قطعة و هي رح تكون بالـ internal يعني مش بالبلازميد لسا ما وصلناه بعدين حنكمل لنوصل لثاني RES و يقطع وهي القطع الطويلة بس

هي النتائج تاعت الإدخال بالإتجاهين على الـ Band ، الـ Forward عنده قطعتين و شوفوا وين موقعهم وحدة 400 و وحدة 5800 و الـ Rev برضه قطعتين وحدة 1200 و وحدة 5000

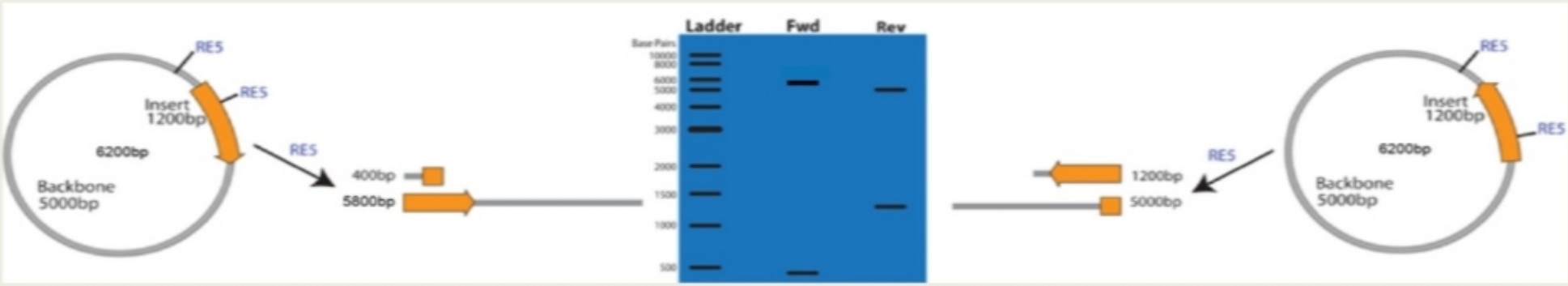
هون كان الإدخال بالعكس فبالتالي لاحظوا حجم القطع اللي طلعت معنا تساوي 1200 و 5000.

How to determine orientation of the insert

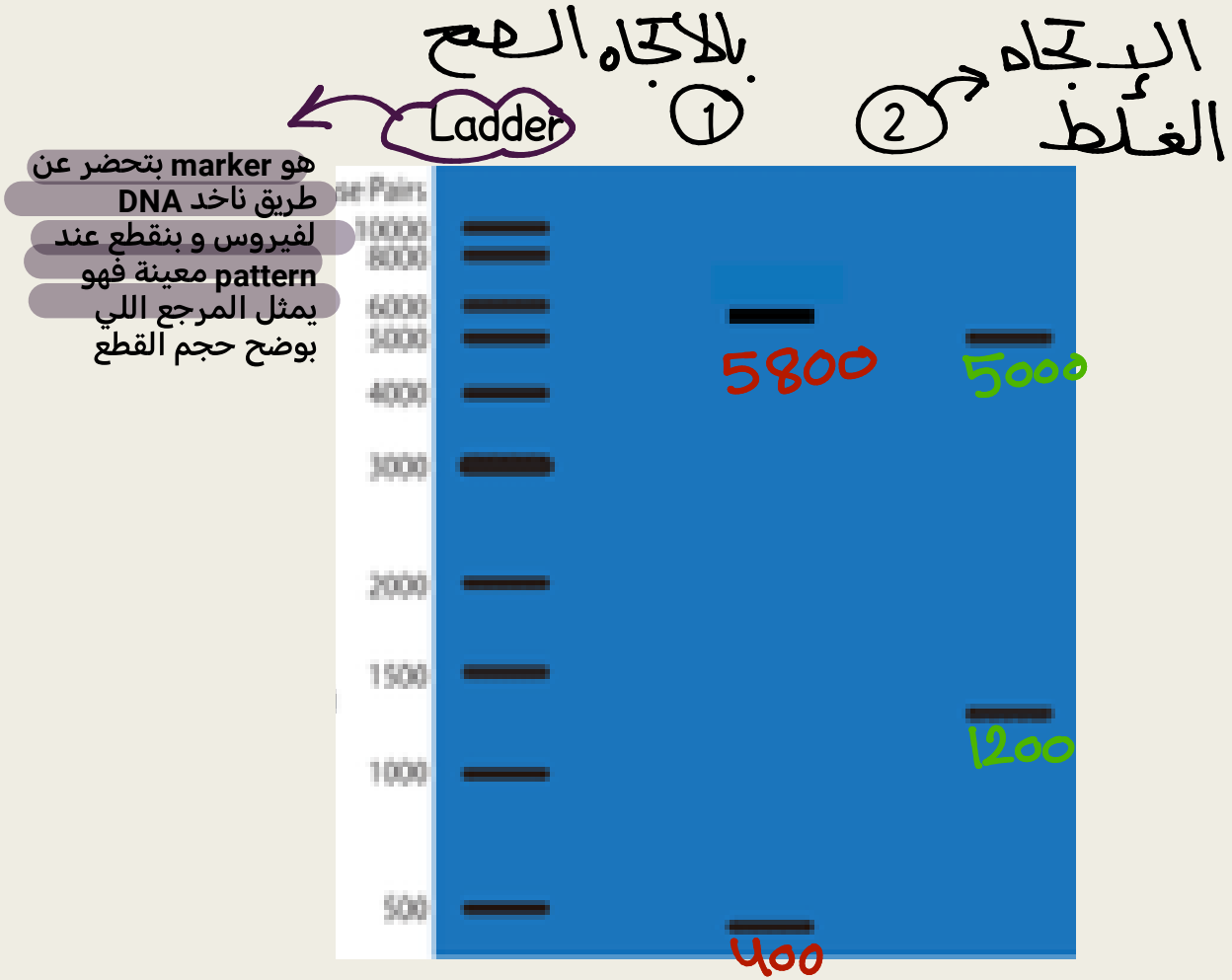
قطع /هضم

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

تم شرحه كامل فوق ✅



هو marker بتحضر عن طريق ناخد DNA لفيروس و بنقطع عند pattern معينة فهو يمثل المرجع اللي بوضح حجم القطع

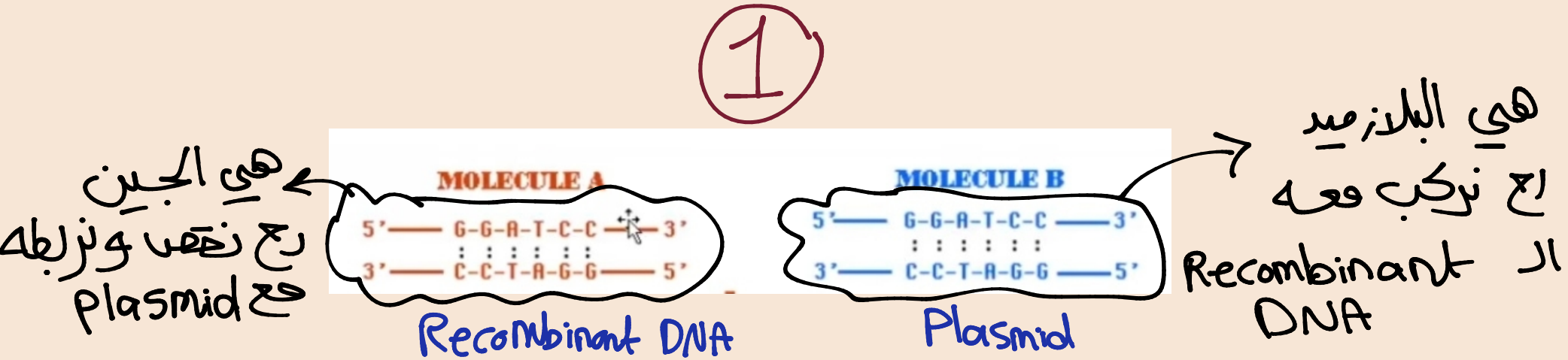


إستعمالات الـ Restriction enzyme :

١ تحضير Recombinant DNA ، حيث نضيف restriction enzyme عشان نعرف نطلعه من DNA الـ Human و نحصله لبرا بعدين بنقدر نربطه ببلازميد و نعمله Expression بالبكتيريا

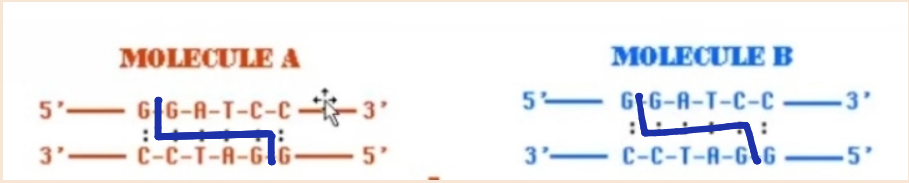
الـ Gene technology بنستخدمها لتحضير Recombinant DNA كلها تعتمد على Restriction enzyme

آلية تحضير Recombinant DNA



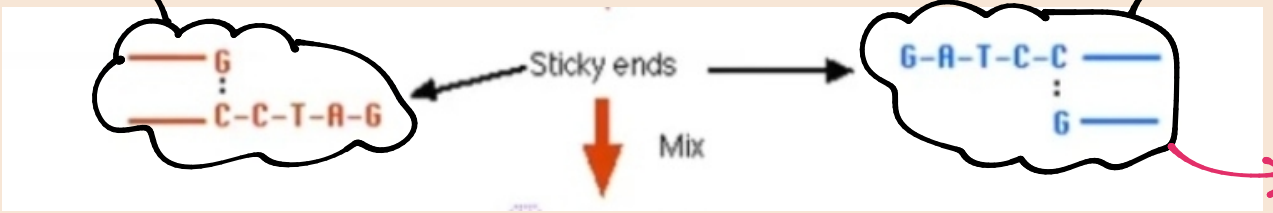
2

رح نقصهم بنفس الإنزيم لنحصل على Sticky ends



sticky ends

3



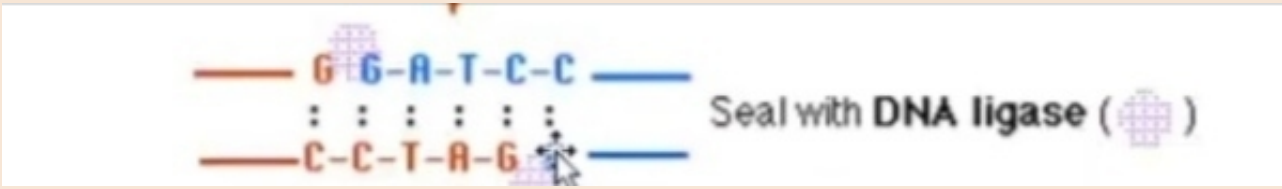
sticky ends

overhand نسمى

يعني زوائد DNA

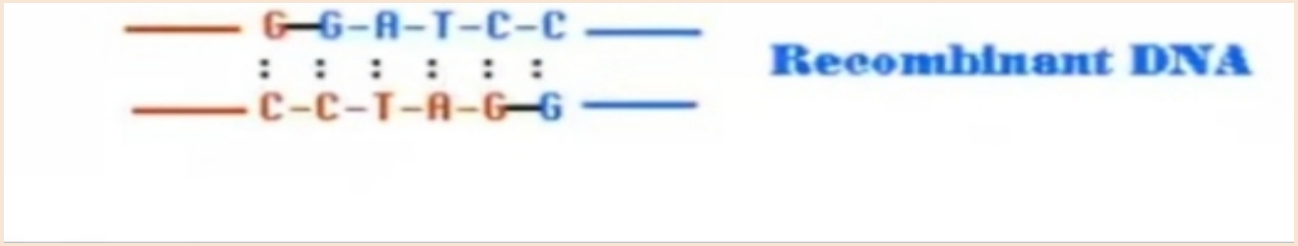
4

نلاقيهم و نربطهم بإستخدام **DNA ligase**



5

بالنهاية بنكون ربطنا **Human DNA** ببلازميد لحتى يطلع معنا **Recombinant DNA**



Uses of Restriction Enzyme

مهمين همه الأساس اللي بخلونا نقص جزء معين من DNA و نركبه عالبلازميد

1. Recombinant DNA technology

- Discovery of enzymes that cut and paste DNA make genetic engineering possible.
- Restriction enzyme cuts DNA and generates fragments

برجع بربط القطع

- Ligase joins different DNA fragments

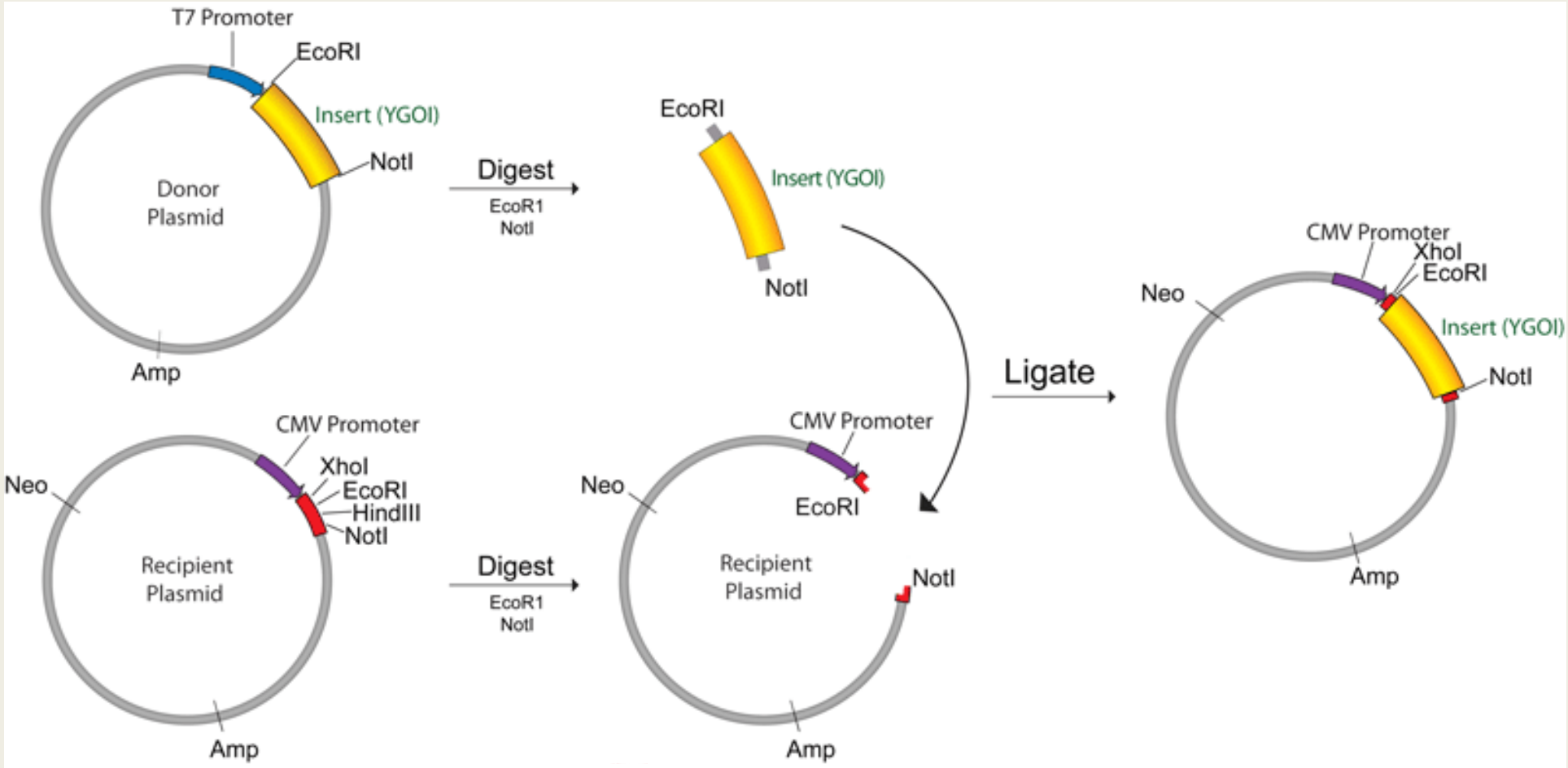
- DNA fragments from different species can be ligated (joined) to create Recombinant DNA

فرضا بدي اصنع انسولين و الانسولين بالذات بزبطش اروح اخذ عينة دم واعمل purification و اعمل pcr و خلص ، و إنما طريقته إنه الـ mRNA بإستخدام reverse transcriptase بطلع منه single strand DNA و بعدها عن طريق polymerase بصنع الـ Strand الثانية و هيك بطلع معي Recombinant DNA فبس التصنيع الأولي صعب بعدهابنحط الـ Strain ببلازميد و بنصنع قد ما بدنا من بكتيريا الانسولين

نأخذ الجين اللي بدنا نشتغل عليه من بلازميد أول، ونقصه باستخدام إنزيمين (EcoRI وNotI)، بعدين نفتح بلازميد ثاني بنفس الإنزيمات، ونركّب الجين فيه باستخدام إنزيم الربط. هيك بصير عندنا بلازميد جديد فيه الجين المطلوب ومحفز قوي (CMV) يخليه يشتغل داخل خلايا الثدييات، ومعه جين مقاومة يساعدنا نعرف إذا دخل البلازميد فعلاً في الخلية.

1. Recombinant DNA technology

هي الصورة بحتتلكم عن شرحها لإنه ما انشرحت حرفي بالمحاضرة



يعني جين بدنا ندخله لبكتيريا و نكثره لهالجين مثل استنساخ النعجة فهي خلية جسمية اخذوها من نعجة بيضة وحطوا الـ nucleous تاعتها ب Zygout و زرعوها برحم نعجة ثانية و طلع معهم نعجة بنفس الصفات الوراثية للأم اللي أخدوا منها و برضه هون الها دور الـ Restriction enzyme سواء بصنع بروتين او organ أو كائن

2. Cloning

Replicates a sequence inserted into a host cell

مثل لما كنا نحكي عن إثبات الابوة و كمان لما حكينا عن التعرف على بقايا إنسان فهي كلها تعتمد على Restriction enzymes، بنقص إنزيم محدد و بتكون عنا Pattern أحجام معينة من DNA الموجودة عندي و كل شخص إله Pattern معينة يعني map خاصة فيه

3. DNA restriction mapping

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

Agarose electrophoresis

🟡هو Horizontal gel بندخل عليه pump (مثل المشط) فهالشي بعمل فتحات بالـ Gel ثم بنحط فيها العينات و بكون معاها صبغة Dye اسمها Bromothymol blue عشان نميز وين الـ DNA لإنه DNA بالأصل هو Colorless ثم هدول الـ electrodes اللي همه cathods & Anodes مربوطين ببـ power supply بمشي الكهربا و عنا buffer فيه ايونات بتعمل تيار كهربائي تنقل DNA molecule فينتقلوا من القطب السالب لإنه DNA شحنته سالبة فبتطلع الـ Bands of DNA و بنحط عليهم من الصبغة و بنشوفها تحت UV ملونة وببين وين الـ Segements موجودة.

📌الخلاصة:

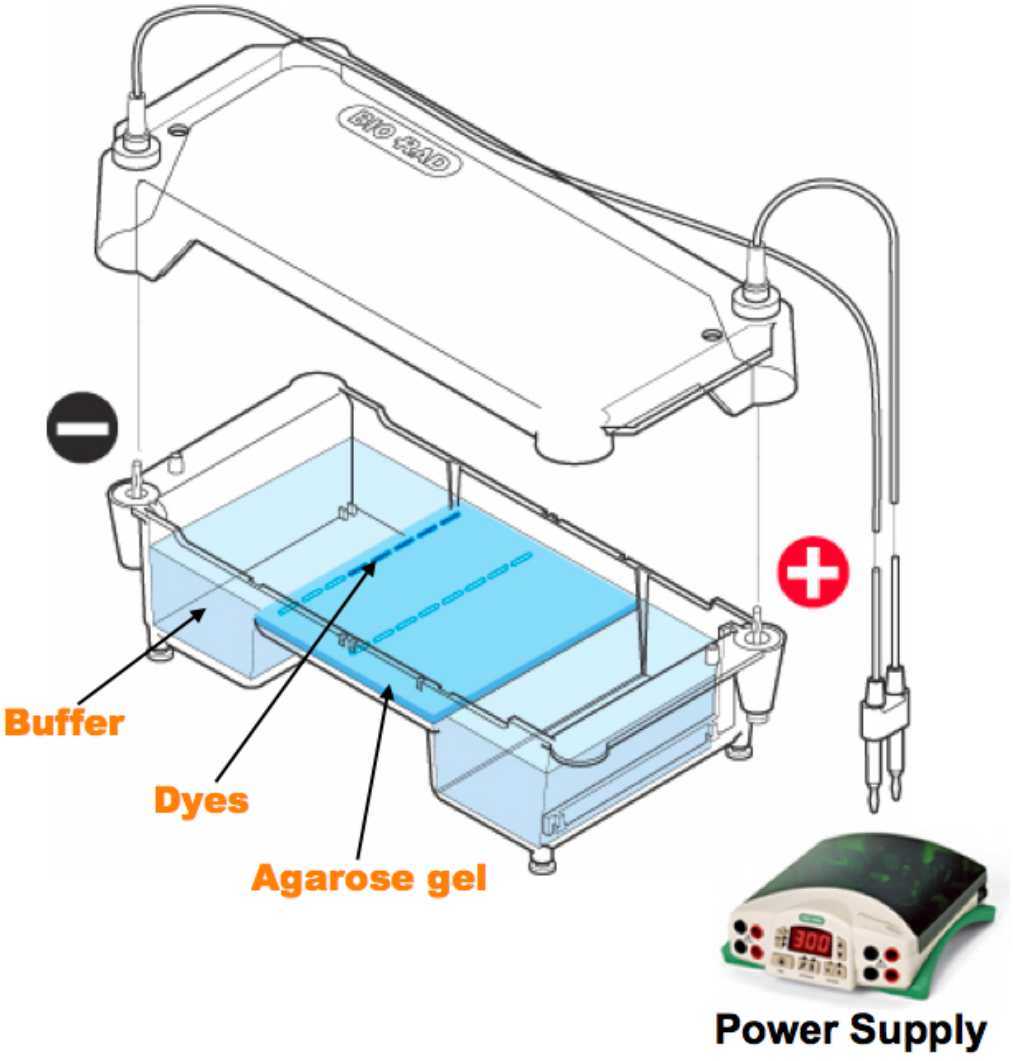
بنحط العينة بـ pipette و بنحط glycerol & sacrose لتضلها تحت و معهم صبغة و أول ما نشوف الصبغة وصلت للنهاية بنوقف الجهاز عشان ممكن عينة الـ DNA تنزل مع الصبغة إذا نزلت بعد النهاية.

✔️عشان نعرف قطع ولا ما قطع لازم نمشيه على Agarose gelو بعتمد على electrical current فالـ DNA عليه phosphate group فعليه Negative charge فينتقل من القطب السالب للموجب بناءا على Size of segement فالقطعة اللي حجمها صغير رح تتحرك اسرع و الكبيرة ابطأ فمسافتها اقل.

Separating Restriction Fragments, I

Agarose Electrophoresis Loading

- **Electrical current** carries negatively-charged DNA through gel towards positive (red) electrode



Separating Restriction Fragments, II

Agarose Electrophoresis Running

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