MIRACLE
Academy

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

تفريغ البيوتكنو
زميلتكم نهى حسن

لجان الدُّفعات

Created with Notewise

VECTORS AND THEIR TRANSFORMATION

ال vector هو نفسه plasmed.🤔 طيب هل بزبط اختار اي واحد منهم؟؟ الجواب لا انما نختار هم حسب

1 characteristic

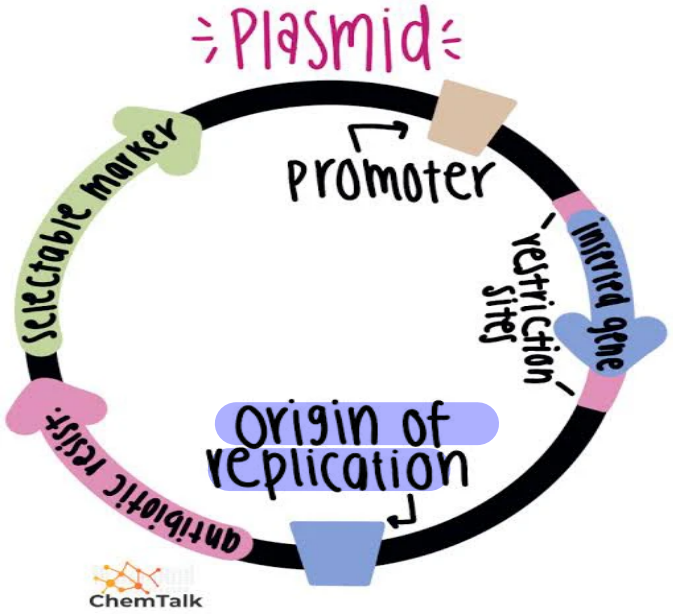
2 size

في عنا كثير أحجام لل plasmed ولكن احنا هون رح نحكي عن plasmed الي داخل الخليه البكتيريا وبحكي عن سعته الي هي تقريبا 10 الاف جين اما أكبر صعب وهون بدور على اشي أكبر

Created with Notewise

ههسا مبدأ شغل ال vector كالآتي والي رح اكتبه لحتى نوخذ فكره عامله عنه وبعدين بنبلش نحلله
انا عندي DNA الي بدي اياه وهاد يحتوي على جين انا بدي اياه بروح عن طريق restrictions enzymes بقص الجين المطلوب وبنفس هاد restrictions enzymes بقص vector الي هو نفسه plasmed وهيك صرنا جاهزين لنشبكهم مع بعض عن طريق عمليه ligation 📍 وهون صار عنا plasmed يحتوي على الجينات المطلوبه وهاد بدخله لجوا خليه بكتيريا ليبلش عمليه الانقسامات

لما دخلته لداخل الخليه هو رح ينقسم. قصدي البلازميد معها ولكن ما رح يكون رابط معها (انقسم لحاله لانه اله oreginal of replication الي بدونها البلازميد ما رح يقدر يعمل نسخ لنفسه ولا يتكاثر وهي صوته



Created with Notewise

Vector types

- Small DNA molecule capable of self replication that are used as cloning vehicle or carrier of DNA fragment.
- Selection of the vector type depends on host used in the cloning and size of insert
  - *Plasmids*
  - *Phages*
  - *Hybrid vectors*
  - *Artificial chromosomes*

إلي بدي استخدمه لعملية cloning

هاد للأشياء الكبيرة

Created with Notewise

بدنا كثير copies رح نوجهه نضرنا إلى self replication لانه ذكرت قبل موضوع origen site
طيب شو هو cloning sites؟ هاي المنطقة تحتوي على restrictions enzymes مش مكرر غير مره وحده وهاي المنطقه هي نفسها الي بدخل من خلالها DNA وبلزقه
طيب شو هاي selective ؟ دخلنا الجين على plasmed ف اكيد رح يكون عنا plasmed اخذ الجين و بلازميد ما أخذه كيف اعرف طيب؟ 🤔 من خلال marker وهاد الماركر هو antibiotics resistant رح اشرح فكرتها هسا لأنها رح تنذكر لقدام

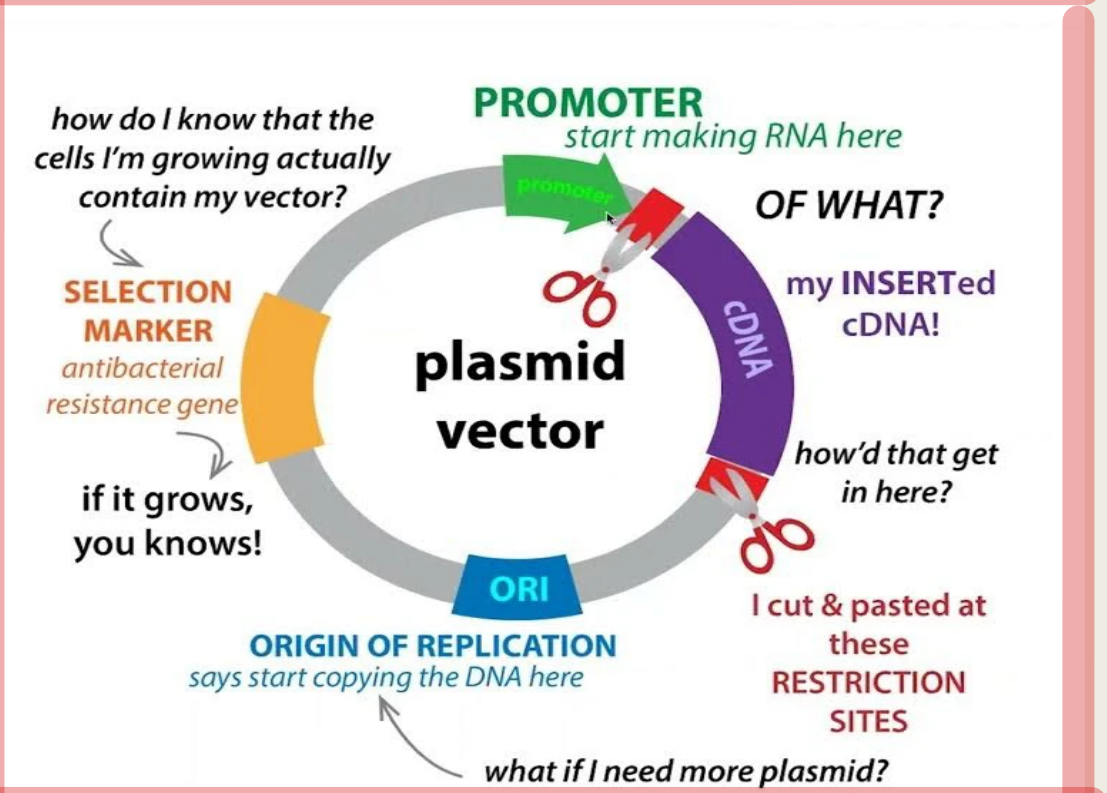
كالآتي مش انا بختار الجينات المطلوبه من DNA لنقول مثلا اخترت الجينات المسؤوله عن growth Hermosa مش بدي ادخلها مع البلازميد لداخل الخليه البكتيريه وبضيف لل بلازميد هاد مثلا جين ampicillin resestans
وبجيب petri dish ويكون فيه مضاد حيوي امبيسلين مخلوط مع agar
ف البكتيريا الي ماتت هي الي ما أخذت البلازميد والي أخذته عاشت ورح تصنع GH

Note

Created with Notewise

Vector Characteristics

- Self replication, multiple copies.
- Replication origin site.
- Cloning site.
- Selectable marker gene.
- Small size.
- Easily isolated & purified.
- Easily transformed into host cell.
- Control elements – promoter, operator, ribosome binding site.



Created with Notewise

Types

- There are two types of vectors:
  - ***Cloning vectors:*** *DNA molecules that are used to "transport" cloned sequences between biological hosts and the test tube.* Examples: Plasmids, Phage or Virus to get millions of copies.

    هاد للجينات الصغيرة　　هاد للجينات الكبيرة

  - ***Expression vectors:*** a plasmid or virus used to introduce a specific gene into a target cell, and can commandeer the cell's mechanism for protein synthesis to produce the protein encoded by the gene

    هون لازم تكون عندي عمليه expression

Cloning vectors

- **Cloning vectors** are used in genomic library, preparing probes and Genetic engineering experiments.

- Selection of cloning vector depends on :-
  - *Objective of cloning experiment*
  - *Ease of working.*
  - *Knowledge existing about the vector.*
  - *Suitability.*
  - *Reliability*

Created with Notewise

اجزاء Cloning vectors

- Self replication, multiple copies.
- Replication origin site.
- Cloning site.
- Selectable marker gene.

كل ما كان أصغر كان احسن، ولكن مش دائما بكون Gen صغير لو عندي 2000 segments ما بقدر اعمل cloning مره وحده إلهم انما كل الف وبعمل إلهم هدول sequence من الجهتين وبحط restrictions enzymes وبربطهم مع بعض يعني colning vector شغال زي السياره ينقله من نقطه لثانيه(بستخدم لنقل plasmed الي حطيت معه Gen المرغوب لداخل الخليه البكتيريه)

ولازم لازم ال ribosomes يتعرف علىplasmed حتى يعمل expression للبروتين ويصنعه ولكن انا ما بدي يكون عندي بعمليه cloning expression عشان ما يعمل expression للخليه human وتكون toxic للبكتيريا

Created with Notewise

Cloning vectors

- Cloning vectors share four common properties
- 1. Ability to promote autonomous replication.

2. Contain a genetic marker (usually dominant) for selection.

3. Unique restriction sites to facilitate cloning of insert DNA.

4. Minimum amount of nonessential DNA to optimize cloning.

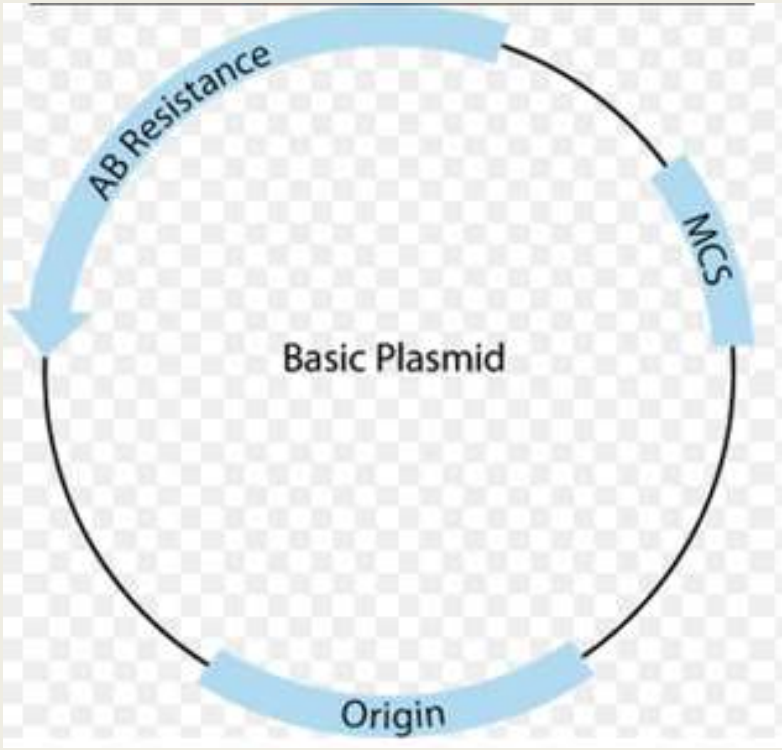
antibiotic
المضاد الحيوي

Created with Notewise

Plasmids

يقدر ينقل resestans من خليه لأخرى من خلاله

- Bacterial cells may contain extra-chromosomal DNA called plasmids.
- Plasmids are usually represented by small, circular double stranded DNA.
- Some plasmids are present in multiple copies in the cell
- In addition to bacteria, it may exist in the nuclei of some eukaryotic cells.
- They can replicate independently of the host cell. The size of plasmids ranges from a few kb to near 100 kb
- Can hold up to 10 kb fragments



ولكن فعليا احنا نستخدم لحد 3000 مش 10000

Created with Notewise

Plasmid vectors
Origin of replication

- Plasmid vectors contain:
- **Origin of replication (Ori)** is a DNA segment recognized by the cellular DNA-replication enzymes.
- Without replication origin, DNA cannot be replicated in the cell
- a gene that permits selection,
- Here the selective gene is *ampr*; it encodes the enzyme b-lactamase, which inactivates ampicillin.
- Exogenous DNA can be inserted into the bracketed region .

Created with Notewise

Selective marker

- **Selective marker** is required for maintenance of plasmid in the cell.
- Because of the presence of the selective marker the plasmid becomes useful for the cell.
- Under the selective conditions, only cells that contain plasmids with selectable marker can survive 8 سلايد الفكره شرحت
- Genes that confer resistance to various antibiotics are used.
- Genes that make cells resistant to ampicillin, neomycin, tetracycline or chloramphenicol are used

Created with Notewise

Multiple cloning site

ححكينا هاد مكان ما يصير فيه تكرار ل restrictions enzymes

- Many cloning vectors contain a **multiple cloning site** or **polylinker**: a DNA segment with several **unique sites** for restriction endonucleases located next to each other
- Restriction sites of the polylinker are not present anywhere else in the plasmid.
- Cutting plasmids with one of the restriction enzymes that recognize a site in the polylinker does not disrupt any of the essential features of the vector

هاد endo فش غير واحد منه وما اله تكرار ف restrictions enzymes مش موجود باي مكان ثاني البلازميد غير ب MCS كمان بقدر اقطع بانزيم او اكثر. مثلا
بقطع bam-bam وبعدها اربطهم
او bam - EXO وبعدها اربطهم

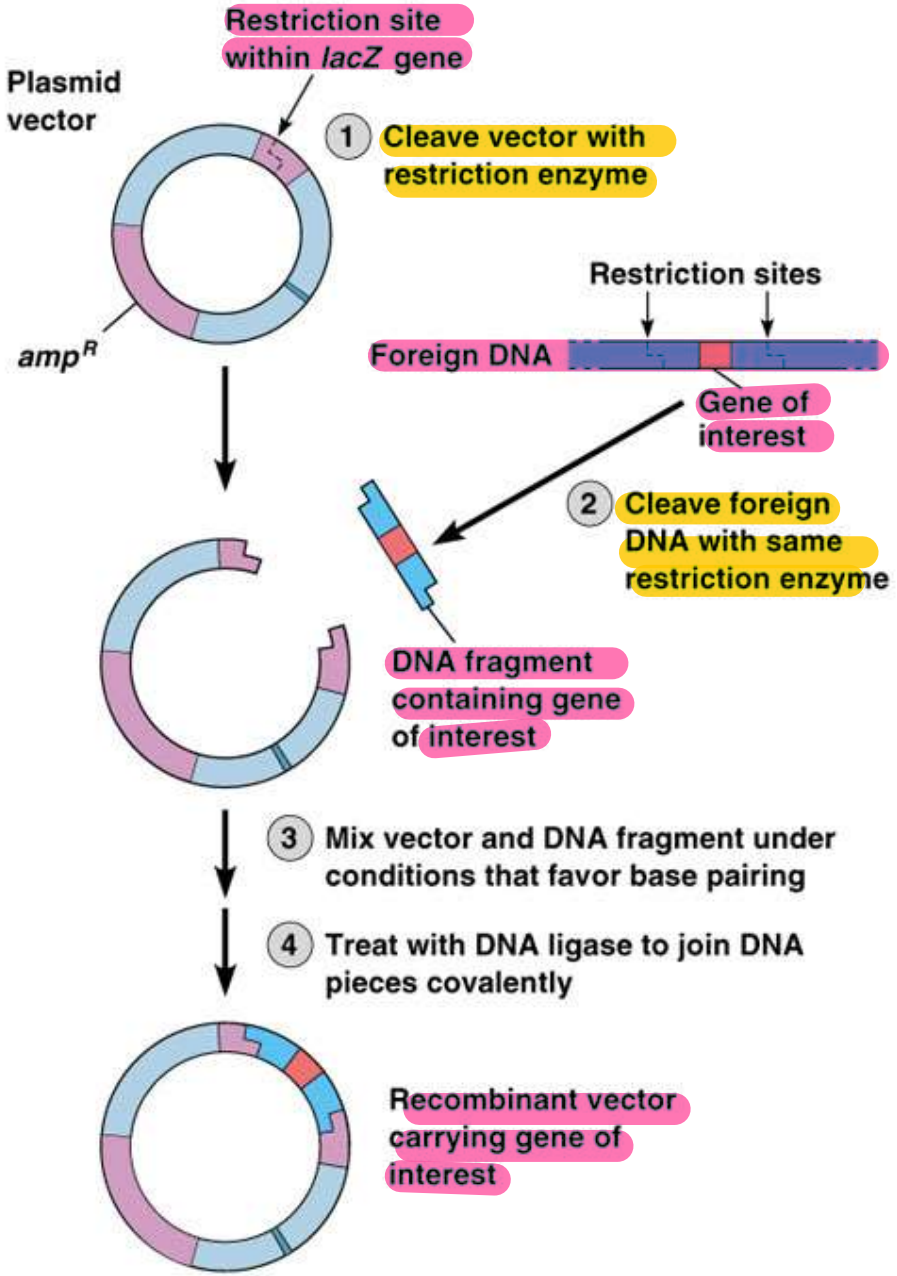
Created with Notewise

Multiple cloning site

ال LacZ حكينا حتى اقدر ادخل ال gen عاده بقص ب restrictions enzymes ويكون من uniq sites من ضمن MCS بدخله وبربطهم وهيك بكون حصلت fragments وبقدر اخزنه داخل bacteria في freezer على درجه حراره - 70 (لو بحط DNA الثلاجه رح يخرب. بالكثير بالكثير يصمد سنه)

نحطه على - 70 حكينا ونضيف معه غليسيرول 30٪

- Gene to be cloned can be introduced into the cloning vector at one of the restriction sites present in the polylinker, transformed into bacteria
- After culture growth, the clone fragment can be recovered easily. The cells are lysed and the DNA is isolated and purified.
- A DNA fragment can be kept indefinitely in bacterial culture if mixed with glycerol in a –70 degrees C freezer.



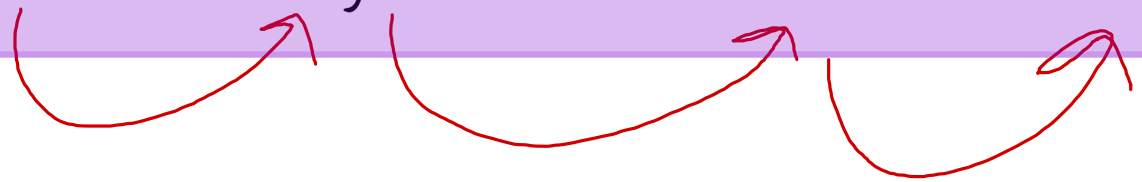
Created with Notewise

اذا بدي ابلش عمليه expression تبعت كل البروتينات لازم عليه اشي اسمه IPTG وطبعا هاد اختصار ل isopropyl B-D-1 thiogalactopyranoside وهاد بديل اللاكتوز لاني ما بدي اشي تتغذى عليه البكتيريا ويشتغل نفس شغل اللاكتوز وهون تبلش عمليه تصنيع البروتينات

قبل ما نعمل اي اشي بحط تقريبا 1Mm من IPTG مع x gal على ال agar وبفردهم وبعدها بحط البكتيريا وبتركها لثاني يوم ليصير الها growth طيب السؤال المهم شو قصه اللون الأزرق والأبيض على ال agar

انا لما بحط insert في عندي اشي اسمه B galactosidase هاي تنكسر بسبب اضافه insert يعني خربت B galactosidase واذا ما كان عندي insert رح يضل شغال وانا حطيت IPTG حتى احفز عمليه promoter الي صنعت B galactosidase ما فيها insert والي ما صنعت B galactosidase فيها insert

ويظهر اللون الازرق oxidation ويكسره ويعمله عمليه xgal يروح على B galactosidase



Created with Notewise

Plasmid Polylinkers and Marker Genes for Blue-White screening

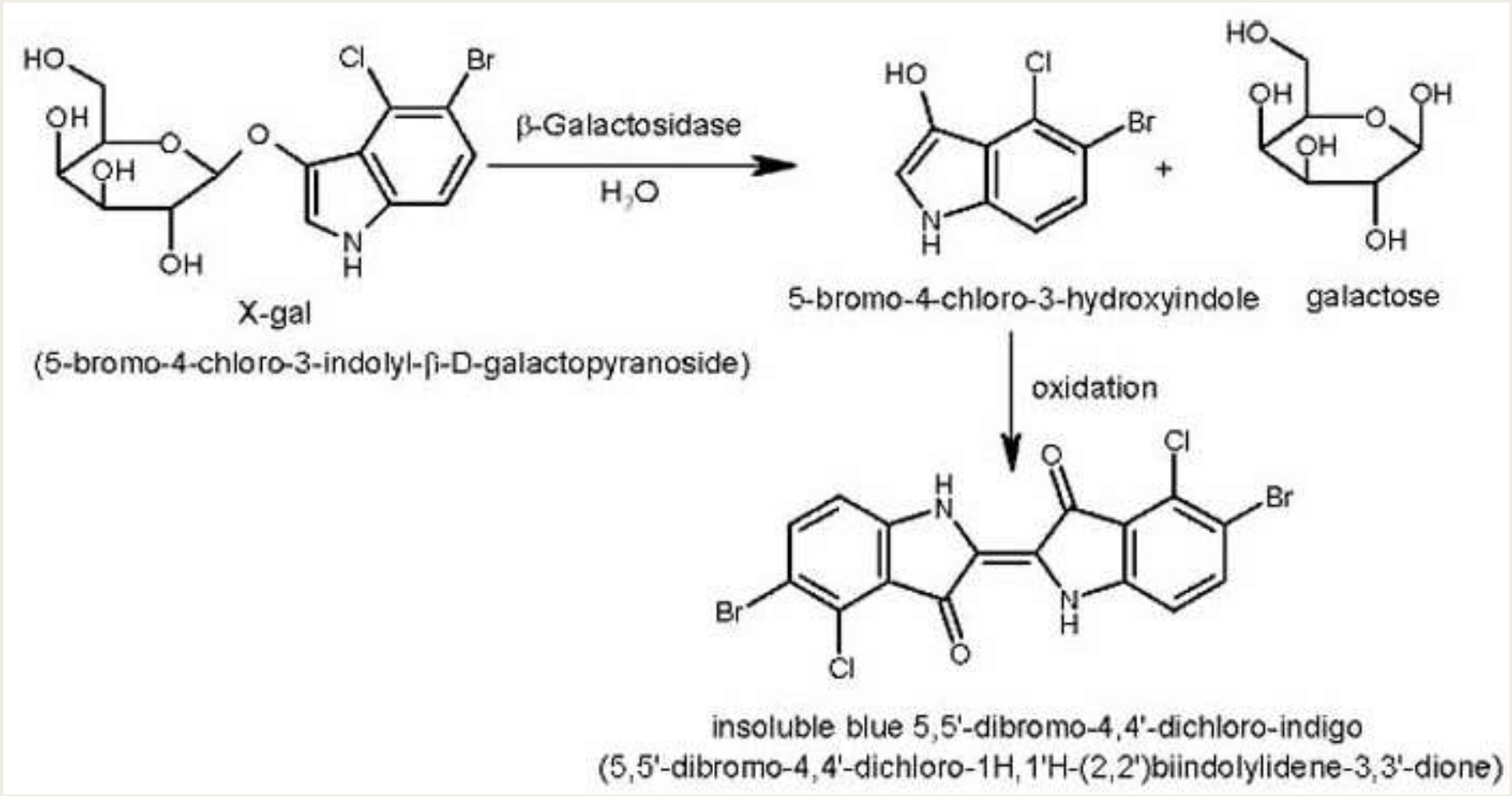
- Colonies with recombinant plasmids are white, and colonies with nonrecombinant plasmids are blue.
- Example: pUC19
- Resistant to ampicillin, has (amp^r gene)
- Contains portion of the lac operon which codes for beta-galactosidase.
- X-gal is a substrate of beta-galactosidase and turns blue in the presence of functional beta-galactosidase is added to the medium.

االي لونها ابيض يعني اخذت insert خربت B galactosidase يعني فش عندي Beta
يعني فش اشي يكسر X gal يعني فش لون ازرق

Created with Notewise

X-Gal reaction

ما نختار هم كل الي اخذو ازرق انما بس 6-7
وبوخذهم بنكاشه أسنان معقمه وبحط كل وحده
لحالها ب tube وبعمل growth وهاي تكون فيها
plasmed + insert



Created with Notewise

هاد تلخيص من عمو chat

الهدف: نريد إدخال جين جديد في البكتيريا (مثل جين الأنسولين)

٢. تصميم البلازميد: البلازميد لازم يحتوي على:

أ. جين المقاومة للمضاد الحيوي · مثل مقاومة الأمبيسلين · وظيفته: يساعدنا نعرف البكتيريا التي أخذت البلازميد

ب. موقع إدخال الجين الجديد · مكان ندخل فيه الجين المطلوب (مثل الأنسولين)

ج. نظام التحكم (Promoter + Lac Operator) ·

promoter: مكان بداية القراءة

· **lac operator:** مكان ارتباط البروتين المغلق

٣. البروتين المغلق (Repressor): وظيفته: · يرتبط على الـ **lac operator** · يمنع **RNA polymerase** من القراءة · يغلق الجين ← لا إنتاج للإنزيم

٤. دور الـ **IPTG**: الـ **IPTG** يعمل كـ: · مفتاح فتح للجين · يرتبط بالـ **repressor** · يسبب انفصال **repressor** عن الـ **DNA** · يفتح الجين ← يبدأ إنتاج الإنزيم

٥. الكشف باستخدام **X-gal**: عندما: · الجين مفتوح (بوجود **IPTG**) · الإنزيم **β-galactosidase** ينتج · الإنزيم يحلل الـ **X-gal** · ينتج لون أزرق !

Created with Notewise

٦. الخطوات العملية في المختبر:

الخطوة ١: إدخال البلازميد في البكتيريا · بعض البكتيريا تأخذه والبعض لا

الخطوة ٢: الانتخاب بالمضاد الحيوي · نضع البكتيريا على طبق به مضاد حيوي · التي أخذت البلازميد تعيش (لديها مقاومة) · التي لم تأخذه تموت

الخطوة ٣: الكشف باللون الأزرق · نضيف IPTG + X-gal · البكتيريا التي أخذت البلازميد تصبح زرقاء · البكتيريا التي لم تأخذه تموت أساساً

٧. النتيجة النهائية: · البكتيريا الزرقاء = أخذت البلازميد وانتجت الإنزيم ✅ · البكتيريا الميتة = لم تأخذ البلازميد ❌

وبهذا نستطيع عزل البكتيريا الناجحة واستخدامها لإنتاج البروتين المطلوب!

Created with Notewise

TYPES OF CLONING VECTORS
1. PLASMID VECTORS

- Plasmid vectors are used to clone DNA ranging in size from several base pairs to several thousands of base pairs (100bp -10kb).
- ColE1 based, pUC vehicles
commercially available ones, eg pGEM3, pBlueScript, pET16

Created with Notewise

Plasmids advantages and disadvantages

- Advantages:
  - *Small size (easy to manipulate and isolate)*
  - *Circular (more stable)*
  - *Replication independent of host cell*
  - *Several copies may be present (facilitates replication)*
  - *Frequently have antibiotic resistance (detection easy)*
- Disadvantages:
  - *Cannot accept large fragments*
  - *Sizes range from 0- 10 kb*
  - *Standard methods of transformation are inefficient*

Created with Notewise

2. Phage Cloning Vectors

- Fragments up to 23 kb can accommodated by a phage vector
- Lambda and M13 are most common phages
- 60% of the genome is needed for lytic pathway.
- Segments of the Lambda DNA is removed and a stuffer fragment is put in.
- The stuffer fragment keeps the vector at a correct size and carries marker genes that are removed when foreign DNA is inserted into the vector.
- Example: Charon 4A Lambda
- When Charon 4A Lambda is intact, beta-galactosidase reacts with X-gal and the colonies turn blue.
- When the DNA segment replaces the stuffer region, the lac5 gene is missing, no beta-galactosidase is formed, and the colonies are white.

Created with Notewise

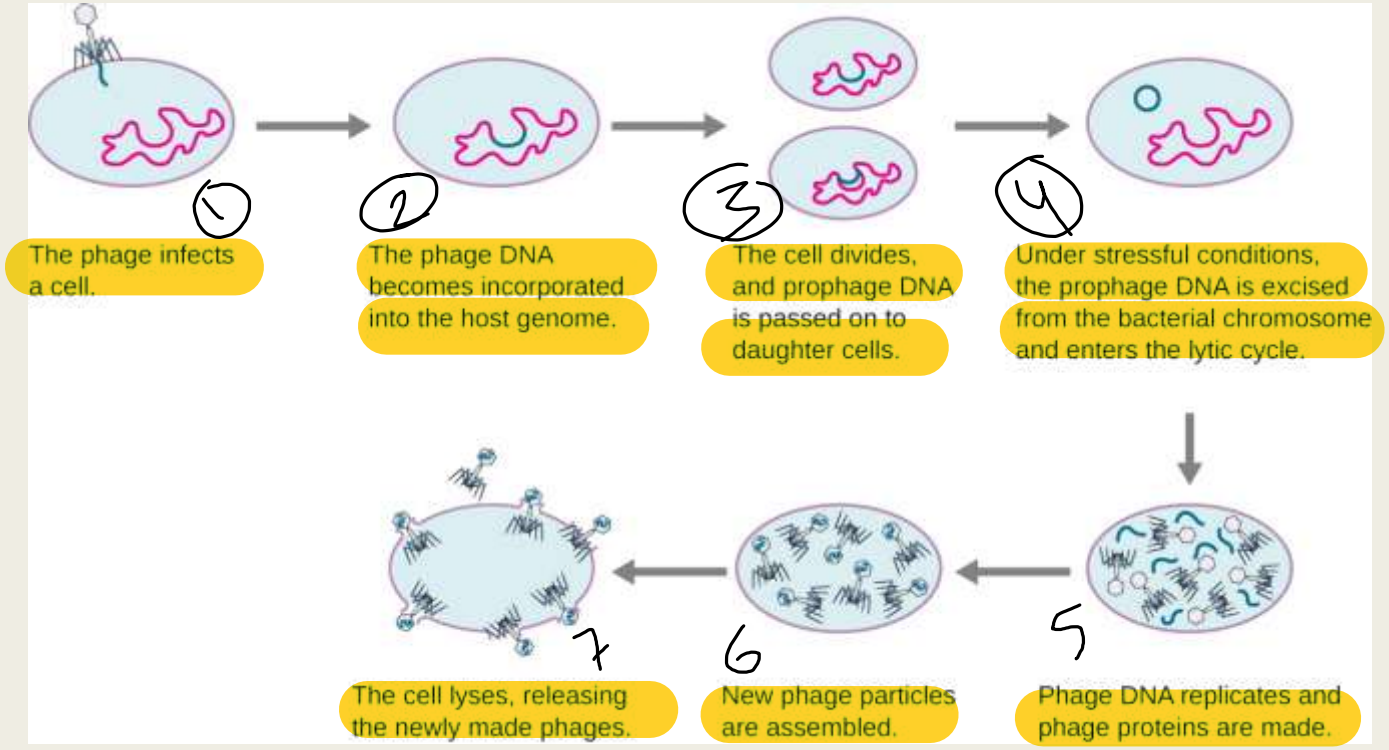
Bacteriophage lambda

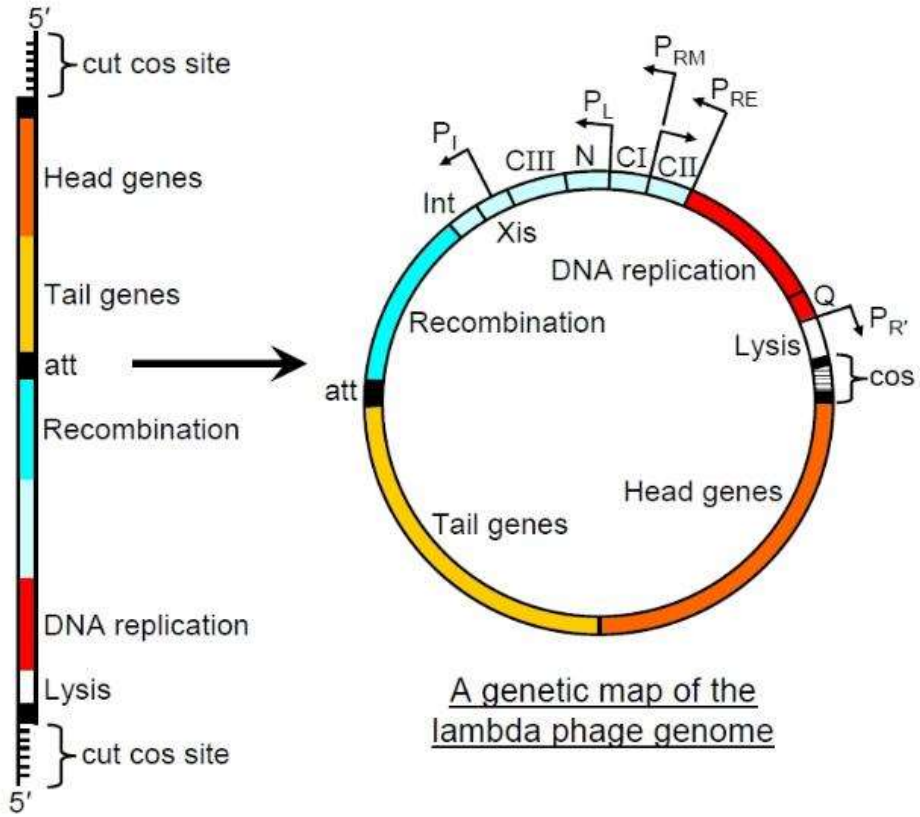
البكتيريا ممكن تتعرض لهجوم من virus. وهاد
يربط على السطح ويدخل DNA الي يروح يرتبط مع
DNA تبع البكتيريا ويعمل virus جديد وبعده
يفجرها للخليه البكتيريا ويطلع 10-15 virus
ولكن بحاله page انا بدي اياه يعمل
replication بدون ما يفجر الخليه معناها لازم
اقصقص اي اشي مضر للخليه من DNA الفيروس

- **Phage lambda** is a **bacteriophage** or **phage**, i.e. bacterial virus, that uses *E. coli* as host.
- Its structure is that of a typical phage: **head, tail, tail fibres.**
- **Lambda viral genome:** 48.5 kb linear DNA with a 12 base ssDNA "sticky end" at both ends; these ends are complementary in sequence and can hybridize to each other (this is the **cos** site: **co**he**s**ive ends).
- **Infection:** lambda tail fibres adsorb to a cell surface receptor, the tail contracts, and the DNA is injected.
- The DNA circularizes at the **cos** site, and lambda begins its life cycle in the *E. coli* host.

Created with Notewise

Bacteriophage lambda





A genetic map of the lambda phage genome

When packaged in the phage head the dsDNA is linear with single-stranded complementary overhangs of single-stranded DNA at the *cos* site at each end. In the host these 'sticky-ends' join together (and are sealed by the host enzyme ligase) to form a circular dsDNA molecule protected from degradation by host exonucleases. The host enzyme DNA gyrase also supercoils the dsDNA.

Created with Notewise