MIRACLE Academy

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

تفريغ البيوتكنو
زميلتكم حلا عبد الجابر

لجان الدُّفعات

ربّ اشرح لى صدري، ويسّر لى أمري، واحلل عقدة من لسانى يفقه قولي، باسم الله الفتاح، اللهم لا سهل إلا ما جعلته سهلا، فإنك إن شئت تجعل الصعب سهلا يا أرحم الراحمين.

أحسن من Lambda virus🦠
حيث انه هو عبارة عن Plasmid و أجزاء من فيروس lambda اسمها Cos sites، نستخدمه لأنه بقدر يحمل قطع DNA طويلة أكثر من plasmid العادي.

Cosmid Cloning Vectors

يتم تحصيله من أنواع مختلفة من البكتيريا، بقصوه بـ Restriction enzymes بعدين بنجيب DNA insert بنكون قاصينه بنفس الـ Restriction enzyme و بندخلها عالـ Cosmid و مباشرة بنروح بنمسكه و بنعبيه هو والـ DNA اللي فيه بداخل Capsid الفيروس

- Fragments from 30 to 46 kb can be accommodated by a cosmid vector.
- Cosmids combine essential elements of a plasmid and Lambda systems.
- Cosmids are extracted from bacteria and mixed with restriction endonucleases.
- Cleaved cosmids are mixed with foreign DNA that has been cleaved with the same endonuclease.
- Recombinant cosmids are packaged into lambda capsids
- Recombinant cosmid is injected into the bacterial cell where the cosmid arranges into a circle and replicates as a plasmid. It can be maintained and recovered just as plasmids.

الـ cosmid تاع البكتيريا حكينا إنه داخل Capsid و هاد مجرد ما دخل جوا بصيرله Cyclization و ببلش يتصرف كإنه Plasmid لكن بس حجمه أكبر و بقدر يحمل كمية أكبر ، فبروح الـ Capsid تاع الفيروس بعمل injection للـ DNA تاعنا اللي هو الـ Cosmid فبس يدخل عالخلية و يصيرله Replication على أساس إنه Plasmid بروح بعمله Recovery يعني بكسر الخلية و بطلّع هاد الـ Plasmid.

Cosmid vector

- Thus, have some advantages of Lambda as Cloning Vehicle:
- Strong selection for cloning of large inserts
- Infection process rather than transformation for entry of chimeric DNA into *E. coli* host
- Maintain Cosmids as phage particles in solution
- **But** Cosmids are Plasmids:
  so cloning proceeds via *E. coli* colony formation

يعني ممسوخ بنكون مركبين شغلتين مش متطابقين زي الوحش راس تمساح مع جلد
حية فالمعنى الحرفي لـ Chimera هو Any two different organisms

فوائد الـ Cosmid vector :
1️⃣ يستخدم الـ Lambda virus كـ Cloning vehicle

2️⃣ حجمه أكبر من Phages و Plasmid

3️⃣ مش مضطر يدخل جوا DNA البكتيريا لإنه عملية Transformation من خلال Inj يعني بروح بصير inj للـ DNA جوا الخلية كإنه فيروس ومباشرة بصير Cyclization و بعدها بتصرف كإنه Plasmid.

4️⃣ الـ infection process يعني زي كإنه فيروس و دخلته وعملت infection للخلية

نفس اللي شرحناه بس موضح بالمثال الموجود بالرسمة عنا **Typical cosmid** اللي هو **pjB8** شرحها كامل بالسلايد الجاي👇

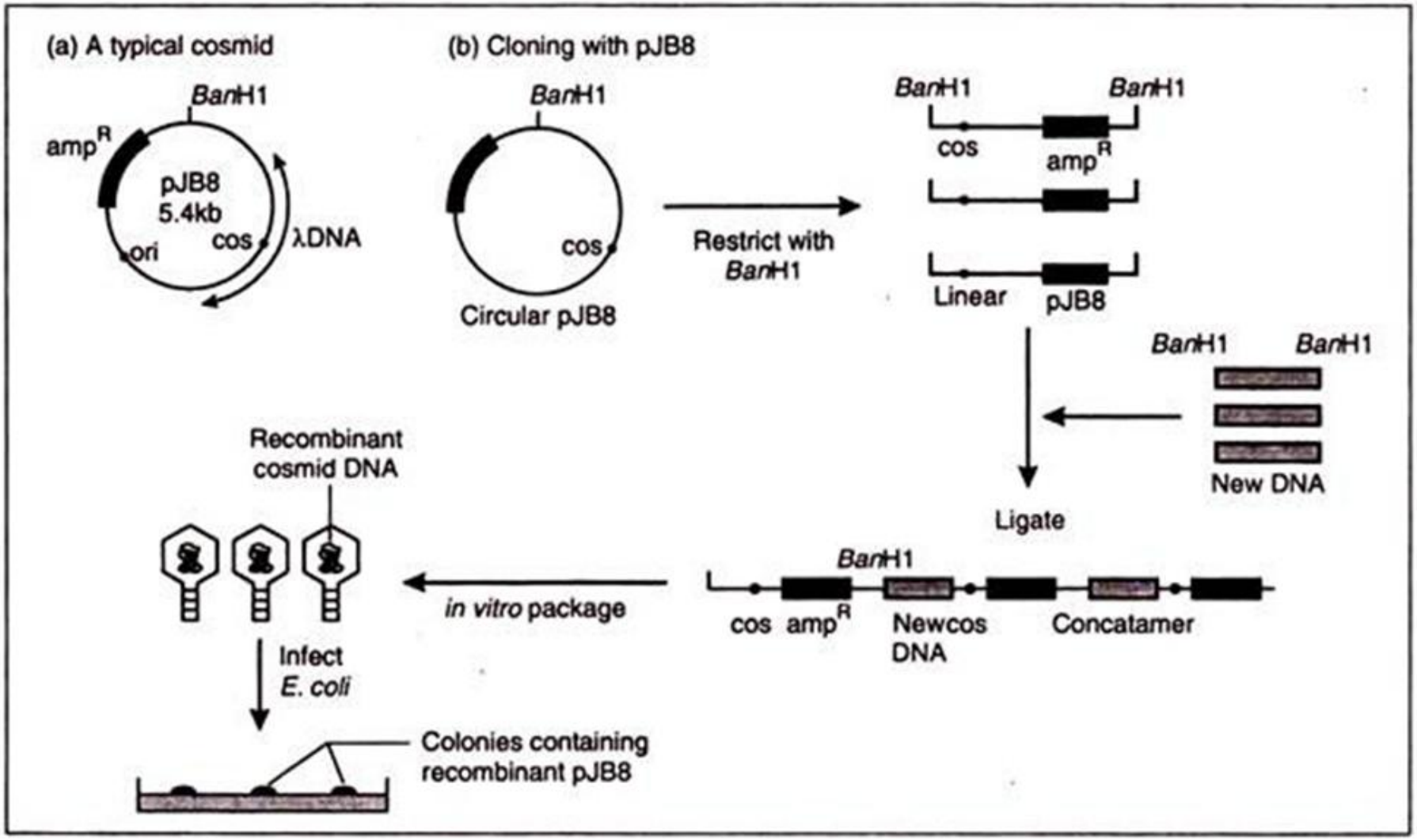


Fig. 4.38: A typical Cosmid vector and the way it is used to clone long fragments of DNA

🟢 مكونات pjB8 cosmid :

➡️ ampR → مقاومة أمبيسيلين (عشان نعمل selection).

➡️ori → نقطة بدء التكاثر داخل البكتيريا.

➡️cos → مواقع على الفيروس تسمح بالتغليف داخل ال Capsid .

➡️ BanH1 → DNAهو موقع قطع نستخدمه عشان نفتح .

🟢الخطوة الأولى: فتح Cosmid

⬅️يكون الـ Cosmid دائري.

⬅️ نستخدم إنزيم BanH1 وهاد بعمل قطع عند موقعه.

⬅️ يصبح الـ Cosmid عبارة linear cosmid (مفتوح) وفيه sticky ends جاهزة لاستقبال DNA.

🟢الخطوة الثانية: تجهيز الـ DNA اللي بدنا ندخّله

⬅️الـDNA اللي بدنا ندخلّه يتم قصّه بنفس الإنزيم BanH1.

ليش طيب؟
لأن لازم تكون الأطراف متوافقة حتى يتم الربط بسهولة.

🟢 الخطوة الثالثة: الربط (Ligation)

⬅️نركّب الـ Cosmid مع الـ DNA insert عن طريق ligase enzyme.

⬅️بعدها بطلع معنا Recombinant Cosmid DNA
وهو عبارة عن الـ Cosmid مركب معه DNA insert.

🟢 الخطوة الرابعة: Packaging داخل فيروس lambda

⬅️الـ Cosmid فيه Cos sites.

هذه الـ Cos sites تسمح للـ DNA إنه يدخل داخل Shell of capsid تبع فيروس λ

رغم إنه الـ Cosmid مش فيروس معناها ما بزبط يصيرله packaging بس بسبب وجود cos site بتخلي packaging يصير.

🟢 الخطوة الخامسة: إصابة البكتيريا (Infect E.coli)

⬅️الفيروسات المحملة بالـ Cosmid تدخل DNA إلى E. coli.

بعدها يشتغل ori ويصير الـ Cosmid يتكاثر زي أي plasmid.

🟢الخطوة السادسة: اختيار الـ Colonies

⬅️نحط البكتيريا على طبق فيه Ampicillin.

⬅️فقط البكتيريا اللي أخذت الـ Cosmid (وفيه ampR) بتعيش.

⬅️ الـ Colonies الناتجة بتكون عبارة عن بكتيريا تحتوي على DNA الجديد اللي دخلناه داخل الـ Cosmid.

Yeast Artificial Chromosomes

YAC

عنا 46 كروموسوم بجسمنا ،فبندخّل واحد زيادة و بصيروا 47 كروموسوم بكون حامل كمية كبيرة من الجين يعني من 100kb إلى 10Mbيعني من مئة ألف قاعدة إالى عشرة مليون قاعدة!

⬅️فبالتالي رح نحتاج لـ Very large insert، الـ Vehicle تاع الـ YAC هو Plasmid

⬅️بنروح بنعمل Chimera مكوّن من:
الـ DNA تبعنا + linear DNA of YAc

- **Purpose:**
- Cloning vehicles that propagate in eukaryotic cell hosts as eukaryotic Chromosomes
- Clone **very** large inserts of DNA: 100 kb - 10 Mb
- **Features:**
  YAC cloning vehicles are plasmids
  Final chimeric DNA is a linear DNA molecule with telomeric ends
- Often have a selection for an insert

لازم يكون في Selection عشان نعرف دخل ولا ما دخل

- YAC cloning vehicles often have a bacterial origin of DNA replication (**ori**) and a selection marker for propogation of the YAC through bacteria.

مكوّن من Bacterial origin

- The YAC can use both yeast and bacteria as a host

هاد الكروموسوم بعد ما عملناله Cloning و دخّلنا الـ insert عندي وقتها خيارين يا بدخّله على Bacteria عشان اعمل اله Expression أو بدخّله على Yeast عشان أعمل اله Expression.

الشرح بالسلايد الجاي افهموه بعدين ارجعوا اقرأوا هي السلايد و شوفوا الرسمة

Yeast Artificial Chromosomes (YAC)

- YACs are designed to replicate as plasmids in bacteria when no foreign DNA is present. Once a fragment is inserted, YACs are transferred to cells, they then replicate as eukaryotic chromosomes.
- YACs contain: a yeast centromere, two yeast telomeres, a bacterial origin of replication, and bacterial selectable markers.
- YAC plasmid→Yeast chromosome
- DNA is inserted to a unique restriction site and cleaves the plasmid with another restriction endonuclease that removes a fragment of DNA and causes the YAC to become linear. Once in the cell, the rYAC replicates as a chromosome, also replicating the foreign DNA.

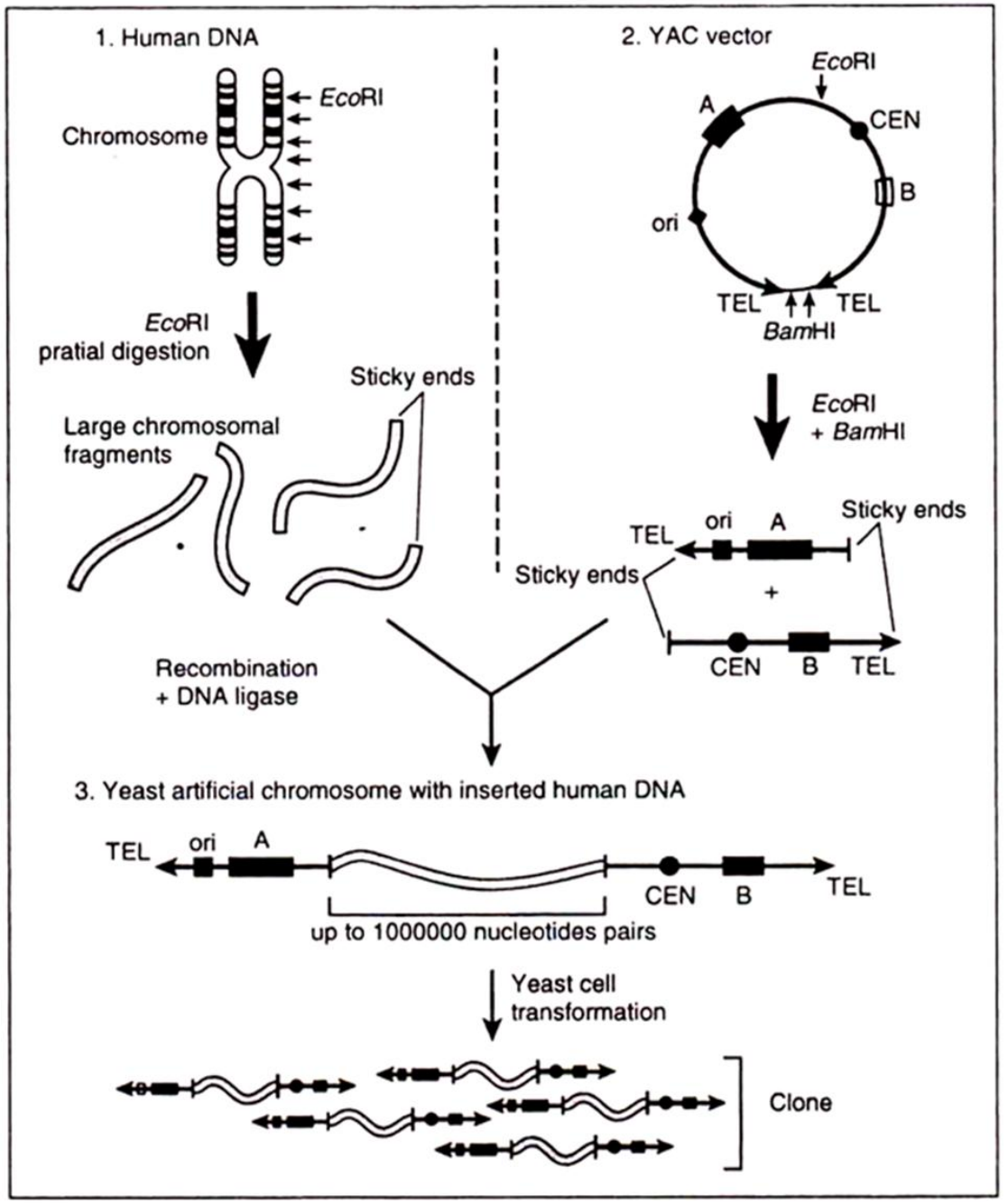


Fig. 4.45: The steps involved in cloning a large segment of human DNA in YAC

🟢YAC = كروموسوم صناعي في الخميرة (Yeast Artificial Chromosome)

⬅️يعني هو vector ضخم بيقدر يحمل قطع DNA هائلة ممكن توصل لمليون زوج قواعد.

يشتغل بطريقتين:

في البكتيريا → مثل plasmid

لما ندخله على الخميرة → يصير زي كروموسوم حقيقي ويتضاعف كأنه جزء من الخلية.

🟢مكونات الـ YAC الأساسية:

➡️TEL → Telomir (عشان يعيش ككروموسوم خطي) من طرفين.

➡️CEN → centromir (عشان ينفصل وقت الانقسام بشكل صحيح).

➡️ORI → (عشان يتكاثر بالبكتيريا) موقع بدء النسخ البكتيري.

➡️Selectable markers → (لتحديد اللي أخذوا الناقل) جينات مقاومة.

➡️ BamHI و EcoRI

🟢الخطوات اللي بالرسمة :

⬅️نقص DNA قطع كبيرة.

⬅️ نفتح YAC فبصير linear .

⬅️ ندخل الـ DNA فيه (ligation).

⬅️نضعه داخل yeast.

⬅️الـ yeast تتعامل معه كأنه كروموسوم طبيعي.

⬅️نحصل على خلايا تحتوي DNA بشري ضخم.

Bacterial Artificial Chromosomes(BACs) and Yeast Artificial Chromosomes(YACs)

- BACs can hold up to 300 kbs.
- The F factor of E.coli is capable of handling large segments of DNA.
- Recombinant BACs are introduced into E.coli by electroportation (a brief high-voltage current). Once in the cell, the rBAC replicates like an F factor.
- Example: pBAC108L
- Has a set of regulatory genes, OriS, and repE which control F-factor replication, and parA and parB which limit the number of copies to one or two.
- A chloramphenicol resistance gene, and a cloning segment.

DNA of bacterial filaments

الـ BAC أصغر من الـ YAC حيث إنه بحمل بس لحد 300kb، وهو يعتمد على F factor اللي هو DNA of baterial filaments و بروحوا بعملوا منه Artificial Chromosome بكون بحتوي على مجموعة من الـ Regulatry genes، و الـ Resistance هون هو Chloramphenicol، و كمان الـ Transformation هون عن طريق Electrophoresis يعني مثل كهربا و Current بتطلع بتروح بتفتح الـ Pores و بيدخل الـ DNA.

Human Artificial Chromosomes (HAC)

- A human artificial chromosome (HAC) is a mini-chromosome that is constructed artificially in human cells. That is, instead of 46 chromosomes, the cell could have 47 with the 47th being very small, roughly 6-10 mega-bases in size, and able to carry new genes introduced by researchers.

- Using its own self-replicating and segregating systems, a HAC can behave as a stable chromosome that is independent of the chromosomes of host cells.

بندخل كروموسوم صغير (mini chromosome) جنب الـ 46 كروموسوم فبصيروا 47 برضه وهاد الكروموسوم بكون محمّل بـ New gene فبعدين عندي خيار يا بدخّله على Human cell أو Eukaryotic cell مثل Yeast و بصير ينقسم هالكروموسوم لحاله بدون الإعتماد على كروموسومات الـ Yeast أو الـ Human cell

Retroviral Vectors

الشرح بالسلايد الجاي

- Retroviral vectors are used to introduce new or altered genes into the genomes of human and animal cells.
- Retroviruses are RNA viruses.
- The viral RNA is converted into DNA by the viral reverse transcriptase and then is efficiently integrated into the host genome
- Any foreign or mutated host gene introduced into the retroviral genome will be integrated into the host chromosome and can reside there practically indefinitely.
- Retroviral vectors are widely used to study oncogenes and other human genes.

⬜ الـ **Retiroviral vector** هم عبارة عن **RNA virus** يعني ما عندهم **DNA** و إنما **RNA** مثل **Corona virus** و **HIV**.

⬜ نعدل الـ **Retiroviral vector** ونضيف له الجين اللي بدنا ياه، بعدين منعمله **Packaging** داخل **capsid**. الفيروس بطبيعته يملك **Reverse Transcriptase**، فلما يفوت على الخلية بيحوّل **RNA → DNA** ويدمج الجين داخل كروموسوم الخلية. بعد هيك الخلية بتبلش تنسخ الجين وتنتج بروتيناته، وهاي الطريقة بنستخدمها بدراسة جينات السرطان والجينات البشرية.

Expression vectors

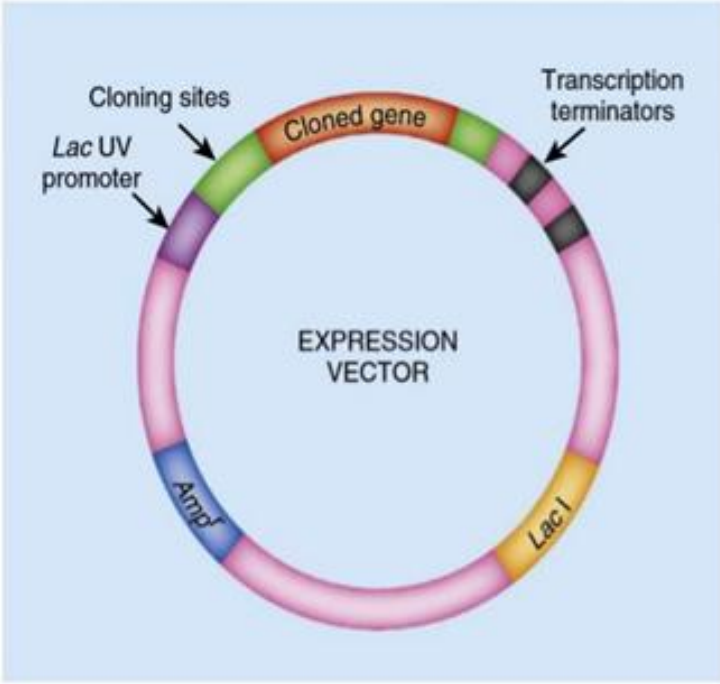
- Allows a cloned segment of DNA to be translated into protein inside a bacterial or eukaryotic cell.
- Vectors will contain the:

(a) *in vivo* promoter

(b) Ampicillin selection

(c) Sequencing primers

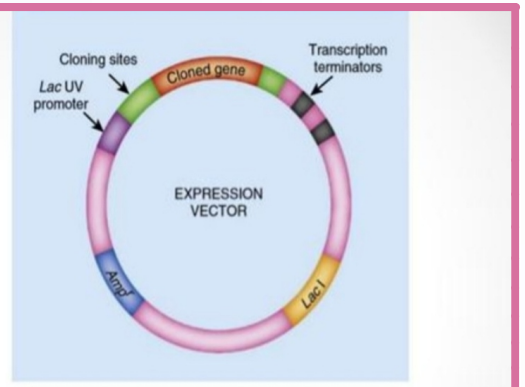
هي موجودة بالـ **Vectors** تاعت الـ **Cloning** فلازم نعمل **Sequencing** قبل ما ننتقل لعملية الـ **Expression** فلازم نتأكد أول إنه الـ**sequence** صح ثم **Expression** بعدها كمان مرة بعمل **Sequencing** وبرجع بعمل كمان **Expression** و إذا صح و مضمون ببلّش أصنع مثلا لو فرضا كان إنسولين بعد كل هالمحاولات و التأكيد بصنعه مش اصنع كمية وبعدين انصدم الـ **Sequences** غلط!



Expression Vectors Have Tightly Regulated Promoters: eg lacUV promoter. To stimulate transcription, the artificial inducer, IPTG, is added. IPTG binds to the LacI repressor protein, which then detaches from the DNA. This allows RNA polymerase to transcribe the gene. Before IPTG is added, the LacI repressor prevents expression of the cloned gene.

كل الـ Vectors المستخدمة بالـ Cloning فيهم تقريباً كل هي الخصائص ما عدا أول وحدة يُفضّل إنه ما يكون فيه Strong in vivo promoter عشان حكينا خلال عملية الـ cloning ما بدنا شي من البروتين هاد يصيرله Expression حتى ما يكون عنا Toxic و ما يطلعلنا شي.

فبالتالي بنعمل replication قد ما نقدر و نطلّع الشي الصح و الكمية المزبوطة بعدين بس نيجي عند جزئية الـ Expression vectors هون بهمني يصير Expression فبنستخدم Strong promoter و أكيد بهمنا تكون العملية Regulated وهالشي من خلال lacZ اللي بينتج β-galactosidase.



Expression Vectors Have Tightly Regulated Promoters: eg lacUV promoter. To stimulate transcription, the artificial inducer, IPTG, is added. IPTG binds to the LacI repressor protein, which then detaches from the DNA. This allows RNA polymerase to transcribe the gene. Before IPTG is added, the LacI repressor prevents expression of the cloned gene.

الـ IPTG يستخدم لتحفيز عملية الـ Expression و الـ X gal هو اللي بكسّر الـ Bond فبحوّللنا لونها للون الأزرق ، فإضافة IPTG بيحفّز تصنييع β-galactosidase بس ممكن نستخدم lactose بدل IPTG لكن الـ lactose عبارة عن Promoter مستهلك يعني مجرد ما تبلّش العملية و بلّش يصير Breakdown of lactose و يتم إستهلاكه بالـ β-galactosidase فعشان هيك احنا بدنا شي Stable و ما يخلص اللي هو IPTG لذلك استخدمناه بدل Lactose

IPTG =Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside

العنصر	lacZ	IPTG
نوعه	جين (DNA)	مادة كيميائية (Inducer)
وظيفته	يصنع إنزيم β-galactosidase	يشغل / يفعّل lac operon
دوره في التجارب	يستخدم كـ reporter (يعمل لون أزرق مع X-gal)	يحفّز التعبير الجيني مثل lacZ أو الجينات تحت نفس الـ promoter
متى يكون مفيد؟	لمعرفة إذا حدث إدخال DNA (insertion) – أبيض/أزرق	لزيادة تعبير البروتين داخل البكتيريا
هل يتكسر داخل الخلية؟	لا ينكسر لأنه جين	لا يتكسر (non-metabolizable) لذلك تأثيره ثابت
مرتبط بـ؟	Lac operon (جين داخله)	Lac repressor (ينزع القمع عن operon)

lac repressor = بروتين يمنع تشغيل جينات هضم اللاكتوز.

موجود عشان البكتيريا ما تشتغل على اللاكتوز إلا لما يكون موجود.

يرتبط بالـ Operator ويمنع النسخ.

ينفصل لما يرتبط به لاكتوز أو IPTG.

الـ **Lac operon** هو نظام جيني موجود في بكتيريا **E. coli**، مصمَّم ليسمح للخلية **تستخدم سكر اللاكتوز فقط لما يكون موجود**، وتوقف استخدامه لما يكون مش موجود.
يعني هو **زر تشغيل وإطفاء** لجينات خاصة بهضم اللاكتوز.

Types of expression systems

- Bacterial: plasmids, phages
- Yeast: plasmids, YACs
- Insect cells: baculovirus, plasmids
- Mammalian:
  - viral expression vectors (gene therapy):
    - SV40
    - vaccinia virus
    - adenovirus
    - retrovirus
  - Stable cell lines (CHO, HEK293)

الـ Mamalian كل الـ Expression vector
تاعته هي Viruses معناها بنقدرش ندخل
للخلية إلا عن طريق نعمل Infection بفيروس
وفيه DNA اللي بدنا نعمله Expression.

هدول Normal cell و في ممكن خلايا سرطانية
بس مستحيل نستخدمها لإنه حتى لو عملت
Purification إلا ما يضل جزء من خلية سرطانية
و تعمل بلاوي عند الناس ،بالمقابل خلية عادية
تمام ما بدخل بلاوي للمريض بس بحتاج أحط
Growth factor و Growth hormone و طبعا
نمو الخلية العادية بطيء فالكمية مش كبيرة
عشان هيك تكلفة هي العلاجات عالية كثير!

Important features of gene expression

إنه يكون بيتحول للبروتين اللي بدي ياه بشكل جيد لإنه في مصطلح اسمه Rare codone يعني بمون موجود عند Humans و مش عند البكتيريا مثلا و أقرب مثال هو كودون GGA هاد عند الإنسان هو كودون الحمض الأميني Glycine ولكن عند البراميسيوم شي ثاني مش Glycine

- The presence of regulatable promoters.
- The number of copies of cloned genes.
- The location of the cloned genes whether inserted into a plasmid or integrated into host genome.

بهمنا نعرف وين دخلت عشان ما اكون خرّبت جين ثاني

- The translation efficiency of the host.
- The cellular location of the foreign protein and its stability in the host cell.

مثال عنا الـ Growth hormone هاد مشكلته لو استخدمنا البكتيريا كـ vector إنه بيتخزن على شكل inclusion body جوا البكتيريا فما بكون بـ Cytosol البكتيريا بحيث مش بسهولة بطلّعه عن طريق كسر الخلية لا و إنما أعقد من هيك لازم لسا كمان نكسّر الـ Inclusion body عشان هيك رحنا استخدمنا mamalian cell لإنه هرمون و بصير يتصرف زي باقي هرمونات الخلية إنه ينفرز بالدم و وقتها خلص ما بنكسّر خلايا و إنما بكل سهولة بناخد الـ Medium بدون أي تكسير

Regulatable promoter

- The presence of a strong regulatable promoter sequence is essential for an effective expression of a cloned gene.
- This is achieved by employing the promoters of E. coli lac (lactose) operon or trp (tryptophan) operon.
- These promoters have strong affinity for RNA polymerase, and consequently the downstream region (of cloned gene) is transcribed.
- The promoters thus provide a switch for turning on or turning off the transcription of a cloned gene

⬜ هدول الـ **Regulatry promoter** خلال عملية الـ **Expression** بهمني هون يكون **Strong** مثل **operon lacZ** اللي حكينا عنه قبل و في كمان **trp operon** وهدول الـ **Promoters** عندهم **Affinity** كثير قوية للـ **RNA polymerase** فبزيدوا عملية الـ **Transcription** ثم **Transformation**.

⬜ من اسمهم **Regulatry** يعني بنقدر نشغّلهم أو نطفيهم.

Expression vectors

- Produces large amounts of a specific protein
- Permits studies of the structure and function of proteins
- Can be useful when proteins are rare cellular components or difficult to isolate

فوائد الـ **Expression vectors** :

1️⃣ بطلّع كميات كبيرة من البروتينات

2️⃣ أوقات بكون الهدف إنه ندرس بروتين معين و نشوف الـ **Enzymatic activity** أو **Hormonal activity**.

3️⃣ لما تكون الكمية قليلة بنروح بننقله عالـ **Plasmid** و ندخله بـ **Ecoli** و بصير **Expression** بكميات قد ما بدنا عشان ادرس الـ **Structure** أو الـ **Function** تاعه.

Common problems with bacterial expression systems

- Low expression levels:
  - change promoter
  - change plasmid
  - change cell type
  - add rare tRNAs for rare codons on second plasmid
- Severe protein degradation:
  - use proteasome inhibitors and other protease inhibitors
  - try induction at lower temperature
- Missing post-translational modification: co-express with kinases etc.
- Glycosylation will not be carried out:
  - use yeast or mammalian expression system
- Misfolded protein (inclusion bodies):
  - co-express with GroEL, a chaperone
  - try refolding buffers

مثلا بدل البكتيريا نستخدم Yeast

لما يكون في Rare codones بنستخدم Rare transfer RNA فالجينات تبعتهم بتكون بالبلازميد فـ بس يدخل للبكتيريا ببلّش يصنّع الـ Rare RNA اللي ناقصة

لمنع تكسير البروتينات

للمحافظة على الـ Protein stability

أحياناً لازم يكون البروتين Phosphorylated عشان يكون Active فلو طلع البروتين Inactive وقتها بنضيف الـ DNA تاع الـ Kinase اللي بعمل عملية Phosphorylation مجرد ما تصنع البروتين

عن طريق استخدام Urea بتعمل Denaturation of protein بعديها بسحبوها شوي شوي لحد ما يعمل Refolding صح مرة ثانية

Reporter Gene Vector

الشرح بالسلايد الجاي افهموه منها وارجعوا هون اقرأوا

- A gene that encodes a protein whose activity can be easily assayed in a cell in which it is not normally expressed
- These genes are linked to regulatory sequences whose function is being tested
- Changes in transcriptional activity from the regulatory sequences are detected by changes in the level of reporter gene expression

أوقات بنكون بنعمل Expression لبروتين و بقل فجأة الـ Expression فلازم نعرف شو السبب ،مثال:

⬅️ بدنا نعمل دراسة على Kinase A وهاد بيتأثر بإضافة الـ Curcumin ،معناها بروح بجيب كميات متساوية من الخلايا و بحط ع كل كمية تركيز مختلف من الـ Curcumin طب ولاحظنا مثلا عند تركيز معين الـ Band خفّت، طب كيف بدي أعرف هل هو قاعد بخفف الـ Expression ولا بقتل بالخلايا عشان هيك بتخف الـ Band ؟؟؟؟

✏️الإجابة : بنستخدم Reporter gene إما اللي هو Actin وهاد اللي بالعضلات إذا بقل معناها الخلايا عم تموت أو نستخدم Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogen اللي بينتج من عمليات الـ Metabolism بالجسم

Shuttle Vectors

- Shuttle vectors can replicate in two different organisms, e.g. bacteria and yeast, or mammalian cells and bacteria.
- They have the appropriate origins of replication.
- Hence one can clone a gene in bacteria, maybe modify it or mutate it in bacteria, and test its function by introducing it into yeast or animal cells.

هو **Vector** ممكن يصيرله **Replication** بأكثر من **Organism** يعني ممكن أعمله **Replication** بالبكتيريا بعدين نقلته على **yeast** برضه بصيرله **Replication** أو مثلا عملية **Cloning** بخلية و **Expression** بخلية ثانية

Cloning Strategy

في معلومات مهم نعرفها عن البروتين قبل عملية الـ Cloning :

- **Strategy** depends on the starting information and desired endpoint.
- **Starting Information or Resources:**
  - Protein sequence
  - Positional cloning information
  - mRNA species / sequence
  - cDNA libraries
  - DNA sequence known or unknown
  - Genomic DNA libraries
  - PCR product

هل الـ DNA sequences معروف إلنا ولا أول مرة بندرسه؟

Insertion of Genes Into Plasmids?

عشان نعرف آلية الـ Cloning كيف بتصير بدنا نفهم 3 مفاهيم أساسية:

- To understand how genes are cloned, we need introduce three terms.
- Recombinant DNA- is mixed DNA
- Vector -it carries recombinant DNA into cells.
- Plasmids - are tiny circular pieces of DNA that are commonly found in bacteria.

Digestion of rDNA and Plasmid

- both rDNA and Plasmid should be digested by the same enzymes
- Plasmid should be dephosphorylated by alkaline phosphatase to prevent self re-ligation

حكينا بنقص الـ DNA و البلازميد بنفس الإنزيم فعشان نضمن إنه البلازميد ما يرتبط مع حاله مرة ثانية بروح بعمله
Dephosphorylation بإستخدام إنزيم اسمه Alkaline phosphatase وهاد الإنزيم رح نحكي عنه أكثر بالسلايد الجاي

- Both digested plasmid and rDNA are run on the agarose gel and the bands are excised from the gel
- Each band will be purified using DNA purification kit

Alkaline Phosphatase

هاد الإنزيم بشتغل بـ Alkaline media و بروح بشيل Phosphate group من على '5 تاعت البلازميد عشان ما يرجع يرتبط بحاله و يرتبط بس مع Recombinant DNA وهي تعتبر أول وظيفة إله

- Alkaline phosphatase removes 5’ phosphate groups from DNA and RNA. It will also remove phosphates from nucleotides and proteins. These enzymes are most active at alkaline pH
- There are two primary uses for alkaline phosphatase in DNA manipulations:
  - Removing 5’ phosphates from plasmid and bacteriophage vectors that have been cut with a restriction enzyme. In subsequent ligation reactions, this treatment prevents self-ligation of the vector and thereby greatly facilitates ligation of other DNA fragments into the vector (e.g. subcloning).

هي الوظيفة الثانية إنه لما بدنا نصنّع Radioactive DNA بنروح بنشيل Phosphate و بنحط Polynucleotide kinase و نضيف Radioactive phosphate عشان يطلع معنا Radioactive DNA

  - Removing 5’ phosphates from fragments of DNA prior to labeling with radioactive phosphate . Polynucleotide kinase is much more effective in phosphorylating DNA if the 5’ phosphate has previously been removed

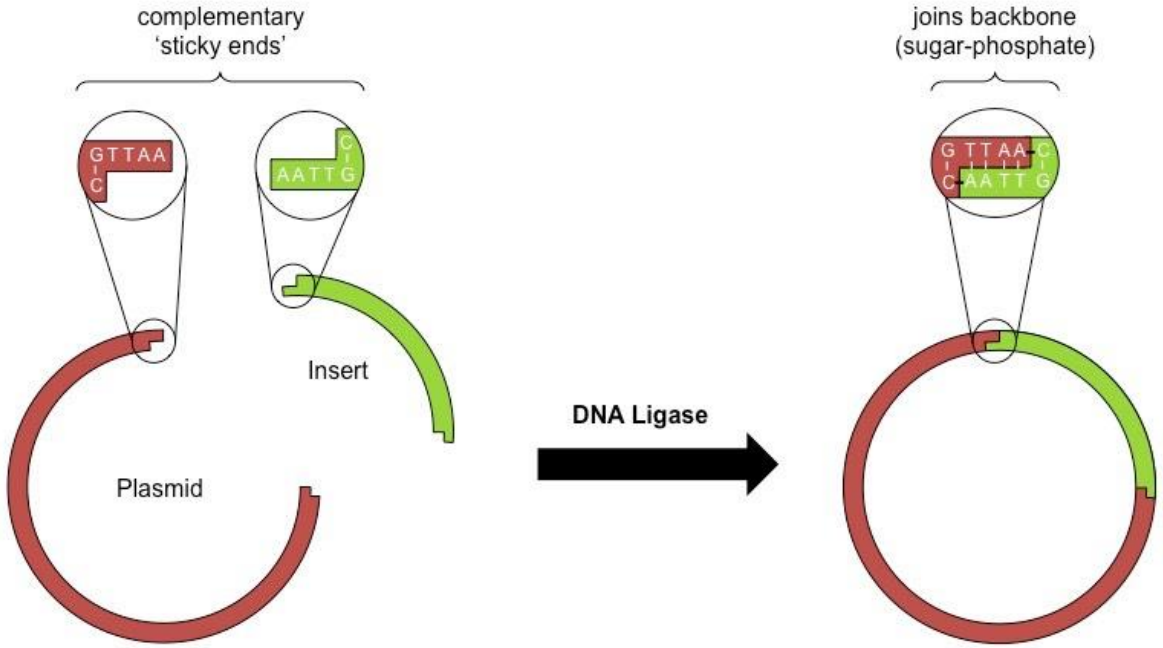
Ligation of the rDNA to the plasmid

- Ligation is performed using DNA ligase catalyzes the formation of a phosphodiester bond between the 3'-OH at one end of a strand of DNA and the 5'-phosphate group of another.
- In animals and bacteriophage, ATP is used as the energy source for the ligation, while In bacteria, NAD^+ is used.

حسب نوع الخلية المستخدم بيتحدد نوع الـ **Energy source** لعملية الـ **Ligation**.

⬅️ إذا **Animal cell** أو **Bacteriophages** : نستخدم **ATP**

⬅️ إذا بكتيريا : **NADP+**



Factors affect ligation

- DNA concentration
- Ligase concentration
- Temperature
- Buffer composition