رغم إنه عدد السلايدات كبير بس المعلومات بتمشي بسرعة لإنه في سلايدات مش مليانة حكي وفي معلومات حكيناها بالتفاريغ السابقة

MIRACLE Academy

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

تفريغ البيوتكنو
زميلتكم حلا عبد الجابر

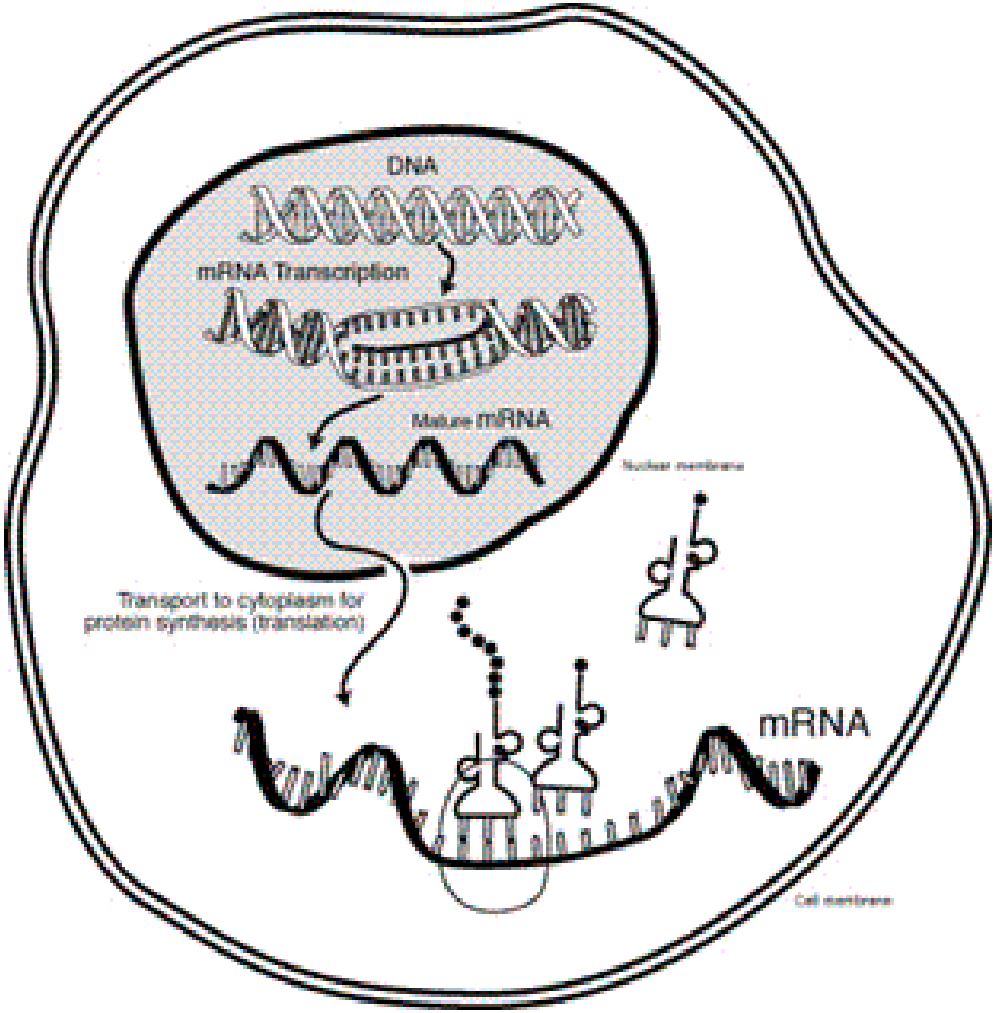
لجان الرُّفعات

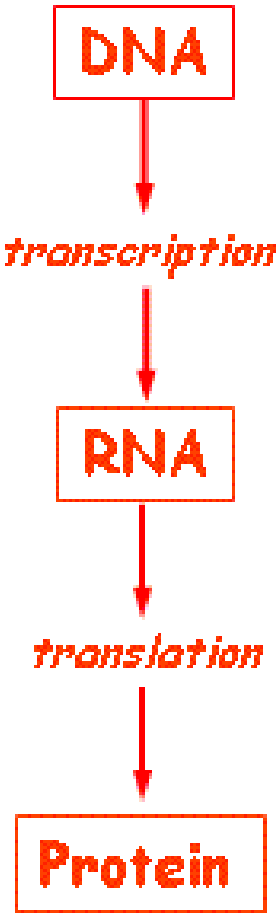
ربّ اشرح لى صدري، ويسّر لى أمري، واحلل عقدة من لسانى يفقه قولي، باسم الله الفتاح، اللهم لا سهل إلا ما جعلته سهلا، فإنك إن شئت تجعل الصعب سهلا يا أرحم الراحمين.

Protein Expression and Purification

نتذكر شو أخذنا بالتسلسل لحد الآن... إحنا حطينا الـ DNA insert داخل Vector و عملناله Sequencing و تأكدنا طبعاً إنه الـ Sequencing صح فهسا بيجي دور نحوّل هذا الـ DNA إلى بروتين يعني نعمل إله Expression وهي العملية تسمي Translation.

Central Dogma of Molecular Biology





Proposed by Francis Crick, 1958

⬅️ فكرة الرسمة اللي فوق :

في شي إسمه Promoters بتروح للـ DNA بتحفّز إنه يصير عملية Transcription، حيث يتحول DNA إلى RNA، هالشي بينتج عنه mRNA.

هي الـ mRNA لسا ضل ينعمل عليها شوية تعديلات، فبيتم قص الـ Introns و بنخلي الـ Exons وبعدها بطلع عنا Mature mRNA.

بيطلع الـ mRNA للـ Cytoplasm وهناك بيجي الرايبوسوم بيمسك الـ mRNA و بقسم كل 3 كودونات لحال عشان يجي tRNA يترجملنا شو الحمض الأميني تاع كل 3 كودونات، وهكذا بضل يتم ترجمة كل 3 كودونات و تكبر السلسلة و يتكون عنا Polypeptide chain و خلص بعدين هي السلسلة بصيرلها Folding عشان تتحول لبروتين .

Expression vector

- The expression vector, otherwise known as an expression construct, is usually a plasmid or virus designed for protein expression in cells
- The expression vector is a plasmid engineered to introduce a particular gene into the target cell

🟢أكثر شي بيميّز الـ Expression vectors إنه عندهم Strong promoters حتى نقدر نعمل On or OFF لهالـ Expression vector و بالتالي معناها بنقدر نتحكم بعملية الـ Expression.

🟢معناها كل لما بدنا نبدأ بعملية الـ Expression بدنا نضيف هدول الـ Strong promoters اللي رح نوضحهم بالسلايدات الجاي.

في مثال على Expression vectors ذكرتهم الدكتورة وهمه pQE-30 و pET-16b و هدول عبارة عن Expression vectors للبروتين بالـ Ecoli.

Protein expression in *E. coli*

pGEX plasmid:

- Gene encoding affinity tag-glutathione S tranferase (GST)
- Spacer between genes - encodes protease cleavage site (thrombin)
- P_{tac} promoter-induce with IPTG
- Ribosome binding site

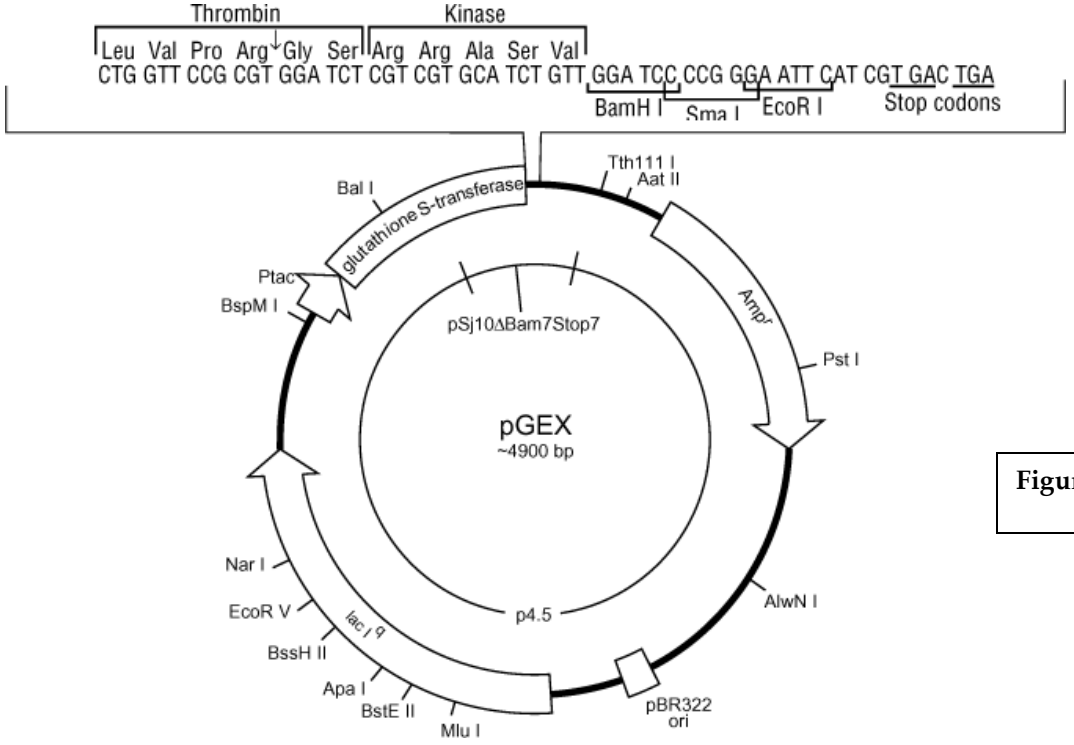


Figure 1: Diagram of the pGEX expression vector.

✅ نحكي هسا الأشياء اللي بنربطها و بنلاقيها بالبلازميد pGEX اللي فيه البروتين تاعنا :

1️⃣ الـ GST اللي هو Glutathione S-transferase ،والهدف من وجوده و ربطه مع pGEX plasmid إنه بيعمل عدة شغلات:

🟢 بيعمل Seperation للبروتين تاعنا عن باقي بروتينات الخلية، لإنه فعليا بس نعمل Expression رح تتم هي العملية لكل بروتينات الخلية و طبعا ممكن يتشابهوا مع البروتين تاعنا بالحجم أو بالـ pH ، فوجود GST بيسهّل إنه نميّز هاد هو البروتين تاعنا لإنه بنلاقي مربوط عليه GST.

🟢بيزيد الـ Solubility للبروتين تاعنا.

🟢بيقلل من إحتمالية تكوين inclusion body.

2️⃣ الـThrombin بوجودالـ Kinase.

3️⃣ الـ His tag.

4️⃣ الـ ptac promoter و اللي بيعمله induction هو IPTG

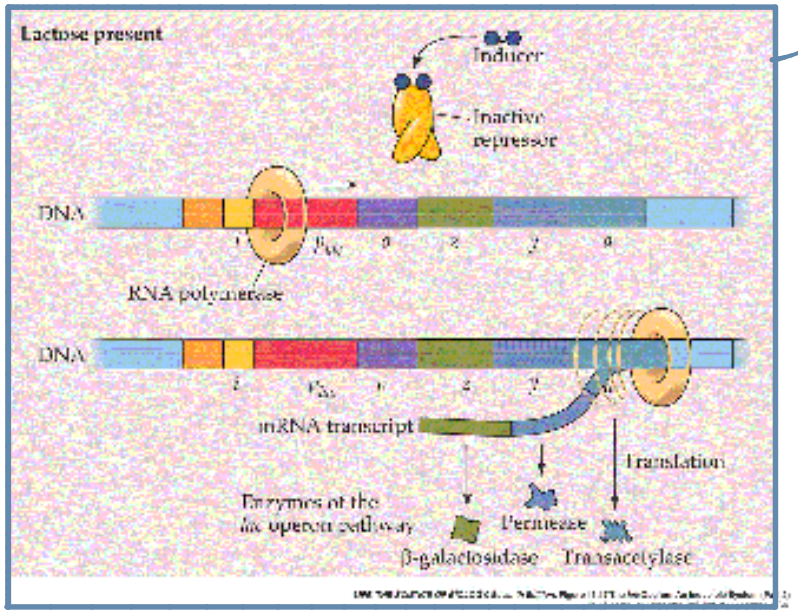
5️⃣ الـ Ribosomes binding site.

هون في توضيح لفكرة الـ Promoters و كيف عملهم، حيث بشوفوا إذا في lactose أو لأ و بناءً عليها يا بيكون الهم Induction effect أو Repressor effect مثل ما هو موضح بشرح الصور :

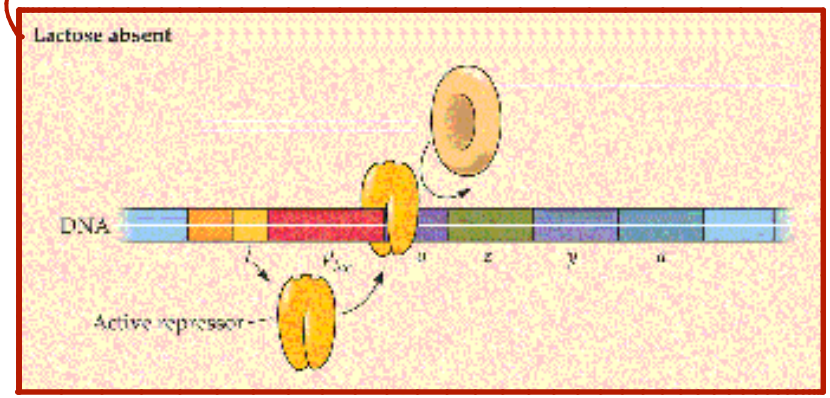
IPTG-inducible protein expression

Isopropyl β–D-1-thiogalactopyranoside

لما يكون اللاكتوز موجود و يعتبر اللاكتوز إنه Inducer
فبروح برتبط اللاكتوز مع الـ Repressor و بفصل الـ
Repressor و بيعطي مجال للـ RNA polymerase فببلش
Transcription ثم Translation.



لما يكون اللاكتوز مش موجود، وقتها بكون رابط
الـ Repressor مع الـ DNA، و في حال اجى Polymerase
عشان يبدأ بعملية الـ Replication بمنعه.



الـ inducer بيكون إما lactose أو IPTG.

Ligation inserts gene in-frame with GST

موضحة بالسلايد الجاي و ارجعوا هون
اقرأوا الملاحظات اللي عالرسمة

In frame in pGEX-2T

```
                          BamHI
CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG GGA ATT CAT CGT GAC TGA CTG ACG
 L   V   P   R   G   S   P   G   I   H   R   D   *
```

هي الاحماض لازم بعد ما ندخل الـ Insert تاعنا ما تتغير و يطلعوا كلهم برضه

Insert into BamHI site → الإدخال بطريقة صحيحة

```
                        BamHI            insert            BamHI
CTG GTT CCG CGT GGA TCC CTG GGT GAG CGT GAA GCG GGA TCC CCG GGA ATT CAT CGT GAC TGA
 L   V   P   R   G   S   L   G   E   R   E   A   G   S   P   G   I   H   R   D   *
```

هيك المفروض تطلع الأحماض الأمينية لو أدخلنا صح.

Out of frame in pGEX-3X

```
                            BamHI
ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCC GGG AAT TCA TCG TGA CTG ACT GAC
 I   E   G   R   G   I   P   G   N   S   S   *
```

Insert into BamHI site → هون الإدخال كان غلط وخربط الكودونات

```
                         BamHI            insert          BamHI
ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCT GGG TGA GCG TGA AGC GGG ATC CCC GGG AAT TCA TCG TGA
 I   E   G   R   G   I   P   G   *   A   *   S   G   I   P   G   N   S   S   *
```

* indicates stop codon

الأحماض الأمينية تغيرت ❗

الفكرة من هالسلايد إنه عنا Sequence تاعتنا رح نلاقي قبلها BamH1 ، و قبل هاد رح نلاقي الـ GST فلما يصير Expression و يطلع كل الـ amino acids اللي موجودين لكن الحلو بسبب وجود الـ GST بقدر اميز انه بعده بتكون الـ Insert تاعتي و بقصها بكل سهولة

في بالصورة فوق كان مصطلح In frame و Out frame:

⬅️الـ Frame in يعني دخلنا الـ insert بشكل صحيح فبنلاقي الـ Amino acids اللي طلعت صحيحة لإنه ما تغير ترتيب الكودونات و بالتالي بندمج البروتين مع GST.

⬅️ الـ Frame out الإدخال كان مش صح حيث صار تغير بترتيب الكودونات بالتالي تسبب بتغيّر الـ Amino acid اللي تم ترجمتها و بنلاحظ تم ترجمة الـ Stop codon بدري وهالشي وقّف البروتين وطلع مش كامل و نتيجة ذلك ما في إندماج بين البروتين اللي كان بدي يطلع مع GST.

Why purify a protein?

- To study its function
- To analyze its physical properties
- To determine its sequence
- For industrial or therapeutic applications

المقصود فيها إنه لما نفصل بروتينات و نستخدمها بالعلاج مثل
الـ Growth hormone أو الإنسولين او Erythropoietin

Steps in Recombinant Protein Purification

موضحة بالسلايد الجاي

1. Design expression plasmid, transform, select
2. Grow culture of positive clone, induce expression
3. Lyse cells
4. Centrifuge to isolate protein-containing fraction
5. Column Chromatography—collect fractions
6. Assess purity on SDS-PAGE

الدكتورة عند نقطة **Centrifugation** حكت بنكب **Supernatent** و مرة ثانية لقدام حكت بالسلايدات انه بناخده ، فأنا رجعت و بحثت لقيت اللي بشرحوا باليوتيوب معتمدين إنه بناخد الـ **Supernatent** و بنكمل شغلنا فيه و هي حطتلكم واحد من المراجع اللي حضرتها: https://youtu.be/rom85WMAm08

🔴 لحد هون إحنا وصلنا خطوة الـ Expression و مثل ما نعرف إنه بصير Expression لكل بروتينات الخلية مش بس لبروتيننا لحاله فمعناها كيف رح اعمل Purification للبروتين تاعي و اقدر افصله عن كل هالبروتينات...

⬅️الخطوات:

1️⃣ نكون عاملين Design للبلازميد و عارفين كيف نعمل اله Transformation و محددين وين الخلايا اللي رح نعمللها Expression هل ببكتيريا أم بـ Mamalian cells ،طبعا هالقرار حسب مين More efficient و مين تكلفتها أعلى ،فالبكتيريا تكلفتها أقل لإنه الـ Culture تاعتها بس عبارة عن Yeast ناشفة بنطحنها بس طبعا في شوية مشاكل فيها بالمقابل Mamalian cell صحيح إنها اغلى (بنستخدم الـ Growth factor كـ Nutrient الها وهاد غالي) و تعطي كمية أقل بس هي المستخدمة فعليا.

2️⃣ بنروح بنزرع الخلية اللي اخترناها عشان تبلش تتكاثر و تكثّر ببروتيني اللي بدي ياه بس طبعا قبل لنكثّره على large scale لازم بالاول نكثّر كمية أقل و نتأكد إنه الـ Sequencing صحيح ثم نستخدم Culture أكبر مثل 200ml بعدها بنبلش الـ Expression لبروتيننا.

3️⃣ بنضل نعمل growth للبروتين وبنفس الوقت بنكون بنقيس اله الـ Absorption على 600nm يعني على OD600 لحد ما نشوف الـ Absorption إله وصل 0.5-0.6 خلص وقتها مباشرة بنضيف IPTG وهاد بيعمل تحفيز للـ Expression فبلش البروتين يتحفز و يتصنع.

4️⃣ مجرد ما يبلش البروتين يتصنع هون مباشرة بننزل الحرارة لـ 27 أو 25 درجة مئوية في حال مش Heat sensitive لكن لو كان بروتيني Heat sensitive فبنروح بننزلها لـ 15 درجة مئوية.

5️⃣ بعدها بنكسّر الخلايا اللي بتحوي كل البروتينات و نروح نعمل Centrifugation و بناخد الـ Supernatent اللي فيه الخلايا بعدين بنحط الخلايا على column chromatography عشان نفصل البروتين ثم بنحطه على SDS page لنتأكد من الـ Purity.

Why bacteria for protein expression

Bacterial Genetics

- Bacteria grow and divide rapidly
  - Divide every 20 minutes or so
  - Millions of cells can be grown on small dishes of agar or in liquid culture media
- Easy-to-make mutant strains to be used for molecular and genetic studies

⬅️ البكتيريا المستخدمة بتكون نوع معين يحقق شروط منها إنه تنقسم كل 20 دقيقة فمثلا لو بلشنا بمليون فخلال ساعة المفروض يكونوا صاروا 8 مليون.

⬅️لو لقينا Ecoli (البكتيريا الأكثر استخداما) فلو لقينا في خصائص مش عندها فبنضيفها فمثلا الكودونات اللي بتعطينا Alanine ممكن ما يكونوا كلهم عند البكتيريا لإنه DNA تاعها صغير مش كبير زي تاع الإنسان ،فبكل سهولة نروح نضيف الكودونات اللي مش عندها و بعدها بتصير البكتيريا جاهزة تعمل Expression لأي بروتين.

أكثر Ecoli مستخدمة هي PN21 لإنه إلها Growth سريع و بنقدر نستخدمها بالـ Molecular biology

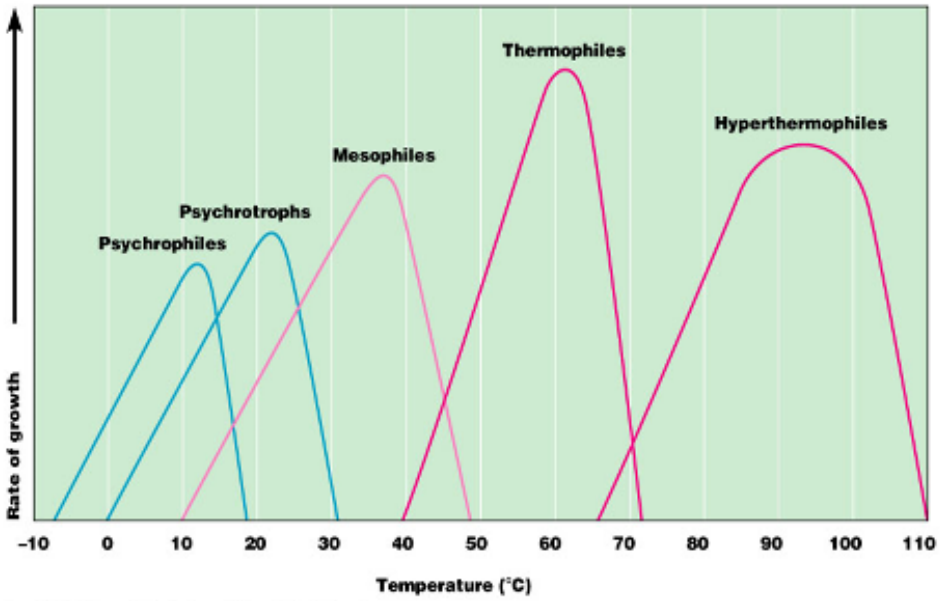
Microbial growth = increase in number of cells, not cell size

The Requirements for Growth:

1. Physical Requirements

Temperature range where organisms can grow:

- Minimum growth temperature
- Optimum growth temperature (best range)
- Maximum growth temperature



هي الحرارة اللي بندور عليها لإنه بكون أعلى Growth للبكتيريا عندها

🔴 الـ psychophiles و psychotrops بيتحملوا الحرارة المنخفضة

🔴 الـ Mesophiles هي مثل الـ Ecoli و الـ Optimum temp إلهم هي 37°.

🔴 الـ Thermophiles هي بتتحمل الحرارة العالية، بنلاقيهم بالينابيع الحارة.

Physical Requirements:

pH

قريبة من pH الدم اللي هي 7.4

- Most bacteria grow between pH 6.5 and 7.5.
- Molds and yeasts grow between pH 5 and 6.

الـ Yeast و الـ Mold
بيحتاجوا Acidic media

- Acidophiles grow in acidic environments (coal mines).

Osmotic Pressure

يعني أكم نسبة الملح الموجودة

- Hypertonic environments, increase salt or sugar, cause plasmolysis. It inhibits cell growth
  - This phenomenon is used to stop food spoilage.

مثل صناعة المخلل و المربى،
تركيز الملح أو السكر العالي
بيمنع نمو البكتيريا

- Extreme or obligate halophiles require high osmotic pressure since they live in high salt concentrations.
- Facultative halophiles can tolerate high osmotic pressure, up to 15% salt.
- Most microorganisms grow in a medium that is nearly all water.

- **The Requirements for Growth:**

2.Chemical Requirements

- Carbon: backbone of living matter
  - Structural organic molecules, energy source
  - Chemoheterotrophs use organic carbon sources energy from protein, carbohydrates and lipids
  - Autotrophs get it from CO_2
- Nitrogen: also needed for synthesis of cellular material
  - In amino acids, proteins
  - Most bacteria decompose proteins
  - Some bacteria derive N from NH_4^+ or NO_3^-
  - A few bacteria use N_2 in nitrogen fixation directly from atmosphere

Chemical Requirements

- (3) Sulfur
  - used to synthesize sulfur-containing amino acids and vitamins (thiamine, biotin)
- (4) Phosphorus
  - used to synthesize nucleic acids and phospholipids
  - In DNA, RNA, ATP, and membranes
  - Phosphate ion, PO_4^{3-} is a source of phosphorus
- (5) Trace Elements
  - Iron, copper, molybdenum and zinc; (Inorganic elements required in small amounts)
  - Usually work as enzyme cofactors
- (6) Organic Growth Factors
  - Organic compounds that are only obtained from the environment
  - Vitamins, amino acids, purines, pyrimidines

أكثر شي مستخدم هو Fetal bovine serum لإنه
أجنة العجول فيها كثير Growth factors

Culture Media

- Culture Medium: Nutrients prepared for microbial growth
- Sterility: No living microbes
- Inoculum: Introduction of microbes into medium

يعني ناخد كمية صغيرة من البكتيريا و نحطها
بـ Growth يعني بداية الـ Growth of bacteria

- Culture: Microbes growing in/on culture medium

يعني نكثّرها

Agar

- Complex polysaccharide
- Used as solidifying agent for culture media in Petri plates, slants, and deeps
- Generally not metabolized by microbes
- Liquefies at 100°C
- Solidifies ~40°C

الـ Agar لا يُستهلك، يعني هو مش غذاء للبكتيريا و إنما بيساعد بتماسك الوسط اللي بتنمو عليه البكتيريا.

إله أشكال كثير ممكن Slant يعني مائل بحيث نحط الـ Tube بوضعية ميلان أو بكون Deep يعني بنزرع البكتيريا لجوا الـ Tube أو Petri desh مثل اللي عملناه بلاب المايكرو.

أول شي بنسخّنه على حرارة 60°-70° فبصيرله melting، بنحطه بالـ Autoave اللي حرارته 121 عشان نضرب عصفورين بحجر إنه بيتحول للـ liquid على حرارة 60 و كمان بيصيرله Sterilization.

بعدين بصيرله Solidification على حرارة 40° لكن إحنا بنصبه بالـ Tube أو Petri desh قبل ليوصل حرارة 40، يعني ممكن نصبه وهي الحرارة 50 و برضه إذا بدنا نضيف Antibiotic بنضيفه على حرارة 50 عشان ما يتكسر بالحرارة لو ضفناه من أول .

الـ Antibiotic لما بدنا نعقمه بزبطش نحطه بالـ Autoclave عشان بيتكسر فلازم نعقمه بعملية الـ Filtration.

أكيد بنكون عارفين مكوناتها للـ Culture media
و أكم الكمية المستخدمة من كلشي حطيناه

Culture Media

- **Chemically Defined Media:** Exact chemical composition is known. The medium must contain organic growth factors that serve as a source of carbon and energy
  - Known for growth of "fastidious" and autotrophic organism

ظروف نموهم صعبة شوي

  - Used in tests to determine concentration of a vitamin in a substance

- **Complex Media:** Extracts and digests of yeasts, meat, or plants
- Nutrient broth: liquid
- Nutrient agar: Solid

Type of Medium	Composition	Usage
Chemically Defined	Precisely known ingredients	For fastidious or autotrophic organisms; vitamin concentration tests
Complex	Extracts from yeast, meat, or plants	General bacterial cultivation

بعد عملية الـ Expression بيجي دور نحفظ البروتين لأطول فترة ممكنة و هالشي ممكن من خلال الطريقتين الآتيات:

- **Preserving Bacteria Cultures**
- ① **Deep-freezing:** -50°to -95°C (30%Glycerol is added to the culture the cells)

بنضيف Glycerol على الـ Growth عشان يمنع الثلج اللي بيتكون خلال التجميد من إنه يدخل لغشاء الخلية و يخربها

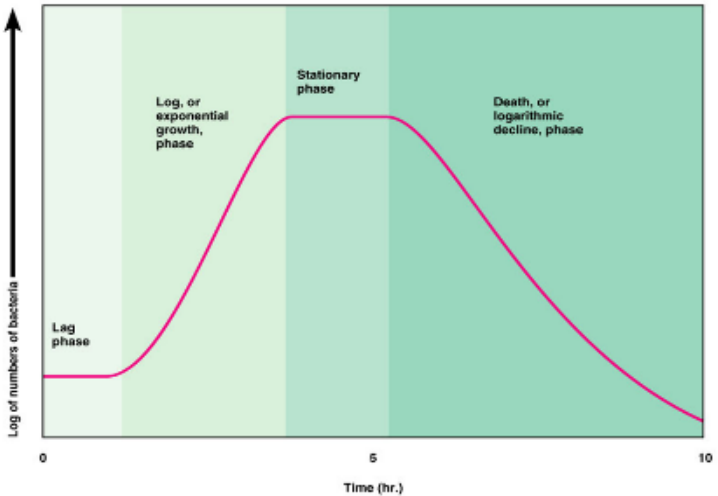
- ② **Lyophilization (freeze-drying):** Frozen (-54° to -72°C) and dehydrated in a vacuum (sublimation)

هون مثل الـ P.aeruginosa أو Ecoli بس نطلبهم من برا بكونوا بـ Vials على شكل Powder، فعشان يكونوا بهالشكل بس بنكون عملنا Sublimintation للمي اللي فيها على حرارة منخفضة تصل لـ -72° ، بعدين لما بدنا نستخدمها ونضيف مي بترجع بتعيش

Phases of Growth

مكتوب شرح هي السلايدة بالسلايدة الجاي👇

- **Lag Phase:** period of little or no cell division since cells do not reproduce immediately a new medium (1 hour to several days)
- **Log Phase or Exponential Growth Phase:** cells begin to divide, enter period of growth or logarithmic increase (straight line). Microorganisms are particularly sensitive to adverse conditions (radiation, antibiotics)
- **Stationary Phase:** growth rate slows, number of microbial deaths balances number of new cells. This is due to exhaustion of nutrients, changes of pH.
- **Death Phase:** logarithmic decline phase starts and continues until the population is diminished to a few cells or dies out completely



الـ Lag phase هون بكون مافي أي Growth لسا، فممكن يحتاج الـ Microorganism لساعات أو أيام ليصيرله Growth وهالشي بيعتمد على نوعه.

بالـ Log phase هون بيكون بلّش الإنقسام و في nutrient كافية و بيكونوا Sensitive to any physical codition.

الـ Stationary phase هون الـ Growth= Death، لإنه هون بتكون بلّشت كمية الـ Nutrient تقل، يعني الخلاصة إنه البقاء رح يكون للأقوى واللي بيتحمل كمية الـ Nutrient القليلة هي، بعد هيك بآخر المطاف بوصلوا مرحلة Death، لكن لو بديش البكتيريا تموت بروح بضيف Nutrients عليها وهيك بتضل بفترة Stationary، و بيزبط كمان وهي بمرحلة الـ Log أضيف عليها Nutrient عشان تضل بالـ Log ولا تروح لمرحلة Stationary.

المراحل اللي بتهمنا منهم همه بس Log و Stationary :

⬅️ لما يكون بدنا Protein أو Primary metabolites مثل الأحماض الأمينة أو اي نواتج من عملية الـ Metabolism نختار Log phase و تحديداً آخر فترة بهي الـ Phase عشان بكون عنا أكبر عدد من البكتيريا و الـ Metabolite تاعتها.

⬅️ لكن لما بدنا Secondary metabolite هدول بنروح بنختار الهم الـ Stationary phase لإنه هدول ما بيتم إنتاجهم إلا تحت Stress condition مثل قلة الـ Nutrients ،أو مثال بدنا نصنع مضاد حيوي مثل Penicillin فإحنا بنعرّض الـ Fungus لـ Stress condition عشان يعطيني البنيسيلين

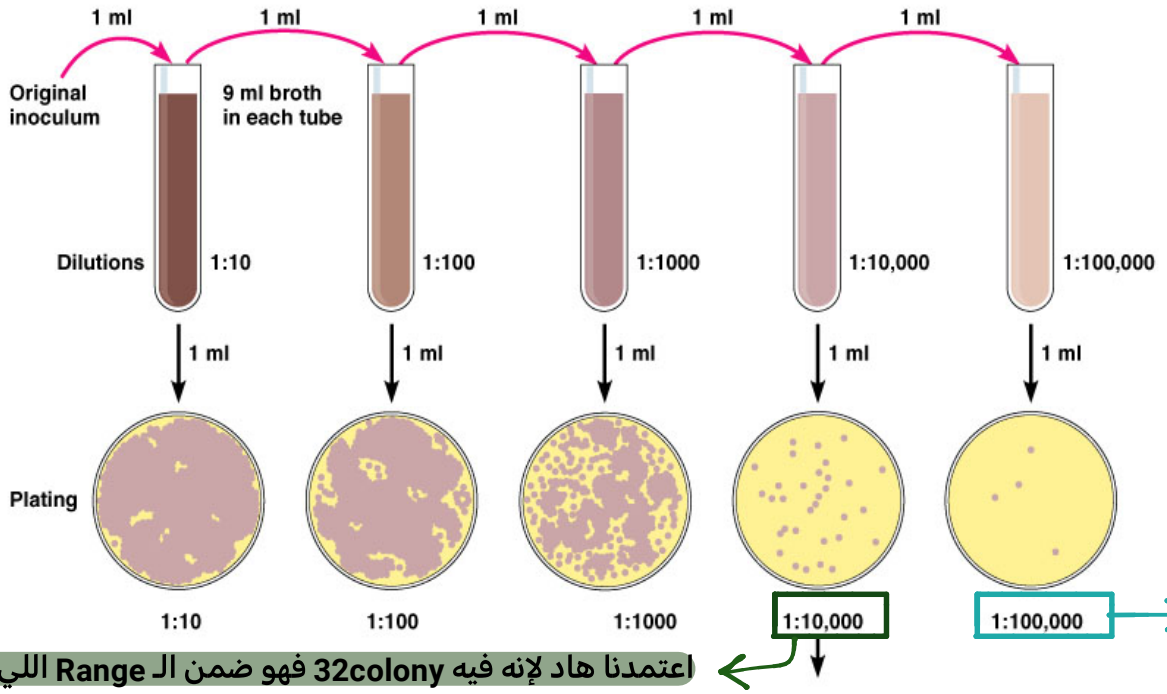
عشان نعرف عدد البكتيريا اللي عنا بالـ Solution عنا طريقتين إما Direct وهي بتعطينا رقم واضح و إما Indirect و بيطلع معنا رقم تقريبي.

Direct Measurements of Microbial Growth:

1. Plate Count Method: Perform serial dilutions of a sample and plate each on an agar-medium plate

After incubation, count colonies on plates that have 25-250 colonies (CFUs)

بنروح بندور مين الـ Petri desh اللي فيه عدد الـ Colony من 25 لـ 250 عدا ذلك أي شي برا هالـ Range ما بعدّه



✅ اعتمدنا هاد لإنه فيه 32colony فهو ضمن الـ Range اللي حكيناه

ما اعتمدناها لإنه فيها 4colony فهي برا الـ Range معناها رح تعطينا عدد للبكتيريا مش دقيق

Calculation: Number of colonies on plate × reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml
(For example, if 32 colonies are on a plate of $^{1}/_{10,000}$ dilution, then the count is 32 × 10,000 = 320,000/ml in sample.)

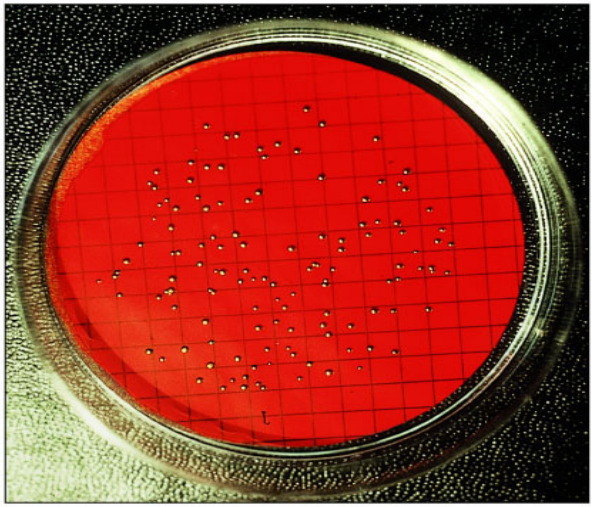
الفلترة تستخدم أكثر شي للمستحضرات الـ Topical حيث إنه معنا حد معين للـ Microorganisms، فهون بيروحوا بفلتروا المي الموجودة من خلال Filter paper و بعدين بيقلبوا هي الـ Filter Paper على Agar plate و بيشوفوا أكم الـ Growth بكل 100ml و بيرجعوا للـ Pharmacopeia ليتأكدوا إنهم ما تجاوزوا الحد المسموح فيه

Direct Measurements of Microbial Growth:

2. Filtration

Bacteria are filtered out of a liquid and then transferred to a Petri dish

(a) The bacteria in 100 ml of water were sieved out onto the surface of a membrane filter.



(b) Such a filter as shown in photo (a) with the bacteria much more widely spaced, was placed on a pad saturated with liquid Endo medium, which is selective for gram-negative bacteria. The individual bacteria grew into visible colonies. One hundred twenty-four colonies are visible, so we would record 124 bacteria per 100 ml of water sample.

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Direct Measurements of Microbial Growth:

3. Direct Microscopic Count

هون بنروح بناخد العينة Tube معموله Dilution و بنشوفها تحت المجهر و بنعد عدد الملايا اللي مبينة تحد المجهر ، بعدها بنقسم العدد هاد على حجم المنطقة اللي عدينا فيها عشان نعرف عدد البكتيريا الأصلي بعينتنا.

$$\text{Number of bacteria/ml} = \frac{\text{number of cells counted}}{\text{volume of area counted}}$$

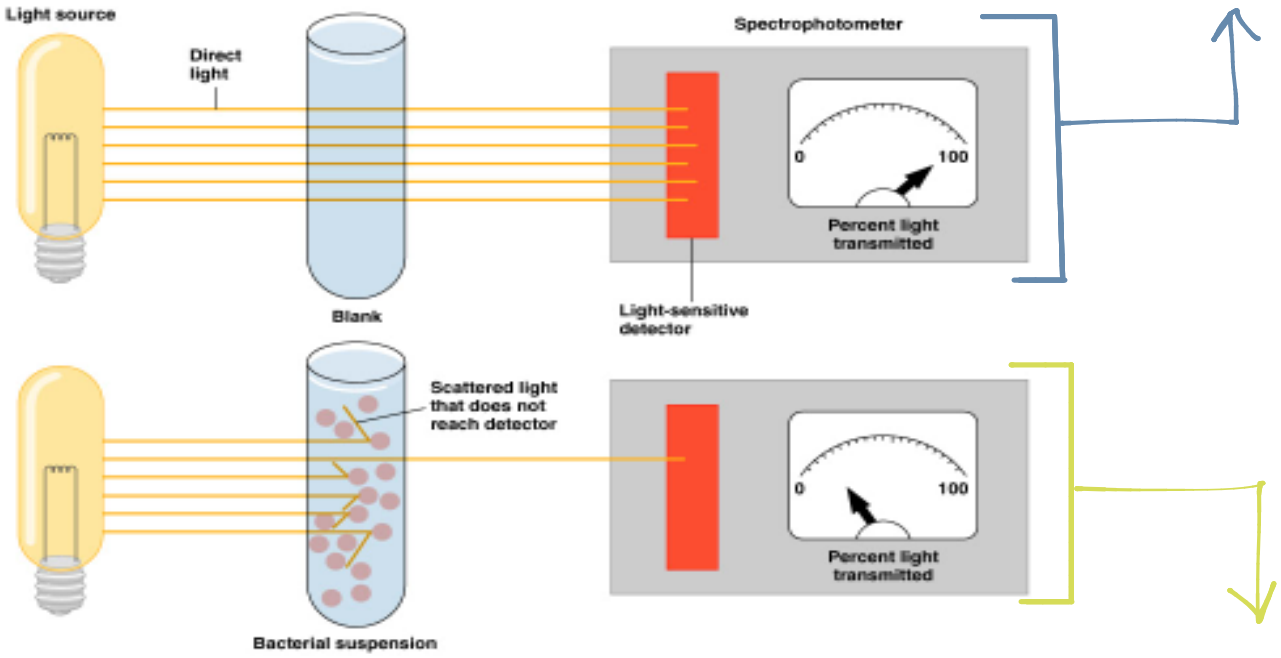
$$\frac{14}{8 \times 10^{-7}} = 17{,}500{,}000$$

موضحة بالسلايد الجاي ، بعدها ارجعوا
شوفوا الملاحظات اللي هون

Estimating Bacterial Numbers by Indirect Methods

Turbidity is not useful to measure contamination of liquids by relatively small numbers of bacteria

هون لما عملنا Standardization ففش فيه بكتيريا و بنلاحظ في high light transmitted و low light diffraction



هون تم إضافة البكتيريا فصار عنا في Low light transmitted و High light diffraction

الـ Estimation هي المستخدمة بالـ Cloning لإنه بنقدرش نعدهم وحدة وحدة، ففي طرق كثير أولها الـ Turbidity.

الـ Turbidity method بيتم تطبيقه عن طريق إنه نحط الجهاز إنه يقيس على 600nanometer (OD600) وبنروح بنجيب Tube بس فيه Culture و بنصفر عليه يعني Standardization ،و بعدها بنبلش نضيف البكتيريا و ببلش الـ Growth و كلما زاد الـ Growth بلش يزيد الـ Absorption لحد ما يوصل 0.5-0.6 بنروح بنضيف IPTG اللي بعمل Induction و وقتها ببلش الـ Expression .

زيادة الـ Absorption معناه إنه عدد البكتيريا اللي عم تنمو أكبر و بنلاحظ إنه رح يصير الـ Light diffraction أكثر و الـ Light transmitted أقل ، وهالشي منطقي لإنه البكتيريا بس يزيد عددها رح تعيق مرور الضوء فبالتالي بيزيد تشتت الضوء.

الـ Expression بضل يزيد يزيد و لكن بمجرد ما الـ Nutrients تبلش إنها تستهلك وتقل أكيد وقتها رح يقل الـ Growth.

هي بنستخدمها لما بدنا نقيس فعالية أدوية معينة على الخلايا السرطانية، فبنروح بنحط كمية متساوية من هي الخلايا بـ Tubes ثم بنبلش نضيف الدوا تاعنا عالـ Tubes بتراكيز مختلفة ،و طبعا أول Tube بنحطش فيه دوا عشان هو الـ Control تاعنا ، المهم بنلاحظ مع زيادة تركيز الدوا رح يتم قتل عدد أكبر ،فبروحوا بعرفوا فعالية الدوا مش من خلال قياس عدد الخلايا اللي ضلت و إنما بيقيسوا كمية الـ CO2 اللي طلعت و الـ Acid و الـ pH ،فطبعا بكون أعلى كمية CO2 رح تكون بالـ Control لإنه كلما زاد عدد البكتيريا معنا في Metabolic activity أعلى يعني CO2.

Estimating Bacterial Numbers by Indirect methods

Metabolic activity: it assumes the amount of a certain metabolic product, such as acid or carbon dioxide, is in direct proportion to the number of bacteria present.

- Determination of vitamin amount assay

Dry weight: used to measure the growth of filamentous organisms.

- Fungus is removed from growth medium, filtered, and dried in a desiccator and then weighed.

هي تستخدم للـ Fungus أكثر شي، ففي حال بدنا نعرف كيف الـ Growth بـ Culture معين بنروح بناخد 1ml من Solution و بنفلتره و ننشفه من السوائل و بنستخدم Desicator لإنه بيسرّع التنشيف لإنه الـ Fungus بيحتاج وقت أطول من البكتيريا ممكن يوصّل لـ 7 أيام ،فبروحوا كل 12 ساعة بياخدوا كمية و بيشوفوا وين وصل الـ Growth.

بعدما أنهينا حديثنا عن الطرق كلها نشوف هسا مين من الطرق
بيسمحلنا نعد العايش و الميت و مين نقدر نعد فيه بس العايش ❓

بتعد العايش و الميت

1. Microscopic count
2. Turbidity
3. Dry weight

بتعد العايش بس

1. Plate count method
2. Metabolic activity
3. Filtration

مطلوبين حفظ، اغلب الجدول معلوماته سهلة واغلبه أخذناه بمادة التعقيم

هدول الجداول برعاية فلاش باك لمادة التعقيم

Aseptic technique that should be practiced

- Sterility of the solutions, the equipment's, the work place

في أكم ملاحظة حكتهم الدكتورة رح اكتبهم بسلايدة بعد ما تخلصوا الجدول بتلاقوهم لتحت

TABLE 7.5 Physical Methods Used to Control Microbial Growth

Method	Mechanism of Action	Comment	Preferred Use
Heat			
1. Moist heat			
a. Boiling or flowing steam	Protein denaturation	Kills vegetative bacterial and fungal pathogens and almost all viruses within 10 min; less effective on endospores.	Dishes, basins, pitchers, various equipment
b. Autoclaving	Protein denaturation	Very effective method of sterilization; at about 15 psi of pressure (121°C), all vegetative cells and their endospores are killed in about 15 min.	Microbiological media, solutions, linens, utensils, dressings, equipment, and other items that can withstand temperature and pressure
2. Pasteurization	Protein denaturation	Heat treatment for milk (72°C for about 15 sec) that kills all pathogens and most nonpathogens.	Milk, cream, and certain alcoholic beverages (beer and wine)
3. Dry heat			
a. Direct flaming	Burning contaminants to ashes	Very effective method of sterilization.	Inoculating loops
b. Incineration	Burning to ashes	Very effective method of sterilization.	Paper cups, contaminated dressings, animal carcasses, bags, and wipes
c. Hot-air sterilization	Oxidation	Very effective method of sterilization, but requires temperature of 170°C for about 2 hr.	Empty glassware, instruments, needles, and glass syringes
Filtration	Separation of bacteria from suspending liquid	Removes microbes by passage of a liquid or gas through a screenlike material. Most filters in use consist of cellulose acetate or nitrocellulose.	Useful for sterilizing liquids (enzymes, vaccines) that are destroyed by heat

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

TABLE 7.8 Chemical Agents Used to Control Microbial Growth

Chemical Agent	Mechanism of Action	Preferred Use	Comment
Phenol and Phenolics			
1. Phenol	Disruption of plasma membrane, denaturation of enzymes	Rarely used, except as a standard of comparison.	Seldom used as a disinfectant or antiseptic because of its irritating qualities and disagreeable odor.
2. Phenolics	Disruption of plasma membrane, denaturation of enzymes	Environmental surfaces, instruments, skin surfaces, and mucous membranes.	Derivatives of phenol that are reactive even in the presence of organic material; O-phenylphenol is an example.
3. Bisphenols	Probably disruption of plasma membrane	Disinfectant hand soaps and skin lotions.	Triclosan is an especially common example of a bisphenol. Broad spectrum, but most effective against gram-positives.
Biguanides (Chlorhexidine)	Disruption of plasma membrane	Skin disinfection, especially for surgical scrubs.	Bactericidal to gram-positives and gram-negatives; nontoxic, persistent.
Halogens	Iodine inhibits protein function and is a strong oxidizing agent; chlorine forms the strong oxidizing agent hypochlorous acid, which alters cellular components.	Iodine is an effective antiseptic available as a tincture and an iodophor; chlorine gas is used to disinfect water; chlorine compounds are used to disinfect dairy equipment, eating utensils, household items, and glassware.	Iodine and chlorine may act alone or as components of inorganic and organic compounds.

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

TABLE 7.8 **Chemical Agents Used to Control Microbial Growth** (continued)

Chemical Agent	Mechanism of Action	Preferred Use	Comment
Alcohols	Protein denaturation and lipid dissolution.	Thermometers and other instruments; in swabbing the skin with alcohol before an injection, most of the disinfecting action probably comes from a simple wiping away (degerming) of dirt and some microbes.	Bactericidal and fungicidal, but not effective against endospores or nonenveloped viruses; commonly used alcohols are ethanol and isopropanol.
Heavy Metals and Their Compounds	Denaturation of enzymes and other essential proteins.	Silver nitrate may be used to prevent gonorrheal ophthalmia neonatorum; mercurochrome disinfects skin and mucous membranes; copper sulfate is an algicide.	Heavy metals such as silver and mercury are biocidal.
Surface-Active Agents			
1. Soaps and acid-anionic detergents	Mechanical removal of microbes through scrubbing.	Skin degerming and removal of debris.	Many antibacterial soaps contain antimicrobials.
2. Acid-anionic detergents	Not certain; may involve enzyme inactivation or disruption.	Sanitizers in dairy and food-processing industries.	Wide spectrum of activity; nontoxic, noncorrosive, fast-acting.

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

الـ Antibiotic بيتم تعقيمه عن طريق الـ Filtration لإنه بالحرارة العالية بيتكسر.

الـ pipette بنقدر نعقمها بطريقتين إما عن طريق Autoclave بحالة كان مكتوب عليها Autoclavable، لكن إذا ما كان مكتوب عليها Autoclavable بنروح بنعقمها بـ Alcohol 70%

طريقة الـ Pasturization هي بنستخدمها للحليب و الكريمة، الفرق بينه و بين الـ Autoclave إنه الـ Autoclave بنحط بحرارة 121 لمدة 15 دقيقة لكن Pasturization بنحط بحرارة 72 لمدة 15 ثانية.

Cell lysis

الـ Cell lyses بنعمله عن طريق إما :

1️⃣ نستخدم طريقة Sonication مع Osmotic shock .

2️⃣ أو Frensh press مع Osmotic shock.

Cell lysis: rupture cell wall / plasma membrane,
--> release contents (organelles, proteins…)

1. Physical means (French Press) → بنحط ضغط هائل عالخلايا فبصيرلهم تكسير.

2. Sonication → تستخدم بحالة كمية البكتيريا قليلة فبنروح بنحط الـ Tube اللي فيه الخلايا بالـ Ice لإنه عملية الـ Sonication بتطلع حرارة فوجود الخلايا بالثلج يضمن إنه البروتينات ما تخرب من الحرارة، فخلال ما الخلايا بالثلج بنضل نعمل Sonication لعشر ثواني و نوقف ونستنى من 20 لـ 30 ثانية و نرجع نكمل Sonication ونوقف وهكذا لنعمل lyses كامل.

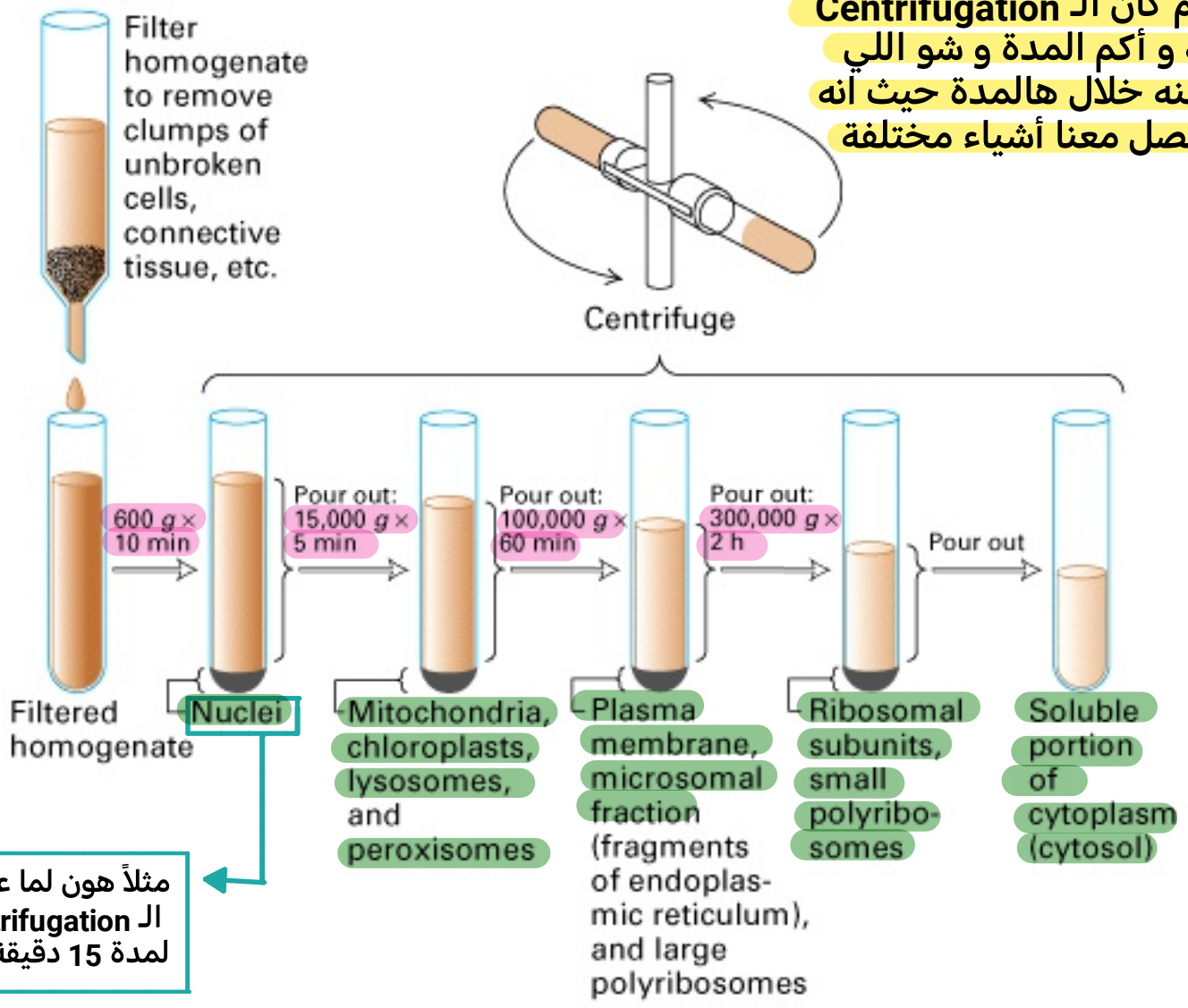
3. Osmotic shock

↓

بنضيف Detergents بيكسّر الخلايا

Differential Centrifugation

هون بيوضح اكم كان الـ **Centrifugation** اللي استخدمته و أكم المدة و شو اللي بكون تخلصت منه خلال هالمدة حيث أنه مع تغيرهم بينفصل معنا أشياء مختلفة من العينة.



مثلاً هون لما عملنا الـ **Centrifugation** على **600g** لمدة **15** دقيقة فصلنا الـ **Nuclei**

Protein purification – Column chromatography

موضح الشرح بالسلايد الجاي 👇

① Protein mixture applied to column

② Solvent (buffer) applied to top, flowed through column

③ Different proteins interact with matrix to different extents, flow at different rates

④ Proteins collected separately in different fractions

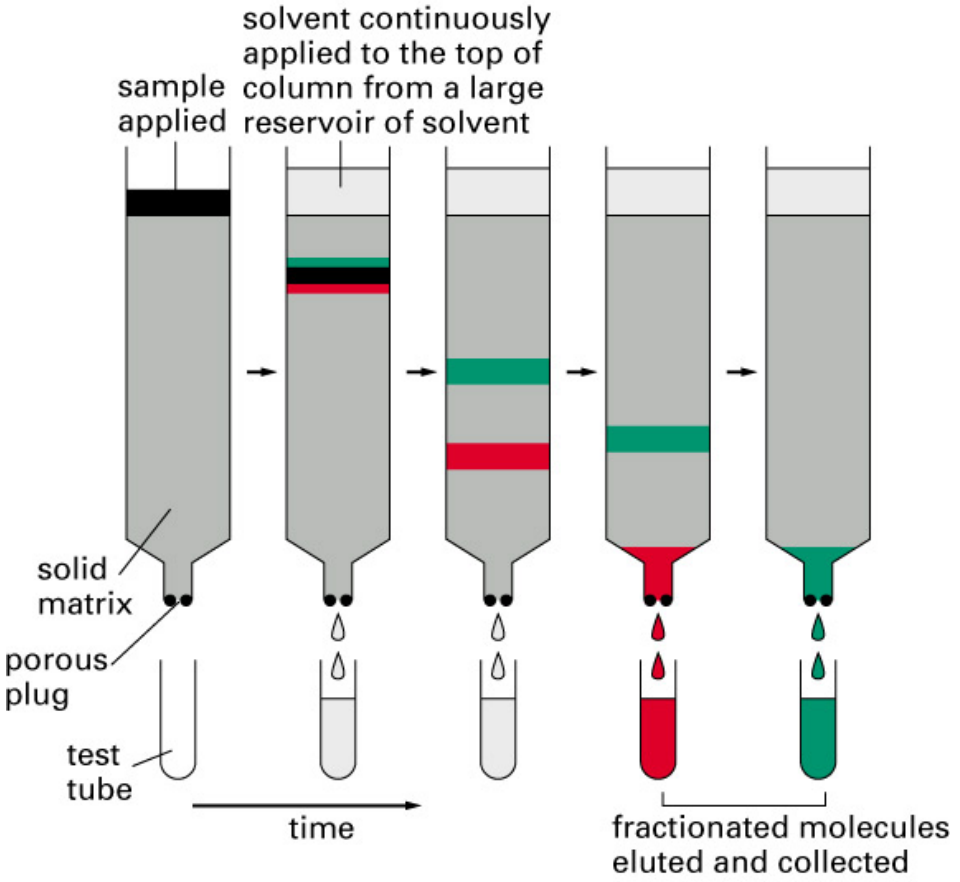


Figure 8–10. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

هسا بعد ما كسّرنا الخلايا وعملنا Centrifugation ،بيجي دور إنه نفصل البروتين تاعنا عن باقي البروتينات.

بنحط خليط البروتينات عالعمود من فوق بيكون في مكان بيسمح إنه نصب خليط البروتينات

بنحط الـ Buffer و بينصب من جهة العمود من فوق وهالشي بيساعد بدفع البروتينات إنها تمشي.

هسا ببلشوا هالبروتينات يمشوا و ينفصلوا حسب الـ Matrix المحطوطة و كيف كل واحد بتفاعل معها.

هون بيتم جمع كل بروتين بـ Tube لحاله، العملية بالصورة اللي فوق مبينة إنها يدوية لكن بالواقع هو عبارة عن جهاز HPLC أو Fraction collecter هو لحاله كل ما يجي بروتين بجمعه بـ Tube و بس يعمل Detection إنه بروتين مختلف بلّش يوصل بروح بيقلب الـ Tube السابق و بيجي Tube ثاني بداله لنجمّع فيه البروتين الجديد و تستمر العملية هكذا...

Column Chromatography

Molecules can be separated on the basis of:

1. SIZE—Gel filtration → إذا فصل حسب الحجم يسمى Gel Filtration
2. CHARGE—Ion exchange → إذا فصل حسب الشحنة بنسميه Ion exchange
3. SPECIFIC BINDING—Affinity → إذا فصل حسب الـ Specific binding تسمى هالطريقة بـ Affinity method

الـ Matrix المستخدمة ممكن يكون إلها عدة طرق بالفصل فممكن تفصل حسب :

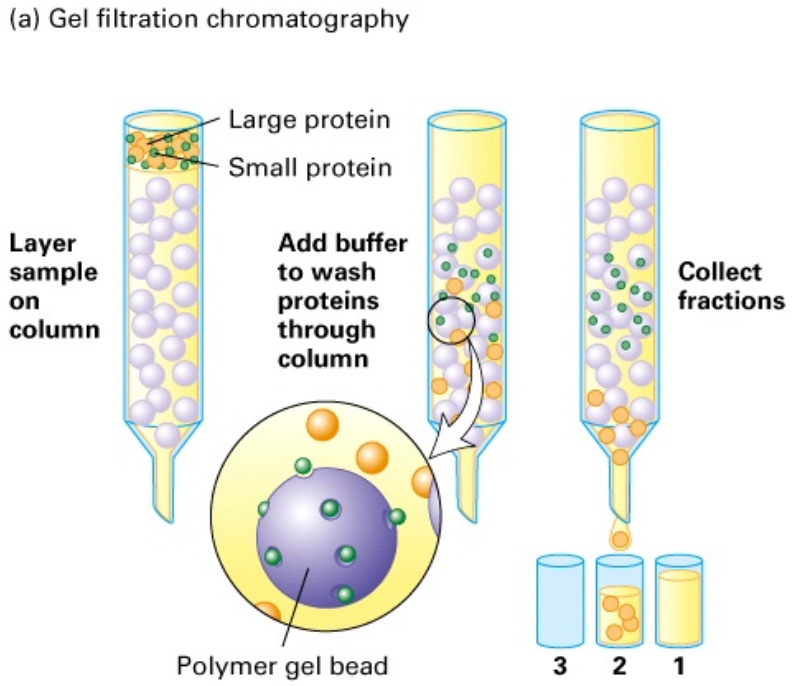
1️⃣ Size 2️⃣ Charge 3️⃣ Specific binding

Gel filtration chromatography – Separation by size

Beads have different size pores

As column flows:

- large proteins excluded from pores and therefore flow rapidly
- small proteins enter pores and flow slowly



بيكون في Beads جواها Pores ،فلما نحط البروتين بروح اللي حجمه صغير بيدخل بالـ Pores و اللي حجمه كبير بيمرق و ما بقدر يدخل من الـ Pores فلذلك اللي حجمه أكبر بيكون أسرع.

Ion exchange chromatography –

separation by charge

هون بتكون الـ Beads إشي عليه شحنة موجبة و إشي عليه شحنة سالبة ، طبعا لو بروتين عليه 3 شحنات موجبة أكيد رح يكون ارتباطه أقوى من بروتين عليه شحنتين موجبات فقوة إرتباطهم بالـ Matrix مختلفة طبعا.

Beads have charged group:

+ charge binds acidic amino acids

- charge binds basic amino acid

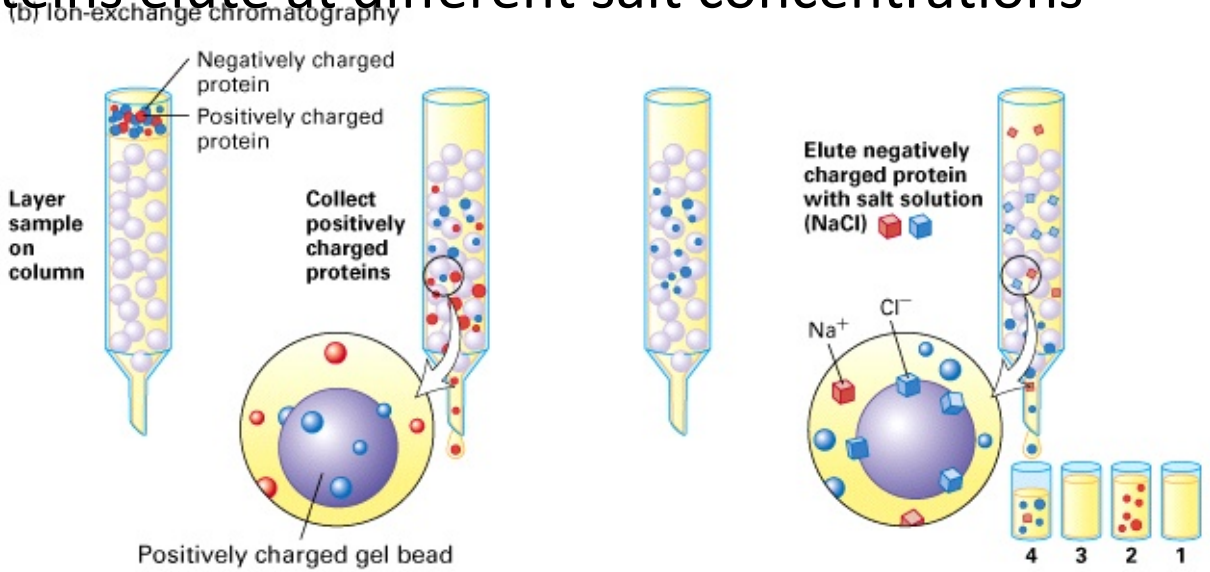
بعدها بيجي دور الـ Elution و هاد عن طريق إضافة كمية كبيرة من الملح فطبعاً اللي ارتباطه أضعف بفك أول يعني مثلا اللي عليه شحنتين موجبة رح يفك قبل اللي عليه 3 شحنات موجبة.

Different proteins bind with different affinity

زيادة تركيز الملح
يقلل ذائبية البروتين

Eluted with increasing amount of salt (NaCl or KCl)

Different proteins elute at different salt concentrations



Affinity chromatography

Separation by biological interactions

- Glutathione *S*-transferase (GST) is a 211 amino acid protein (26kDa) whose DNA sequence is frequently integrated into expression vectors for production of recombinant proteins. The result of expression from this vector is a GST-tagged fusion protein in which the functional GST protein (26kDa) is fused to the N-terminus of the recombinant protein.
- Because GST rapidly folds into a stable and highly soluble protein upon translation, inclusion of the GST tag often promotes greater expression and solubility of recombinant proteins than expression without the tag.
- GST-tagged fusion proteins also can be purified or detected based on the ability of GST (an enzyme) to bind its substrate, glutathione (GSH)

حكينا فيما سبق إنه ممكن نستخدم Vector يحتوي على الجين تاع GST و تكلمنا عنه إنه منيح حيث إنه بيزيد الـ Solubility of protein و الهدف الأساسي إنه يساعدنا بعملية فصل البروتين.

فبالتالي بنلاقي بالبلازميد الـ GST بعدها بكون راكب الـ Insert تاعنا، فلما نعمل Expression رح يطلع GST ثم بعده البروتين تاعي رابط معه.

نيجي هون للسؤال القوي إنه كيف بيساعدنا نفصل البروتين، ألا وهو عن طريق بنروح بعدها لـ Column فيها Beads مربوط فيها Glutathione (GSH).

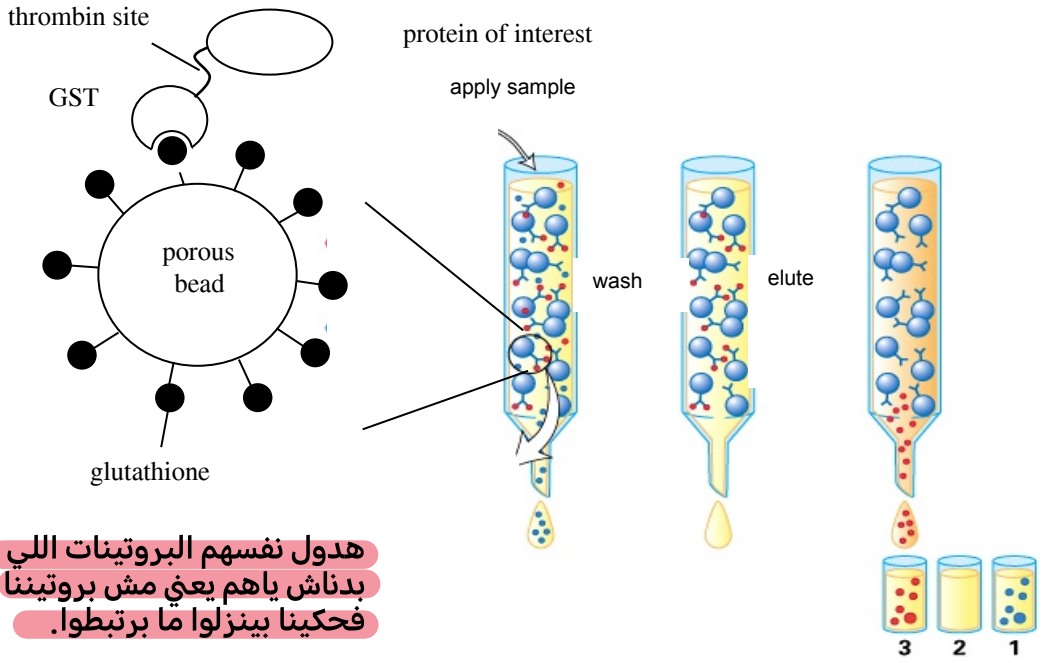
لما نحط خليط البروتينات اللي عملنالها Expression على هاد الـ Glutathione beads column معناها رح يروح يرتبط الـ GST مع GHS فمعناها برضه حيكون مرتبط معهم بروتيننا لإنه البروتين تاعنا ملزق بالـ GST وين ما راح و وين ما اجى، أما باقي البروتينات رح تنزل واتخلص منها.

طيب مهو كمان بدي البروتين تاعي هسا ينزل أكيد بديش ياه يضل رابط مع GST و معلق بالـ Column، فبنروح بنضيف Glutathiones فبتروح بتربط مكان البروتين بتفكه عشان تربط مع GST بعدها البروتين تاعي بنزل و بحصل عليه .

أو ممكن نضيف Thrombin اللي هو يعتبر Protease بيقص البروتين عن GST و ينزل بس البروتين تاعي.

إعادة للي حكيناه

Affinity chromatography
Separation by biological interactions



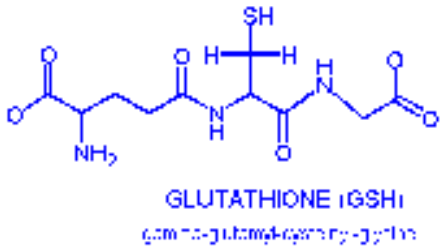
Example: GST - Glutathione

GST-tagged proteins bind to gluthatione on beads

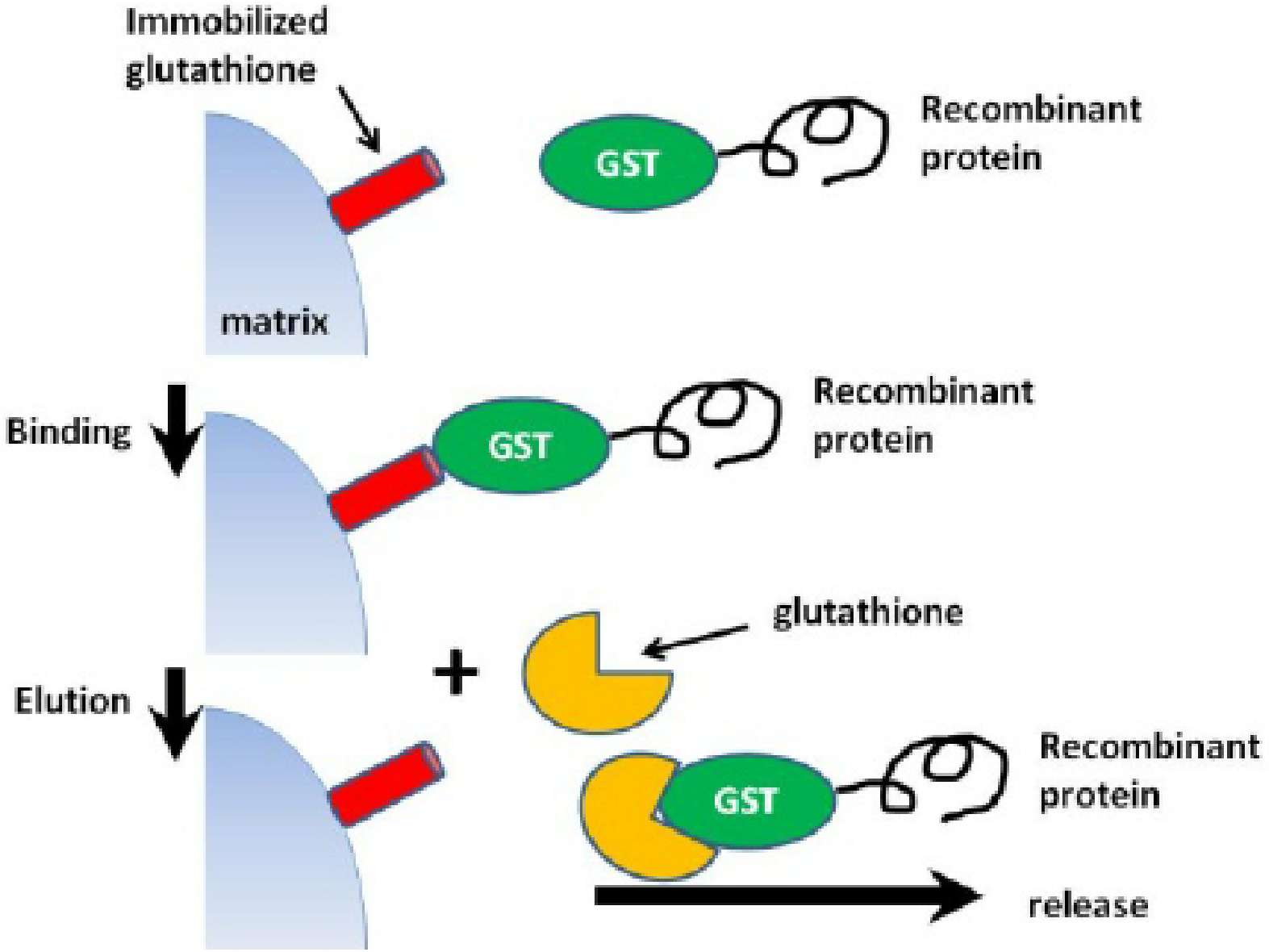
Non-specifically or weakly bound proteins washed off

هدول نفسهم البروتينات اللي بدناش ياهم يعني مش بروتيننا فحكينا بينزلوا ما برتبطوا.

GST-tagged proteins eluted with glutathione (competitor) or thrombin (protease)



برضه إعادة للحكي بس موضح بصورة



مكتوب شرحها بالسلايد الجاي

PolyHis tagged proteins

- The DNA sequence specifying a string of six to nine histidine residues is frequently used in vectors for production of recombinant proteins. The result is expression of a recombinant protein with a 6xHis tag fused to its N- or C-terminus.
- Expressed His-tagged proteins can be purified and detected easily because the string of histidine residues binds to several types of immobilized metal ions, including nickel, cobalt and copper, under specific buffer conditions. In addition, anti-His-tag antibodies are commercially available for use in assay methods involving His-tagged proteins.
- In either case, the tag provides a means of specifically purifying or detecting the recombinant protein without a protein-specific antibody or probe

الـ PolyHis tag هو عبارة عن إنه نضيف 6Histidine وهاد هو اللي رح يساعدنا نفصل البروتين وترا فكرته بتشبه فكرة GST.

الـ His tag يا بنحطها عالـ C terminal أو الـ N terminal، الـ Beads المستخدمة بالـ Column بتكون عبارة عن NTA مرتبطة مع واحد من الـ metals مثل Nickle أو Cupper أو Cobalt لإنه هدول بقدروا يعملوا Complexation مع immidazole ring اللي موجودة عالـ Histidine.

لذلك لما نضيف خليط البروتينات اللي عنا على هذا الـ NTA beads with meatal binding ما رح يربط معه إلا البروتين اللي عليه Histidine اللي هو طبعا البروتين تاعنا و أي بروتين ثاني رح ينزل مباشرة.

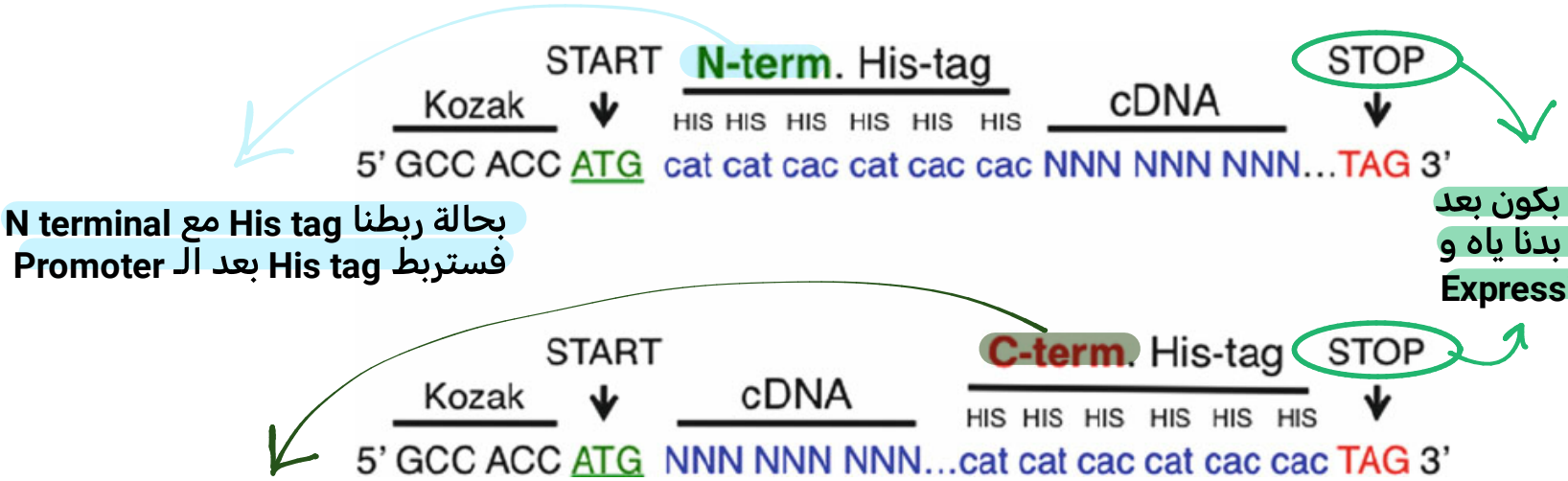
هون بيجي دور نفك البروتين ونفصله عن الـ Histidine إما برضه عن طريق القص مثل ما حكينا بالـ GST أو بنضيف immidazole ring بتحل محل الـ Histidine و بيفكه عن Nickle و هيك بكون فكيت البروتين تاعنا وحصلت عليه ✅

في فائدة من هي الطريقة إنه بنقدر نعمل Detection للبروتين هل موجود او لا عن طريق نطلّع Anti His tag antibody فطالما طلع معنا معناها في Histidine رابط مع البروتين تاعنا.

الـ Celators عبارة عن
NTA أو IDA رابطين مع
Divalent meatals على
الـ Agarose gel

Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC)

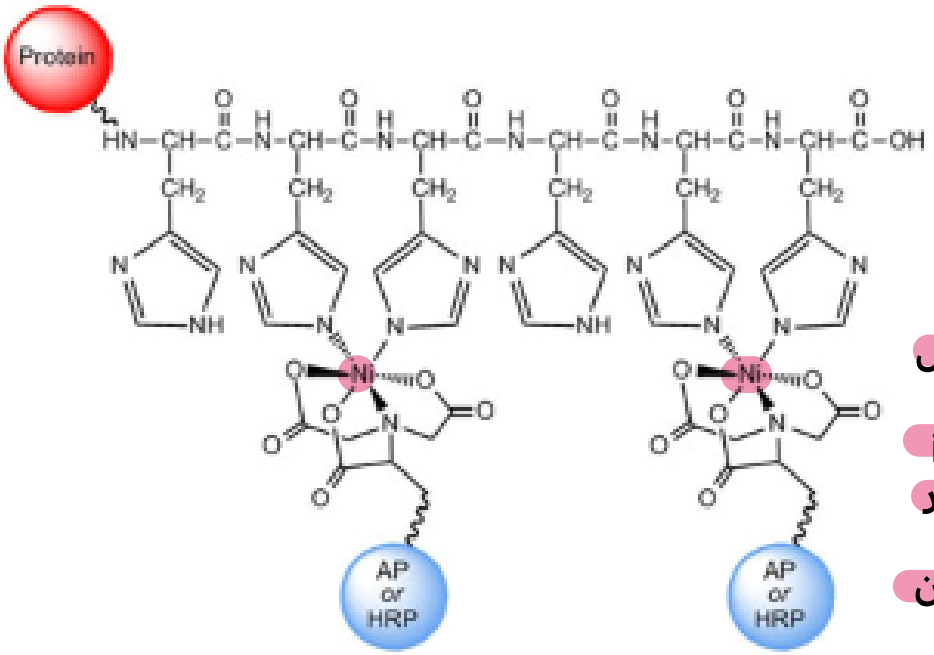
- Supports such as beaded agarose or magnetic particles can be derivatized with chelating groups to immobilize the desired metal ions, which then function as ligands for binding and purification of biomolecules of interest.
- The chelators most commonly used as ligands for IMAC are nitrilotriacetic acid (NTA) and iminodiacetic acid (IDA). Once IDA-agarose or NTA-agarose resin is prepared, it can be "loaded" with the desired divalent metal (e.g., Ni, Co, Cu, Fe). Using nickel as the example metal, the resulting affinity support is usually called Ni-chelate, Ni-IDA or Ni-NTA resin.
- Affinity purification of His-tagged fusion proteins is the most common application for metal-chelate supports in protein biology research. Nickel or cobalt metals immobilized by NTA-chelation chemistry are the systems of choice for this application



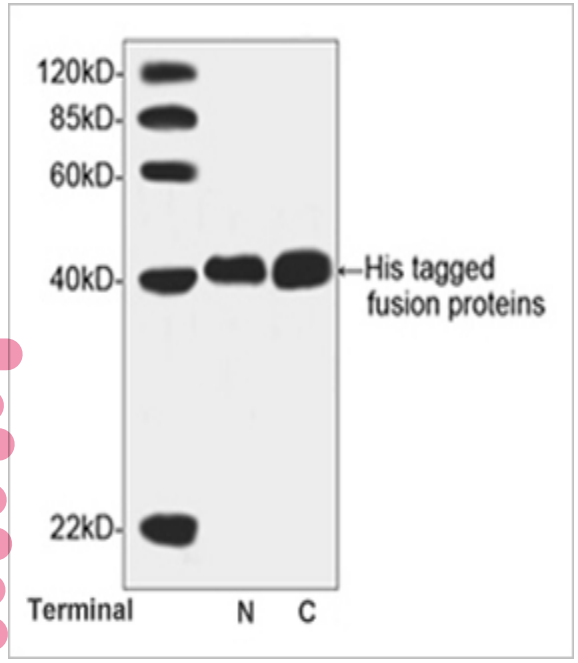
بحالة ربطنا His tag مع N terminal
فستربط His tag بعد الـ Promoter

الـ Stop codon بكون بعد
الـ His tag لإنه بدنا ياه و
لازم يصيرله Expression

ترتبط الـ His tag قبل الـ Stop codone
مباشرة إذا كان ربطها مع الـ C terminal.



كلما زاد عدد النيكل
اللي رابط مع
immidazole ring
يعني قوة الربط أكبر
و بضمن يطلع
عالجل بس البروتين
تاعنا.



Protein purification by chromatography

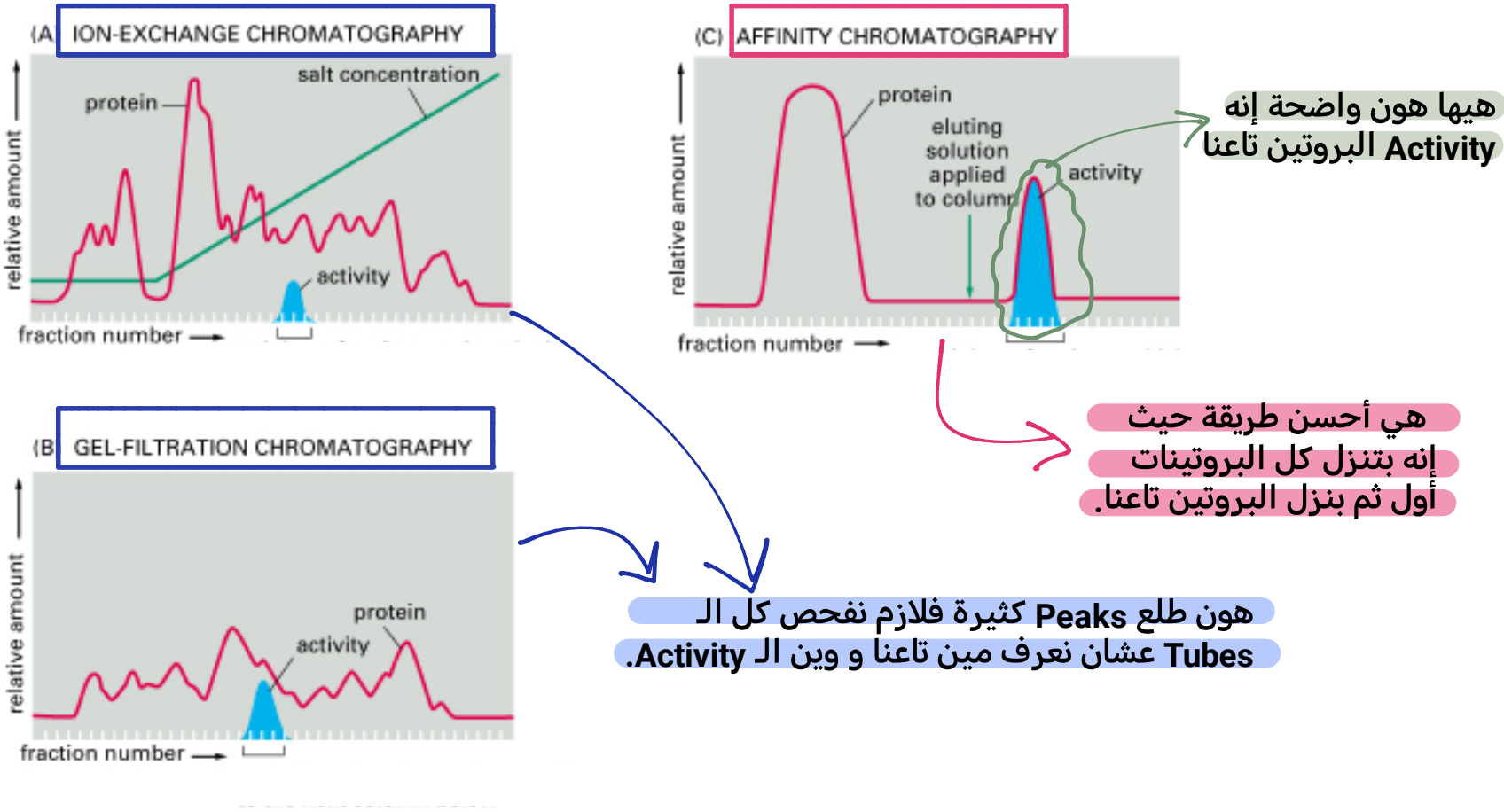


Figure 8–12 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Check the size and the purity of the protein

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

1. Heat sample with SDS and β -mercaptoethanol

SDS = Detergent (anionic)

- Denatures proteins
- Coats proteins
- Each protein has similar mass/charge ratio

خلص بعد ما حصلنا عالبروتين بنروح بنقيس الـ Concentration اله
بعدها بناخد كمية معينة منه و بنضيف عليه SDS وهاد رح يعمل
Denaturation للبروتين و بعمله Coating with negative charge
فهيك بنضمن إنه Charge to size ratio موحدة يعني الهم نفس
الشحنة و الفرق بينهم بس بالـ Size.

b-mercaptoethanol/DTT

- reduces disulfide bonds

هاد لو لقى شي عامل Dimeeization او Trimer
أو Tetromer بروح بكسره عن بعض

2. Separate on polyacrylamide gel

- Protein migrates through gel matrix in electric field (from negative to the positive)

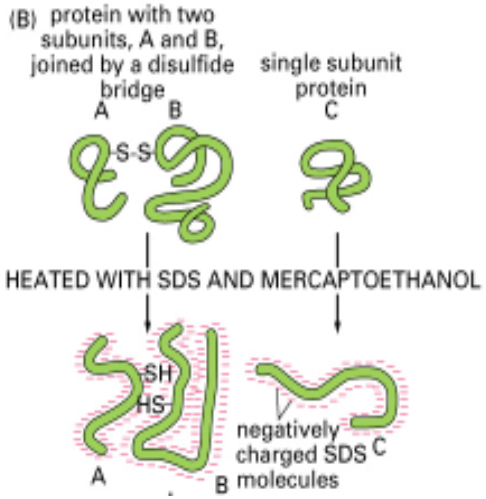
حسب تركيز الـ Polyacrylamide بتحدد الـ Porisity فكلما كان
تركيزه أكبر معناها بتقل الـ Porisity و يفصل حجم أصغر

3. Use commassie blue or silver stain to visualize protein purity

بالنسبة للـ Comassie blue فهي تستخدم لنعمل Detection of the bands ، فبنروح بنستخدمها بتلوّن الجل بلون ازرق بعدها بنروح بنعمل Discoloration بإستخدام Acetic acid with ethanol لمدة ربع ساعة فوقتها بتروح عالصبغة عن كلشي إلا عن بروتيني بضل ملون طبعا ننتبه إنه لو زاد الوقت عن ربع ساعة حتى البروتين تاعنا بروح لونه و طبعا حكينا قبل ممكن نستخدم Silver stain بدل Comassie ولكنها أغلى.

SDS-PAGE

نفس اللي حكيناه بس موضح بالصور



تكسير Disulfide linkage
بإستخدام B-mercaptoethanol
فبيتحول عنا كل الـ Dimer
لـ Monomer مغلفين بشحنة سالبة.

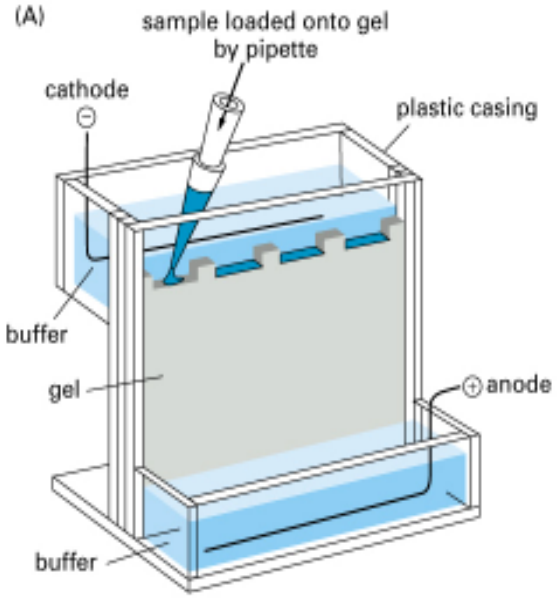
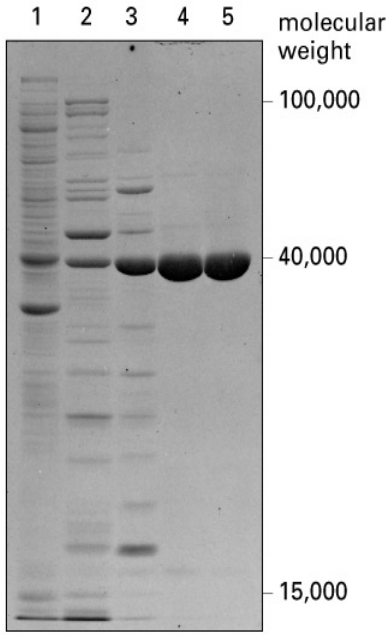


Figure 8–14 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

هون ببلش فصل حسب الحجم ،بنحط الصبغة
و بنسخّ على حرارة 95 لمدة 5 دقايق بحيث
يصير Protein Denaturation

Coomassie Blue/
Silver Staining



رح نحطهم هسا عالجل و طبعا سرعة
الصبغة اسرع من الـ Band تاعت
البروتين لإنه بتنبهنا متى رح نوصل
لآخر الجل عشان نطفي الجهاز