# Genetic Engineering

**Fourth Year**

**Dr. Mukaram Shikara**

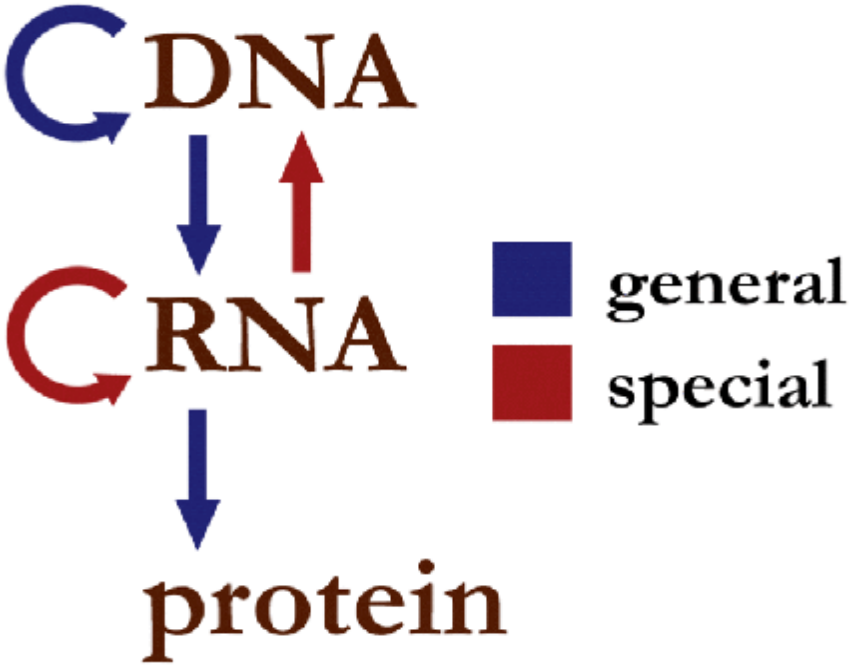
**Chemical Biotechnology Division**
**Applied sciences Department**
**University of Technology**

**2008-2009**

| Subjects of genetic engineering | Page |
|---|---|
| The central Dogma | 1 |
| Genetic Engineering – definition | 3 |
| Nucleases | 3 |
| Genetically modified organisms (GMOs) | 4 |
| Transgenic animals | 4 |
| Definitions needed | 5 |
| Techniques of Genetic Engineering | 7 |
| complementary DNA (cDNA) | 8 |
| Restriction Enzymes | 9 |
| DNA Ligase | 12 |
| Vectors | 13 |
| Viral vectors | 14 |
| Plasmids | 15 |
| Cosmids | 16 |
| Bacterial artificial chromosome | 16 |
| Yeast artificial chromosome | 17 |
| Human artificial chromosome | 17 |
| Gene Transfer | 17 |
| Replica Plating | 20 |
| Polymerase chain reaction (PCR) | 21 |
| DNA markers (probes) | 27 |
| Shotgun sequencing technique | 29 |
| Antisense genes | 30 |
| Gene Synthesis | 30 |
| Electrophoresis | 38 |
| Applications of genetic engineering | 39 |
| Gene Products | 41 |
| Human Insulin | 41 |
| Human Growth Hormone (HGH) | 41 |
| Bovine Somatotrophin (BST) | 42 |
| Factors VIII and IX | 42 |
| Anti-thrombin | 42 |
| Penicillin | 42 |
| Vaccines | 42 |
| Rennin | 43 |
| AAT (α -1-antitrypsin) | 43 |
| Glucosidased | 44 |
| DNAses | 45 |
| Polyhydroxybutyrate (PHB) | 45 |
| Dolly | 46 |
| New Phenotypes | 47 |
| Gene Therapy | 49 |
| Additional Information | 51 |
| Satellite DNA | 51 |
| Tandem repeats | 51 |
| Minisatellite | 51 |
| Microsatellite | 52 |

| | |
|---|---|
| Erythropoietin | 52 |
| Oncomouse | 52 |
| Telomere | 53 |
| Telomerase | 54 |
| Some questions about DNA Fingerprinting | 55 |
| Plants Cloning | 55 |
| What materials are needed to take a clone? | 57 |
| Ten steps to taking the perfect clone | 59 |
| Molecular Cloning | 60 |
| Cellular cloning | 61 |
| Cloning in stem cell research | 62 |
| Organisms cloning | 62 |
| Species cloned | 62 |
| Human cloning | 63 |
| Ethnical questions of cloning | 64 |
| Cloning extinct and endanger species | 65 |

## The Central Dogma




**DNA Replication**
As the final step in the Central Dogma, to transmit the genetic information between parents and progeny, the DNA must be replicated faithfully. Replication is carried out by a complex group of proteins that unwind the superhelix, unwind the double-stranded DNA helix, and, using DNA polymerase and its associated proteins, copy or replicate the master template itself so the cycle can repeat DNA → RNA → protein in a new generation of cells or organisms.

**Transcription**
Transcription is the process by which the information contained in a section of DNA is transferred to a newly assembled piece of messenger RNA (mRNA). It is facilitated by RNA polymerase and transcription factors. In eukaryote cells the primary transcript (pre-mRNA) is often processed further via alternative splicing. In this process, blocks of mRNA are cut out and rearranged, to produce different arrangements of the original sequence.

## Translation

Eventually, this mature mRNA finds its way to a ribosome, where it is translated. In prokaryotic cells, which have no nuclear compartment, the process of transcription and translation may be linked together. In eukaryotic cells, the site of transcription (the cell nucleus) is usually separated from the site of translation (the cytoplasm), so the mRNA must be transported out of the nucleus into the cytoplasm, where it can be bound by ribosomes. The mRNA is read by the ribosome as triplet codons, usually beginning with an AUG, or initiator methonine codon downstream of the ribosome binding site. Complexes of initiation factors and elongation factors bring aminoacylated transfer RNAs (tRNAs) into the ribosome-mRNA complex, matching the codon in the mRNA to the anti-codon in the tRNA, thereby adding the correct amino acid in the sequence encoding the gene. As the amino acids are linked into the growing peptide chain, they begin folding into the correct conformation. This folding continues until the nascent polypeptide chains are released from the ribosome as a mature protein. In some cases the new polypeptide chain requires additional processing to make a mature protein. The correct folding process is quite complex and may require other proteins, called chaperone proteins.

### Reverse transcription

Reverse transcription is the transfer of information from RNA to DNA (the reverse of normal transcription). This is known to occur in the case of retroviruses, such as HIV, as well as in eukaryotes, in the case of retrotransposons and telomere synthesis.

### RNA replication

RNA replication is the copying of one RNA to another. Many viruses replicate this way. The enzymes that copy RNA to new RNA, called RNA-dependent RNA polymerases, are also found in many eukaryotes where they are involved in RNA silencing.

### Direct translation from DNA to protein

Direct translation from DNA to protein has been demonstrated in a cell-free system (i.e. in a test tube), using extracts from *E. coli* that contained ribosomes, but not intact cells. These cell fragments could express proteins from foreign DNA templates, and neomycin was found to enhance this effect.

**Genetic engineering (GE)**, **recombinant DNA technology**, **genetic modification/manipulation** (**GM**) and **gene splicing** are terms that are applied to the direct manipulation of an organism's genes.

**Genetic engineering** is the process of manipulating genes, usually outside the organism's normal reproductive process.

Genetic modification of an organism can be achieved through a number of methods, most notably traditional breeding and recombinant technologies. It means altering the genes in a living organism to produce a **Genetically Modified Organism (GMO)** with a new genotype.

Genetic engineering often involves the isolation, manipulation and re-introduction of DNA into cells or model organisms, usually to express a protein. The aim is to introduce new characteristics such as increasing the yield of a crop species, introducing a novel trait, or producing a new protein or enzyme. Examples include the production of human insulin through the use of modified bacteria, the production of erythropoietin in Chinese Hamster Ovary cells, and the production of new types of experimental mice such as the OncoMouse (cancer mouse) for research, through genetic redesign.

**Nucleases**

A **nuclease** is an enzyme capable of cleaving the phosphodiester bonds between the nucleotide subunits of nucleic acids. It can cleave DNA or RNA strand. Nucleases are further classified into exonucleases and endonucleases. The term **"endonuclease"** applies to a nuclease that break nucleic acid chains somewhere in the interior, rather than at the ends, of DNA molecule, while the term "**exonuclease"** applies to a nuclease that functions by removing nucleotides from the ends of the DNA molecule**.**

Nucleases can classified into:

1) Nucleases that can cleave both DNA or RNA
2) Deoxyribinuclease (DNAse) that can cleave DNA only
3) Ribonuclease (RNAse) that can cleave RNA only.

All the three types can be either endonuclease or exonuclease.

Endonucleases can cut the two strands of DNA at the same point and this is called (Single-hit mechanism) and blunt ends will formed or they can cut one strand of DNA then move several bases before cutting the other strand and this is called (double-hit mechanisms) and cohesive sticky ends نهايات لزجة are formed.

**Genetically modified organisms (GMOs)**

GMO is defining as "an organism with changes made within its genome such as amplification or deletion of genes".

Or

GMO is "an organism whose genetic material has been altered using the genetic engineering techniques".

GMOs is known also as GEOs (Genetically Engineered Organisms). Various kinds of genetic modification are possible. If a scientist inserts a foreign gene from one species into the genome of another species, then a (transgenic organism) is formed. Other kinds of alternations are: altering an existing gene, so that its product is changed; or changing gene expression so that it translated more often or not at all.

**Transgenic organisms**

Transgenic means "ACROSS SPECIES".

A transgenic organism is define as "a genetically modified organism with extra-genome (foreign genetic) information attached to its genome".

In order to create a transgenic organisms, a scientist will insert a specific gene into another species for some purposes, and a transgenic organism is created (whether microorganisms, animals or plants). For example, many crops protected against caterpillar larvae يرقات الفراشات because a gene from a bacterium has been inserted into their cells. This gene produces a protein that is highly and specifically toxic to the larvae of many moths العث or butterflies الفراشات that attack food crops. Transgenic organisms can produce human insulin for example.

The transgenic techniques have the ability to move viral genes into humans, human genes into plants, plant genes into viruses etc. etc.

Transgenic plants have been developed for various purposes: resistance to pests, herbicides or harsh environmental conditions; improved shelf-life (storage); increased nutritional value - and many more.

## Definitions needed

a **locus** (plural loci) is a fixed position on a chromosome. A variant of the DNA sequence at a given locus is called an allele. The ordered list of loci known for a particular genome is called a genetic map. Gene mapping is the process of determining the locus for a particular biological trait.

A **phenotype** is any ***observable characteristic*** خواص مرئية of an organism, such as its morphology, development, biochemical or physiological properties, or behavior.

Phenotypes result from the expression تعبير of an organism's genes as well as the influence of environmental factors and possible interactions between the two.

**A genotype** of an organism is the inherited instructions carries within its genetic code.

Not all organisms with the same genotype look or act the same way, because appearance and behavior are modified by environmental and developmental conditions. Not all organisms, also, that look alike necessarily have the same genotype.

The concept of the phenotype is complex because:
First, most of the molecules and structures coded by the genetic material are not visible in the appearance of an organism, yet they are observable (by experimental methods) and thus part of the phenotype. Human blood groups are an example. Behaviors are also affected by both genotypic and environmental factors are second example.

Second, the phenotype is not simply a product of the genotype, but is influenced by the environment to a greater or lesser extent.

Third, it must be remembered that not all heredity is carried by the nucleus. For example, mitochondria transmit their own DNA directly, not via the nucleus, though they divide in unison with the nucleus.

Fourth, some phenotypes are controlled entirely by the individual's genes. Others are controlled by genes but are significantly affected by extragenetic or environmental factors. For example, almost all humans inherit the *capacity* to speak and understand language, but which language they learn is entirely an environmental matter.

In summary,
**genotype + environment + random-variation → phenotype**

**Polymorphism** (Greek: poly = many, and morph = form) is often defined as the presence of more than one genetically distinct type in a single population — meaning, the population is in the same location and is interbreeding. The term was first used to describe *visible forms*, but by extension, the term includes *cryptic morphs* أشكال غامضة, for instance blood types, which can be shown by a test.

**Polymorphism** in biology occurs when two or more clearly different phenotypes exist in the same population of a species — in other words, the occurrence of more than one *form* or *morph*. Examples are:

**1) Human blood groups**
All the common blood types, such as the ABO system, are genetic polymorphisms. The phenotypes are controlled by multiple alleles at one locus.
Statistical research has shown that the various phenotypes are more, or less, likely to suffer a variety of diseases. For example, an individual's susceptibility حساسية to cholera (and other diarrhea infections) is correlated with their blood type: those with type O blood are the most susceptible, while those with type AB are the most resistant. Between these two extremes are the A and B blood types, with type A being more resistant than type B.

**2) Sickle-cell anaemia**
Sickle-cell anemia is found mostly in tropical populations in southern Iraq, Africa and India. People suffer from this genetic disease are resistant to malaria.

**Introns**
derived from the term "intragenic regions" and also called "intervening sequence" (IVS), are DNA regions in a gene that are not translated into proteins. These non-coding sections are present in precursor mRNA (pre-mRNA) and some other RNAs (such as long noncoding RNAs), and removed by a process called (splicing) during the processing to mature RNA. After intron splicing, the mRNA consists only of exons, which are translated into a protein.
Introns are common in eukaryotic pre-mRNA, but in prokaryotes they are only found in tRNA and rRNA.
The number and length of introns varies widely among species, and among genes within the same species.

**Exon**

An **exon** is a nucleic acid sequence that is represented in the mature form of an RNA molecule after:

a) portions of a precursor RNA, introns, have been removed by cis-splicing

or

b) two or more precursor RNA molecules have been ligated by trans-splicing.

The mature RNA molecule can be a messenger RNA or a functional form of a non-coding RNA such as rRNA or tRNA. Depending on the context, exon can refer to the sequence in the DNA or its RNA transcript.

**Techniques of Genetic Engineering**

Genetic engineering is a very young discipline, and is only possible due to the development of techniques from the 1960s onwards. Watson and Crick made these techniques are possible by discovering the structure of DNA in 1953. The following table lists the techniques that used in Genetic Engineering in detail.

| | Techniques | Purposes |
|---|---|---|
| 1 | cDNA | To make a DNA copy of mRNA |
| 2 | Restriction Enzymes | To cut DNA at specific points, making small fragments |
| 3 | DNA Ligase | To join DNA fragments together |
| 4 | Vectors | To carry DNA into cells and ensure replication |
| 5 | Gene Transfer | To deliver a gene to a living cells |
| 6 | Replica Plating | To make exact copies of bacterial colonies on an agar plate |
| 7 | PCR | To amplify very small samples of DNA |
| 8 | DNA markers (probes) | To identify and label a piece of DNA containing a certain sequence inside a cell |
| 9 | Shotgun | To find a particular gene in a whole genome |
| 10 | Antisense genes | To stop the expression of a gene in a cell |
| 11 | Gene Synthesis | To make a gene from scratch |
| 12 | Electrophoresis | To separate fragments of DNA |

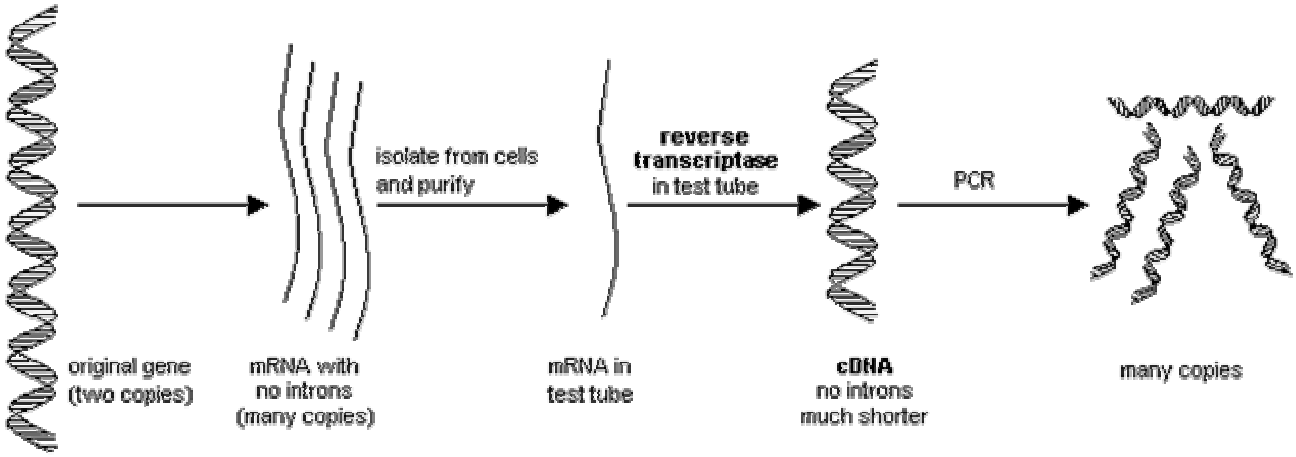
# 1. Complementary DNA

A complementary DNA (cDNA) is DNA synthesized from a mature mRNA template in a reaction catalyzed by the enzyme (reverse transcriptase). cDNA is often used to clone eukaryotic genes in prokaryotes.

When an eukaryotic gene is expressed inside a prokaryotic cells, a simplified method of doing so, would include the addition of eukaryotic DNA to a prokaryotic host, which would transcribe the DNA to mRNA and then translate it to protein. However, as eukaryotic DNA has introns, and since prokaryotes lack the machinery to splice them, the splicing of eukaryotic DNA must be done prior to adding the eukaryotic DNA into the host. The (spliced DNA) is called (a complementary DNA).

Though there are several methods for doing so, cDNA is most often synthesized from mature (fully spliced) mRNA using the enzyme (reverse transcriptase). This enzyme operates on a single strand of mRNA, generating its complementary DNA based on the pairing of RNA base pairs (A, U, G and C) to their DNA complements (T, A, C and G respectively).

cDNA is found naturally in a family of viruses called the retroviruses (which include HIV), and it helps them to invade cells. In nature, retroviruses use cDNA to turn their viral RNA into mRNA (viral RNA → cDNA → mRNA). mRNA will make viral proteins that take over the host cell, while in genetic engineering, reverse transcriptase used to make an artificial gene of cDNA as shown in this diagram.




Complementary DNA has helped to solve different problems in genetic engineering:

It makes genes much easier to find. There are some 30 000 genes in the human genome, and finding one gene out of this many is a very difficult (though not impossible) task. However a given cell only expresses a few genes, so only makes a few different kinds of mRNA molecule. For example, the b cells of the pancreas make insulin, so make lots of mRNA molecules coding for insulin. This mRNA can be isolated from these cells and used to make cDNA of the insulin gene.

cDNA= complementary DNA
ccDNA = closed circular DNA
ccssDNA = closed circular single stranded DNA
ccds DNA = closed circular double stranded DNA

## 2. Restriction Enzymes

A **restriction enzyme** (or **restriction endonuclease**) is an enzyme that cuts double-stranded DNA. The enzyme makes two incisions (cuts), one through each of the sugar-phosphate backbones (i.e., each strand) of the double helix without damaging the nitrogenous bases. The chemical bonds that the enzymes cleave can be reformed (attached again) by other enzymes known as ligases, so that **restriction fragments** carved from different chromosomes or genes can be spliced together, provided their ends are complementary.

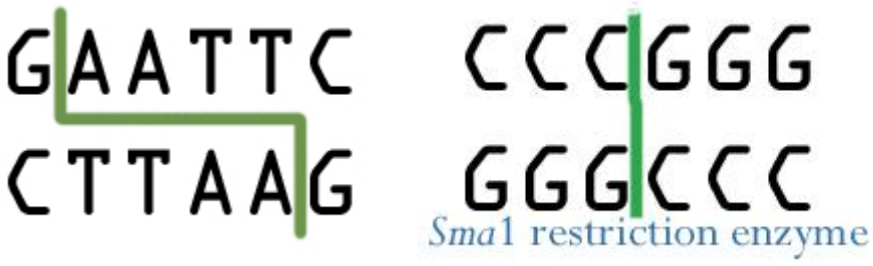
The 1978 Nobel Prize in Medicine was awarded to Daniel Nathans and Hamilton Smith for the discovery of restriction endonucleases, leading to the development of recombinant DNA technology. The first practical use of their work was the manipulation of *E. coli* bacteria to produce human insulin for diabetics.

A Restriction enzyme can cut the two strands in the same point and this is called (Single-hit mechanism) and a blunt ends will formed. A Restriction enzyme can cut one strand of DNA then move several bases before cutting the other strand (double-hit mechanisms) and cohesive sticky ends are formed.

Each restriction enzyme has its **(recognition sites)** which can be four to twelve nucleotides long.

Furthermore, restriction enzymes specific to hundreds of distinct sequences have been identified, purified and synthesized for sale to laboratories.

While recognition sequences vary widely, many of them are palindromic; that is, the sequence on one strand reads the same in the same direction on the complementary strand. GTATAC is (GTATAC is complementary to CATATG).




**Types of restriction enzymes**

Restriction enzymes are classified biochemically into three types. These are designated as Type I, Type II, Type III. A major type of Type II enzymes are sometimes referred to as Type IV enzymes..

***Type I and III systems***, both restriction activities are carried out by a single large enzyme complex. Although these enzymes recognize specific DNA sequences, the sites of actual cleavage are so far, and can be **hundreds of bases away**. Both require ATP for their proper function.

***In type II systems***, the restriction enzyme cleavages at very specific sites that are within or close to the recognition sequence. The vast majority of known restriction enzymes are of type II, and it is these that find the most use as laboratory tools. The first to be discovered and utilized was EcoRI, which is staggered and its recognition sequence is 5'-GAATTC-3'.

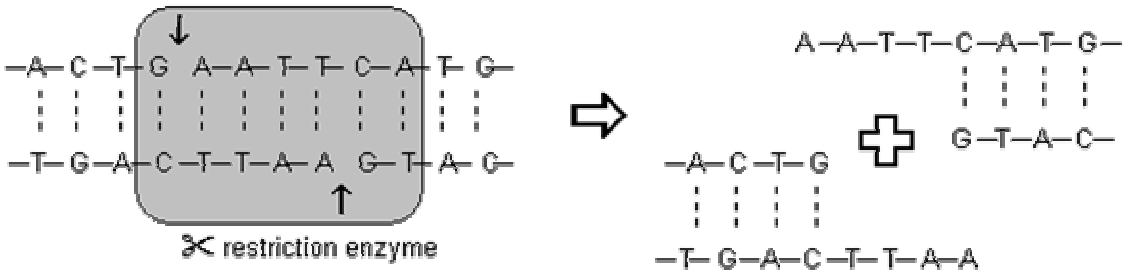
**Naming**

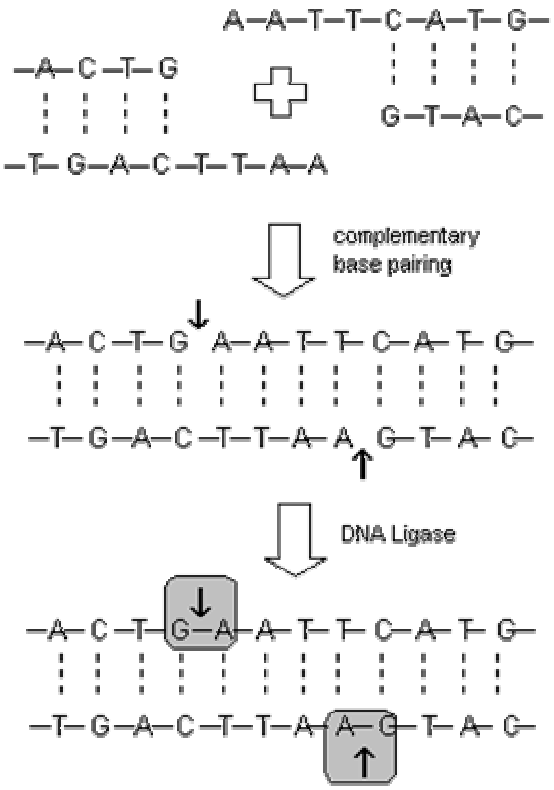
Restriction enzymes are named based on the bacteria in which they are isolated in the following manner:

| | | |
|---|---|---|
| *E* | *Escherichia* | (genus) |
| *Co* | *Coli* | (species) |
| R | RY13 | (strain) |
| I | First identified | Order ID'd in bacterium |

Restriction enzymes are produced naturally by bacteria as a defense against viruses (they “restrict” viral growth), but they are enormously useful in genetic engineering for cutting DNA at precise places

("molecular scissors"). Short lengths of DNA cut out by restriction enzymes are called **restriction fragments**. There are thousands of different restriction enzymes known, with over a hundred different recognition sequences. Restriction enzymes are named after the bacteria species they came from, so *Eco*R1 is from *E. coli* strain R, and *Hin*dIII is from *Haemophilis influenzae*.



**Examples of restriction enzymes**

| Enzyme | Source | Recognition Sequence | Cut |
|---|---|---|---|
| *Eco*RI | *Escherichia coli* | 5'GAATTC<br>3'CTTAAG | 5'---G AATTC---3'<br>3'---CTTAA G---5' |
| *Bam*HI | *Bacillus amyloliquefaciens* | 5'GGATCC<br>3'CCTAGG | 5'---G GATCC---3'<br>3'---CCTAG G---5' |
| *Hin*dIII | *Haemophilus influenzae* | 5'AAGCTT<br>3'TTCGAA | 5'---A AGCTT---3'<br>3'---TTCGA A---5' |
| *Mst*II | *Microcoleus* species | 5'CCTNAGG<br>3'GGANTCC | |
| *Taq*I | *Thermus aquaticus* | 5'TCGA<br>3'AGCT | 5'---T CGA---3'<br>3'---AGC T---5' |
| *Not*I | *Nocardia otitidis* | 5'GCGGCCGC<br>3'CGCCGGCG | |
| *Hin*fI | *Haemophilus influenzae* | 5'GANTC<br>3'CTNAG | |
| *Alu*I* | *Arthrobacter luteus* | 5'AGCT<br>3'TCGA | 5'---AG CT---3'<br>3'---TC GA---5' |
| * = straight (blunt) ends | | | |

## 3. DNA Ligases

In biochemistry, a ligase (from the Latin verb *ligāre* — "to bind" or "to glue together") is an enzyme that can catalyse the joining of two large molecules by forming a new chemical bond, usually with accompanying hydrolysis of a small chemical group pendant to one of the larger molecules.
This enzyme repairs broken DNA by joining two nucleotides in a DNA strand. It is commonly used in genetic engineering to do the reverse of a restriction enzyme, i.e. to join together complementary restriction fragments.

The sticky ends allow two complementary restriction fragments to anneal, but only by weak hydrogen bonds, which can quite easily be broken (for example, by gentle heating). DNA ligase completes the DNA backbone by forming covalent bonds. Restriction enzymes and DNA ligase can therefore be used together to join lengths of DNA from different sources.

Ligases are classified as EC 6 in the EC number classification of enzymes.

1) EC1 Oxidoreductases that catalyzes oxidation/reduction reactions
2) EC2 Transferases that transfer functional group (*e.g.* a methyl or phosphate group)
3) EC3 Hydrolases catalyze the hydrolysis of various bonds
4) EC4 Lyases cleave various bonds by means other than hydrolysis and oxidation
5) EC5 Isomerases: catalyze isomerization changes within a single molecule
6) EC6 Ligases join two molecules with covalent bonds

# 4. Vectors

In biology, a vector is an organism that transmits diseases or infections between species. For example, the mosquito is a disease vector because it carries the malaria parasite into humans.
By extension, any organism that transports foreign living material is a vector, so in genetic engineering, a vector **is a length of DNA that carries the gene one want to plant into a host cell.** A vector needed because a length of DNA containing a gene on its own will not actually do anything inside a host cell. Since it is not part of the cell's normal genome it will not replicated when the cell divides, it will not be expressed, and it will probably be broken down quickly by defense mechanisms. A vector gets round these problems by **having these properties:**

- It is big enough to hold the gene we want (plus a few others), but not too big.
- It is circular (or more accurately a closed loop), so that it is less likely to be broken down (particularly in prokaryotic cells where DNA is always circular).
- It contains control sequences, such as a replication origin and a transcription promoter, so that the gene will be replicated, expressed, or incorporated into the cell's normal genome.
- It contain marker genes, so that cells containing the vector can be identified.

Many different vectors have been made for different purposes in genetic engineering by modifying naturally-occurring DNA molecules, and these are now available off the shelf (in sale). For example a cloning vector contains sequences that cause the gene to be copied (perhaps many times) inside a cell, but not expressed. An expression vector contains sequences

causing the gene to be expressed inside a cell, preferably in response to an external stimulus, such as a particular chemical in the medium.

| TYPE OF VECTOR | MAX LENGTH OF DNA INSERT |
|---|---|
| Viruses | |
| Plasmid | 10 |
| Cosmid | 40 kbp |
| Virus or phage | 30 kbp |
| Bacterial Artificial Chromosome (BAC) | 500 kbp |
| Yeast Artificial Chromosome (YAC) | 3000 kbp |
| Human Artificial Chromosome (HAC) | 5000 kbp and more |

The vectors can be:

## - Viral vectors

They are a tool commonly used by molecular biologists to deliver genetic material into cells. This process can be performed inside a living organism (*in vivo*) or in cell culture (*in vitro*) في الزجاج. Viruses have evolved specialized molecular mechanisms to efficiently transport their genomes inside the cells they infect. Delivery of genes by a virus is termed transduction and the infected cells are described as transduced. A modified SV40 virus containing DNA from the bacteriophage lambda to infect monkey kidney cells maintained in culture was the first viral vector.

Viral vectors must have the following properties:

- **Safety** Although viral vectors are occasionally created from pathogenic viruses, they are modified in such a way as to minimize the risk of handling them.
- **Low toxicity** The viral vector should have a minimal effect on the physiology of the cell it infects.
- **Stability** Some viruses are genetically unstable and can rapidly rearrange their genomes.
- **Cell type specificity** Most viral vectors are engineered to infect as wide a range of cell types as possible. However, sometimes the opposite is preferred. The viral receptor can be modified to target the virus to a specific kind of cell.

**Transduction** is the process by which DNA is transferred from one bacterium to another by a virus. It also refers to the process whereby foreign DNA is introduced into another cell via a viral vector. This is a common tool used by molecular biologists to stably introduce a foreign gene into a host cell's genome.

When bacteriophages (viruses that infect bacteria) infect a bacterial cell, their normal mode of reproduction is to harness the replicational, transcriptional, and translation machinery of the host bacterial cell to make numerous virions, or complete viral particles, including the viral DNA or RNA and the protein coat

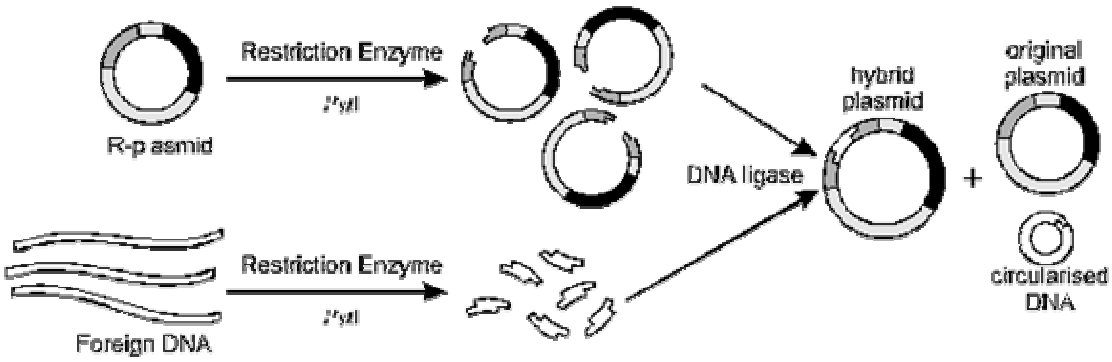
More generally, **transduction** is the process by which genetic material, e.g. DNA or siRNA, is inserted into a cell. Common techniques in molecular biology are the use of viral vectors (including bacteriophages), electroporation, or chemical reagents that increase cell permeability. Transfection and transformation are more common terms, although these sometimes imply expression of the genetic material as well.

## - Plasmids

Plasmids are by far the most common kind of vector. Plasmids are short closed circular dsDNA found naturally in bacterial cells. A typical plasmid contains 3-5 genes and there are usually around from one copy to hundreds of copies of a plasmid in a bacterial cell. Plasmids copied separately from the main bacterial DNA when the cell divides, so the plasmid genes passed on to all daughter cells. They are also used naturally for exchange of genes between bacterial cells. Because they are so small, they are easy to handle in a test tube, and foreign genes can quite easily incorporated into them using restriction enzymes and DNA ligase.
One of the most common plasmids used is the R-plasmid (or pBR322). This plasmid contains a replication origin, several recognition sequences for different restriction enzymes (with names like *Pst*I and *Eco*RI), and two marker genes, which confer resistance to different antibiotics (ampicillin and tetracycline).
Plasmids contain **genetic markers** that allow for selection of cells which have taken up the plasmid DNA.

The diagram below shows how DNA fragments can incorporate into a plasmid using restriction and ligase enzymes. The restriction enzyme used is (*Pst*I) cuts the plasmid in the middle of one of the marker genes.

The foreign DNA anneals with the plasmid and is joined covalently by DNA ligase to form a hybrid vector (in other words a mixture or hybrid of bacterial and foreign DNA). Several other products are also formed: some plasmids will simply re-anneal with themselves to re-form the original plasmid, and some DNA fragments will join together to form chains or circles. Theses different products cannot easily be separated, but it does not matter, as the marker genes can be used later to identify the correct hybrid vector.




## - Cosmids

A cosmid is a type of plasmid (used as a cloning vector) constructed by the insertion of *cos sequences*, DNA-Sequences of the Phage Lambda Virus. Cos sequences are single stranded sequences of DNA, which have been split from the parent molecule by a specific restriction enzyme and form *cohesive ends.*

These DNA-Sequences make it possible to pack genes with up to 44K base pairs, while normal plasmids are able to carry only 10-15K base pairs. Cosmids are packaged in phage structures consisting of proteins, which allows the foreign genes to be inserted into the bacteria using transduction.

## - Bacterial artificial chromosome

A bacterial artificial chromosome (BAC) is a DNA construct, based on a plasmid, used for transforming and cloning in bacteria, usually *E. coli*. Its usual insert size is 150 kbp, with a range from 100 to 300 kbp.
BACs are often used to sequence the genetic code of organisms in genome projects, for example the Human Genome Project. A short piece of the organism's DNA is amplified and then sequenced. Finally, the

sequenced parts are rearranged ***in silico***, resulting in the genomic sequence of the organism.

***In silico*** is an expression used to mean "performed on computer or via computer simulation."
***in vivo*** experiments done inside living organisms
***in vitro*** experiments done outside living organisms

## - Yeast artificial chromosome

A yeast artificial chromosome (YAC) is a vector used to clone large DNA fragments (larger than 100 kb and up to 3000 kb). It is an artificially constructed chromosome that contains the **telomeric, centromeric, and replication origin** sequences needed for replication in yeast cells. Plasmid is used in initial step. A gene is attached to YAC with the help of restriction enzymes, and then DNA ligase by the use of cohesive ends. YACs and BACs were used to map sections of DNA of interest when hunting for specific genes, but YAC is more unstable than BAC.

## - Human artificial chromosome

A human artificial chromosome (short HAC) is a micro-chromosome that can act as a new chromosome in a population of human cells. That is, instead of 46 chromosomes, the cell could have 47 with the 47th being very small, roughly 6-10 megabases in size, and able to carry new genes introduced by human researchers. Yeast artificial chromosomes and bacterial artificial chromosomes were invented before human artificial chromosomes, which first appeared in 1997. They are useful in expression studies as gene transfer vectors and are a tool for elucidating human chromosome function.
HAC synthesized by combining portions of alpha satellite DNA with telomeric DNA and genomic DNA into linear microchromosomes. Grown in HT1080 cells, they are mitotically and cytogenetically stable for up to six months.

# 5. Gene Transfer

Vectors containing the genes of interest must incorporate into living cells, so that they can be replicated or expressed. The cells receiving the vector called host cells, and once they have successfully incorporated the vector, they are called (transformed cells). Vectors are large molecules which do

not readily cross cell membranes, so the membranes must be made permeable in some way. There are different ways of doing this depending on the type of host cell.

**Heat Shock**

In biochemistry, applying a heat shock means subjecting cells to a higher temperature than the ideal body temperature of the organism from which the cell line was derived. For instance, in fish that survive at $0^oC$, heat shock can be induced with temperatures as high as $5^oC$, whereas thermophilic bacteria that proliferate at $50^oC$ will not express heat shock proteins until temperatures reach approximately $60^oC$.

In genetic engineering, heat shock is a method in which genes can be introduced into cells via a vector. Cells are incubated with the vector in a solution containing calcium ions at 0°C for several minutes. The temperature is then suddenly raised to about 40°C. This sudden change in temperature causes the pores of the cells to open up to larger sizes, allowing DNA molecules to enter. After a brief interval, the test tube is quickly cooled to a low temperature again. This closes up the pores, and traps the DNA inside. With this, the cells would have been transformed. However, it must be noted that, as with almost all transformation techniques, this method is about 40-70% efficient

**Electroporation**

Electroporation is a significant increase in the electrical conductivity and permeability of the cell plasma membrane caused by an externally applied electrical field. It is usually used in molecular biology as a way of introducing some substance into a cell, such as loading it with a molecular probe, a drug that can change the cell's function, or a piece of coding DNA.

Pores are formed in cells when the voltage across a plasma membrane exceeds its dielectric strength. The disruptions of cells will open the pores, then they will after a short period of time, during which extracellular compounds (such as vectors) have a chance to enter into the cell. However, excessive exposure of live cells to electrical fields can cause *apoptosis* (death)to the cell.

This procedure is highly efficient method of delivering genes to bacterial cells.

**Viruses**

Viruses were used as vectors. They are carrying the foreign gene along with their own genetic material. Since viruses rely on getting their DNA into host cells for their survival they have evolved many successful methods, and so are an obvious choice for gene delivery. The virus must

first be genetically engineered to make it safe, so that it cannot reproduce itself or make toxins.

**Plant Tumors**

This method has been used successfully to transform plant cells, which are perhaps the hardest to do. The gene is first inserted into a plasmid of a bacterium, and then plants are infected with the bacterium. The bacterium inserts the plasmid into the plant cells' chromosomal DNA and causes a tumor. These tumor cells can be cultured in the laboratory and whole new plants grown from them by micropropagation. Every cell of these plants contains the foreign gene.

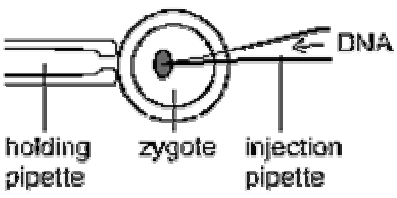
**Gene Gun**

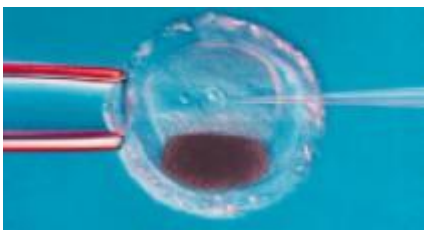
The gene gun fires microscopic gold particles coated with the foreign DNA carried by a plasmid (or other vectors) at the cells using a compressed air gun. It is designed to overcome the problem of the strong cell wall in plant tissue, since the particles can penetrate the cell wall and the cell and nuclear membranes, and deliver the DNA to the nucleus, where it is sometimes expressed.

The gun is connected to a vacuum pump and is under vacuum while firing. Gold is favored because it has better uniformity than tungsten and tungsten can be toxic to cells, but its use may be limited due to availability and cost.

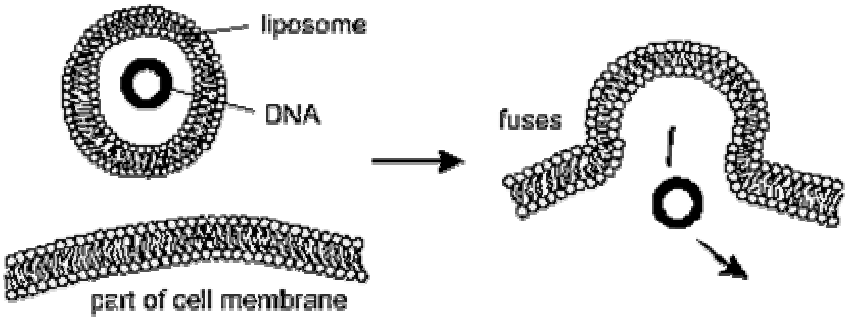
**Micro-Injection.**

Microinjection refers to the process of using a micro needle to insert substances at a microscopic or borderline macroscopic level into a single living cell. It is a simple mechanical process in which an extremely fine micro needle penetrates the cell under a microscope. The foreign DNA (with vector) is injected directly into the nucleus using an incredibly fine micro-needle. This method is used where there are only a very few cells available, such as fertilized animal egg cells. In the rare successful cases the fertilized egg is implanted into the uterus of a surrogate mother and it will develop into a normal animal, with the DNA incorporated into the chromosomes of every cell.



**Liposomes.**
A liposome is a spherical vesicle composed of a bilayer membrane. The liposome fuses with the cell membrane (and sometimes the nuclear membrane too), delivering the DNA into the cell. This works is useful for delivering genes to cell *in vivo* (such as in gene therapy).

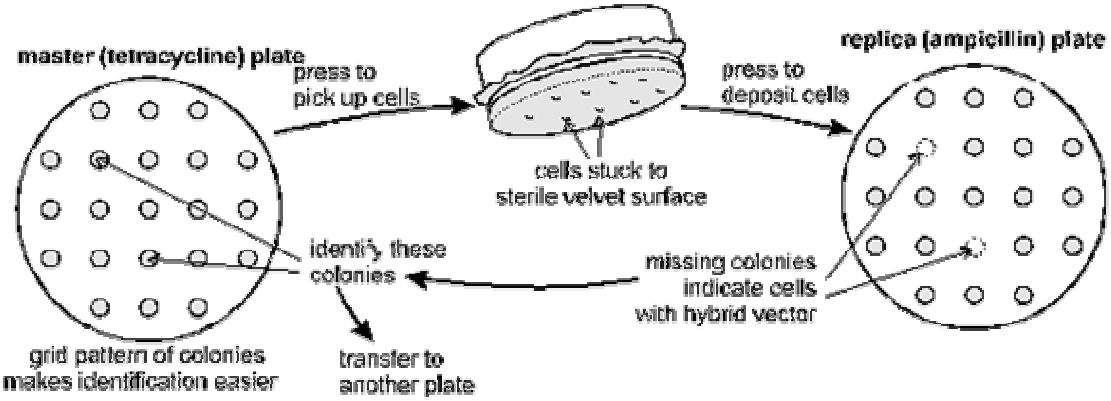



## 6. Replica Plating

In molecular biology and microbiology, Replica plating is a simple technique for making an exact copy of an agar plate. **replica plating** is a technique in which one or more secondary Petri plates containing different solid are inoculated with the same colonies of microorganisms from a primary plate (or master dish), reproducing the original colonies. The technique involves pressing a nitrocellulose membrane, or filter paper to a primary plate, and then imprinting secondary plates with cells in colonies removed from the original plate by the material.

The purpose of replica plating is to be able to compare the master plate and any secondary plates to screen for a selectable phenotype. For example, a colony which appeared on the master plate but failed to appear at the same location on a secondary plate shows that the colony was sensitive to a substance on that particular secondary plate. The second purpose is to keep the Master plate untouched and can be used as a reference.

This problem is to distinguish those cells that have taken up a hybrid plasmid vector (with a foreign gene in it) from those cells that have taken up the normal plasmid. This is where the second marker gene (for resistance to ampicillin) is used. Once the colonies of cells containing the correct hybrid plasmid vector have been identified, the appropriate colonies on the master plate can be selected and grown on another plate.




## 7. Polymerase Chain Reaction (PCR)

The polymerase chain reaction (PCR) is a technique widely used in molecular biology. It derives its name from one of its key components, a DNA polymerase used to amplify (i.e., replicate) a piece of DNA by *in vitro* enzymatic replication. As PCR progresses, the DNA used as a template for replication. This sets in motion a chain reaction in which the DNA template is exponentially amplified. With PCR it is possible to amplify a single or few copies of a piece of DNA across several orders of magnitude, generating millions or more copies of the DNA piece.
Almost all PCR applications employ a heat-stable DNA polymerase, such as Taq polymerase. This DNA polymerase enzymatically assembles a new DNA strand from DNA building blocks, the nucleotides, using single-stranded DNA as template and DNA oligonucleotides (also called DNA primers) required for initiation of DNA synthesis.

Developed in 1983 by Kary Mullis, PCR is now a common and often indispensable technique used in medical and biological research labs for a variety of applications. These include DNA cloning for sequencing, DNA-based phylogeny, or functional analysis of genes; the diagnosis of hereditary diseases; the identification of genetic fingerprints (used in forensics and paternity testing); and the detection and diagnosis of infectious diseases. Mullis won the Nobel Prize for his work on PCR.

**PCR principle and procedure**

PCR is used to amplify specific regions of a DNA strand (the DNA target). This can be a single gene, a part of a gene, or a non-coding sequence. Most PCR methods typically amplify DNA fragments of up to 10 kilo base pairs (kb), although some techniques allow for amplification of fragments up to 40 kb in size.

A basic PCR set up requires several components and reagents. These components include:

| | |
|---|---|
| 1) Heating | Normally (*in vivo*) the DNA double helix would be separated by the enzyme helicase, but in PCR (*in vitro*) the strands are separated by heating to 95°C for two minutes. This breaks the hydrogen bonds. |
| | |
| 2) DNA template | that contains the DNA region (target) to be amplified. |
| | |
| 3) Primers | which are complementary to the DNA regions at the 5' (five prime) and 3' (three prime) ends of the DNA region. A DNA polymerases always require short length of DNA (about 20 bp long) called a primer, to get started. *In vitro,* the primer must be cooled to 40°C to allow it to anneal to complementary sequences on the separated DNA strands. |
| | |
| 4) DNA polymerase | DNA polymerases used in PCR are from the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus*, which grows naturally in hot springs at a temperature of 90°C, so they are not denatured by the high temperatures (95°C). |
| | |
| 5) Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) | the building blocks from which the DNA polymerases synthesizes a new DNA strand. |
| | |
| 6) Buffer solution | providing a suitable chemical environment for optimum activity and stability of the DNA polymerase. |
| | |
| 7) Divalent cations | magnesium or manganese ions; generally $Mg^{2+}$ is |

| | |
|---|---|
| | used, but $Mn^{2+}$ can be utilized for PCR-mediated DNA mutagenesis, as higher $Mn^{2+}$ concentration increases the error rate during DNA synthesis |
| | |
| 8) Monovalent cation | potassium ions. |

The PCR is commonly carried out in a reaction volume of 15-100 µl in small reaction tubes (0.2-0.5 ml volumes) in a thermal cycler. The thermal cycler allows heating and cooling of the reaction tubes to control the temperature required at each reaction step.

**Procedure**

The PCR usually consists of a series of 20 to 35 repeated temperature changes called cycles; each cycle typically consists of 2-3 discrete temperature steps. Most commonly PCR is carried out with cycles that have three temperature steps (The above figure). The cycling is often preceded by a single temperature step (called *hold*) at a high temperature (>90°C), and followed by one hold at the end for final product extension or brief storage. The temperatures used and the length of time they are applied in each cycle depend on a variety of parameters. These include the enzyme used for DNA synthesis, the concentration of divalent ions and dNTPs in the reaction, and the melting temperature **(Tm)** of the primers.

The purpose of a PCR (Polymerase Chain Reaction) is to make a huge number of copies of a gene. This is necessary to have enough starting template for sequencing.

1. **The cycling reactions :**

   There are three major steps in a PCR, which are repeated for 30 or 40 cycles. This is done on an automated cycler, which can heat and cool the tubes with the reaction mixture in a very short time.

   1. **Denaturation** at 94°C :
      During the denaturation, the double strand melts open to single stranded DNA, all enzymatic reactions stop (for example : the extension from a previous cycle).
   2. **Annealing** at 54°C :
      The primers are jiggling around, caused by the Brownian motion. Ionic bonds are constantly formed and broken between the single stranded primer and the single stranded template. The more stable bonds last a little bit longer

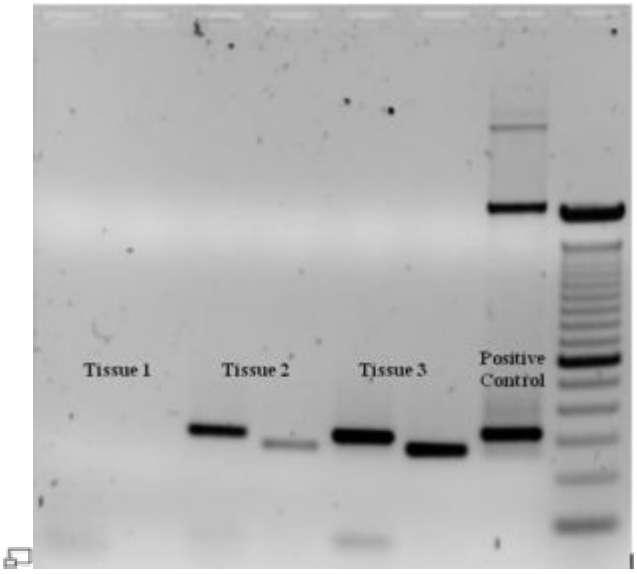
(primers that fit exactly) and on that little piece of double stranded DNA (template and primer), the polymerase can attach and starts copying the template. Once there are a few bases built in, the ionic bond is so strong between the template and the primer, that it does not break anymore.

3. **extension** at 72°C :
   This is the ideal working temperature for the polymerase. The primers, where there are a few bases built in, already have a stronger ionic attraction to the template than the forces breaking these attractions. Primers that are on positions with no exact match, get loose again (because of the higher temperature) and don't give an extension of the fragment.
   The bases (complementary to the template) are coupled to the primer on the 3' side (the polymerase adds dNTP's from 5' to 3', reading the template from 3' to 5' side, bases are added complementary to the template)

**Important Notes**

Before the PCR product is used in further applications, it has to be checked if :

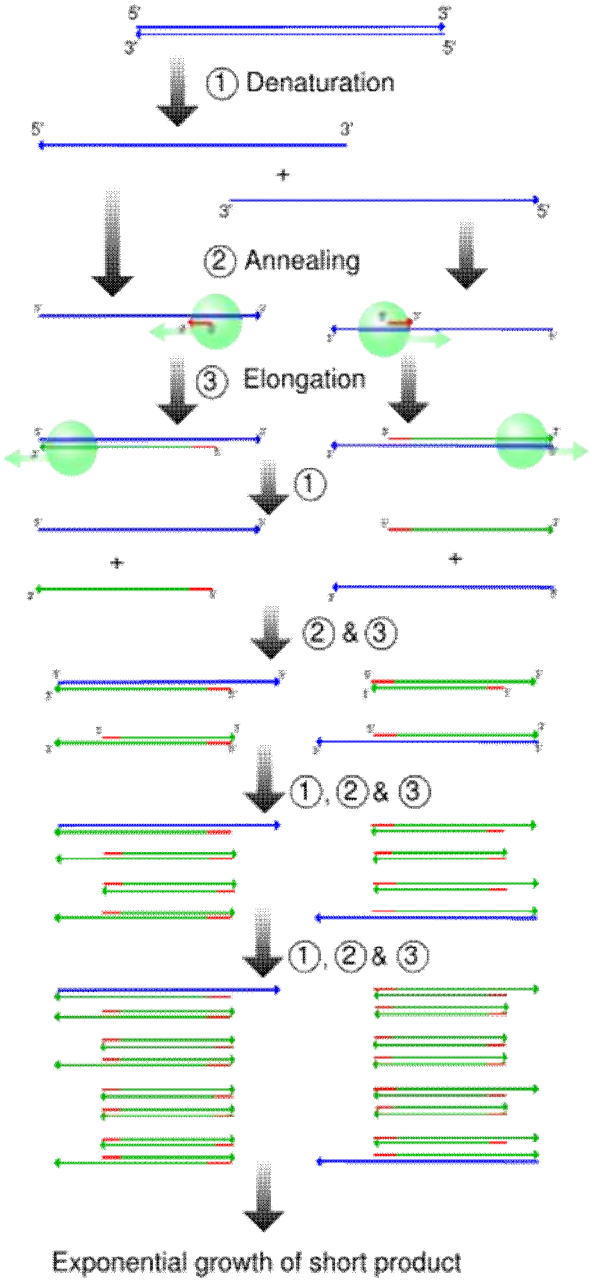
a) Not every PCR is successful. There is for example a possibility that the quality of the DNA is poor, that one of the primers doesn't fit, or that there is too much starting template
b) It is possible that there is a product, for example a band of 500 bases, but the expected gene should be 1800 bases long. In that case, one of the primers probably fits on a part of the gene closer to the other primer. It is also possible that both primers fit on a totally different gene.




***Ethidium bromide-stained PCR products after gel electrophoresis***

**PCR Failure**

In practice, PCR can fail for various reasons, mostly due to **contamination** with extraneous DNA (DNA from the workers of PCR).



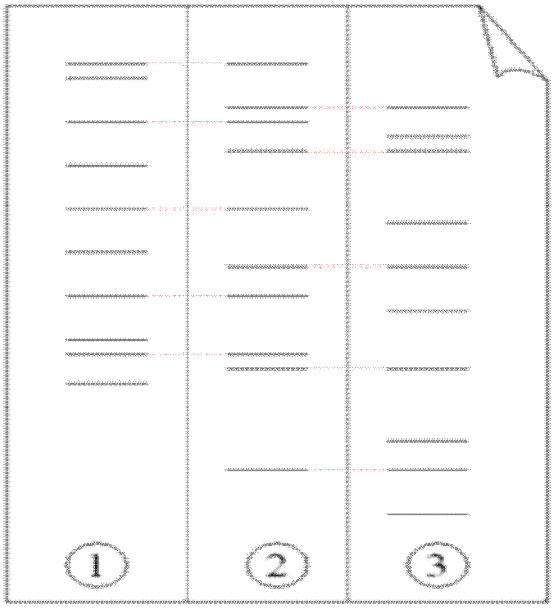

***Schematic drawing of the PCR cycle. (1) Denaturing at 94-96℃. (2) Annealing at ~65℃ (3) Elongation at 72℃. Four cycles are shown here.***

**Application of PCR**

PCR can be completely automated, so in a few hours a tiny sample of DNA can be amplified millions of times with little effort. These some of its applications:

1) Isolation of genomic DNA that may use in gene cloning that require large amounts of DNA
2) DNA sequencing to determine unknown amplified sequences

3) Genetic fingerprinting a forensic technique used to identify a person or organism by comparing experimental DNAs.
4) DNA paternity to identify the parents of a child (see below figure)




***Electrophoresis of PCR-amplified DNA fragments. (1) Father. (2) Child. (3) Mother. The child has inherited some, but not all of the fingerprint of each of its parents, giving it a new, unique fingerprint.***

## 8. DNA Probes

**genetic marker** (or probe) is a known DNA sequence. A genetic marker may be a short DNA sequence, such as a sequence surrounding a single base-pair change (single nucleotide polymorphism), or a long one, like microsatellites.

Some commonly used types of genetic markers are

- **RFLP** (or **Restriction Fragment Length Polymorphism**)
- **AFLP** (or **Amplified Fragment Length Polymorphism**)
- **RAPD** (or **Random Amplification of Polymorfic DNA**)
- **VNTR** (or **Variable Number of Tandem Repeat**)
- **Microsatellite Polymorphism**
- **SNP** (or **Single Nucleotide Polymorphism**)
- **STR** (or **Short Tandem Repeat**)

They can be further categorized as dominant or co-dominant. Dominant markers allow for analyzing many loci at one time. A primer amplifying a

dominant marker could amplify at many loci in one sample of DNA with one PCR reaction. Co-dominant markers analyze one locus at a time. A primer amplifying a co-dominant marker would yield one targeted product.

**Uses**

Genetic markers can be used to study the relationship between an inherited disease and its genetic cause (for example, a particular mutation of a gene that results in a defective protein). It is known that pieces of DNA that lie near each other on a chromosome tend to be inherited together. This property enables the use of a marker, which can then be used to determine the precise inheritance pattern of the gene that has not yet been exactly localized.

Genetic markers have to be easily identifiable, associated with a specific locus, and highly polymorphic, because homozygotes do not provide any information. Detection of the marker can be direct by DNA sequencing, or indirect using allozymes.

Some of the methods used to study the genome or phylogenetics are RFLP, Amplified fragment length polymorphism AFLP, RAPD, SSR.

**Insulin production**

Genetic markers also play a role in genetic engineering, as they can be used to produce normal, functioning proteins to replace defective ones. The damaged or faulty section of DNA is removed and replaced with the identical, but functioning, gene sequence from another source.

This is done by removal of the faulty section of DNA and its replacement with the functioning gene from another source, usually a human donor. These gene sections are placed in solution with bacterial cells, a small number of which take up the genetic material and reproduce the new DNA sequence. Engineers need to know which bacteria have been successful in duplicating these genes so another gene is added, altering the bacteria's resistance to antibiotics. Replica plating or a fomenter is used to grow enough bacteria to test resistance to antibiotics. It is important that the cultures are not mixed.

This process can be used as a treatment for diabetes mellitus. Bacterial DNA often has two resistency genes: one for tetracycline and one for ampicillin. The insulin gene can be inserted in the middle of the ampicillin gene after it has been removed using restriction endonucleases.

If the gene has been taken up, the bacteria both produces insulin and is also no longer ampicillin resistant. The bacteria are then allowed to grow on an agar plate containing a culture medium. The bacteria grow and produce colonies on the agar jelly. A piece of filter paper can be placed onto the top of this agar plate so that the exact positions of the colonies are remembered. This produces a copy which can then be transferred onto a second agar plate containing ampicillin. All of the bacteria that are not resistant to ampicillin will die. These locations on the second plate show the places on the first plate where bacteria are not resistant and therefore produce insulin. Another similar method is followed, in which an epitope sequence is added to insert. When the insert is expressed so is the epitope. Then this epitope can be effectively bound using an antibody on a filter paper. And the expressing colonies can be easily selected.

## 9. Shotgun sequencing technique

In genetics, shotgun sequencing is a method used for sequencing long DNA strands rapidly. The method of the chain termination can only be used for short strands of DNA, longer sequences must be subdivided into smaller fragments, and subsequently re-assembled to give the overall sequence. Two principal methods are used for this:

1) chromosome walking, which progresses through the entire strand, piece by piece, and rarely used now.
2) Shotgun sequencing, is a faster but more complex process, and uses random fragments.

In shotgun sequencing, DNA is broken up randomly into numerous small segments, which are sequenced using the chain termination method. In order to be certain completely, multiple overlapping sequencing for the target DNA are obtained by performing several rounds of this fragmentation and sequencing. Computer programs then use the overlapping ends of different sequences to assemble them into a contiguous sequence.

**Double-barrel shotgun sequencing** is a technique uses both ends of the same fragment of DNA. Although sequencing both ends of the same fragment and keeping track of the paired data was more complex than sequencing a single end of two distinct fragments, the knowledge was valuable.

## 10. Antisense Genes

**These used to turn off (stop) the expression of a gene in a cell.** The principle is very simple: (a copy of the **switched off gene** inserted into the host genome the "wrong" way round, so that the complementary (or antisense) strand transcribed).

The **antisense** mRNA produced will anneal to the normal **sense** mRNA forming double-stranded RNA. Ribosomes cannot bind to this, so the mRNA is not translated, and the gene is effectively "switched off".
**This method can be used for gene therapy**.

Cells can produce antisense RNA molecules naturally, which interact with complementary mRNA molecules and inhibit their expression, so a product is stopped. This is how the cell control the production of enzymes, hormones and other kinds of products.

## 11. Gene Synthesis

**It is a process of chemically synthesize an artificially designed gene in the lab and add it to the DNA sequence inside the cell.**

Gene synthesis was first demonstrated by Har Gobind Khorana in 1970 for a short artificial gene. Nowadays, commercial gene synthesis services are available from hundreds of companies worldwide, with a price often below $1 a base pair.

Automated machines can now make genes much easier, **but it is usually much easier to make cDNA.**

## 12. Electrophoresis

**Electrophoresis** is the most known electrokinetic phenomena. It was discovered by Reuss in 1809. He observed that clay particles جزيئات الطين dispersed تنتشر in water and migrate تهاجر under influence of an applied electric field مجال كهربائي.
Generally, **electrophoresis** is the motion of dispersed particles relative to a fluid under the influence of an electric field that is space uniform.

**Gel electrophoresis**
Gel electrophoresis is an application of electrophoresis in molecular biology. Biological macromolecules – usually proteins, DNA, or RNA – are loaded on a gel and separated on basis of their electrophoretic mobility.

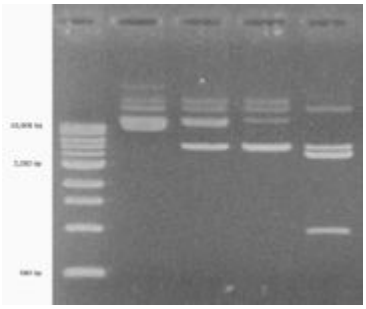
**Or:**

**Gel electrophoresis** is a technique used for the separation of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, or protein molecules using an electric current applied to a gel matrix. It is usually performed for analytical purposes, but may be used as a preparative technique prior to use of other methods such as mass spectrometry, RFLP, PCR, cloning, DNA sequencing, or Southern blotting for further characterization.

**Electrophoretic fingerprinting**
Electrophoresis is also used in the process of DNA fingerprinting. Certain DNA segments that vary vastly among humans cut at recognition sites by restriction enzymes (restriction endonuclease). After the resulting DNA fragments are run through electrophoresis, the distance between bands are measured and recorded as the DNA "fingerprint."

**Separation**
The term "gel" in this instance refers to the matrix used to contain, and then separate the target molecules. In most cases the gel is a crosslinked polymer whose composition and porosity مسامية is chosen based on the specific weight and composition of the target to be analyzed. When separating proteins or small nucleic acids (DNA, RNA, or oligonucleotides) the gel is usually composed of different concentrations of acrylamide and a other chemical compounds producing different sized mesh networks شبكة of polyacrylamide. When separating larger nucleic acids (greater than a few hundred bases), the preferred matrix is purified agarose. In both cases, the gel forms a solid, yet porous matrix.

The molecules place in wells in the gel and an electric current applied, so the molecules will move through the matrix at different rates, usually based on size, toward the cathode if **negatively charged** or toward the anode **if positively charged**. This is because negative molecules will be repelled by the negative anode and drawn toward the positive cathode (and vice versa).



*Agarose gel prepared for DNA analysis - The first lane contains a DNA ladder for sizing, and the other four lanes show variously-sized DNA fragments that are present in some but not all of the samples.*

After the electrophoresis is complete, the molecules in the gel can be stained to make them visible. Ethidium bromide, silver, or coomassie blue dye may be used for this process. Other methods
If molecules pass through the gel in the same speed, they are usually approximately of the same size. **There are molecular weight size markers available that contain a mixture** of molecules of known sizes. If such a marker was run on one lane in the gel parallel to the unknown samples, the bands observed can be compared to those of the unknown in order to determine their size.

**Proteins**
Proteins, unlike nucleic acids, can have varying charges and complex shapes, therefore they may not migrate into the gel at similar rates, or at all. For this reason, proteins must **denatured in the presence of a detergent** such as sodium dodecyl sulfate/sodium dodecyl phosphate (SDS/SDP) that coats the proteins with a negative charge. Since denatured proteins act like **long rods instead of having a complex tertiary shape,** the rate at which the resulting SDS coated proteins migrate in the gel is relative only to its size and not its charge or shape.

**DNA electrophoresis**
**DNA electrophoresis** is an analytical technique used to separate DNA fragments by size. An electric field forces the fragments to migrate through a gel. DNA molecules normally migrate from negative to positive potential due to the net negative charge of the sugar-phosphate backbone of the DNA chain.

Double-stranded DNA and single-stranded DNA or RNA fragments tend to fold up into molecules with complex shapes and migrate through the gel in a complicated manner based on their tertiary structure. Therefore, agents that disrupt the hydrogen bonds, such as sodium hydroxide are

used to denature the nucleic acids and cause them to behave as long rods. Longer molecules migrate more slowly because they are more easily 'trapped' in the network. **Gel electrophoresis of large DNA or RNA is usually done by agarose gel electrophoresis.**

After the separation is completed, the fractions of DNA fragments of different length are often visualizing a fluorescent dye specific for DNA, such as ethidium bromide. The gel shows bands corresponding to different DNA molecules populations with different molecular weight. Fragment size is usually reported in "nucleotides", "base pairs" or "kb" (for 1000's of base pairs) depending upon whether single- or double-stranded DNA has been separated. Fragment size determination is typically done by comparison to commercially available **DNA ladders** (DNA ladder is a mixture containing linear DNA fragments of known length).

**Types of electrophoresis**

The first two are most common, but the others are specialized types of electrophoresis:

1) Agarose (for relatively long DNA molecules)
2) Polyacrylamide (for high resolution of short DNA molecules, for example in DNA sequencing).
3) Pulsed field electrophoresis
4) Alkaline agarose gels
5) Capillary electrophoresis
6) Electrophoretogram
7) Electrophoretic display

**Visualisation: EtBr and dyes**

The most common dye used for agarose gel electrophoresis is ethidium bromide, usually abbreviated as EtBr. It fluoresces under UV light when intercalated into DNA (or RNA). By running DNA through an EtBr-treated gel and visualizing it with UV light, distinct bands of DNA become visible.

**Indicators**

The samples that run on the gel are colorless, so indicators are added to them, so one can observe the running operations, and these are:

- ethidium bromide
- Xylene cyanol
- Bromophenol blue

The last two run at about 5000 bp and 300 bp respectively, but the precise position varies with percentage of the gel. Other less frequently indicators used are Cresol Red and Orange G which run at about 125 bp and 50 bp. **Glycerol is added to indicators to make them more dense.**

## Agarose

Agarose is a polysaccharide extracted from the agar (a gelatinious substance) extracted from seaweed. It is typical used at concentrations of 0.5 to 2%. The higher the agarose concentration, the "stiffer" the gel. Agarose gels are extremely easy to prepare: you simply mix agarose powder with buffer solution, melt it by heating, and pour the gel. It is also non-toxic.

**Agarose gels have a large range of separation, but relatively low resolving power.** By varying the concentration of agarose, fragments of DNA from about 200 to 50,000 bp can be separated using standard electrophoretic techniques.

## Polyacrylamide

**Polyacrylamide** is a cross-linked polymer of acrylamide. The length of the polymer chains is dictated by the concentration of acrylamide used, which is typically between 3.5 and 20%. Polyacrylamide gels are significantly more annoying to prepare than agarose gels. Because oxygen inhibits the polymerization process, they must be poured between glass plates (or cylinders).
***Acrylamide is a potent neurotoxin and should be handled with care with gloves***. Polyacrylamide is considered to be non-toxic, but polyacrylamide gels should also be handled with gloves due to the possible presence of free acrylamide.

**Polyacrylamide gels have a rather small range of separation, but very high resolving power.** In the case of DNA, polyacrylamide is used for separating fragments of less than about 500 bp. However, under appropriate conditions, fragments of DNA differing is length by a single base pair are easily separated. In contrast to agarose, polyacrylamide gels are used extensively for separating and characterizing mixtures of proteins.

### Preparing and Running Standard Agarose DNA Gels

The equipment and supplies necessary for conducting agarose gel electrophoresis include:

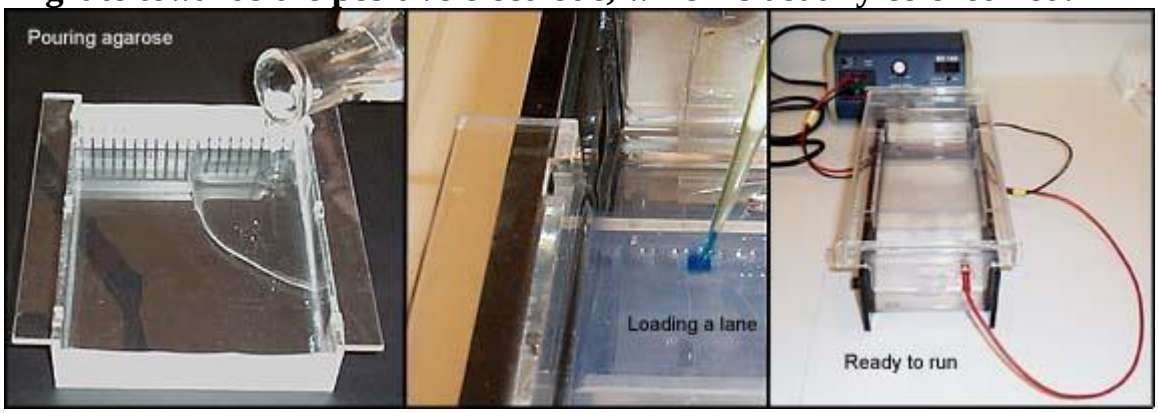
- electrophoresis chamber
- Power supply
- **Gel casting trays**, which are available in a variety of sizes and composed of UV-transparent plastic. The open ends of the trays are closed with tape while the gel is being cast, then removed prior to electrophoresis.
- **Sample combs**, around which molten agarose is poured to form sample wells in the gel.
- **Electrophoresis buffer**, usually Tris-acetate-EDTA (TAE) or Tris-borate-EDTA (TBE).
- **Loading buffer**, which contains something dense (e.g. glycerol) to allow the sample to "fall" into the sample wells, and one or two tracking dyes, which migrate in the gel and allow visual monitoring or how far the electrophoresis has proceeded.
- **Ethidium bromide**, a fluorescent dye used for staining nucleic acids. (5.25 mg/ml in $H_2O$).
- **Transilluminator** (an ultraviolet lightbox), which is used to visualize ethidium bromide-stained DNA in gels.
- DNA fragments to separate; typically 10-30 µl/sample
- DNA size markers.
- A mixture of DNA fragments (usually 10-20) of known size. (DNA ladder).
- Nitrile rubber gloves
- A color marker dye containing a low molecular weight dye such as "bromophenol blue" (to enable tracking the progress of the electrophoresis) and glycerol (to make the DNA solution more dense so it will sink into the wells of the gel).
- A gel rack
- A "comb"
- UV lamp or UV lightbox or other method to visualize DNA in the gel

**Procedure**

**Pouring the gel**, agarose powder is mixed with electrophoresis buffer to the desired concentration, then heated in a microwave oven until completely melted. Most commonly, ethidium bromide is added to the gel (final concentration 0.5 ug/ml) at this point to facilitate visualization of DNA after electrophoresis. After cooling the solution to about 60C, it is poured into a casting tray containing a sample comb and allowed to solidify at room temperature or, if you are in a big hurry, in a refrigerator.

**After the gel has solidified**, the comb is removed, using care not to rip the bottom of the wells. The gel, still in its plastic tray, is inserted horizontally into the electrophoresis chamber and just covered with

buffer. Samples containing DNA mixed with loading buffer are then pipeted into the sample wells, the lid and power leads are placed on the apparatus, and a current is applied. You can confirm that current is flowing by observing bubbles coming off the electrodes. **DNA will migrate towards the positive electrode, which is usually colored red.**




The distance DNA has migrated in the gel can be judged by visually monitoring migration of the tracking dyes. Bromophenol blue and xylene cyanol dyes migrate through agarose gels at roughly the same rate as double-stranded DNA fragments of 300 and 4000 bp, respectively.

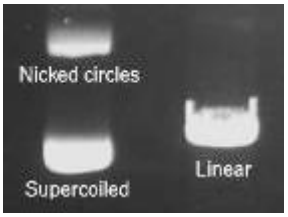
When adequate migration has occurred, **DNA fragments are visualized by staining with ethidium bromide.** This fluorescent dye intercalates between bases of DNA and RNA. It is often incorporated into the gel so that staining occurs during electrophoresis, but the gel can also be stained after electrophoresis by soaking in a dilute solution of ethidium bromide. To visualize DNA or RNA, the gel is placed on a ultraviolet transilluminator. Be aware that DNA will diffuse within the gel over time, and examination or photography should take place shortly after cessation of electrophoresis.

**Migration of DNA Fragments in Agarose**

**Fragments of linear DNA migrate through agarose gels with a mobility that is inversely proportional to the $\log_{10}$ of their molecular weight.** In other words, if you plot the distance from the well that DNA fragments have migrated against the $\log_{10}$ of either their molecular weights or number of base pairs, a roughly straight line will appear.

**Circular forms of DNA migrate in agarose distinctly differently from linear DNAs of the same mass.** Typically, uncut plasmids will appear to migrate more rapidly than the same plasmid when linearized. Additionally, most preparations of uncut plasmid contain at least two topologically-different forms of DNA, corresponding to supercoiled forms and nicked circles.

***The image to the right shows an ethidium-stained gel with uncut plasmid in the left lane and the same plasmid linearized at a single site in the right lane.***



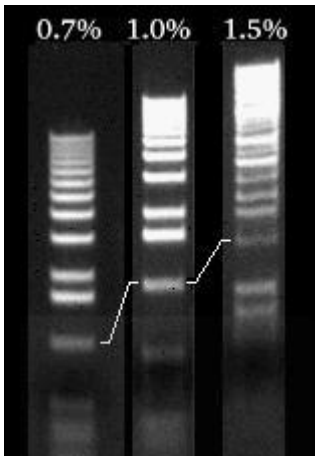

**Factors affecting migration**

The most important factor:

1) the length of the DNA molecule, smaller molecules travel farther
2) conformation of the DNA molecule is also a factor.
3) Increasing the agarose concentration of a gel reduces the migration speed and enables separation of smaller DNA molecules.
4) The higher the voltage, the faster the DNA migrates. But voltage is limited by the fact that it heats and ultimately causes the gel to melt. High voltages also decrease the resolution (above about 5 to 8 V/cm).

**Several additional factors have important effects on the mobility of DNA fragments in agarose gels, and can be used to your advantage in optimizing separation of DNA fragments.** Chief among these factors are:

**Agarose Concentration:** By using gels with different concentrations of agarose, one can resolve different sizes of DNA fragments. Higher concentrations of agarose facilities separation of small DNAs, while low agarose concentrations allow resolution of larger DNAs.

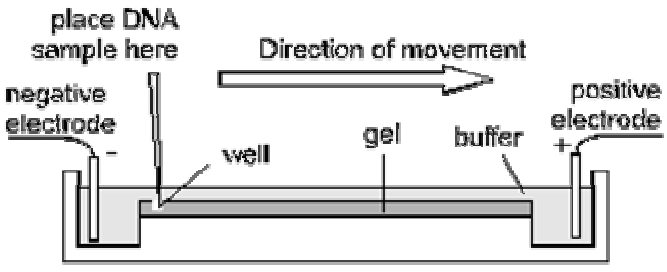


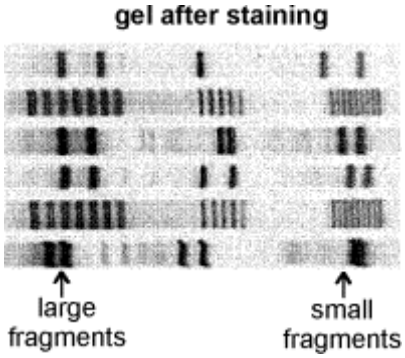

The image to the right shows migration of a set of DNA fragments in three concentrations of agarose, all of which were in the same gel tray and electrophoresed at the same voltage and for identical times. Notice how the larger fragments are much better resolved in the 0.7% gel, while the small fragments separated best in 1.5% agarose. The 1000 bp fragment is indicated in each lane.

**Voltage:** As the voltage applied to a gel is increased, larger fragments migrate proportionally faster that small fragments. For that reason, the best resolution of fragments larger than about 2 kb is attained by applying no more than 5 volts per cm to the gel (the cm value is the distance between the two electrodes, not the length of the gel).

**Electrophoresis Buffer:** Several different buffers have been recommended for electrophoresis of DNA. The most commonly used for duplex DNA are TAE (Tris-acetate-EDTA) and TBE (Tris-borate-EDTA). DNA fragments will migrate at somewhat different rates in these two buffers due to differences in ionic strength. Buffers not only establish a pH, but provide ions to support conductivity. If you mistakenly use water instead of buffer, there will be essentially no migration of DNA in the gel! Conversely, if you use concentrated buffer (e.g. a 10X stock solution), enough heat may be generated in the gel to melt it.

**Effects of Ethidium Bromide:** Ethidium bromide is a fluorescent dye that intercalates between bases of nucleic acids and allows very convenient detection of DNA fragments in gels, as shown by all the images on this page. As described above, it can be incorporated into agarose gels, or added to samples of DNA before loading to enable visualization of the fragments within the gel. As might be expected, binding of ethidium bromide to DNA alters its mass and rigidity, and therefore its mobility.




## Applications of Genetic Engineering

The first genetically engineered drug was **human insulin**, approved by the United States Food and Drug Administration (FDA) in 1982. This followed by the creation of human growth hormone (HGH) as replacement for a drug that was previously extracted from human cadavers.

One of the best known applications of genetic engineering is the creation of genetically modified organisms (GMOs) such as foods and vegetables that resist pests and bacteria infection and have longer freshness.

Most products from genetic engineering still has very few successful commercial applications, although these are increasing each year. The applications so far can usefully considered in three groups:

| | |
|---|---|
| **Gene Products** | Use genetically modified organisms (usually microbes) to produce chemicals, usually for medical or industrial applications. |
| **New Phenotypes** | Use gene technology to alter the characteristics of organisms (usually farm animals or crops) |
| **Gene Therapy** | Use gene technology on humans to treat a disease |

**Gene Products**

The biggest and most successful kind of genetic engineering is the production of gene products. These products are of medical, agricultural or commercial value. This table shows a few of the examples of genetically engineered products that are already available.

| Products | Use | Host organism |
|---|---|---|
| Insulin | human hormone used to treat diabetes | bacteria /yeast |
| HGH | human growth hormone, used to treat dwarfism | bacteria |
| BST | bovine growth hormone, used to increase milk yield of cows | bacteria |
| Factor VIII | human blood clotting factor, used to treat haemophiliacs | bacteria |
| Anti-thrombin | anti-blood clotting agent used in surgery | goats |
| Penicillin | antibiotic, used to kill bacteria | fungi / bacteria |
| Vaccines | hepatitis B antigen, for vaccination | yeast |
| rennin | enzyme used in manufacture of cheese | bacteria /yeast |
| AAT | enzyme used to treat cystic fibrosis and emphysema | sheep |
| Glucosidase | enzyme used to treat Pompe's disease | Rabbits' cells/ bacteria |
| DNase | enzyme used to treat CF | bacteria |
| PHB | biodegradable plastic | plants |

The products are mostly proteins, which are produced directly when a gene is expressed, but they can also be non-protein products produced by genetically engineered enzymes. The basic idea is to transfer a gene (often human) to another host organism (usually a microbe) so that it will make the gene product quickly, cheaply and ethically. **It is also possible to make "designer proteins" by altering gene sequences, but while this is a useful research tool, there are no commercial applications yet for it.**

Since the end-product is just a chemical, in principle any kind of organism could be used to produce it. By so far the most common group of host organisms used to make gene products are the bacteria, since they can grow quickly and the product can be purified from their cells. Unfortunately, bacteria cannot not always make human proteins, and recently animals and even plants have also been used to make gene products. **In neither case is it appropriate to extract the product from their cells,** so in animals the product must secreted in milk or urine, while in plants the product must secreted from the roots. This table shows some of the advantages and disadvantages of using different organisms for the production of genetically-engineered gene products.

| Type of organisms | Advantages | Disadvantages |
|---|---|---|
| Prokaryotes (Bacteria) | No nucleus, so DNA is easy to modify; have plasmids; small genome; genetics well understood; asexual so can be cloned; small and fast growing; easy to grow commercially in fomenters; will use cheap carbohydrate; few ethical problems. | Can't splice introns; small gene size |
| Eukaryotes | Can splice introns; can accept large genes | Do not have plasmids (except yeast); control of expression not well understood. |
| Fungi (yeast, mould) | Asexual so can be cloned; can be grown in vats | Can not always make animals gene products |
| Plants | Photosynthetic so don not need much feeding; can be cloned from single cells; products can be secreted from roots or in sap العصير النباتي. | Cell walls difficult to penetrate by vector; slow growing; must be grown in fields. |

| | | |
|---|---|---|
| Animals | Most likely to be able to make human proteins; products can be secreted in milk or urine | Slow growing |

**Some gene products in detail**

**Human Insulin**

Insulin is a small protein hormone produced by the pancreas to regulate the blood sugar concentration. In the disease insulin-dependent diabetes the pancreas cells don't produce enough insulin, causing wasting symptoms and eventually death. The disease can successfully treated by injection of insulin extracted from the pancreases of slaughtered cows and pigs. However, the insulin from these species has a slightly different amino acid sequence from human insulin and this can lead to immune rejection and side effects.

The human insulin gene was isolated, cloned and sequenced in the 1970s, and so it became possible to insert this gene into bacteria, which could then produce human insulin in large amounts. Unfortunately, it wasn't that simple. In humans, pancreatic cells first make pro-insulin, this then undergoes post-translational modification to make the final, functional insulin. Bacterial cells cannot do post-translational modification. Eventually a synthetic cDNA gene was made and inserted into the bacterium *E. coli*, which made pro-insulin, and the post-translational conversion to insulin was carried out chemically. This technique was developed by Eli Lilly and Company in 1982 and the product, "humulin" became the first genetically-engineered product approved for medical use.

In the 1990s the procedure was improved by using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* instead of *E. coli*. Yeast, as a eukaryote, is modification, so this simplifies the production of human insulin. However, another company has developed a method of converting pig insulin into human insulin by chemically changing a few amino acids, and this turns out to be cheaper than the genetic engineering methods. This all goes to show that genetic engineers still have a lot to learn.

**Human Growth Hormone (HGH)**

HGH is a protein hormone secreted by the pituitary gland, which stimulates tissue growth. Low production of HGH in childhood results in pituitary dwarfism. This can treated with HGH extracted from dead humans, but as the treatment caused some side effects, such as Creutzfeldt-Jacod disease (CJD), the treatment was withdrawn. The HGH gene has cloned and an artificial cDNA gene has inserted into *E. coli*. This genetically engineered HGH produced by Genentech can successfully restore normal height to children with HGH deficiency.

**Bovine Somatotrophin (BST)**
This is a growth hormone produced by cattle. The gene has cloned in bacteria by the company Monsanto, who can produce large quantities of BST. In the USA, cattle are often inject with BST every 2 weeks, resulting in a 10% increase in mass in beef cattle and a 25% increase in milk production in dairy cows. European Union has already overproduction of milk and beef, so BST is not used.

**Factors VIII and IX**

Factor VIII (FVIII) is an essential clotting factor. The lack of normal FVIII causes Hemophilia A, an inherited bleeding disorder. Factor IX is an essential clotting factor that the lack of it causes Hemophilia B. The genes responsible for both factors are located on chromosome X. It is produced by genetically engineered Chinese hamster ovary cells that have been altered to produce factor VIII or Factor IX .

**Anti-thrombin**
It is a coagulation protein that has many effects in the coagulation cascade. It is a serine protease (EC 3.4.21.5) that converts soluble fibrinogen into insoluble strands of fibrin, as well as catalyzing many other coagulation-related reactions. Thrombin converts fibrinogen to an active form that forms fibrin.
Anti-thrombin antibodies are autoantibodies directed against thrombin. Anti-thrombin antibodies can react with thrombin in the antithrombin-thrombin complex. Antibodies (IgG) against thrombin can strongly inhibit its activity.

**Penicillin**
Penicillin is a secondary metabolite of fungus ***Penicillium***, which means the fungus will not produce the antibiotics while it is growing, but will produce penicillin when it feels threatened. There are also other factors that inhibit penicillin production.

The penicillium cells are grown using a technique called fed-batch culture (The cells are constantly subject to stress) that will produce plenty of penicillin. Modified mutated strains can produce a much larger quantity of penicillin.

**Vaccines**
Most pharmaceutical companies refuse to produce vaccines against diseases such as HIV, malaria and tuberculosis for financial reasons.

These diseases exist in under-developed countries that have no money to spend on them.
Most vaccine development to date has relied on governments and non-profit organizations.

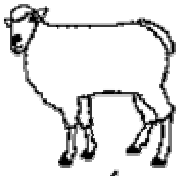
**Rennin**
Rennin is an enzyme used in the production of cheese. It is produced in the stomach of juvenile mammals (including humans) and it helps the digestion of the milk protein caesin by solidifying it so that is remains longer in the stomach. Traditionally the cheese industry has used rennin obtained from the stomach of young calves (calf=single عجل) when they slaughtered, but there are moral and practical objections to this source. Now an artificial cDNA gene for rennin has been made from mRNA extracted from calf stomach cells, and this gene has been inserted into a variety of microbes such as the bacterium *E. coli* and the fungus *Aspergillus niger*. The rennin extracted from these microbes has been very.

**AAT (α-1-antitrypsin)**
alpha 1-Antitrypsin is a glycoprotein made in liver anf founfd in blood. It is generally known as serum trypsin inhibitor. It protects tissues from enzymes of inflammatory cells, especially elastase, and trypsin. In its absence, elastase is free to break down elastin -- which contributes to the elasticity of the lungs -- resulting in respiratory complications leading finally to COPD (chronic obstructive pulmonary disease).

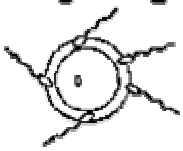
It is an inhibitor of protease enzymes like trypsin and elastase. If AAT gene mutated, the gene becomes inactive, and protease enzymes will be uninhibited. The most noticeable effect of this is in the lungs, where elastase digests the elastic tissue of the alveoli, leading to the lung diseases. Inhaling a spray containing AAT will inhibits the elastase.

AAT can extract from blood, but only in very small amounts. The gene for AAT has been found and cloned, but AAT cannot be produced in bacteria because AAT is glycoprotein. After many attempts, gene AAT is cloned and produced by genetically-modified sheep (inside mammary gland cells). AAT will be secreted with the sheep's milk. The first transgenic sheep to produce AAT was called Tracy, and she produced by PPL Pharmaceuticals in Edinburgh in 1993.
This is how Tracy made:

A female sheep given a fertility drug to stimulate her egg production, and several mature eggs are collected from her ovaries.

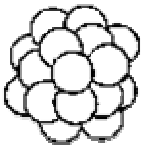


The eggs are fertilized *in vitro*.

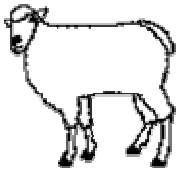


A plasmid is prepared containing the gene for human AAT and the promoter sequence for b-lactoglobulin. Hundreds of copies of this plasmid are microinjected into the nucleus of the fertilized zygotes. Only a few of the zygotes will be transformed, but at this stage you can't tell which.

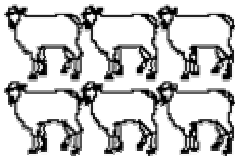
The zygotes divide *in vitro* until the embryos are at the 16-cell stage.



The 16-cell embryos implant into the uterus of surrogate mother ewes. Only a few implantations result in a successful pregnancy.



Test all the offspring from the surrogate mothers for AAT production in their milk. This is the only way to find if the zygote took up the AAT gene so that it can expressed. About 1 in 20 eggs are successful.



Collect milk from the transgenic sheep for the rest of their lives. Their milk contains about 35 g of AAT per litre of milk. Also breed from them in order to build up a herd of transgenic sheep.

Purify the AAT, which is worth about £50 000 per mg.

**Glucosidases**

They are glycoside hydrolase enzymes (EC 3.2.1). These enzymes involved in breaking down complex carbohydrates such as starch and glycogen. The following enzymes are members of the glucosidases family:

| **Name** | **EC** | **Description** |
|---|---|---|
| α-Amylase | EC 3.2.1.1 | is a digestive enzyme in mammals |
| β-Amylase | EC 3.2.1.2 | is a plant enzyme to break down starch |

| | | |
|---|---|---|
| γ-Amylase | EC 3.2.1.3 | is a digestive enzyme |
| Cellulase | EC 3.2.1.4 | breaks down cellulose from plant material |
| Sucrase-isomaltase | EC 3.2.1.10 | - |
| Acid α-glucosidase | EC 3.2.1.20 | is associated with Glycogen storage disease type II |
| Beta-glucosidase | EC 3.2.1.21 | is associated with gaucher's disease |
| Lactase | EC 3.2.1.23 | one member of the β-galactosidase family, breaks down milk sugars, and its absence in adulthood causes lactose intolerance |
| Debranching enzyme | EC 3.2.1.33 | - |
| Pullulanase | EC 3.2.1.41 | has been used as a detergent |

**Deoxyribonuclease**

A **deoxyribonuclease** (**DNase**, for short) is any enzyme that catalyzes the hydrolytic cleavage of phosphodiester linkages in the DNA backbone. Deoxyribonucleases are thus one type of nuclease. A wide variety of deoxyribonucleases are known, which differ in their substrate specificities, chemical mechanisms, and biological functions.

DNases can be exodeoxyribonucleases or endo-deoxyribonucleases. Some can cut the DNA at any sequence, while others, including restriction enzymes, are very sequence-specific.

**Polyhydroxybutyrate (PHB)**

**Polyhydroxybutyrate** (**PHB**) is a polymer belonging to the polyesters class. PHB is produced by micro-organisms (like *Alcaligenes eutrophus* or *Bacillus megaterium*) apparently in response to conditions of physiological stress. The polymer is primarily a product of carbon assimilation (from glucose or starch) and is employed by micro-organisms as a form of energy storage molecule to be metabolized when other common energy sources are not available.

PHB has attracted much commercial interest as a plastic material because its physical properties are remarkably similar to those of polypropylene (PP), even though the two polymers have quite different chemical structures. While PHB appears stiff and brittle سريع التكسر أو التقصف, it also exhibits a high degree of crystallinity, a high melting point of about 180 °C, but, most importantly, PHB is rapidly biodegradable, unlike PP.

Two major factors inhibiting widespread use of PHB lie in its production costs, which are a lot higher than plastics produced from petrochemicals, and its brittleness, since PHB as it is currently produced cannot handle high impact.
At present, several researchers are trying to use genetic technology to produce a better bacteria-based plastic that has more desirable properties and is cheaper to produce. If PHB becomes as cheap as plastics produced from petrochemicals, then it will probably become widely used, since it has the potential to be employed for packaging products like bottles, bags, wrapping film and disposable nappies.

Within the last decade, a team from Michigan State University genetically modified plants to enable them to produce PHB. They had managed to create a plant that could grow plastic within its leaves. After further research, they managed to increase production within the plant without affecting growth: 14% of the dry weight of the genetically modified leaves is PHB.

**Properties of PHB**
1. PHB is water insoluble and relatively resistant to hydrolytic degradation. This differentiates PHB from most other currently available biodegradable plastics, which are either water-soluble or moisture-sensitive.
2. PHB shows good oxygen permeability.
3. PHB has good ultra-violet resistance but has poor resistance to acids and bases.
4. PHB is soluble in chloroform and other chlorinated hydrocarbons.
5. PHB is biocompatible and hence is suitable for medical applications.
6. PHB has melting point 175C.
7. PHB has tensile strength 40 MPa which is close to that of polypropylene.
8. PHB sinks in water while polypropylene floats, but sinking of PHB facilitates its anaerobic biodegradation in sediments.
9. PHB is nontoxic.

## DOLLY

Dolly (July 5, 1996 – February 14, 2003), a ewe, was the first mammal to have been successfully cloned from an adult cell. She was cloned at the Roslin Institute in Midlothian, Scotland, and lived there until her death when she was six years old. Her birth was announced on February 22, 1997.

The technique used is **somatic cell nuclear transfer**, in which a cell placed in a de-nucleated ovum, the two cells fuse and then develop into an embryo. It was Dolly.

The goal of the research was the reproduction of mammals genetically modified to produce therapeutic proteins in their milk.

In 1999, research was published in the journal *Nature* suggesting that Dolly may have been susceptible to premature aging, due to shortened telomeres in her cells. It speculated that these passed on from her donor sibling, who was six years old when the genetic material was taken from her, so that Dolly may have been *genetically* six years old at birth. This is because telomere length is reduced after each cell division, which requires DNA replication before mitosis occurs. The polymerase, part of the replication machinery, cannot reach the end of the chromosome being replicated and clips a little of the telomere at the end off every time replication occurs.
When Dolly was five years old, she had developed arthritis at an unusually early age. This supported the theory of premature aging.

***Dolly's remains as exhibited in the Royal Museum of Scotland***

On February 14, 2003 it was announced that Dolly had died from a progressive lung disease. Such lung diseases are especially a danger for sheep kept indoors, as Dolly had to be for security reasons.

After Dolly's creators successfully demonstrated the cloning, thousands of mammals cloned at present, including horses and bulls, but cloning does not alleviate the problems of loss of genetic diversity and habitat.

## New Phenotypes

This means altering the characteristics of organisms by genetic engineering. The object is to improve the quality of many important plants and animals (GMOs). It is a kind of **a high-technology selective breeding**. Nevertheless, GMOs have turned out to be a highly

controversial development. The table gives an idea of what is being done.

| Organism | Modification |
|---|---|
| Long life tomatoes | Two methods are used to affect the gene for the enzyme polygalactourinase (PG), a pectinase enzyme that softens fruits as they ripen. Either tomato will make less PG, so it ripens more slowly and retain more flavour, or the gene will be silenced, so no enzyme produce after tomato is ripen. Both were successful, neither method increases production. |
| Insect-resistant crops | Genes for various powerful protein toxins have transferred from the bacterium *Bacillus thuringiensis* to crop plants including maize, rice and potatoes. These Bt toxins are thousands of times more powerful than chemical insecticides, and since they are built-in to the crops, insecticide spraying (which is non-specific and damages the environment) is unnecessary. |
| Virus-resistant crops | Gene for virus coat protein has cloned and inserted into tobacco, potato and tomato plants. The coat protein seems to "immunize" the plants, which are much more resistant to viral attack. |
| Herbicide resistant crops | The gene for resistance to the herbicide BASTA has transferred from *Streptomyces* bacteria to tomato, potato, corn, and wheat plants, making them resistant to Basta. Fields can safely spray with this herbicide, which will kill all weeds, but not the crops. However, this means using more agrochemicals, not less. |
| Nitrogen-fixing crops | The project aims to transfer the 15-or-so genes required for nitrogen fixation from the nitrogen-fixing bacteria *Rhizobium* into cereals and other crop plants. These crops would then be able to fix their own atmospheric nitrogen and would not need any fertilizer. However, the process is extremely complex, and the project is nowhere near success. |
| Crop improvement | Proteins in some crop plants, including wheat, are often do not contain essential amino acids, so the protein genes are alter to improve their composition for human consumption. |

| | |
|---|---|
| Mastitis-resistant cattle | The gene for the enzyme lactoferrin, which helps to resists the infection that causes the udder disease mastitis ألتهاب الثدي, has introduced to Herman – the first transgenic bull. Herman's offspring inherit this gene, do not get mastitis and so produce more milk. |
| Tick-resistant sheep | The gene for the enzyme chitinase, which kills ticks القراد by digesting their exoskeletons, has been transferred from plants to sheep. These sheep should be immune to tick parasites, and may not need sheep dip. |
| Fast-growing sheep | The human growth hormone gene has transferred to sheep, so that they produce human growth hormone and grow more quickly. However, they are more prone to infection and the females are infertile. |
| Fast-growing fish | A number of fish species have been given a gene from another fish (the ocean pout) which activates the fish's own growth hormone gene so that they grow larger and more quickly. Salmon grow to 30 times their normal mass at 10 times the normal rate. |
| Environment cleaning microbes | Genes for enzymes that digest many different hydrocarbons found in crude oil have transferred to *Pseudomonas* bacteria so that they can clean up oil spills. |

## Gene Therapy

This is perhaps the most significant and most controversial kind of genetic engineering. It is also the least well-developed. The idea of gene therapy is to genetically alter humans in order to treat a disease. This could represent the first opportunity to cure incurable diseases. Gene therapy means altering the genotype of a tissue or even of a whole human.

### Cystic Fibrosis

Cystic fibrosis (CF) is the most common genetic disease in the World, affecting about 1 in 2500. It caused by a mutation in the gene for protein called CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator). The gene is located on chromosome 7, and there are actually over 300 different mutations known, although the most common mutation is a deletion of

three bases, removing one amino acid out of 1480 amino acids in the protein.
The symptoms of CF: breathlessness, lung infections such as bronchitis and pneumonia, poor digestion and absorption, and infertility. The lung effects are the most serious causing 95% of deaths. CF is always fatal, though life expectancy has increased from 1 year to about 20 years due to modern treatments.
cDNA clone of the gene was made, and the idea is to deliver copies of this good gene to the epithelial cells of the lung, where they can incorporated into the nuclear DNA and make functional CFTR gene again. Clinical trials are going with little success since 1995.

**The Future of Gene Therapy**
Gene therapy is in its infancy, and is still very much an area of research rather than application. No one has yet cured by gene therapy, but the potential remains enticing. Gene therapy need not even be limited to treating genetic diseases, but could also help in treating infections and environmental diseases:

Gene therapy can be either somatic cell therapy or germ cell therapy. Somatic cell therapy means genetically altering specific somatic cells, such as bone marrow cells, pancreas cells, or whatever, in order to treat the disease. This therapy may treat or cure the disease, but any genetic changes will not be passed on their offspring.
Germ-line therapy means genetically altering reproductive cells such as sperm cells, sperm precursor cell, ova, ova precursor cells, zygotes or early embryos that will pass their genes down the "germ-line" to future generations. Alterations to any of these cells will affect every cell in the resulting human, and in all his or her descendants.
Germ-line therapy would be highly effective, but is also potentially dangerous (since the long-term effects of genetic alterations not known). It is currently illegal in most of the World, and current research is focusing on somatic cell therapy only. All gene therapy trials in the UK must approved by the Gene Therapy Advisory Committee (GTAC), a government body that reviews the medical and ethical grounds for a trial. Germ-line modification allows with animals, and indeed is the basis for producing GMOs.

**Economic and political effects of GMOs**
In illiterate society, with farmers ignorant, Biotechnology companies will gain excessive control over the production chain of crops and food, and over the farmers that use their products, as well.

## Additional Information

### Satellite DNA

Satellite DNA consists of highly repetitive DNA, and is so called because repetitions of a short DNA sequence tend to produce a different frequency of the nucleotides adenine, cytosine, guanine and thymine, and thus have a different density from bulk DNA - such that they form a second or 'satellite' band when genomic DNA is separated on a density gradient.

### Tandem repeats

They occur in DNA a pattern of two or more nucleotides is repeated and the repetitions are directly adjacent to each other.

An example would be:

ATTCGATTCGATTCG

in which the sequence ATTCG is repeated three times.

### Minisatellite DNA

It is a section of DNA that consists of a short series of bases 10-60bp. These occur at more than 1000 locations in the human genome. Some minisatellites contain a central (or "core") sequence of letters “GGGCAGGAXG” (where X can be any letter) or more generally a strand bias with purines (Adenosine (A) and Guanine (G))on one strand and pyrimidines (Cytosine (C) and Thymine (T)) on the other. Use the nemonic "pure As Gold" and you will recall that the purines are Adenosine (A) and Guanine (G). Use the nemonic "'CUT"' the Pie" and recall from the C-U-T that pyrimidines are Cytosine (C), Uracil (U)(RNA only for Uracil), and Thymidine (T). It has been proposed that this sequence per se encourages chromosomes to swap DNA. In alternative models, it is the presence of a neighbouring cis-acting meiotic double-strand break hotspot which is the primary cause of minisatellite repeat copy number variations. Somatic changes are suggested to result from replication difficulties (which might include replication slippage, among other phenomena). When such events occur, mistakes are made, this causes minisatellites at over 1000 locations in a persons genome to have slightly different numbers of repeats, thereby making them unique.

"Minisatellites" consist of repetitive, generally GC-rich, variant repeats that range in length from 10 to over 100 bp. These variant repeats are

tandemly intermingled, which makes minisatellites ideal for studying DNA mechanisms.

### Microsatellites

They are called Simple Sequence Repeats (SSRs), consist of repeating units of 1-6 bp in length.

**Satellite DNA, together with Minisatellite and Microsatellite DNA constitute the Tandem repeats.**

## Erythropoietin

Erythropoietin (or EPO) is a glycoprotein hormone that regulates erythrocytes (red blood cells) production. It called hematopoietin or hemopoietin and produced by the kidney. It is used in treating anemia resulting from chronic renal failure or from cancer chemotherapy. When EPO is given in advance, the bone marrow produces more red blood cells.
EPO is a forbidden drug used by athletes (a blood doping agent) in endurance sports such as bicycle racing, triathlons and marathon running. The side effect is that the blood becomes thick enough to strain the heart, especially during sleep when the heart rate is low and clots formed with lead to death.

### Oncomouse

The Oncomouse or Harvard mouse is a type of laboratory mouse that has been genetically modified using modifications designed by Harvard University and DuPont to carry a specific gene called an activated oncogene.
The activated oncogene significantly increases the mouse's susceptibility to cancer, and thus makes the mouse suitable for cancer research

### Telomere

A **telomere** is a region of highly repetitive DNA sequences at the end of a linear eukaryotic chromosome. Telomeres do not contain the codes for proteins, so telomeres are not themselves genes, but neither are they meaningless junk. Instead, these repetitive sequences protect the ends of the chromosome from damage, and prevent the chromosomes from fusing into rings, or binding haphazardly to other DNA in the cell nucleus.

The telomere is composed of repeating sequences and various proteins and acts to protect the terminal ends of chromosomes. This prevents the ends of the chromosome from being processed as a double strand DNA break, which could lead to chromosome-to-chromosome telomere

fusions. The telomere of any divided chromosome will shrink (shorten) a little bit every time a cell divides (**exception only of chromosomes in stem cells, germ cells and white blood cells**). Cells with critically short telomeres alter their character by transcribing a partly distinct set of genes. They also become unresponsive to any stimulation to divide. In humans, the telomere sequence is a repeating string of TTAGGG, between 3 and 20 kilobases in length. There are additional 100-300 kilobases of telomere-associated repeats between the telomere and the rest of the chromosome. Telomere sequences vary from species to species, but are generally GC-rich.

If telomeres become too short, the cell stops dividing and enter into apoptosis stage.

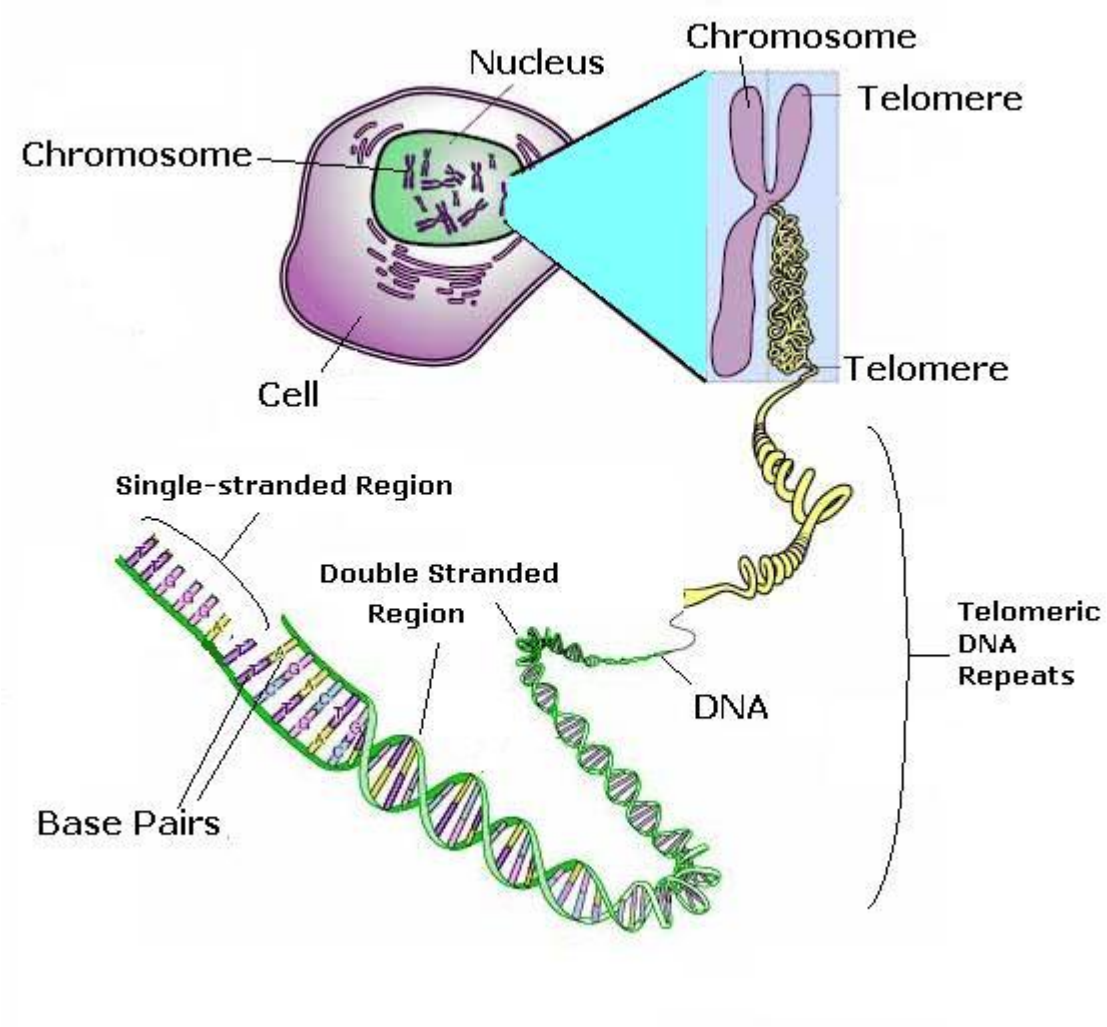
**Telomere shortening**
In order to prolong life, some researchers activate teleomerase by drugs. So far this idea has not been proven in humans. However, it has been hypothesized that by lengthening telomeres, one can slow aging and in exchange increase vulnerability to cancer.

**TELOMERE CANCER THEORY**
The cancer initiated by the mutation of the telomere subunit sequence. An enzyme WTG ("Where To Go" enzyme) picks up or transcribed (after cell division) the released telomere subunit(s) and initiates normal cell functioning. If the telomere subunit mutated, then one of the following things may happen depending on the mutated sequence:
1.) The cell may die.
2.) An oncogene may initialize, but is still under normal telomere counting.
3.) Embryonic growth may initialize, but is still under normal telomere counting.
4.) Telomerase may initialize.

With a corrupted subunit, anything may initialize. Someone with the facilities should create a string of labeled and non TTAGGG subunits and insert it in a living cell and observe the outcome when the labeled sequence becomes active. This is a lot of work as there are 4,095 possibilities.

**Telomerase**
**Telomerase** is an enzyme that adds specific DNA sequence repeats ("TTAGGG" in all vertebrates) to the 3' ("three prime") end of DNA

strands in the telomere regions, which are found at the ends of eukaryotic chromosomes.



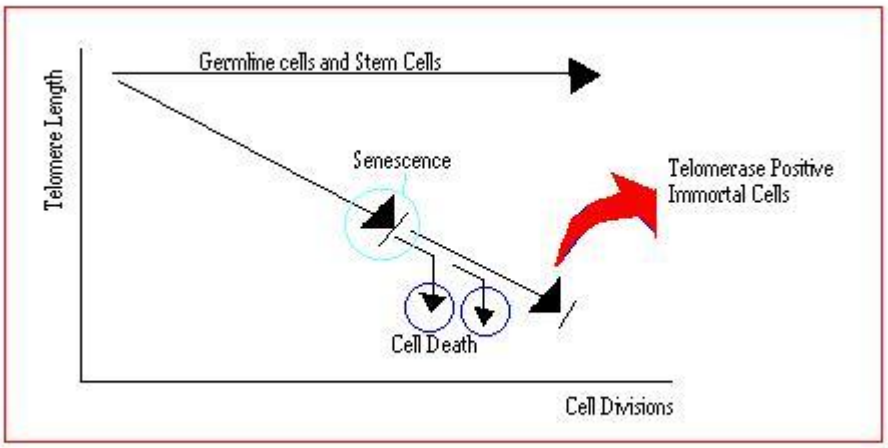

· **Why do we need Telomeres?**

It is thought that the telomeres at the end of chromosomes may have evolved to prevent the unlimited growth of cells by limiting their life span. Evidence that average telomere length correlates with the lifespan of cell in culture, suggests that the growth of human cells is limited by their resource of telomeric DNA.

In normal cells, **mechanisms for maintaining telomere length are absent.** So, with each successive round of cell division, telomeres

progressively **decrease in length**, loosing up to 200 base pairs of terminal DNA from the tips of their chromosomes with each division. Since each chromosome possesses a telomere of finite length, the number of divisions a cell can undergo is limited by this store of telomeric DNA. The more times a cell divides, the shorter the telomere becomes and ultimately after a limited number of cell divisions, the length of the telomere becomes so short that the cell ceases to divide. This non-dividing state is known as **senescence.**

Fig . Behaviour of Cells and their telomere lengths




**Some questions About DNA fingerprinting.**

**Q1. How accurate is it at identification. For example, is it as good as classical fingerprints?**

In theory, with the exception of identical twins, everyone on this planet has a different DNA fingerprint. That is, DNA fingerprinting is as good as classical fingerprinting for identification.

**Q2. What are its advantages?**

In theory DNA fingerprinting will work with much smaller amounts of material than a classical fingerprint and DNA lasts much longer than classical fingerprints. DNA-containing samples that are many years old (up to 25 million yr.) are still usable. Only very tiny quantities of DNA are required in order to carry out a highly accurate test. For example, dried blood, semen, spit, skin etc. on samples stored in dusty files for years are still usable. Samples of mixed DNA's can also be used. DNA containing evidence is much harder to clean up at a crime scene than other evidence, like classical fingerprints.

**Q3. What are its limitations?**
There currently are no accepted Federal standards for controlling the quality of DNA testing nationwide. Lab A may use one set of procedures and standards, whereas, lab B may use another set of procedures and standards. Making comparisons between results from the two labs is difficult. The quality of laboratory personal is not standardized. Technicians may vary in their efficiency. Finally, blood that is mixed with the wrong chemicals or is degraded is difficult to analyze accurately.

**Q4. When faced with DNA evidence what questions should be asked?**
Questions regarding the handling of the evidence, the quality of the testing, including the controls used, the skill of the testing personnel, the accuracy of the data interpretation, possible contamination of the evidence, the possibility of accidental, or intentional misplacement of evidence ***are all valid questions*** that should be raised regarding DNA evidence (or any evidence for that matter). In the end, the fact that **no matter how powerful a new tool in crime fighting is, its ultimate effectiveness is *only as good as the persons using that tool*** should be kept in mind.

## Plants Cloning

Cloning has become one of the most efficient ways to grow plant. Clones are the result of asexual or vegetative propagation, whereas, seeds are the result of sexual propagation. Cloning is basically taking a cutting (a branch or growing portion of the plant, including a few small leaves to aid growth) of one plant, and placing it in a medium and forcing it to take root on it's own, by applying rooting hormones(described later). This cutting then becomes a plant of it's own, but identical to the "parent" plant(the plant from which the clone was taken). This gives us the first benefit of cloning, survival of the fittest.

Unlike with seeds, where the outcome of the plant can be a guess to the grower, clones can be taken from the strongest, healthiest and most productive plants, and turned into genetic replicas of their strong parent plants. This gives you a complete, uniform garden of only the most productive, disease resistant, pest resistant and healthiest plants(or whatever characteristics you decide are the best qualities for your particular plant). Plants that are grown from seed can be non-productive. Some seeds, more

than likely about 30%-60%, can grow up to represent the worst characteristics of their species. They also take time to start and grow; with clones you start with a prebuilt plant, and all that is involved past that is adding the rooting hormone and regular plant maintenance. Although the first step in cloning is the seed, after they have shown their traits, the unhealthiest(by the characteristics you set) can be taken out of the garden, leaving you with your strongest, most productive plants to clone. Your healthy plants are then cloned, and when these clones begin to grow small branches, they too can be cloned and so on and so forth, until you decide to stop. If you decide that you could benefit from cloning then you are ready to begin the next step. In the next part you will be given the information on the materials needed to take your clones, followed by "Ten Steps To The Perfect Clone". I hope your newfound interest in cloning will lead your garden to the amazing results that they lead my garden to. Good luck and happy cloning!!

## WHAT MATERIALS ARE NEEDED TO TAKE A CLONE?

The first thing you will need to take a clone will be a parent plant exhibiting your desired characteristics. The plant should be atleast 2 months old. The next thing you will need is a rooting hormone. They come in liquid, as well as, powder forms. Liquid solutions are used by most professional growers because the have better stem penetration, and exhibit consistent results; powders are less used, because they adhere inconsistently to the stem and yield poor survival rates. The following is a list of rooting hormones good for a wide array of plant types(some of these products are not intended for plants that are used for consumption, so read the labels carefully to make sure you get the solution that will work best for you); Dip-N-Grow, Rootone-F, Woods Rooting Compound, Up-Start, Hormodin, Hormex and Superthrive. You will also need a piece of screen or shadecloth to protect your clones from large amounts of intense light for their first few days. New clones are sensitive to light, and need some sort of shade or filtered sun for their first few days, until they begin to form roots. They will also require foliar feeding via a water spray bottle. In their first few days it is critical that you spray the leaves of your clones with water about 4-5 times a day to supply the water that isn't able to be supplied to the plant through the roots. Just spray the with a fine layer of mist to keep the leaves from dehydrating.

Also needed are a pair of sharp, sterile scissors to cut your clipping and remove excess foliage, a glass of fresh, tepid, water, a pencil or chop stick, and a container(filled with the planting mix of your choice) in which to transfer your new clone. With these materials you are now prepared to take your first clone.

**TEN STEPS TO TAKING THE PERFECT CLONE**

1) Choose a parent plant that is at least two months old. Leach the soil with water, at a rate of 1 gallon water per 5 gallons of soil, once a day for 5 days prior to cloning.

2) Locate some older, lower branches with about 4-6 sets of leaves on them, and that are about 1/8-1/4-inches-wide and 3-8 inches long. With your scissors, make a 45 degree cut across the intended clones branch, being careful not to smash the stem. Trim the 2-3 sets of bottom leaves off the stem, leaving 2-3 sets of leaves above ground. Immediately place the cut end into the glass of fresh, tepid water. This will keep an air bubble from blocking it's transpiration passages, which can kill a plant within 24 hours. Leave your cuttings overnight in the water with no light.

3) Use your pencil or chopsticks to place a hole in the potting soil in your pot, just wider than your clones stem. The hole should bottom out 1/2-1 inch from the bottom of the container to allow for root growth.

4) Now is the time to prepare your rooting solution. Most professional nursery people use liquid hormones which should be mixed just prior to using. There should be dilutions for hardwoods and softwoods, use which ever dilution applies to you. Swirl the stem of your cutting in the solution for 10-20 seconds. Place your clones in the hole and press the potting soil around the base of the stem gently. If you are using a powder hormone, roll the stem in the powder, taking special care to keep a solid layer of powder around the stem when packing the soil into place.

5) Lightly water with a mild solution of water and rooting hormone, until the soil is evenly moist, watering the soil as needed to retain moisture.

6) Place your new clones under filtered sunlight, a piece of shade cloth or a screen to prevent excessive shock to the plant. After 4-5

days they can be moved into a sunny area where they will begin to adjust and continue to grow.

7) With your spray bottle of water, gently mist the leaves of your clones, just lightly covering the surface of the leaves. This will help the plant continue to absorb water without needing roots. Spray about 4-7 times a day, just to keep the leaves from drying out completely.

8) Maintain the temperature of clones at about 70-80 degrees Fahrenheit for about 3 days after growth, bringing them inside if you need to.

9)Some of your cuttings may wilt for the first few days or have rotting leaves if the leaves were in contact with moist soil. Remove any rotten leaves as they may occur. Your clones should look like normal, small, uniform plants after about the first 5-7 days. If any of the plants are still badly wilted at the end of the first week they probably will not survive or if they do they it is unlikely they will catch up with the rest of your plants, and should be removed from the garden.

10) In 1-4 weeks the clones should be well rooted and ready to be checked. To check simply remove one of the clones from it's container to check for the off-white strands of roots. After your plants have rooted they are now ready to be put into their regular growing area and resume growth. In about another month these plants will be ready to be parents their selves. Simply follow the same process as the first clones for each subsequent generation and can be continued as long as you wish for them to. Within no time you will see just how beneficial cloning can be in your garden. Good luck with your new cloning hobbies.

# Molecular Cloning

Molecular cloning refers to the procedure of isolating a defined DNA sequence and obtaining multiple copies of it. Cloning is frequently used to amplify DNA fragments containing genes, but it can be used to amplify any DNA sequence such as promoters, non-coding sequences and randomly fragmented DNA. It is used in a wide array of biological experiments and practical applications such as large scale protein production. Occasionally, the term cloning is misleadingly used to refer to the identification of the chromosomal location of a gene associated with a particular phenotype of interest, such as in positional cloning. In practice, localization of the gene to a chromosome or genomic region does not necessarily enable one to isolate or amplify the relevant genomic sequence.

In practice, in order to amplify any DNA sequence in a living organism, that sequence must be linked to an origin of replication, which is a sequence of DNA capable of directing the propagation of itself and any linked sequence. However, a number of other features are needed and a variety of specialized cloning vectors exist that allow protein expression, tagging, single stranded RNA and DNA production and a host of other manipulations.

Cloning of any DNA fragment essentially involves four steps: fragmentation, ligation, transfection, and screening/selection. Although these steps are invariable among cloning procedures a number of alternative routes can be selected, these are summarized as a ‘cloning strategy’.

Initially, the following steps are taken:

1) The DNA of interest needs to be isolated to provide a DNA segment of suitable size (foreign DNA).
2) Subsequently, a ligation procedure is used where the amplified fragment (foreign DNA) is inserted into a vector by using restriction enzymes,
3) The vector incubated with the fragment of interest (foreign DNA) under appropriate conditions with DNA ligase to ligate.
4) Following ligation, the vector with its foreign DNA is transfected into cells. A number of alternative techniques are available, such as chemical sensitivation of cells, electroporation or others.
5) Finally, the transfected cells are cultured.

6) As the above procedures are of particularly low efficiency, there is a need to identify the cells that have been successfully transfected with the vector construct containing the desired insertion sequence (Foreign DNA) in the required orientation. Modern cloning vectors include selectable antibiotic resistance markers, which allow only cells in which the vector has been transfected, to grow.
7) Additionally, the cloning vectors may contain color selection markers which provide blue/white screening (α-factor complementation) on X-gal medium.
8) Nevertheless, these selection steps do not absolutely guarantee that the DNA insert (foreign DNA) is present in the cells obtained. Further investigation of the resulting colonies is required to confirm that cloning was successful. This may be accomplished by means of PCR, restriction fragment analysis and/or DNA sequencing.

## Cellular cloning

**Cloning a cell** means to derive a population of cells from a single cell. In the case of unicellular organisms such as bacteria and yeast, this process is remarkably simple and essentially only requires the inoculation of the appropriate medium. However, in the case of cell cultures from multi-cellular organisms, cell cloning is an arduous task as these cells will not readily grow in standard media.

A useful tissue culture technique used to clone distinct lineages of cell lines involves the use of cloning rings (cylinders). According to this technique, a single-cell suspension of cells which have been exposed to a mutagenic agent or drug used to drive selection is plated at high dilution to create isolated colonies; each arising from a single and potentially clonally distinct cell. At an early growth stage when colonies consist of only a few of cells, sterile polystyrene rings (cloning rings), which have been dipped in grease are placed over an individual colony and a small amount of trypsin is added. Cloned cells are collected from inside the ring and transferred to a new vessel for further growth

### Cloning in stem cell research

Somatic cell nuclear transfer can also be used to create a clonal embryo. The most likely purpose for this is to produce embryos for use in research, particularly stem cell research. This process is also called "research cloning" or "therapeutic cloning." The goal is not to create cloned human beings, but rather to harvest stem cells that can be used to study human development and to potentially treat disease. While a clonal human blastocyst has been created, stem cell lines are yet to be isolated from a clonal source.

### Organism cloning

Organism cloning refers to the procedure of creating a new multicellular organism, genetically identical to another. In essence this form of cloning is an asexual method of reproduction, where fertilization or inter-gamete contact does not take place. Asexual reproduction is a naturally occurring phenomenon in many species, including most plants and some insects.

## Species cloned

The modern cloning techniques involving nuclear transfer have been successfully performed on several species. Landmark experiments in chronological order:

- Tadpole: (1952) Many scientists questioned whether cloning had actually occurred and unpublished experiments by other labs were not able to reproduce the reported results.
- Carp: (1963) In China, embryologist Tong Dizhou cloned a fish. He published the findings in a Chinese science journal which was never translated into English.
- Mice: (1986) was the first successfully cloned mammal; Soviet scientists Chaylakhyan, Veprencev, Sviridova, Nikitin had mice "Masha" cloned. Research was published in the magazine "Biofizika" volume XXXII, issue 5 of 1987.
- Sheep: (1996) From early embryonic cells by Steen Willadsen. Megan and Morag cloned from differentiated embryonic cells in June 1995 and Dolly the sheep from a somatic cell in 1997.
- Human: (November 1998) hybrid embryo created from leg cells and a cleaned cow egg - not allowed to implant in a womb, nor develop, nor be born due to ethical issues.
- Rhesus Monkey: Tetra (female, January 2000) from embryo splitting

- Gaur: (2001) was the first endangered species cloned.
- Cattle: Alpha and Beta (males, 2001) and (2005) Brazil
- Cat: CopyCat "CC" (female, late 2001), Little Nicky, 2004, was the first cat cloned for commercial reasons
- Mule: Idaho Gem, a john mule born 4 May 2003, was the first horse-family clone.
- Horse: Prometea, a Haflinger female born 28 May 2003, was the first horse clone.

## Human cloning

Human cloning is the creation of a genetically identical copy of an existing or previously existing human. The term is generally used to refer to *artificial* human cloning; human clones in the form of identical twins are commonplace, with their cloning occurring during the natural process of reproduction. There are two commonly discussed types of human cloning: therapeutic cloning and reproductive cloning. Therapeutic cloning involves cloning cells from an adult for use in medicine and is an active area of research: while reproductive cloning would involve making cloned human beings. Such reproductive cloning has not been performed and is illegal in many countries. A third type of cloning called replacement cloning is a theoretical possibility, and would be a combination of therapeutic and reproductive cloning. Replacement cloning would entail the replacement of an extensively damaged, failed, or failing body through cloning followed by whole or partial brain transplant.

The various forms of human cloning are controversial. There have been numerous demands for all progress in the human cloning field to be halted. Some people and groups oppose therapeutic cloning, but most scientific, governmental and religious organizations oppose reproductive cloning. The American Association for the Advancement of Science (AAAS) and other scientific organizations have made public statements suggesting that human reproductive cloning be banned until safety issues are resolved. Serious ethical concerns have been raised by the idea that it might be possible in the future to harvest organs from clones. Some people have considered the idea of growing organs separately from a human organism - in doing this, a new organ supply could be established without the moral implications of harvesting them from humans. Research is also being done on the idea of growing organs that are biologically acceptable to the human body inside of other organisms, such as pigs or cows, then transplanting them to humans, a form of xenotransplantation.

The first human hybrid human clone was created in November 1998, by American Cell Technologies. It was created from a man's leg cell, and a cow's egg whose DNA was removed. It was destroyed after 12 days. Since a normal embryo implants at 14 days, Dr Robert Lanza, ACT's director of tissue engineering, told the Daily Mail newspaper that the embryo could not be seen as a person before 14 days. While making an embryo, which may have resulted in complete human had it been allowed to come to term, according to ACT: "[ACT's] aim was 'therapeutic cloning' not 'reproductive cloning'"

On January, 2008, Wood and Andrew French, Stemagen's chief scientific officer in California, announced that they successfully created the first 5 mature human embryos using DNA from adult skin cells, aiming to provide a source of viable embryonic stem cells. Dr. Samuel Wood and a colleague donated skin cells, and DNA from those cells was transferred to human eggs. It is not clear if the embryos produced would have been capable of further development, but Dr. Wood stated that if that were possible, using the technology for reproductive cloning would be both unethical and illegal. The 5 cloned embryos, created in Stemagen Corporation lab, in La Jolla, were destroyed.

## Ethical issues of cloning

Although the practice of cloning organisms has been widespread for several thousands of years in the form of horticultural cloning, the recent technological advancements that have allowed for cloning of animals (and potentially humans) have been highly controversial. Some believe it is unethical to use a human clone to save the life of another. Others have countered that people who exist today and have interpersonal relationships and personal histories should take precedence over never-conscious life at any stage of developmental maturity. The Catholic Church and many religious organizations oppose all forms of cloning, on the grounds that life begins at conception. Conversely, Judaism does not equate life with conception and, though some question the wisdom of cloning, Orthodox rabbis generally find no firm reason in Jewish law and ethics to object to cloning. From the standpoint of classical liberalism, concerns also exist regarding the protection of the identity of the individual and the right to protect one's genetic identity.

According to the US Food and Drug Administration, food coming from cloned animals is safe to eat. In addition the FDA stated that cloned food does not require special labeling. Both meat and milk from cloned

animals such as swine, goats and cattle have no differences from the conventionally bred animals.

Joseph Mendelson, legal director of the Center for Food Safety, said that cloned food still should be labeled due to the fact that safety and ethical issues of it remain questionable.

Carol Tucker Foreman, director of food policy at the Consumer Federation of America, stated that FDA does not consider the fact that the results of some studies revealed that cloned animals have increased rates of mortality and deformity at birth.

FDA specialists mentioned that when the cloned animals are aged from 6 to 18 months, they are almost similar to conventionally bred animals. The food receives a certain label only in cases when its features are modified by the way it is produced.

## Cloning extinct and endangered species

Cloning, or more precisely, the reconstruction of functional DNA from extinct species has, for decades, been a dream of some scientists. The possible implications of this were dramatized in the best-selling novel by Michael Crichton and high budget Hollywood thriller *Jurassic Park*. In real life, one of the most anticipated targets for cloning was once the Woolly Mammoth, but attempts to extract DNA from frozen mammoths have been unsuccessful, though a joint Russo-Japanese team is currently working toward this goal.

In 2001, a cow named Bessie gave birth to a cloned Asian gaur, an endangered species, but the calf died after two days. In 2003, a banteng was successfully cloned, followed by three African wildcats from a thawed frozen embryo. These successes provided hope that similar techniques (using surrogate mothers of another species) might be used to clone extinct species. Anticipating this possibility, tissue samples from the last *bucardo* (Pyrenean Ibex) were frozen immediately after it died. Researchers are also considering cloning endangered species such as the giant panda, ocelot, and cheetah. The "Frozen Zoo" at the San Diego Zoo now stores frozen tissue from the world's rarest and most endangered species.

In 2002, geneticists at the Australian Museum announced that they had replicated DNA of the Thylacine (Tasmanian Tiger), extinct about 65 years previous, using polymerase chain reaction. However, on 2005-02-15 the museum announced that it was stopping the project after tests

showed the specimens' DNA had been too badly degraded by the (ethanol) preservative. Most recently, on 2005-05-15, it was announced that the Thylacine project would be revived, with new participation from researchers in New South Wales and Victoria.

One of the continuing obstacles in the attempt to clone extinct species is the need for nearly perfect DNA. Cloning from a single specimen could not create a viable breeding population in sexually reproducing animals. Furthermore, even if males and females were to be cloned, the question would remain open whether they would be viable at all in the absence of parents that could teach or show them their natural behavior. Essentially, if cloning an extinct species were successful — it must be considered that cloning is still an experimental technology that succeeds only by chance. It is far more likely than not that any resulting animals, even if they were healthy, would be little more than curios or museum pieces.

Cloning endangered species is a highly ideological issue. Many conservation biologists and environmentalists vehemently oppose cloning endangered species — not because they think it won't work but because they think it may deter donations to help preserve natural habitat and wild animal populations. The "rule-of-thumb" in animal conservation is that, if it is still feasible to conserve habitat and viable wild populations, breeding in captivity should not be undertaken in isolation.

In a 2006 review, David Ehrenfeld concluded that cloning in animal conservation is an experimental technology that, at its state in 2006, could not be expected to work except by pure chance and utterly failed a cost-benefit analysis. Furthermore, he said, it is likely to siphon funds from established and working projects and does not address any of the issues underlying animal extinction (such as habitat destruction, hunting or other overexploitation, and an impoverished gene pool). While cloning technologies are well-established and used on a regular basis in plant conservation, care must be taken to ensure genetic diversity. He concluded:

الجامعة التكنولوجية
قسم العلوم التطبيقية
فرع التقنيات الكيميائية الاحيائية

# ملزمة
# الهندسة الوراثية العملي

إعداد

هبة منير عبد الحسن (M.Sc.)

وسناء هاتف محمد (M.Sc.)

٢٠٠٧-٢٠٠٨

# الهندسة الوراثية ( العملي )

## التعليمات والأرشادات الواجبة أتباعها في مختبرات الهندسة الوراثية التعليمية

**أولاً : سجلات التجارب والتقارير**

تتضمن السجلات تدوين التجارب التي يتم أنجازها خلال السنة الدراسية، ويجب أن يتبع الطالب الارشادات في كتابة التجارب وتسجيل البيانات والنتائج وكما يأتي:

١. أسم التجربة Title of experiment
٢. الغرض من التجربة Purpose ويثبت بجملة أو جملتين
٣. الهدف Objective: لماذا ولأي غاية وكيف
٤. المواد والطرائق Material & methods لكل طريقة ومصدرها .
٥. البيانات والنتائج Data / Results

يجب تثبيت جميع البيانات خلال التجربة وأستنساخ الأشكال والمخططات من المرجع العلمي ، أو في جداول وأشكال جديدة ضرورية ، الحسابات ، المعادلات ، الأخطاء التحليلية ، وتصحيح البيانات المدونة .

٦. المناقشة والاستنتاجات Discussion & Conclusion

تتضمن مناقشة وربط النتائج والأستنتاجات والمقترحات .

٧. المصادر References .

**ثانياً : أجراءات السلامة**

١. اقرأ التجربة جيداً عدة مرات لغرض خفض فرص الاخطاء ، كما أن التحضير المسبق لمتطلبات التجربة سوف يزيد من كفاءة وسرعة أنجازها.
٢. عدم الشرب والأكل والتدخين في المختبر .
٣. إرتداء الصدرية في المختبر لتجنب تلوث الملابس بالأحياء المجهرية أو المواد الكيميائية والصبغات.

٤. أدخال المواد ذات العلاقة بالمختبر ( سجل ، مواد المختبر .. ) وترك كل المواد الأخرى خارج المختبر أو الأماكن المخصصة لها.
٥. تعقيم مكان العمل قبل البدء وبعد الأنتهاء وأرتداء القفازات المطاطية والأقنعة في تجارب الهندسة الوراثية.
٦. تعليب كل المواد والمزارع بشكل صحيح ودقيق متضمناً النوع ، التأريخ ، التجربة.
٧. جمع المواد والمزارع التالفه في حاويات خاصة واتلافها في اجهزة التعقيم ثم حرقها وطمرها عدا المواد المشعة حيث يتم جمعها في حاويات خاصة لحين نقلها الى أماكن طمر خاصة.
٨. إعادة جميع المواد المستخدمة الى امكانها وغسل الزجاجيات وتجفيفها.
٩. النظافة أساس التجربة الناجحة.

**ملاحظات عامة**

عند أجراء تجارب الهندسة الوراثية فان هناك ملاحظات مهمة في التعامل مع المواد والمزارع وهي :

١. يتطلب أستخدام معدات وأجهزة الهندسة الوراثية ممارسة مستمرة صحيحة لهذه المعدات والاجهزة مثل الماصات الأوتوماتيكية الدقيقة، خلايا الترحيل، مجهزات القدرة ، أنابيب الأختبار ، أجهزة النبذ المركزي.
٢. يتطلب تحضير المحاليل والأوساط الزراعية والهلام دقة عالية بالأوزان والحجوم، مع التقيد التام بطريقة العمل، لأن أي خلل في التحضيرات يؤثر أساساً على الشحنات الصافية والقوةالأيونية.
٣. يتم تداول المعدات والاجهزة والمحاليل وأواسط الهندسة الوراثية بصورة سليمة وحسب التجربة، فعند أجراء تجارب انزيمية ، لا بد من إستخدام قفازات وأقنعة جديدة وذلك لتجنب الفشل المرتقب أرتدائها ، لأن الأنزيمات الموجودة في اليد ستؤثر على المادة الوراثية ، كما يجب تجنب لمس الصبغة السامة Ethidium Bromide باليد مطلقاً.

٤. يتم العمل في كابينة معقمة مع التأكد من عدم وجود أي تيارات هوائية ملوثة.

**الأجهزة والمعدات المطلوبة في مختبرات الهندسة الوراثية**

هناك أجهزة متخصصة في مجال الهندسة الوراثية فضلاً عن الأجهزة التقليدية في مختبرات الأحياء المجهرية ، ومن هذه الأجهزة:

**اولا : أجهزة النبذ المركزي Centrifuges**

تكون الفائدة منه فصل الجزيئات الخلوية عن بعضها، حيث يقوم الجهاز بترسيب الخلايا بمعدل يعتمد على حجم وشكل وكثافة الخلايا.

يجب موازنة جميع أنابيب النبذ المركزي المتقابلة ، وكلما زادت سرعة الجهاز ، كان لا بد من الموازنة الدقيقة ، بحيث لا يتجاوز فرق الوزن في أجهزة النبذ المركزي عالية السرعة 0.0001g، وإلا فهناك احتمال أن يترك الرأس head موقعه.

بصورة عامة، لا بد ممن موازنة أنابيب النبذ المركزي بإستمرار مهما كانت السرعة المستخدمة، لأن هناك احتمال كبير في تحطم الأنابيب الزجاجية المحتوية على المحلول في حالة عدم الموازنة.

يجب التذكر أنه عند عمل جهاز النبذ المركزي ، فأن الأنابيب تصبح بصورة أفقية تماماً ، ولكن لا ينسكب السائل لأنه يكون منجذباً إلى المركز ، ولهذا يجب تجنب إيقاف الجهاز بصورة مفاجئة.

يمكن تقسيم أجهزة النبذ المركزي إلى:

**١ - أجهزة النبذ المركزي العادي المبرد (Cooling centrifuge)**

تستخدم في فصل الخلايا الميكروبية حيث تفصل المواد استناداً إلى كثافتها ووزنها، وتتراوح سرعتها بين 0-6000 rpm/min ، وبدرجة حرارة تتراوح بين 0-30°C ، علماً أن الحرارة المستخدمة لفصل الخلايا هي 4°C

أما حجم الأنابيب المستخدم فيتراوح بين 5مل – 100 مل اعتماداً على الرأس المستخدم [Head].

**٢ - أجهزة النبذ المركزي الدقيق (Microcentrifuge)**

هي أجهزة منضدية متخصصة، اما مبردة او عادية، تصل سرعتها الى 15000 دورة لكل دقيقة، وتستخدم انابيب نبذ خاصة تسمى (أنابيب أبندروف Epindroff tubes ، حجمها بين 0.5-5ml ، وهذه الأنابيب شائعة الاستخدام في مجال الهندسة الوراثية وفصل البروتينات، وتكون ذات شكل مخروطي ذات غطاء، وهي من اللدائن الشفافة polypropylene حيث تمتاز بمقاومتها للمذيبات بأنواعها والحوامض المعدنية ، وتستخدم اللدائن الشفافة في صنع انواع الأنابيب والأدوات المستخدمة في الهندسة الوراثية.

تكون النهاية المخروطية لهذه الأنابيب مهمة لتركيز المادة المراد جمعها كونها ذات تركيز أو أوزان قليلة، وتستخدم في الطرق المصغرة لفصل المادة الوراثية لاسيما الدنا الخارجي Extrachromosomal DNA مثل البلازميدات.

**٣ - أجهزة النبذ المركزي عالي السرعة**

**High-speed cooling centrifuge**

تمتاز بزيادة سرعة النبذ المركزي وتصبح الحاجة للتبريد أساسية وذلك لان زيادة السرعة يعني تولد حرارة عالية جداً ، لذلك تصمم أجهزة النبذ المركزي عالية السرعة ليكون التبريد أساس فيها، وتصل سرعة هذه الأجهزة الى 20000 دورة/دقيقة ، وتستخدم فيها أنابيب ذات أحجام تتراوح بين 5 مل – 500مل وهي ليست منضدية ، وإنما أرضية تتم موازنتها عند نصبها لتجنب تضررها ، وتستخدم هذه الأجهزة لفصل المواد استناداً إلى وزنها وكثافتها حيث تستخدم لفصل الدنا والرنا عند استخلاصهما من الخلية، وكذلك لفصل

الجزيئات البروتينية كالأنزيمات، والهرمونات، والببتيدات الاخـــرى، ويمكـــن فصل كميات جيدة بسبب السعة الكبيرة للأنابيب.

**٤ - أجهزة النبذ المركزي فائق السرعة (Ultra-centrifuge):**

تزيد سرعة هذه الأجهزة على 50000 دورة/ دقيقة ، وتعمل تحت ظـــروف مبردة، وفيها أجهزة لشفط الهواء الحار المتولد لدى الاحتكـــاك العـــالي مـــع الرأس، وتستخدم هذه الأجهزة لفصل قطع الدنا والبلازميدات وفي تنقية الـــدنا والرنا ، ويتم الفصل اعتماداً على الكثافة البيونية Bayonet density حيث لا تترسب قطع الدنا في قاع انبوبة النبذ، وانما تتجمع القطع بنفس الوزن الجزيئي والكثافة والشكل الفيزياوي بشكل حزم تعرف من خـــلال الـــصبغة المتألقـــة المستخدمة مثل Ethidium bromide .

**ثانياً: أجهزة الترحيل الهلامي Gel electrophoresis :**

توجد عدة انواع من أجهزة الترحيل الهلامي وهي :

١- الترحيل الهلامي الافقي Horizontal GE

٢- الترحيل الهلامي العمودي Vertical GE

٣- الترحيل الهلامي الأنبوبي Tube GE

يـــستخدم هـــلام الاكـــروز Agarose gel وهـــلام البـــولي اكريـــل امايـــد polyacrylamide gel مع sodium dodecyl sulfate (SDS) أو بدونه في الأجهزة المستخدمة في فصل جزيئات DNA اعتماداً على وزنها الجزئي وشكلها الفيزياوي

**ثالثاً: جهاز المطياف Spectrophotometer**

يقرأ الامتصاصية Absorbance لكل مادة مذابة بأطوال موجية تتراوح ما بـــين 160-900nm، علماً أن اطوال الاشعة فوق البنفسجية تتراوح مـــا بـــين 160-400nm ، بينما أطوال الضوء المرئي تقع ما بين 400-900nm.

يقاس تركيز الـــ DNA بطول موجي فوق بنفسجي 260nm ، بينما بقاس تركيز الـــبروتين بطول موجي فوق بنفسجي 280nm.

**رابعاً: الكابينة البيولوجية Biological cabinet**

تسمى أيضاً Laminar flow Cabinet، وهو حيز صندوقي مجهز بالاضـــاءة ومصدر للأشعة فوق البنفسجية (UV–light) ومنظومة لسحب الهواء وتعقيمـــه عبر مرشحات سليلوزية (0.2-0.45um).

بما أن أصغر قطر للبكتريا هو 0.2um، فيجـــب أن يكـــون حجـــم الثقـــب فـــي المرشحات السليلوزية في الكابينة البيولوجية المخصصة لزرع البكتريا 0.2um، لكي لا تمر البكتريا عبرها.

يتم أنجاز كل الفعاليات البيولوجية في هذه الكابينة لاسيما المتعلقة منها بتجـــارب الهندسة الوراثية والأحياء المجهرية.

**خامساً: أجهزة التبريد والتجميد**

**Cooling and Freezing apparatus**

تستخدم هذه الأجهزة مثل الثلاجات (4°C) والمجمدات (-4°C) لحفظ العـــزلات الميكروبية والمواد الوراثية، لفترات القصيرة أوالمتوسطة (ثلاثة أشهر فقط)، ويتم حفظ المواد لفترات طويلة الأمد (سنوات) في مجمدات خاصة (-80°C)، أو فـــي سائل النتروجين Liquid Nitrogen.

**سادساً: أجهزة التجفيد Freeze drying apparatus**

وتسمى أيضاً Lypholizers، وهي أجهزة تجمد المادة من خلال خفـــض درجـــة الحرارة، وفي الوقت نفسه يتم تخفيف الضغط الجوي مما يـــؤدي إلـــى خـــروج قطرات الماء من المادة التي تحتفظ بشكلها الطبيعي ولا يوجد بداخلها حبيبات ثلج.

**سابعاً: جهاز الموجات الكهرومغناطبيسية Microwave**

المـــايكرويف microwave جهـــاز لتـــسخين الطعـــام باســـتخدام الموجـــات الكهرومغناطيسية الأقصر من موجات الراديو.

يقوم الجهاز بتسخين الطعام عن طريق أطلاق جزيئات كهرومغناطيسية تتحـــرك بسرعة كبيرة وتصطدم بجزيئات الماء (الموجودة داخل الطعام) مما يجعلها تفقـــد توازنها وتدور بسرعة حول نفسها (جزيئات الماء كمعظم الجزيئات الأخرى لهـــا شحنة موجبة في أحدى النهايتين وشحنة سالبة في النهاية الأخرى، ولهـــذا تـــدور حول نفسها لغرض الوصول إلى حالة توازن)، ويؤدي دوران جزيئة الماء إلـــى توليد طاقة تؤدي إلى دوران الجزيئات المحيطة بها مثـــل جزيئـــات البروتينـــات والكربوهدرات والشحوم وغيرها مما يؤدي إلى تسخين الطعام بسرعة.

في حالة التسخين الأعتيادي على النار، تتحرك الجزيئات المكونة للنـــار بـــسرعة فتصطدم بسطح الإناء الموضوع فيه الطعام وتجعل جزيئاته في حالة عدم توازن، وهذه الجزيئات تحفز جزيئات الماء في الطعام على الحركة وهكذا.

الفرق بين عملية التسخين بالمايكرويف والتسخين الاعتيادي هو قـــدرة الموجـــات الكهرومغناطيسية في المايكرويف على اختراق مناطق عميقة مـــن الطعـــام ممـــا يؤدي إلى تسخينه ، مما أدى الى القول الشائع الخاطيء بأن (المايكرويف يـــسخن الطعام من الداخل إلى الخارج).

بصورة عامة، يغلي الماء النقي بسرعة كبيرة في المـــايكرويف، بينمـــا الطعـــام المجمد يحتاج وقت أكثر، لأن جزيئات الماء تحتاج وقـــت لتتحـــرك، وتحتـــاج جزيئات الدهون فترة طويلة ليتم تسخينها.

**ثامناً: أجهزة التقطير Distillation units**

هناك عدة أنواع منها ، بعضها يقوم بتبخير الماء ثم تكثيفه لمرة واحدة (ذات المرحلة الواحدة Single stage ) وبعضها يتم إعادة تسخين الماء وغليه ثم تكثيفه مرة أضافية (ذات المرحلتين Double stage )، وأما جهاز أنتاج الماء اللاأيوني Demonized water فيقوم بإزالة الايونات من الماء ولكنه لا يعقمه ، وهناك أجهزة لإنتاج ماء لاأيوني ومعقم معاً، ولهذا الماء أهمية كبيرة في مجال الهندسة الوراثية.

**تاسعاً: جهاز تحليل الأحماض الامينية Amino Acid Analyzer**

يستخدم لمعرفة تسلسل الأحماض الامينية في البروتين أو البولي ببتايد وتركيزها ونسبها، علماً ان معرفة تسلسل هذه الأحماض له أهمية كبيرة في مجال الهندسة الوراثية.

**عاشراً: جهاز انزيم البلمرة المتسلسل (PCR)**
**Polymerase Chain Reaction**

يقوم بعملية تضاعف DNA باستمرار بحيث تزداد كمياته اعتماداً على التغير السريع في درجات الحرارة.

**الهندسة الوراثية**

هو التلاعب بالمحتوى الوراثي لكائن معين من اجل تغيير صفاته الوراثية. ويشمل هذا التعريف العام كل الطرق التي من شأنها أن تغير البنى الوراثية مثل طريقه تربيه الحيوانات والنباتات Animal and plant breeding والطرق الوراثية التقليدية الأخرى مثل إحداث الطفرات الوراثية والتزاوج في الإحياء المجهريه، فضلاً عن تقنيات الهندسة الوراثية الحديثه التي تعرف بتقنيه ألدنا الهجينة Recombinant DNA techniques التي تعتمد على تكوين بنى وراثية

جديدة عن طريق ربط مواد وراثية مختلفة في أنابيب الاختبار (خارج الخلايا in vitro).

لا تقتصر أهميه أو فائدة الهندسة الوراثية على إنتاج كائنات هجينه ذات مواصفات مرغوبة فحسب، بل كانت وسيله ممتازة للتعرف على الكثير من الأسرار العملية وبالذات تلك التي تخص بناء ووظيفة ألجين والتي تكون ذات فائدة كبيره في التعرف على طبيعة الكائن الحي بشكل أفضل، ومن كل ما تقدم يمكن إن نستخلص أن جميع التجارب المختبرية في هذا المجال تتفاعل مع جزيئات الخلية التي لا يمكن رؤيتها بالعين المجردة مما يحتاج إلى مهارة ودقه فائقة في العمل لاسيما وان المحاليل المستخدمة يجب أن تحضر بحيث تحافظ على حيوية هذه الجزيئات مثل ألـ(DNA)، لذا يجب ضبط تراكيز المواد المحضرة وألـpH لأن أي خلل في ذلك سيؤدي إلى تحطيم ألجزيئه المراد دراستها واستخلاصها وبالتالي استخدامها.

**الحامض النووي منقوص الأوكسجين (الدنا): -**

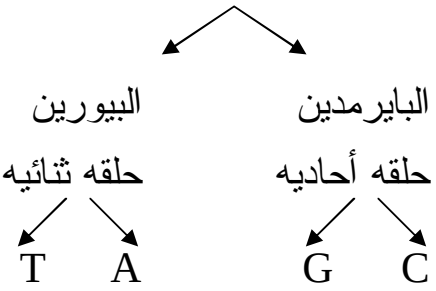
**Deoxyribonucleic acid (DNA)**

يتكون من سلسلة حلزونية مزدوجة طويلة من الوحدات البنائية التي تسمى النيوكليوتيدات (التي تضم القواعد النتروجينيه وجزيئة سكر وفوسفور)، ويعد الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA أساس الهندسة الوراثية، ويتكون من أربعة قواعد نتروجينية هي:Adenine, Cytosine, Guanine and Thymine

يقوم DNA بتخليق الحامض النووي الرايبوزي RNA داخل النواة بعملية تسمى الاستنساخ Transcription، ويقوم الـRNA بتخليق البروتينات حياتياً بعملية (الترجمة Translation).

يوجد الـDNA في الطبيعة داخل نواة الكائن الحي مرتبطاً بنوع من البروتينات تسمى الهستونات histones ، ويكون كلاهما الكروموسوم chromosome.

**القواعد النايتروجينيه**




**الفرو قات بين ألدنا والرنا**

١- سكر الرايبوز في ألدنا هو الرايبوز منقوص الأوكسجين بينما في الرنا هو سكر الرايبوز.

٢- غياب قاعدة الثايمين من الرنا

٣- غياب قاعدة اليوراسيل من ألدنا بينما توجد في الرنا.

٤- ألدنا هي سلاسل مزدوجة بينا الرنا هي سلاسل منفردة.

# تحضير DNA من البصل

**معلومات عامة ليست للحفظ**

الأسم العلمي للبصل هو ***Allium cepa*** ، ويستخدم في علاج أمراض البرد ، ويحوي مواد مضادة لإلتهاب الحروق فيعقمها ويخفف الآمها.

تحوي خلايا البصل مجموعة من اوكسيدات الكبريت sulphoxide وعلى مجموعة إنزيمات تسمى ailiinases ، وتقوم مجموعة الأنزيمات بتحليل أوكسيدات الكبريت إلى حوامض كبريتية غير ثابتة تسمى sulphenic acids تتحول إلى غازات طائرة تسمى syn-propanethial S-oxide ، وعند وصول هذه الغازات إلى عين الإنسان تتفاعل مع الماء الموجود على سطح العين (الدموع) مكونة حامض كبريتيك مخفف $H_2SO_4$ مما يؤدي إلى تهيج نهايات أعصاب العين مما يحملها على إفراز كميات من الماء (بشكل دموع) لتخفيف الحامض.

لغرض منع تدفق الدموع عند تقشير البصل، في الأمكان تقشير البصل تحت الماء، أو استخدام سكين مبردة ، أو استخدام بصل مجمد، أو استخدام سكين حاد جداً لتقليل تدمير الخلايا.

تم انتاج مسيل للدموع صناعي من البصل من قبل أحدى الشركات الكندية لاستخدامه كغاز مسيل للدموع ، ولكن ثبت أن الغاز الناتج من البصل يتحلل تلقائياً بعد ثلاثة أشهر فقط مما أدى إلى فشل المشروع.

**مصطلحات**

أن الشخص له مشكلة حادة ليس لها حل = He is in an onion

شخص ثقيل الظل = He is an onion

**ملاحظات مهمة للحصول على نتائج أفضل**

١- الماء الساخن من الحنفية يصل ٦٠م ، والماء البارد من الثلاجة يصل ٤م ، وهما كافيان لاجراء التجربة.

٢- رج الخليط بصورة مستمرة عند وضعه في انبوبة الاختبار من خلال قلب انبوبة الاختبار بهدوء عدة مرات منعاً لتكسر DNA.

٣- عند وضع مزيج البصل في حوض ماء ساخن أو حوض ماء بارد ، استخدم ملعقة لضغط البصل داخل انبوبة الاختبار للاسراع في استخلاص DNA.

٤- تجنب تكوين فقاعات لأنها ستحتوي بداخلها مواد غير ذائبة منها DNA ، لهذا يجب التقليل من تكونها.

٥- عملية الترشيح هي أطول العمليات (٤٠-٦٠ دقيقة) ولكنها مهمة للحصول على كمية واضحة من DNA

## الطريقة الأولى لاستخلاص DNA

**مواد العمل**

- اناءان بحجم ١٠٠مل مدرجة
- اناء جحم ٢٥٠مل مدرج.
- أنابيب اختبار
- ملعقة قياس
- سكين حاد لقطع البصل
- ملعقة كبيرة للخلط
- خلاط (غير محبذ استخدامه لأنه من المحتمل بقاء رائحة البصل في الخلاط ، لذا في الامكان استخدام وسائل أخرى للسحق مثل الهاون الخزفي)
- محرار (٦٠°م)
- قمع
- نسيج خفيف cheese cloth

- حوض ماء ساخن (٥٥-٦٠°م)، وماء الجنفية الساخن يصل لهذه الدرجة
- حوض ماء بارد
- ماء مقطر
- شامبو ( مخفف حسب النوع مخفف بنسبة ١: ١٠ حسب التجربة)
- بصلة كبيرة
- ملح طعام (مؤين او غير مؤين)
- ٩٥% كحول اثيلي ethanol

## طريقة العمل

### تحضير محلول الاستخلاص

يتكون محلول الاستخلاص (بصورة عامة) من مزج ملعقة أكل كبيرة (10ml) من الشامبو (أو مسحوق الغسيل) مع نصف ملعقة شاي (1.5g) من ملح الطعام لغاية 100ml من الماء المقطر، ويجب إذابة الملح ببطء دون تكوين فقاعات

### تحضير ثمرة البصل

يتم تقطيع البصل ووضعه في إناء (١٠٠٠مل)، ويجب أن تكون القطع متوسطة الحجم وليست ناعمة جداً، ثم يتم استخدام حوالي 100g من البصل في التجربة

### هرس البصل

تتم إضافة سائل الاستخلاص إلى البصل المقطع، ويتم هرسه بواسطة الهاون الخزفي أو بظهر ملعقة كبيرة، ونقل الخليط إلى إناء أو أنبوب اختبار مناسب، وبعد ذلك تجري الخطوات الآتية:

١-يتم تسخين حوض الماء إلى ٥٥ –٦٠°م ، وتحضير حوض الماء البارد
٢-يوضع الإناء المحتوي البصل المهروس في حوض ماء حار (٥٥–٦٠°م) لمدة ١٠ – ١٢ دقيقة، ويتم بسحق البصل خلال هذه الفترة بظهر الملعقة في

الإناء (أو أنبوبة الاختبار)، ويجب عدم إبقاء البصل في الماء الحار أكثر من ١٠ دقائق وإلا سيتحلل الـ DNA.

٣-يتم تبريد المزيج لمدة ٥ دقائق في حوض ماء ثلجي، مع الاستمرار في الضغط على البصل بظهر الملعقة للإسراع في تحطيمه.

٤- يتم ترشيح الخليط بواسطة (أربعة طبقات من النسيج الناعم)، مع محاولة منع الرغوة من المرور، ومن الافضل وضع المزيج في الثلاجة وتركه يترشح ببطء طوال الليل.

٥-يوضع الراشح filtrate في أنابيب اختبار مملوءة إلى الثلث

٦- في الإمكان خزن الراشح في الثلاجة لمدة يوم واحد

٧- يضاف كحول أثيلي بارد (مساوية لكمية الراشح) إلى كل أنبوبة اختبار لخلق طبقة كحولية في اعلى المزيج ، وفي الإمكان إضافة الكحول بثلاث طرق

آ - من خلال ملء انبوبة باستور بالكحول ، ووضع طرفها في قاع انبوبة الاختبار ، وضخ الكحول ببطء

ب- وضع الكحول في قاع انبوبة الاختبار ثم صب الراشح فوقه ببطء

ج- يتم صب الكحول على جانب انبوبة الاختبار (وليس بصورة عمودية) باستخدام انبوبة باستور

٢) بعد إضافة الكحول ، يتم ترك المزيج دون حركة لمدة ٢ – ٣ دقائق وعدم هز انبوبة الكحول مطلقاً

٤) ستتم مشاهدة راسب DNA الابيض (لعاب أبيض) يتجمع في الطبقة الكحولية، وفي الإمكان سحبه بواسطة تدوير قضيب زجاجي بلاستيكي باتجاه واحد ليتجمع الـ DNA حوله، حيث يتم حفظه في الكحول.

**ملاحظة**: يستطيع الطالب حذف بعض الخطوات من أجل المقارن، فمثلاً ماذا يحدث لو لم يضع الطالب البصل في ماء ساخن لمدة ١٠ دقائق، أو أكتفى بالسحق دون استخدام الشامبو؟؟

## أسباب خطوات التجربة

**السحق أو الخلط**

يؤدي السحق أو الخلط إلى أضعاف الروابط السليلوزية الرابطة لجدار الخلية النباتية ، أو أضعاف ألياف الخلية الحيوانية

**إضافة الماء الحار**

تؤدي إضافة الماء الحار (50°C) إلى:

- إضعاف الروابط السليلوزية في جدار الخلية النباتية وأضعاف ألياف الخلية الحيوانية
- إضعاف روابط الشحوم الفوسفاتية في الغشاء البلازمي للخلية
- تحليل الأنزيمات النووية DNAses and nucleases التي تحلل DNA إلى اجزاء صغيرة

**التبريد**

لغرض إبطاء أو منع عمل الانزيمات النووية DNAses and nucleases التي تحلل DNA إلى اجزاء صغيرة

**كلوريد الصوديوم**

يقوم كلوريد الصوديوم بحماية النهايات الفوسفاتية السالبة الطليقة في اللولب الحلزوني مما يسمح لشريطي اللولب بالتقارب وزيادة الالتفاف مما يفصله عن محتويات الخلية الأخرى ويجعله يترسب بسهولة

**إضافة مساحيق التنظيف أو الشامبو**

تحوي المواد المنظفة على تراكيز عالية من بعض المركبات الكيمياوية مثل Sodium dodecyl sulphate-SDS تقوم بتفكيك الأواصر التي تربط البروتينات والشحوم في الغشاء البلازمي مما يجعلها تترسب، أي أن المنظفات

تحطم جدار الخلية وغشائها.
في الأمكان إضافة SDS عال النقاوة بمفرده في التجارب التي تتطلب تحضير DNA نقي.
في الأمكان أيضاً إضافة سترات الصوديوم sodium citrate التي هي عامل تكليب Chelating agent لغرض سحب عنصر الكالسيوم Calcium من الغشاء البلازمي مما يؤدي إلى تفكك العشاء البلازمي.
**ملاحظة: لا يتم استخدام شامبو الأطفال أو شامبو -مكيف لقلة تركيز SDS فيهما**

**الترشيح**
للتخلص من محتويات الخلية الأخرى المختلطة بالـ DNA

**إزالة الفقاعات**
في جميع التجارب الكيمياوية على الإطلاق، يؤدي وجود فقاعات هوائية إلى وجود جزء من المادة داخلها مما يؤثر على التركيز ، فعلى سبيل المثال عند إضافة 20mg إلى محلول، فمن المحتمل أن تحوي الفقاعات على 2mg مما يعني إذابة 18mg في المحلول.
أما في حالة التنقية ، فمن المحتمل أن تحوي الفقاعات على قسم من الـDNA النقي داخلها.

**الكحول الأثيلي المبرد**
يتم استخدامه لأن الـ DNA لا يذوب فيه ، ويكون الـDNA أقل كثافه منه فيطفو على سطحه
سيمتص الكحول الأثيلي البارد (كأي سائل مبرد) بعض الغازات التي سيتم طرحها عندما ترتفع درجة حرارته، ولهذا تظهر فقاعات غازية تدريجياً عند إضافة الكحول للماء.

## الطريقة الثانية لاستخلاص DNA من البصل

هذه الطريقة مهمة لاستخلاص كميات كبيرة من DNA من البصل او مصادر حيوانية او نباتية اخرى مثل عينات الدم، كما يتم في هذه الطريقة استخدام isopropanol بدلاً من الكحول المثيلي، واستخدام سترات الصوديوم sodium citrate بدلاً من ملح الطعام، واستخدام SDS بدلاً من الشامبو.

**مواد العمل**

- هاون خزفي
- ٦٠ – ٧٠°م حوض ماء
- isopropanal
- sodium dodecyl sulphate (SDS) (أو أي محلول محلل للبصل)
- بصل مقطع
- سترات الصوديوم sodium citrate
- نسيج قماش خفيف
- ثلج
- ٥٠ مل اناء مخروطي 50ml conical flask
- ١٥مل اناء مخروطي يحوي ٥٠% كحول اثيلي
- ٥٠٠مل اناء زجاجي 500ml Beaker
- ٢٥٠مل اناء زجاجي 250ml Beaker
- عيدان بلاستيكية

**طريقة العمل**

١) يتم وضع ١٠غم بصل مقطع في دورق مخروطي (٥٠مل)، ويضاف أليه ٢٥ مل من المحلول المحلل للبصل SDS مع قليل من سترات الصوديوم إلى الدورق،

٢) يتم نقل الخليط إلى هاون خزفي وسحقه عدة مرات

٣) يوضع الخليط في ٦٠°م لمدة ١٠ دقائق
٤) يتم تبريد الخليط بوضعه في حوض ثلجي ، ويتم تحريك الدورق إلى ان يبرد الزجاج
٥) من الضروري تجنب إنتاج الفقاعات.
٦) يتم الترشيح خلال طبقات من النسيج الشفاف Cheese cloth موضوعة في قمع، مع محاولة منع الفقاعات من التسرب .
٧) يتم تقسيم المزيج الى انابيب بحيث يحوي كل انبوب ١٠ – ١٥ مل من المزيج البصلي.
٨) تضاف كمية متساوية من isopropanal الى مزيج البصل ببطء،
٩) خلال خمس دقائق، سيتم تكون كتله بيضاء (كريمي ابيض ، وطويل ورفيع)، وهذا هو الـ DNA
١٠) يتم سحب DNA بواسطة وضع عود بلاستيكي وتدويره باتجاه واحد ليتجمع الـ DNA حوله.
١١) يوضع DNA في ٥٠% كحول اثيلي للحفظ.
١٢) يمكن الاستعاضة عن isoproponal بكحول أثيلي نقي في الخطوة التاسعة.

**حفظ DNA**

عند أستخدام DNA لمدة قصيرة الأمد (أيام أو أسابيع)، يتم حفظه تقليدياً في أنابيب نبذ مركزي Ependrroff tubes صغيرة عالية التعقيم ذات غطاء ، ويضاف اليه دارئ TE (Tris-HCl-EDTA) برقم هيدروجيني 0.8 في ٤°م ، ولا يجوز أذابة وتجميد نموذج DNA لأنه يسبب ثلم (nick) الجزيئة ، كما لا يجوز حفظه بدرجة -20 ْم في مجمدة مكونة للصقيع ، ويمكن حفظه لمدة شهر في مجمدة غير مكونة للصقيع، أما الحفظ طويل الأمد فيتم بدرجة -70 ْم بأستخدام مجمدة التجميد العميق (Deep freezer).

**سترات الصوديوم Sodium citrate ($Na_3C_6H_5O_7$)**

- يتم استخدام سترات الصوديوم بسبب طعمها المالح الحاد sour salty كمطيبات للطعام والمشروبات الغازية لاسيما الصودا ومشروبات اللبمون الغازية ليكسبها طعم خاص مميز،
- تستخدم كمضاد للتخثر في الدم لكونها عامل كلابي Chelating agent حيث تقوم بتكليب الكالسيوم في الدم وايقاف عمله مما يمنع عملية التخثر.
- تستخدم لمنع تغيير pH لذا يدخل في صناعة الجلاتين ليمنع حموضتها
- الأسم الشائع لها في العراق (ليمن دوزي)

**التكليب Chelation**

١) يحدث التكليب من خلال اتصال الفلز بذرتين من ذرات العناصر الكالبة أو أكثر، بحيث تتكون حلقة حول الفلز

٢) تستعمل المكلبات Chelators لتحويل الماء العسرhard water إلى ماء يسر soft water من خلال إزالة عنصري الكالسيوم والمغنيسيوم منه

٣) تستعمل المكلبات Chelators لمنع التسمم من خلال احاطتها بالمواد السامة مثل الزرنيخ والزئبق داخل الجسم

٤) تستعمل المكلبات Chelators كمثبتات

٥) هناك كثير من المركبات الطبيعية التي تحوي مكلبات بداخلها مثل جزيئة الهيموكلوبين التي تحوي porphyrin rings المحيطة بذرة الحديد ، والكلوروفيل الحاوي على ذرة المغنيسيوم.

٦) التتراسايكلين tetracycline مكلب لأيونات الكالسيوم والمغنيسيوم

٧) تعد سترات الصوديوم مكلب جيد

**Sodium dodecyl sulphate ($C_{12}H_{25}Na0_4S$)**

- يسمى ايضاً Sodium lauryl sulphate (SLS)
- مثخن أيوني ionic thickener في معاجين الاسنان والحلاقة لجعل قوامها سميكاً
- منتج جيد للرغوة،
- يدخل في صنع مساحيق التنظيف والشامبو، ويزيل الدهون بسهولة، لكنه يسبب حساسية للجلد.
- يسبب مسخ denaturation البروتينات، لذا يستخدم في عمليات الترحيل الكهربائي electrophoresis حيث تفقد البروتينات شكلها الطبيعي natural conformation.

## ملاحظة مهمة جداً

يكون الـDNA المحضر بالطرق أعلاه غير نقي تماماً لإحتوائه على بروتينات الهستون histones ولوجود RNA متصل به، ولذا لا بد من استخدام أنزيمات محللة للبروتين proteases (proteolytic enzymes) وأنزيمات محللة للـRNA (RNAses) ضمن خطوات العمل.

إذا لم يتم توفر أنزيمات محللة للبروتين في المختبر، ففي الأمكان استخدام عدة مليلترات من عصير الأناناس المركز pineapple الغني بمجموعة أنزيمات محللة للبروتين إلى أحماض أمينية تسمى بروم-ألين Bromelain.

# استخلاص الـــ DNA من الفواكه والثمار

## ١) من الموز Banana

**طريقة العمل**

- يتم تقشير موزتين، ثم يضاف اليهما 250ml من الماء المعقم، ثم يتم سحقهما إلى أن يصبح المحلول مستحلب (**محلول A**)
- يتم مزج (على حدة) ملعقة شاي من الشامبو مع كميتين بأطراف الأصابع من ملح الطعام، ثم تضاف أربعة ملاعق شاي من الماء المقطـــر، ويـــتم مـــزج الخليط مع تجنب الفقاعات (**محلول B**)
- تضاف ملعقتي شاي من محلول A مع جميع محلـــول B ، وتمـــزج لفتـــرة عشرة دقائق (**محلول C**)
- يتم تقسيم المحلول الناتج إلى قسمين **C1 و C2** ، دائماً في مكان بارد
- يتم ترشيح محلول C1 خلال طبقتين من المناديل الورقية أو عبر قماش فـــي قدح صغير، ثم يوضع الراشح في أنبوبة اختبار، ويوضع C2 فـــي أنبوبـــة اختبار أخرى ايضاً
- يضاف كحول أثيلي بارد برفق ومع ميل الأنبوبة (أو isopropanol) وبدون رج إلى كل أنبوبة
- تعاد كل أنبوبة إلى وضعها العمودي ويلاحظ ظهور DNA بـــشكل أليـــاف مخاطية بيض اللون بين الطبقتين
- سيطفو الـــ DNA على الكحول الأثيلـــي (أو isopropanol) خـــلال ١٥ دقيقة، وفي الإمكان جمعه بواسطة قضيب زجاجي أو دبوس شعر
- في الإمكان مشاهدته بالمجهر الضوئي البسيط
- قارن بين الكميتين الناتجتين من DNA في كل من **C1 و C2**

**معلومات عامة ليست للحفظ**

- الأسم العلمي Musa acuminate
- المادة الغذائية الرابعة من حيث الاستهلاك العالمي بعد الرز والحنطة والذرة
- وزن ثمرة الموز الواحدة حوالي 125g ، منها 75% منها ماء، والبقية مواد غذائية ، منها 23g كربوهدرات
- الثمرة غنية بفيتامينات A و C وB
- الثمرة غنية بعنصر البوتاسيوم
- يتم أكل الموز في جزر المحيط الهادي بعد خلطه بالبطاطا المهروسة واعداد عجينة ساخنة مغلية من الأثنين، بينما تطبخ الأثمار مع الكاري في الهند، وتقدم قطع من الموز المرشوشة بالفلفل الأحمر كفاتح للشهية في اندونيسيا وماليزيا.

## ٢) من الطماطة

**معلومات عامة ليست للحفظ**

الأسم العلمي للطماطة هو ***Solanum lycopersicum*** ، وللطماطة مزايا عديدة منها:

- تحوي الطماطة 22% من فيتامين C، والذي يتحلل عند قطع الثمرة إلى أكثر من أربع قطع بالسكين،
- تحوي الطماطة Lycopene وهو مضاد تأكسدي قوي powerful antioxidant مفيد لمنع الأصابة بسرطان البروستات، وتزداد فائدته عند أكل الطماطة مطبوخة وليست نيئة.

**المواد المضادة للتأكسد antioxidant**

هي مواد تختزل معدل التأكسد (أو عمليات الأكسدة) وتقلله، وتحوي جميع الخلايا الحية نظام معقد من المواد المضادة للتأكسد لمنع أي تلف كيمياوي يحدث نتيجة عملية الأكسدة، وتلعب المواد المضادة للتأكسد دوراُ مهماً في علاج السرطان

وأمراض القلب، وتشمل المواد الغذائية الغنية بالمواد المضادة للتأكسد الفلفل الأحمر، والسبانغ، واللوز والجوز، والفستق، والكاكاو، والقهوة ، والشاي، والذرة

**المواد المستخدمة**

- طماطة
- ملعقة طعام
- سكين
- كلوريد الصوديوم
- ماء معقم
- ملعقة شاي
- سترات الصوديوم
- مناديل ورقية
- ثلج
- كحول أثيلي (95%)
- انابيب اختبار
- هاون خزفي
- مساحيق منظفة
- قضيب زجاجي
- شامبو

**طريقة العمل**

١) يتم مزج 8.8g من كلوريد الصوديوم مع 44g من سترات الصوديوم sodium citrate في لتر واحد من الماء المعقم (محلول A)

٢) يتم تقطيع الطماطة إلى أربعة أقسام، يتم استخدام أحدها بعد تقطيعه إلى جزئين أو ثلاثة أجزاء،

٣) توضع الطماطة في هاون خزفي بارد وتضاف أليها ملعقتي شاي من محلول A ، وملعقة شاي شامبو،

٤) يتم السحق لمدة دقيقة واحدة إلى أن يتكون محلول متجانس (محلول B)،

٥) يتم تقسيم محلول B إلى قسمين B1 و B2 ، دائماً في مكان بارد

٦) يتم ترشيح محلول B1 خلال طبقتين من المناديل الورقية أو قماش خفيف في قدح صغير

٧) يوضع كل من محلول B1 المرشح ومحلول B2 غير المرشح في انبوبة اختبار (كل على حدة)، ويضاف اليهما كحول أثيلي بارد برفق وبدون رج

٨) تعاد كل أنبوبة إلى وضعها العمودي ويلاحظ ظهور DNA بشكل ألياف مخاطية بيض اللون بين الطبقتين

٩) سيطفو الـ DNA على الكحول الأثيلي خلال ١٥ دقيقة ، وفي الإمكان جمعه بواسطة قضيب زجاجي أو دبوس شعر

١٠) في الإمكان مشاهدته بالمجهر الضوئي البسيط

١١) تتم المقارنة بين حجم الـــDNA الناتج في B1 بحجمه في B2

## ٣) من الكيوي Kiwi fruit

**معلومات عامة ليست للحفظ**

الأسم العلمي لثمرة الكيوي هو ***Actinidia deliciosa*** ، ولها مزايا عديدة منها:

- غنية بفيتامين C،
- تعد هذه الثمرة (مع الموز) من أغنى الفواكه بعنصر البوتاسيوم،
- غنية بفتيامين A وفيتامين E
- يمكن إضافة عصيرها إلى اللحوم النيئة غير المطبوخة لعشر دقائق لجعلها طرية لأنه يحوي أنزيم papain بتركيز عال والذي يطري اللحوم،
- لا يمكن خلط الثمرة مع أي من منتجات الحليب لأن انزيم papain يحلـــل بروتينات الحليب

**Papain**

١) الأسم العلمي له هو cysteine protease

٢) يستطيع تحطيم أقوى الألياف (معظمها بروتينات) الموجودة في الأنـــسجة، لهذا يستخدم كملين للحوم meat tenderizer

٣) يستخدم لعلاج لدغات النحل والعقارب حيث يحطـــم الـــسلاسل البروتينيـــة للسموم

٤) يتم اعطاء 1cc منه للأبقار المسنة قبل خمس دقائق من ذبحها حتى يـــصبح لحمها طرياً، ويعد الأنزيم الشائع لتطرية اللحوم

**طريقة العمل**

يتم أخذ نصف الثمرة لإجراء استخلاص الـــ DNA كالتجارب السابقة.

## استخلاص الـــDNA من الحبوب (مثال: الرز Rice)

**معلومات عامة ليست للحفظ**

١) الأسم العلمي oryza sativa

٢) المادة الغذائية الأولى في الاستهلاك عالمياً

**٣)** كلمة الرز ar-ruzz سومرية الأصل ، وتم اشتقاقها إلى كل لغات العالم مثل riz الفرنسية، وarroz الاســبانية-البرتغاليــة، وrice الأنكليزيــة، وriso الايطالية.

في حالة الحبوب أو الثمار الجافة، لا بد من نقع الحبوب في الماء أو فــي محلــول الاستخلاص لعدة ساعات قبل أجراء التربة لأضعاف الغلاف السليلوزي.

## استخلاص الـــ DNA من الدم Blood

تجري عملية تنقية الـ DNA من الدم كمثيلاتها من طرق التنقية مع ملاحظة ما يأتي:

١) يتم استخدام جهاز النبذ المركزي centrifugation بصورة مستمرة للتخلص من الصبغة الحمراء

٢) في الإمكان استخدام الراسب (الأنوية) والراشح (المصل) لغرض استخلاص الـDNA منهما.

٣) يتم استخدام 0.1ml من الدم وتضاف اليه الكمية نفسها من المحلول الداريء للتحلل في Eppendroff tubes

٤) كلما قلت كمية الدم كلما أمكن التخلص بسهولة من الصبغة الحمراء

**المحلول الداريء للتحليل ( يستخدم مع الراشح) Lysis buffer**
100mM EDTA
10mM Tris-HCl
1.0% SDS
Adjusted to pH 7.5

**TE buffer**
0.2mM EDTA
10mM Tris-HCl
Adjusted to pH 7.5

**Nucleic lysis buffer**

**المحلول الداريء لتحليل الأنوية (يستخدم مع الراسب)**

400mM sodium chloride
10mM Tris-HCl
2mM EDTA
Adjusted to pH 8.2

**Protease K solution**

1mg/1ml protease K
1% SDS
2mM EDTA

ملاحظات

١) يتم استبدال proteinase K بمزيج من كلوروفورم: فينول (١:١)، حيث يقوم هذا المزيج بمسخ البروتينات المحيطة بالـ DNA
٢) يتم استخدام تركيز معين من كلوريد الصوديوم لغرض مسخ البروتينات بدلاً من مزيج كلوروفورم: فينول ، أو بدلاً من Proteinase K ، علماً إن زيادة تركيز كلوريد الصوديوم ستؤدي إلى قيام كلوريد الصوديوم بامتصاص جزيئات الماء المحيطة بالـDNA مما يؤدي إلى تحلل الـDNA، وتلعب الخبرة العملية دورها في ذلك.
٣) يتم استخدام (المحلول الداريء للتحلل Lysis buffer) مرتين أو ثلاث مع استخدام جهاز النبذ المركزي لغرض تقليل تركيز الصبغة الحمراء.

## استخلاص الـ DNA من خلايا الخد Cheek Cells

تجري عملية تنقية الـ DNA من خلايا الخد كمثيلاتها من طرق التنقية مع ملاحظة ما يأتي:

- يتم تحضير سائل ملحي (اغم في ١٠ مل من الماء)
- يقوم كل طالب بالمضمضة بهذا السائل (يجب تحريك عضلات الفك بقوة للحصول على أكبر عدد من الخلايا)، وبصق السائل مع اللعاب (المحتوي خلايا الخد) في إناء زجاجي
- يوضع السائل في أنابيب اختبار ويتم استخدام جهاز النبذ المركزي centrifugation ، فإذا تكون راسب، فيعني ذلك وجود كمية كافية من خلايا الخد في انبوبة الاختبار
- تتم إضافة مادة منظفة ، ويوضع أنبوب الاختبار في حوض ماء ساخن (٦٠ مئوية) لمدة عشرة دقائق، ويتم الترشيح، ثم إضافة الكحول الأثيلي بارد.

**البلازميدات Plasmids**

هي عبارة عن قطع من ألدنا لها القابلية على التكرار المستقل عن الكرموسوم البكتيري في خلايا البكتيريا، وتتوارث بثبات على شكل قطع منفصلة عن الكرموسوم، وتكون اغلب البلازميدات غير ضرورية لبقاء الخلية إلا إن وجودها يعطي للخلية صفات اضافيه تمكنها من العيش تحت ظروف استثنائية ومن الصفات المحمولة على البلازميدات

١. المقاومة للمعادن الثقيلة
٢. المقاومة للمضادات الحيوية
٣. تخمير السكريات

وغيرها

يمكن تقسيم البلازميدات إلى نوعين رئيسين:-

**النوع الأول**:- تم تقسيمها اعتماداً على قابليتها على الانتقال إلى:

١. **البلازميدات الاقترانية** Conjugation plasmid

وهي التي تحوي على مجموعه من الجينات الناقلة Transfer genes التي تسمى جينات Tra المحفزة لعمليه الاقتران في البكتريا.

٢. **البلازميدات غير الاقترانية** non -Conjugation plasmid

وهي التي لا تحوي جينات Tra genes وتكون البكتيريا الحاملة لهذا النوع من البلازميدات غير قادرة على بدء عمليه الاقتران

**النوع الثاني** :- تم تقسيمها اعتماداً على عدد النسخ الموجودة في الخلية الى:-

أ. **البلازميدات المسترخية**

والتي تكون في الخلية بعدد كبير من النسخ وتشمل البلازميدات غير الاقترانية ووزنها الجزيئي قليل

ب. **البلازميدات المتشددة**

والتي تكون بعدد محدد وتشمل البلازميدات الاقترانية ووزنها الجزيئي عالي

**تحضير المحاليل الدارئة buffers لمختبر عزل الـــ DNA**: -

حسب خطوات العمل نحتاج الى عدة محاليل دارئة وهي: -

**محلول SET**

يتكون من 75 mM NaCl، 25 mM EDTA و 20 mM Tris-HCl ذي الرقم الهيدروجيني ٧,٥.

الوزن الجزيئي لـــNaCl = 58.45

M= 1000 mM

75mM NaCl ⟶ 0.075 M

$$\text{Wt. (NaCl)} = \frac{\text{M* M.W* V}}{1000}$$

$$\text{Wt. (NaCl)} = \frac{0.075 * 58.45 * 100}{1000} = 0.438 \text{ g}$$

الوزن الجزيئي لـــEDTA = 372.2

25mM EDTA ⟶ 0.025M

$$\text{Wt. (EDTA)} = \frac{0.025 * 372.2 * 100}{1000} = 0.93 \text{ g}$$

الوزن الجزيئي لـــTris-HCl = 121.1

20 mM (Tris-HCl) ⟶ 0.02M

$$\text{Wt. (Tris-HCl)} = \frac{0.02 * 121.1 * 100}{1000} = 0.24 \text{ g}$$

تخلط جميع المكونات (0.24g +0.93g +0.438) ⟵ 90 ml

نضبط الـــ pH حوالي 8 ⟵ 7.5 ثم نكمل الحجم إلى 100 ml

**محلول NaCl (5M)**

$$\text{Wt. (NaCl)} = \frac{5 * 58.45 * 50}{1000} = 14.6 \text{ g}$$

**محلول 10% SDS**

10g SDS in 100ml distilled water
1g SDS in 10ml distilled water

يحضر انياً مع إجراء التجربة

**محلول TE**

يتكون المحلول من 20mM EDTA مع 50mM Tris-HCl

$$\text{Wt. (EDTA)} = \frac{0.020 * 372.2 * 10}{1000} = 0.74 \text{ g}$$

$$\text{Wt. (Tris-HCl)} = \frac{0.05 * 121.1 * 100}{1000} = 0.605 \text{ g}$$

**H.W**

١- حضر 250 ml من دارئ tris- HCl (M.W=121.1) بمولاريه 0.1 M ؟
٢- حضر محلول (Na-acetate) بحجم 100 ml وتركيز 5 M مع العلـــم إن (M.W Na-acetate = 59)
٣- حضر محلول 250 ml متكون من

50 mM glucose M.W= 180
10 mM EDTA M.W= 372.2
25 mM Tris-HCl M.W= 121.1
10 % SDS

**استخلاص الدنا البلازميدي**

تعتمد طرق تنقيه البلازميدات أساسا على الاختلاف في الطبيعة الفيزيائية لكل من الدنا البلازميدي والدنا الكرموسومي ولاسيما من ناحيتي الحجم size والشكل الفيزيائي configuration حيث ان حجم البلازميدات يكون صغير جداً مقارنه مع حجم كرموسوم البكتريا، كما إن أكبر البلازميدات المعروفه لا تشكل إلا حوالي ٨% من حجم كرموسوم بكتريا *E.coil* في حين توجد بلازميدات اصغر من ذلك بكثير، أما من ناحية الشكل فعلى الرغم من ان البلازميدات تشابه كرموسوم البكتريا في كونها حلزوناً مزدوجاً دائرياً إلا إنها توجد داخل الخلايا بشكل مختلف عن الكرموسوم حيث تكون ملتفة على نفسها مكونه جزيئات عاليه الالتفاف supercoiled وتبقى الجزيئات على هذا الشكل ما دام كان كل من خيطي الحلزون سليمين بدون كسر.

يطلق على هذه الجزيئات العالية الالتفاف اسم الجزيئات الدائرية المغلقة تساهمياً Covalently closed circular molecules (ccc)

في حاله تعرض أي من خيطي الحلزون للقطع، تفقد الجزيئه خاصية الالتفاف العالي وتبدأ بالتراخي مكونه جزيئه دائرية مفتوحة open –circular molecule ، إما في حاله قطع خيطي الحلزون في نفس المكان فستنتج جزيئه خطية linear molecule

يشمل عزل الدنا الكرموسومي total cell DNA كل الدنا الموجود في الخلية، ففي البكتريا يشمل الدنا الكرموسومي والدنا البلازميدي، ويكون العزل مشابه في كلا الحالتين، إلا إن الخطوة اللاحقة والمهمة هي تنقية الدنا البلازميدي عن الدنا الكرموسومي، وتوجد عدة طرق لعزل الدنا البلازميدي ومنها :-

١. طريقه المسخ القاعدي Alkaline denaturation
٢. طريقه الطرد المركزي في محلول كلوريد السيزسوم متدرج الكثافة بوجود بروميد الايثيديوم

Ethidium bromide-caesium chloride density gradient centrifugation

توجد طرق كثيرة لعزل الدنا البلازميدي، وتشترك تشترك في المبادئ نفسها، ومن هذه الطرق طريقه الغليان Boiling method وطريقه الترسيب الملحي salting out method

**الخطوات الرئيسية لعزل الـ DNA**

تعد مبادئ عزل واستخلاص الـ DNA واحدة لجميع الطرق، وبما إن الأحماض النووية تظهر في الخلية الحية بشكل بروتين نووي معقد complex nucleoprotein لذا وبشكل عام، تبدأ عمليات الاستخلاص كما يأتي:

١- تكسير الأغشية الخلوية لتسهيل خروج الـ DNA وبقيه المكونات الخلوية ودون التعرض لأضرار كبيرة.

٢- يتم فصل DNA من المكونات الخلوية باستخدام العديد من عمليات إزالة البروتينات Deproteinization process من خلال استخدام معاملات أنزيميه وكيماويه.

٣- إزالة البروتينات الممسوخة من خلال معاملتها بالمذيبات المناسبة وبواسطة الترسيب الميكانيكي (centrifugation) الذي يؤدي إلى ترسيب البروتينات الممسوخة وفصلها عن الـ DNA.

**Salting out method**

استخدمت طريقه salting out المحورة من العالمين Pospiech & Neumann وكما يلي طريقه العمل: -

١- تنمية مستعمرة بكتيرية من العزلة المراد استخلاص الـ DNA البلازميدي منها في ٣٠ مل من وسط زرعي مناسب وتحضن بدرجة حرارة وفترة زمنية مناسبة لكل بكتيريا.

٢- ينقل المزروع البكتيري إلى الأنابيب الخاصة بجهاز النبذ المركزي وبعد الموازنة، تنبذ مركزيا بسرعة ١٢،٠٠٠ دوره/ دقيقة لمدة ١٥ دقيقة.

٣- بعد الحصول على راسب الخلايا (pellet)، تتم إضافة ٥ مل من المحلول الدارئ (SET)، ثم أضافة ١٠٠ مايكروليتر من محلول إنزيم اللايسوزايم ، والحضن بدرجه ٣٧ °م لمدة (٣٠-٦٠) دقيقة.

٤- يضاف ٦٠٠ مايكروليتر من محلول (10% SDS)، ويتم مزج المحتويات يدويا، ثم حضن الأنابيب لمدة ساعتين وتحت درجه حرارة ٣٧ °م مع التقليب.

٥- تتم إضافة ٢ مل من محلول NaCl (٥ مولاري) ومزج المحتويات يدوياً.

٦- تتم إضافة ٥ مل من محلول الكلوروفورم ومزج المحتويات بالتقليب مدة ٣٠ دقيقه بدرجه حرارة الغرفة.

٧- يتم النبذ مركزياً بسرعة ٦٠٠٠ دورة/ دقيقة مدة ٣٠ دقيقة.

٨- يتم سحب الرائق وينقل إلى أنبوبة جديدة ومعقمة ويراعى معرفة حجم الرائق وتتم إضافة ما يعادل ٠,٦ من حجم الرائق من الايزوبروبانول أو ضعفين حجم الرائق من محلول الايثانول المطلق ومزج المحتويات بالتقليب ، ثم نبذها مركزياً بسرعة ١٢,٠٠٠ دورة/ دقيقة مدة ١٥ دقيقة.

٩- يهمل الرائق ويضاف ٥ مل من محلول ٧٠ % كحول ايثانولي، ثم تنبذ مركزيا بسرعة ١٢,٠٠٠ دورة/ دقيقة، ثم يزال الرائق ويترك الانبوب ليجف مدة ١٠ دقائق.

١٠- يذاب الـDNA المترسب بواسطة TE ويحفظ بدرجة حرارة (-٢٠) لحين الاستخدام.

**فوائد المواد المضافة**

EDTA يعمل على تحليل جدار الخلية وذلك لأنه يقوم بسحب الايونات الموجبة ($Mg^{++}$) والتي استقرارية الجدران وأغشية الخلايا.

SDS منظف ايوني يعمل على إكمال تحلل الخلايا البكتيرية عن طريق ترسيب البروتينات.

| | |
|---|---|
| NaCl | يتاين إلى $Na^+$ و $Cl^-$ ويرتبط مع البروتينات ويقوم بترسيبها. |
| ايثـــــــانول ١٠٠% | يقوم بترسيب DNA حيث يقوم بسحب جزيئات الماء وبالتالي تحويـل DNA من الشكل الذائب إلي الشكل الغير ذائب وبالتالي ترسيبه. |
| ايثانـــول ٧٠ % | لغسل عينه الـــ DNA |
| TE | لأذابه DNA |
| الكلوروفورم | مذيب عضوي له صفه القطبية (صفه القطبية للمذيب:- هـــو المـــذيب الذي يعمل على توزيع المحتويات الخلوية بين طورين عضوي ومائي والعضوي مثل proteins) وعند إجـــراء centrifugation تتـــوزع الدهون والبروتينات وبقيه المحتويات الخلوية فـــي طـــور بينـــي أمـــا الأحماض النووية فإنها تكون موجودة بالطبقة المائية لقابليتها للـــذوبان بالماء. أما الطور السفلي يحتله الكلوروفورم لعدم قدرته على الامتزاج بالماء |

# الترحيل الكهربائيElectrophoresis

تقنيه حديثة لفصل وتشخيص وتنقية قطع الدنا وكذلك لمراقبه عمليات الهندسة الوراثيه ...او (هجرة جزيئة مشحونة من مجال كهربائي بحيث تتجه الى اتجاه معاكس لشحنتها )

**تركيب جهاز الترحيل الكهربائي**

١.خزان الدارئ: هو عبارة عن خزان بلاستيكي يحوي قطبين موجب وسالب.

٢. صينية صب الهلام

٣. المشط

٤.منظم التيار الكهربائي

**العوامل المؤثرة على الترحيل الكهربائي**

أ. **تركيز الهلام Gel بصورة عامة: حيث يوجد نوعان من الهلام هما:**

١. **الاكاروزAgarose**:سلسلة متشابكة من السكريات المتعددة المكونة من الكالكتوز galactose والمرتبطة مع بعضها بأواصر هيدروجينية لتكوين شبكة معقدة

٢. **بولي اكريلامايد polyarylamide** : ينتج من ارتباط مادة acrylamide+bisacrylamide لتكوين شبكة معقده ذات ثقوب اصغر قطرا من تلك الموجودة في الاكاروز

كلما كان التركيز عالي، كلما كانت قابليه الفصل اكفأ، لأن الثقوب في الهلام تكون أصغر، مما يتيح الفرصة لجزيئات الدنا ذات الأوزان الجزيئية الصغيرة بالانفصال

**ب. الوزن الجزيئي والشكل للدنا DNA**

- **الوزن الجزيئي**: تهاجر الأوزان الجزيئية الصغيرة أسرع في الهلام من الجزيئات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة

- **الشكل**: عند تماثل الوزن الجزيئي لجزيئات الدنا، يعتمد معدل هجرتها على الهلام على أشكالها، حيث توجد ثلاثة أشكال لجزيئه الدنا هي:

١. دائرة مغلقه تساهمياً covalently closed circular

٢. دائرة مفتوحة open circular

٣. جزيئه خطيه linear

تكون حركه جزيئه الدائرة المفتوحة في الهلام ابطأ من غيرها لأنها لا تمتلك الشكل المضغوط الذي تتميز به ألجزيئه الدائرية المغلقة تساهمياً والذي يساعدها على المرور بسرعة خلال الثقوب، كما لا يمكنها التسلل بسهوله خلال الثقوب كما هو الحال مع الجزيئه الخطية

ج. **تدرج الفولتيه الكهربائية**: التي تعتمد على كمية التيار الكهربائي المار خلال الهلام أثناء عمليه الترحيل، وهذا بدوره يعتمد على اختيار الفولتيه والدارئ المناسبتين، ويتبع قانون اوم

$$V=IR$$

فعند تجهيز فولتيه معينه لدائرة كهربائية بسيطة، ستسير كمية ثابتة من التيار خلال عناصر الدائرة (الهلام)، فعند تيار ثابت فان تقليل سمك الجل أو القوة الايونيه للدارئ سوف يزيد من المقاومة، وبالتالي يزداد تدرج الفولتيه المار خلال الجهاز، وهذا يزيد من حركه الترحيل للعينة.

**هناك نقطه مهمة جداً**، وهي أنه إذا أريد فصل قطع الدنا بشكل منتظم فيجب رفع الفولتيه بدرجه عالية، لان معدل الهجرة يتناسب طرديا مع الفولتيه، وعند زيادة التيار فان حركه الجزيئات الكبيرة من الدنا ستزداد، لذا سيفقد الهلام خاصية الفصل على أساس فرق الأوزان الجزيئية، لان كل الأوزان الجزيئية العالية ستسير بنفس الحركة، لذا سوف لا تتميز القطع ذات الأوزان المتقاربة عن بعضها، إذن خاصية الفصل ستزول بزيادة الفولتيه.

**ملخص الطريقة**

يمكن تلخيص الطريقة بثلاثة مراحل:

١. تحضير الهلام بتركيز معين من الاكاروز بحيث يكون ملائم لحجم جزيئات الدنا المراد فصله

٢. يتم التحميل للعينات في الحفر الخاصة ثم يمرر التيار وبفولتيه معينه

٣. يتم تصبيغ الهلام باستخدام صبغه الايثيديوم بروماید والتي تضاف إلى الهلام أثناء تحضيره قبل الترحيل أو تضاف بعد الانتهاء من عمليه الترحيل بغمر الهلام فيها، ويمكن الاستدلال عن موقع قطع الدنا من خلال تعريض الهلام إلى أشعه .U.V التي تتفلور مشعه لون برتقالي

**المواد وطرق العمل**

**- محلول صبغه بروميد الايثيديوم**

يحضر بإذابة ٠,٢٥ غرام من الصبغة في ٥٠ مل ماء مقطر للحصول على تركيز نهائي mg/ml ويعتبر محلول خزين .stock solution

- المحاليل الدارئة للتحميل

تتكون من ٤٠% سكروزsucrose مع ٠,٥% بروموفينول بلو Bromophenol blue مذابه في ماء مقطر (يحفظ في ٤مئوي لتلافي تلوثه بالأحياء ألمجهريه)

- دارئ (٥ )X TBE المكون من:

Tris-base 0.089M
Boric acid 0.089M
EDTA-Na2 0.002M
pH= 8.0

**طريقه العمل**

يحضر هلام الاكاروز بتركيز 8% (أي إذابة 0.8 غرام في ١٠٠ مل) ويذوب باستخدام حمام مائي مغلي مع التحريك المستمر إلى أن يذوب جيدا ثم يترك ليبرد في درجه حرارة الغرفة

يوضع بعد ذلك 5 مايكروليتر من صبغة ايثيدوم بروماید ليصبح التركيز النهـــائي 0.5 ملغم /ملليتر،

ثم يتم صب الاكاروز المعد في اعلاه على tray بعد لصق حافاتها بشريط لاصق شفاف، ويثبت المشط لعمل الحفر المعدة لتحميل العينات بشكل هـــادئ وبطـــيء لتلافي تكوين الفقاعات الهوائية، ثم يترك ليتصلب بدرجه حرارة الغرفة

يملأ الحوض المستخدم للترحيل الكهربائي بمقدار مناسب مـــن TBE(1X) ثـــم توضع TRAY داخل الحوض TANK في المكان المناسب لها ثـــم يـــتم نـــزع المشط بشكل هادئ ثم يتم نزع الشريط اللاصق

يوضع المحلول الداريء بمقدار 1 ململتير أعلى الهلام (الجل)

**تحضير العينه المراد تحميلها**

٣ مايكروليتر من دارئ التحميل

٧ مايكروليتر من العينة

وتمزج جيدا

# استخلاص الدنا من البلازميدات

**اولاً :الدنا الخارجي**

البلازميدات (Plasmids) هي أعداد كثيرة من دنا لولبي مزدوج دائـــري مغلق صـــغير عـــالي اللـــف Supercoiled circular closed DNA ( scc dsDNA) تتواجد خـــارج الـــدنا الكروموســـومي الاصـــلي للخليـــة البكتيريـــة (Genome).

تدعى طريقة استخلاص الدنا البلازميدي بالطريقـــة القاعديـــة المـــصغرة Minimum alkaline preparation وتختصر بـــــ .Mini-prep ، وهنـــاك طريقة استخلاص اخرى هي طريقة الاستخلاص بالغليان (boiling method).

**الاساس العلمي للطريقة القاعدية المصغرة**

١. تنمية الخلايا النقية الفتية النشطة(protype).
٢. تحطيم الخلية باستخدام المحلول الحال A وانـــزيم Lysozyme واحيانـــا انزيمات Proteases الحالة للبروتينات حـــسب جـــنس ونـــوع الكـــائن المجهري.
٣. استخدام المحلول B المكون من NaOH , SDS حيث ان اضافته تضمن رفع الرقم الهيدروجيني الى pH=12 وهي احدى الطرق الكيميائية لفصل شريطي DNA.

سيحدث تحطم وتكسر الدنا الأصلي بسبب عمليات المزج القوي مع بقـــاء الدنا البلازميدي محافظا على هيئته بصورة عامة.

ستقوم الخطوة الثالثة بتفكيك الاشرطة الثنائية الى اشرطة مفردة بسبب تحطـــم الآصرة الهيدروجينية التي تربط الاشرطة الثنائية عند القواعـــد النتروجينيـــة المتقابلة وكما مبين في الشكل نهاية الموضوع.

٤. عند إضافة خلات البوتاسيوم Potassium acetate بتركيز وحجم معـــين لخفض الرقم الهيـــدروجيني إلـــى التعـــادل ، وعنـــدها تعـــود الاصـــرة

الهيدروجينية للتشكل مرة أخرى، وهنا يحصل ترسيب وتكتل للدنا الكروموسومي، ويعود البلازميد إلى حالته الطبيعية يضاف ( 5M K-acetate 300ml ).

٥. المعاملة بالمذيبات Solvents التي تضمن فصل وترسيب البروتينات والدهون جميعاً إضافة إلى الدهون البروتينية ( Lipoproteins ) في طبقة المذيبات السفلى من انبوبة ابندروف تاركه الدنا في الطور المائي ( المحاليل والدوارىء ) أعلى الطور اللاقطبي Non-Polar phase .

٦. تؤخذ الطبقة المائية الحاوية على DNA ويتم ترسيبه بإضافة الكحول الأثيلي المطلق .

تمثل الخطوات أعلاه ميكانيكية استخلاص DNA بالطريقة القاعدية المصغرة الخاصة بالبلازميدات أي الدنا الخارجي .

**خطوات العمل**

**أولاً : تحضير المحاليل والدوارىء والمذيبات**

١. تحضير مذيب الفينول–كلوروفورم ( Phenol-Chloroform ) بنسبة (١:١) ويطلق عليه (الفينول الحامضي Acid phenol). يتم صهر الفينول في إناء زجاجي Beaker بدرجة حرارة ٦٥°م في حمام مائي ويضاف اليه (بعد الصهر) الكلوروفورم بنفس الحجم .

٢. كحول أثيلي مطلق ١٠٠% absolute alcohol.

٣. كحول أثيلي ٧٠% في ماء مقطر ويفضل مصدره جهاز تقطير زجاجي.

٤. دارىء TE ٠,٠١ مولارية برقم هيدروجيني ٨,٠ .

٥. فينول متعادل Neutral phenol. بعد صهر الفينول ، يضاف محلول Tris-HCL ( ٠,١ مولارية ) ويعدل الرقم الهيدروجيني إلى ٨,٠ بنفس الدارىء . يفضل استخدام هذا المحلول بدلا عن الفينول الحامضي أعلاه .

**ثانياً :- من خطوة إضافة المحلول الحال B ( SDS-NaOH )**

١. يتم إضافة ٣٠٠ مايكرولتر ( ٠,٣مل ) من 5M محلول K-acetate برقم هيدروجين يصل تقريباً إلى ٦,٠ حيث يمزج بقوة لفترة ( ١٠ ) ثانية في جهاز Vortex ويحفظ بالثلج لمدة ٥ دقائق.

٢. نبذ مركزي بسرعة ١٣٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٥ دقائق .

٣. نقل الراشح بواسطة ماصة اوتوماتيكية وبدقة الى انبوبة ابندروف معقمة.

٤. اضافة الفينول المتعادل (Neutral phenol) بنفس حجم الراشح . المزج بجهاز Vortex.

٥. النبذ المركزي لمدة ( ٢ ) دقيقة بسرعه ١٣٠٠٠ دوررة/دقيقة .

٦. نقل الراشح الى انبوبة ابندروف معقمة جديدة وبدقة عالية .

٧. إضافة حجمين من الايثانول المطلق ( ١٠٠% ) الخلط بتقليب وتركه على حرارة الغرفة لمدة ٢٠دقيقة .

٨. النبذ المركزي لمدة (٥) دقائق في درجة حرارة الغرفة بسرعة ١٣٠٠٠ دورة/دقيقة .

٩. يطرح الراشح بعناية ويترك ليجف بدرجة حرارة الفرفة .

١٠. غسل الراسب بالإيثانول ٧٠%.

١١. النبذ المركزي لمدة ٥ دقيقة بسرعة ١٣٠٠٠ دورة .

١٢. إعادة الإذابة بدارىء TE بحجم ٥٠ مايكرولتر ( ٠,٠١ مولاري ) برقم هيدروجيني pH=8.0 .

١٣. يحفظ مستخلص الدنا بالتجميد لحين الترحيل الكهربائي .

## المحاليل الدارئة Buffers

تعتمد معظم دراسات البيولوجي الجزيئي والهندسة الوراثية وجميع الدراسات والبحوث الأنزيمية والجزيئات الحيوية على المحاليل الدارئة buffers للمحافظة على الفعالية الحيوية للجزيئات المعزولة من التأثيرات المباشرة للتغير في الرقم الهيدروجيني بسبب الفعالية ، أو عند اضافة الحوامض او القواعد لتعديل الرقم الهيدروجيني.

أن الدارىء buffer هو محلول يحتوي على خليط حامض ضعيف (HA) وقاعدته القرينة (-A) وله المقدرة على مقاومة التغيرات الكبيرة في الرقم الهيدروجيني pH عند اضافة كميات قليلة من الحامض اوالقاعدة ، وتؤدي اضافة الحامض الى الدارىء الى تحويل بعض القاعدة القرينة الى الحامض الضعيف (HA)، وعند اضافة القاعدة فأن قسماً من (HA) يتحول الى -A ، وبالنتيجة فأن أي حامض أو قاعدة يؤدي الى تغير بنسب -HA/A.

في معادلة Henderson – Hasselbalch المستخدمة في أنظمة الدارىء ، فأن نسبة -HA/A تظهر كدالة لوغارتمية، لذلك فأن أي تغير في نسبة -HA/A يؤدي فقط الى تغيرات ثانوية في pH ضمن المدى الذي يعمل عليه الدارىء .

يحدد مدى عمل الدارىء بواسطة قيمة pK ( لوغارتم ثابت التوازن ) للنظام ، وتقع ضمن pH ±1 عن قيمة pK .

تعتمد سعة الدارىء Buffer capacity على حجم الدارىء وعلى تراكيز مكونات الدارىء، وتعرف سعة الدارىء على انها (عدد مكافئات $H^+$ او $OH^-$ المطلوبة لتغير pH لحجم الدارىء المعطى وحدة pH واحدة).

يتم تحضير الدارىء بطريقتين:

١- كميات مجهولة من -A و HA تخلط وتخفف الى حجم المطلق .

٢- كميات معلومة من HA (-A) و كميات معلومة من القاعدة (الحامض) تضاف وتخلط وتخفف.

٣- ولهذا فان 0.5 مولارية الدارىء من $HPO_4^{-2}$ / $H_2PO_4$ هو مجموعة تراكيز $HPO_4^{-2}$ و $H_2PO_4$ هي 0.5 مول / لتر .

**معادلة Handerson – Hasselblach** :

اشتقت معادلة اندرسون من تفاعل التفكك ( التاين) للحامض الضعيف (HA) .

$$HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$$

HA : حامض برونشتد ( مانح البروتون ، الحامض القرين)

A : قاعدة بروتشتد ( مستقل البروتون ، القاعدة القرينة)

يقال إن كلا المجموعتين HA و A يكونان ازدواج قاعدة – حامض قرين .

يعبر عن ثابت التوازن ( Equilibrium constant ) للتفاعل ( K او $K_{eq}$ ) بما يلي :

$$K = \frac{[H^=]\,[A^-]}{[HA]}$$

بأخذ اللوغارتم واعادة الترتيب تصبح معادلة اندرسون:

$$pH = pK + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$pH = -\log [H^+] = \log \frac{1}{[H^+]}$$

$$pK = -\log K$$

**صفات الدارىء والمحاليل**

يجب ملاحظة الارشادات التالية عند تحضير المحاليل الدارئة :

١- استخدام كواشف عالية النقاوة .

٢- استخدام ماء مقطر عالي النوعية ولا ايوني.

٣- تعقم المحاليل جهد الامكان، وعند عدم التعقيم يفضل حفظـــة بالتبريـــد او ترشيحه من خلال مرشح غشائي سعة ثقوبـــه 0.22 مـــايكرومتر (تمنـــع دخول البكتريا).

٤- ضبط pH باستخدام محاليل محضرة جديدة قياسية .

٥- تعليم الحاويات بالاسماء أو التراكيز.

**ملاحظة**

في حالة استخدام قاعدة قوية مثل ١ مولارية من هيدوركسد الصوديوم Na OH يفضل استخدام عبوة بلاستيكية بدلاً من الزجاجية لحصول تأكل للزجاج .

تستخدم المعادلة المعروفة

$V_1 C_1 = V_2 C_2$

$V_1$ ، $V_2$= الحجم المطلوب

$C_1$ ، $C_2$= التركيز المطلوب

يعبر عن التراكيز الحجمية للمحاليل باربع طرق رئيسية هي :

**١- المولارية (M) Molarity**

هو عدد الاوزان الجزيئية الغرامية من المذاب في ١ لتر من المذيب،

The number of moles of solute per liter of solution

فعند حساب مولارية أي محلول يتوجب معرفة شيئين اساسيين هما معرفة الوزن الجزيئي للمذاب ووزن المذاب بالغرام .

$$M = \frac{Wt\ (g)}{M.W} \times \frac{1000}{V(\ ml)}$$

**مثال - ١** : لعمل محلول ١ مولارية من كلوريد الصوديوم NaCl .

الحل :

١- معرفة الاوزان الذرية للعناصر ( من الجدول الدوري )

Na = 22.997 Cl = 35.459

٢- حجم الاوزان الذرية المكونة للملح للحصول على الوزن الجزيئي .

Molecular weight of NaCl = 22.997 + 35.459 = 58.456

٣- يتم وزن 58.46 غم من NaCl واكمال الحجم الى 1000 مل من الماء المقطر في دورق حجمي

أذن:

58.456 g in 1000 ml = 1M
5.8456g in 100 ml = 1M
0.58g in 10 ml = 1M

**مثال- ٢** : لعمل 0.1 مولارية من محلول NaCl .

الحل :

58.456 g in 1000 ml = 1M
5.8456g in 1000 ml = 0.1M
0.58g in 100 ml = 0.1M
0.058g in 10ml = 0.1 N

مثال ٣:

كم هو عدد غرامات $AgNO_3$ (وزنه الجزئي 169.9) اللازمة لتحضير 100 مل من محلول 0.5 مولاري ؟

169.9g in 1000ml = 1M
(169.9 x 5)g in 1000ml = 5M
849.5g in 1000M = 5M
84.95g in 100ml = 0.5M = 500mM
One can continue to get several morality
8.495g in 100ml = 0.05M = 50mM
or
8.495g in 10ml = 0.5M
84.95g in 10ml = 0.5M

**٢ - العيارية Normality (N)**

تعرف بانها عدد المكافئات الغرامية للمذاب في ١ لتـــر مـــن المحلـــول . ولحساب العيارية يتطلب معرفة الوزن المكافيء للمذاب والوزن بالغرام له .

$$N = \frac{Wt\ (g)}{Eq\ .\ wt} \times \frac{1000}{V(ml)}$$

**مثال- ١** : حضر محلول كاربونات الصوديوم $Na_2CO_3$ بتركيز 0.1 عيارية وبحجم 250مل .

الحل :

$$0.1 = (wt / 53) \times (1000 / 250)$$
$$= 1.325\ gm$$

**٣ - جزء بالمليون part per million [PPM]**

يستخدم الجزء بالمليون للتعبير عن تراكيز المحاليل المخففة جـــداً والـــذي يساوي تقريباً ملغم من المذاب في التر من المحلول.

**مثال** :- لتحضير ١٠٠٠مل من الكحـــول الاثيلـــي ( Ethanol ) بنـــسبة ٧٠% ( حجم / حجم ) من محلول ايثانول أصلي بنسبة ٩٥% ( حجم / حجم ) .

الحل :- باستخدام العلاقة السابقة .

$$\mathbf{95 \times X = 70 \times 1000}$$

$$\mathbf{95X = 70.000}$$

$$\mathbf{X = 70.000/95}$$

**X = 736.8 ml 95% ( v/v ) ethanol in 263.2 ml of D.W**

**طريقة العمل**

تحضير الدوارىء الشائعة الاستخدام في تجارب الهندسة الوراثيـــة والبيولـــوجي الجزيئي .

**١ - دارىء ( Tris – HCL, EDTA )**

**Hydroxy methyl amino methane – HCl,**
**Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)**

**أ. يحضر ١ مولاري من محلول Tris – HCl ( pH = 8.0 )**

- زن ١, ١٢١ غم (الوزن الجزيئي لـــ Tris – base) وضعه فـــي دورق ( بيكر ) سعه ٢ لتر حاوي على مازج مغناطيسي
- أضف ٨٠٠ مل من ماء مقطر وأذب Tris باستخدام المزج علـــى جهاز Magnetic Stirrer.
- نظم الرقم الهيدروجيني الى القيمـــة المطلوبـــة باضـــافة حـــامض الهيدروكلوريك المركز (conc. HCl) علماً ان اضافة HCl يجب أن تتم بعناية ودقة مع مراقبة الرقم الهيدروجيني بأستمرار باستخدام pH-meter (في حالة انخفاض الـــpH ، يجب أعـــادة التـــوازن باستخدام NaOH).
- أكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل مع الماء المقطر فـــي دورق حجمـــي Volumetric Flask .

**تمارين (١)**

**١) تحضير ١٠٠مل من دارىء Tris-HCl ذو مولارية ( 0.1M ) .**
**٢) تحضير ٥٠٠مل من دارىء Tris-HCl ذو مولارية ( 0.25M ) .**
**٣) تحضير ١٠٠مل من دارىء Tris-HCl ذو مولارية ( 0.005M ) .**
**٤) تحضير ٣٠٠مل من دارىء Tris-HCl ذو مولارية ( 20mM ) .**
**٥) تحضير ١٠٠مل من دارىء Tris-HCl ذو مولارية ( 50mM ) .**
**٦) تحضير ٢٥٠مل من دارىء Tris-HCl ذو مولارية ( 0.1M ) .**

**ب – تحضير محلول EDTA بمولارية ( 0.5 M )**

- الوزن الجزيئي لـــ EDTA-2Na هو ٣٧٢,٢
- زن ١, ١٨٦ غم من EDTA-2Na وضعه في بيكر سعة ٢ لتر .
- أضف ٨٠٠مل من الماء المقطر وأمزج بقــوة باســتخدام جهــاز المــزج المغناطيسي magnetic stirrer.
- نظم الرقم الهيدروجيني الى ٠, ٨ باستخدام هيدروكسيد الصوديوم conc. NaOH المركز.
- يكمل الحجم الى ١٠٠٠مل مع الماء المقطر ويعقم بالموصدة .

**تمارين (٢)**

**١ -تحضير EDTA بمولارية 50mM في ١٠٠مل .**

**٢ - تحضير EDTA بمولارية 1mMفي ١٠٠مل .**

**٢ - تحضير المحلول الحال (A ) Lysis buffer**

صمم هذا الدارىء ليقوم باضعاف الغــشاء الخــارجي ( Outer membrane ) للخلية تحت ظروف الموازنة الاســموزية ويهيــىء الظــروف لعمــل الانــزيم الحال Lysozyme للعمل على طبقة الببتيدوكلايكان ( Peptedoglycan ) .

**يطلق على المحلول الحال مختصر STET**

**( Sucrose, Tris-HCL, EDTA, Triton X-100 )**

**المطلوب** :- تحضير الدارىء الحال كما يلي :-

- Sucrose ( 8% W/V )
- Triton X- 100 ( 0.5% W/V )
- EDTA, 5mM ( pH 8.0 )
- Tris –HCL 10mM ( pH 8.0 )

**تمرين (٣)**

**يرجى كتابة الخطوات المفصلة لطريقة تحضير المحلول الحال.**

**٣. تحضير محلول خلات البوتاسيوم K – acetate أو محلول خلات الصوديوم Na-acetate .**

يفضل K – acetate ، وهو محلول يستخدم لمعادلة الرقم الهيدروجيني في خطوات استخلاص DNA من الخلايا بطريقة الاستخلاص القاعدي المصغرة

**تمرين (٤)**

١) حضر محلول ١٠٠ مل بتركيز ٥ مولارية و(pH 6.0) علما ان الوزن الجزيئي لخلات البوتاسيوم (Mw = 39.102)

٢) حضر محلول ١٠٠ مل بتركيز ٥ مولارية و(pH 6.0) علما ان الوزن الجزيئي لخلات الصوديوم( Mw = 59.0 )

مثال:

كيف تحضر محلول داريء من Tris-HCl ، وزنه الجزيئي 121.6 بتركيز 0.005M ؟

121.6g in 1000ml = 1M
60.8g in 1000ml = 0.5M
6.08g in 1000ml = 0.05M
0.608g in 1000 ml = 0.005M

مثال:

كيف تحضر محلول داريء من Tris-HCl ، وزنه الجزيئي 121.6 بتركيز 5M ؟

121.6g in 1000ml = 1M
60.8g in 1000ml = 0.5M
60.8g in 100ml = 5M

مثال:

كم مليمتر من $H_2SO_4$ 5M نحتاج لتحضير 1500ml من $H_2SO_4$ 0.002M؟

Liters x M (dilute solution) = liter x M (concentrated solution)
1.5 x 0.002 = liters x 5

liters = 1.5 x 0.002 / 5 = 0.006 liters

0.006 x 1000 = 6ml
Take 6 ml of concentrated solution and dilute to 1.5 liters

Example
Prepare 2 liters of 0.4M HCl starting with a concentrated HCl solution (28% w/w, SG = 1.15)

Liters x M = number of moles
2 x 0.4 = 0.80 mole HCl needed

$wt_g$ = number of moles x MW = 0.80 x 36.5
= 29.2 g pure HCl needed

The stock is not pure HCl, only 28% HCl by weight

29.9/0.28 = 104.3g stock solution needed

Instead of weighing out 104.3g of stock solution, one can calculate the volume required

$Vol_{mol} = wt_g/p_{g.ml}$ = 104.3/1.15 = 90.7 ml stock solution needed

Measure out 90.7 ml of stock solution and dilute to 2 liters with water

**Short solution**
Use one equation

Vol = wt/p x % = 29.2/1.15 x 0.28 = 90.7 ml

W = vol x p x % = 1000 x 0.322 = 322g

1000ml (1 liter) of solution

322g of pur HCl

No. of moles = wtg/MW = 322/36.5 = 8.82

Concentrated stock solution is 8.882M

## طرائق تحطيم الخلايا Methods of Cell Breaking

هنالك عدة تقنيات لتحطيم الخلايا من أجل استخلاص الجزيئات الحيوية المهمة فيها، وفيما يلي أهم هذه الطرائق:

### أولاً : التقنيات الميكانيكية Mechanical Techniques

#### أ- تقنية السحق الآلي Automated Milling Technique

يستخدم جهاز الهاون Mortar لتحطيم الخلايا ، ويضاف الرمل أو مسحوق الزجاج إلى المزيج للتأكد من التحطم الكامل للخلايا.

#### ب- تقنية أستخدام المكسرات الميكانيكية French Press Technique

تعتمد التقنية على تكسير الخلايا من خلال وضعها في محلول وأستخدام الضغط والتفريغ في أجهزة ميكانيكية خاصة.

### ثانياً : التقنيات الفيزياوية Physical Methods

#### أ. الموجات فوق الصوتية Sonication

يتم تعريض الخلايا لموجات أو ذبذبات فوق الصوتية أو عالية التردد، حيث تقسم الموجات الصوتية الى:

١. موجات صوتية مسموعة تقع ترددتها بين ١٠٠٠٠-١٦٠٠٠ .

٢. موجات فوق الصوتية Super Sound Waves وتقع ترددتها بين ١٦٠٠٠-٢٠٠٠٠٠ .

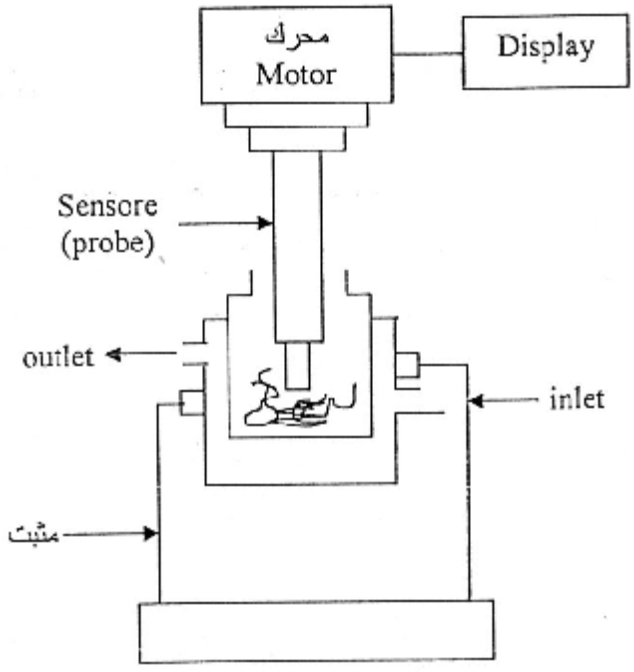
٣. الأمواج الفائقة Ultrasound Wave وتقع ترددتها فوق ٢٠٠٠٠٠ .

تكون الموجات الصوتية ضمن المدى المسموع غير مؤثرة على خلايا الأحياء المجهرية، بينما تؤثر الترددات الفائقة على خلايا الأحياء المجهرية إذ تتسبب في تلف بعض الجزيئات الكبيرة مثل البروتين والأحماض النووية، وأستمرار هذه

الترددات يؤدي لحدوث أهتزازات عنيفة لمكونات الخلية مما يدمر عضيات الخلية، ويؤدي إلى موتها.

يطلق على الجهاز المستخدم لتحطيم الخلايا بـ Sonicator ويتألف من متحسس Sensor أو Probe وهو عمود معدني يرتبط بمحرك كهربائي ، ويغمر المتحسس داخل عالق الخلايا الموجودة في حاوية زجاجية ثنائية الجدار للسماح بتبريد العالق أثناء عملية تشغيل الجهاز بسبب الحرارة العالية المتولدة عن الأهتزازات.

من مساوئ الطريقة هي حصول تحطيم للمادة الوراثية والجزيئات البروتينية الكبيرة ولكن الطريقة مفيدة هي أستخلاص الأنزيمات والمكونات الداخلية، على شرط التبريد المستمر، لذا لا يجوز أطلاق الذبذبات إلا لفترة ٢٠-٤٠ ثانية، والتوقف للتبريد، ولمدة ٣-٦ مرات.




مخطط لجهاز Sonicator

**ب. التجميد والإذابة Freezing and Thawing**

يؤدي تجميد الخلايا واذابتها بسرعة لمرتين على الأقل إلى تحطم الانسجة ، ولكن هذه الطريقة لها الكثير من المساويء.

**ثالثاً : التقنيات الكيميائية Chemical techniques**

**أ. أستخدام المنظفات Detergents**

سيتم أستخدام المنظف السالب Anion detergent في تجاربنا وهو Sodium Dodecyl Sulphate ( SDS) ، ومن المعروف أن هناك ثلاثة أنواع من المنظفات وهي:

١. المنظفات السالبة Anion detergent مثل SDS .

٢. المنظفات الموجبة Cation detergent مثل
Cetyl Trimethyl ammonium Bromide (CTBA)

٣. المنظفات المتعادلة Neutral detergent مثل Triton V-1000 .

يمكن تعريف المنظفات على أنها **مركبات ذات نهايتين محبة وكارهة للماء تتداخل مع مكونات أغشية الخلية Lipoprotein وتخترقها وتؤدي الى تدميرها وبالتالي الى النفاذية الكاملة لغشاء الخلية وخروج مكوناتها.**

ويفضل عند أستخدام المنظفات وتدعيمها بمركب EDTA **لغرض المحافظة على عضيات الخلية من التلف، واحياناً يستخدم السكروز sucrose.**

**ب. المعالجة الحامضية أو القاعدية Acid or Base Treatments**

وهي محدودة الأستخدام مع الأنظمة الحيوية

**تمرين (٥)**

**لماذا المعالجة الحامضية أو القاعدية محدودة الاستخدام؟**

**رابعاً : الطرائق البيولوجية Biological Methods**

أ. إستخدم الأنزيمات الحالة Hydrolysis Enzymes ، وسيتم استخدام انزيم Lysozyme في تجاربنا .

ب. العاثيات Phages علماً مجال استخدام العاثيات محصور في مجال البحوث فقط.

ج. المضادات الحياتية Antibiotics

تستخدم المضادات الحيوية كالبنسلين penicillin ومشتقاته لتحطيم كبسولة البكتريا الضارية.

**خطوات العمل**

**أولاً: - المواد المطلوبة Materials**

١. الوسط الزرعي السائل (المرق المغذي) Nutrient broth المحضر في انابيب اختبار أو قناني ذات غطاء (Universal) معقمة وبحجم ١٠ مل.

٢. الوسط الزرعي الصلب (الآكر المغذي) Nutrient Agar في اطباق بتري.

٣. مستعمرات بكتريا القولون البرازية ***Escherichia coli*** المنشطة على وسط MacConky Agar.

٤. المحلول الحال (A) STET

٥. المحلول الحال (B) SDS-NaOH

٦. محلول الانزيم الحال .Lysozyme Solution(١مل) ويحضر كما يلي :-
10 mg enzyme in 10 mM Tris-HCL

٧. أنابيب ابندروف ، ١ مل معقمة .

**ثانياً :- خطوات العمل**

١. تتم تنمية بكتريا ***E.coil*** على وسط Nutrient Agar , أو وسط MacConky Agar بطريقة التخطيط للحصول على مستعمرات نقية وفحصها مجهريا.
٢. تنقل المستعمرات النقية إلى وسط N.Broth المحضر سابقا وتحضن ١٨ ساعة بدرجة ٣٨ °م.
٣. ينقل ١ مل من المزرعة إلى انبوبة ابندروف ١ مل معقمة.
٤. يتم النبذ المركزي المبرد بسرعة ٤٠٠٠ – ٥٠٠٠ دورة /دقيقة لمدة ١٠ دقائق.
٥. أحياناً ، يتم النبذ المركزي أولا للمزرعة في انابيب اختبار (١٠ مل) وتغسل بمحلول ملحي معقم لمرة واحدة ، وتعلق في ١٠ مل من المحلول الملحي ، ومن ثم يؤخذ ١ مل وينقل الى ابندروف ويطرد مركزيا مرة اخرى بنفس السرعة.
٦. يطرح الراشح Supernatant.
٧. يضاف ٠,٣٥ مل من المحلول الحال (A) والمزج في المازج Vortex بقوة لنشر راسب الخلايا.
٨. إضافة ٢٥ مايكرولتر (٠,٠٢٥ مل ) من محلول انزيم اللايسوزايم وحضن النموذج بدرجة ٣٧ ° م لمدة حضن ساعة في الحاضنة.
٩. اضافة المحلول (B ) بحجم ٠,٤٠٠ مل (٤٠٠ مايكرولتر) ويتم خلط الانبوبة بالتقليب (Inverting) وحفظها في الثلج لمدة ٥ دقائق.
١٠. يتم نشر ٠,١ مل من الانبوبة على اوساط MacConky Agar Nutrient Agar وحضنها لمدة ٢٤ ساعة بدرجة حرارة ٣٧ ° م (تخافيف الى $١٠^{-٦}$) .
١١. يتم عمل معاملة سيطرة Control بدون اضافة المحاليل والتوقف عند النقطة (٦) اعلاه، وينشر النموذج بحجم ٠,١ مل في الاوساط الصلدة M.A , N.A . (تخافيف الى $١٠^{-٦}$) .

١٢. تحفظ المعاملات في المجمدة لحين اجراء الخطوات اللاحقة.
١٣. اعداد تقرير يتضمن جدول النتائج وتعداد الخلايا والمقارنة ومناقشة النتائج.

**تقييم كفاءة وفعالية المحلول الحال ( Lysis B)**

باستخدام نفس ظروف التحطيم في التجربة السابقة بواسطة Lysis A يتم اعادة تجربة التحطيم بالاستعاضة عن انزيم (lysozyme) باستخدام المحلول الحال (lysis B-(B)) المحضر سابقا والمؤلف من SDS-NaOH.

١. يضاف المحلول الحال بعد خطوة إضافة المحلول الحال A بحجم ٤٠٠ مايكرولتر (٢٠٠ مايكرولتر من SDS ١% و ٢٠٠ مايكرولتر من ٠,٢ عياري محلول NaOH).
٢. يتم اضافة المحلول الحال B بعد وضعه في حمام ثلجي.
٣. يلي ذلك وضع انبوبة ابندروف في حمام ثلجي لمدة ٥ دقائق.
٤. يتم تحضير معاملة سيطرة باستخدام ماء مقطر عوضا عن المحاليل اعلاه ويتم اجراء التخافيف الى $١٠^{-٦}$ والزرع بطريقة النشر (Spreading) لـ ٠,١ مل من التخافيف على وسط الآكر المغذي.
٥. تحفظ مكررات من العمل للتجارب اللاحقة.
٦. ملاحظة النتائج في اليوم التالي واعداد تقرير تفصيلي.

# الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis

## المقدمة Introduction

هي طريقة قياسية لفصل وتشخيص وتنقية قطع الدنا البلازميدي خلال مرورها على هلام الآكاروز وتعتبر طريقة سريعة وبسيطة وتستخدم :-

١. لفصل مزيج من قطع الدنا DNA مقارنة بطريقة الفصل التدريجي باستخدام ( C5CL2 ) والمسماة ( Cesium gradient technique ) .
٢. لحساب الوزن الجزيئي لـ DNA من الهلام مباشرة مقارنة بالـ DNA قياسي ( Markers ) وحسب موقع القطع .

اكتشفت التقنية في السبعينات من القرن الماضي وقد عوضت عن تقنية المحلول المتدرج الكثافة Ultra-Centrifugal Sucrose gradient ، وهي وضع محلول DNA فوق محلول متدرج الكثافة من السكروز ثم تجري عملية نبذ مركزي فائق، بحيث تتكون حزم حسب تدرج كثافة السكروز، حيث أن مرورها سيكون حسب أطوالها وأوزانها الجزيئية، ومن مساوىء التقنية المتدرجة الكثافة ، صعوبة فصل القطع التي تكون متقاربة بالأطوال والأوزان الجزيئية واستخلاصها كما أن تنقية القطع من السكروز يحتاج إلى عملية طويلة.

أفضل أنواع الهلام المستخدم في GE هي :-

١. هلام أكريل امايد متعدد ( Polyacrylamide ) .
٢. هلام الآكاروز (Agaros) وهو من السكريات المتعددة (Polysaccharide)، ويكون شبكة net تعتمد فتحاتها على الآكاروز فكلما كان التركيز عالياً ، كلما كانت المسامات Pores أصغر، لذلك فإن التركيز يكون ٠,٥ – ٢% والاكثر استخداماً هو ٠,٧ -١% ، ويستخدم الآكاروز للكشف عن قطع الدنا كبيرة الوزن الجزيئي 20Kb-200bp .

يستخدم هلام الأكرياميد المتعدد للكشف عن قطع الدنا الصغيرة التي يتـــراوح حجمها بين 1bp-200bp ويعتمد تكوين شبكتها وفتحتها على تراكيز مـــادتي acrylamide and Bis-acrylamide حيث تضاف عوامل مساعدة تـــؤدي إلى البلمرة ، فتكون شبكة ذات ثقوب أو فتحات كبيرة.

من مساوىء هذه الطريقة أنها أصعب من الآكاروز وذات كلفة.

تختصر التقنية بأسم

. ( Polyacrylamide Gel Electrophoresis ) PAGE

**يعتمد معدل هجرة DNA خلال هلام الآكاروز على اربعة عوامل** :

١. الوزن الجزيئي .

٢. تركيز الآكاروز .

٣. شكل الجزيئة DNA.

٤. التيار المار

تكون هجرة قطع DNA على هلام الآكـــاروز بدرجـــة حـــرارة الغرفـــة باستخدام الآكاروز القياسي ( ٠,٧-١% ) .

**خطوات العمل** :

**أولاً :- تحضير الآكاروز**

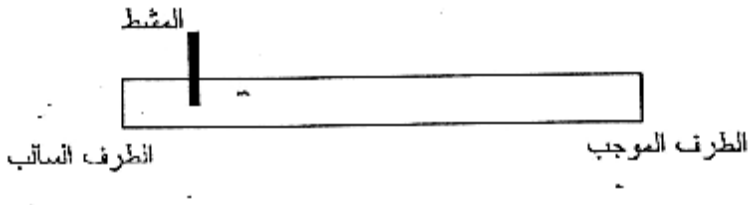
١) يذاب ٠,٧ غم من الآكاروز في ١٠٠ مـــل مـــن دارىء Tris-Borate-TBE Buffer المحضر سابقاً.

٢) يحضر الهلام حسب سعة الصينية Tray الموجودة في جهـــاز الترحيـــل الكهربائي، وتتم الإذابة بواســـطة الحـــرارة ويفـــضل اســـتخدام جهـــاز Microwave ولمدة دقيقتين.

٣) عند وصول دراجة حرارة الهلام المنصهر إلى ما يقارب ٥٥°م، تضاف صبغة ( EB ) Ethidium Bromide بحجم ٠,٠٠٥مل (تحذير: تجنب ملامسة الصبغة لليد أو اي جزء آخر من الجسم).

٤) تحضر الصبغة الأساس بإذابة ١٠ملغم/مل في الماء .

**ثانياً** : تحضر الصينية Tray بلصق أطرافها بشريط لاصق ، ويوضع المشط comb في الطرف القريب من القطب السالب وبمسافة تتراوح بين (١,٥-٢سم).




**ثالثاً**:- يصب الهلام في الصينية بهدوء لمنع تكون الفقاعات في الهلام وتتم إزالة الفقاعات مباشرة بواسطة نهاية Tip معقم ويترك لحين التصلب .

رابعاً: تحضير الخزان Tank

يتكون الخزان من غطاء ويوضع بطريقة ترتبط فيها الأقطاب الموجبة والسالبة وتتصل الأقطاب بقاعدتها في الخزان الذي يحوي على قاعدة وسطية لوضع العينة عليها، ويملأ الخزان إلى قرب الحافة العليا بدارىء TBE أو TBB لضمان تغطية سطح الهلام بالدارىء.

**خامساً**: تزال اللواصق والمشط من على العينة الحاوية على الهلام وتوضع في الخزان في موقعها على أن يغطى الدارىء سطح الهلام .

**سادساً** :- **تحضير نموذج DNA**

١. تتم إذابة DNA الذي تم الحصول عليه 25 مايكرولتر من دارىء TE بتركيز 0.0IM.
٢. يضاف دارىء التحميل Loading buffer (المحضر في مختبرات الدارىء) وبنسبة ٧ حجم دارىء : ٣ حجم DNA وتتم الإضافات في انبوبة ابندروف نفسها.

٣. يتم مزج خفيف بواسطة Tip داخل الأنبوبة.

**سابعاً: وضع الهلام داخل الخزان .**

**ثامناً**: تحميل نموذج DNA بواسطة نفس Tip داخل الحفر (Wells) على الهلام.

**تاسعاً**: إعادة الغطاء على الخزان باتجاه صحيح لضمان الترحيل من القطب السالب إلى الموجب ، ويتم تشغيل مجهز القدرة على فولتية 70V .

**عاشراً**: تتم مراقبة الترحيل من خلال حركة صبغة Bromophenol blue ( Indicator).

**حادي عشر**: بعد مرور ساعة ، يتم ايقاف التيار والكشف عن الحزم باستخدام UV-Illuminator (٣٠٠-٣٥٠ نانوميتر) (تحذير: حفظ العين من الاشعة فوق البنفسجية باستخدام نظارات زجاجية مرشحة أو أي حاجز بوليمري شفاف).

**ملاحظات**:

١. ارتداء القفازات على طول التجربة .
٢. ارتداء الصدرية .
٣. الحذر في تحضير صبغة ethidium bromide
٤. الحذر واقتناء النظارات عند استخدام ( UV Source )

**يتم إنجاز العمل خلال أربعة مختبرات**

**المختبر الأول**: -

١. تحضير الدوارىء TBB ، دارىء التحميل Bading buffer ، صبغة EB .
٢. تنصيب جهاز الترحيل الكهربائي ومعرفة أجزاءه .
٣. إعداد تقرير .

**المختبر الثاني**:

١. تهيأة جميع الدوارىء الخاصة بتكسير الخلايا .
٢. استخلاص DNA والترحيل الهلامي .
٣. إعداد تقرير .

**المختبر الثالث** :

١. العمل من جديد على خلايا ***E. coli*** جديدة نشطة محضرة قبل يوم لتحطيمها واستخلاص المادة الوراثية .
٢. الكشف عن التحطيم (عمل مكررين لغرض حفظ المكرر الثاني للترحيل).
٣. إعداد تقرير.

**المختبر الرابع**:

١. تحضير خلية الترحيل الكهربائي ( الهلام ، الدوارىء ) .
٢. تحضير نموذج DNA للترحيل في دارىء TE ودارىء التحميل .
٣. الترحيل الهلامي .
٤. الكشف عن نتائج الترحيل .
٥. إعداد تقرير نهائي .