كلية العلوم

القسم : علم الحياة

السنة : الرابعة

المادة : وراثة جزيئية

المحاضرة : السادسة/نظري/

{{ مكتبة A to Z }}

Facebook Group : مكتبة A to Z

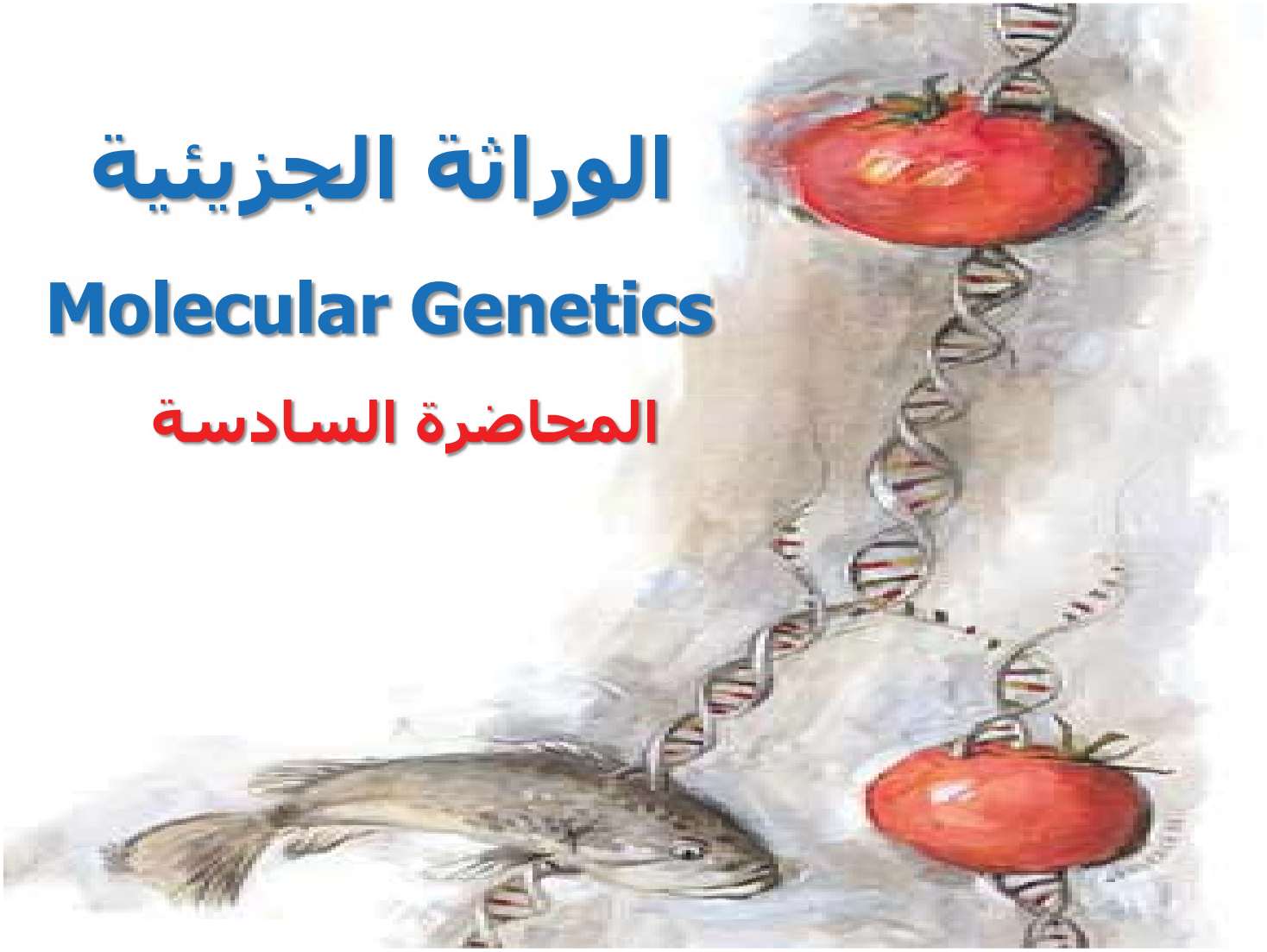
2026

يمكنكم طلب المحاضرات برسالة نصية (SMS) أو عبر (What's app-Telegram) على الرقم 0931497960

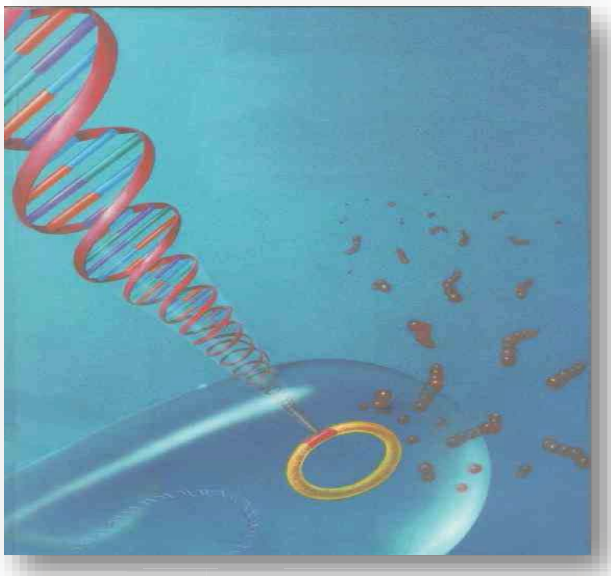
الوراثة الجزيئية

Molecular Genetics

المحاضرة السادسة



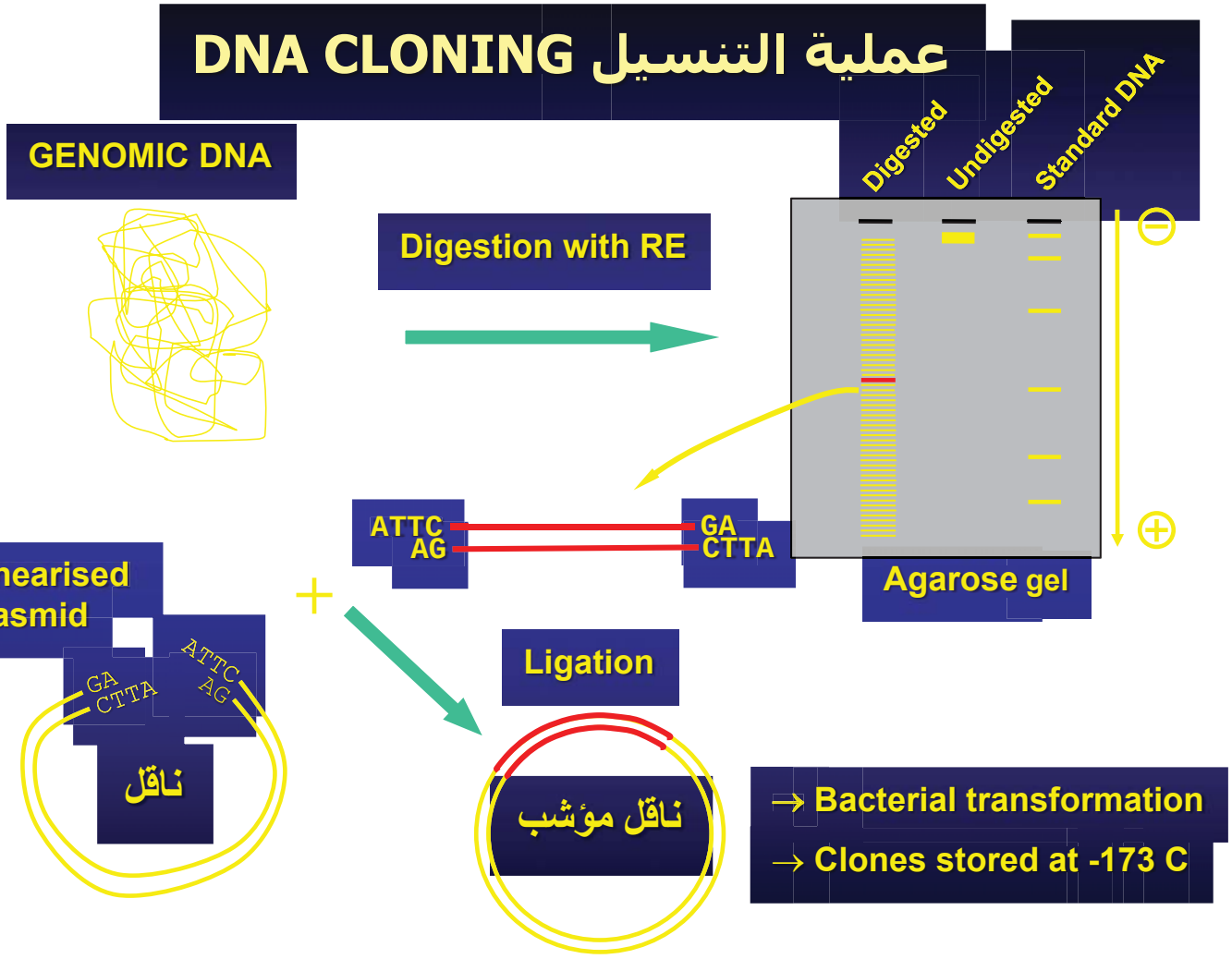
مخطط المحاضرة:



الهندسة الوراثية وتقنيات الـ DNA المؤشب:

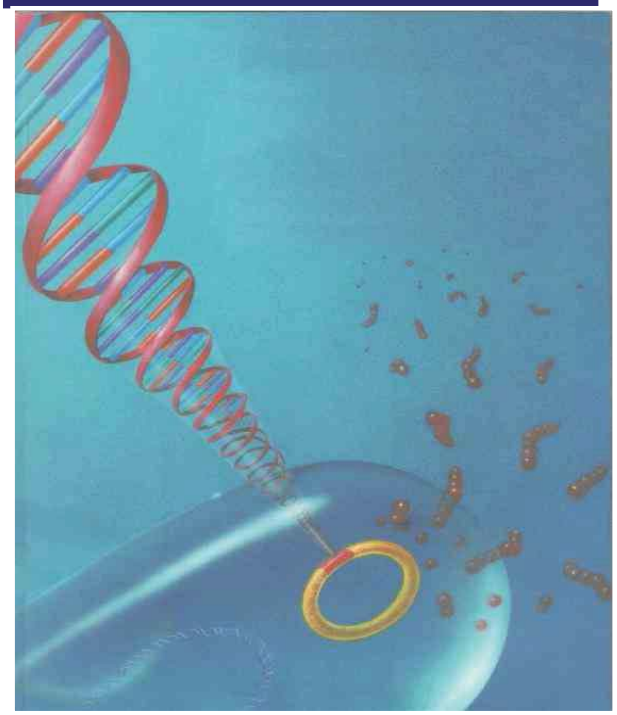
- ✓تتمة عملية التنسيل.
- ✓النواقل وأنواعها.
- ✓ الارتباط.
- ✓ التحوير الوراثي.
- ✓ انتخاب المستعمرات التي تحوي المورثة المطلوبة.
- ✓ مكاثرة المستعمرة (النسيلة) المرغوبة.
- ✓ الحصول على الـ DNA المنسل النقي.

DNA CLONING عملية التنسيل

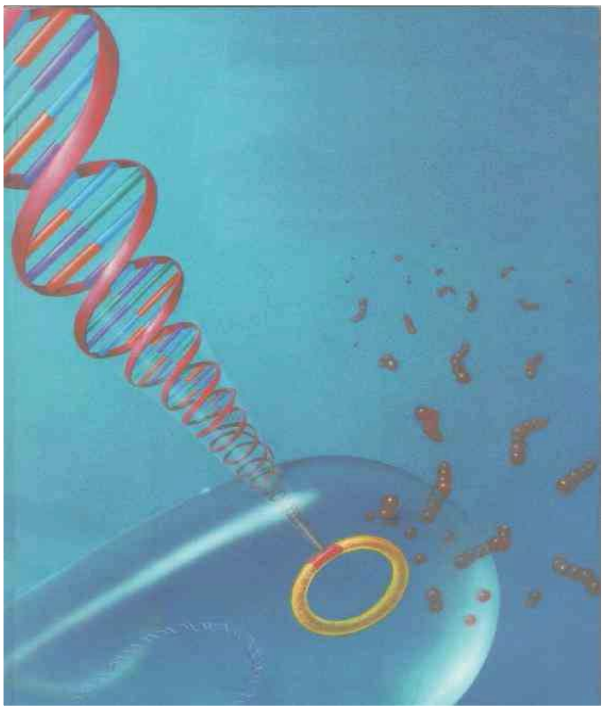


النواقل المستخدمة بعملية التنسيل

Cloning Vectors



نواقل التنسيل: Cloning Vectors



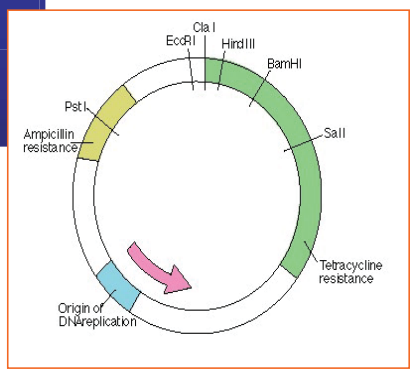
- DNA حلقي (غالباً) يتقبل جزيئة جديدة من الـ DNA ويقوم بمكاثرتها ضمن مضيف (كائن حي).

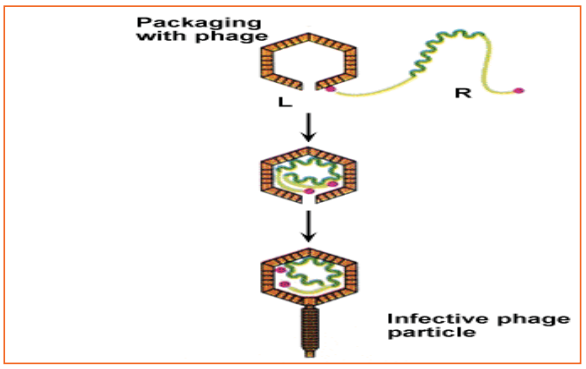
- يسمح بانتاج كمية كبيرة من الـ DNA المؤشب Recombinant DNA .

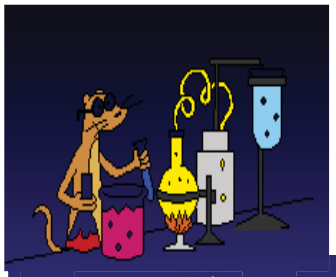
النواقل المستخدمة بعملية التنسيل

Cloning Vectors

- البلازميد Plasmids -
- البكتريوفاج Bacteriophages -
- الكوزميد Cosmids -
- BAC
- YAC







بعض خصائص النواقل

• البلازميد: يستقبل قطعة DNA ذات متوسط طول 5 كيلو زوج نيوكليوتيدي.

• البكتريوفاج: يكاثر حتى 20 ك. زوج نيوكليوتيدي.

• الكوزميد : جزيئة مكونة من نوعين من الـ DNA، يستقبل حتى 50 Kbp .

•الصبغي الصناعي: مركب من اجزاء صبغية من الخميرة ، من البكتريوفاج أو من البلازميدات الكبيرة، يستقبل حتى1 ميغا زوج نيوكليوتيدي.

- Plasmids (insert to 10Kbp)
- Bacteriophages (to 20Kbp)
- Cosmids, chimera between plasmids and bacteriophages. (to 40-50Kbp)
- Artificial Chromosomes derived from chromosomal elements cloned from Yeast, Bacteriophages or large plasmids (to 1Mbp).

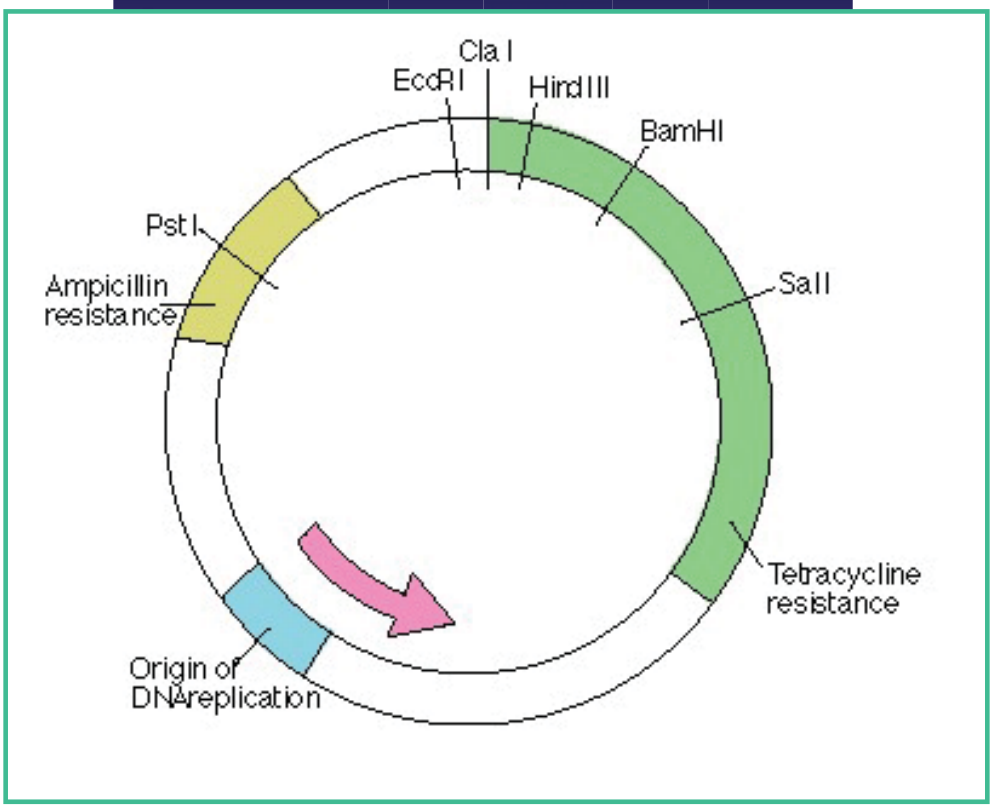
Plasmid البلازميد

Bacterial Plasmid Vectors

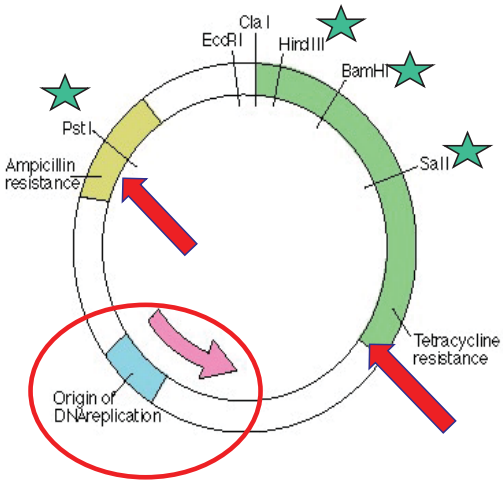
A plasmid is an extra-chromosomal element, a circular DNA.

البلازميد هو دنا حلقي يوجد في الخلية البكتيرية ولكن منفصل عن الصبغي.

خصائص البلازميد لاستخدامه في عملية التنسيل



* هناك ثلاث خصائص أساسية لا بد من وجودها بالبلازميد المخصص لعملية التنسيل (النموذجي):



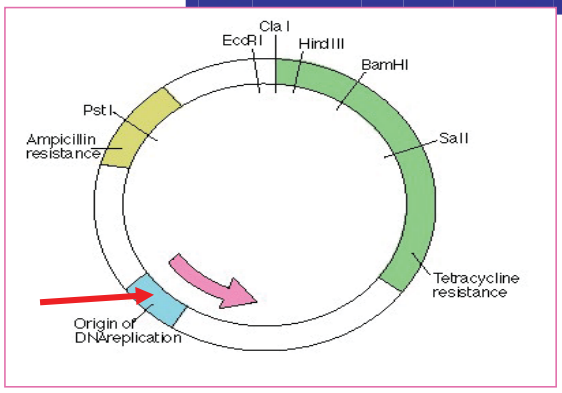
- امتلاكه لأصل تناسخ
- وجود مورثات تستخدم كمؤشر انتخاب
- وجود موقع التنسيل "الوحيد لانزيم محدد"

- An origin of replication.
- A cloning site (a place to insert foreign DNAs).
- A selectable marker gene (e.g. resistance to antibiotic, ex. Ampicillin, Tetracycline,..).

أصل التناسخ: Origin of replication

- مقاطع يتم التعرف عليها من قبل الخلية البكتربة وتعطي اشارة لانزيمات البكتريا المسؤولة عن التناسخ لتقوم بمضاعفة DNA البلازميد.

-البلازميد هو DNA غير نووي (غير موجود على صبغي معين) وبالتالي لا يستطيع ان يستفيد من أي اصل تناسخ DNA موجود على اي صبغي، لهذا لا بد من ان يحمل في بنيته اصلاً للتناسخ.

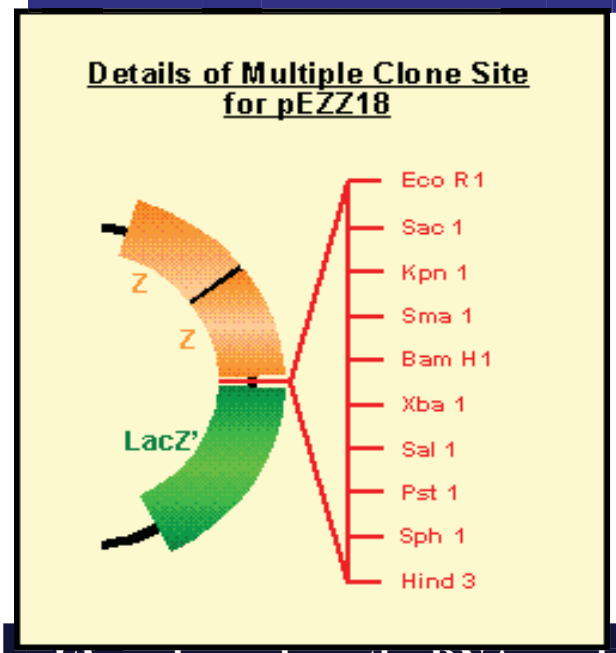


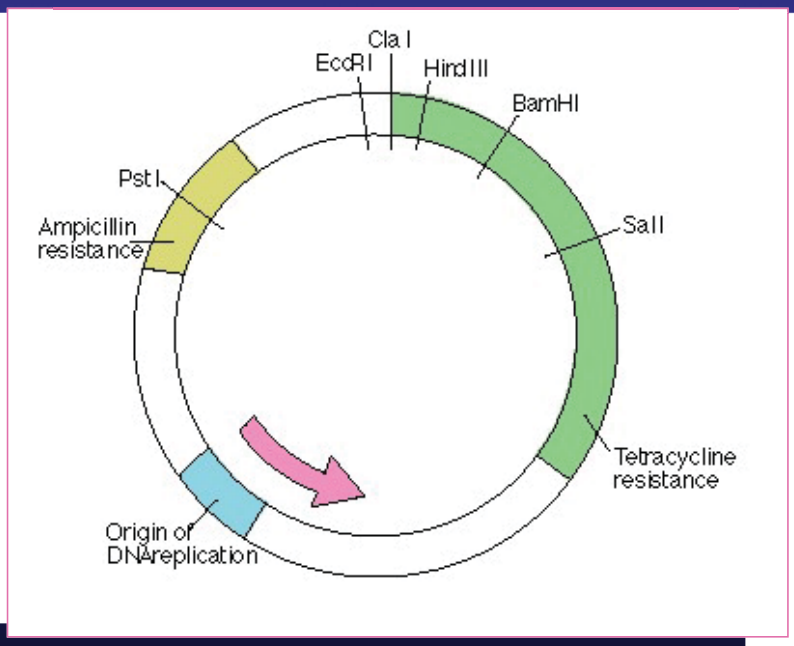
- Since a plasmid is an extra-chromosomal element, it cannot make use of any origin of DNA replication in a chromosome.
- DNA synthesis within a plasmid depends on its having an origin of DNA synthesis of its own.

موقع التنسيل : A cloning site

-هو مقطع يمثل موقع تحديد، أي يمكن ان يهضم بأنزيم تحديد معين (يجب ان يكون وحيد)

-يستخدم هذا المكان لادخال قطعة الـ DNA الغريبة المراد تنسيلها.



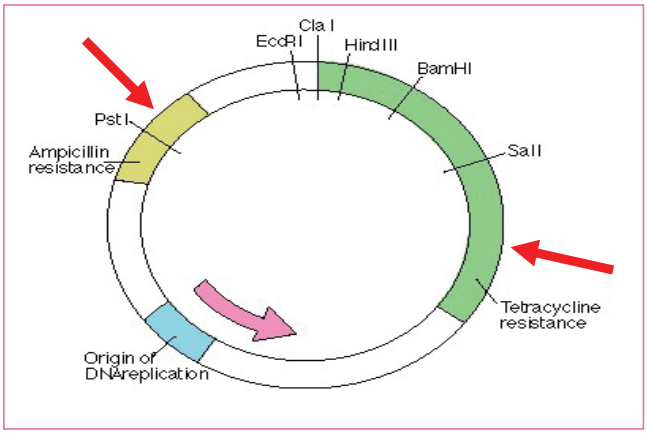


- It's a place where the DNA can be digested by specific restriction enzymes.
- It's a place to insert foreign DNAs.

A selectable marker gene (e.g. resistance to antibiotic)

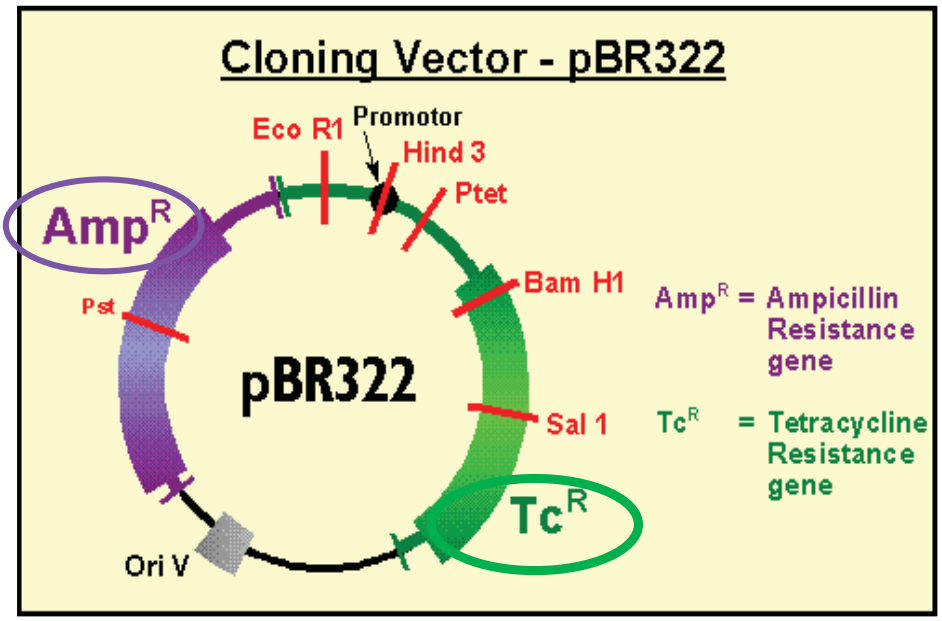
مورثات تستخدم كمؤشر انتخاب (كالمقاومة للمضادات الحيوية)

-يجب ان يحتوي بلازميد التنسيل على مؤشرات انتخاب {مثل المورثات التي تمنح المقاومة للمضادات الحيوية كالامبيسيلين، و/ أو ان يكون موقع يشفر لانزيم مثل البيتا جالاكتوزيديز (تسمى المورثة الزرقاء= LacZ)}.

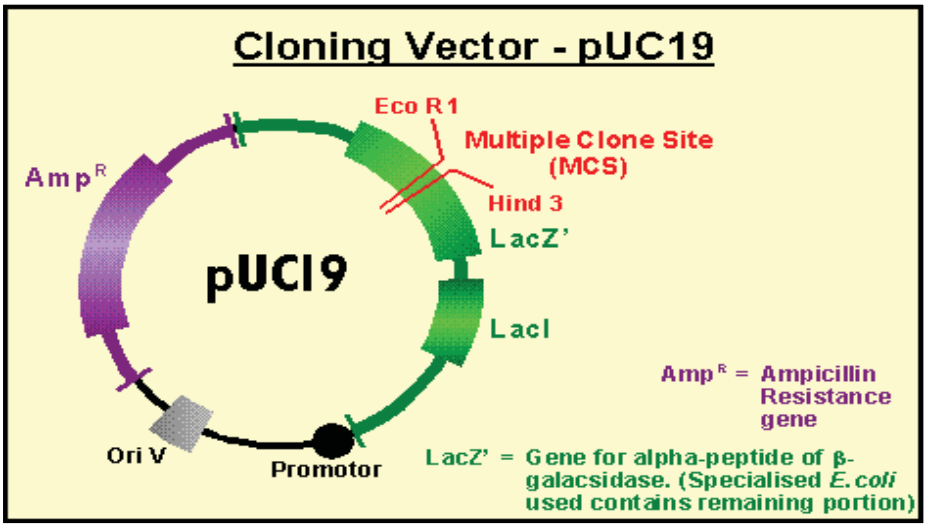


-يجب ان يحتوي البلازميد على أكثر من مؤشر انتخاب (يستخدم احدهما كموقع تنسيل).

- Plasmids used in gene cloning have a selectable marker like an ampicillin resistance gene, or / and a gene that encodes the enzyme beta galactosidase.
- The gene encoding this enzyme is called the LacZ or blue color gene.
- More than 1 marker gene could be in the plasmid.

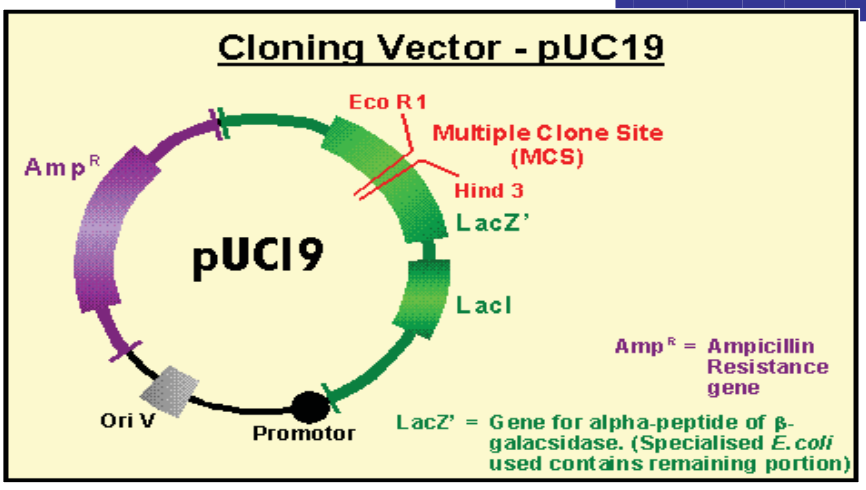


- بلازميد مهم، يحتوي على مورثتين مقاومتين للمضادات الحيوية (الامبيسيلين Ampicilin والتتراسيكلين Tetracycline).
- تستخدم مورثة واحدة لعملية التنسيل.
- المورثة التي تدخل اليها قطعة DNAغريبة تتوقف عن عملها.



- بلازميد مهم، يحتوي على مورثتين إحداهما تمنح المقاومة للمضاد الحيوي (الامبيسيلين Ampicilin) والثانية المورثة المسؤولة عن انتاج أنزيم البيتا جالاكتوزيديز (B-Galactosidase).
- تستخدم مورثة واحدة لعملية التنسيل والأخرى للانتخاب.
- المورثة التي تدخل اليها قطعة DNAغريبة تتوقف عن عملها.

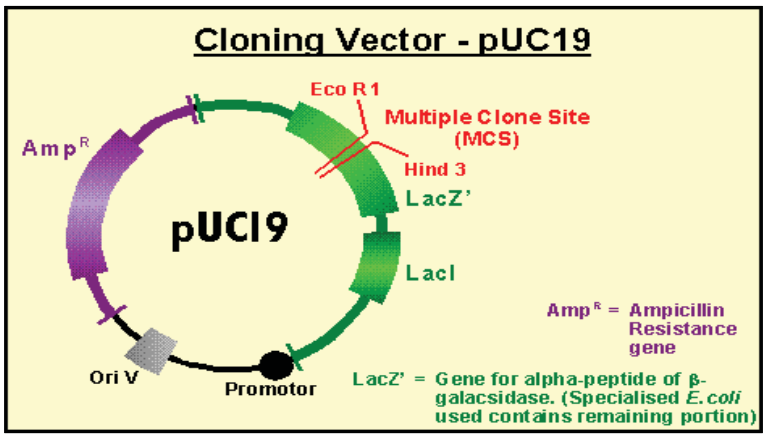
- انزيم البيتا جالاكتوزيديز يحلل سكر اللاكتوز الى جالاكتوز وغلوكوز.
- بحال استخدم شكل اخر من هذا السكر X-gal في وسط زراعة البكتريا سيتم انتاج مادة ذات لون ازرق داخل البكتريا التي تحوي المورثة "الزرقاء".
- البكتريا ستعبر عن نشاط مورثتها بتصنيع انزيم البيتا - جالاكتوزيديز الذي سيفصل جزيئات السكر .
- الـ X في الـ X-gal هو صبغة عديمة اللون عندما تكون مرتبطة بالسكر ولكنها تصبح زرقاء اللون عندما تقطع بانزيم البيتا جالاكتوزيديز (مؤدياً لخلايا بكترية زرقاء اللون)



- الصبغة الزرقاء ستتشكل في الخلايا و ستتشكل مستعمرات زرقاء في أطباق بتري.
- يتم ملاحظة شيئين في الطبق الواحد الذي تحوي مضاد الأمبيسيلين والـ X-gal :

* البكتريا الموجودة على الطبق إما ان تنمو او لا تنمو.
* بحال نمت، قد تكوّن مستعمرات بيضاء أو زرقاء اللون.

- بمراقبة هذه الصفات في البكتريا سنتعرف على المستعمرات تحتوي على الـ DNA المؤشب.



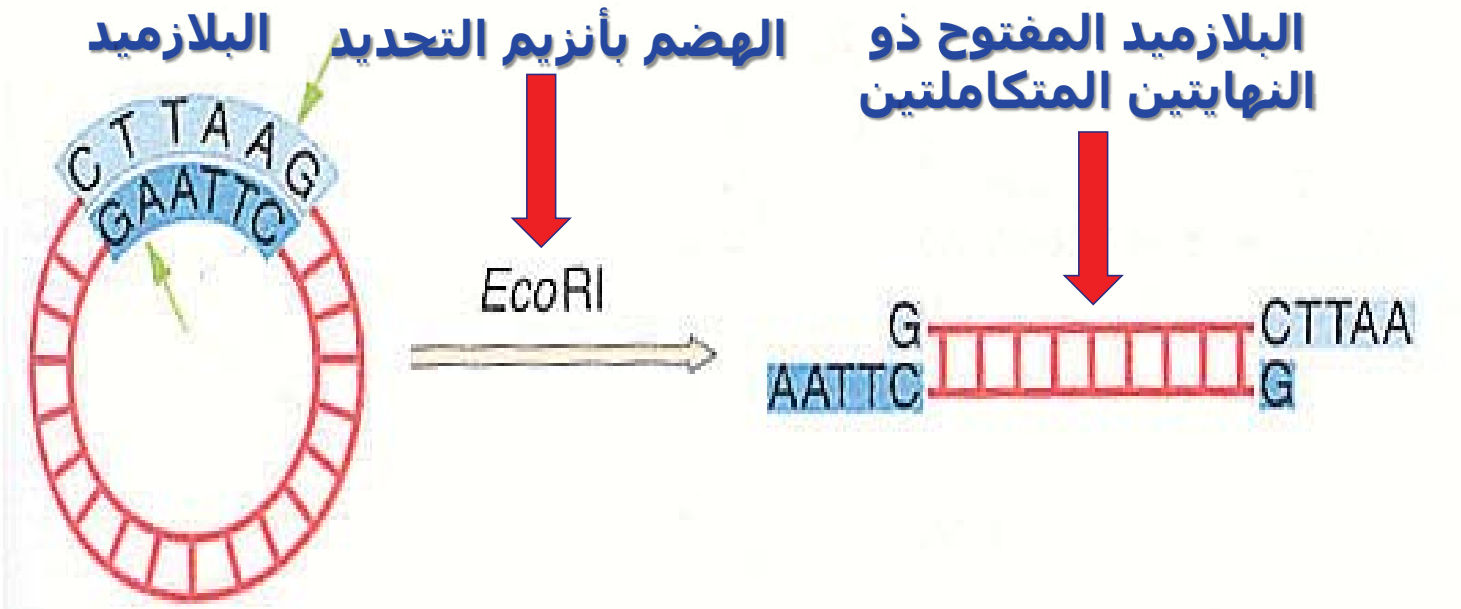


Figure 12-3 The restriction enzyme *Eco*RI cuts a circular DNA molecule bearing one target sequence, resulting in a linear molecule with single-stranded sticky ends.

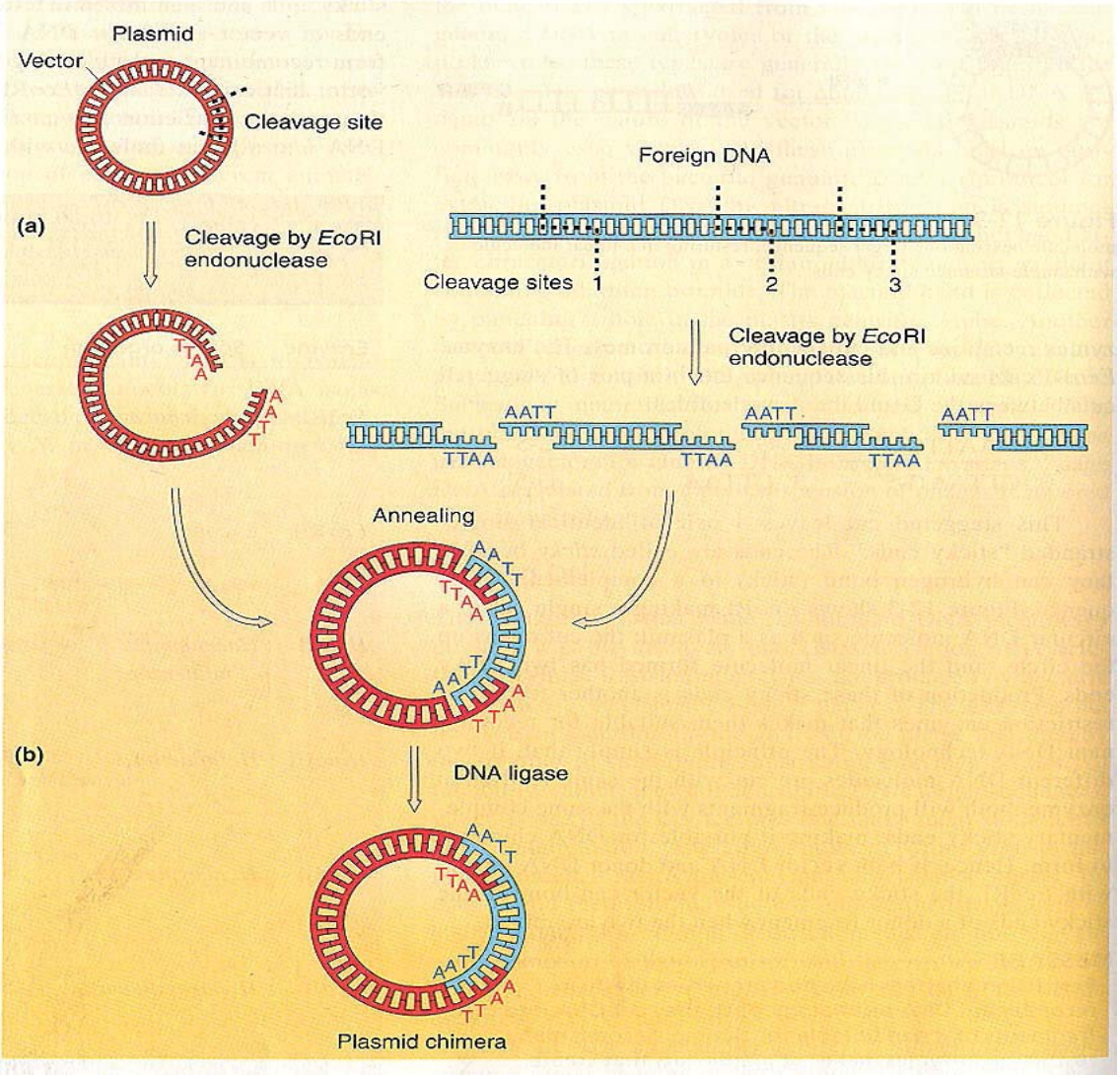
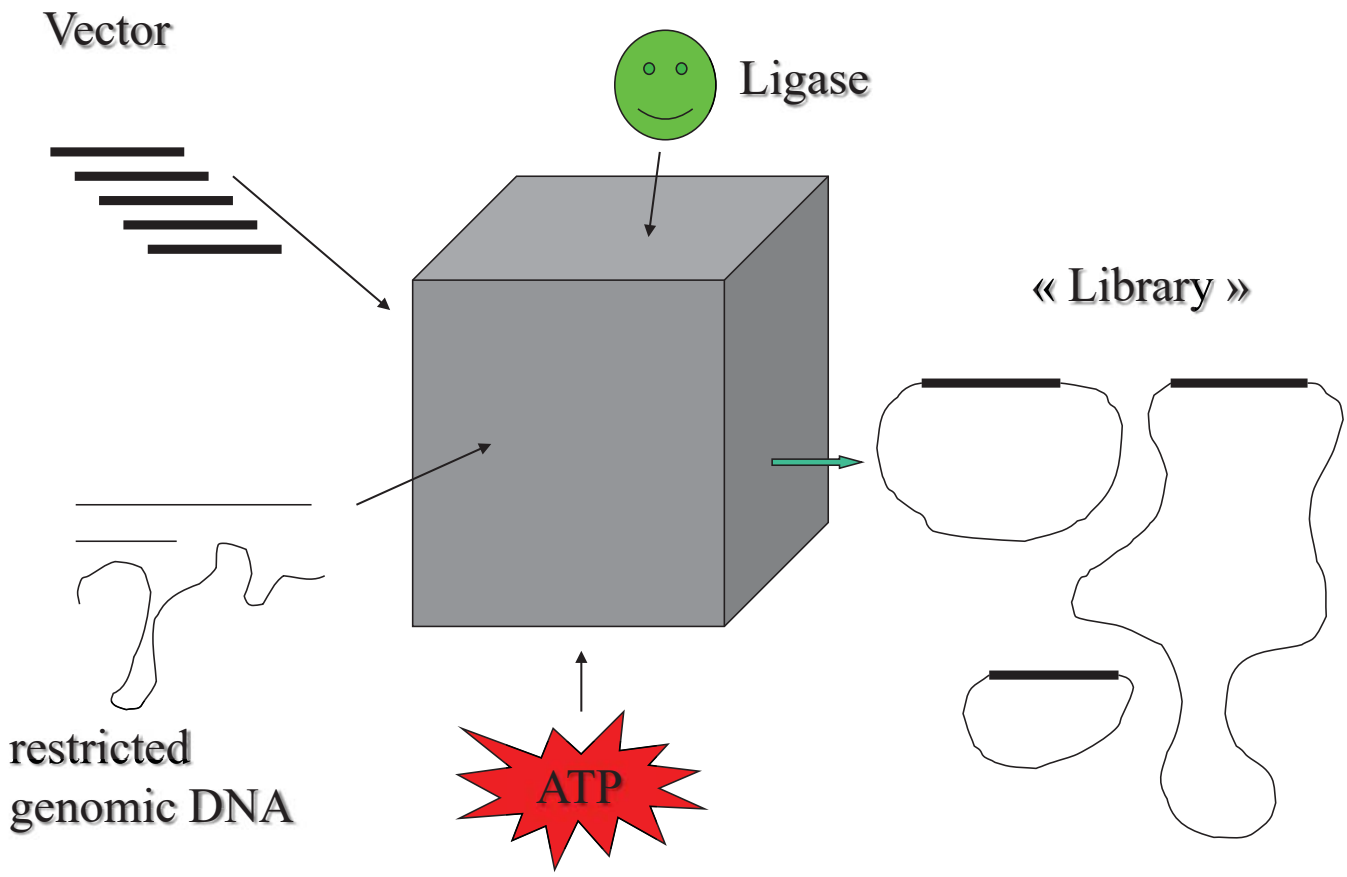


Figure 12-4 Method for generating a chimeric DNA plasmid containing genes derived from foreign DNA. (From S. N. Cohen, "The Manipulation of Genes." Copyright © 1975 by Scientific American, Inc. All rights reserved.)

Ligation الارتباط



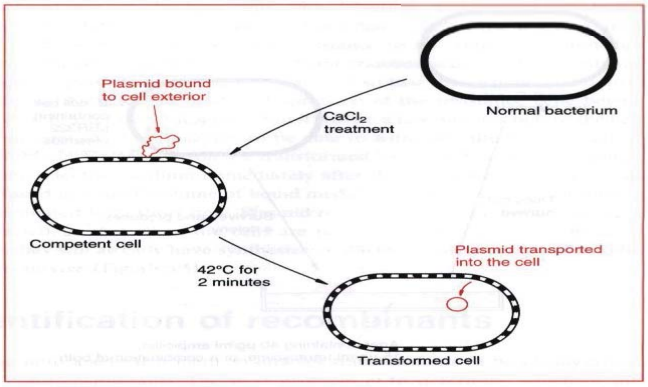
التحوير البكتيري Transformation

وهي عملية ادخال البلازميد المؤشب إلى البكتريا،

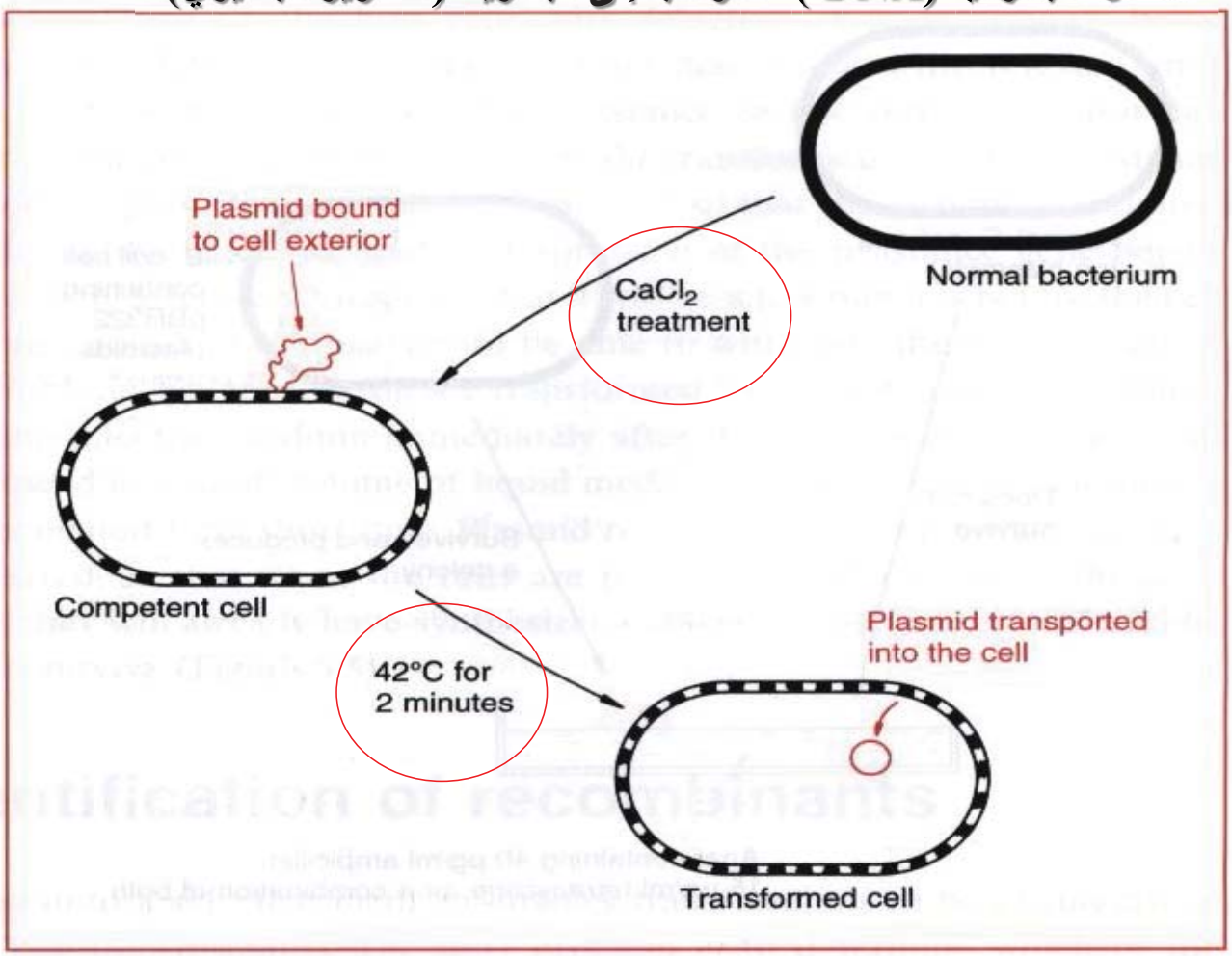
طرق تحوير البكتريا:

* كيميائية Chemical treatment

* كهربائية Electroporation



ادخال البلازميد (DNA) المؤشب إلى البكتريا (التحوير البكتيري)



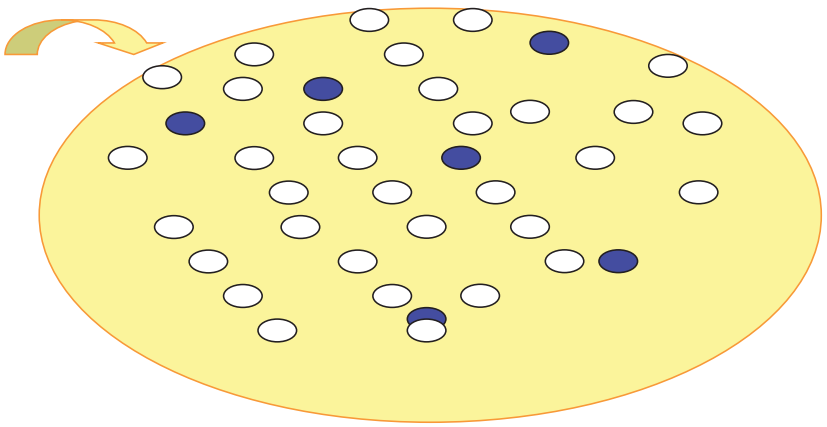
طريقة التثقيب الكهربائي: Electroporation

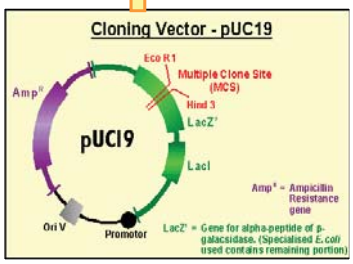
تعريض البكتريا الموجودة بوسط سائل محتوي على البلازميد المؤشب لتيار كهربائي بشدة محددة ولفترة زمنية محددة.

Bacteria_Transformation.exe

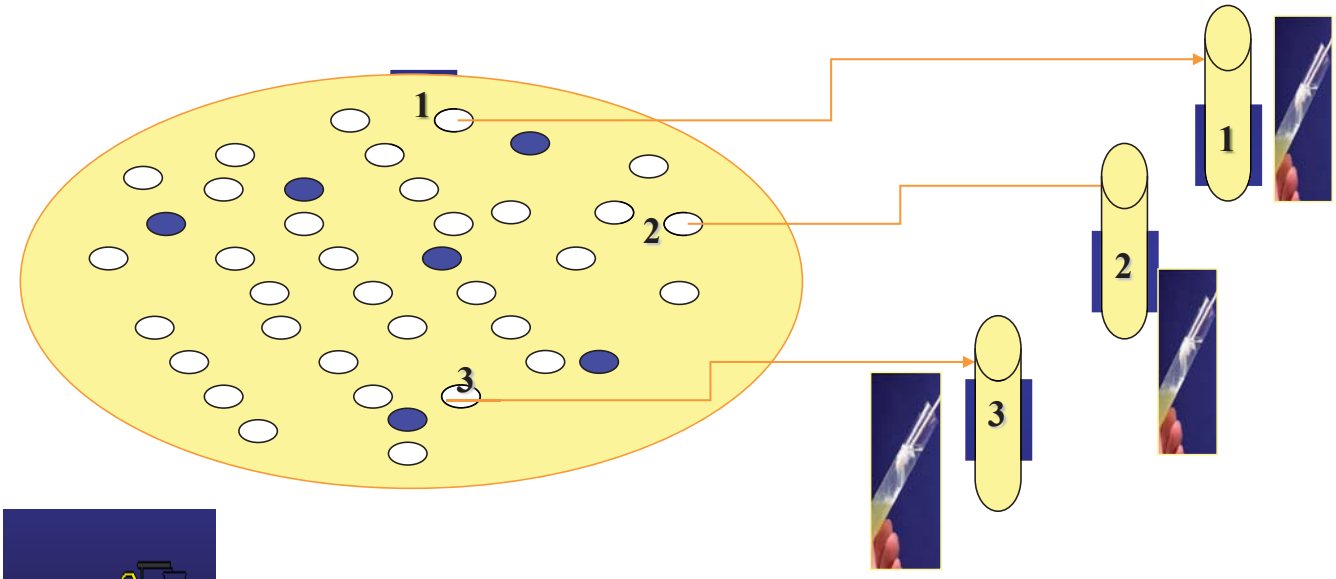
نتائج الزراعة البكترية

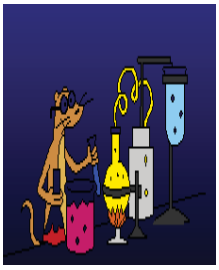
- تنمى الخلايا بعد التحوير على بيئة تحوي الأمبيسيلين والـ X-gal .
- البكتريا على الطبق، إما ان تنمو وتعطي مستعمرات (اذا كانت مورثة الامبيسيلين فيها سليمة) دليل ان البكتريا محورة ، أو لا تنمو دليل عدم تحويرها و عدم دخول البلازميد لها.
- بحال نمت، قد تكوّن المستعمرات بيضاء أو زرقاء اللون.
- بحال كانت زرقاء فهذا يعني ان المورثة الزرقاء سليمة وفعالة ولا تحتوي على DNA غريب.
- بحال كانت بيضاء فهذا يعني ان الـ DNA توضع ضمن المورثة الزرقاء و أصبحت غير فعالة لاحتوائها على DNA غريب ، وهذه هي المستعمرات التي تهمنا.

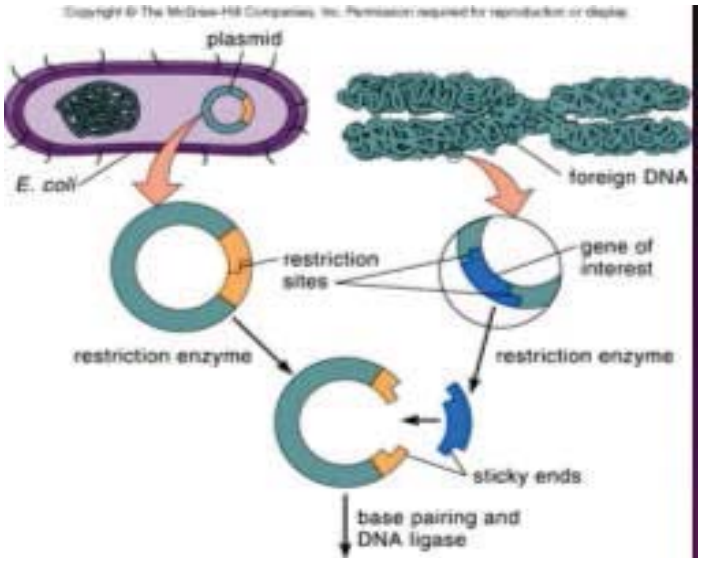




انتخاب المستعمرات ومكاثرة الـ DNA المنسل

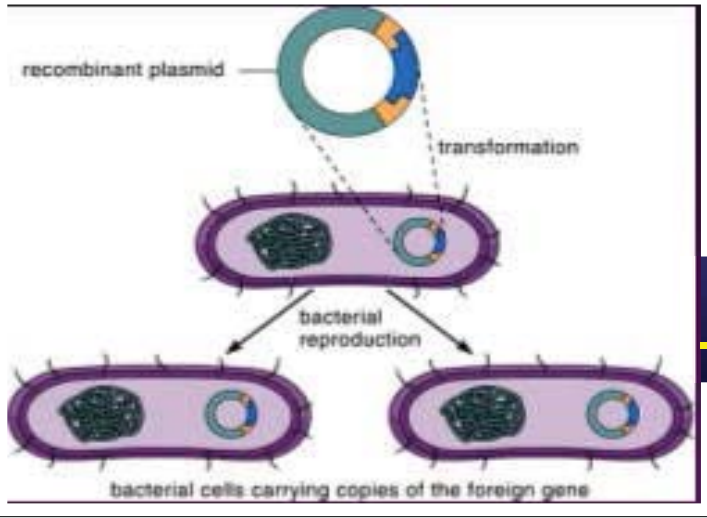




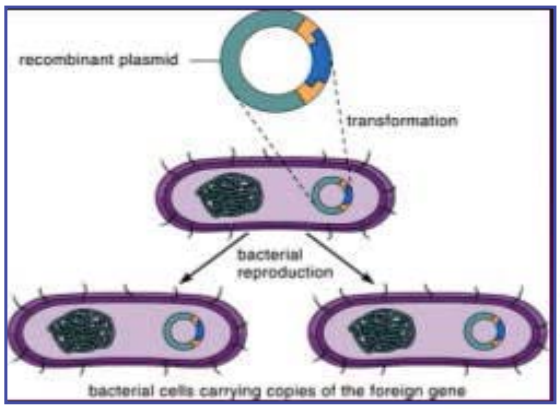


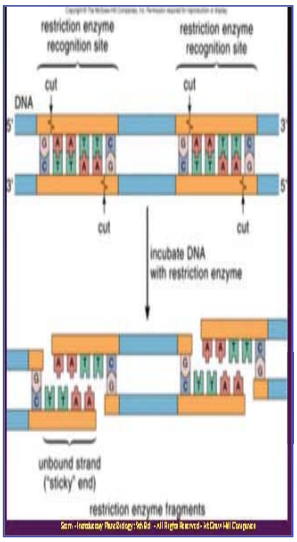
مكاثرة وفصل المورثة بعد عملية التنسيل.

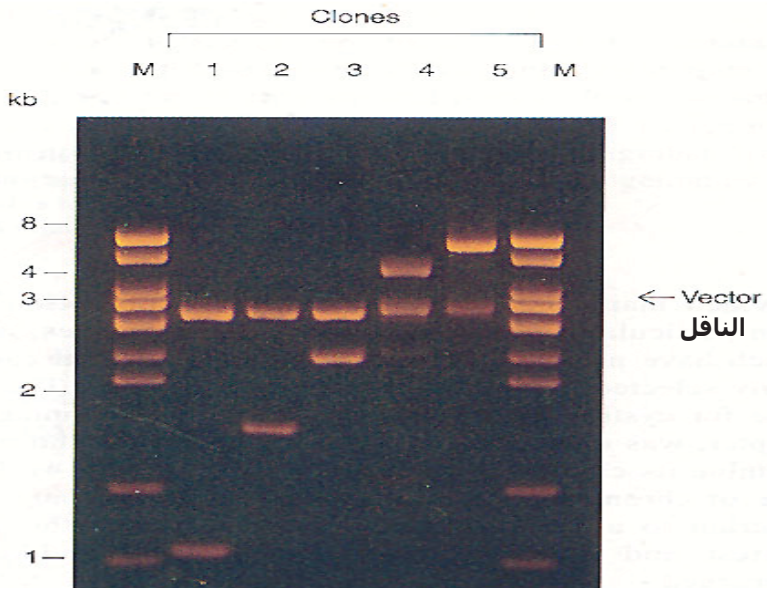
Identify and clone the gene of interest.



DNA Purification







نتائج عملية التنسيل

-القطعة بنفس المستوى هي DNA الناقل.

- القطع بمستويات مختلفة هي القطع المنسلة وهي ذات وزن جزيئي مختلف.

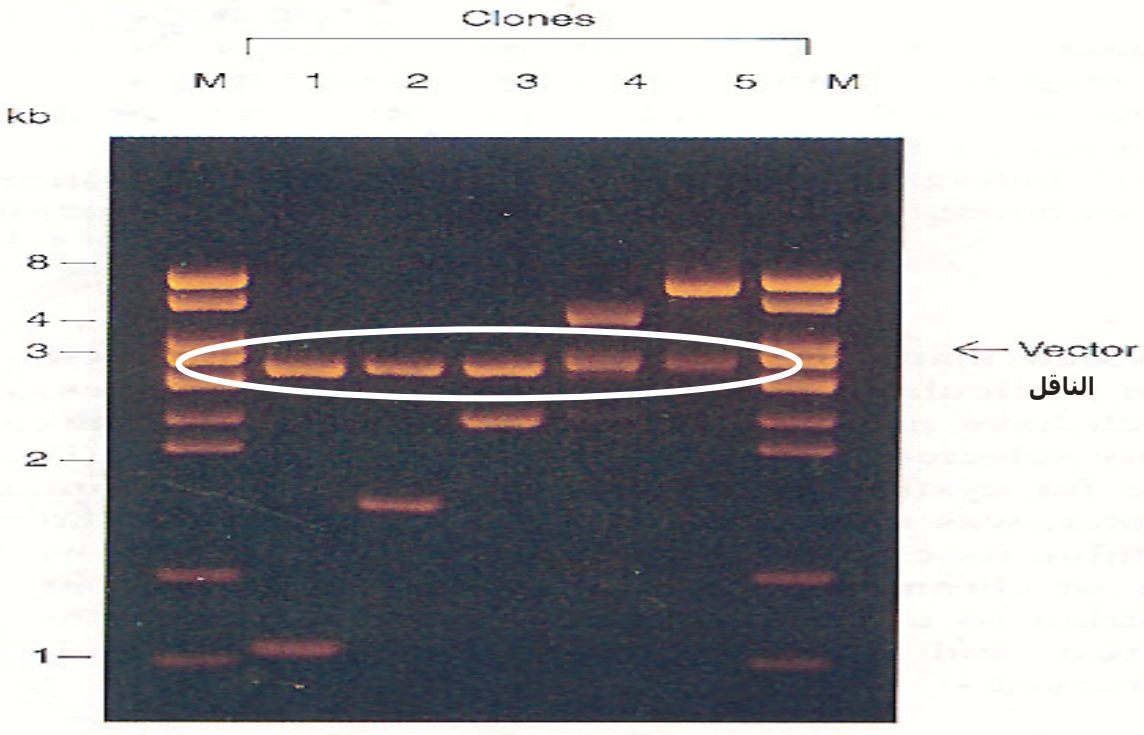


Figure 12-17 Mixtures of different-size DNA fragments separated electrophoretically on an agarose gel. In this case, the samples are five recombinant vectors treated with *Eco*RI. The mixtures are applied to wells at the top of the gel, and fragments move under the influence of an electric field to different positions dependent on size (and, therefore, number of charges). The DNA bands have been visualized by staining with ethidium bromide and photographing under UV light. (M represents lanes containing standard fragments acting as markers for estimating DNA length.) (From H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, and J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3d ed. Copyright © 1995 by Scientific American Books, Inc.)

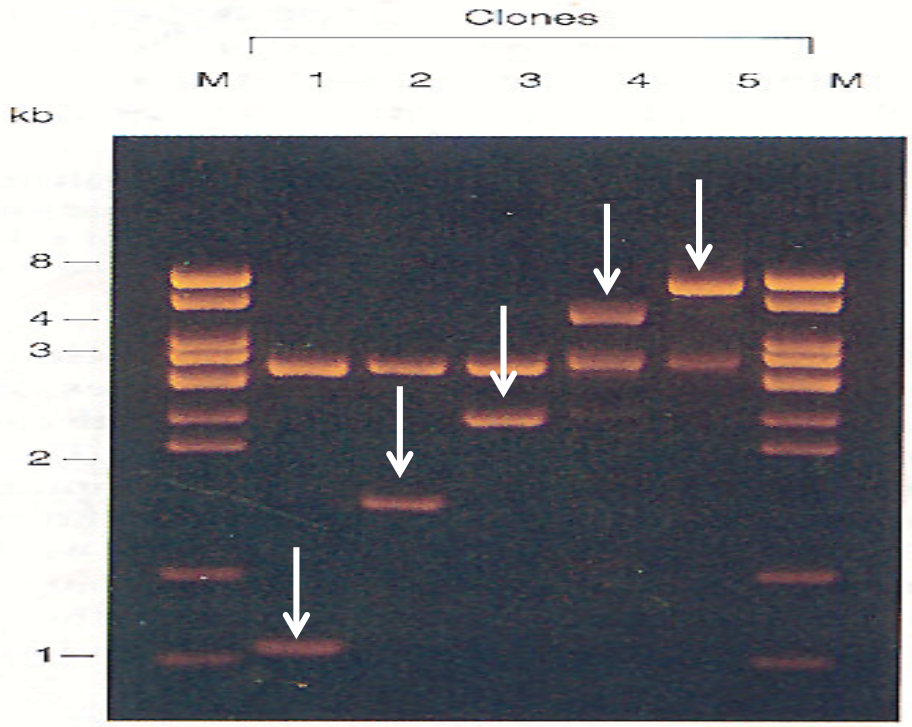
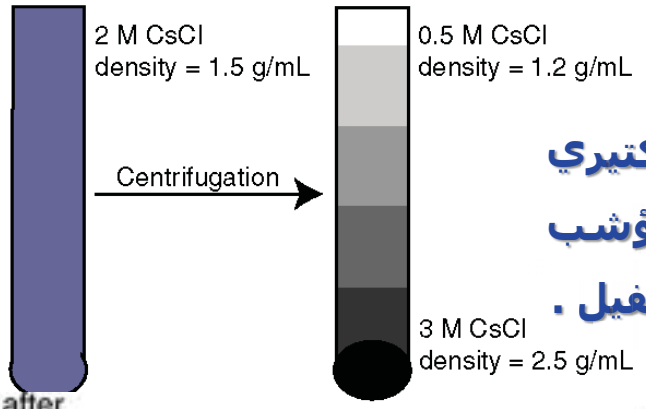


Figure 12-17 Mixtures of different-size DNA fragments separated electrophoretically on an agarose gel. In this case, the samples are five recombinant vectors treated with *Eco*RI. The mixtures are applied to wells at the top of the gel, and fragments move under the influence of an electric field to different positions dependent on size (and, therefore, number of charges). The DNA bands have been visualized by staining with ethidium bromide and photographing under UV light. (M represents lanes containing standard fragments acting as markers for estimating DNA length.) (From H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, and J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 3d ed. Copyright © 1995 by Scientific American Books, Inc.)



فصل الصبغي البكتيري عن البلازميد المؤشب من خلال عملية التثفيل .