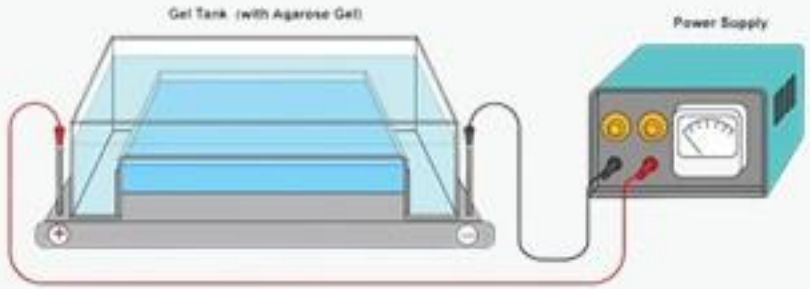
المديرية العامة للتربية و التعليم بمحافظة جنوب الباطنة

مدرسة هالة بنت خويلد للتعليم الأساسي (٩-١٢)

فصل & تضخيم

DNA

للصف الثاني عشر



اعداد أ. خلود العجمي

اختبر معلوماتك

عدد الأدوات التي يحتاجها تقني الجينات؟

ما الرابط العجيب بين هذه الأدوات؟

اعداد أ. خلود العجمي

اختبر معلوماتك

عدد الأدوات التي يحتاجها تقني الجينات؟

- انزيمات القطع
- انزيم ترانسكريبتيز العكسي
- بناء DNA اصطناعي
- النواقل
- العلامات الجينية
- المحفزات

ما الرابط العجيب بين هذه الأدوات؟

تستخدم في بناء DNA وفصله

وهو موضوع درس اليوم .

اعداد أ. خلود العجمي

معايير النجاح هي :

١– يعرف المصطلح تفاعل البوليميريز المتسلسل (PCR).
يكتب قائمة ويشرح المكونات اللازمة لبدء (PCR).
٢– يصف المرحلة الأولى من (PCR) .
٣– يذكر ويشرح تأثير درجة الحرارة المستخدمة في المرحلة الأولى من (PCR).
٤– يصف المرحلة الثانية من (PCR).
٥– يشرح دور البادئات في (PCR).
٦– يذكر ويشرح تأثير درجة الحرارة المستخدمة في المرحلة الثانية من (PCR).
٧– يصف المرحلة الثالثة من (PCR).
٨– يذكر ويشرح تأثير درجة الحرارة المستخدمة في المرحلة الثالثة من (PCR).
٩– يذكر ما يجب ان يحدث في نهاية المرحلة الثالثة لتضخيم DNA بشكل أكبر.
١٠– يشرح سبب اعتبار Taq مناسبا لتفاعل (PCR)
١١– يعرف المصطلح الفصل الكهربائي الهلامي .
١٢– يصف العوامل التي تؤثر في حركة قطع DNA أثناء الفصل الكهربائي الهلامي .
١٣– يكتب قائمة مواد و أدوات البدء اللازمة لفصل قطع DNA بالفصل الكهربائي الهلامي .
١٤– يشرح سبب استخدام عينة مرجعية الى جانب عينة DNA بالفصل الكهربائي الهلامي .
١٥– يشرح سبب إضافة الصبغة غالبا الى عينات DNA المستخدمة في الفصل الكهربائي الهلامي .
١٦– يصف ما قد يمكن رؤيته في الهلام في نهاية الفصل الكهربائي الهلامي.
١٧– يشرح كيف يمكن التعرف على DNA المجهول باستخدام عملية الفصل الكهربائي الهلامي .

اعداد أ. خلود العجمي

يحوي موضوع هذا اليوم على **عمليتين مهمتين**
يتم استخدامهما في تطبيقات التقنية الجينية وهما :-

العملية الأولى

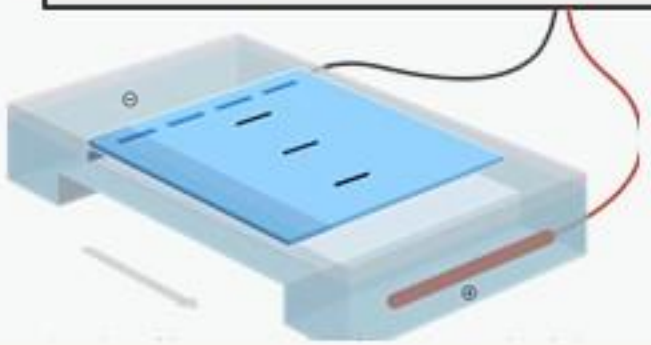
تفاعل البوليميريز المتسلسل.

الفكرة(**تضخيم أجزاء من DNA**)

العملية الثانية

الفصل الكهربائي الهلامي.

الفكرة (**فصل جزيئات DNA**)



سنتناول كلا منهما على حدة .

اعداد أ. خلود العجمي

تضخيم DNA

المقصود به	اختصار العملية	استخدامات	ملخص العملية

اعداد أ. خلود العجمي

تضخيم DNA

المقصود به

عملية يتم فيها اليا
تضخيم أجزاء معينة من
DNAباستخدام مراحل
متناوبة من فصل عديد
النيوكليوتيد (تمسخ (DNA)
وبناء DNAالذي يحفزه
انزيم DNAبوليميريز).

اختصار العملية

(PCR)

استخدامات

تستخدم تقريبا في كل
تطبيقات التقنية الجينية
لتضخيم جزء معين من
DNA .

ملخص العملية

انتاج كميات غير محدودة
من جزء DNA
من كمية صغيرة
من DNA
(وان كان جزيئا واحدا)
بطريقة سهلة و سريعة .

اعداد أ. خلود العجمي

الأدوات المستخدمة لعملية تضخيم DNA:

جهاز (PCR)

معلومة

- يتم تشغيل الجهاز و تركه ليعمل .
- كل مرحلة تحتاج الى درجة حرارة مختلفة لذلك يغير الجهاز درجة حرارة المزيج ذاتيا.

أنابيب جهاز (PCR)

معلومة

- الانابيب صغيرة جدا لذلك تستوعب تقريبا. 0.05cm
- جدرانها رقيقة جدا لذلك تتغير درجة الحرارة فيها بسرعة عندما تتغير درجة الحرارة في الجهاز .

محتويات كل انبوبة في جهاز (PCR)

DNA Template

1

Primers

2

3

dNDPs

Buffer/Cofactors

4

DNA Polymerase

5

اعداد أ. خلود العجمي

محتويات كل انبوبة في جهاز (PCR)

1 ..... عينة من DNA.

هو الجزء المراد تضخيمه.

DNA Template

2 ..... جزأن قصيران مختلفان من شريط DNA مفرد.

للعمل كبادئات لانزيم DNA بوليميريز.

Primers

3 ..... جزيئات حرة من ديوكسي نيوكلوتيد ثلاثي الفوسفات (dNTPs) .

تعمل كوحدات أساسية لبناء أشرطة جديدة من DNA.

dNDPs

4 ..... محلول منظم عند PH 7-8.

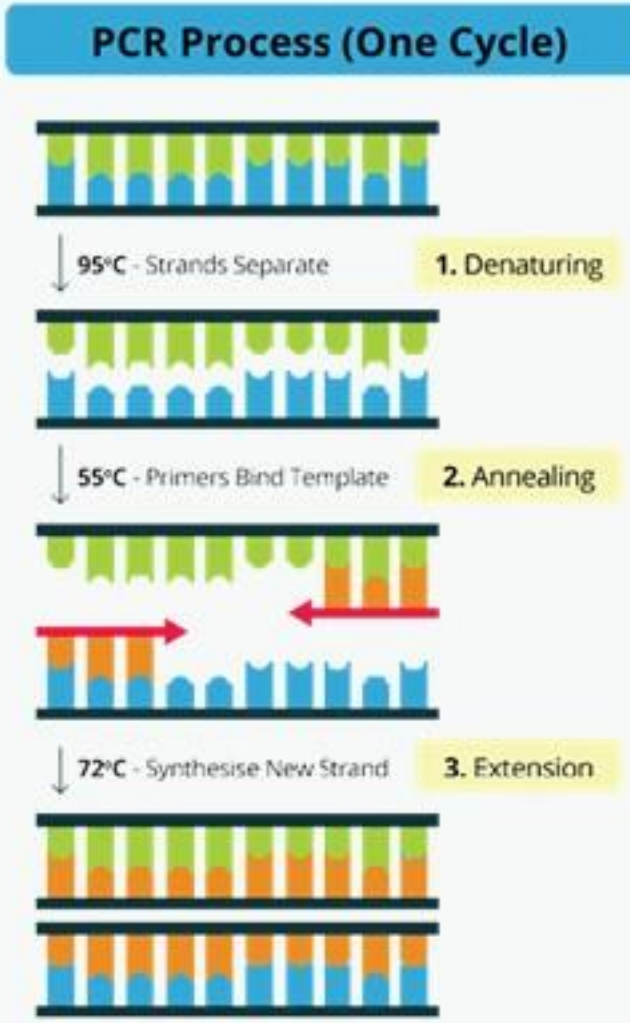
Buffer/Cofactors

5 ..... محلول من DNA بوليميريز مستقر حراريا.

DNA Polymerase

اعداد أ. خلود العجمي

مراحل تضخيم DNA :



المرحلة الاولى ← التمسخ

المرحلة الثانية ← الالتصاق

المرحلة الثالثة ← الاطالة

سنتناول كل مرحلة على حدة .

اعداد أ. خلود العجمي

اعداد أ. خلود العجمي

المرحلة الأولى لتضخيم DNA :-

مرحلة التمسخ

طريقة التمسخ

النتائج المترتبة

ثم

ثم

1. Denaturing

اعداد أ. خلود العجمي

المرحلة الأولى لتضخيم DNA :-

مرحلة التمسخ

طريقة التمسخ

يتم عن طريق تسخينه الى 95C تقريبا

النتائج المترتبة

تتكسر الروابط الهيدروجينية بين ازواج القواعد.

ثم

ينفصل شريطي DNA احدهما عن الاخر .

ثم

تبقى القواعد مكشوفة غير مزدوجة .

1. Denaturing

اعداد أ. خلود العجمي

المرحلة الثانية لتضخيم DNA :-

مرحلة الالتصاق

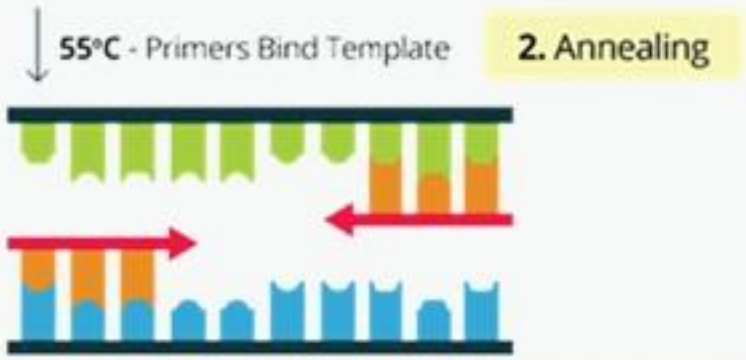
ما تحتاجه المرحلة

طريقة الالتصاق

مميزاتها

السبب

الهدف



اعداد أ. خلود العجمي

المرحلة الثانية لتضخيم DNA :-

مرحلة الالتصاق

ما تحتاجه المرحلة

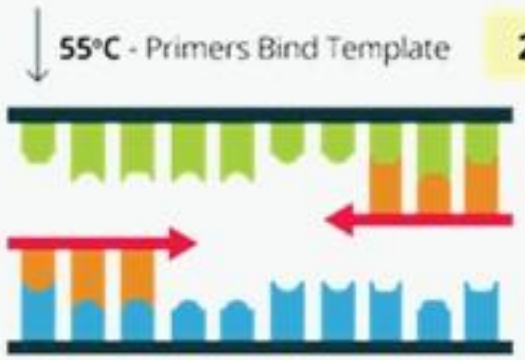
وجود البادئات .

السبب

لا يمكن لأنزيم DNA بوليميريز البدء بتكوين DNA بدون شريط يمكن البناء عليه.

طريقة الالتصاق

ترتبط البادئات مع تتابع القواعد على جانبي DNA الجاري تضخيمه عن طريق تكوين الروابط الهيدروجينية.



مميزاتها

تتكون من ٢٠ زوج تقريبا.

ذات تتابع مكمل لتتابع القواعد على جانبي جزء DNA الجاري نسخه.

يكون تتابع القواعد لها مختلف.

الهدف

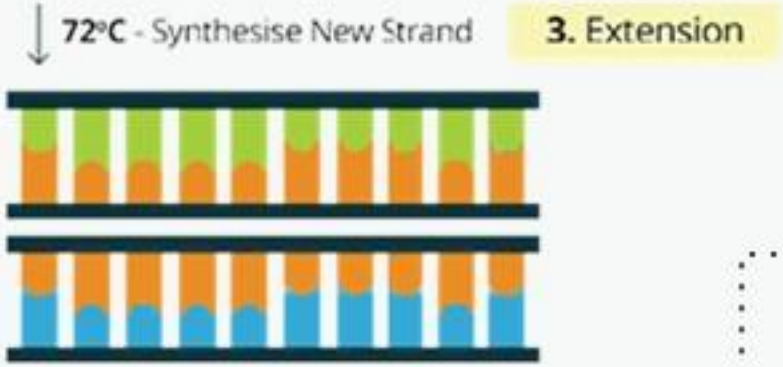
لترتبط احداهما بالشريط "صعودا" وترتبط الأخرى بالشريط "نزولا".

يتطلب ارتباط البادئات درجة حرارة 60C تقريبا.

اعداد أ. خلود العجمي

المرحلة الثالثة لتضخيم DNA :-

مرحلة الاطالة



طريقة الاطالة

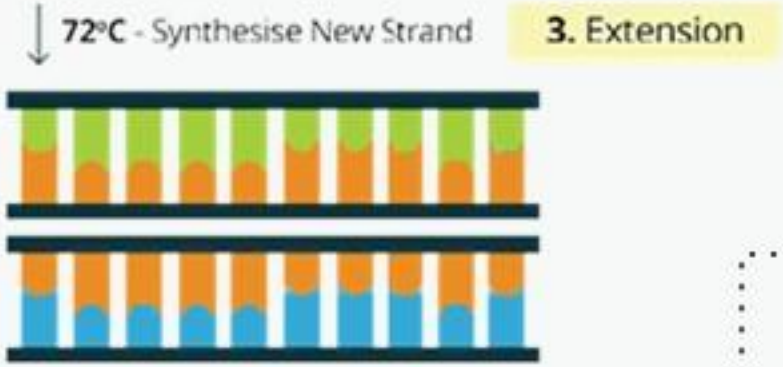
شرط العملية

الهدف من ذلك

اعداد أ. خلود العجمي

المرحلة الثالثة لتضخيم DNA :-

مرحلة الاطالة



طريقة الاطالة

يستخدم انزيم DNA بوليميريز DNA بعد ذلك dNTPs .

الهدف من ذلك

تكوين اشرطة جديدة من DNA مقابل تلك المكشوفة .

شرط العملية

درجة حرارة 72C تقريبا .

معلومة

خلها في بالك

DNA بوليميريز المستخدم في هذه العملية من الكائنات الحية الدقيقة التي تكيفت للعيش في البيئات الحارة .

ملاحظات حول تضخيم DNA.

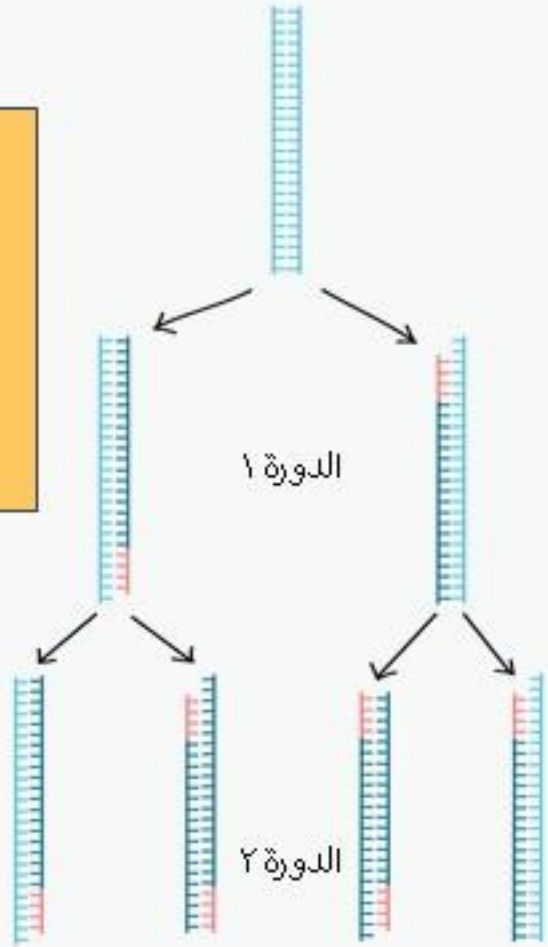
1

نهاية الدورة الأولى

(بعد تكون DNA قد تم نسخه)

يسخن المزيج مرة أخرى

للبدء بالدورة الثانية .



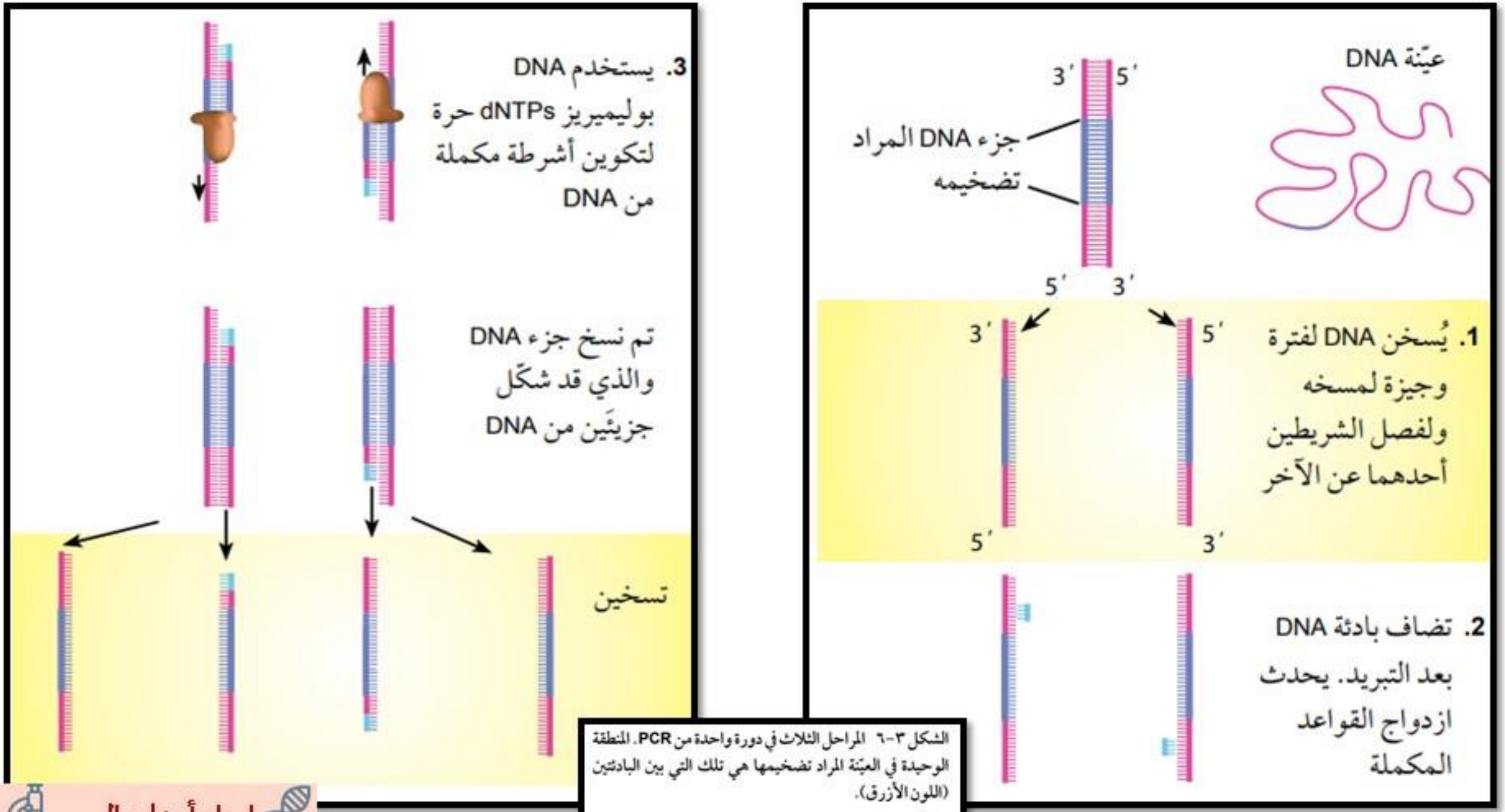
2

ناتج الدورتين

هو انتاج اربع جزيئات من

DNA المزدوج .

اعداد أ. خلود العجمي



الشكل ٣-٦ المراحل الثلاث في دورة واحدة من PCR. المنطقة الوحيدة في العيّنة المراد تضخيمها هي تلك التي بين البادئتين (اللون الأزرق).

اعداد أ. خلود العجمي

مثال لأنزيم مستقر حراريا ويستخدم في PCR :

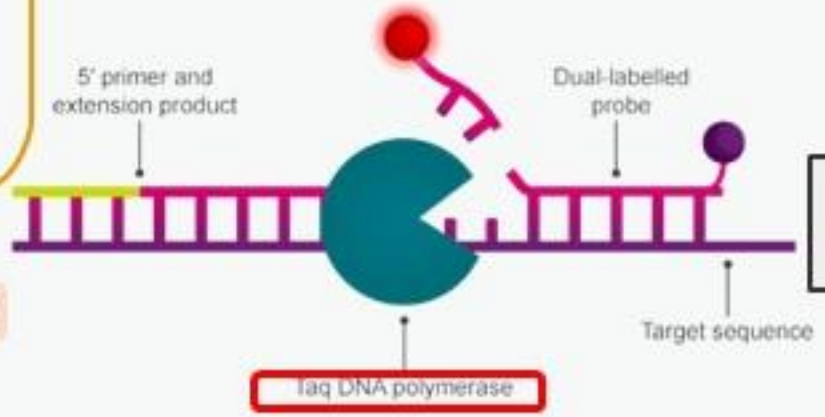
سبب قيمته الكبيرة لPCR

مصدره

النتيجة

النتيجة

النتيجة



اعداد أ. خلود العجمي

مثال لأنزيم مستقر حراريا ويستخدم في PCR :

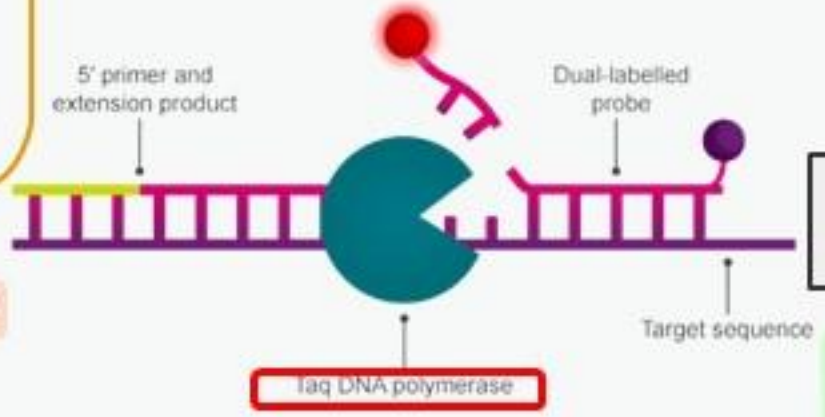
انزيم Taq بوليميريز

مصدره

بكتيريا المحبة للحرارة

وجدت في الينابيع الحارة في منتزه بلوستون في الولايات المتحدة الامريكية.

سبب قيمته الكبيرة لPCR



له درجة حرارة مثلى عالية.

النتيجة

درجة الحرارة لمرحلة الاطالة يجب الا تنخفض الى أقل من تلك في عملية الالتصاق..

لا يتحطم في مرحلة التمسخ.

النتيجة

لا يجب استبداله اثناء كل دورة.

النتيجة

يزيد من الكفاءة الى أقصى حد .

معلومة

خلها في بالك

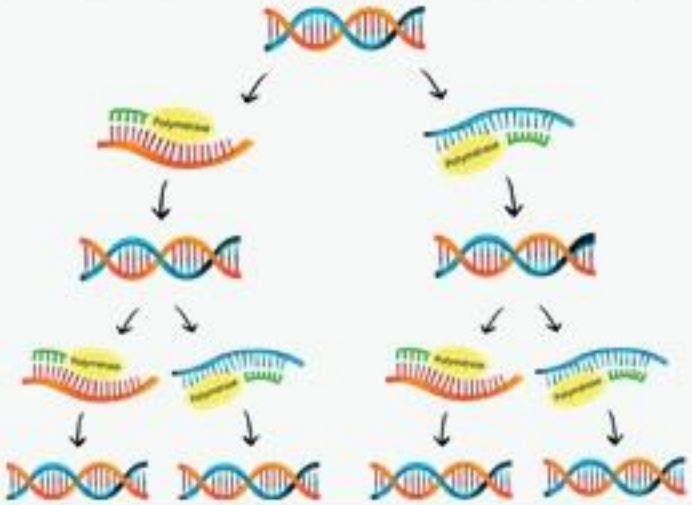
هناك العديد من انزيماتDNA بوليميريز المختلفة والمستقرة حراريا متاحة الان لـ PCR..

اعداد أ. خلود العجمي

اضف لمعلوماتك :

نظريا

يمكن استمرار تكرار التفاعل للابد



النتيجة

تكوين نسخا أكثر فأكثر من عدد ضئيل من جزيئات DNA الاصلية .

يمكن استخدام جزيء DNA واحد لإنتاج مليارات النسخ المماثلة في غضون ساعات قليلة .

اعداد أ. خلود العجمي

أهمية تقنية PCR

تستخدم بشكل روتيني في علم الطب الشرعي لتضخيم DNA من عينات نسيجية تركت في مسرح الجريمة.

إمكانية الحصول على ما يكفي من DNA من عينة صغيرة .

على سبيل المثال جزيء مجهري من قطرة دم تركت في مسرح الجريمة.

امكن حل العديد من الجرائم بمساعدة PCR مع إضافة DNA باستخدام الفصل الكهربائي الهلامي.

وهو ما سنتناوله بعد قليل .

اعداد أ. خلود العجمي

الفصل الكهربائي الهلامي

1 المقصود به:

2 استخداماته

3 ملخص التقنية

4 العوامل المؤثرة على حركة الجزيئات المشحونة

اعداد أ. خلود العجمي

الفصل الكهربائي الهلامي

1 المقصود به:

تقنية تستخدم لفصل جزيئات مختلفة .

2 استخداماته

تستخدم على نطاق واسع في تحليل DNA بفصل أجزاء من DNA .

3 ملخص التقنية

وضع خليط من الجزيئات في ابار تحفر في الهلام وتتعرض لمجال كهربائي.

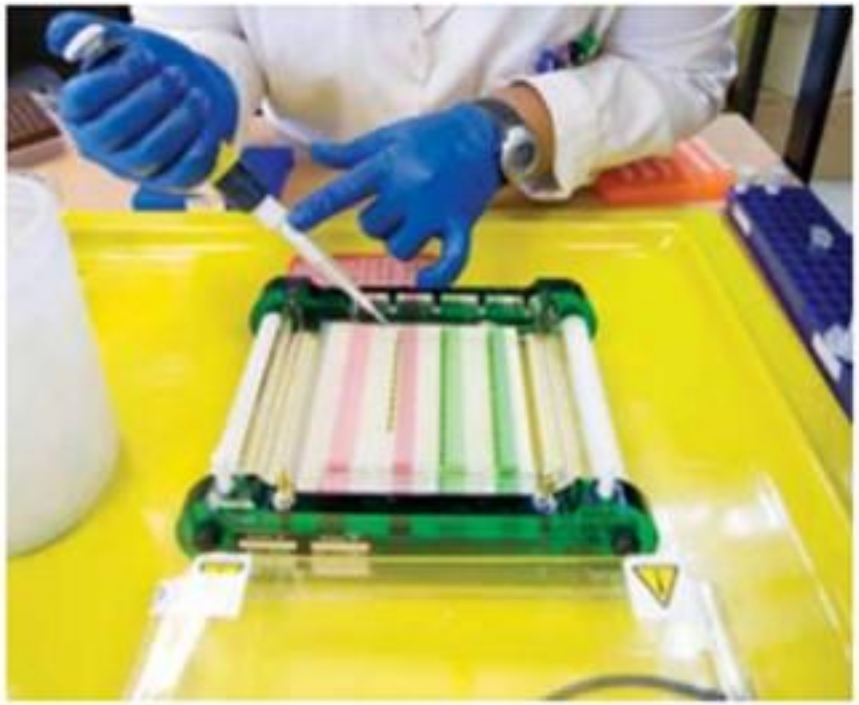
4 العوامل المؤثرة على حركة الجزيئات المشحونة

الشحنة: مجموعة الفوسفات في DNA ذات شحنة (-) لذلك تتحرك قطع DNA باتجاه القطب (+) .

الحجم: فالجزيئات الاصغر والاقصر تتحرك عبر الهلام بشكل اسرع من الجزيئات الأكبر والاطول .

تتناسب المسافة التي تقطعها قطعة DNA عكسيا مع طولها .

اعداد أ. خلود العجمي



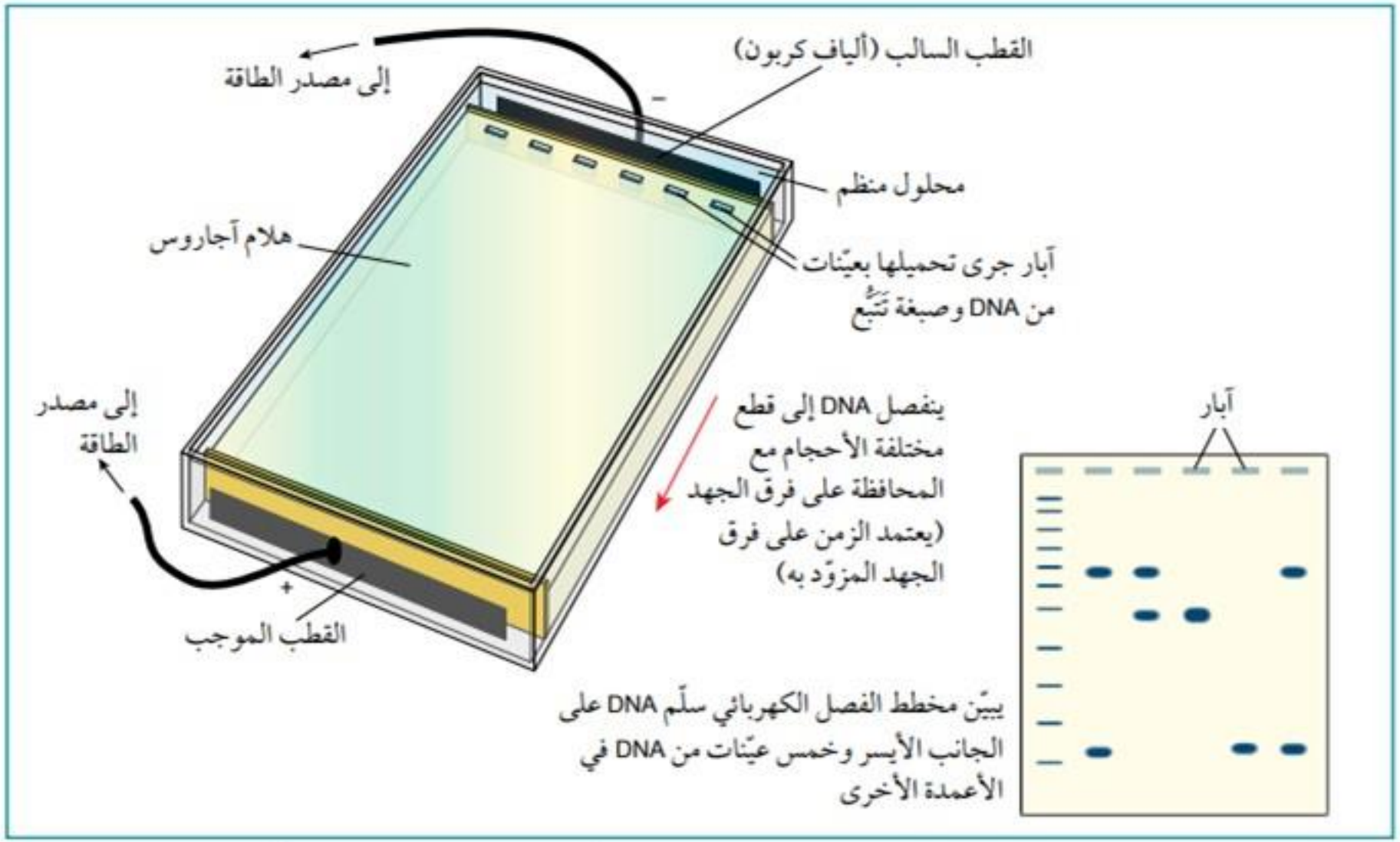
الصورة ٣-٦ تحليل التنوع الجيني في الشعاب المرجانية. يتم تضخيم DNA المستخلص من الشعاب المرجانية بواسطة PCR، ويوضع على الهلام ليتم فصله عن طريق الفصل الكهربائي الهلامي.

الصورة ٣-٧ استخدام الماصة الدقيقة لتحميل الآبار في هلام الأجاروس مع عيّنات من DNA مختلطة مع صبغة تَتَبُّع زرقاء.

خطوات الفصل الكهربائي

اعداد أ. خلود العجمي

1. يحضر الهلام (من آجاروس مثلا) ثم يصب في محلول منظم في الخزان ليغطي الهلام.
   الهدف من هذا المحلول المنظم توفير PH ثابت .
2. نستخدم ماصة دقيقة لنقل عينات DNA الى جميع الابار.
   تحوي هذه العينات على صبغة تتبع (Tracking dye).
3. نوضع عينة مرجعية بأطوال معروفة من قطع DNA في بئر على أحد جانبي الهلام أو كلا الجانبي .
   تستخدم بمثابة سلم DNA لتحديد أطوال قطع DNA في العينات الأخرى .
4. نوصل حزمة بطاريات بأقطاب كهربائية .
   يكون القطب السالب في الطرف نفسه للآبار المحملة بـDNA .
5. نظهر صبغة التتبع المسافة التي تركها المادة في العينات عبر الهلام.
   ⚠ توضيح
   تحديد أطوال قطع DNA بمقارنتها مع سلم DNA على جانبي الهلام.
6. يسكب المحلول المنظم خارجا ونضاف صبغة مناسبة الى الهلام.
   تشطف الصبغة لتكشف عن قطع عبر الهلام التي تمثل مواقع أجزاء DNA.



الشكل ٣-٧ يحتوي خزان الفصل الكهربائي على هلام آجاروس مع عيّنات DNA في آبار. يملأ الخزان بمحلول منظم ويتصل بمصدر طاقة. ستتحرك العيّنات باتجاه القطب الموجب.

اعداد أ. خلود العجمي

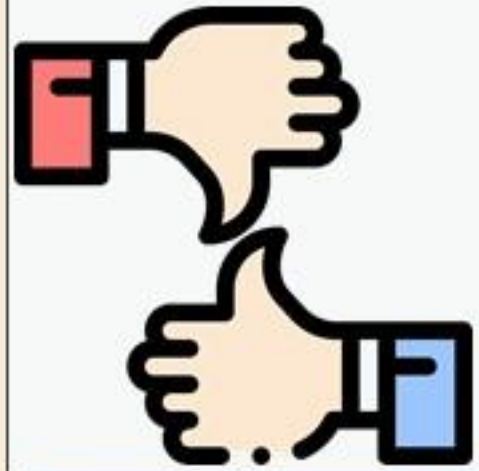
الشكل ٣-٨ رسم تخطيطي لهلام مصبوغ يبين نواتج PCR لخمسة أشخاص، لكل شخص قطعة أو قطعتان تتراوح أطوالها بين 400 و 800 زوج من القواعد. DNA في العمود 4 مصبوغ بلون داكن لأن الشخص متماثل الأليلات مع القطعة ذات 600 زوج من القواعد، لذلك يوجد ضعف كميّة DNA في القطع مقارنة بتلك التي في الأعمدة 2، 3، 5، 6.

اعداد أ. خلود العجمي

YouTube

https://www.youtube.com/watch?v=yhkHj7FQDJw

https://www.youtube.com/watch?v=bW2NmUiN5-0

اعداد أ. خلود العجمي

أقيم ذاتي بذاتي