النادي الطبي

Genetics

Subject : Recombinant DNA technology

Lec no : 30

Done By : Maria Hood

تدقيق : Esra'a khaled

وَقُل رَّبِّ زِدْنِي عِلْمًا

للوصول الى guidance الجينتكس و تفاريغ المادة كاملة :

تجدون في guidance مادة الجينتكس على موقع النادي :

medclubhu.weebly.com

GUIDANCE SLIDES NOTES RECORDS

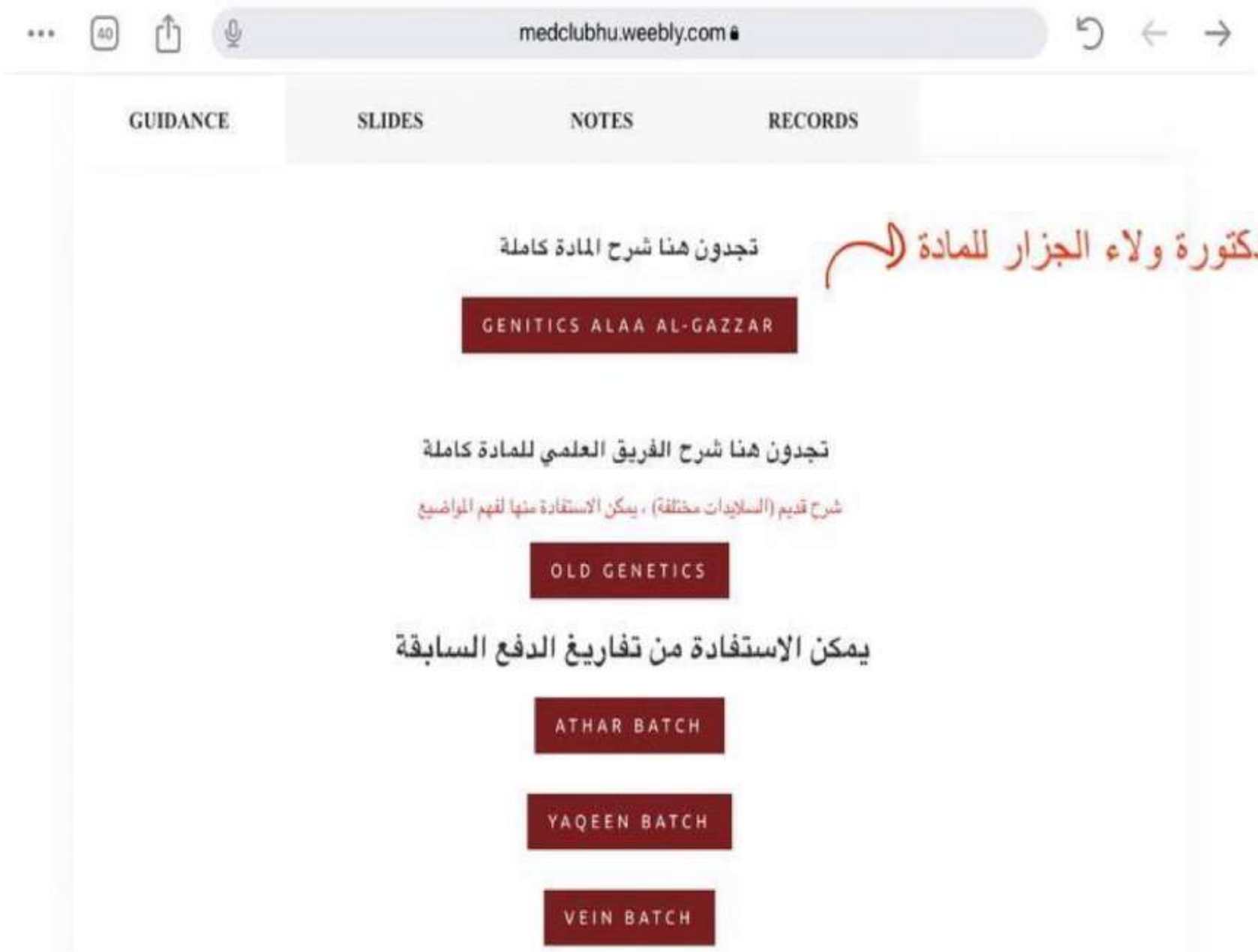
تجدون هنا شرح المادة كاملة

GENITICS ALAA AL-GAZZAR

شرح الدكتورة ولاء الجزار للمادة

تجدون هنا شرح الفريق العلمي للمادة كاملة

شرح قديم (السلايدات مختلفة) ، يمكن الاستفادة منها لفهم المواضيع



OLD GENETICS

يمكن الاستفادة من تفاريغ الدفع السابقة

ATHAR BATCH

YAQEEN BATCH

VEIN BATCH

كل اعمال الفريق العلمي تنشر على قناة التيليغرام

اليوم رح نبلش في الـ Recombinant DNA technology، التكنولوجيا الي رح استخدمها مشان اصنع Recombinant DNA molecule، شو يعني ؟
في السبعينيات الدكاترة و العلماء في جامعة ستانفورد استطاعوا انهم يتوصلوا لطريقة ينقلوا فيها genetic trait من الـ organism الـ organism ثاني ، حيث انهم جابوا DNA من microorganism و جابوا DNA من organism ثاني و عملوا الهم recombination مع بعض ، و داحوا زارعينهم جوا الـ hosts (المضيف الي بيستقبل الـ Recombinant DNA)
و بما انهم في هذيك الفترة (السبعينيات) تعاملوا مع tiny material و tiny organism فهذا الاشي كان مثل الطفرة في العلم نظرا إلى انه ما كانوا بهذا التحضر ، و ترتب على اكتشافهم هذا اكتشافات مهمة جدا في عالم العلاج

Recombinant DNA technology

- In the early 1970s, biochemists at stanford university showed that genetic traits could be transferred from one organism to another.

* عملو إشي اسمه Hyprid molecule يعني DNA من organism و DNA من organism تاني

- In this experiment, the DNA of one microorganism recombined with the inserted DNA sequence of another, and thus had been edited to exhibit a very specific modification.

- The actual editing, or insertion process, is painstaking, as it involves manipulating incredibly tiny pieces of incredibly tiny organisms.

قبل ما نبلش بموضوعنا بدنا نحكي عن شوية مصطلحات :

1. اولا ال plasmid و احنا أخذناه بس بدنا نعمل هيك مراجعة صفننة و هو عبارة عن DNA حلقي و double stranded و موجود في البكتيريا و بيحمل جينات بتساعدها على مقاومة المضادات الحيوية
2. ثاني مصطلح هو ال Recombinant DNA و هذا المصطلح بطلقه على اي fused human gene مع plasmid يعني لو جين او DNA بشري و دمجته مع بلازميد من البكتيريا و ربطتهم مع بعض انت هيك عملت Recombinant DNA molecule و ممكن نطلق عليه ال hybrid DNA لانه هجين من مصدرين من ال DNA : البكتيري و البشري ، و اله اسم ثالث و هو chimeric molecule : هس هو جاي من الكلمة chimera و هو حيوان اسطوري من الموثولوجيا اليونانية برأس أسد و ذيل كالأفعى و جسد ماعز ، اشي ملخبط يعني و اطلقناه على مركبنا هاد لانه حاجة ملخبطة برضو

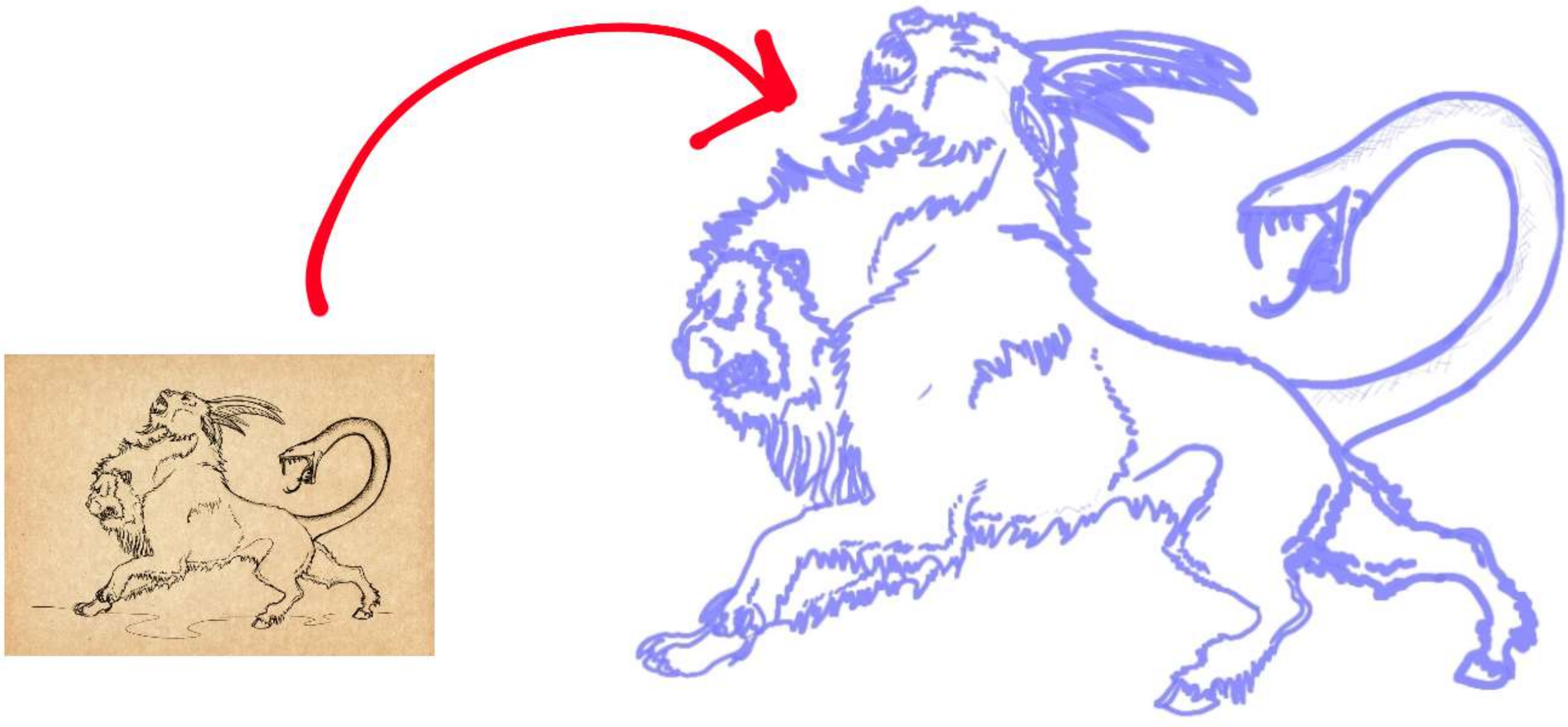
Important definitions

- **The recombinant DNA:** the term given to the fused human gene DNA and the bacterial (plasmid) DNA.

غالباً بحمل جينات بتمكّن البكتيريا أنها تقاوم ال resistance

- **Plasmid** : the extrachromosomal DNA present in some bacterial cells and normally gives the bacterial cells the power to resist the action of antibiotics.

- The recombinant DNA molecule is also known as **hybrid or chimeric molecule**.



هس طيب انا كيف بدي اصنع هذا ال molecule؟ هذا ما سنعرفه في آخر المحاضرة ، حاليا انا بدي اعرف الأدوات الي رح تساعدني في تحضيره

بس بدي احكي اشي ، هس الهدف من هاي المحاضرة انه اصنع Recombinant DNA molecule و ازرعه داخل ال host cell و هاي الخلية بتتضاعف و بتتقاسم بسرعة و هي بتتقاسم ال hybrid DNA molecule الي جواتها بيتضاعف اعداده معها فأنا هيك بكثر من ال Recombinant DNA

Recombinant DNA technology

- **It is genetic engineering which causes artificial modifications of genetic constitution of a living cell by introduction of foreign DNA through experimental techniques.**

بنشرحهم بعدين هس رح نشوف الأدوات المستخدمة

- **The techniques involves:**
- **Splicing of DNA by restriction endonucleases.**
- **Preparation of chimeric molecules.**
- **Cloning of large number of identical target DNA molecules**

زي المقصات

1. اول اشي هو ال Restriction endonucleases و همي عبارة عن انزيمات بستخدمها في قطع الجين مشان اعمل اله isolation و الصقه على البلازميد
2. ثاني اشي اسمه ال vectors او vehicle DNA و هي عبارة عن وسيلة نقل بنقل فيها ال human gene لل hosts و احد الأمثلة عليها هو البلازميد
3. ثالثا ال human gene او passenger DNA بعمل اله لصق على البلازميد
4. و آخر اشي هو living cell سواء كانت نباتية ، بكتيرية او حيوانية مشان ازرع جواتها (و طبعا كل هذا لازم يكون داخل وسط مناسب)

Tools of recombinant DNA technology

* بينما ال exonucleases كانت بتقطع من الاطراف

1 Restriction endonucleases
إنزيمات بتقطع بالنص

2 Vectors or vehicle DNA e.g : plasmid

3 Passenger DNA (foreign DNA)
هاد ال DNA الي رح يركب عال vector

4 Hosts: they include Bacterial-animal or plant cells

اول اشي رح نبلش نحكي عن ال Restriction endonucleases من اسمهم يعني بيعملوا cut في ال middle بتاع ال polynucleotide chain و بيشتغل مثل المقصات، و لما تقطع بتقطع specific site بنقول عليه ال restriction sites و هاي المواقع الها مواصفات و specific sequence معينة خاصة فيها بتقطع عندها

هس هاي المقصات بنستخرجها من البكتيريا ، وظيفتها في البكتيريا تحميها من الفيروسات الي بتعمل infection للبكتيريا د بحيث انه هاي الفيروسات لما تدَّخل ال genetic material بتاعتها المقصات هاي بتعمل الها قطع

Restriction endonucleases

They are important class of DNA endonucleases that recognize specific sequence of bases in DNA (restriction sites) and have the ability to cleave DNA molecules at these sites so they serve as molecular scissors.

* شو فايدة ال Restriction endonuclease بالبكتيريا ؟

يعتبرو وسائل دفاع للبكتيريا ، يعني لو البكتيريا تعرضت ل infective virus مثلا ، بتروح بتطلع هاي المقصات و بتقص ال nucleic acid تاع ال bacteriophage الي هو ال virus

They are found in a wide range of bacteria, their function is to recognize and cleave foreign DNA and so prevent or restrict the infecting virus "bacteriophages" (so the name restriction). They are called endonucleases because they cut in the middle of the polynucleotide chain.

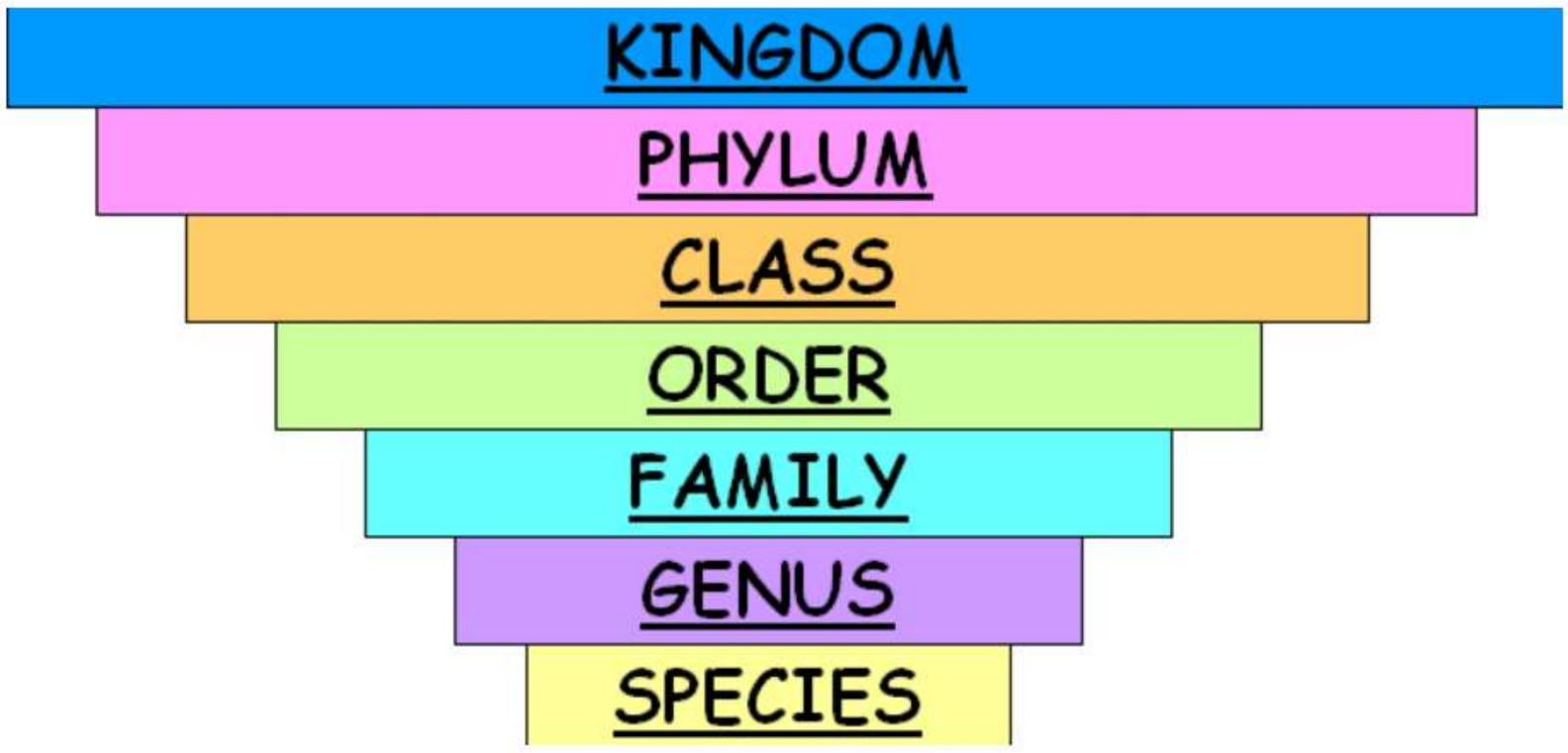
هس مش حكينا انه هاي ال restriction enzymes بتتعرف على sequence معين ، طيب اذا البكتيريا عندها نفس هاد ال sequence مش رح تقطع ال DNA الخاص في البكتيريا كمان ؟
هس البكتيريا فيها DNA methylase enzyme و بيعمل methylation لل cytosine الي موجود في ال restriction site ، فلما ييجي ال endonuclease ما رح يقدر يتعرف عليه و بالتالي ما رح يقصه

The cell's own DNA is protected from cleavage by these restriction enzymes by methylation as bacteria that contain these enzymes also contain a DNA methylase enzyme that methylates the cytosine bases of the bacterial DNA at the restriction site rendering the bacterial DNA resistant to the action of the restriction endonuclease.

عدد ال restriction enzymes المعروفة ما يقارب ال 3000 ، 600 نوع منها موجود في الأسواق و انا ممكن اطلبهم من الشركات اذا كنت بدي اقوم ببحث

- **Over 3,000 restriction enzymes have been studied in detail, and more than 600 of these are available commercially. They are named according to the bacterial species from which they are isolated .**

و طبعا كل واحد من هاي الانزيمات اله اسم معين حسب البكتيريا الي أُخذ منها الانزيم
طبعا احنا بنعرف انه جميع الكائنات الحية بيتم تصنيفها حسب الجنس و النوع و القبيلة (حتى الإنسان الي يصنف على أنه Homo sapiens) ، هس كمان كل بكتيريا الها جنس و نوع معين فلهيك لما اسمي ال enzyme اول حرف بكون نفسه اول حرف من اسم جنس البكتيريا genus و ثاني حرفين حسب اول حرفين من نوع البكتيريا species
الحرف الرابع الدكتورة ما حكت عنه اشي بس هو بدل على ال strain
و الرقم اللاتيني حسب ترتيب اكتشاف هذا الانزيم من هذا النوع من البكتيريا



- **The first letter indicates the genus name , and the other two indicate the species name and a roman numeral indicates the order of discovery of an enzyme from that species. e.g. EcoRI was the first enzyme isolated from Escherichia coli (E.coli).**

Derivation of the EcoRI name		
Abbreviation	**Meaning**	**Description**
E	*Escherichia*	genus
co	*coli*	specific species
R	RY13	strain
I	First identified اول انزيم isolated من ال E.coli	order of identification in the bacterium

ال Restriction site اله مواصفات معينة حسب الانزيم الي بيقطعه، مهو حكينا انه كل انزيم اله Restriction site خاص فيه ، فلهيك كل واحد اله مواصفات محددة مشان يقدر يحدده :

اول شرط انه كل site اله specific sequence خاص فيه و بيكون من 4 ، 6 او 8 bases

الشرط الثاني انه يكون متدتب حسب palindromic arrangement و طبعا palindrome كلمة اغريقية بتعني to run backwards يعني لو قرأت الكلمة من اليمين للشمال او من الشمال لليمين نفس الاشي زي كلمة (خوخ) و (توت) و (madam) ، بس احنا هون قصدنا انه التدتيب في ال strand الأول من 5' ل 3' اله نفس التدتيب في ال strand الثاني بدضو من 5' إلى 3' (حسب الصودة الي تحت)

و هذا بنطلق عليه Palindromic arrangement او inverted repeat sequence

Restriction sites

- They are sequences of four, six, eight or rarely more bases with palindrome arrangement.

- Palindrome in Greek means “to run backwards”. It is similar to a word that reads backwards or forwards similarly e.g. madam. These are also called inverted repeat sequences which means the nucleotide sequence in 5`to 3` direction is the same in both strands.

palindrome arrangement

5’…..	G	A	A	T	T	C	…..3’
3’…..	C	T	T	A	A	G	…..5’

طيب الانزيم كيف بيقطع الـ restriction site ؟

وجدوا انه فيه انزيمات بتقطع blunt end cut ، من المنتصف مباشرة بحيث انه كل base بتكون مع المكملة الها حسب هاي الصورة

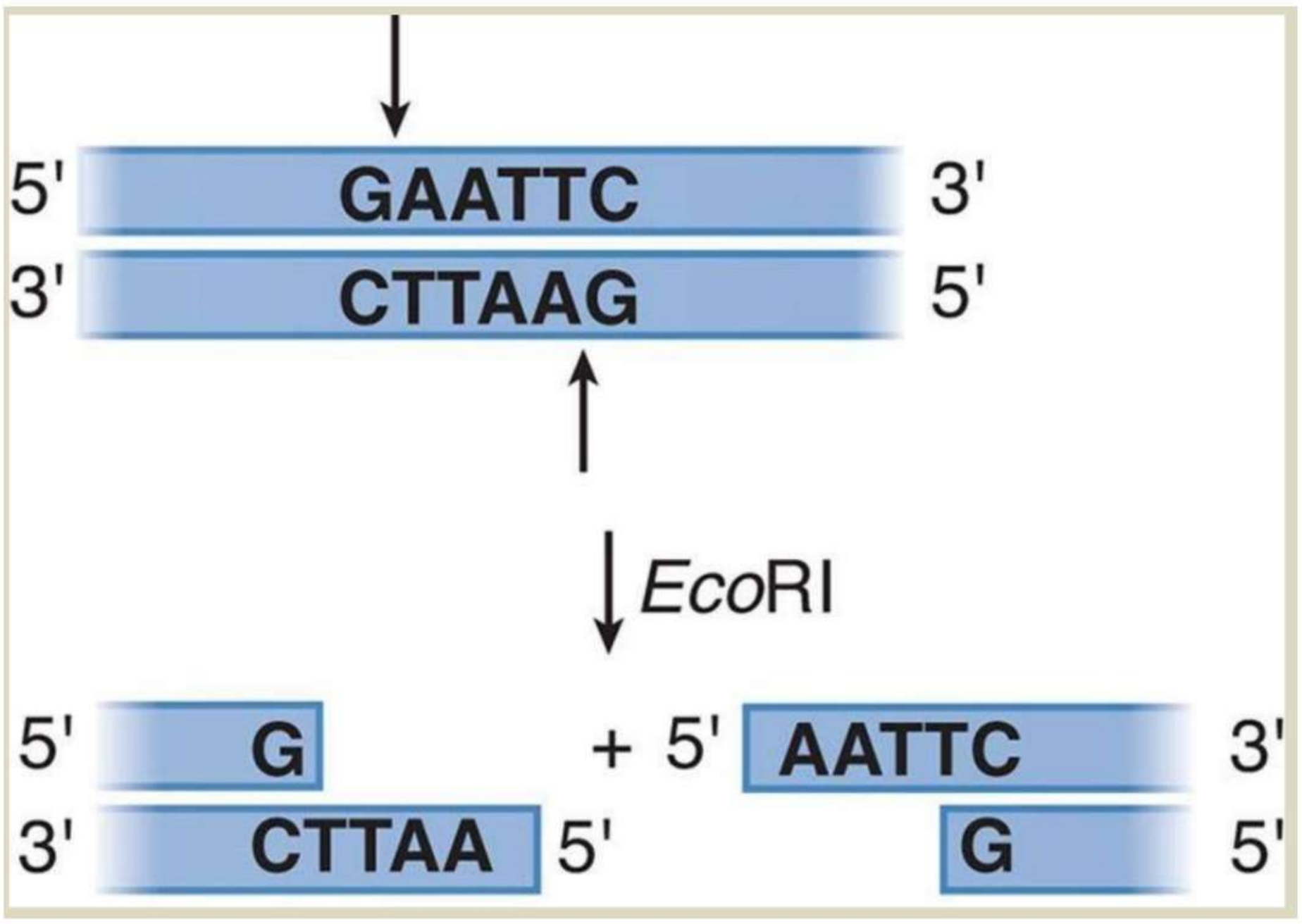
ما في ولا base مش قدامها ال complement تاعها

و الطريقة الثانية اسمها sticky end cut و اله اسمين كمان :

ال cohesive ends

و ال staggered ends

و من اسمها sticky و cohesive يعني بتلزق في اي DNA molecule مكملة الها (حسب الصورة الي تحت) و احنا بالشغل في اللاب بنستخدم هذه الطريقة اكثر اشي

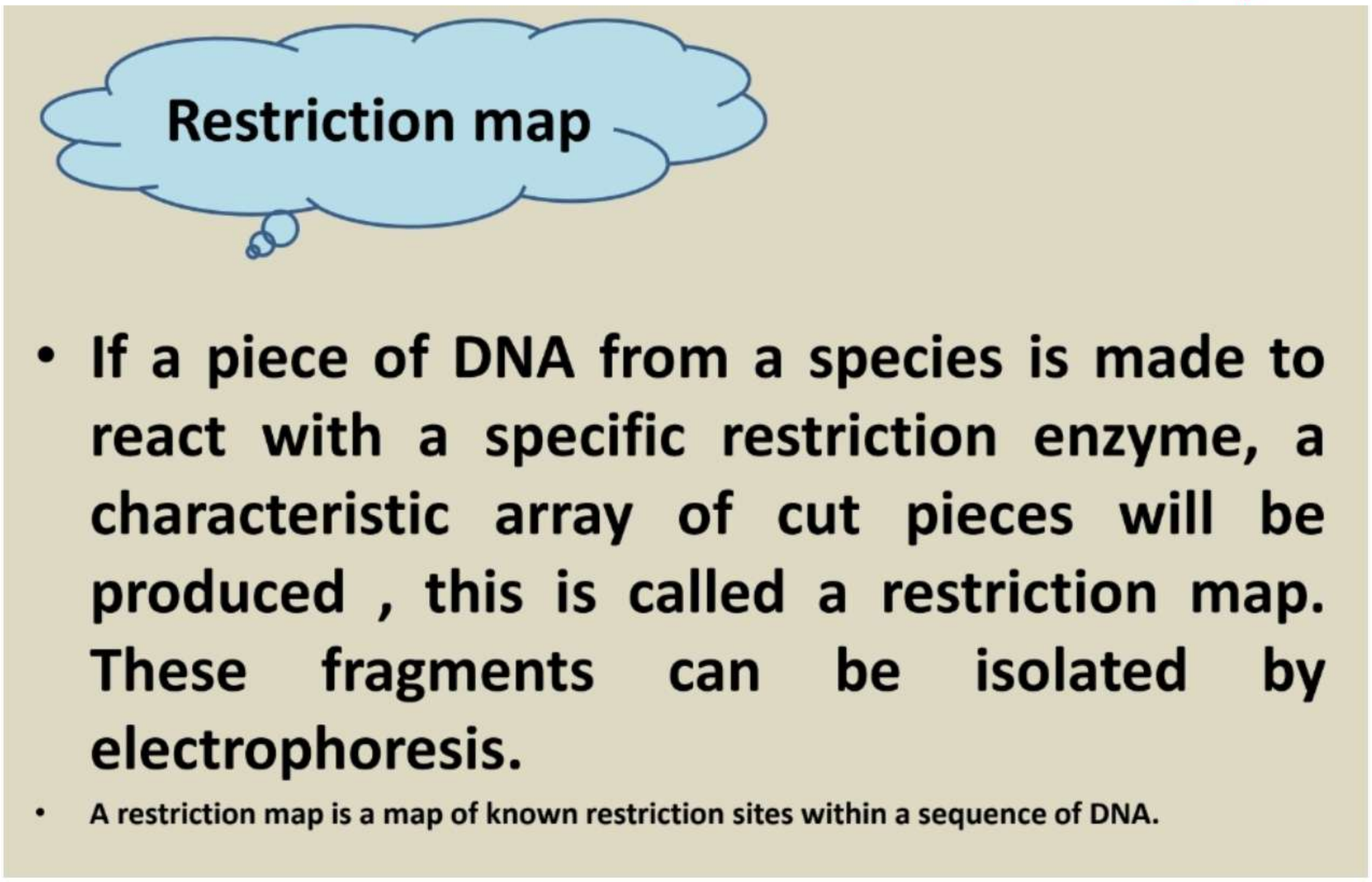


- **They cut either blunt end cut or sticky end cut.**
- **Blunt end cut cleaves both strands of DNA so as to leave no unpaired bases on either ends.**
- **Sticky end cut leaves unpaired ends which are called cohesive ends, sticky ends, or staggered ends.**
- **Blunt end of the DNA fragment are ligated at a low efficiency than those with complementary sticky end, while the sticky end of the DNA fragment facilitates the ligation of amplified DNA into cloning vector.**

شايفين الصورة الي تحت فيها جين فيه منطقتين مناسبات مشان ال EcoR1 يقطع عندها ، فهو لما يقطع بصير عندي ثلاثة قطع (هس لو مثلا كان طوله الجين 100KBP فتقريبا نحكي انه قطعه ثلاث قطع وحدة 50 و الثانية 30 و الثالثة 20 ... تقريبيبيبا!!!!)، هس فيه جهاز اسمه جهاز الفصل الكهربائي الهلامي بنقدر نعرف منه طول الجين او كم الانزيم قطع الجين لقطعه من حيث انهم بيحطوا الجينات و بيشغلوا الجهاز و بتمشي الجينات للقطب الثاني أو الجهة الثانية من الجهاز و لما يوقفوا الجهاز لتكون الجينات بتوقف كمان ، فأصغر جين بيكون هو الأسرع و بيكون أقرب للجهة الثانية و الأطول هو الابطأ و بيكون الجهاز مرقم بحيث انه كل جين بتوقف عند رقم بيدل على عدد ال KBP الموجودة فيه و بما انه ال EcoR1 قطعت الجين لثلاثة قطع فراح يبين عندي ثلاث نقط على الجهاز
وحدة واقفة عند ال 50 ووحدة عند ال 30 ووحدة عند ال 20

هس لو أخذنا الجين نفسه و كان mutated في ال restriction site و رحت قطعته في ال EcoR1،
فالإنزيم ما رح يتعرف على ال mutated و بالتالي رح يقطعه لقطعتين فقط ، و رح اكتشف هاي الطفرة من
خلال جهاز الفصل الكهربائي الهلامي انه بيبن عليه نقطتين فقط

في حاجة الدكتورة حكت انها مش مهمة اسمها ال restriction map بس خلينا نحكي نبذة :
هي عبارة عن خريطة بتوضح كل restriction enzyme شو ال sequence المناسب اله و
بتساعدني في الشغل



هس بعد ما قطعنا ال DNA رح نلصقه بوسيلة نقل الها مواصفات معينة :

1. انه يكون able to replicate بحيث لما ازرعه في ال host cell يتضاعف معها يعني حتى لو ال host ما كان بيتضاعف (بنحكي مثلا بس احنا ما رح نجيب hosts ما بيتضاعف) لازم يقدر يتضاعف من تلقاء نفسه
2. لازم يكون عليه منطقة اقطعها و الصق الجين بتاعي عليها
3. لازم يكون عنده المقدرة يدخل ال host cell ⟵ و هاد الاشي معتمد على شغلتين : معتمد عليه و على ال cell نفسها
4. هس لما احطه في أنبوب و كان فيه خليتين كيف اعرف هو دخل اي خلية ؟ فلهيك بيكون اله علامة مميزة اعرف من خلالها هو دخل اي خلية (selectable marker)

vectors

- In order to introduce the human gene into bacteria, at first, the gene is transferred into a carrier, known as a vector.

- Vectors show the following essential features:
  - They are able to replicate.
  - They must contain a site for insertion of target DNA.
  - They could be inserted into the host cell
  - They have a selectable marker to trace them after insertion. بنختار plasmid ب marker معين بميزه

هس بدنا نشوف اشهد ال vectors:

1. اولا ال plasmid و هو فيه المواصفات كلها من ١ إلى ٤ ، بس هس رح نحكي عن ال selectable marker بتاعه ، مش من مهام البلازميد انه عنده antibiotic resistance gene بيخلي البكتيريا to resist to antibiotics ؟

هس لما احط هذا البلازميد الملصق عليه الجين في أنبوب مع مجموعة بكتيريا ، كيف رح اعرف اي بكتيريا أخذته؟ من خلال انه بوهذ هاي البكتيريا و بحطها في وسط فيه antibiotic ، البكتيريا الي اخذت البلازميد هي الوحيدة الي ما رح تموت لانه عندها صار عندها resistance لهذا ال antibiotic

مثال : لو هذا البلازميد كان فيه ampicillin resistance gene و بكتيريا اخذت البلازميد دا ، هل لو زرعت هاي البكتيريا في ampicillin رح تعيش ؟ رح تعيش لأنها اخذت البلازميد المناسب ، البكتيريا الي ما اخذت البلازميد هذا رح تموت ، و بعديها بوخذ البكتيريا الكويسة و بكثرها و بكثر الجين الي فيها

Commonly used vectors

- **(1) plasmids:**

➢ **They are bacterial extra chromosomal circular double stranded DNA.**

➢ **They replicate independent of bacterial DNA.**

ال kilo base pair يعني 1000 base pair

➢ **Foreign DNA "small pieces from 6-10 Kbp" could be incorporated in plasmid by using specific restriction endonuclease.**

➢ **Plasmids usually carry one or more of antibiotic resistance genes "which are utilized as selectable markers". i.e. a method of selection of cells containing recombinant DNA molecule as growth in presence of antibiotic, only the bacteria containing the plasmid will grow.**

بس في مشكلة في البلازميد انه ما بشيد الا small pieces من ال DNA ، لو اجيب DNA او segment صفنن كدا من 6 إلى 10 kbp رح يشيله بس لو أكبر من 10 kbp رح استخدم حاجة تانية اسمها Bacteriophage و بتشيد من 10 إلى 20 kbp ، لو أكبر من 20 رح ارد استخدم اشي ثاني cosmids و هو artificially constructed: حاجة مش حقيقية بقا بس احنا عملناها و هو خليط بين البلازميد و ال Bacteriophage و بيشيد up to 50 kbp

(2) Bacteriophage :

- ❖ **Is a virus that infects and replicates within a bacterium.**
- ❖ **Plasmids can accept only about 6-10 kbp long foreign DNA. If a DNA segment of 10-20 kbp is to be introduced, bacteriophages may be the vectors of choice.**

One Kb=1000 nocleotides base sequence.

- **(3) Cosmids :** *(artificially constructed cloning vectors)*

❖**They are plasmid that also contain some portion of bacteriophage DNA . They can take up still bigger fragments of DNA "up to 50 Kbp".**

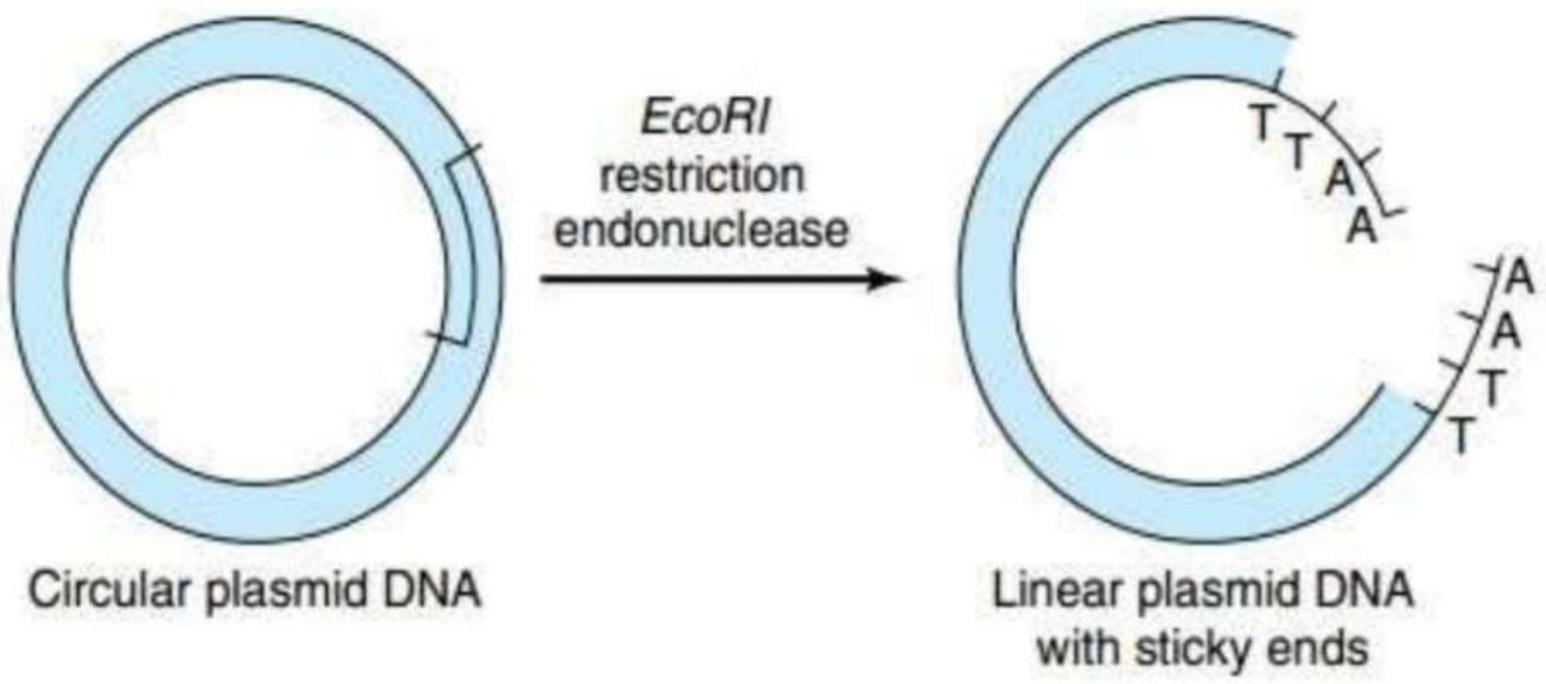
Preparation of Chimeric DNA Molecules

- **Chimera is the Greek mythological monster with a lion's head, goat's body and serpent's tail.**

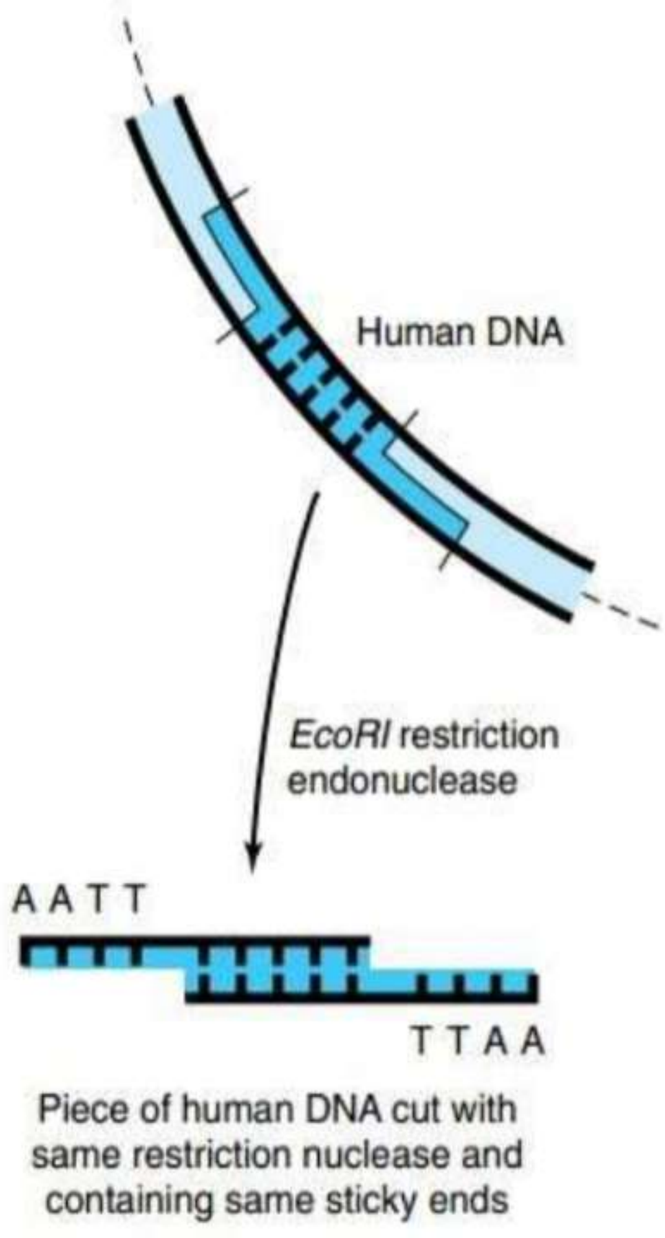
- **A vector carrying a foreign DNA is called <u>Chimeric DNA</u> or <u>Hybrid DNA</u> or <u>Recombinant DNA.</u>**

هس رح نبلش بالخطوات :

اول اشي بجيب البلازميد و بنحط عليه restriction endonucleases مشان يقطعه ، بحيث رح يكون عندي TTAA على ال strand الأول و AATT على ال Strand الثاني إذا استخدمت EcoR1



i. **A circular plasmid vector DNA is cut with a specific restriction endonuclease (RE). If EcoRI is used, sticky ends are produced with TTAA sequence on one DNA strand, and AATT sequence on the other strand**



Piece of human DNA cut with same restriction nuclease and containing same sticky ends

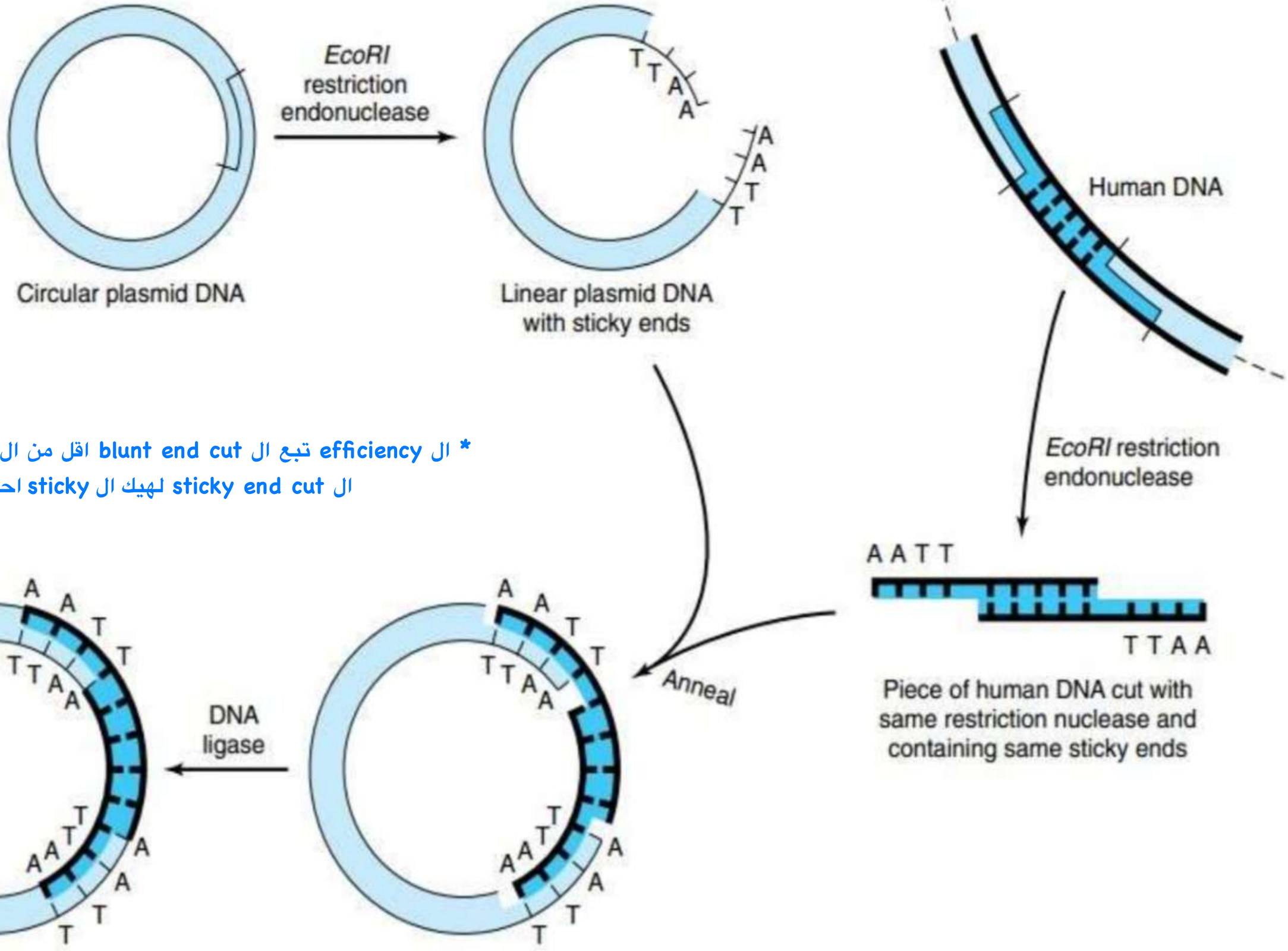
الخطوة الثانية رح اجيب نفس ال restriction enzyme اقطع بيه ال human DNA ، ليش نفسه طيب ؟ عشان يقطع بنفس ال sticky end (يكونوا complementary لبعض)

- **ii. The human DNA is also treated with the same RE, so that the same sequences are generated on the sticky ends of the cut piece.**

بعد ما اقطعم رح اعمل الهم incubation مع البلازميد في نفس ال tube و ال sticky ends رح يصير الهم annealing with each other، رح يمسكو بعض بسهولة لأنهم complementary لبعض و بعديها بييجي ال DNA ligase بيعمل phosphodiester linkage و تا دا صار فيه عندي Recombinant DNA molecule

- **iii. Then the vector DNA and human cut-piece DNA are incubated together so that annealing takes place. The sticky ends of both vector and human DNA have complementary sequences, and therefore they come into contact with each other.**

- **iv. Then <u>DNA ligase</u> enzyme is added, which introduces phosphodiester linkages between the vector and the insert molecules. Thus the chimeric DNA is finally produced.**



* ال efficiency تبع ال blunt end cut اقل من ال efficiency تبع
ال sticky end cut لهيك ال sticky احسن

DNA ligation

- DNA ligase can join matching sticky ends of DNA pieces from different sources that have been cut by the same restriction enzyme
- The mechanism of DNA ligase is to form two covalent phosphodiester bonds between 3' ends of one nucleotide, ("acceptor") with the 5' phosphate end of another ("donor").
- ATP is required for the ligase to work

هس بعد ما اعمل ال Recombinant DNA رح اعمل اله incubation مع ال host cell بتاعتي
بعد ما احطهم في tube مع بعض ، هس مش كل البكتيريا بتعمل uptake لل plasmid بتاعي ، فيه
5% من البكتيريا بتعمل كدا بس ، فعندي tupe فيه بكتيريا كيف اعرف اي وحدة اخذت ال plasmid؟
حكيناها انه بحطها في antibiotic و الي فيها ال plasmid رح تعيش

Cloning of Chimeric DNA

مستعمرة

- A clone is a large population of identical bacteria or cells that arise from a common ancestor molecule.

- Cloning allows the production of a large number of identical DNA molecules. The hybrid molecules are amplified by the cloning technique.

in vivo : داخل خلية حية
In vitro : داخل المختبر

بنكون كثرنا ال segments جوا living organism
عكس ال PCR الي كان in vitro

- DNA cloning is an in vivo DNA amplification.

- Only 5% of bacteria colonies contain the desired vector, so we have to select the desired colonies.

5% بس من البكتيريا بتعمل uptake لل hybrid molecule

- The bacterial host cell containing the recombinant vector can be selected if the vector contains an antibiotic resistance genes.

- Bacteria without vector die in the presence of antibiotic medium.

هس انا مش هدفي اني اكثر الجين و بس ، لأ احنا كمان بنهتم في ال gene product و بعضه مهم جدا جدا جدا ، فأنا بروح و بزرع البكتيريا في وسط بيعمل inhance for the gene expression، يعني انا بكثر الجين و بضيف شوية خطوات و بنكثر ال protein product، و فيه طرق خاصة مشان استخلص البروتين و دي كانت احسن خطوة في تصنيع ال Recombinant DNA molecule، و اشهر مثال هو تصنيع ال human insulin، الناس كانوا بيجيبوا الأنسولين من animal sources، بس ال human source افضل بكثير لانه الجسم رح يتعامل افضل معه و ما رح يعمل antibodies

Isolation of cloned foreign DNA or its protein product:

Cells containing an appropriate chimeric plasmid are cultured then the plasmids are isolated from host cells (the bacteria are lysed and the hybrid plasmids are isolated) and treated with the same restriction enzyme to release the foreign DNA.

If the host cells are grown under conditions that permit the production of protein produced from target DNA, then the protein of interest can be isolated.

ال hepatitis فيه اله نوعين كانوا عاملين قلق عالمي :

الأول هو ال hepatitis B و هو DNA virus و لقينا اله vaccine هو hepatitis B infection كمثل انه الدكتور يستخدم أدوات استخدمها على مريض مصاب و ما عقمها ، و هو من ال antigen ، و هذا النوع بسرعة بينتقل بسرعة حتى لو من قطرة دم وحدة ، بينتقل ك vaccines الي لازم الكل يوخذها و هو طفل و لو الدكتور ما كان ماخذه لازم يوخذه و نصيحة من الدكتورة لازم احنا الدكاترة نتعامل مع أي مريض انه مصاب بكل أنواع الفيروسات حتى لو هو ظاهر عليه انه سليم

الثاني hepatitis C و هو RNA virus و حد هس ما لقينا اله vaccine ، و هو صعب ينتقل و بده كمية كبيييييرة من الدم مشان ينتقل من شخص لآخر

- **Hundreds of human proteins are now being synthesized by the recombinant technology.**

- **Recombinant human insulin is now available in market. Other useful products produced include; interferons, hepatitis B antigen and growth hormone.**

ال interferons بيعمل على تحفيز ال immune system انه يهاجم الفيروس مثل ال hepatitis C ، و هو احد أسوأ العلاجات بالنسبة للدكتورة ، لأنه المريض بعد أخذه كان يدخل في إعياء شديد لمدة ثلاثة أيام و هو بيكون كحقنة كل أسبوع لمدة سنة إلى سنة و نصف و فوق هيك 60 % من الحالات كانت تفشل علاجها

و دمتم بود