الاسم : ..... المادة : العلوم الحياتية (رقم 12)

الصف : الثاني عشر – المسار الاكاديمي الوحدة الرابعة : التكنولوجيا الحيوية / الدرس الاول

معلمة المادة : هبة سوداح

الدرس الاول : ادوات التكنولوجيا الحيوية

- تستخدم في التكنولوجيا الحيوية ادوات وتقنيات تعمل على تعديل المادة الوراثية DNA ونقلها وتكثيرها وفصلها وقد وظف الانسان هذه الادوات في مجالات عدة مثل الطبية والزراعية كما تسهم علوم البيولوجيا الجزيئية والادوات المخبرية والحواسيب في تطوير المنتجات التي تساعد على تحسين حياة الانسان .

- التكنولوجيا الحيوية :
فرع من فروع العلوم الحياتية ويهتم بتوظيف الكائنات الحية والمعلومات المتعلقة بها في مجالات عدة واستخدامها في صنع بعض المنتجات وتطويرها لخدمة البشرية .

- استخدم الانسان منذ القدم الكائنات الحية ومنتجاتها لتحسن مناحي حياته مثل :
  1. إضافة الخميرة الى الطحين لاعداد الخبز .
  2. ادخال البكتيريا في عمليات التعدين وصناعة الالبان ومنتجاتها .

- اصبح الانسان في ظل التطور في علم الوراثة والبيولوجيا الجزئية (مثل DNA) يستخدم الكائنات الحية بعد تعديل المادة الوراثية فيها ومعالجتها ثم نقلها الى كائن اخر .

- ويتطلب للتكنولوجيا الحيوية مجموعة من الاجراءات والتي تشمل :
  1. المواد وأدوات :
     أ. انزيمات الحمض النووي وهي ثلاث أنواع (انزيمات القطع المحدد، انزيمات الربط،انزيمات بلمرة DNA المتحمل للحرارة ، انزيم النسخ العكسي) .
     ب. نواقل الجينات : هي ثلاث أنواع (البلازميدات، الفايروسات أكلة البكتيريا، الجسيمات الدهنية) .

  2. التقنيات (الطرائق) :
     أ. تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل (PCR)
     ب. الفصل الكهربائي الهلامي
     ت. تحديد تسلسل الحمض النووي DNA

3. التطبيقات :

أ. البصمة الوراثية (بصمة DNA)

ب. هندسة الجينات وتشمل :

- تطبيقات طبية مثل (انتاج مواد علاجية،العلاج الجيني) .
- تطبيقات زراعية مثل (تحسين وتعديل الإنتاج النباتي، تحسين وتعديل الإنتاج الحيواني)

ت. الاستنساخ (استنساخ النباتات ، استنساخ الحيوان)

ث. مشروع الجينوم البشري

ج. المعلوماتية الحيوية (معلومات جينية DNA او RNA، علم المحتوى البروتيني)

- **ملاحظة :**

اسهم تطور ادوات البيولوجيا الجزيئية الحديثة واستخدام قواعد البيانات الحاسوبية في تعرف تسلسل نيوكليوتيدات الجينوم البشري مما ادى الى تقدم علم الامراض والصيدلة .

- <u>ادوات ومواد التكنولوجيا الحيوية :</u>

أولا : انزيمات الحمض النووي DNA :

- انزيمات القطع المحدد (اتحقق ص 169) :

هي انزيمات متخصصة تتعرف تسلسل محدد من النيوكليوتيدات في منطقة تسمى منطقة التعرف ويكون تسلسل النيوكليوتيدات في هذه المنطقة في احدى سلسلتي DNA من النهاية 5 ⟵ 3
هو نفس التسلسل للسلسلة المقابلة لها من 5 ⟵ 3

- منطقة التعرف : هي مناطق محددة من جزيء DNA تحوي تسلسل معين من النيوكليوتيدات متماثل في السلسلتين المتقابلتين من 5 ⟵ 3 وتتعرف عليها انزيمات القطع المحدد عادة عددها من (4-6) نيوكليوتيدات .

- امثلة على مناطق التعرف :

5^- AACGTT 3^-
3^- TTGCAA 5^-

5^- CCGG 3^-
3^- GGCC 5^-

5^- CGATCG 3^-
3^- GCTAGC 5^-

- **ملاحظة :**

تقوم بعض أنواع البكتيريا بإنتاج انزيمات القطع المحدد للدفاع عن نفسها من الفيروسات من خلال قطع DNA الفيروس الذي يهاجمها وتسمى انزيمات القطع تبعاً لجنس البكتيريا ونوعها وسلاستها وترتيب اكتشاف انزيم القطع الذي تنتجه .

بعض أنواع إنزيمات القطع المُحدَّد.

إنزيم القطع المُحدَّد	اسم الجنس للبكتيريا نأخذ اول حرف	النوع نأخذ اول حرفين	السلالة	السلالة الفرعية	رقم الإنزيم بحسب ترتيب اكتشافه
EcoR I	*Escherichia*	*coli*	R	-	1
BamH I	*Bacillus*	*amyloliquefaciens*	H		1
Hind III	*Haemophillus*	*influenzea*	-	d	3
Pst I	*Providencia*	*stuartii*	-	-	1

- **الية عمل انزيم القطع المحدد :**

1. **تقطع هذه الانزيمات جزيء ال DNA بعد التعرف على تسلسل النيوكليوتيدات في منطقة التعرف عند مواقع محددة بين نيوكليوتيدين متتاليين (تسمى مواقع القطع) وقد تتكرر مناطق التعرف لانزيم قطع محدد فيقطع الانزيم في اكثر من موقع بحيث ينتج أجزاء متعددة الاطوال من ال DNA**

2. **ينتج من بعض انزيمات القطع : قطع DNA ذات اطراف مفردة وهي تتكون من سلسلة واحدة من النيوكليوتيدات تسمى (النهايات اللزجة) ويسهل التحامها بنهايات لزجة متممة لها من قطعة DNA أخرى .**

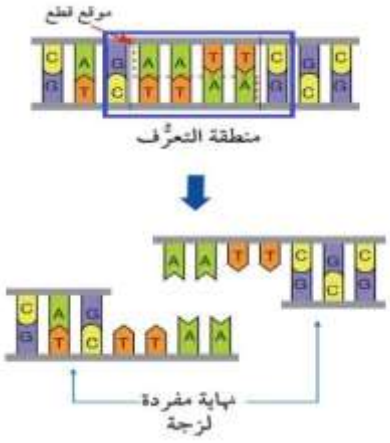
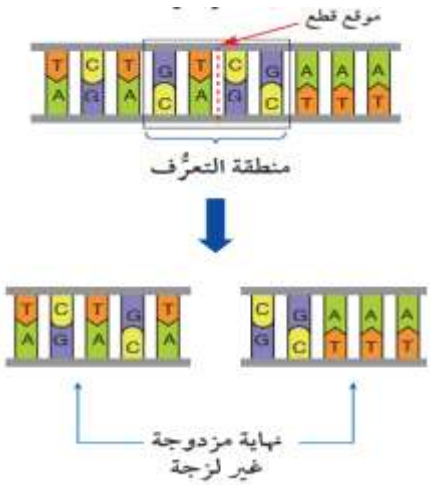
- **النهايات اللزجة :**

تتكون من سلسلة واحدة من النيوكليوتيدات تنتجها بعض انزيمات القطع المحدد وتكون في نهاية قطع ال. DNA

- **النهايات غير اللزجة :**

تتكون من سلسلتين من النيوكليوتيدات تنتجها بعض انزيمات القطع المحدد وتكون في نهاية قطع ال DNA .

- **قد تنتج من بعض انزيمات القطع المحدد قطع من ال DNA تتكون نهايتها من سلسلتين من النيوكليوتيدات وتسمى نهايات غير لزجة ويصعب التحامها بسلاسل أخرى مما يحد من استخدامها في التكنولوجيا الحيوية .**

وجه المقارنة	نهاية لزجة	نهاية غير لزجة
عدد السلاسل في النهايه	واحدة	سلسلتين
التحامها بسلاسل أخرى (سبب التسمية)	سهولة التحامها بسلاسل أخرى مكملة لها من قطعة DNA أخرى	صعوبة التحامها بسلاسل أخرى من قطعة DNA أخرى
الاستخدام في التكنولوجيا الحيوية	تستخدم على نطاق واسع	لا تستخدم (استخدام محدود)
الشكل		

- **مثال :**

أنزيم القطع المحدد ECOR I يتعرف منطقة التعرف بحيث أن تتابع النيوكليوتيدات في سلسلة الـ DNA من 5- إلى 3- هو نفسه تتابع النيوكليوتيدات في السلسلة المقابلة من 5- إلى 3- وهذا الانزيم يقطع سلسلة الـ DNA في مكان محدد بين القاعدة النيتروجينية G والقاعدة النيتروجينية المتتاليتين A .

- **مثال :**

انزيم قطع معين يقطع بين القاعدة النيتروجينية T,T المتتاليتين في منطقة التعرف الاتيةTTAA
اكتب القطع الناتجة من عمل هذا الانزيم .

- **ملاحظة :**

دائما عدد القطع الناتجة = عدد مرات القطع + 1
عدد النهايات اللزجة = عدد مرات القطع X 2

- **انزيم الربط :**

يستخدم انزيم الربط في التكنولوجيا الحيوية لانتاج جزيء DNA معاد تركيبه وذلك بربط سلسلتي DNA معاد تركيبه ولربطه بناقل جينات ينقل الجين المعزول الى الخلية المستهدفة وذلك بربط سلسلتي DNA معا عن طريق النهايات اللزجة وذلك بتكوين روابط فوسفاتية ثنائية الاستر بين نهايتي سلسلتي DNA مما يؤدي الى التحامها .

- **انزيم بلمرة DNAمتحمل الحرارة :**

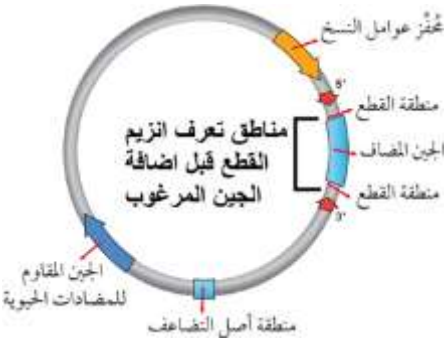
انزيم يستخدم في بلمرة DNA ويستخلص من نوع بكتيريا محبة للحرارة يعيش في الينابيع الحارة ويستخدم كانزيم اساسي في تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل PCR.

- **انزيم النسخ العكسي :**

يستخرج من الفيروسات ويعمل على نسخ قالب الحمض النووي الريبوزي RNA إلى نسخة من الحمض النووي DNA ، وهو باتجاه معاكس لما هو معتاد بانتقال المعلومات الوراثية ويعد هذا الانزيم مهما في تقنيات مقارنة التعبير الجيني مثل مصفوفة DNA الدقيقة من خلال عزل وانتاج جين معين .

ثانيا : نواقل الجينات :
يتم استخدام نواقل الجينات مثل (البلازميدات،الفيروسات اكلة البكتيريا، الجسيمات الدهنية) لنقل الجين المرغوب فيه الى الخلية الحية المستهدفة .

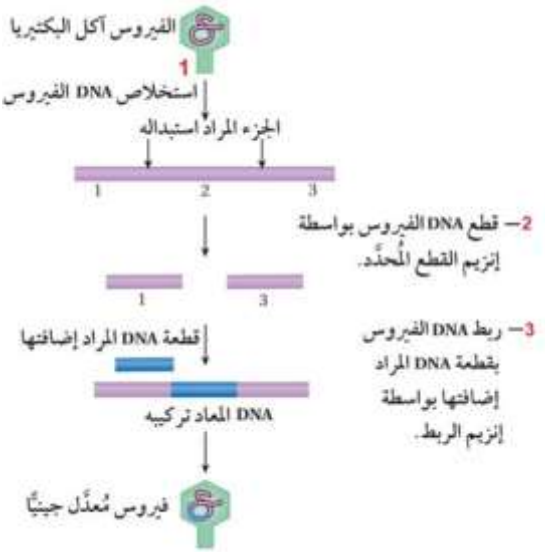
أ. البلازميد : هو DNA حلقي في سيتوبلازم البكتيريا قادر على التضاعف ذاتياً بصورة مستقلة ويحتوي على عدة مناطق:



- **منطقة (محفز عوامل النسخ)**
- **مناطق تعرف انزيمات القطع المحدد**
- **مناطق جينات مقاومة أنواع مختلفة من المضادات الحيوية : لتسهيل عزل البكتيريا المطلوبة .**
- **منطقة اصل التضاعف(ORI) : وهي تسمح بتضاعف البلازميد ذاتياً .**

ب. الفيروسات أكلة البكتيريا : تستخدم بعض الفيروسات اكلة البكتيريا كنواقل جينات عندما تكون قطع DNA المراد نقلها كبيرة الحجم بعد تعديل هذه الفيروسات جينياً باستخدام انزيمات القطع المحدد وانزيمات الربط .

- **خطوات التعديل الجيني لفيروس اكل البكتيريا**



ج. الجسيمات الدهنية : حويصلات كروية من الليبيدات المفسفرة تستعمل لنقل الأليلات السليمة او الادوية في المعالجة الجينية .

- **تقنيات التكنولوجيا الحيوية :**

أولا : تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل PCR :

هي عملية مضاعفة عينة صغيرة من ال DNA وتكرارها لانتاج ملايين النسخ خلال ساعات عدة باستخدام جهاز الدورية الحرارية (قام العالم كاري موليس بتطوير هذه التقنية)

- **المواد والادوات اللازمة لاتمام هذا التفاعل (PCR) :**
  1. **وجود عينة DNA المراد مضاعفتها**
  2. **انزيم بلمرة DNA متحمل للحرارة (يعمل في درجات حرارة مرتفعة)**
  3. **اعداد كبيرة من النيوكليوتيدات الأربعة (A,C,T,G) لاستخدامها في بناء السلاسل الجديدة**
  4. **سلاسل البدء : هي سلاسل مفردة من النيوكليوتيدات قد يصل عددها الى 20 نيوكليوتيد او اكثر**

- **ملاحظة :**

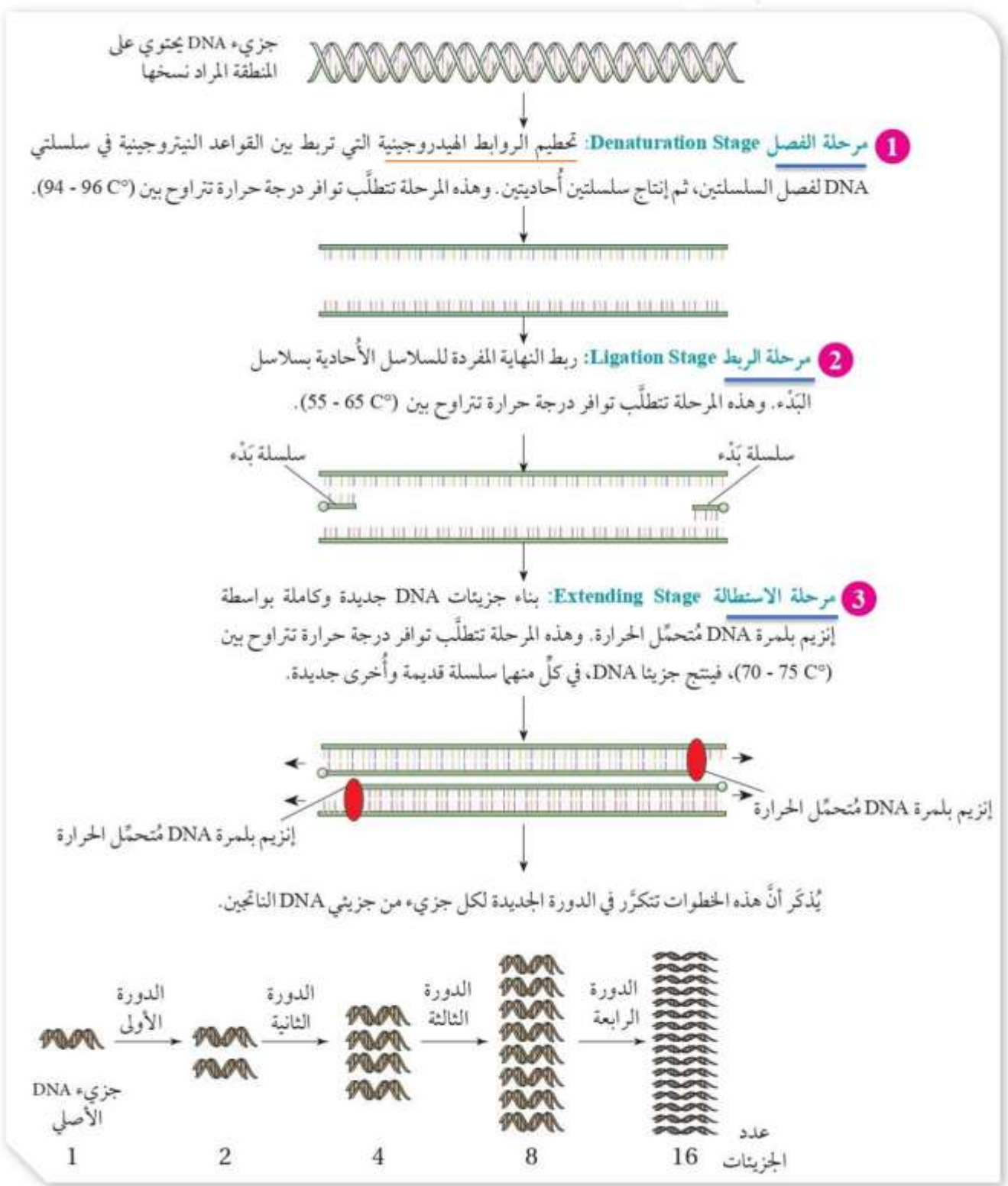
تصمم سلاسل البدء وفق تسلسلات محددة بحيث تكون متممة لتسلسل النيوكليوتيدات في بداية منطقة التضاعف وترتبط بها وتصبح بداية السلسلة المراد بناءها مزدوجة ليستطيع انزيم بلمرةDNA المتحمل للحرارة ببدء بناء السلسلة المكملة لان هذا الانزيم لا يستطيع العمل الا اذا كان تسلسل ال DNA مزدوج.

- **خطوات تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل :**

توجد 3 مراحل أساسية لتفاعل انزيم البلمرة المتسلسل في كل دورة من دورات التفاعل التي تتكرر عدة مرات وتعتمد كل مرحلة على درجة حرارة معينة :

1. **مرحلة الفصل : توافر درجة حرارة C 94 – 96**
2. **مرحلة الربط : توافر درجة حرارة 55 – 65 C**
3. **مرحلة الاستطالة : توافر درجة حرارة C 70 – 75**

- **الشكل المجاور يبين خطوات تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل :**



- **ملاحظة :**

عدد جزيئات DNA الناتجة من تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل يساوي $2^{س}$ حيث س عدد الدورات

- **سؤال :**

احسب عدد جزيئات ال DNA الناتجة بعد 5 دورات في جهاز الدورية الحرارية = 32 جزيء

- **سؤال :**

اذا نتج 1024 جزيء DNA من جهاز الدورية الحرارية فكم عدد الدورات التي حدثت في هذا الجهاز = 10

- **ثانيا : الفصل الكهربائي الهلامي :**

تقنية تستعمل لفصل جزيئات (قطع) DNA عن بعضها اعتماداً على شحنتها السالبة وعلى اختلاف اطوالها بأستخدام جهاز الفصل الكهربائي الهلامي الذي يحتوي محلول موصل للتيار الكهربائي .

- **خطوات الفصل الكهربائي الهلامي :**

1. **توضع قطع عينات DNA داخل ثقوب في المادة الهلامية .**
2. **يوصل التيار الكهربائي مدة مناسبة .**
3. **تتحرك قطع DNA بالاتجاه القطب الموجب(لأن شحنتها سالبة لاحتوائها مجموعة الفوسفات السالبة)**
4. **يتم فصل التيار الكهربائي ورفع المادة الهلامية بما تحتويه من قطع .**
5. **توضع المادة الهلامية في محلول يحتوي صبغة خاصة بال DNA .**
6. **تنقل المادة الهلامية الى جهاز التصوير (باستخدام الاشعة فوق البنفسجية (UV)) فتظهر خطوط تمثل قطع DNA على مسافات مختلفة من القطب السالب تبعاً لطول القطعة .**

- **ملاحظة :**

تتناسب المسافة المقطوعة من القطب السالب باتجاه القطب الموجب مع طول القطعة تناسب عكسي (كلما قل طول قطعة DNA زادت المسافة المقطوعة بأتجاه القطب الموجب) .

- **خرائط قطع :**

مجموعة الخطوط الظاهرة في جهاز التصوير باستخدام اشعة فوق بنفسجية والتي تمثل قطع ال DNA على مسافات مختلفة بعد فصلها بجهاز الفصل الكهربائي الهلامي وتستخدم الخرائط في هندسة الجينات ودراسة الطفرات، والتمييز بين الافراد(البصمة الوراثية) .

- **سؤال :**

تمثل الأرقام من 1 الى 7 نتائج الفصل الكهربائي الهلامي لعدد من قطع الـ DNA :

أنسب كل قطعة DNA إلى الرمز الذي يمثلها على الشريط من (أ الى ز) :

1- GCGAATGCGTCCAAC

2- GCGAATTGCGTCC

3- GCAATGCGTCCACAACGC

4- GCGAATGCGTCCAC

5- GCGAATGCGTC

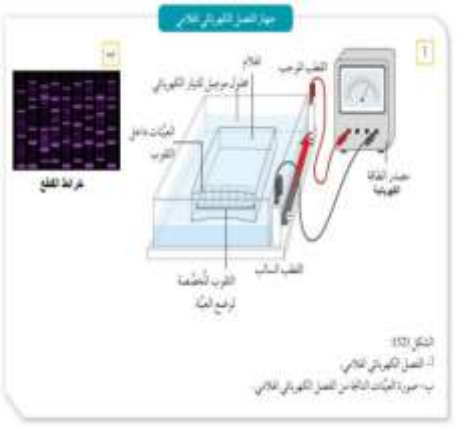
6- GCGAATGC

7- GCGAATGCGTCCACAACGTAC

- **ملاحظة :**

دائما القطعة الأقرب للقطب الموجب (الابعد عن القطب السالب)هي اصغر قطعة : اقصر قطعة

دائما القطعة الابعد عن القطب الموجب(الأقرب الى القطب السالب) هي اكبر قطعة : أطول قطعة



- **ثالثا : تحديد تسلسل الحمض النووي تحديد تسلسل الحمض النووي DNA : هي عملية تحديد وقراءة تسلسل النيوكليوتيدات الكاملة المكونة لجزيء الحمض النووي DNA وتطورت هذه التقنية على عدة مراحل (اجيال) مع مرور الوقت بحيث تعطي كل تقنيةاحدث نتائج اسرع وتكلفة اقل .**

- **هناك ثلاثة تقنيات (اجيال) استخدمت اليا لتحديد تسلسل DNA وهي :**

1. التقنية الاولى (الجيل الاول)

تسمى تسلسل سانجر وطورت في السبعينات من القرن العشرين من قبل العالم فريدريك سانجر والذي حصل على جائزة نوبل عام 1980 .

2. التقنية الثانية (الجيل الثاني)

استخدمت في حال كان حجم جزيء DNA كبيرا بالخطوات الاتية :

- **تقطيع جزيء DNA بصورة عشوائية الى قطع صغيرة باستخدام انزيمات القطع المحدد .**
- **تحديد تسلسل النيوكليوتيدات لكل قطعة على حدة باستخدام جهاز قراءة تسلسل النيوكليوتيدات .**
- **ثم يتم ترتيب القطع وفقا لمناطق التداخل (مناطق التشابه بين نهاية قطعة وبداية قطعة اخرى) باستخدام حواسيب ضخمة مزودة ببرمجيات خاصة كما يوضح الشكل الاتي : كتاب الطالب ص 176**

- **تساعد الاجهزة الالكترونية الحديثة مثل جهاز قراءة تسلسل النيوكليوتيدات في الشكل المجاور على تحديد تسلسل الالاف أو مئات الالاف من القطع كل منها بطول حوالي 300 نيوكليوتيد وتسهم اجهزة الحاسوب في تحديد اي من النيوكليوتيدات الاربعة A / G / C / T اضيف كل مرة مما يمثل معدلا عاليا من تسلسل النيوكليوتيدات في الساعة ويحلل تسلسل المجموعة الكاملة من القطع باستخدام برنامج حاسوبي يربطها معا في تسلسل كامل حسب مناطق التداخل المذكورة سابقا .**

- **في الكثير من الاحيان تستخدم تقنيات تسلسل الجيل الثاني وتستبدل بها في بعض الحالات تقنيات تسلسل الجيل الثالث .**

3. التقنية الثالثة (الجيل الثالث)

وهذ التقنية جديدة لا يتم فيها قطع جزيء DNA او تكثيره بل يقرا تسلسل سلسلة واحدة طويلة جدا من DNA عن طريق تمريرها عبر غشاء يحوي مسامات دقيقة جدا (مسامات النانو) يمر خلاله تيار كهربائي مما يسمح بتحديد القواعد النيتروجينية واحدة تلو الاخرى باستخدام ميزة فصل التيار الكهربائي مدة زمنية مختلفة عن باقي انواع القواعد الاخرى يحددها جهاز الحاسوب .

- **من المواد والادوات التي اسهمت في معرفة تسلسل النيوكليوتيدات في الحمض النووي DNA هي : (اتحقق ص 177)**

1. انزيمات القطع المحدد
2. انزيم بلمرة DNA متحمل للحرارة
3. جهاز قراءة تسلسل النيوكليوتيدات
4. غشاء يحوي مسامات نانوية دقيقة جدا يمر من خلاله تيار كهربائي
5. حواسيب ضخمة مزودة ببرمجيات خاصة .