المحاضرة 1

تعليمات حول طبيعة العمل في مجال التقانات الاحيائية

1- يجب ارتداء الصدرية في المختبر
2- يجب ان يكون المكان المخصص لكل طالب اومجموعة نظيفا ومعقما قبل وبعد العمل في المختبر
3- عدم لمس العيون والانف وعدم تناول الطعام والمشروبات داخل المختبر
4- يجب ان تكون جميع الادوات المستخدمة لاخذ النماذج او التي تتطلبها التجارب المختبرية نظيفة ومعقمة
5- يجب ان يكون لدى كل طالب قلم واشرطة Marker لتدوين المعلومات المطلوبة في كل تجربة
6- لتوخي الدقة في دراسة الاحياء المجهرية سواء طرائق العد او العزل او اية دراسة تتعلق بهذا الموضوع يجب ان يكون العمل في ظروف معقمة من اخذ النماذج والادوات المستخدمة وفي جميع مراحل تنفيذ التجارب المختبرية
7- يجب ان يكون اسنخدام المواد لتنفيذ التجارب المختبرية حسب القدر المحدد والحرص على تقنين المطلوب وعدم هدر المواد لان ذلك يعد احد المؤشرات على دقة الطالب في ادائه
8- المحافظة على الاجهزة والحرص في استخدامها السليم ويجب الاستفسار من المشرف حول كيفية استخدام اي جهاز , ويجب فصل التيار الكهربائي عن الاجهزة بعد الانتهاء من العمل وتنظيفها
9- الحذر من التلوث في اثناء العمل ولاسيما عند دراسة نمو احياء مجهرية معزولة لأنها غير مشخصة ويحتمل ان تمون منها عزلات مرضية
10- يجب وضع الادوات التي استخدمت في الاماكن التي يحددها المشرف على سبيل المثال عدم وضع الماصات بعد استخدامها على الطاولة وانما يجب وضعها في اسطوانات خاصة حاوية على سائل مطهر

التقانة الحيوية Biotechnology :وهي استخدام تطبيقات التقنية الحديثة في معالجة الكائنات الحية وتعني التعامل مع الكائنات الحية على المستوى الخلوي وتحت الخلوي من اجل تحقيق اقصى استفادة منها صناعياً وزراعياً وبالتالي اقتصادياً وذلك عن طريق تحسين خواصها وصفاتها الوراثية وهنا يكون التركيز على دراسة الجانب الجيني للكائن وعلى طرق وتقنيات نقل الجينات من كائن لأخر لتعديل صفة ما او تحسين عيب.

تطبيقات التكنولوجيا الحيوية :

1- الانسان:

العلاج الجيني Gene therapy اي معالجة الامراض الوراثية في البشر باستخدام التكنولوجيا الحيوية في نقل وتعديل الجينات المعطوبة, بالاضافة الى امكانية زرع اعضاء جديدة باستخدام المحتوى الوراثي لخلية المريض بدلا من ان ينقل له عضو من متبرع او ميت. انتاج ادوية خاصة بالمحتوى الجيني للفرد (علم الصيدلة الجيني) Pharmacogenomics , والتعامل في قضايا اثبات النسب وفي الطب الشرعي وفي الجانب الجنائي للكشف عن هوية المجرم عن طريق البصمة الوراثية بالاضافة الى فحوصلت ماقبل الزواج لمعرفة احتمالية الاصابة بالامراض في الاجيال القادمة

2- الكائنات الدقيقة Microorganism

تستخدم الكائنات الدقيقة خاصة البكتريا والفيروسات على نطاق واسع في التكنولوجيا الحيوية مثل: استخدام البروتينات كالانسولين البشري, استخدام البكتريا في انتاج الاسمدة الحيوية bio fertilizers بدلاً من استخدام الاسمدة الكيميائية , تنقية المياه من الملوثات, التخلص من المخلفات العضوية, تصنيع المركبات الكيميائية المستخدمة في العقاقير , واستخدام الكائن الدقيق كناقل لبعض الجينات التي تحمل الصفات المرغوبة.

3- النباتات :

فتحت التكنولوجيا الحديثة افاقاً واسعة جداً في الانتاج النباتي من خلال

1- امكانية نقل جينات بعض الصفات المرغوبة مثل تحمل درجة الحرارة ونقص المياه من نباتات صحراوية الى نباتات اخرى
2- التحكم في احجام واشكال الثمار والنباتات بشكل عام وتغيير اللون والشكل حسب الرغبة
3- امكانية رفع القيمة الغذائية لمحصول ما باضافة بعض الصفات الوراثية من محاصيل اخرى
4- مضاعفة كميات المحاصيل الناتجة واختزال الوقت اللازم للنمو وبالتالي المساعدة على القضاء على المجاعات وارتفاع اسعار الغذاء
5- انتاج الوقود الحيوي

فروع التكنولوجيا الحيوية

1- التكنولوجيا الحيوية الحمراء Red Biotechnology

وهي التقانة الحيوية في المجال الطبي مثل انتاج المضادات الحيوية من الكائنات الحية واستخدام الهندسة الوراثية لمعالجة الامراض وانتاج ادوية خاصة بالمحتوى الجيني لفرد ما

2- التكنولوجيا الحيوية الخضراء Green Biotechnology

وهي التقانة الحيوية في المجال الزراعي مثل انتاج النباتات المعدلة وراثياً ذات الفوائد العديدة , الاسمدة الحيوية, والمبيدات الحشرية غير الكيميائية

3- التكنولوجيا الحيوية البيضاء White Biotechnology

من اكثر المجالات انتشارا وقد ادخلت العديد من التعديلات على على صناعات قديمة كالورق والبلاستك وهي التقانة المستخدمة في المجال الصناعي مثل استخدام كائنات حية لانتاج مواد كيميائية مطلوبة للاستخدام التجاري حيوياً بدل من انتاجها صناعياً وتشمل ايضاً التصنيع الدوائي وانتاج الفيتامينات والمعالجة الخاصة للانسجة والجلود وانتاج البلاستك القابل للتحلل العضوي

4- التكنولوجيا الحيوية الزرقاء Blue Biotechnology

وهي التقانة الحيوية التي تتعامل مع الكائنات البحرية

طرق عزل وتنمية الاحياء المجهرية:

ان الهدف الاساس من استخدام الطرائق الحديثة في العزل والتنمية هو استغلال الوقت وتقليل الجهد والكلفة الاقتصادية من حيث ادوات ومعدات الوسط ومن هذه الطرائق :

1- زراعة المستعمرات بطريقة استنساخ الاطباق Replica plating technique

ان لهذه الطريقة اكثر من هدف الا انه الهدف الاساسي من استخدامها عزل وتشخيص الطفرات Identifying mutants اذ تستخدم في عزل طفرات العوز الغذائي للكائنات غير ذاتية التغذية Auxotrophs التي تكون غير قادرة على تصنيع بعض المواد الاساسية لنموها كبعض الفيتامينات والاحماض الامينية وتحتاج الى عوامل النمو لذلك يجب ان تضاف هذه المواد الاساسية الى الوسط الغذائي لتنمو الخلايا وتكون هذه عكس الكائنات ذاتية التغذية Protrophs التي تستطيع ان تصنع المتطلبات الضرورية لنموها اذ تستطيع هذه النمو في الاوساط الدنيا Minimal media والتي تحتوي على مصدر كاربون وطاقة مثل الكلوكوز ومصدر لاعضوي للنيتروجين والاملاح اما Auxotrophs فلا تنمو في هذا الوسط لانها تحتاج الى عوامل النمو مثل الحوامض الامينية والفيتامينات.
يحتوي المجتمع الخلوي Cell population على عدد كبير من الخلايا من ضمنها الخلايا التي حصلت فيها طفرات بسبب تعرضها لعوامل فيزيائية او كيميائية , تزرع في وسط غذائي كامل Complete medium لتشكل الطبق الرئيس Master plates اذ يحتوي على اغلب المتطلبات الضرورية للكائن المجهري كما تستخدم هذه الطريقة عندما يراد نقل عدد كبير من المستعمرات من وسط غذائي صلب الى اخر وتتم على النحو التالي :

1- يوخذ Block له نفس قطر الطبق المراد نقل المستعمرات اليه ويعقم بالكحول بواسطة قطعة من القطن ويغطى بطبقة من قماش القديفة المعقمة Sterile velvet cloth الحاوية على شعيرات صغيرة ويثبت القماش باستخدام حلقة معدنية
2- يعلم كل من الطبق المراد طبعه والاخر الذي سيستلم الطبعة
3- يرفع الطبق الاول المراد طبعه الذي يطلق عليه Master plate
4- تطبع المستعمرات على الاطباق الاخرى التي يمكن ان تصل 8-10 اطباق والتي يطلق عليها Replica plates
5- توضع الاطباق في الحاضنة تحت 35-37° م لمدة 24-48 ساعة
6- يشترط في الاطباق المراد طبعها ان تكون :
   1- حاوية على اعداد قليلة من المستعمرات اي تكون غير مزدحمة
   2- ان تكون المستعمرات صغيرة حتى لاتختلط مع بعضها

3- يمكن ملاحظة مواقع المستعمرات التي تنشأ بعد مدة الحضن في الطبق المستنسخ Replica plate متطابقة مع تلك التي في الطبق الرئيس Master plate

2- زرع الاحياء المجهرية على شرائح زجاجية Slide culture

تستخدم هذه الطريقة لتنمية الاعفان لتظهر بشكل واضح مع متابعة حوامل النمو دون تعريض اجزاء العفن الى عملية تكسير ةتتلخص بالاتي :

1- تؤخذ شرائح زجاجية Slides وتوضع في اطباق Petridish حاوية على قطعة زجاجية Glass rod على شكل حرف V
2- تعقم الشريحة وهي داخل الطبق باستخدام Autoclave
3- يصب حوالي 2 مل من الوسط الغذائي المراد تنمية الاحياء المجهرية عليه ويترك ليتصلب داخل الطبق
4- تزرع الاحياء المجهرية على الوسط الغذائي ويوضع عليها Cover slide ثم يعاد تغطية الطبق
5- يوضع الطبق في الحاضنة عند درجة الحرارة والوقت المناسبين لنمو الكائن المجهري
6- تفحص الشريحة بالعدسة الصغرى ثم الكبرى لملاحظة تركيب الكائن المجهري

3- عزل البكتريا المكونة للسبورات Isolation of spore forming bacteria

توجد هذه البكتريا في مصادر مختلفة وتكون الابواغ Spores عندما تصبح الظروف غير ملائمة لنمو وانقسام الخلايا الخضرية مثل ارتفاع وانخفاض درجات الحرارة او نقص المواد الغذائية وتقسم البكتريا حسب حاجتها للأوكسجين الى هوائية مثل جنس *Bacillus* ولاهوائية مثل جنس *Clostridium*

عزل البكتريا الهوائية المكونة للسبورات :

1- تؤخذ نماذج من مصادر مختلفة (تربة-حليب ومنتجاته- فاكهه- لحوم ....الخ)
2- يوزن 1 غم من كل نموذج ويضاف الى انابيب اختبار حاوية علة 9 سم^3 من الماء المقطر المعقم او محلول البيتون المعقم وبذلك يتم الحصول على تخفيف 1:10 ثم تعمل التخافيف التالية : 1:100 و1:1000 (مكررين لكل تخفيف)

3- توضع انابيب التخافيف في حمام مائي بدرجة 80º م لمدة 20 دقيقة لقتل الخلايا الخضرية غير المكونة للسبورات وضمان الحصول على السبورات التي تستطيع البقاء حية عند هذه الدرجة صمن تلك المدة
4- تنقل كمية 0.1 -1 سم3 من كل انبوب الى طبق زجاجي معقم ثم يصب وسط غذائي عام ملائم لنمو البكتريا درجة حرارته تتراوح مابين 45-50º م تخلط العينة مع الوسط بتحريك محتويات الطبق افقياً باتجاه وعكس اتجاه عقارب الساعه مباشرةً بعد صب الوسط ثم يترك ليتصلب
5- تحضن الاطباق في الحاضنة تحت درجة حرارة 30º م لمدة اسبوع واحد
6- تلاحظ المستعمرات وتعد ثم تعمل مسحة منها وتصبغ بصبغة السبورات او صبغة كرام ثم تلاحظ الخلايا المكونة للسبورات وموقع السبور من الخلية قد يكون طرفيTerminal او شبه طرفي Semiterminal او مركزي Central

4- عزل الخمائر Isolation of yeasts

تتكاثر الخمائر لاجنسيا بالتبرعم او الانشطار او جنسيا بواسط سبورات جنسية ومن الاجناس الشائعة Saccharomyces وCandida وRodotorula
تتلخص طريقة عزل الخمائر بالاتي :

1- تؤخذ نماذج من مصادر مختلفة ويوزن 1غم منها ويوضع في انبوب اختبار حاوٍ على 9سم3 من ماء مقطر معقم او ماء البيتون المعقم وتعمل تخافيف وصولاً الى التخفيف الثالث وحسب توجيهات المشرف على المختبر
2- ينقل 0.1 سم3 من كل تخفيف الى طبق زجاجي معقم (مكررين لكل تخفيف)
3- يصب الوسط الخاص بالخمائر (P.D.A.) ويمزج مع العينة ويترك ليتصلب
4- تحضن الاطباق تحت درجة 25º م لمدة اسبوع
5- تفحص مستعمرات الخمائر (مسطحة- معتمة-ذات الوان بيجي مائل الى البياض او وردي او برتقالي)
6- الفحص المجهري يتم بوضع قطرة من الماء على سلايد نظيف وينقل جزء من احدى المستعمرات وينشر مع القطرة وتترك الشريحة لتجف بدرجة حرارة الغرفة ثم تصبغ بصبغة ازرق المثلين لمدة دقيقة واحدة ثم تغسل بالماء ثم تترك لتجف وتفحص مع ملاحظة اشكالها وتكون البراعم

ملحق خاص ببعض الأوساط الزرعية

فيما يأتي عدد من الأوساط الزرعية ومكوناتها التي تستخدم في تنمية وعزل كثير من الاحياء المجهرية التي لها علاقة بالتقانات الاحيائية . ان طريقة تحضير الاوساط الزرعية عادة تكون بخلط مكوناتها الاولية في لتر من الماء المقطر ثم تسخن مع التحريك المستمر لغاية الذوبان والغليان ثم تعقم بجهاز الاوتوكليف لمدة 15 دقيقة على درجة حرارة 121º م

وضغط جوي 15 باوند/ انج^2 ثم يبرد لدرجة حرارة 40-45º م ثم يصب في اطباق بتري . عادة تتوفر في الاسواق العالمية اوساط زرعية جاهزة للاستخدام بعد اضافة لتر ماء على الكمية المعينة وحسب التعليمات الملصقة على علب تلك الاوساط ثم تعقم كما ذكر اعلاه.

1- وسط الثايوكلايكوليت Thioglycolate

مستخلص الخميرة Yeast extract	2غم
مستخلص اللحم Meat extract	1غم
كلوريد الصوديوم NaCl	5غم
Glucose Na-thioglycolate	1غم
ببتون Peptone	5غم
ماء مقطر D.W.	1 لتر
pH = 6.5	

2- وسط Clostridium medium

ببتون Peptone	10غم
مستخلص الخميرة Yeast extract	3غم
كلوكوز Glucose	5غم
مستخلص اللحم Meat extract	10غم
سستين Cystein	0.5 غم
نشأ Starch	1غم
خلات الصوديوم Na- acetate	5غم
ماء مقطر D.W.	1 لتر

3- وسط Glucose nitrate salt agar

كلوكوز Glucose	10غم
نترات الصوديوم NaNO3	10غم
فوسفات البوتاسيوم K2PO4	10غم
كلوريد البوتاسيوم KCl	10غم
كبريتات المغنيسيوم المائية MgSO4.7H2O	10غم
اكر Agar	15غم

4- وسط Davis yeast salt broth

Ammonium nitrate	1غم
Ammonium sulphate	1غم
Sodium mono hydrogen phosphate anhydrous	4غم

Potassium dihydrogen phosphate	2غم
Sodium chloride	1غم
Glucose	10غم
Yeast extract	1غم
D.W.	1 لتر

5- وسط Czapek-Dox Agar

نترات الصوديوم NaNO3	2غم
سلفات المغنيسيوم المائية MgSO4.7H2O	0.5 غم
ثنائي فوسفات البوتاسيوم K2HPO4	1غم
سلفات الحديد المائية FeSO4.7H2O	0.01غم
كلوريد الكالسيوم KCl	0.1غم
نشا Starch (soluble)	20غم
اكر Agar	10غم
ماء مقطر D.W.	1 لتر
pH= 7	

6- وسط بريستول Bristol s medium

نترات الصوديوم NaNO3	0.5غم
ثنائي فوسفات البوتاسيوم K2HPO4	0.5غم
كلوريد الصوديوم NaCl	0.5 غم
سلفات المغنيسيوم المائية MgSO4.7H2O	0.05 غم
FeCl3.6H2O	0.01غم
CaCl2.7H2O	0.05 غم
D.W.	1 لتر
pH = 7	

ملحق خاص ببعض المحاليل والصبغات :

1- محلول صبغة المثلين الازرق المستخدم في طريقة العد المباشر للاحياء المجهرية
يضاف 6 غم من كلوريد المثلين الازرق الى 52 مل من كحول الايثانول 95% و44 مل من محلول رابع كلوريد الايثان في دورق سعة 200 مل ويمزج لحين الاذابة ويترك لمدة 12-24 ساعة بدرجة حرارة 40-45º م ثم يضاف 4 مل من حامض الخليك

الثلجي, يرشح المحلول بورق ترشيح نوع What man No.42 ثم يحفظ في قنانٍ محكمة الغلق.

2- صبغة اليود Gram's Iodine
يؤخذ 1غم من بلورات اليود و2 غم من ايوديد البوتاسيوم وتذاب في 300 مل من الماء المقطر ويضاف لها 3غم من بيكاربونات الصوديوم.

3- صبغة المثلين الازرق
يحضر محلول كحولي مشبع والمتكون من اذابة 1.48 غم من الصبغة في 100 مل من كحول الايثانول ويضاف اليه 600 مل من هيدروكسيد البوتاسيوم بتركيز 0.01% ويكمل الحجم الى 2000مل , يمزج ويرشح.

4- صبغة Crystal violet
يؤخذ حجم واحد من محلول الصبغة (وهو محلول كحولي مشبع والمتكون من اذابة 20 غم من الصبغة في 100 مل من كحول الايثانول) مع اربع حجوم من محلول اوكزالات الامونيوم 1% , يترك محلول الاوكزالات مدة 24 ساعة او يسخن بهدوء لحين الاذابة ثم يمزج مع محلول الصبغة ثم يرشح.

المحاضرة 3

تقدير الكتلة الحيوية Estimation of Biomass

الكتلة الحيوية Biomass : مصطلح عام يشمل انتاج الخلايا الحية بجميع اشكالها او الكائنات الحية عامة مثل انتاج الكتلة الحيوية النباتية او الحيوانية وبروتين الخلية الواحدة Singl cell protein (SCP) وهو حالة خاصة من الكتلة الحيوية التي تكون الاحياء فيها من خلايا مفردة وتكون المادة الغالبة على تكوين الخلايا المفردة هي المواد البروتينية.

في الاحياء المجهرية يشير هذا المصطلح الى الاحياء المجهرية الموجودة في مزرعة معينة Organisms in culture ويقابل هذا الخلايا, ويستخدم هذا القياس لتحديد المدى

الذي يحصل فيه النمو Growth yield وتمتاز الاحياء المجهرية بكفائتها العالية في تحويل المواد الاولية الى بروتين وتكون بطبيعة الحال افضل من حيوانات الحقل.

اختيار الاحياء:
ان انتاج بروتين الخلية الواحدة هي الحالة الخاصة التي تحتاج الى بعض الاسس للاختيار اما الكتل المنتجة من النباتات فتكون حالات اخرى, ومن الاسس العامة للاختيار:

1- ان تكون السلالة المنتجة ذات معدل نمو عالٍ اي لها وقت جيل قصير.
2- تستطيع الاحياء المنتجة استخدام المواد الاولية المتوفرة سواء كانت مصادر كاربونية او نيتروجينية او مكونات اخرى.
3- يجب ان تكون الاحياء متحملة لمدى واسع من درجات الحرارة والارقام الهيدروجينية.
4- يجب ان تكون من النوع الذي لايتأثر بظروف التهوية والتقليب.
5- يجب ان تكون ذات طبيعة ملائمة من النمو من حيث المظهر الخارجي في المخمرات.
6- يجب ان تكون غير مرضية وولاتنتج سموماً.
7- يجب ان تكون الكتلة الناتجة منها سهلة الفصل والتحضير.
8- يجب ان يكون تركيب الخلية ملائما من حيث كمية البروتينات والاحماض النووية ولاسيما RNA حيث تفضل الانواع التي يكون محتواها من الحوامض النووية قليل.

استعمالات الكتلة الحيوية:
تستعمل الكتلة الحيوية ولاسيما الميكروبية لاغراض متعددة:

1- مصدر للبروتين في تغذية الانسان والحيوان وفي هذه الحالة يجب ان تكون هذه المواد البروتينية منافسة لمصادر البروتينات الحيوانية والنباتية التجارية من ناحية الاسعار والقيمة الغذائية وامينة للاستعمال المباشر.
2- تستعمل لقاحات لبعض العمليات او تضاف لتقوم ببعض العمليات مثل:
   1- مبيدات حيوية
   2- تستعمل في معاملة الفضلات
   3- تستعمل في التعدين
   4- تستعمل في تحضير المواد الغذائية المتخمرة مثل انتاج اللحوم المخمرة وخميرة الخبز ويجب ان تكون الاحياء في هذه الحالة ذات فعالية حيوية عالية وجيدة ولها مدى طويل من الصلاحية.

الطرق المستخدمة لقياس الكتلة الحيوية :
1- طريقة الوزن الجاف Dry weight (Dry mass)

تعتمد هذه الطريقة على عدة خطوات وهي:

أ- الفصل: اي فصل الكتلة الحيوية وتتم هذه العملية باستخدام مرشح ميكروبي خاص Microbiological filter ذي خصائص تختلف عن خصائص ورق الترشيح الاعتيادي اذ يكون حجم فتحاته يتراوح بين 0.22-0.47 مايكرومتر اي ان كل ما موجود في الوسط من مواد ذائبة بحجم اقل من هذه الفتحات سوف تنزل وتبقى الاحياء المجهرية على ورقة الترشيح ويتم فصل الخلايا بواسطة ضغط مخلخل.

ب- الغسل Washing : يتم اجراء عملية الغسل باستخدام محاليل متعادلة Isotonic solution (ذات ضغط اوزموزي مقارب للضغط الاوزموزي داخل الخلايا) لأنه عند استخدام محاليل Hypertonic سوف يحدث انكماش للخلية وعند استخدام محاليل Hypotonic سوف يحدث انفجار للخلية, تستخدم عملية الغسل للتخلص من دقائق الوسط الغذائي ولكي لاتؤثر في وزن الكتلة الحيوية فيما بعد وفي دقة القياس.

ج- التجفيف: يتم اجراء التجفيف لورقة الترشيح والكتلة الحيوية باستخدام درجة حرارة 50-60º م / 24 ساعة او 105º م / 2 ساعة ثم يتم وزن الورقة بعد التجفيف والفرق بين الوزنين يمثل الكتلة الحيوية.

2- طريقة الوزن الرطب Wet weirght (Wet mass):
تعتمد هذه الطريقة الخطوات السابقة ذاتها لتقدير الوزن الجاف باستثناء خطوة التجفيف اذ تبقى ورقة الترشيح رطبة في هذه الطريقة اي تكون حاوية على الماء والماء المحيط بالخلايا Extaecellular والماء الداخلي Entracellular والماء البيني الموجود بين الخلايا , وجد في احدى الدراسات ان حجم الماء البيني يشكل 10-20% من الحجم الكلي للخلايا والكتلة الجافة تشكل 25% من الكتلة الرطبة.

3- كتلة مكونات الخلية Mass of cell component :
وهي تشكل نسبة ثابة من الكتلة الحيوية مثل الـ DNA الذي يقدر بقياس سكر deoxyribose الموجود فيه او قياس النيتروجين او البروتين الموجودين داخل الخلايا واللذين يقدران اما باستخدام طريقة Kieldal وLowry وBiuret .

4- قياس العكارة Turbidity :
تعتمد على قياس الامتصاص الضوئي وتكون العلاقة طردية بين الاعداد الميكروبية والامتصاص الضوئي ولاتميز هذه الطريقة بين الخلايا الحية والميتة. تعبر درجه التعكير عن الكتلة أكثر من تعبيرها عن عدد الخلايا حيث أن عند نمو الخلايا البكتيرية في وسط غذائي سائل يزداد عددها مما ينشأ عنه تعكير لهذا الوسط نتيجه لقلة كثافة الاشعة الضوئية

النافذه خلال نمو المزرعه . عاده يستخدم جهاز Spectrophootometr or Colorimeter لهذا الغرض مع مراعاة اختيار الطول الموجي المناسب بحيث اذا كانت البيئة عديمة اللون يستخدم الطول الموجي 240 nm اما في حالة البيئات الصفراء يستخدم الطول الموجي 600 nm و يطلق على القراءه التي تسجلها المزرعة البكتيرية OD (Optical Density)

5- حساب الاعداد Cell count :

هناك عدة طرق لحساب الاعداد منها:

أ- قياس الاعداد الحية Viable count اذ تستخدم طريقة Standard plate count (SPC) التي تعتمد على اساس ان كل خلية حية Viable cell عند نموها على وسط غذائي سائل او صلب تعطي مستعمرة واحدة وتقاس Colony forming unit (CFU)

ب- قياس الاعداد الكلية Total count:

تستخدم طريقة العد المجهري المباشر Direct microscopic count (DMC) وهذه الطريقة تعد الخلايا الحية والميتة, اذ يؤخذ عدد الحقول المجهرية ويتم حساب عدد الخلايا الموجودة في كل حقل ثم يؤخذ معدل الاحياء في الحقول المقابلة

عدد الخلايا المجهرية/مل = 100×n× MF

n= عدد خلايا الاحياء المحسوبة

Microscopic factor = MF /100 نق^2 ×Δ

نق^2= نصف قطر الحقل المجهري

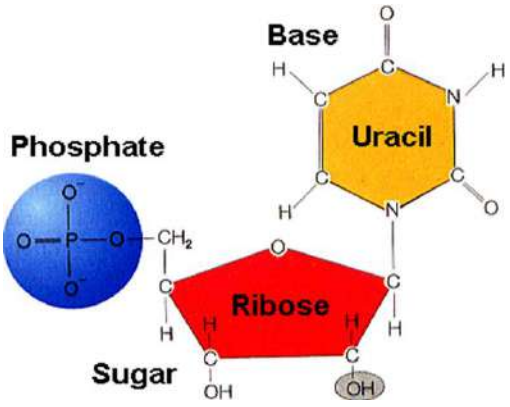
المحاضرة 4

تقنية الـ Polymerase Chain Reaction P.C.R.

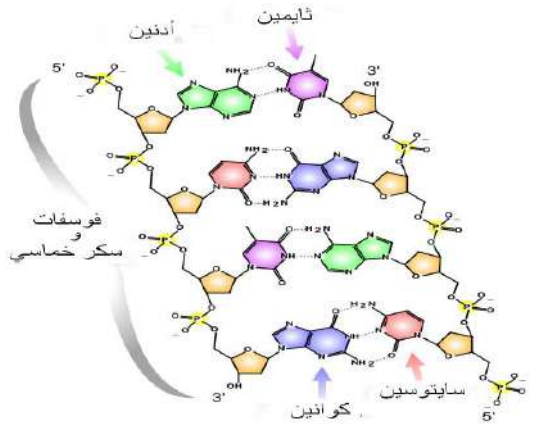
تفاعل البوليمريز التتابعي (المتسلسل)

DNA(DeoxyriboNucleic Acid) هو الحمض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين ويعتبر المادة الوراثية للغالبية العظمى من الكائنات الحية ,تتكون مادة الـ DNA من اربع انواع من القواعد النيتروجينية Nitrogen bases وهي الادنين Adenine والكوانين Guanine والسايتوسين Cytosine والثايمين Thymineوسكررايبوزي خماسي منقوص الاوكسجين

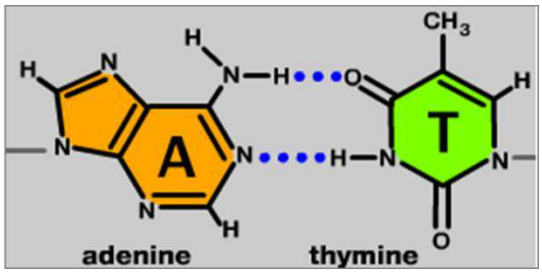
وحامض الفوسفوريك ترتبط مع بعضها باواصر فوسفاتية لتشكل سلسلة طويلة جدا تقدر بالبلايين في اعدادها. تزدوج هذه السلسلة مع سلسلة نظيرة لها بنفس الطول ولها نفس القواعد النيتروجينية الاربع ويكون هذا الازدواج باواصر هيدروجينية اذ يرتبط الادنين في احداهما مع الثايمين في الاخرى باصرة هيدروجينية ثنائية والسايتوسين مع الكوانين باصرة هيدروجينية ثلاثية. وهذه السلسلةالمزدوجة تشكل وحدات اكبر تدعى Genes المورثات التي تتكون الواحده منها من عشرات او مئات القواعد النيتروجينية وهي التي تعطي الصفات الوراثية للكائنات الحية. ولأن الـ DNA هو المسؤول عن توارث الصفات في الكائنات الحية فكل كائن حي له تسلسلات خاصة به من القواعد النيتروجينية يمكن اذا تم التعرف عليها وعلى ترتيبها ان تكشف عن نوع هذا الكائن أوسلالته .

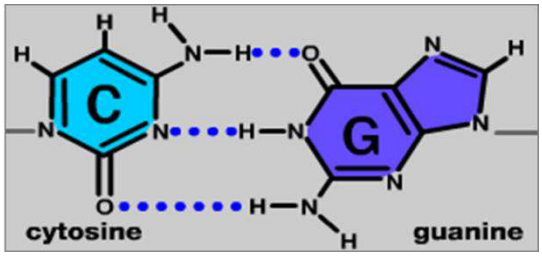


التركيب الاساسي للأحماض النووية (RNA)



التركيب النهائي للـ DNA





ماهو الـ P.C.R.

هو تقنية مختبريه تم اكتشافها عام 1983م تقريباً تقوم على أساس تصنيع نسخ عديدة من قطع الحمض النووي (DNA)خارج النظام الحيوي في المختبر (in vitro) . و لذلك فهي تقنية حيوية لاستنساخ قطعة محددة من الحمض النووي ومضاعفة إنتاجها لكي يتسنى إجراء اختبارات و فحوصات إضافية عليه.

تقوم الخلية بمضاعفة كمية الحمض النووي وقت انقسام الخلية بشكل تلقائي و بشكل سريع مع وجود نظام تصحيح للأخطاء خلال النسخ. . و تبلغ سرعة النسخ والمضاعفة إلى 1000 قاعدة نيتروجينية بالثانية (داخل النظام الحيوي) و هي كما ذكرنا تحدث في الخلية في وقت التكاثر والانقسام فقط . ومع التطور في مجال التكنولوجيا الحيوية والذي يقوم على التعامل مع الحمض النووي (DNA) بشكل أساسي ، استدعى ذلك العلماء على أن يبحثوا عن طريقة أو تقنية تقوم على مضاعفة كمية الحمض النووي (DNA) بشكل كبير ، فكان هناك عدة محاولات لتنشيط الخلية على الانقسام المستمر بإضافة عوامل النمو growth factors ، ولكن هذه الطريقة لم تكن ذات جدوى لدى العلماء لأسباب كثيرة. إلى أن توصل العالم Dr. Kerry Mullis في عام 1985 (و قد حصل على جائزة نوبل في الكيمياء عام 1993)بنشر اختراعه لتقنية PCR فكانت هذه التقنية بوابة لكثير من التطورات المتسارعة في مجال التكنولوجيا الحيوية ، من أهم الأسباب التي ساعدت هذه التقنية على الانتشار عدم اعتمادها على النظام الحيوي(أي الخلية) و التحكم بكمية الحمض النووي (DNA) وسرعة في الإنتاج ولكن كان من عيوب هذه التقنية عدم وجود نظام إصلاح أخطاء الارتباط الخاطئ miss match .

ما هي متطلباتPCR :

لتقوم بإنتاج الحمض النووي (DNA) بواسطة PCR يتتطلب عليك توفير :

1. جهاز للتحكم بدرجات حرارة التفاعل بشمل دقيق و متتالي (الدورة الحرارية Thermocycle) : ويقوم هذا الجهاز بتغير درجة الحرارة بشكل سريع ، لأن تغير درجة الحرارة هو الأساس الذي تقوم عليه فكرة هذه التقنية .

2. البوليمريز : وهو الإنزيم الذي يقوم ببناء وترتيب القواعد النيتروجينية (وحدات الحمض النووي (DNA) ، ويجب أن يكون هذا الإنزيم مقاوم للحرارة العالية ليتمكن من العمل . و قد اكتشف انزيم مقاوم للحرارة و يسمى Tag polymerase مستخرج من سلالة بكتيريه تسمى ***Thermus aquaticus*** التي تتواجد طبيعياً في الينابيع حارة.

3. مجموعة متفرقة من القواعد النيتروجينية: (A T C G) ليتمكن الإنزيم من ترتيبها في مواقعها أثناء عملية نسخ الحمض النووي (DNA) .

4. بريمر Primer : وهو قطعة صغيرة من الحمض النووي (DNA) ليتمكن الإنزيم من بدأ البناء و النسخ عليها ويتم تصنيعه وتنقيته بواسطة شركات منتجة.

5. والشيء الأهم هو وجود نسخة من الحمض النووي (DNA) المراد نسخه .

6. بالإضافة إلى محلول أو وسط ليتم به التفاعل : وهذا المحلول يختلف بين تفاعل و أخر .

خطوات تقنية PCR ثلاث مراحل في الدورة الواحدة :

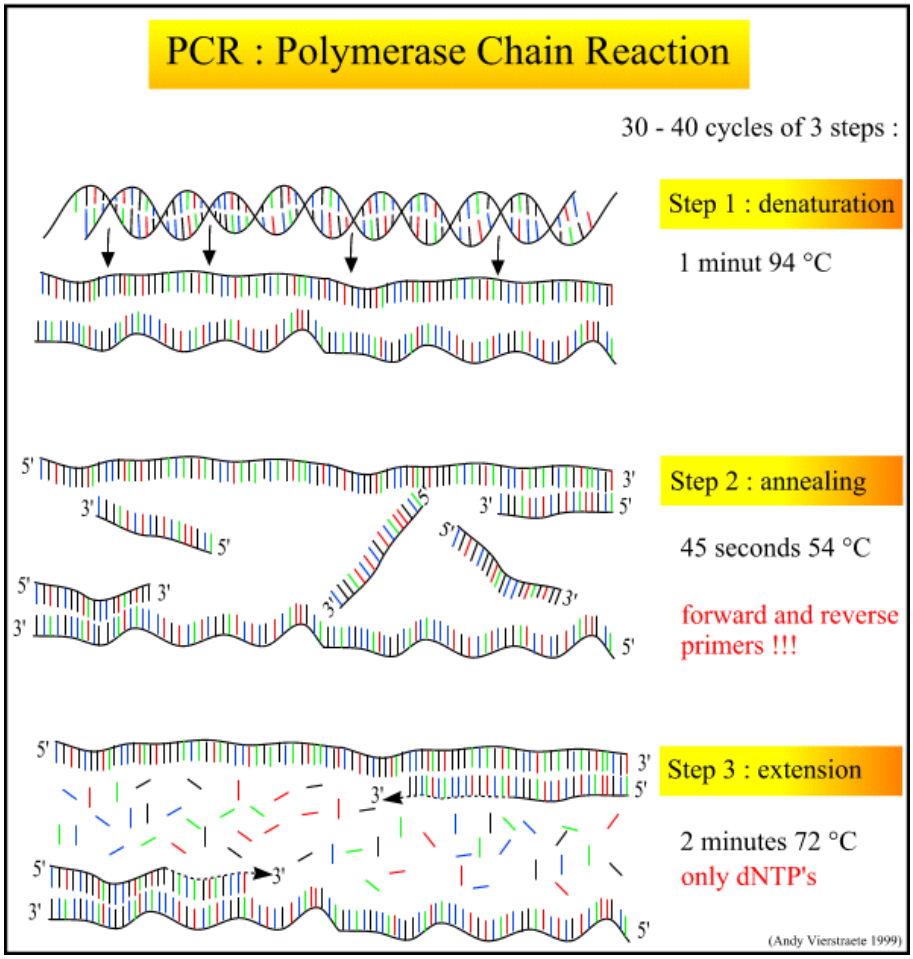
1- مرحلة التفكيك Denaturation الحراري:

يتم رفع درجة الحرارة إلى 94 -98º م وذلك لفك الشكل المزدوج للحمض النووي (DNA) الأصل d.s. DNA الى s.s.DNA

2- مرحلة التصاق البادئات Primers annealing:

يجب خفض درجة الحرارة إلى ما بين 50-65 ْم ليقوم البادئات بالألتصاق فيزيائياً بواسطة الروابط الهيدروجينية مع الحمض النووي (DNA) الأصل.

3- مرحلة الامتداد(Extension (Elongation: تتم برفع درجة الحرارة إلى 75 - 80 °م ليقوم انزيم البلمرة بعمله في بناء الحمض النووي (DNA) الجديد. في وجود dNTPs وهذه المراحل الثلاث تمثل دورة كاملة وفيها يصبح الحمض النووي (DNA) الأصل قد تضاعف ، وتعتمد كمية ناتج الحمض النووي (DNA) على عدد الدورات بشكل أسي .



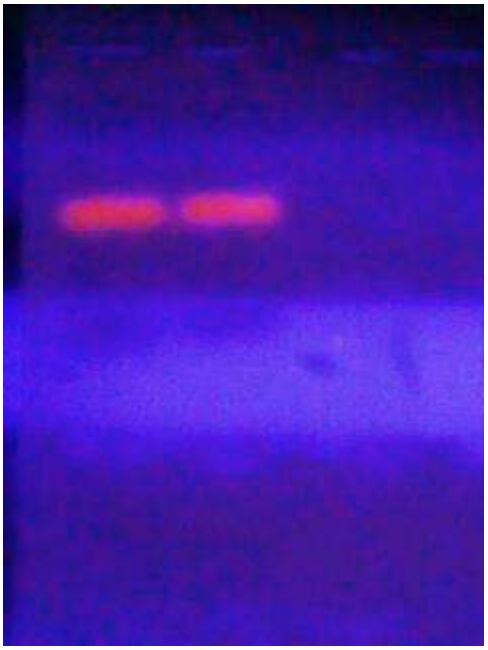
وتوجد عدة طرق مختلفة في استخلاص DNA من الخلايا الحية وتعتمد بأساس على تمزيق جدران الخلايا ومن ثم التخلص من البروتينات ومن RNA ومن ثم الحصول على DNA وكالاتي:-

1- عمل فصل لها بواسطةجهازالطردالمركزي3000-12000rpm لمدة 15 دقيقة.
2- وذلك بإضافة محلول تكسيروتحليل الخلايا (Lysis Solution) .
3- توضع العينات على جهاز (الهزاز) لمدة 10 دقائق .
4- نسكب الرائق ونحتفظ بالراسب مع قليل من الرائق ثم نعمل لها رج (vortex) لمدة 40 ثانية .
5- نضيف محلول تكسيرمحتويات الخلية (Cell Lysis Solution) .مع انزيم RANase الذي يحلل هذا الحامض النووي

6- نضيف كحول الإيزوبوبانول مع الرج باليد يظهرDNAعلى شكل خيوط ثم يضاف الايثانول بتركيز 70% ويحفظ به .

7- يتم الكشف عن DNA باستعمال الترحيل الكهربائي على هلام agarose gel تركيزه 0.8%

DNA المستخلص من الخلايا محفوظ بالايثانول



الترحيل الكهربائي للحامض النووي DNA المستخلص من بكتريا *Pediococcus acidilactici* AK المعزولة محليا من اللحم المتخمر على هلام الاكاروز بتركيز 0.8 %

تطبيقات PCR :

لتقنية PCR تطبيقات كثيرة في مجال أبحاث الحمض النووي (DNA) و الوراثة ومنها :

1. الكشف عن الطفرات الوراثية : وذلك عن طريق وضع بريمر خاص للطفرة لتكثير الجين الخاص بها . ومنه نقوم بمعرفة المرض إذا كان على زوجين الكروموسومات أو على احدهما (allele) .

2. تعين البصمة الوراثية .

3. الكشف عن الفيروسات : وهذه الطريق هي الأدق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته.

4. هو العنصر الأهم في عملية التجميع الجيني (Recombinant الحمض النووي (DNA) حيث نقوم بتكثير الجين المراد إدخاله على البلازميد أو الحمض النووي (DNA) المضيف .

5. استخدامه في تغير نهايات الجين لتصبح متوافقة مع إنزيمات القطع (Restriction enzyme) .

6. هو العملية الأساس في تحديد تتابع القواعد النيتروجينية في الحمض النووي (DNA) الحمض النووي (Sequencer (DNA) .

7. معرفة طول الحمض النووي (DNA) .

8. تقنية الحمض النووي (DNA) المكمل (الحمض النووي c DNA) .

9. تحديد الجين المطلوب من خليط من الجينات .

10. يستخدم في تقنية (microarrays).

11- في مجال الطب الشرعي (اختبار الأمومة ، حالات الاغتصاب ، تحديد الهوية ... الخ)

الاستنساخ Cloning

هو زرع خلية عادية في بويضة أُفرغت من الكروموسوم، أي من الإرث الجيني، بحيث تصبح خلية قابلة للتكاثر عن طريق الإنقسام الخليوي المعتاد، اذ يتم ملؤها بخلية أخرى من كائن مكتمل النمو، تحمل صفاته الوراثية وزرعها في رحم أنثى بالغة.. لتأتي النتيجة جنيناً أو مولوداً مستنسخاً من صاحب الخلية المزروعة . وهذه الكلمة مأخوذه من كلمة Clone وتعني واحد من مجموعة من الاحياء التي انتجت من غير تلقيح جنسي واصل الكلمة يونانية Klone وتعني البرعم الوليد.

الهندسة الوراثية

هي تقنية حيوية تقوم على اساس تحوير الجينات بالمعالجة المباشرة من خلال استبدال جينات معينة موجودة على DNA بجينات اخرى ذات ترتيب مختلف من القواعد النيتروجينية وبالتالي فان DNA الذي شفرنا فيه الجين الجديد سوف يضاعف نفسه ذاتيا مثل اي جزء اخر من DNA .

تستخدم الهندسة الوراثية في مجال زيادة المحاصيل الزراعية والحيوانية وفي مجال صحة الانسان اذ من الممكن زراعة جينات تحمل معلومات تساعد في مقاومة مرض السرطان مثلا والعديد من الامراض الاخرى فمثلا يمكن زرع جين يحتوي على معلومات تساعد على صنع مادة CD4 التي تقاوم فيروس الايدزوممكن ايضا القضاء على الامراض الوراثية بتغيير الجينات الغير سليمة باخرى طبيعية.

الخلفية العلمية

لفهم التقنية العلمية للاستنساخ يجب معرفة مايأتي:

1- الخلية الجسدية : يتكون الجسم البشري من وحدات متمايزة تدعى الخلايا , وتحتوي كل خلية في داخلها على **نواة** هي سرالنشاط الحياتي للخلية ويحيط بالنواة غشاء نووي وكذلك فإن النواة تحتوي بداخلها على شبكة ملونة تتكون من٤٦ شريطاً تلتقط بمجموعها الصبغة القاتمة ولهذا تسمى **بالأجسام الصبغية** أو الصبغيات (Chromosomes), والأجسام الصبغية الـ ٤٦ هي حوامل الصفات الوراثية على هيئة وحدات من حمض خاص يسمى بالحمض النووي Nucleic Acid وتسمى هذه الوحدات بالمورثات او الجينات Genes وهي مرتبة ترتيباً خاصاً فكأنها حروف تؤلف كلمات وهذه تؤلف رسالة عامة تقرر الصفات الوراثية للجنس البشري عامة. تتكاثر كل خلية بالإنقسام وبموجبه ينشق كل شريط من هذه الاجسام الصبغية طوليا الى نصفين يتمم كل منهما نفسه إلى شريط كامل بالتقاط المواد اللازمة من السائل المحيط به وهكذا تتكون شبكتان صبغيتان تغلفُ كلٌ منهما بغلاف نووي لتصبح هناك نواتان تقتسمان السائل الخلوي ويحيط بكل منهما غشاء

خلوي وتصبح الخلية خليتين وهكذا أجيالٌ بعد أجيال من الخلايا المتماثلة , فالخلية الجلدية مثلاً تنجب أجيالاً من الخلايا الجلدية و خلية الكبد تعطي أجيالاً من الخلايا الكبدية ..... وهكذا.

2- الخلية الجنسية : تتألف الخلايا الجنسية من نوعين من الخلايا الذكرية والأنثوية وهي هي كسائر الخلايا إلا أنها تتمتع بخاصية لا تتصف بها الخلايا الاخرى ذلك أنها في الإنقسام الأخير الذي تتهيأ به للقدرة على الإخصاب لا ينشطر الشريط الصبغي إلى نصفين يكمل كل منهما الآخر بل تبقى الأجسام الصبغية سليمة ويذهب نصفها ليكون نواة خلية ويذهب النصف الآخر ليكون نواة خلية أخرى فتتكون نواة الخلية الجديدة التي تحوي على 23 كروموسوم مفرد لهذا يسمى هذا الإنقسام بالانقسام الاختزالي أو النصفي فكأن النواة فيما يختص بالحصيلة الإرثية نصف نواة. والقصد من ذلك أنه إذا أخصب حيوان منوي ناضج بويضة مخصبة ناضجة باختراق جدارها السميك التحمت نواتاهما ونتجت نواة واحدة ذات 23 زوج من الكروموسوم وليس فرد أي 46 من الاجسام الصبغية كما هي الحال في سائر خلايا جسم الإنسان، فكأنهما نصفان التحما في خلية واحدة هي البيضة الملقحة, وهذه أولى مراحل الجنين. وهناك خصوصية للبيضة الملقحة تنفرد بها دون سائر خلايا الجسم ويكمن سر هذه الخصوصية في السائل الخلوي السايتوبلازما الذي يحيط بالنواة بينما تتكاثر الخلية الجسمية الى اجيال لانهاية لها من الخلايا المتماثلة فان البيضة الملقحة تشرع في الإنقسام إلى خلايا متماثلة لعدد محدود من الأجيال فما تكاد تفضي إلى كتلة من 32 خلية حتى تتفرع خلايا الأجيال التالية إلى اتجاهات وتخصصات شتى ذات وظائف متباينة وتتخلق إلى خلايا الجلد والأعصاب والأمعاء والعظام وأعضاء وغيرها، أي تنحو إلى تكوين جنين ذي أنسجة وأعضاء مختلفة ومتباينة، على الرغم من أنها لا زالت تشبه الخلية الأم التي أنتجتها من حيث مادتها الوراثية الأجسام الصبغية أو الكروموسومات اذ ينشق كل شريط كروموسومي إلى نصفين يكمل كلٌ منهما نفسه ويتجه إلى خلية الجيل التالي وهكذا.

وعلى هذا فلو جئنا بخلية جنسية ناضجة (بويضة)ونزعنا منها نواتها، ثم أتينا بخلية جسدية من الجلد مثلاً واخذنا منها نواتها وأودعناها داخل البيضة منزوعة النواة, فإن النواة الضيفة تشرع في انقسام ليس في اتجاه تكوين خلايا جلدية ولكن في اتجاه تكوين جنين سيكون نسخة طبق الأصل ممن أخذنا عنه الخلية لأن الخلية التي أودعناها النواة الضيفة أصبحت تحوي الكروموسومات 46 التي تحملها خلايا المعطي وليست التي نصفها من الحيوان المنوي والنصف الاخر من البويضة, وبتكرار هذا نستطيع أن نحصل على أي عدد شئنا من النسخ التي تطابق تماماً في تكوينها الوراثي الفرد صاحب تلك الخلايا.

انواع الاستنساخ واستعمالاته

1- الاستنساخ الجيني : ويهدف إلى الحصول على كمية كبيرة من جين معين بغرض دراسته مثلا، ويتم عبر إدخال الجين الذي يراد استنساخه من كائن حي معين مثلا، إلى

المادة الجينية لخلية تحوي على ناقل يدعى Victor (Plasmid) والتي قد تكون خلية بكتيرية او فطريات او فيروسات ثم يتم وضع هذا الناقل بالمختبر في ظروف مناسبة مما يؤدي إلى تكاثره وبالتالي استنساخ كمية كبيرة من المادة الجينية المرغوبة.

2- الاستنساخ الانجابي : ويستخدم لإستنساخ حيوانات بأكملها، وذلك عبر الخطوات التالية :

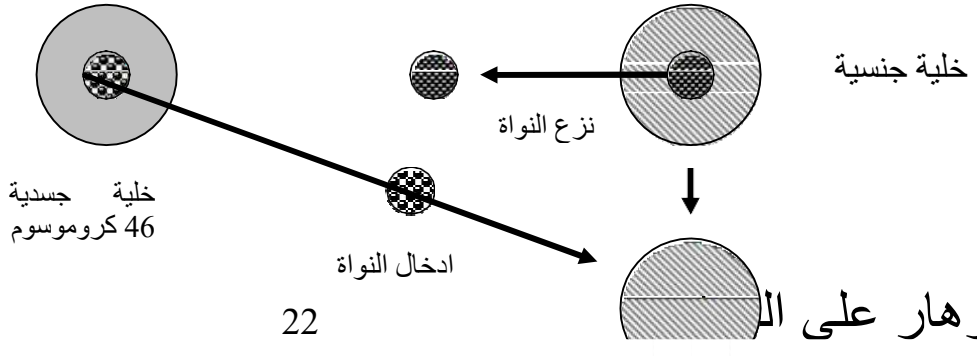
1- أخذ المادة الوراثية من نواة خلية من جسم الحيوان الذي يرغب في إستنساخه، مثل خلية جلد (أي تحتوي على كامل عدد الكروموسومات لا نصفه)
2- يتم أخذ بويضة وتفريغها من المادة الوراثية، أي أنها لا تحتوي على النوية التي بها الكروموسومات، ومحتواها من الجينات يساوي صفر
3- يتم إدخال المادة الوراثية من الخلية البالغة إلى البويضة الفارغة، ويتم ذلك عبر حقنها أو استخدام تيار كهربائي لدمج الاثنتين معاً
4- تزرع البويضة الجديدة بالمختبر في أنبوب إختبار
5- تنقل البويضة إلى رحم أنثى تسمى "الأم البديلة"، لتحمل بها وتلدها بعد حين
6- الوليد يحمل نفس المادة الوراثية للخلية الأصلية التي تم إستنساخها
هذه الطريقة هي التي تم استخدامها لإستنساخ النعجة دوللي

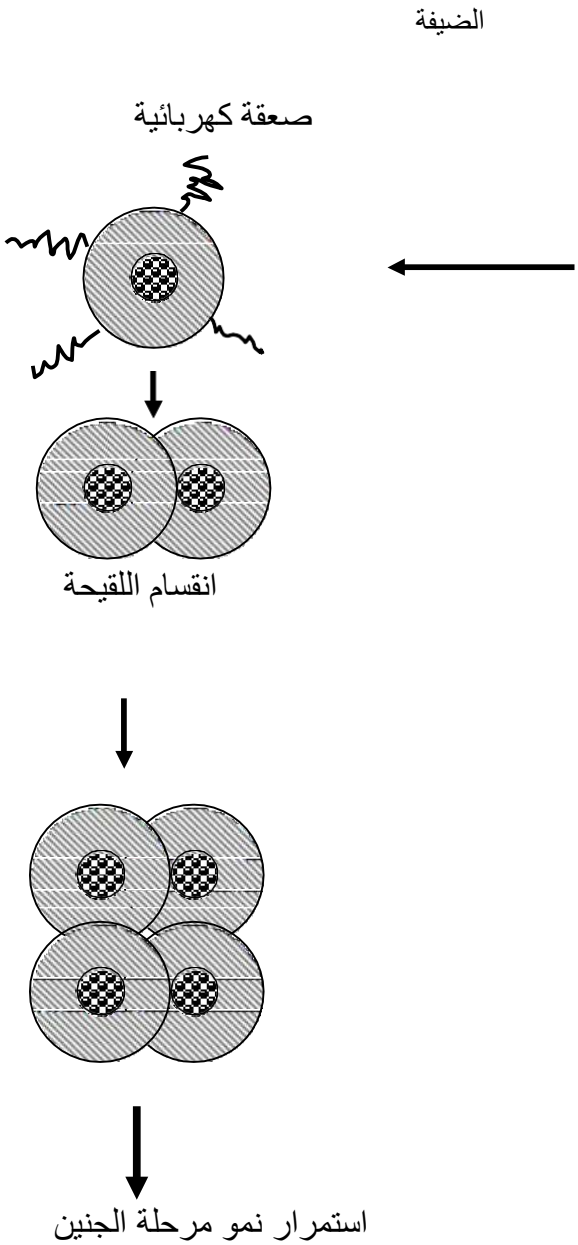
3- الاستنساخ العلاجي : يشبه هذا النوع الاستنساخ الإنجابي، ولكن الهدف النهائي مختلف. ففيما يسمح الاستنساخ الإنجابي للبويضة بالنمو لتكوين كائن حي جديد يزرع برحم الأم البديلة، يستعمل الاستنساخ العلاجي البويضة كمصدر لإنتاج الخلايا الجذعية، وهي خلايا تملك قدرة غير محدودة على التكاثر والتمايز لأي نوع من الخلايا، والتي يقول العلماء إنها قد تحمل أملا بعلاج العديد من الأمراض. كما تساعد هذه الطريقة في الاستنساخ العلماء على فهم أعمق لطبيعة وكيفية تطور الأمراض . من سلبياته انه يتطلب تدمير الجنين بالمختبر لأخذ خلاياه الجذعية، مما يثير قضايا أخلاقية . يشير بعض العلماء إلى وجود تشابه بين الخلايا الجذعية وخلايا السرطان، إذ تقول بعض الدراسات إنه بعد ستين انقساما خلويا يتجمع بالخلايا الجذعية طفرات كافية لتحويلها إلى سرطانية. ولذلك فإنهم يطالبون بالمزيد من الأبحاث قبل استخدام هذه التقنية في علاج الأمراض لدى الإنسان .

4- الاستنساخ الجزيئي : يشير إلى عملية إنتاج نسخ مطابقة للأصل من سلسلة جزئية لحمض نووي , كثيرا ما يستخدم هذا الاستنساخ من أجل تضخيم أجزاء محددة من سلسلة DNA تحتوي على مورثات كاملة، ولكن يمكن استخدام التقنية أيضا من أجل تضخيم أي سلاسل جزئية أخرى , تستعمل هذه التقنية ا في مجالات واسعة من التجارب البيولوجية .

تطبيقات وفوائد الاستنساخ

1- استنساخ حيوانات ذات صفات مرغوبة مثل أبقار غزيرة الحليب أو ذات نسب مرتفعة من لحم
2- استنساخ حيوانات متطابقة لإجراء اختبارات الأدوية عليها، مما يساعد في الحصول على نتائج متجانسة وواضحة ولا يلعب فيها الاختلاف بين الحيوانات دورا في تشويش نتائجها
3- استنساخ الفصائل المهددة بالانقراض اذ يفيد الاستنساخ في المحافظة على السلالات النادرة سواء كانت نباتية او حيوانية ومعرضة لانقراض
4- يفيد الاستنساخ في مجال البحث العلمى فمثلا انتاج فأر ليكون موديلا لفأر آخر يعانى من مرض وراثي محدد لإجراء تجارب علاجية وراثية لتحديد أفضل سبل العلاج والتي يمكن تطبيقها على الإنسان يكون هنا للاستنساخ فائدة عظيمة لاختيار أفضل وانسب الطرق الصالحه للبشرية
5- اكثار الحيوانات المهندسة وراثيا لانتاج العقاقير بمعنى مضاعفة المصانع الحيوية عدديا لزيادة انتاج العقاقير
6- اكثار التراكيب الوراثية التي اثبتت كفاءتها في انتاج الغذاء للبشر





مراحل الاستنساخ

المحاضرة 6

البروتين والكائنات المنتجة له

تعد البروتينات من الجزيئات الكبيرة الاكثر تنوعا في الانظمة الحية حيث تقوم باداء وظائف بايولوجية على نطاق واسع ويعكس ذلك تنوعها التركيبي. تتكون البروتينات بصورة اساسية من الكاربون ,الهيدروجين,الاوكسجين, الكبريت بالاضافة الى بعض العناصر الاخرى التي توجد في بروتينات متخصصة محددة مثل عنصر الحديد في بروتين الهيموغلوبين وعنصر الفسفور في بروتين الكازين. تتكون جميع البروتينات من وحدات بناء تعرف بالاحماض الامينية التي ترتبط مع بعضها باواصر ببتيدية ويوجد في بروتينات الكائنات الحية 22 حامض اميني مختلف.

عملية بناء البروتين:

تعتمد عملية بناء البروتين على الرايبوسومات جنبا الى جنب مع الاحماض النووية والتي تتضمن نوعين:

1- الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين DNA
2- الحامض النووي الرايبوزي RNA بانواعه (mRNA الرسول **Messenger RNA** وtRNA الناقل **Transfer RNA** وrRNA الرايبوسومي **ribosomal RNA** الذي يعتبر الوحدة الوظيفية للرايبوسوم)

وتنحصر وظائف RNA الثلاثة في بناء البروتين
m-RNA تستخدمه الخلية البكتيرية كمرشد guide لبناء البروتين.
r-RNA مسئول عن بناء بروتينات معينة لتكوين الريبوسومات.
t-RNA ترجمة المعلومات الوراثيه في جزيء mRNA وهو عبارة عن خيط ينثني وينحني ليأخذ الشكل المميز للـ t-RNA وهو شكل ورقة البرسيم حيث يكون له 3 عقدloops.

تتكون عملية بناء البروتين في الخلية من خطوتين:
1- عملية النسخ Transcription
2- عملية الترجمة Translation

عملية النسخ هي العملية التي يتم من خلالها نسخ جزيء mRNA من جين معين موجود على DNA عبر سلسلة من الخطوات تبدأ بارتباط انزيم يدعى انزيم بلمرة RNA (RNAD polymerase) على موقع موجود على DNA يسمى موقع الابتداء **promoter site** بعد ذلك تنفصل سلسلتي DNA ليبدأ الانزيم باضافة النيوكليوتيدات الخاصة بالـ mRNA مع استبدال القاعده النيتروجينية T بالقاعدة U من احدى سلسلتي DNA وحينما يعمل انزيم البلمرة الى اشارة الانتهاء (وهي منطقة معينة على DNA مكونة من تسلسل معين من النيوكليوتيدات المحددة لنهاية الجين تدعى **termination site**) يتم تحرير mRNA الناتج وتعود سلسلتا DNA الى الالتفاف من جديد .

تسمى كل 3 نيوكليوتيدات متجاورة على mRNA بالكودون Codon (عبارة عن شفرة من 3 قواعد نيتروجينية من اصل 4 قواعد هي A,C,G,U ويبلغ عدد الكودونات 64 اجمالاً 61 منها مخصصة لتشفير 20 حامض اميني اما 3 المتبقية لاتشفر لأي حامض اميني.

عملية الترجمة: تتكون من 3 خطوات

1- البدء Initiation of Translation
2- الاستطالة Elongation
3- الانهاء

- تنطلق خطوة البدء بارتباط الوحدة البنائية 30S من الريبوسوم مع start codon في الـ m-RNA و start codon يتعرف عليه بواسطة t-RNA (الحامل UAC anti codon) حاملاً حمض أميني يسمى formylmethionine
- ارتباط كل من تحت الوحدة 30S من الريبوسوم وm-RNA و t-RNA يحتاجوا إلى طاقة من التحلل GTP (Guanosine Triphosphate) هذه الطاقة تؤدي إلى ارتباط الوحدة البنائية 50S من الريبوسوم لتكوين initiation complex

- تنشط الحوامض الامينية انزيميا وتنتقل بواسطة tRNA وفق الشفرة المطلوبة بمساعدة انزيم Amino acyl tRNAsynthetase وجزيئات tRNA تحوي شفرات مكملة (Anticodon) للشفرات الموجودة على mRNA

- في هذه النقطة فإن t-RNA الحامل للـ f. Met يرتبط على موقع في الريبوسوم يسمى موقع P أو (Peptidyl).

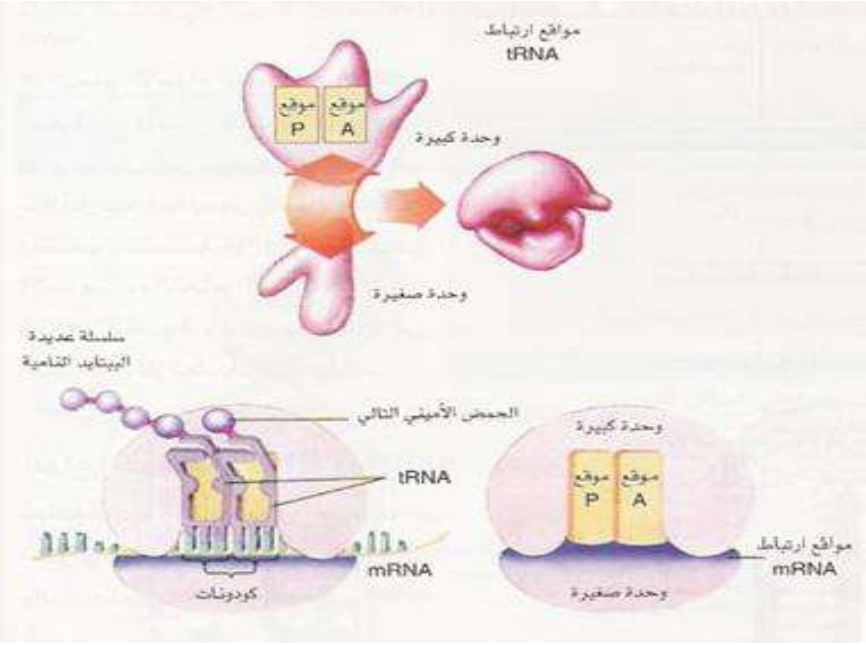
- تبدأ قراءة الرايبوسومات للشفرات على mRNA باتجاه ذرة الكاربون5 الى ذرة الكاربون 3 ويجلب اول حامض اميني الى الموقع A (Accepting site) على الرايبوسوم ويكون للحامض الاميني الاول الذي يترجم في البدائية النواة الى المثيونين AUG ثم يأتي الحامض الاميني الثاني الى الموقع p (Peptidyl site) على الرايبوسوم ويتم ربط الحامضين باصرة ببتيدية بمساعدة انزيم Peptidyl transferase وظيفة هذا الانزيم هو بناء رابطة كيماويه بين الحمضين الأمينيين

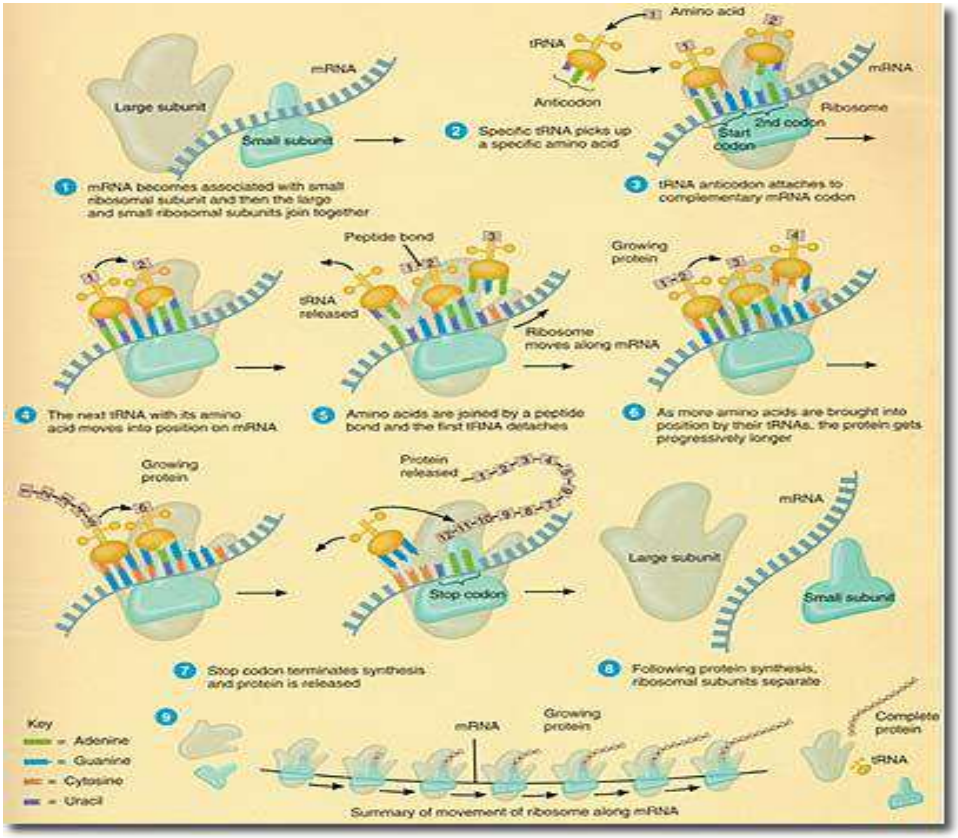
- يتحرك الرايبوسوم بعد ذلك مسافة شفرة واحدة لينقل الحامض الاميني الثاني الى الموقع A ويبقى الموقع P شاغرا مستعدا لاستقبال حامض اميني ثالث الى ان تترجم كل الشفرات الى مايقابلها من الحوامض الامينية , هناك انزيم يسمى Transfocase وظيفته إزالة أو استئصال tRNA الحر من موقعه على m-RNA من الموقع P

- يدخل aminoacyl tRNA جديد حاملاً معه حمض أميني آخر ليتعرف على codon الموجود على mRNA ليرتبط به حيث ترتبط الأحماض الأمينية السابقة بالحمض الأميني الجديد،
- ويتحرك الريبوسوم على طول m-RNA ليسمح بدخول aminoacyl tRNA جديد وترتبط الأحماض الأمينية ببعضها البعض لتكوين البروتين

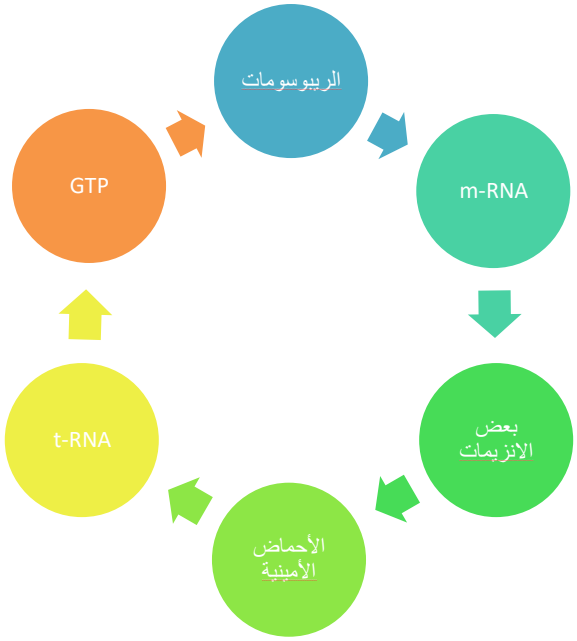
انهاء الترجمة:

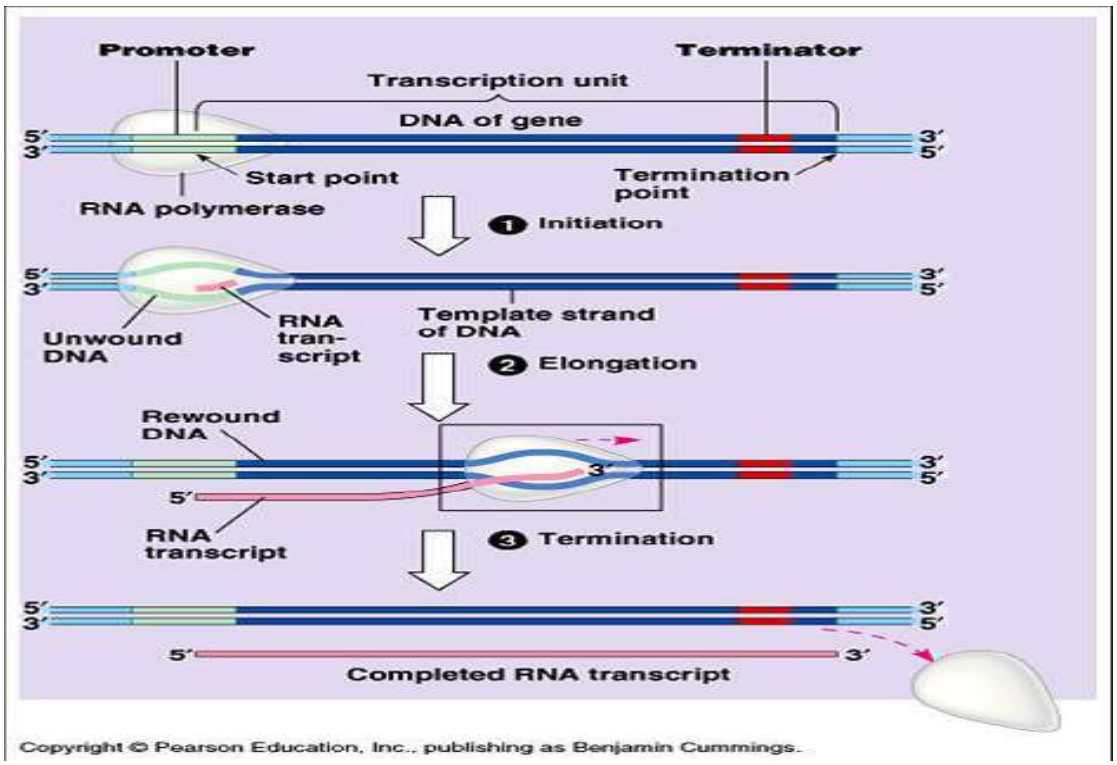
1- عندما يصل الريبوسوم إلى نهاية الشفرة Termination codon تسمى monsense codons (شفرات ليس لها معنى) لأنها لا تحمل أي معلومات خاصة لبناء البروتين.
2- هناك tRNAs غير عادية تحمل anticodon تتعرف على Termination codon
3- هناك بروتينات مسماه عوامل الإزالة releas factors ترتبط مع الريبوسوم عند الوصول إلى الشفرة النهائية وتنشط Peptidyl transferase لقطع البروتين الجديد المتكون
4- في النهايه يتجزأ الريبوسوم إلى جزئين ويفك mRNA وينتج البروتين كخيط مرتب عليه الأحماض الأمينية





يحدث بناء البروتين في سيتوبلازم الخلية البكتيرية في وجود كل من




Promoter
Terminator
Transcription unit
DNA of gene
5′
3′
3′
5′
Start point
Termination point
RNA polymerase
1 Initiation
Unwound DNA
RNA tran-script
Template strand of DNA
2 Elongation
Rewound DNA
RNA transcript
3 Termination
Completed RNA transcript
Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

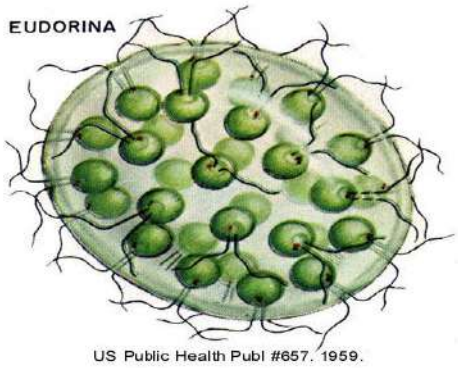
المحاضرة 7

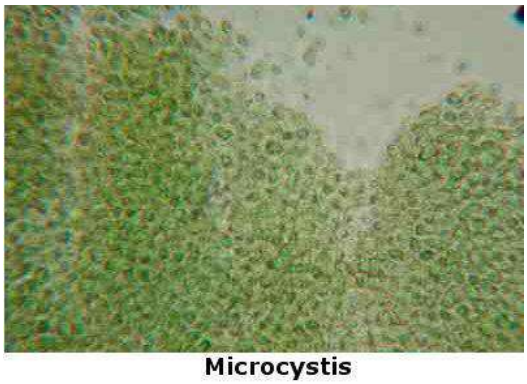
الطحالب والوقود الحيوي..... تكنولوجيا حيوية حديثة

الطحالب هي كائنات حيّة، تستطيع صنع غذائها بنفسها كالنباتات، حيث إنها تمتلك صبغة الكلوروفيل، وبالتالي تقوم بعمليّة البناء الضوئي، وتم تصنيفها على هذا الأساس أنها من النباتات، ولكن مع التطور العلمي تم التوصل أنها تشبه الأوليّات إلى حد ما، وأن معظمها وحيد الخليّة، وبالتالي تم تصنيفها ضمن مملكة الطلائعيّات، وهي مختلفة في شكلها، وحجمها، ولونها. خصائص الطحالب التي تجعلها مختلفة عن النباتات هناك أكثر من عشرين ألف نوعٍ من الطحالب، ولكنها تشترك في عدة صفات منها: لا يوجد لها جذور، ولا ساق، ولا زهور، ولا ورق. تعيش معظمها في الماء سواء العذبة أو المالحة، ونادراً ما تجدها في التربة.

أنواع الطحالب

هناك عدة أسس يتم من خلالها تقسيم الطحالب، وهي نوع الصبغة الموجودة فيها، وأنواع المغذيّات التي تخزّنها، وطبيعة جدارها الخلويّ، ونوع الأسواط، ومن أنواع الطحالب :**1- قسم الطحالب الخضراء المزرقة، أو الطحالب اللزجة:** يتكون هذا الطحلب من خليّة واحدة، ولكنها تتواجد على شكل مجموعات على هيئة مستعمرات بعدة أشكال، وتعيش في المياه، أو في التربة الرطبة، وتفضِّل العيش في درجة حرارة تتراوح ما بين 35-40 °م مثل طحلب *Microcystis* **2- قسم الطحالب الخضراء:** وهي النوع المتشر من الطحالب، وتختلف كثيراً عن بعضها، إلا أنها تشترك في وجود نواة حقيقيّة، وجدار خلوي يحتوي البكتين، والسليولويز، وتحتوي مجموعة من الصبغات، وتفضّل العيش في حرارة تتراوح بين الثلاثين، وخمسٍ وثلاثين درجة مئويّة، ومن أمثلتها: *Eudorina*




Microcystis

اتجهت أبحاث الخبراء والمتخصصين فى الفترة الأخيرة إلى التركيز علي إنتاج الوقود الحيوي من الطحالب الخضراء، خاصة بعد إقرار بدء مرحلة نضوب النفط فى فترة زمنية قريبة، وأنه سينضب أكثر من 95% من مصادر البترول الموجودة على سطح الأرض . وايضا مشكله الغذاء المحتمل حدوثها في حاله استخدام المنتجات الزراعيه او مخلفاتها في الوقود الحيوي لانتاج منتجات الوقود مثل وقود الديزل الحيوي, الايثانول, الكازولين الحيوي و غيرهم من منتجات الوقود الحيوي. وقد اشارت االعديد من الدراسات الحديثه الي ان الطحالب الخضراء كمصدر للوقود تندرج تحت لواء مصادر الطاقه المتجددة وخاصا بعد التزايد المستمر في سعر الوقود الاحفوري. فهي تنمو بسرعة ولها أثر محدود على البيئة ولا تؤثر علي الاحتياج العالمي للغذاء مثل القمح والذرة والسكر.

من اهم ما يميز استخدام الطحالب كبديل للوقود انها لا تحتاج الي اراضي صالحة للزراعه فمن الممكن زراعتها في الصحاري, كما انها لا تتطلب مياه عذبة وقيمتها الغذائية عالية. هناك الكثير من الابحاث المركزة علي الطحالب الخضراء في جميع انحاء العالم, وبالاخص في امريكا الشمالية واوروبا مع عدد كبير من الشركات التي خصصت مبالغ مالية كبير لتطوير الابحاث المنعقدة علي الطحالب الخضراء كمصدر بديل للوقود الاحفوري.

وفى إنتاج الوقود السائل من الطحالب يتم بطريقة كيميائية بسيطة؛ إذ يجرى تحويل الزيوت المستخلصة إلى ديزل حيوي، وإن هناك نوعين من الطحالب يستخدمان فى هذه العملية: **الأعشاب البحرية** التى يوجد بها كمية كبيرة من الزيت يتم درسها ثم استخلاص الزيوت منها لتحويلها إلى وقود، والثانى **الطحالب الدقيقة (المجهرية)** التى تُزرع داخل المختبر؛ حيث تُعرف نسبة الزيت الموجودة داخل الخلية ثم يبدأ التغيير فى الوسط الغذائى لها، وكلما كانت نسبة الدهون أعلى كان أفضل.

وتشير معظم الدراسات العلمية الي امكانية انتاج الزيوت من حوالي 25-50 طن للهكتار الواحد سنويا من الطحالب الخضراء. وتحتوي الطحالب الدقيقة, من بين بعض المركبات البيوكيميائية الأخرى علي الدهون المحايدة(ثلاثي, ثنائي, احادي الجلسرايد احماض دهنية حره), والدهون القطبية (الدهون السكرية, الدهون الفوسفاتية) و أسترات الشمع.

يختلف المحتوى الدهني للطحالب المجهريه 1-90% من الوزن الجاف ويوقف علي نوع وسلاله الطحالب وظروف الانتاج. أن عملية إنتاج الوقود من الطحالب تمر بعدة مراحل؛ ففى البداية لابد من تأكد جودة الزيت الموجود داخل الخلايا ثم استخلاصه، وفى النهاية، وبمعادلة كيميائية، يتم تحويل الزيوت إلى بيوديزل.

الوقود الحيوي

هو وقود نظيف يعتمد إنتاجه في الأساس على تحويل الكتلة الحيوية سواء كانت ممثلة بمحاصيل زراعية أو شحوم حيوانية إلى إيثانول كحولي أو ديزل عضوي ، مما يعني إمكانية استخدامهما في الإنارة وتسيير المركبات وإدارة المولدات، وهذا حادث فعلاً وعلى نطاق واسع في دول كثيرة أبرزها أميركا والبرازيل وألمانيا والسويد وكندا والصين والهند، وبقدر مكَّن دولة نامية مثل البرازيل من الاستغناء عن استيراد النفط نهائيا و تعد البرازيل هي الدولة السباقة في مجال الوقود الحيوي و استخراج الإيثانول من قصب السكر

استخراج الوقود الحيوي من الطحالب

يمكن استخلاص الوقود الحيوي من الطحالب وستثبت الأيام والأزمات بأن الطحالب ستكون الحل الأمثل لحل كثير من المشكلات والأزمات الغذائية سواء للإنسان أو كعلف للحيوان وأيضا تستخدم كضرورة بيئة حيث يمكن لو أعطيناها اهتمامنا الحقيقي بعمل مزارع للطحالب ستكون بالوعات أخرى للكربون حيث إنها تمتص كميات كبيرة من ثاني أكسيد الكربون لاستخدامه في عملية التمثيل الضوئي وأيضا لو استخدمناها في استخراج الايثانول سوف تدفعنا لعالم الصفوة المنتجة للايثانول وللطحالب من الفوائد تجعلنا نسميها البوابة السحرية لحل الكثير من الأزمات الغذائية . للطحالب قدرة على تحويل المركبات الكربونية المكونة من فضلات الإنسان وطحين نوى التمر وإضافة ثاني أكسيد الكربون إلى مركب زيتي تتم معالجته كيميائيا وتحويله إلى وقود الديزل الحيوي الذي يعتبر من البدائل الهامة للطاقة النظيفة والصديقة للبيئة التي توظف ثاني أكسيد الكربون الضار كعنصر أساسي بالعملية واستغلاله بإنتاج الوقود

1- توضع بعض الطحالب في أحواض مخصصة مهيأة بالغذاء المناسب (ثاني أوكسيد الكربون) و درجة الحرارة المناسبة وشمس
2- تترك في هذه الأحواض لتتكاثر و تحتاج لكي تضاعف عددها مابين 6 إلى 24 ساعة حسب نوعها
3- تجمع عن طريق شباك مسامية تمهيدا لعصرها
4- يتم عصر الطحالب و اسخراج الزيت منها
5- تتم معالجة الزيوت و تحويلها إلى ديزل حيوي
6- و ينتج مما تخلف من عصرها علف حيواني ممتاز غني بالبروتينات صالح لكل الحيوانات

هذا الديزل الناتج ينتج عند احتراقه غاز ثاني أوكسيد الكربون إلا أنه لا يلوث الجو لأن هذا الغاز تم امتصاصه مسبقا من الجو ، لذا فإنه يحافظ على نسبة ثاني أوكسيد الكربون في الجو بعكس الوقود الأحفوري الذي يحول الكربون في الأرض إلى ثاني أوكسيد الكربون في الجو والذي يؤدي إلى الاحتباس الحراري .

المحاضرة 8

انتاج الانزيمات باستخدام تخمرات الحالة الصلبة

استخدمت انظمة تخمرات الحالة الصلبة منذ زمن بعيد واختلفت تطبيقاتها على مر العصور وتعتمد على استخدام مواد غير ذائبة في الماء وبغياب الماء الحر بشرط عدم انخفاض الرطوبة عن 12 % . تكون اغلب المواد المستخدمة في عمليات تخمر الحالة الصلبة طبيعية المصدر متمثلة بالحبوب والنخالة والذرة وبذور البقوليات والمخلفات الزراعية مثل التبن والكوالح وغيرها وهذه تكون غير ذائبة في الماء وتمتص كمية من الماء في نسيجها موفرة بذلك الكمية التي تحتاجها الاحياء المجهرية من الرطوبة لغرض نموها وفعالياتها الحيوية.

مزايا تخمرات الحالة الصلبة

1- اقتصادية اذ ان استخدام مواد تفاعل مركزة ورخيصة ومتوفرة فضلا عن استخدام مخمرات ذات حجوم صغيرة مقارنة بالحصيلة المنتجة وعلى ضوء ذلك فان عمليات الاستخلاص والتنقية تكون اقتصادية
2- تكون عملية التهوية يسيرة اذ ينتشر الهواء خلال دقائق مادة التفاعل بحرية
3- تعد الاوساط الغذائية المستخدمة بسيطة نسبيا وطبيعية مقارنة بالاوساط الغذائية التركيبية المستخدمة في طرائق التخمر المغمورة التقليدية
4- توفر بيئة تكون اكثر طبيعية للاحياء المجهرية التي تستهلك مواد التفاعل الطبيعية
5- تعد بيئة غير مفضلة لبعض انواع البكتريا التي تحتاج الى مستوى عال من الرطوبة

سلبيات تخمرات الحالة الصلبة

1- تقتصر العمليات التخميرية على انواع محددة من الاحياء وهي الفطريات الخيطية والاحياء المحبة للجفاف التي تنمو في نشاط مائي واطئ الذي يترتب عليه محدودية المواد التي يمكن انتاجها بواسطة هذه التخمرات
2- تولد كميات كبيرة من الحرارة احيانا يكون التخلص منها امرا معقدا
3- لايمكن توسيع العمليات الى حد كبير
4- يكون نمو الاحياء فيها بمعدلات واطئة جدا
5- صعوبة تسجيل بعض المعلومات الدقيقة عن العملية مثل مستويات CO_2 وO_2 او تحديد كمية الكتلة الحيوية المتكونة او تحديد نسبة الرطوبة

المواد وطريقة العمل

تستخدم هذه الطريقة لتحديد العزلة الاكفأ لانتاج الانزيمات سواء كانت اميليزات او بروتيزات او سليوليزات ويتم ذلك على النحو الاتي:

1- بالنسبة لانزيم الاميليز تستخدم دوارق سعة 300 سم3 مزودة بسدادات قطنية تحتوي على

أ- ذرة مطحونة كمادة اساس طبيعية وتدعم ببعض الاملاح

CaCl2.2H2O 1 gm
MgCl2.6H2O 1gm
K2HPO4 1gm
(NH4)2SO4 1gm
For 1 liter D.W.

تضاف بكمية 40 سم 3 لكل 30 غم ذرة مطحونه

ب - بالنسبة لانزيم البروتييز نستخدم نخالة الحنطة المحضرة بنقل 10 غم من النخالة الى دورق مخروطي سعة 300 سم3 والمرطبة بـ 30 سم3 من الماء المعقم او محلول غير منظم معقم

ج - بالنسبة لانزيم السليوليز تستخدم الكوالح المجروشة بواقع 10 غم لكل دورق وتكون مرطبة بوسط Czapek-Dox السائل المحور باستبدال مصدر الكاربون بالسليولوز بنسبة ترطيب 3:1 وزن: حجم

2- تلقح الدوارق السابقة بنسبة اللقاح السبوري المحضر في الاسبوع الماضي وكلا حسب نوع الانزيم على ان تحضن الدوراق في أ وب في درجة حرارة 40-45 °م لمدة 3 أيام اما الدوارق ج فتحضن بدرجة حرارة 30-45 ° م لمدة 7 أيام