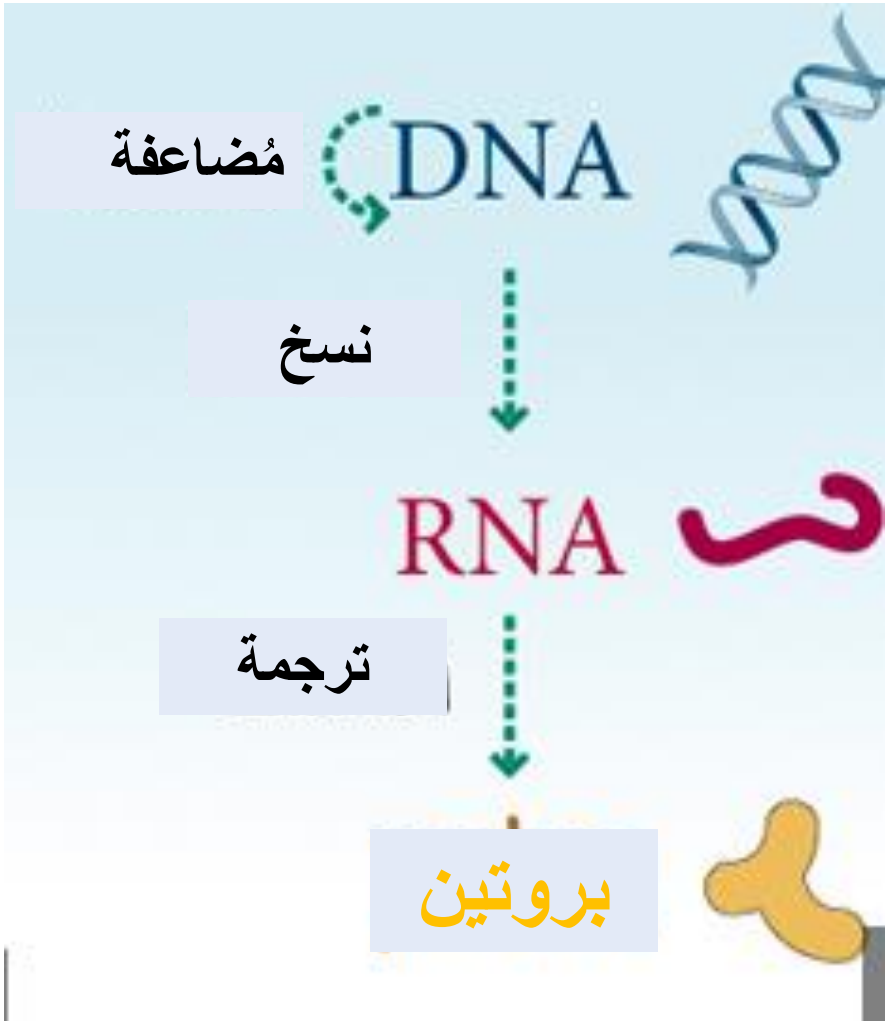
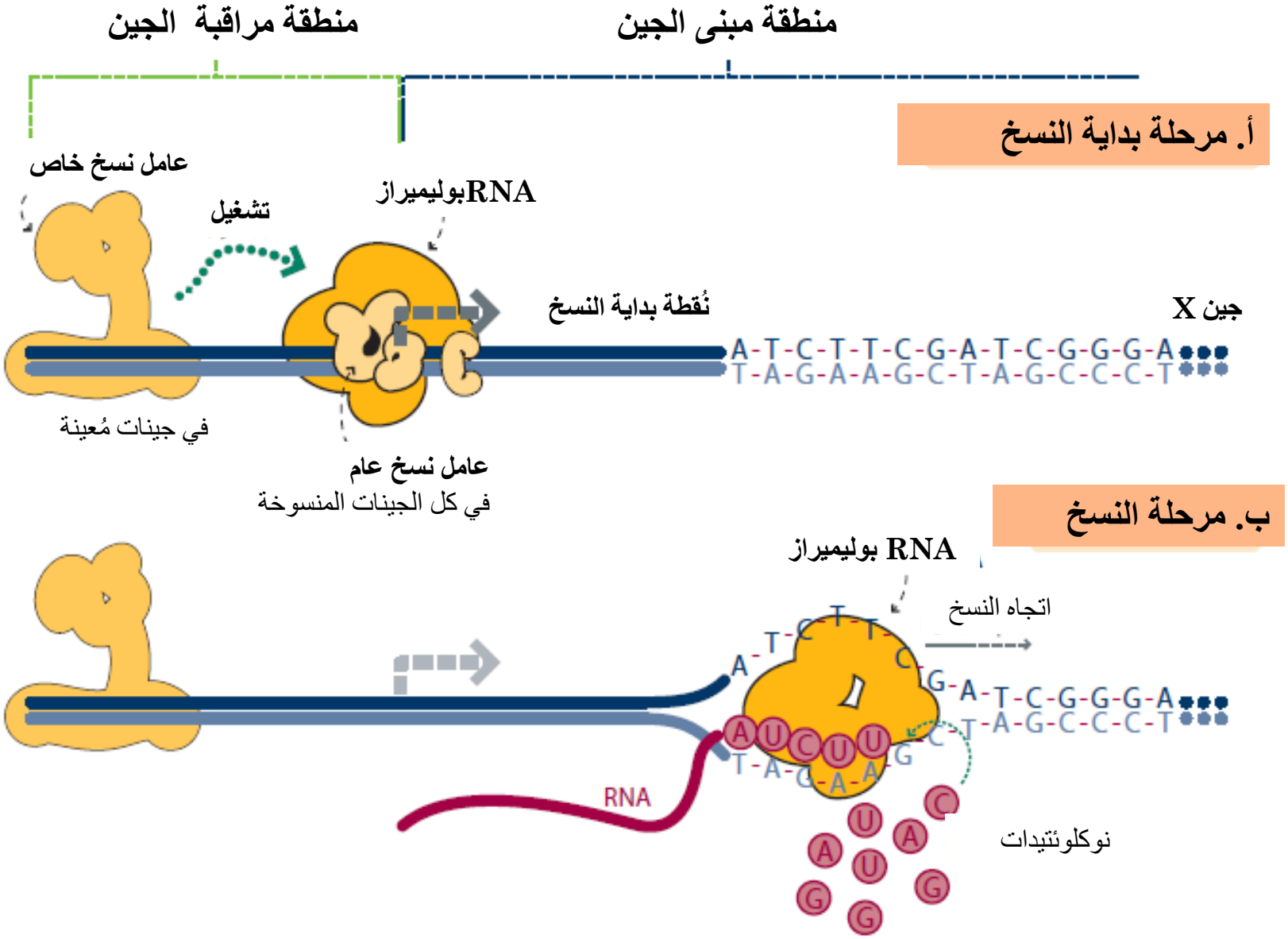
التعبير عن الجينات

اعداد: رائدة ريناوي

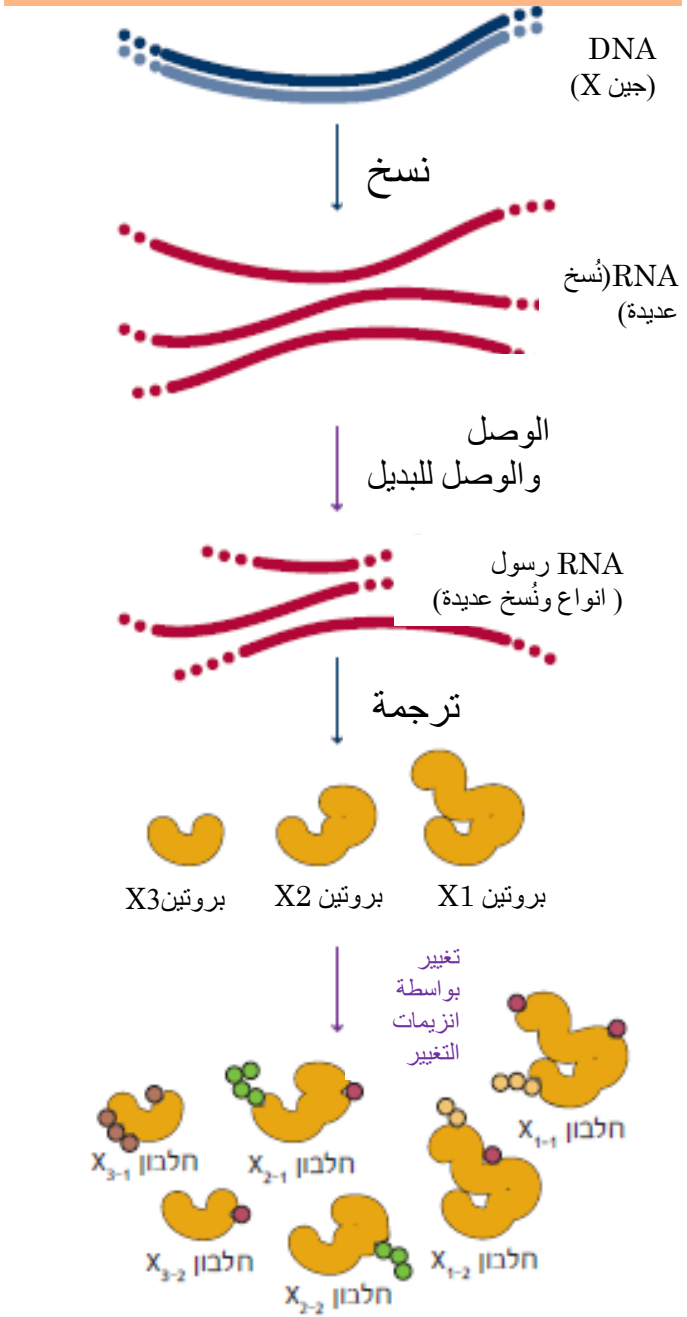
من ال DNA إلى البروتين



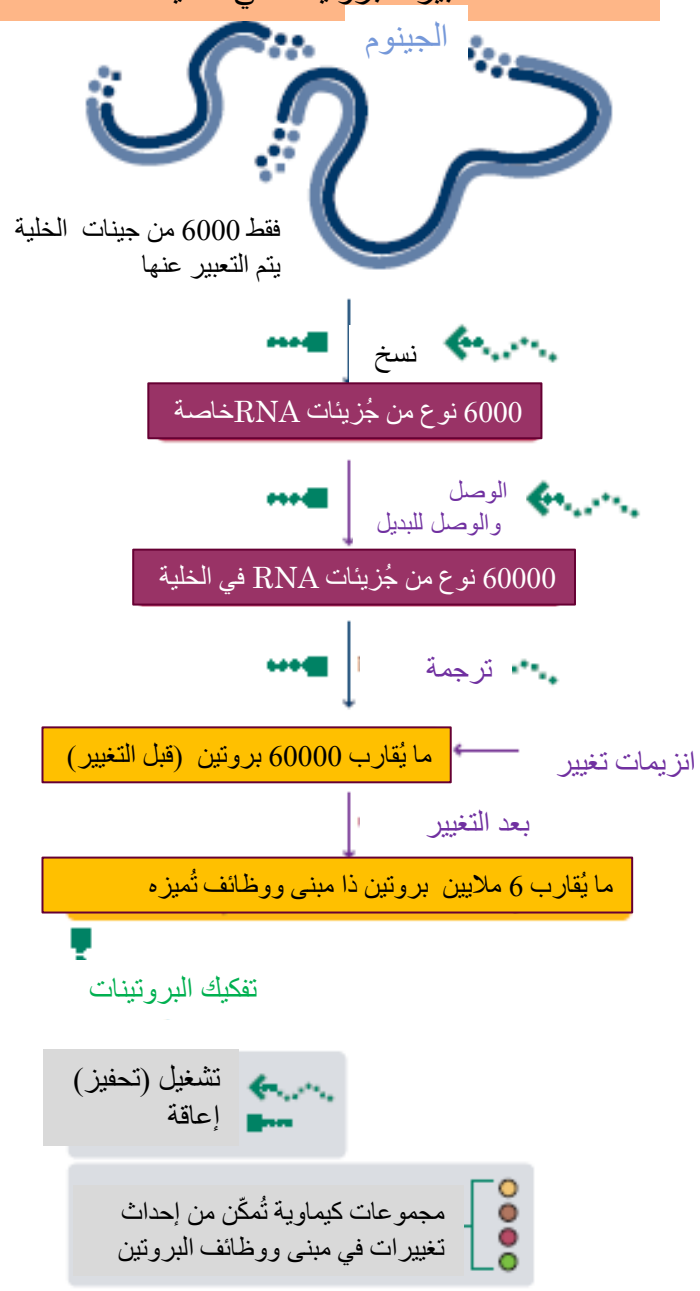


منطقة مراقبة الجين
منطقة مبنى الجين
أ. مرحلة بداية النسخ
عامل نسخ خاص
تشغيل
RNAبوليميراز
نُقطة بداية النسخ
جين X
A-T-C-T-T-C-G-A-T-C-G-G-G-A
T-A-G-A-A-G-C-T-A-G-C-C-C-T
في جينات مُعينة
عامل نسخ عام
في كل الجينات المنسوخة
ب. مرحلة النسخ
RNA بوليميراز
اتجاه النسخ
RNA
نوكلوئتيدات

أ. جين واحد وبروتينات عديدة تنتج بواسطته:
اليات انتاج واليات تغيير



أ. من الجينوم إلى البروتيوم:
مُساهمة عمليات الإنتاج، التغيير والمُراقبة للتشكيلة الكبيرة للبروتينات في الخلية



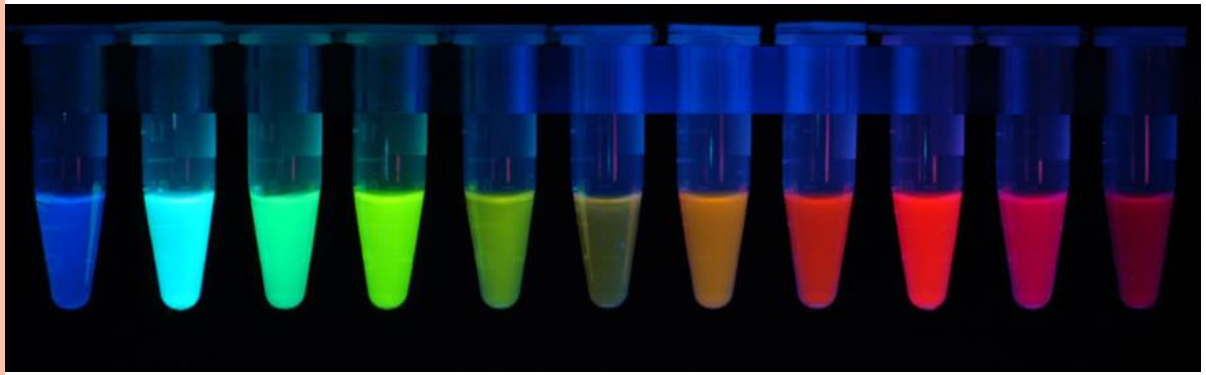
تشخيص التعبير بمستوى ال DNA

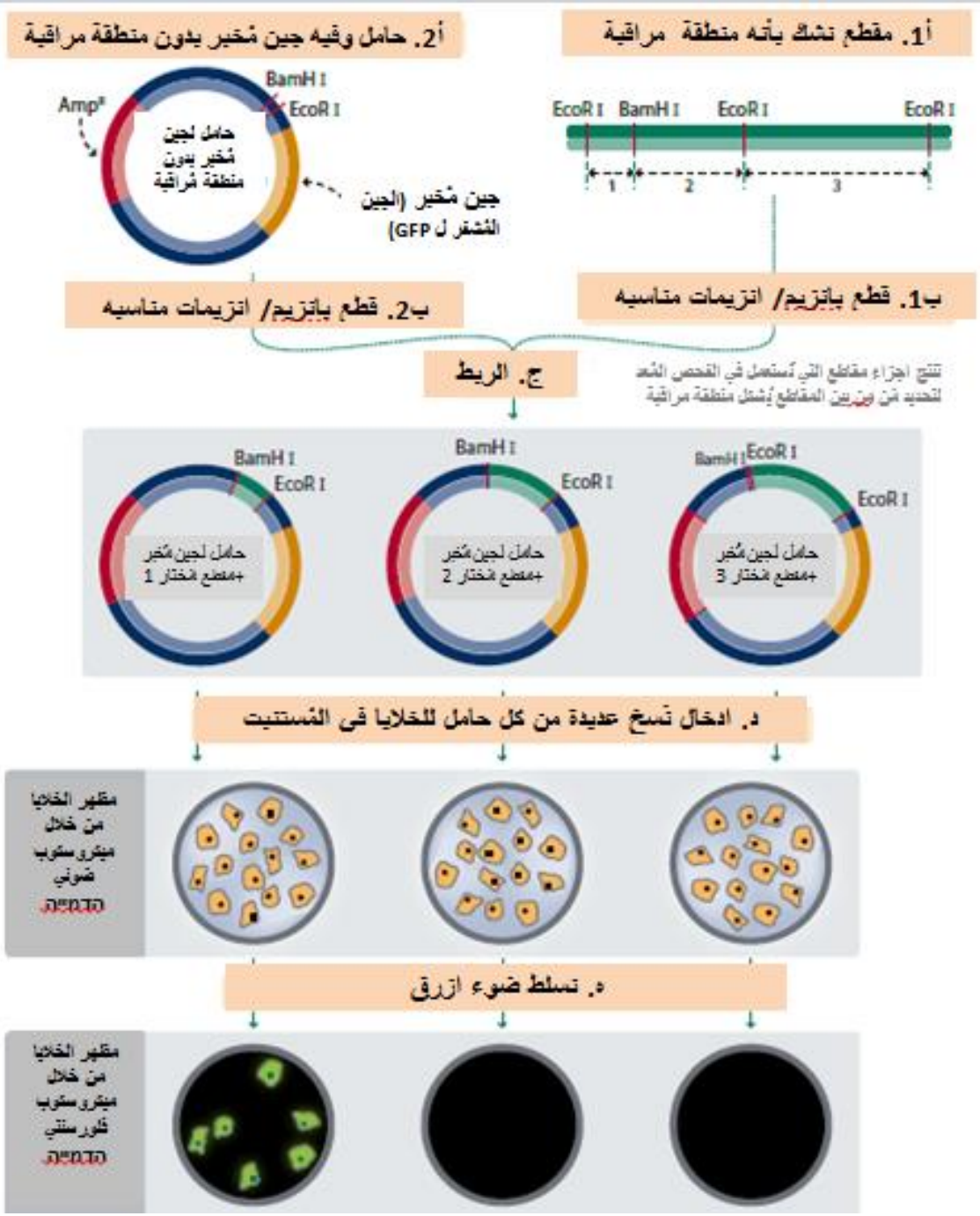
- التعبير عن الجين يحتاج الى عملية مُتعددة المراحل، انتاج ال RNA هو المرحلة الاولى.
- لكل جين يوجد منطقة مراقبة خاصة به وفيها مواقع ربط لعوامل نسخ خاصة (גורמי תעתוק).
- ارتباط عامل النسخ الخاص لموقع ربط مُعين في منطقة المراقبة للجين يُمكن أنْ يؤدي الى التعبير عنه، أي يُمكّن من نسخه وفي اعقاب ذلك ينتج RNA.
- عامل نسخ خاص يُمكن أن يتواجد في انواع مُعينة فقط من الخلايا وفي اوقات مُعينة فقط. (في اية خلايا يتم التعبير ومتى يتم التعبير).

- من أجل فهم **لماذا، اين ومتى** يتم التعبير عن الجين يجب تحديد من جُملة الامور هوية عوامل النسخ التي ترتبط بمنطقة المُراقبة للجين. لذلك يجب اولاً تحديد اين تبدأ منطقة المُراقبة في ال DNA واين تنتهي.
- من أجل تحديد حدود منطقة المُراقبة، يتم استعمال طُرق الهندسة الوراثية بهدف استنساخ مقاطع صغيرة من منطقة نشك بأنها منطقة المُراقبة. في المرحلة التالية نسأل أي من بين المقاطع الصغيرة من المنطقة التي نعتقد أنها منطقة المُراقبة تُمكّن من نسخ الجين؟
- من أجل الإجابة المُباشرة على السؤال يُمكن استعمال حامل فيه جين مُخبر (גן מדווח- reporter gene).

الجين المُخبر الذي أعد لتشخيص التعبير هو **جين بدون منطقة مراقبة خاصة به** ووظيفته "الإخبار" اذا كان المقطع الموجود بقربه يعمل كمنطقة مراقبة. جين مُخبر نموذجي هو مقطع DNA يُشفر لبروتين يمنح الخلية التي يتم التعبير عنه فيها لونًا.

كمثال لجين مُخبر هو مقطع من ال DNA الذي يُشفر ل **GFP (green fluorescent protein)**، اذا تم التعبير عن GFP في الخلية تُشع الخلية باللون الاخضر.




أ1. مقطع نشك بأنه منطقة مراقبة
أ2. حامل وفيه جين مُخبر بدون منطقة مراقبة
EcoR I
BamH I
EcoR I
EcoR I
1
2
3
Amp^R
حامل لجين مُخبر بدون منطقة مُراقبة
جين مُخبر (الجين المشفر ل GFP)
ب1. قطع بإنزيم/ انزيمات مناسبه
ب2. قطع بإنزيم/ انزيمات مناسبه
ج. الربط
تنتج اجزاء مقاطع التي تُستعمل في الفحص المُعد لتحديد من بين المقاطع يُشمل منطقة مراقبة
BamH I
EcoR I
حامل لجين مُخبر +مقطع مختار 1
BamH I
EcoR I
حامل لجين مُخبر +مقطع مختار 2
BamH I
EcoR I
EcoR I
حامل لجين مُخبر +مقطع مختار 3
د. ادخال نسخ عديدة من كل حامل للخلايا في المستنبت
مظهر الخلايا من خلال ميكروسكوب ضوئي
ه. تسلط ضوء ازرق
مظهر الخلايا من خلال ميكروسكوب فلورسنتي

تلخيص :

- في حالة التعبير عن الجين المُخبر يُمكن القول أن عامل نسخ او عوامل نسخ ارتبطت بموقع المُراقبة المفحوص ومكنت من انتاج ال RNA للجين المُخبر بواسطة ال RNA بوليميراز .
- بسبب عدم وجود منطقة مراقبة في الحامل الاصلي الذي يتواجد فيه الجين المُخبر فإن إدخال هذا الحامل الى الخلايا لا يؤدي الى التعبير عن البروتين للجين المُخبر، وتبقى هذه الخلايا عديمة اللون.
- حتى نحدد أن مقطع DNA معيّن يشكل منطقة مراقبة نسخ، يجب دمج مقاطع ال DNA التي نفحصها داخل الحامل الاصلي بجوار الجين المُخبر. في المرحلة التالية يتم إدخال كل بلاسميد راكومبنتي ناتج الى الخلايا وفحص أذا تم التعبير عن الجين المُخبر.
- اذا تم التعبير عن الجين واشعت الخلايا باللون الاخضر، فإن المقطع المفحوص يُشكل منطقة مراقبة نسخ في الخلايا المفحوصة. بالمُقابل اذا لم يتم التعبير عن الجين المُخبر وبقيت الخلايا بدون لون فإن المقطع الذي تم دمجه لا يُشكل منطقة مراقبة نسخ في الخلايا المفحوصة.
- مع هذا يُمكن أن يشكل المقطع الذي نبحثه منطقة مراقبة في خلايا اخرى أو في ظروف اخرى فيها تتواجد عوامل نسخ مناسبة.
- في مقطع ال DNA الذي يُشكل منطقة مراقبة كمقطع 1 في الرسم السابق يوجد ايضًا مقطع اصغر، هذا المقطع هو التسلسل الذي يرتبط به عامل النسخ ويُسمى ايضًا باسم موقع الربط "אתר קישור " .

ملاحظة هامة:

- من المهم أن نعرف أن مناطق المُراقبة تعمل فقط في خلايا مُعينة من خلايا الكائن. احد الاسباب لذلك ان عوامل النسخ الضرورية لعمل منطقة مُراقبة مُعينة لا تتواجد في جميع الخلايا. **لذلك يُمكن ان نفهم أن منطقة مراقبة مصدرها من الانسان لا تعمل فى خلية بكتيريا والعكس صحيح.**

- **تذكّر**

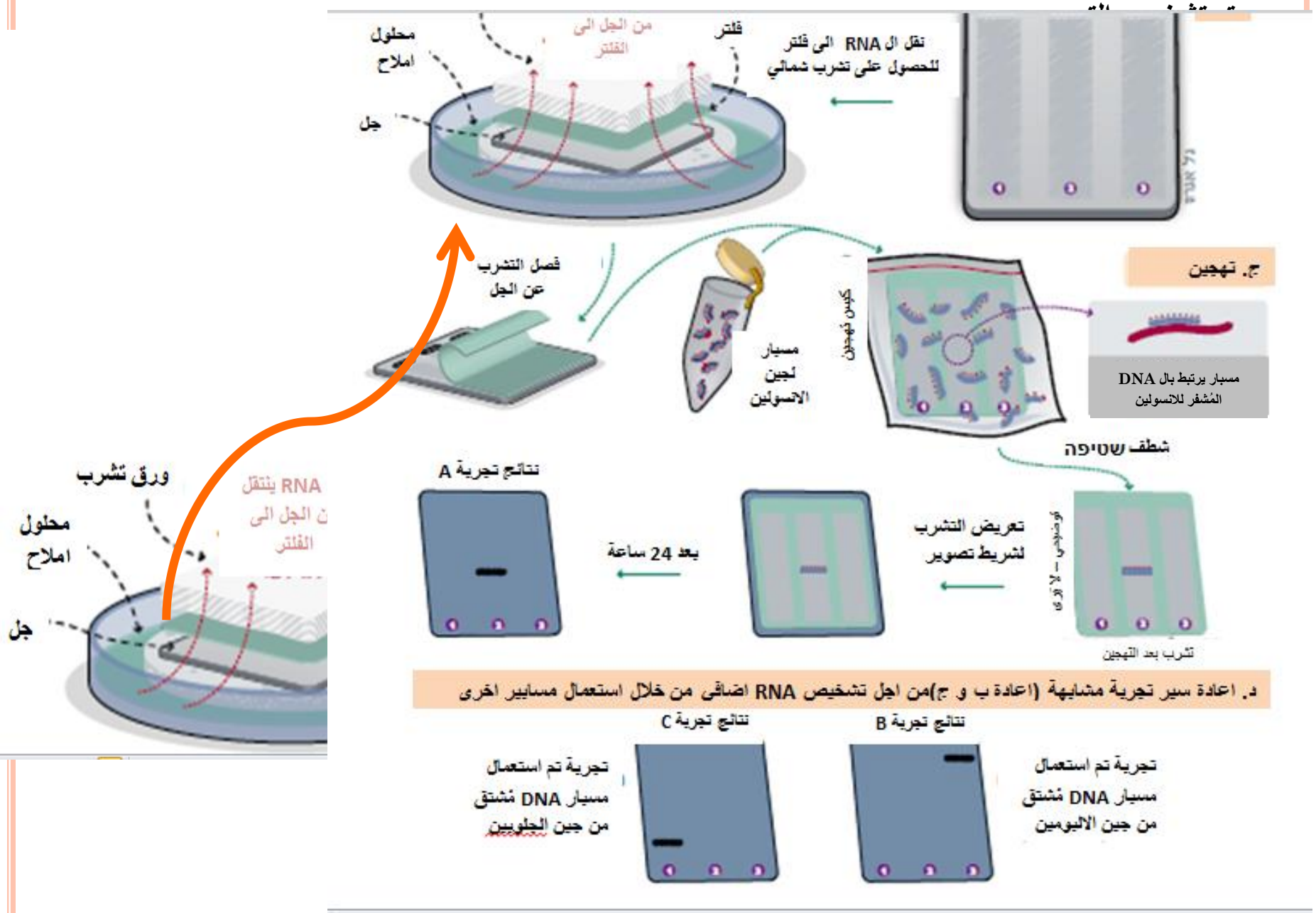
في الخلية النموذجية توجد المئات من عوامل النسخ الخاصة. لكل جين مجموعة مُحدّدة من مواقع الربط الخاصة به الموجودة في منطقة المُراقبة للجين والتي تربط عوامل نسخ خاصة به.

تشخيص التعبير عن الجينات

تشخيص التعبير عن ال RNA

- التعبير عن الجين يتعلق بنوع الخلية وفي الظروف التي تسود بيئتها.
- مثلاً الجينات التي تُشفر للأجسام المضادة يتم التعبير عنها في خلايا جهاز المناعة فقط.
- المعلومات عن التعبير عن جين وبالذات معلومات عن الزمن الذي يتم فيه التعبير عنه يُمكنها أن تُساعد في معرفة وظيفة هذا الجين .مثلاً جين الذي ينتج منه RNA في الزمن الذي تبدأ فيه الخلايا بالانقسام يُمكن أن يكون له وظيفة في انقسام الخلايا.
- عندما نقوم بتشخيص التعبير عن جين يجب أولاً تشخيص التعبير عن ال RNA التابع له أي تشخيص كمية ال RNA جودته وزمن التعبير عنه.
- من المهم أن نفهم أن كمية ال RNA لجين مُعين تتعلق بعوامل أخرى بالإضافة لوتيرة النسخ. ال RNA الناتج في الخلية يتواجد فيها فقط لفترة مُحددة، زمن منتصف الحياة (זמן מחצית חיים). زمن منتصف الحياة ل RNAللجينات المُختلفة يتراوح بين عدة دقائق وحتى عدة ايام وهو يتأثر ويتحدد بحسب عدة عوامل.

التشرب الشمالي תספיג צפוני (NORTHERN BLOT)



مُحاكاة

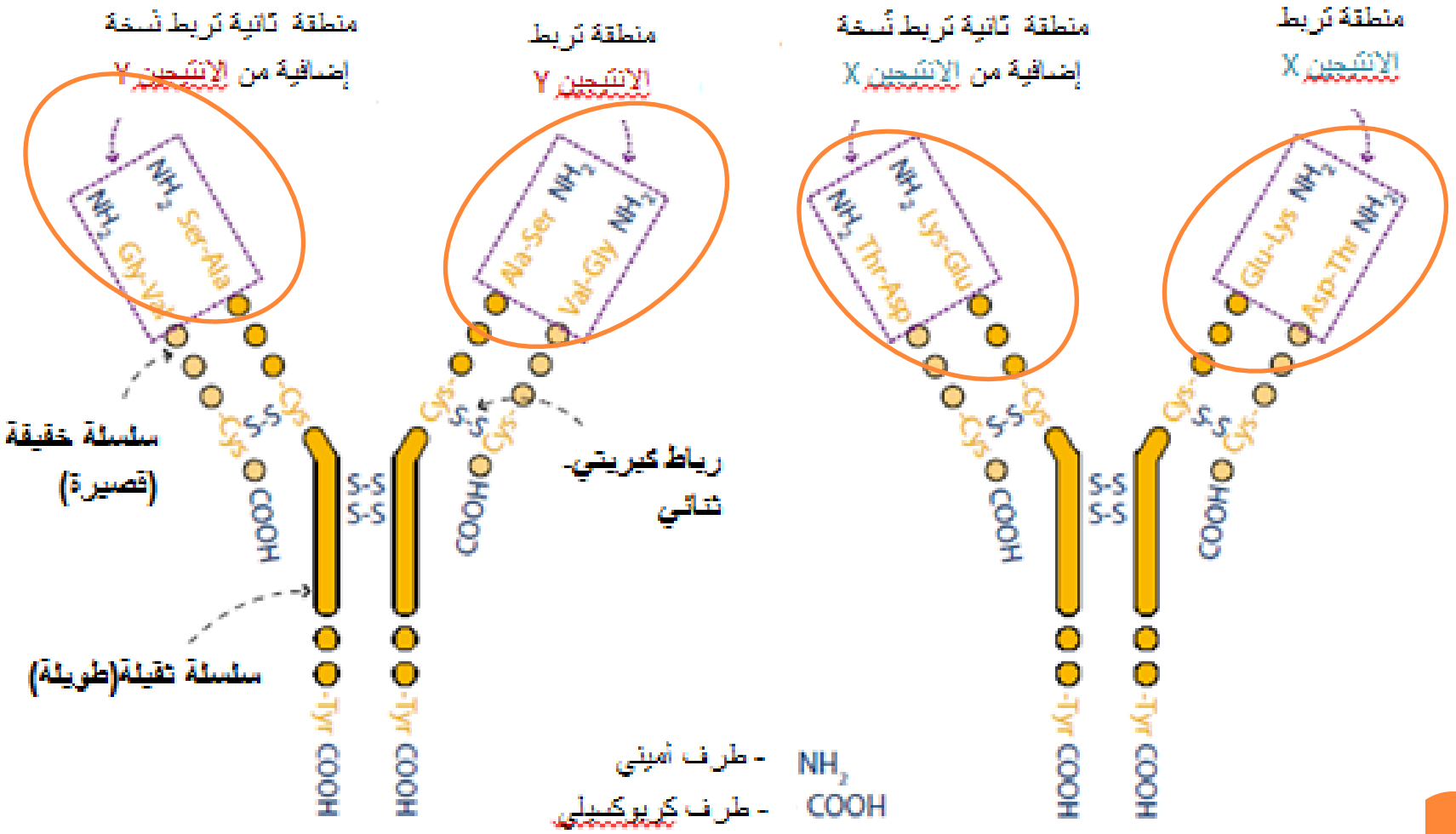
https://www.youtube.com/watch?v=KfHZFyADnNg

تشخيص التعبير عن البروتينات

- إن تشخيص وجود بروتين معين في الخلية والكمية الموجودة منه في الخلية يُمكن أن يُساعد في تحديد وظيفة الجين المُشفر لهذا البروتين وفي تحديد وظيفة البروتين في الخلية.
  - مثلًا إذا ازدادت كمية بروتين معين في ظرف مُعين (مثلاً بعد التعرض للأشعة)، يُمكن أن نُخمن أن لهذا البروتين وظيفة في تأقلم الخلية مع الوضع الجديد الذي تتواجد فيه.

- كمية RNA أكبر ⟵ كمية بروتين أكبر

لتحديد كمية بروتين مُعين في الخلية في وضع مُعين، ولمعرفة إذا كان بروتين مُعين مرتبط ببروتين اخر وهل يؤثر الارتباط على فعالية البروتين نقوم باستعمال:

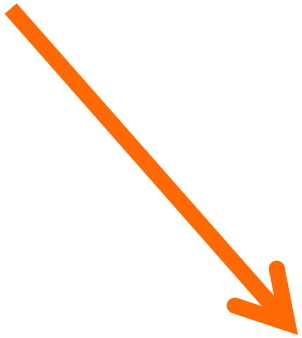


الجسم المُضاد (נוגדן) هو الأداة الأكثر أهمية واستعمالًا لمعرفة هذه المعلومات

يتم استعمال الجسم المُضاد للكشف عن وجود البروتين وكميّته بواسطة عدة طرق :

التشرب الغربي

Western blot- תספיג מערבי

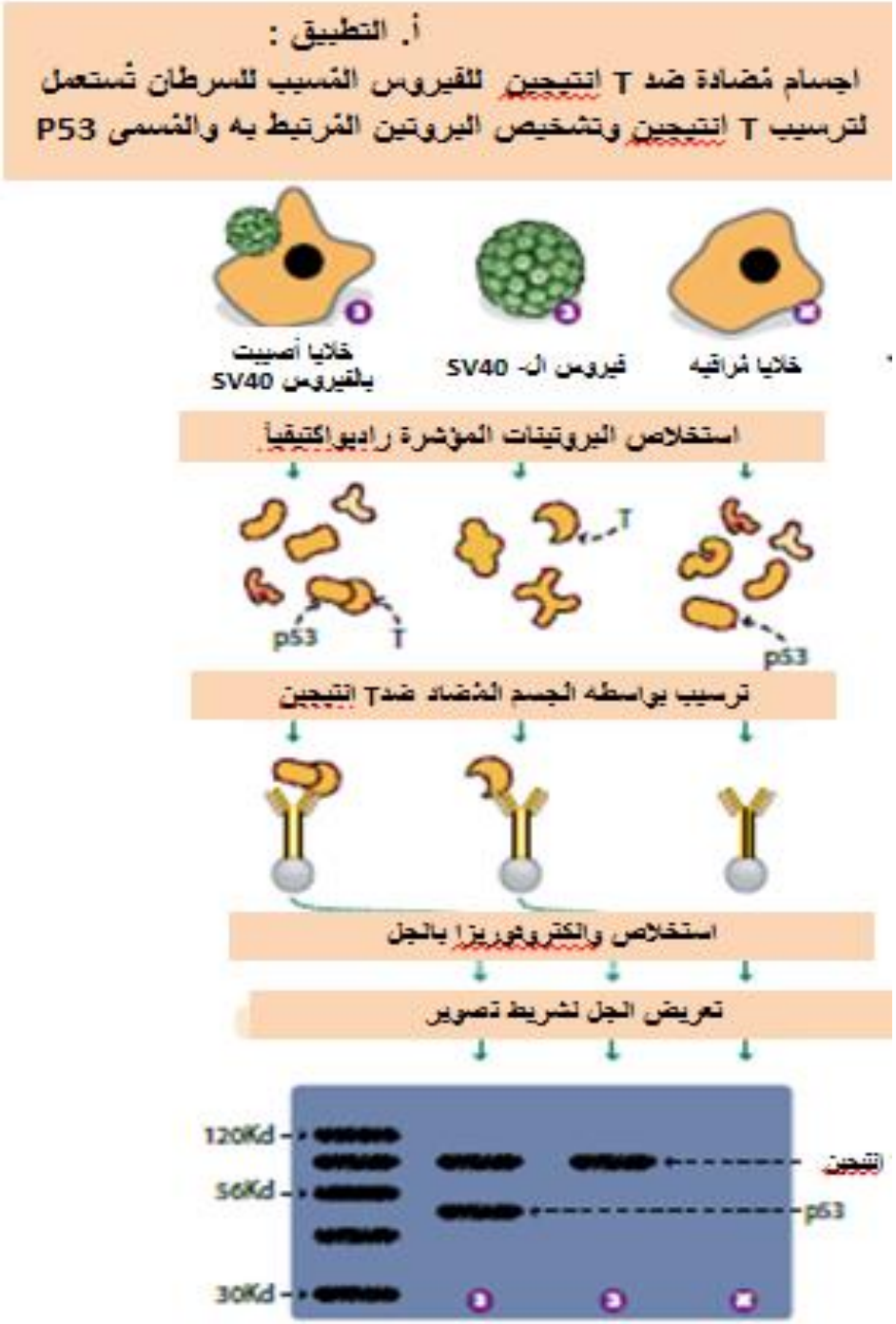


الترسيب بواسطة الأجسام المُضادة

Immunoprecipitation

أ- الترسيب بواسطة الأجسام المُضادة (IMMUNOPRECIPITATION)

- المرحلة الأولى: من أجل ترسيب وعزل بروتين بواسطة الاجسام المُضادة يتم تثبيت الاجسام المُضادة المناسبة على سطح كريات صغيرة من الجل.
- المرحلة الثانية: يتم حضن الاجسام المُضادة المُثبتة مع مُستخلص بروتينات الخلايا التي نُميّت بوجود حامض أميني مُشع (تصبح كل بروتينات الخلية مُشعة)، هذا الامر يُمكّن من ربط البروتين المناسب في حال وجوده في مستخلص البروتينات.
- المرحلة الثالثة: بعد ارتباط البروتينات بالأجسام المُضادة يتم ترسيب الكريّات ومعها ترسب الاجسام المُضادة الموجودة على الكريّات والتي تربط البروتينات التخصصيّة لها بحسب موقع الربط.
- المرحلة الرابعة: بعد ذلك يتم ابعاد البروتينات التي لم ترسب بواسطة عمليات شطف (שטיפה).
- المرحلة الخامسة: يتم فصل البروتين المطلوب عن الجسم المُضاد الراسب بواسطة بوفر مناسب.
- المرحلة السادسة: يتم تحريك البروتينات الراسبة في جل أكريلأميد.
- المرحلة السابعة: تعريض الجل لشريط تصوير يؤدي إلى ظهور خط اسود في المكان الذي يتواجد فيه بروتين مُشع.



أ. التطبيق :

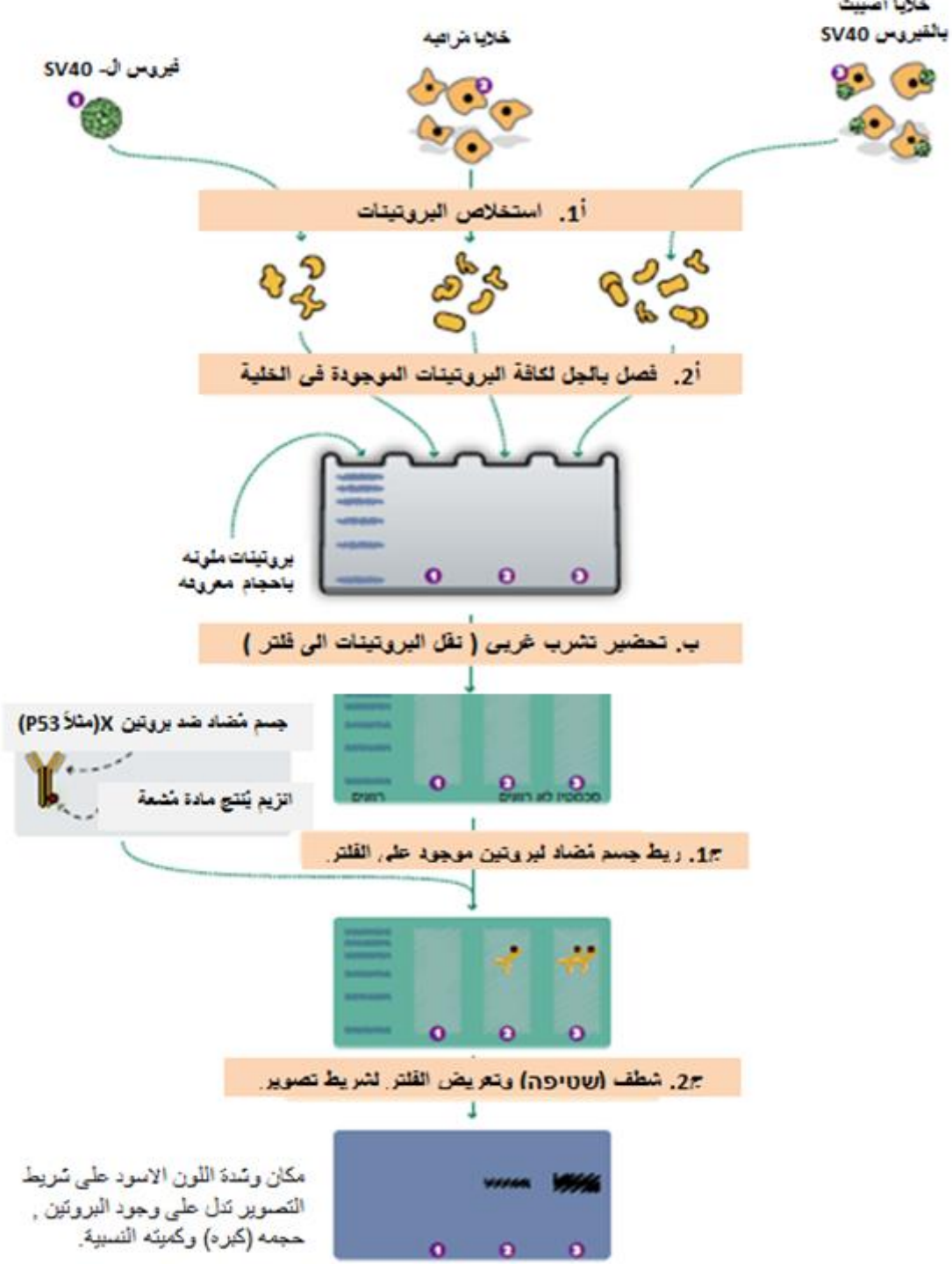
اجسام مُضادة ضد T انتيجين للفيروس المُسبب للسرطان تُستعمل لترسيب T انتيجين وتشخيص البروتين المُرتبط به والمسمى P53

- ❖ المثال التالي يعرض استعمال طريقة الترسيب لبحث السرطان الناتج بسبب الفيروسات .
- ❖ تم تحضير اجسام مُضادة ضد أحد بروتينات الفيروس SV40 الذي يُسمى T انتيجين (T antigen) لفهم كيف يسبب هذا الفيروس السرطان عند الحيوانات.
- ❖ نُميت الخلايا بوجود حامض اميني مُشع وأُجريَ ترسيب بروتينات بواسطة جسم مُضاد ضد T انتيجين.
- ❖ بعد فصل البروتينات المُشعة في الجل لوحظ وجود خط اسود في شريط التصوير الذي يُمثل T انتيجين.

- الترسيب بواسطة الجسم المُضاد ضد T انتيجين مَكّنت من تشخيص خط اسود في شريط التصوير والذي يُمثل بروتين اضافي طوله KD 53 في الخلايا التي أصيبت بالفيروس. هذا البروتين احد بروتينات الخلية وليس تابعاً للفيروس، يرسب هذا البروتين بمساعدة جسم مُضاد ضد T انتيجين لأن البروتين يرتبط ب T انتيجين ولا يرتبط بشكل مباشر مع الجسم المُضاد.

- توقع الباحثون ان استنساخ الجين المُشفر ل P53 يُمكّن من فهم وظائف P53 في العمليات التي تؤثر على انقسام الخلايا ومرض السرطان.

ب- التشرب الغربي (תספיג מערבי - WESTERN BLOT)



فيلم يعرض الطريقة

https://www.youtube.com/watch?v=mjbr3beDslo

- الرسم السابق يُمثل تجربة تم استعمال التشرب الغربي فيها بهدف بحث البروتين P53.
- **الخطوات:**
  - تم استخلاص البروتينات من الفيروسات (1), من خلايا المُراقبة (2) ومن الخلايا التي أصيبت بالفيروسSV40 (3).
  - بعدها تمّ فصل خليط البروتينات في الجل والحصول على تشرب غربي.
  - عُرّض التشرب الغربي الى جسم مُضاد بإمكانه ربط P53.

- **نتائج التجربة**
  - ظهر أن البروتين P53غير موجود في الفيروسات وانما يتواجد في الخلايا.
  - هكذا كان من المعروف ان الخلايا التي أصيبت بالفيروس SV40 تم التعبير عن T انتيجين للفيروس. الاستنتاج الذي ينبع من النتائج المعروضة هي أن T انتيجين الخاص بالفيروس يربط البروتين P53 الخاص بالخلايا.
  - تجارب اضافية أظهرت أن T انتيجين يُشوش عملية تفكيك البروتين p53 وبذلك تزداد كميته في الخلايا. الفرضية التي طُرحت هي انه بتراكم P53 في الخلايا التي اصيبت بالفيروس تغيرت وظيفة p53 وأن هذا التغيير له علاقة لتحويل الخلية المُصابة بالفيروس الى خلية سرطانية .

أ- التشرب الغربي (תספיג מערבי - Western blot)

من أجل **تحديد وجود بروتين** مُعيّن في الخلية و**تحديد كمية** النسبيّة فيها، نقوم بما يلي:

المرحلة أ': إستخلاص بروتينات من الخلايا ومن ثُم يتم فصل البروتينات المستخلصة بالجل.

المرحلة ب': يتم نقل البروتينات إلى فلتر للحصول على **" تشرب غربي" (Western blot-תספיג מערבי).**

المرحلة ج': استعمال جسم مُضاد يتعرّف بشكل تخصصي على البروتين المطلوب فحص وجوده على التشرب وتشخيص كميته النسبية في الخلايا، الجسم المضاد المستعمل يربط جزء مُشع.

المرحلة د': تعريض التشرب لشريط تصوير، الإشعاع المنطلق من الأجسام المُضادة يؤدي إلى إنتاج لون أسود على شريط التصوير. شدة اللون تدل على الكمية النسبية للبروتين في الخلايا التي أُستخلص منها.

مُلاحظة : بالإمكان استعمال جسم مُضاد يربط إنزيم وعندها بدل التعريض لشريط تصوير يتم إضافة سُبسترات الإنزيم بحيث أنّ ناتج عمل الإنزيم عليه هو ناتج مُلوّن. شدّة اللون تدلّ على الكميّة النسبيّة له في الخليّة.

مُقارنة بين التشرب الشمالي والتشرب الغربي

أوجه الشبه:

1. فصل الجُزيئات عن بعضها البعض يتم بسبب الشحنة الكهربائية السالبة لها بحيث أنَّ الجُزيئات الكبيرة تكون قريبة من البئر والجُزيئات الصغيرة تكون بعيدة عن البئر.

2. في كلتاهما نستعمل شريط تصوير يؤدي إلى إنتاج خط اسود (شريط- פס أو בנד) في المكان الذي يتواجد فيه اشعاع.

3. يتم استعمال مسبار راديوإكتيفي (مؤشر- مجس- גלאי). في أيامنا تتواجد انواع أخرى كالمسبار الانزيمي.

4. في كلا العمليتين نستعمل فلتر أو غشاء لنقل الجُزيئات إليه.

مُقارنة بين التشرب الشمالي والتشرب الغربي

أوجه الإختلاف:

التشرب الشمالي	التشرب الغربي
1. طريقة لتشخيص جُزيئات RNA.	1.طريقة لتشخيص جُزيئات البروتينات.
2. المجس المُستعمل هو حامض نووي (DNA أو RNA) والأكثر استعمالًا هو مجس الDNA.	2. المجس المستعمل هو جسم مُضاد.
3. لا يتم استعمال SDS خلال عملية فصل الجُزيئات لأن جُزيئات الRNA مشحونة بشحنة سالبة.	3. يتم استعمال SDS لشحن البروتينات بشحنة سالبة.
4.يتم استعمال الحرارة عند استعمال مجس ال DNA لفصل جدائل ال DNAعن بعضها.	4. لا حاجة لرفع درجة الحرارة.