

## تصميم بلازميد لإنتاج أنزيم Pfu بوليميراز معدّل باستخدام قالب pTi والتأكد من تركيبه

جوزيف جورج شنكجي<sup>1</sup> أحمد شمس الدين شعبان<sup>2</sup> أنطونيوس مخائيل الداود<sup>3</sup>  
سامر جعفر حاج قدور<sup>4</sup>

1. طالب دكتوراه، قسم هندسة التقانات الحيوية، كلية الهندسة التقنية، جامعة حلب.

[josephshenkji94@alepuniv.edu.sy](mailto:josephshenkji94@alepuniv.edu.sy)

2. أستاذ مساعد، قسم هندسة التقانات الحيوية، كلية الهندسة التقنية، جامعة حلب.

[shaabany57@alepuniv.edu.sy](mailto:shaabany57@alepuniv.edu.sy)

3. مدير بحوث علمية، قسم التقانات الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية، دمشق. [aaldaoude@acc.org.sy](mailto:aaldaoude@acc.org.sy)

4. مدرس، قسم الطب المخبري، كلية الطب البشري، جامعة حلب. [s.hajkaddour@alepuniv.edu.sy](mailto:s.hajkaddour@alepuniv.edu.sy)

### الملخص

يناقش هذا البحث تصميم بلازميد تعبيرى لأنزيم Pfu بوليميراز معدّل ضمن قالب بلازميدي من نوع pTi يُستخدم لأول مرة من أجل هذا الغرض ويحتوي على عدة صفات نوعية تجعله متفوقاً على الأنزيمات التجارية العادية، حيث دُمجت شدّفات لجزء Sso7d البروتيني لزيادة ثباتية أنزيم البلمرة من حيث قوة ارتباطه مع التسلسل الهدف للقيام بالتضخيم بسرعة وثباتية عالية. استُخدم في التصميم البرمجي *in-silico* عدة قواعد بيانات مفتوحة المصدر، وتم اعتماد منصة Benchling السحابية لتصميم البلازميد والتأكد من فعاليته برمجياً، وبعد التجميع نتج بلازميد تعبيرى طوله 7476bp يحتوي على مشغل Lac وجين مقاومة للكاناميسين ومحفز T7 لضمان مردود كبير في التعبير عن الأنزيم الهدف، وتمت إضافة ذيل متعدد الهيستيدين x10His من أجل تسهيل عملية تنقية الأنزيم في المراحل اللاحقة للإنتاج.

وللتأكد من البلازميد في التجارب المخبرية تم تحديد مقاييس للتقطيع الأنزيمي بانزيم HindIII مع محاكاة شكل الرحلان الناتج برمجياً وعمل رحلان فعلي لعينة مُصنّعة من البلازميد بطريقة غيبسون لمقارنة تطابق النتائج البرمجية مع النتائج الفعلية، بالإضافة إلى ذلك تم تصميم بادئات primers نوعية للقيام بالسلسلة وتم التأكد من فعالية جين pfu بوليميراز من خلال عملية السلسلة لبعض الشدّفات المختارة منه ورُصدت التسلسلات من دون طفرات بالموقع الفعال، ما يجعل هذا البلازميد مرشحاً مقبولاً للاختبار بالعمليات اللاحقة لإنتاج أنزيم Pfu بوليميراز.

الكلمات المفتاحية: بلازميد - هندسة وراثية - بوليميراز - PFU

تاريخ الإيداع: 2024/02/25

تاريخ القبول: 2024/08/21



حقوق النشر: جامعة دمشق -

سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق

النشر بموجب الترخيص

CC BY-NC-SA 04

# Designing of a plasmid to produce a modified Pfu polymerase enzyme using the pTi template and verifying the construct

Joseph George shenekji<sup>1</sup> Ahmed Shams Al-Dien Shaaban<sup>2</sup>  
Antonius Michael Al-Daoude<sup>3</sup> Samer Jafar Haj Qaddour<sup>4</sup>

1. PhD student, Department of Biotechnology Engineering, Faculty of Technical Engineering, University of Aleppo.

[josephshenekji94@alepuniv.edu.sy](mailto:josephshenekji94@alepuniv.edu.sy)

2. Assistant professor, Department of Biotechnology Engineering, Faculty of Technical Engineering, University of Aleppo.

[shaabany57@alepuniv.edu.sy](mailto:shaabany57@alepuniv.edu.sy)

3. Research Director, Department of Biotechnology, Syrian Atomic Energy Commission, Damascus. [aaldaoude@aec.org.sy](mailto:aaldaoude@aec.org.sy)

4. Teacher, Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Aleppo. [s.hajkaddour@alepuniv.edu.sy](mailto:s.hajkaddour@alepuniv.edu.sy)

## Abstract

This research discusses the design of an expression plasmid for a modified Pfu polymerase enzyme within a pTi plasmid template that is used for the first time for this purpose. It contains several different characteristics that make it superior to regular commercial enzymes and is multi-use with desirable features. Some sequences were incorporated into a Sso7d protein molecule that increases the stability of the enzyme and strengthens the Polymerization by fortifying the attachment of the polymerase on the target chain to carry out amplification with high speed and stability.

The in-silico software design used several open-source databases provided from previous research articles, and the Benchling cloud platform was adopted to design the plasmid and ensure its effectiveness. After assembly, an expression plasmid of 7476bp length was produced that contains the Lac operator, a kanamycin resistance gene, and a T7 promoter to ensure abundant expression of the enzyme, and a x10His poly histidine tail was added in order to facilitate purification of the enzyme in the subsequent stages of production.

To confirm the plasmid in laboratory experiments, standards were determined for enzymatic cleavage using the HindIII restriction enzyme, while simulating the resulting electrophoresis form and performing actual electrophoresis to compare the conformity of the program results with the actual results. In addition, specific primers were designed to carry out the sequencing, and the effectiveness of the pfu polymerase gene was confirmed through the sequencing process for some selected fragments, sequences without mutations in active sites were observed, making this plasmid an acceptable candidate for further testing to produce the Pfu polymerase enzyme.

**Keywords:** Plasmid – Genetic Engineering - Polymerase - PFU

Received: 25/02/2024

Accepted: 21/08/2024



**Copyright:** Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

## المقدمة:

## 1. نبذة عن أنزيمات البوليميراز المستخدمة بتفاعل الـ PCR:

تقوم أنزيمات بلمرة الدنا أو البوليميراز بالحفاظ على حياة الكائنات الحية وضمان نسلها من خلال مضاعفة الحمض النووي للكائنات حقيقية وبدائية النوى، وينتج عن مضاعفتها نسخة طبق الأصل عن الحمض النووي يستخدمه الكائن الحي لبناء خلايا جديدة.

وتعد أنزيمات البوليميراز من أهم العناصر الأساسية في البيولوجيا الجزيئية التطبيقية والتقانات الحيوية، حيث استخدمها العالم كاري موليس عام 1983 في تفاعلات البوليميراز التسلسلي وأسس بذلك حقبة جديدة في مجال التقانات الحيوية، ومن ذلك الحين برزت عدة تصنيفات لأنزيمات بلمرة الحمض النووي فمنها المقاوم حرارياً ومنها المصحح للأخطاء والذي يطيل الشدافات الطويلة من الحمض النووي [1].

تتميز العتائق *Archea* بخصائصها الفريدة وجيناتها ذات التعبير القوي في الظروف البيئية القاسية، فعلى الرغم من وجود بكتيريا مُحِبَّة للحرارة *thermophile* تُستخدم أنزيماتها بشكل تقليدي في تفاعل البوليميراز التسلسلي مثل بكتيريا *Thermus aquaticus* الخيار التقليدي لصناعة أنزيم تاك بوليميراز *Taq Polymerase* لكن هناك حاجة كبيرة لأنزيمات قادرة على تصحيح الأخطاء والمقاومة الحرارية بشكل أفضل، لذا كان الخيار لاستخدام جينات عُتَيْقَة *Pyrococcus furiosus* المنتجة لأنزيم *Pfu* بوليميراز القادر على تحمل الشروط الحرارية الأقوى والذي يمتلك فعالية تصحيح الأخطاء غير الموجودة في أنزيم تاك بوليميراز.

## 2. أنزيم pfu وخصائصه المميزة:

تم اكتشاف أنزيم *PFU* بوليميراز من قبل العالم إريك ماثور الباحث في شركة التكنولوجيا الحيوية ستراتاجين الأمريكية عام 1991، وتبين أن هذا الأنزيم يظهر قدرة فائقة على تصحيح الأخطاء مقارنة بأنزيم التاك بوليميراز الشائع آنذاك مع مقاومة حرارية أكبر، وذلك فتح المجال أمام استخدام انزيمات العتائق المحتملة للظروف القاسية في تطبيقات البيولوجيا الجزيئية الصناعية [2].

ويتميز أنزيم *PFU* بوليميراز بالصفات التالية [3]:

- يبلغ وزنه الجزيئي 90-110 كيلو دالتون.
- يمكنه تضخيم سلسلة هدف من الحمض النووي يصل طولها إلى 2 كيلو أساس دون أخطاء.
- سرعة الاستطالة هي 0.2 ~ 0.4 كيلو أساس بالدقيقة بمجال درجات حرارة بين 70-75 درجة مئوية.
- درجة حرارته المثالية للتضخيم تعد قريبة من 75 درجة مئوية.
- يبقى 95% من كمية الأنزيم الموضوعة بالتفاعل نشطاً بعد تحضينه لمدة ساعة بدرجة حرارة 98 درجة مئوية، وهذا يدل على ثباتيته الشديدة.

• يتمتع أنزيم بوليميراز الحمض النووي *Pfu* بنشاط النوكلياز الخارجي من 3' إلى 5'، ما يعني أنه قادر على تصحيح النوكليوتيدات التي تمت إضافتها بشكل خاطئ من خلال الرجوع خلفاً على سلسلة الحمض النووي والتحقق من المطابقة، وهذا يفيد في تفاعلات الـ

PCR التي تحتاج على دقة في التطبيقات اللاحقة لها (Downstream applications). [4]

ويستخدم أنزيم *Pfu* بوليميراز في التطبيقات التالية:

- تفاعلات PCR عالية الدقة.
- الاستنساخ في نواقل تعبيرية حادة الأطراف *blunt*.

• توليد الطفرات في مواقع محددة.

• تصنيع الجينات المطلوبة للاستساخ.

### 3. التصميم البرمجي للبلازميدات:

يعد التصميم البرمجي للبلازميدات مرحلة أولية تجرى حاسوبياً **in-silico** بشكل سابق لعملية تصنيع البلازميد الذي نرغب في استخدامه بالتعبير الجيني لبروتين أو أنزيم معين قبل البدء بالتجارب الإنتاجية في المختبر، وتتميز عمليات تصميم البلازميدات برمجياً باستخدام منصات برمجية وقواعد بيانات للجينات وقوالب النواقل التعبيرية البلازميدية **Backbone** بالإضافة إلى القدرة على ترتيب البلازميد مع كل الخصائص الإضافية المرغوبة للحصول على أفضل النتائج وتسهيل عملية الانتخاب للسلالات المنتجة وزيادة كفاءة عملية التنقية ومضاعفة التعبير الوراثي تبعاً للمحفز الموضوع بالتصميم.

تتطلب عملية تصميم البلازميد إدخال الأقسام الأساسية التالية [5]:

• الجين الهدف المطلوب التعبير عنه.

• جين انتخابي ويكون بالعادة جين مقاومة للمضادات الحيوية أو واسم مفلور مثل البروتين الأخضر المفلور **GFP** الذي يستخدم في الكثير من الأبحاث الخاصة بمجال التقانات الحيوية ورصد التعبير المورثي [6].

• محفز للتعبير الوراثي ويدعى أيضاً الأوبرون **Operon** وهو عبارة عن تسلسل يساعد في زيادة عملية التعبير الجيني ويوضع قبل الجين الهدف.

• قالب الناقل التعبيري **Backbone** وهي قطعة بلازميد لا تحتوي على الجين الهدف، يمكن قصها في موقع التأشير المتعدد **MCS** وإلصاق الجين الهدف، ويحتوي على موقع منشأ التضاعف اللازم لانتساخ البلازميد **ORI**.

ومن المهم الالتزام بحجم بلازميد معين وعدم إدخال القطعة بموقع مهم لتضاعف البلازميد وتحقيق المقاومة الحيوية الضرورية للانتخاب، مع مراعاة اختيار سلالة بكتيرية مناسبة للتضاعف ومن بعدها سلالة بكتيرية تعبيرية مناسبة.

### الدراسات المرجعية:

• استطاع الباحث مورتن نورهولم تصميم بلازميد معبر عن أنزيم **PFU** بوليميراز طافر مصمم لاستبدال أساس اليوراسيل من التسلسلات في البلازميدات والتطهير في الموقع الموجه ما يفيد في تطبيقات الهندسة الوراثية، ولكن في هذا البحث تم الاستفادة من تعديل التسلسل المعبر عن أنزيم **PFU** بوليميراز لإنتاج أنزيم قادر على الحفاظ على التسلسل بشكل خالٍ من الأخطاء وقادر على التأشير الوراثي بشكل دقيق [4].

• وفق بحث منشور في روسيا 2021 من قبل الدكتور سارسن وزملائه تبين أن أنزيم تاك بوليميراز المعدل بإضافة **Sso7d** أعطى إطالة تفوق أنزيم تاك بوليميراز العادي، واعتمد في هذا البحث على هذه الشدفة لزيادة ثباتية ارتباط الأنزيم بالتسلسل الهدف ما ضاعف من إمكانيات الأنزيم في الثبات الحراري الارتباط النوعي بالسلسلة أثناء الاستطالة ويمكن من الإطالة لآلاف النكليوتيدات. [7]

• أظهر بحث منشور عام 2023 من معهد الكيمياء الحيوية والطب الأساسي في روسيا كيفية التحوير الوراثي وإنتاج أنزيم بوليميراز مستخلص من **Massilia aurea**، وذلك بشكل بخطوات مرحلية تشبه بخطواتها الأساسية الطريقة التي تم اعتمادها في هذا البحث للتحوير الوراثي لإنتاج أنزيم **Pfu** بوليميراز بشكل عام، لكن هنا تم اعتماد منصة **Benchling** لتصميم البلازميد المنتج للأنزيم الهدف. [8]

## مواد البحث وطرائقه:

استُخدمت عدة قواعد بيانات مثل NCBI و GENBANK وأداة تصميم البلازميد التعبيري في منصة Benchling السحابية لتصميم البلازميد الهدف، ولدراسة التراكيب الممكنة للبلازميد تم الرجوع لموقع مخزن البلازميدات العالمي Addgene.

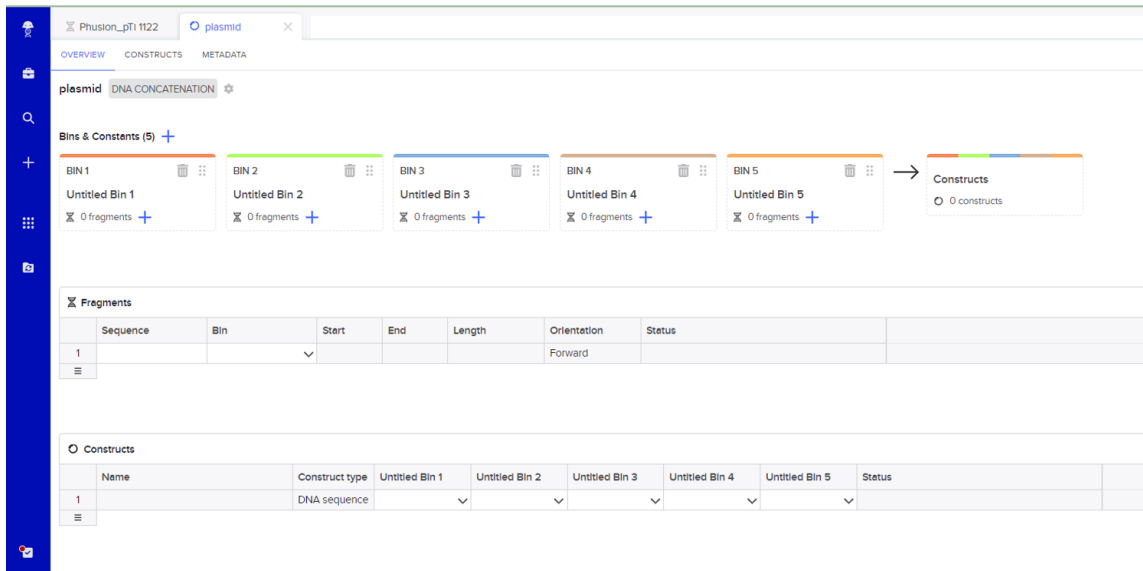
### 1. منصة Benchling:

اعتمد تصميم البلازميد المعبر عن أنزيم pfu بوليميراز على منصة Benchling، وهي منصة سحابية مختصة بالبحث والتطوير في مجال علم الأحياء وتبادل المعلومات والبيانات بين الباحثين، وتأسست شركة Benchling بمعهد إم آي تي وتفيد المنصة في الخدمات التالية:

- إنشاء وتنظيم وتتبع المشاريع والتجارب والعينات في بيئة مركزية للباحثين.
- توفير أدوات قوية لتصميم وتحرير وتسلسل الجزيئات الحيوية، مثل الحمض النووي والبروتينات والخلايا.
- دعم التكامل مع أجهزة المختبر الآلية والذكاء الاصطناعي لزيادة كفاءة ودقة البحث.
- تسهيل التعاون والاتصال بين الباحثين داخل وخارج المؤسسات، وتحمي الملكية الفكرية والامتثال للمعايير الأخلاقية.

تم استخدام منصة Benchling لتصميم البلازميد من خلال اتباع المراحل التالية:

- 1- تم إنشاء حساب على منصة Benchling من خلال الدخول إلى رابط المنصة [www.Benchling.com](http://www.Benchling.com).
- 2- تم النقر فوق علامة التبويب "إنشاء +" في أعلى الجانب الأيمن من الصفحة، واختيار إدخال تسلسل DNA/RNA جديد.
- 3- تم إدخال التسلسل المطلوب من خلال النسخ من مصدره ولصقه أو يمكن وضع رابط مصدر التسلسل.
- 4- تم تكرار العملية لإدخال عدة تسلسلات مطلوبة وحفظها في المكتبة الخاصة على المنصة لتجميعها في بلازميد لاحقاً.
- 5- بعد وضع كل التسلسلات المطلوبة من الدنا تم اختيار تجميع التسلسلات التي وضعتها باختيار **Assemble DNA/RNA** **sequences by concatenation**.
- 6- تم ملء الفراغات الظاهرة بالتسلسلات المراد إدخالها ومنها هيكل الناقل البلازميدي والجين الهدف والقطع الأخرى المطلوبة كما في الشكل 1.
- 7- تم طلب النتيجة بأن تظهر كبلازميد حلقي للحصول على البنية المطلوبة، وتم إنشاؤها أوتوماتيكياً لمراعاة الشروط التعبيرية المناسبة للبلازميد.
- 8- نشأ ملف التجميع الذي تم تحضيره، وتم الدخول إليه ووضع التسميات التوضيحية **Annotation** كما يجب، علماً أنه يمكن تغيير مكان دخول القطعة أو موقعها من خلال تحديد التسلسل وقطعه وإعادة إدخاله بموقع آخر.



الشكل (1): واجهة منصة Benchling لإدخال تسلسلات وتركيبها في بلازميد

طريقة ثانية لإدخال الجين الهدف:

1- إدخال الهيكل البلازميدي مثل الخطوة 2 بالفقرة السابقة.

2- تحديد النقطة المراد إدخال الجين المطلوب فيها، ويجب مراعاة إدخال الجين بموقع تقطيع فريد غير متكرر مثل موقع تقطيع أنزيم NdeI.

3- إدخال الجين الهدف أو القطعة المرادة من خلال النقر بالماوس بالزر اليميني واختيار **insert sequence** والتأكد أن القطعة المدخلة تحتوي على نفس نهايات أنزيم التقطيع المطابقة.

4- بعد ظهور البلازميد المطلوب والانتهاء من التجميع تم تحميل النتيجة من خلال النقر على أيقونة (i) واختيار تحميل الملف بالصيغة المرادة، وهناك صيغة FASTA أو GenBank كما تم تحميل الرسم التوضيحي والتسلسل بصيغة PDF.

## 2. التسلسلات المستخدمة في صناعة بلازميد PFU بوليميراز المعدّل

تضم أبرز التسلسلات المستخدمة في تصنيع بلازميد PFU بوليميراز المعدّل ما يلي:

### أ. جين PFU بوليميراز

وهو الجين المعبر عن أنزيم Pfu بوليميراز، وتم أخذ تسلسله من موقع NCBI وهو موقع المركز القومي الأميركي للتقانات الحيوية والمعلوماتية الحيوية، ورقمه التسلسلي GenBank: KF836420.1 ويبلغ طوله 2328 زوج قاعدي، ويعطي 775 حمضاً أمينياً.

تسلسل الجين:

```
5'atgatttagatgtggattacataactgaagaaggaaaacctgttattagctattcaaaaagagaacggaaaatttaagatagagcatgatagaac
tttagaccatacatftacgcccttctcagggatgattcaagattgaagaagftaagaaaataacgggggaaagggcatggaagattgtgagaattgtt
atgtagagaaggttgagaaaaagttctcggcaagcctattaccgtgtggaactttatttggaaacatcccaagatgttcccactattagagaaaaagtt
agagaacatccagcagttgtggacatcttgaatagatattccatttgaagagatacctcatcgacaaggcctaataccaatggagggggaagag
gagctaaagattcttgccttcgatatagaaccctctatcaagaaggagaagagtttggaaaaggcccaattataatgattagttatgcagatgaaatga
agcaaaggtgattacttgaaaaacatagatcttcatacgttgaggtgtatcaagcgagagagatgataaagagattctcaggattatcagggag
aaggatctgacattatagttactataatggagactcattcgacttccatatttagcgaaaagggcagaaaaactgggattaaattaaccattggaag
agatggaagcgagcccaagatgcagagaataggcatatgacggtgtagaagtcaagggaagaatacatttcgactgtatcatgtaataacaagga
caataaatctcccaacatacacactagagcgtgtatatgaagcaattttggaaaagccaaaggagaaggtatacgccgacgagatagcaaaagcctgg
gaaagtggagagaaccttgagagagttgccaataactcgatggaagatgcaaggcaacttatgaactcgggaaagaattccttccaatggaattcag
cttcaagattagttgacaacctttatgggatgttcaaggtcaagcacagggaaacctgtagagtggttcttacttaggaaagcctacgaaagaacga
```

agtagctccaacaagccaagtgaagaggagtatcaagaaggetcagggagagctacacaggttgattcgftaaagagccagaaaaggggtgtgg  
 gaaacatagtagcttagatcttagagccctatccctgattataattaccacaatgtttctccgatactctaaatcttgaggatgcaagaactatg  
 atategctctcaagtaggccacaagttctgcaaggacatccctgggtttataccaagtctcttgggacattgttagaggaaagacaaaagattaagaca  
 aaaatgaaggaaactcaagatcctatagaaaaatactcctgactatagacaaaaagcgataaaactcttagcaaatcttctacggatattatggcta  
 tgcaaaagcaagatggtagctgtaaggagtgtgctgagagcgttactgcctggggagaaagtacatcgagttagtaggaaggagctcgaagaaaagtt  
 tggattaaagtctctacattgacactgatggcctctatgcaactatccaggaggagaaagtgaggaaataaagaaaaggctctagaatttgtaaaa  
 tacataaattcaaagctccctggactgtagagcttgaatgaaaggggtctataagaggggattcttctgtaagaagaaggatgacagtaaatgatga  
 agaaggaaaagtcattactcgtggttagagatagtaggagagattggagtgaattgcaaaagaaactcaagctagagtttggagacaatactaaa  
 acacggagatgttgaagaagctgtgagaatagtaaaagaagtaatacaaaagcttgcacattgaaattccaccagagaagctcgaataatgatgca  
 gataacaagaccattatcagtagtataaggcgataggtcctcagtagctgttgcacaaagaaactagctgtaaaaggagttaaaaataagccaggaaatggt  
 aattggatacatagtagtagggcgatgggtccaattgcaatagggcaattctagctgaggaatacagatcccaaaaagcacaagtagcgcgagaata  
 ttacattgagaaccaggtcttccagcggtagcttaggatattggagggatttgatcacagaaggaggacctcagataccaaaagacaagacaagctgg  
 cctaactctggttaacattaaaaatcc3'

### ب. جين المقاومة للكاناميسين

وتم إدخاله في الهيكل القالب للبلازميد التعبيري، وأخذ من تسلسل جينوم الإشريكية القولونية برقم تسلسلي GenBank: GQ149347.1 من الموقع 2941 إلى الموقع 3711 ويحتوي جين المقاومة للمضاد الحيوي كاناميسين على 256 حمض أميني، وتسلسله كالتالي:

5'ttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcattcagattatcaataccatattttgaaaaagccgttctgtaaatgaaggagaa  
 aactcaccggagcagttccataggtaggcaagatcctggtagctgctgactcagctcagcaacatcaatacaacctattaatttccctcgtcaaaa  
 ataaggtatcaagtgagaaatccatgagtagcagactgaatccggtagaagtgcaaaagtttatgatttttccagactgttcaacagccagcc  
 attacgctcgtcatcaaaatcactcgatcaacaaaccgttattcattcgtgattgagcctgagcagagacgaaatcagcagctgctgttaaaaggacaat  
 tacaacaggaatcgaatgcaaccggcaggaactgcccagcagcatcaacaatattttcactgaatcaggatattcttcaataacctggaatgctgtt  
 ttcccggggatcgagtggtgagtaacctgcatcattcaggagtagcagataaaatgctttagtggtgagagagcagaaatccctgtagccagtttagct  
 gaccatctcatctgtaacatattggcaaccgtacctttgcatgttcagaaacaactctggcagcagggcttccatacaatcagatagattgtagcact  
 gattgcccagacattatcgcgagcccatttataccatataaatcagcatccatgttgaatttaactcgccgctagagcaagacgtttcccggtgaatagg  
 ctcat3'

### ج. هيكل القالب للبلازميد التعبيري

تم استخدام هيكل قالب backbone pTi ويوفره مخبر العلوم المفتوحة التابع لجامعة كامبريدج، ويبلغ طوله 5215bp وتم إدخال جين مقاومة الكاناميسين ضمنه بالإضافة إلى كاسيت LacZ للانتخاب الأزرق للمستعمرات المحورة وجين LacI لتحسين التعبير ومنشأ تضاعف مشتق من بلازميد pBR322 لتضاعف البلازميد وتسلسله كالتالي:

5'cagtgagcaggaagcggagagcgcctgatcgcggtattttctcttaccatctgtgaggtatttccacaccgcatataggtgactctcagtagaate  
 tgcctgatgcgcagtagtaagccagtagactcagctgactgggtcagtgctgcccagacaccgccaacaccgctgacgcgcc  
 tgacgggctgtctgctccggcatcagcttacagacaagctgtgaccgtctccggagctgcatgtgtagaggtttaccgctcatcagcaaacgcgc  
 gagcagctcgggtaagctcagcgtggtcgtgaagcattcagatgtctgctgttcatcagcgtccagctcgttgagtttccagaagcgttaa  
 tgtctgcttctgataaagcgggcatgtaagggcgtttttctggttggctactgatgctcctgtaaggggatttctgttcatgggggtaaatgatac  
 cgatgaaacgagagaggatgctcagatacgggttactgatgatgaacatgccgggtactggaacgttggagggtaaacaactggcggtatggatgc  
 ggccgggaccagagaaaaatcactcagggtcaatgccagccttctgtaatacagatgtaggtgttccacagggtagccagcagcattcctgcatgcaga  
 tccggaaacataatggtgacgggcctgacttccgctttccagactttacgaaacaggaacccgaagaccattcattgttctcaggtcgcagacgtt  
 ttgacgagcagctccttccgctcgtcgtgattcattctgtaaacagtaaggcaaccccagcctagcgggtcctcaacgacaggag  
 cagcatcatgtagtcatgcccgcgccaccggaaggagctgactgggttgaaggctcagggcagctcagatccgggtgctaatgagtgag  
 ctaactacattaattgcttgcctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgctgcccagctgcattaatgaaatggccaacgcgcggggagaggcg  
 gtttgcgtattggcgccagggtggttttttaccagtgagacgggcaacagctgattgcccctcaccgctgcccctgagagagttgtagcaagcgg  
 tccagctggtttgcccagcaggcgaaaatcctgtttgatggtggttaacggcgggataataacatgagctgtctcgggtatcgtctatcccactaccgag  
 atgtcgcaccaacgcgcagcccggactcggtaatggcgcgactgcccagcgcactctgatcgttggcaaccagcagcagtgaggaaacgatgccc  
 tcatcagcatttgcattggtttgtaaaaccggacatggcactccagtccttccgctcagctgaaattgattgtagtagatattatgcca  
 gccagccagcagcagcgcggagacagaacttaatggcccgtaacagcgcgatttctggtgacccaatgtagaccagatgctccagcccagtc  
 gcgtaccgttctatgggagaaaataactgtttaggggtgctggtcagagacatcaagaataacgcgggaacatttagtcaggcagcttccacagc

aatggcatcctggatccagcggatagtaaatgatcagcccactgacgcgttgccgagagaagattgtgaccgcccgtttacaggcttcgacgcgcttc  
 gftctaccatcgacaccaccagctggcaccagttgatcggcgcgagatataatcgccgcgacaatttgcgacggcgctgcaggccagactggagggt  
 ggcaacgccaatcagcaacgactgttgccecgccagttgtgtgccaacgggttgggaatgtaattcagctccgccatcgccgttccacttttcccgctt  
 ttcgagaaacgtggctggctggctcaccacgcgggaaacggctctgataagagacaccggcactctgcgacatcgataacgttactgttccacatt  
 caccacctgaattgactctctccgggctatcatgccataaccgcaaagggtttgcgccattcgatgggtgctccgggatctcgacgctctcccttatgcga  
 ctctgcattaggaagcagccagtagtaggttgaggcgttgagcaaccgcccgcgaaggaaatggggaattgctcttctaagcattactcgatccattc  
 tcaggtgtctctctctcgcgagctctcaatgaggagtgagaccattgacagcgcagctggcagcagaggttcccgactggaaaagcgggagtgga  
 gcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattagcaccagcctttacactttatgcttccggctgatgttgtgtggaattgtgagcggataaaca  
 ttccacacaggaacagctatgaccatgattacgccaagcttgatgcctgcaggctgactctagaggatccccgggtaccgagctcgaattcactggcgcg  
 tcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatgccttgcagcacaatcccccttcccgactggcgttaatagegaagaggccc  
 gcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgctgatgcggtatfttctcttacgcatctgtgcggtatftcacaccgcatatg  
 gtgactctcagtaaatctgctctgatgcgcatagttaagccagccccgacacccgcaaacaccgctgacgcgccctgacgggctgtctgctcccg  
 catccgttacagacaagctgtgacactagtgagcaggtctcagctagcatgaagagcaccagagatacatagattaccacaactccgagccctcc  
 acccgccggcgaggcccaactgtagtgggccaatgcctgatagacgggttttgcctttgacgttggagtcacgcttcttaatagtgactcttgttccaaa  
 ctggaacaacactcaacctatctcggctctattctttgattataagggatttgcgatttggcctattgggttaaaaaatgactgatttaaaaaatg  
 acgcaatttaaaaaatataacgtttacaatttctggcggcagatggcatgagattataaaaaggatctcactagatccttttaaaatgaaatg  
 aagtttaaatcaatcaaatatataatgagtaactggctgacaggctagattattagaaaaactcagcagatcaaatgaaactgcaatttctat  
 atcaggattatcaataccatattttgaaaaagccgttctgtaatgaaggagaaaactcaccagggcaggtccaaagaatggcaaggctctgtaacggt  
 ctgagattccgaccctcaacatcaatacaacctattaatttccctcgtcaaaaataaggttatcaagtgagaaatcaccatgagtgacgactgaatcc  
 ggtgagaatggcaagagctgtgcatfttcttccagactgttcaacaggccagcattacgctcgtcatcaaaaactcagcagcaaccaaaccgttattc  
 atgctgattgctgctgagcaagacgaaatacacgatcgtgttaaaaggacaattacaacaggaatcgaatgtaaccggcgcaggaacacggccag  
 cgcatacaaatatttccactgaatcaggataftcttaataacctggaaggctgttccaggaatcgcggtggtgagtaaccagcagcagcagcagcagc  
 acggataaaatgcttgatggctgggagaggcataaaactccgtcagccagttgagacggaccatctcctgtaaacatcattggcaacgctacctttgcat  
 gtttcagaaacaactcggcgcagcggcttccatacaagcagatagattgtgcacactgattgcccagcattatcgcgagccatttataccatataaat  
 cagcgtccatgttggagtttaagcgcgggagcgggagcaagcgttcccggtgaaataggtcataaacaccctgttactgtttatgtaagcagacagttt  
 tattgtcagatgataatatttcttctgcaatgtaacatcagagattttgagacacaacgtggccttgtgataaaatcgaacttttctgagttgaagga  
 tcagctatttagaaaaataaacaataggtcatgacaaaatcccttaacgtgagtttcttccactgagcgtcagaccctgtagaaaagatcaaaggat  
 ctcttgagatcctttttctgcgctgaatctgctgcttgcacaacaaaaaacaccgctaccagcgggtgttgttggcggatacaagagctaccaactctt  
 ttccgaaggttaactggctcagcagagcgcagatacaaaatactgctcttctagtgtagcctgattagggccaccactcaagaactctgtagcaccgct  
 acatacctcgtctgtaatcctggttaccagtgctgctgcccagtgggcagaaagtctgcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcg  
 cagcggctcgggctgaacggggggttctgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaag  
 cggcagcttccgaagggaagggcggacaggtatccggtgaagcggcagggtcggaaacaggagagcgcagcaggggagcttccagggggaacgc  
 ctggtatctttatagctctgctgggttccaccctctgactgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagggggggcggagcctatgaaaaacggcagcaac  
 ggccctttttacggctctggccttttctggtcttctcactgcttcttctcgtgcttaccctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagtgagct  
 gataaccgctcgcgcagccgaacgaccgagcgcagcagct3'

#### د. التسلسل الجيني المعبر عن بروتين Sso7d

هو تسلسل معبر عن عامل بروتيني مشتق من عُنيقة *Saccharolobus solfataricus* المتحملة للحرارة الشديدة، حيث يمكن دمجه مع جين أنزيم PFU بوليميراز لزيادة الارتباط بالDNA الهدف، إذ يرتبط بروتين Sso7d مباشرة بالDNA مضاعف السلسلة بألفة قوية بما يكفي لتثبيت البوليميراز وتقليل احتمالية تفكك البوليميراز من الحمض النووي، ولكن يكون ارتباطه ضعيفاً بما يكفي لتمكين أنزيم البوليميراز من الانزلاق على طول DNA القالب أثناء تفاعل البلمرة [9].

تم أخذ التسلسل من جينوم *Saccharolobus solfataricus* المتاح في GenBank برقم تسلسلي AE006641.1 من الموقع 2320224 إلى الموقع 2320430.

5' ggtaccggcgggtggcgggtgcaaccgtaaatcaagtacaaaaggcgaagaaaaagaggtagacatctccaagatcaagaagatggcgtgtggg  
 caagatgatctctccactacgacgagggcggtggaagaccggcctggtgctggtaagcgaaggacgcgccgaaggagctgctgcagatgctgg  
 agaagcagaaaaag3'

#### هـ. محفز T7

وهو محفز تعبيرى (Promoter) مؤلف من 18 زوج أساسي يوضع في موقع بدء النسخ عند +1 ويستخدم بشكل شائع لتنظيم التعبير الجيني للبروتينات المؤشبة، ويعد محفزاً طبيعياً لأنزيمات بوليميراز الرنا لعائيات الجراثيم Bacteriophage من نوع T7 وتسلسله

كالتالي: 5'taatacgactcactatagg3'

و. تسلسل جين معبر عن بروتين LacI

ويعرف بجين مثبط اللاكتوز Lac repressor، ويعبر عن بروتين يشارك في انتساخ الجينات، ووظيفته تنظيم تعبير الجينات عندما يرتبط بمنطقة مشغل Promoter lac ما يمنع انتساخ الجينات المسؤولة عن استقلاب اللاكتوز عند عدم وجود اللاكتوز، ويمكن استخدامه كمفتاح تشغيل وإيقاف لتفعيل الجينات عند وضع مشغل Lac قبلها، وفي هذه الحالة تم وضع مشغل Lac قبل الجين المعبر عن Pfu

بوليميراز ويمكن الوصول لتسلسل الجين المعبر عنه من خلال الرقم التسلسلي GenBank: J01636.1

5'gtgaaaccagtaacgttatacagatgtcgcagagtatgccggtgtctcttatcagaccggttcccgcgtggggaaccaggccagccacgtttctgcgaaa  
acgcgggaaaaagtggaaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgetgattggcgt  
tgccacctccagctggccctgcacgcgcgtcgcaaatgtcggcgattaaatctcgcgcgatcaactgggtgccagcgtgggtgtcgtatggtag  
aacgaagcggcgtgaaagcgtgaaagcggcgtgcacaatctctcgcgcaaccgcgtcagtggtgatcattaactatccgctggatgaccaggatgc  
cattgctgtggaagctgctgcactaatgttccggcgttatttctgatgtctctgaccagacccatcaacagtattatttctccatgaagacggtagc  
gactggcgtggagcatctggctgcattgggtcaccagcaaatcgcgcgtttagcgggcccattaagtctctcgcgcgtctcgcgtctggctggctggc  
ataaatatctcactcgcaatcaaattcagccgatagcggaaacgggaaggcgcactggagtgcattcgcggtttcaacaaccatgcaaatgtgaaatga  
gggcatcgttcccactgcgatgctgggtgccaacgatcagatggcgcgtggcgcaatgcgcgccattaccgagtcgggctgcgcgttgggtcggatctc  
cggtagtgggatacagacgataccgaagacagctcatgttatatcccgcgcaaccaccatcaaacaggatttctcgcgtgctggggcaaacagcgtgga  
ccgcttgcgcaactctcagggccaggcgggtgaagggcaatcagctgttgcgcgtcactgggaaaagaaaaaccacctggcggccaatacgc  
aacgcctctcccgcgcttggcgcattcattaatgcagctggcagcagcaggttcccgcactggaaagcgggcagtgaa3'

ز. مشغل Lac Operon

وتم أخذ تسلسله مع بعض التعديلات والهدف من إضافته زيادة التعبير الجيني من خلال إضافة مادة IPTG للوسط المغذي للبكتيريا

المعبرة عن أنزيم Pfu بوليميراز، وتسلسله كما يلي: 5'ggaattgtgagcggataacaattcc3'

و. ذيل متعدد الهستيدين

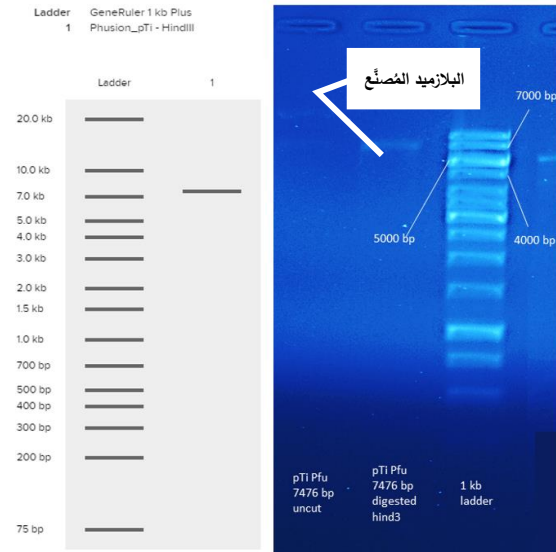
ويتألف من 10 كودونات معبرة عن الهستيدين الموجودة في الطرف 3' من الأنزيم الذي يتم التعبير عنه، وذلك من أجل تسهيل عملية تنقية الأنزيم بواسطة أعمدة الكروماتوغرافيا التي تحتوي على النيكل، ومن ثم يتم الغسل بواسطة محلول مشبع من الإيميدازول للحصول

على الأنزيم الهدف لوحده [10] وتسلسله: 5'catcatcatcatcatcatcatcac3'

وبعد تركيب البلازميد تم طلب تصنيعه بواسطة تجميع غيبسون من مختبر open bioeconomy lab التابع لجامعة كامبريدج وعند استلامه استخدم الرحلان الكهربائي بعد التقطيع الأنزيمي بأنزيم HindIII للتأكد من نجاح التركيب واحتواء البلازميد على العناصر المطلوبة به من خلال مقارنة طول البلازميد المقطع الناتج مع مؤشر سلمي مرجعي.

وفي سبيل التأكد من تسلسل البلازميد الهدف ومطابقة النتيجة التصنيعية المخبرية للنتيجة البرمجية، تم تصميم بادئين نوعيين لتغطية الجين الهدف كاملاً وذلك باستخدام أداة تصنيع البوادي التي توفرها منصة Benchling وتم سلسلة القطعة المضخمة لاحقاً للتأكد من صحتها وعدم وجود طفرات بها.





الشكل (3): مقارنة نتائج محاكاة الرحلان بواسطة التقطيع الأنزيمي *HindIII* للبلازميد المصمم والتقطيع الفعلي للبلازميد.

## 2.2. التأكد من تسلسل الأنزيم بواسطة بادئات نوعية

ولموظ بعد التأكد من التضخيم أن زوج البوادي غطت القطعة الممتدة قبل بدء جين **PFU** بوليميراز وصولاً إلى نهايته لمعرفة دخول الجين إلى البلازميد الهدف في الموقع الصحيح من البلازميد، وكان تسلسل البادئين كما يلي:

- البادئ الأمامي ذو التسلسل  $5' \text{ccatatcgaaggctcgtcat} 3'$  يغطي الموقع الممتد من **2360** إلى **2379** ودرجة حرارة انصهاره **61.7** درجة مئوية ومحتواه من الغوانين والسيوتوزين **60%** وطوله **19 bp**.
  - البادئ العكسي تسلسله  $5' \text{taactgctaacaagcccg} 3'$  ويغطي الموقع الممتد من **5084** إلى **5102** ودرجة حرارة انصهاره **55.5** درجة مئوية ومحتواه من الغوانين والسيوتوزين **47%** وطوله **19 bp** أيضاً.
- ويبلغ طول القطعة الهدف للبادئين **2576 bp** تضم الجين الهدف مع منطقة لاحقة للجين تشمل قالب هيكل البلازميد. بعد القيام بالسلسلة من مختبر **open bioeconomy lab** التابع لجامعة كامبريدج وصلت نتيجة السلسلة للبلازميد موافقة للتصميم البرمجي كما هو مبين في الكروماتوغرام بالشكل 4.



الشكل (4): كروماتوغرام نتائج سلسلة قطعة التضخيم للبلازميد pTi Pfu بين البادئين المختارين.

### 3.2. التأكد من تعبير البلازميد من خلال رحلان البروتينات

ولمتابعة التأكد من تعبير البلازميد عن الأنزيم المطلوب، يوصي Sankar وزملاؤه 2019 بالقيام برحلان بروتينات SDS-PAGE لمعرفة الوزن الجزيئي للأنزيم الناتج بعد التنقية، وإذا ظهرت حزمة بروتينية عند وزن جزيئي بين 90-109 كيلو دالتون هذا قد يعني غالباً أن الأنزيم موجود وتم التعبير عنه، ويمكن مقارنة التعبير الجيني عن الأنزيم قبل إضافة المادة المحفزة للتعبير IPTG وبعد إضافتها لدراسة كفاءة التعبير [12].

### 4.2. التأكد من البروتين الناتج من خلال القيام بتفاعل PCR

بعد نجاح خطوات التأكد السابقة يمكن تنقية الأنزيم بإحدى طرق التنقية مثل الديلزة بأغشية النيتروسلولوز أو الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء مع استغلال ذيل الهيستدين لمتعدد x10 ومن ثم استخدام الأنزيم الناتج في تفاعل PCR حيث ستظهر كفاءة PFU بوليميراز المعدل الذي تم التعبير عنه في مضاعفة الدنا الهدف [13].

بالمحصلة يمكن الاستنتاج بأن البلازميد المصمم في هذا البحث تم تصنيعه بشكل سليم وفقاً للاختبارات التي تمت عليه من رحلان كهربائي وتطابق نتائج المحاكاة للرحلان والتضخيم لقطعة منه بالبوادئ المصممة ونتائج سلسلة القطعة التي تضم الجين المعبر عن أنزيم Pfu بوليميراز.

### التوصيات

وفقاً لنتيجة تصميم البلازميد البرمجية يمكن طلب تصنيعه من قبل الشركات التجارية أو المخابر البحثية لاختبار فعاليته وكفاءة الأنزيم الناتج عنه في التطبيقات المخبرية والبحثية والطبية المختلفة، ولتحقيق ذلك يُنصح بتحويل البلازميد إلى سلالة بكتيرية مؤهبة وراثياً لاستقبال البلازميد ومضاعفته مثل E-coli top10 ومن ثم استخلاص البلازميد الذي تم إكثاره وتحويله من خلال تقنيات التحويل الوراثي لسلالة بكتيرية تعبيرية مثل E-coli B121 Rosetta.

**معلومات التمويل:** هذا البحث ممول من الهيئة العليا للبحث العلمي، رقم العقد 2 عام 2021.

## References:

- 1- Mullis, Kary B., (1990) “The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction.” *Scientific American* 262, no. 4: 56–65. <http://www.jstor.org/stable/24996713>.
- 2- Kelly S. Lundberg et al. (1991) “High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*”, *Gene*, Volume 108, Issue 1, Pages 1-6, ISSN 0378-1119, [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90480-Y](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90480-Y).
- 3- Farooqui, A. K., (2023) “Quick and easy method for extraction and purification of Pfu-Sso7d, a high processivity DNA polymerase” *Protein Expression and Purification*, 208–209, 106276.
- 4- Nørholm, M.H., (2010) “A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering”. *BMC Biotechnology* 10, 21.
- 5- Tolmachov, O. (2009), “Designing Plasmid Vectors. In: Walther, W., Stein, U. (eds) *Gene Therapy of Cancer*”, *Methods in Molecular Biology*, vol 542. Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-561-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-561-9_6)
- 6- Alharaki F., Sukkarieh Sh., (2023), “Producing a local strain of genetic modified *Leishmania tropica* parasites expressing GFP protein”, *Damascus University Journal for the Basic Sciences*, 39(2). Retrieved from <https://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/basj/article/view/3967>
- 7- Sarsen, A., (2021) “Modification Of Taq DNA Polymerase with Improved Elongation Ability” *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, (2) <https://doi.org/10.11134/btp.1.2021.4>.
- 8- Kuznetsova, A.A.; (2023) “Cloning, Expression, and Characterization of Family A DNA Polymerase from *Massilia aurea*”, *Fermentation*, 9, 650. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070650>
- 9- Shehi Erlet et Al., (2001), “The Sso7d DNA-binding protein from *Sulfolobus solfataricus* has ribonuclease activity”, *FEBS Letters*, 497, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02455-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02455-3)
- 10- Gaberc-Porekar, V. and Menart, V. (2005), “Potential for Using Histidine Tags in Purification of Proteins at Large Scale” *Chem. Eng. Technol.*, 28: 1306-1314. <https://doi.org/10.1002/ceat.200500167>
- 11- Benchling [Biology Software]. (2023). Retrieved from <https://benchling.com>.
- 12- Sankar PS, Citartan M, Siti AA, Skryabin BV, Rozhdestvensky TS, Khor GH, Tang TH., (2019) “A simple method for in-house *Pfu* DNA polymerase purification for high-fidelity PCR amplification” *Iran J Microbiol.*;11(2):181-186. PMID: 31341574; PMCID: PMC6635313.
- 13- Kimple, M.E., Brill, A.L. and Pasker, R.L. (2013), “Overview of Affinity Tags for Protein Purification” *Current Protocols in Protein Science*, 73: 9.9.1-9.9.23. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0909s73>