الباب الثالث

الإستنساخ الوراثى والإتجاهات الحديثة فى التكنولوجيا الحيوية

Cloning and New Trends in Biotechnology

obeikandl.com

خطوات هندسة الكائنات الحية وراثياً

قبل أن نخوض ونتعمق فى هندسة الكائنات الحية وراثياً يجب التطرق إلى بعض المفاهيم الخاصة بتلك التقنيات.

أولا: تصميم الخرائط الوراثية Genetic Maps Design

ويقصد به تحديد الموقع الطبيعى لجين ما أو العلاقة الوراثية على كروموسوم ما، والخريطة الخطية للمواقع النسبية للجينات على إمتداد الكروموسوم. ويمكن التعرف على المسافات الجينية من خلال تحليل الإرتباط، والتى تحدد التكرار والتى عندها تعتبر المواقع الجينية منفصلة أثناء إعادة التوليف الكروموسومى. ويمكن تشبيه تصميم الخرائط الوراثية بالعرض البياني المركز للمسافات النسبية ولكن معبراً عنها بالإتحادات الجديدة بين جينات المجموعات الإرتباطية الواحدة والمحمولة على كروموسوم واحد والمقصود برسم الخرائط الوراثية هو تحديد المواقع النسبية لمقاطع المادة الوراثية (DNA fragments) المختلفة في المحتوي الوراثي للكائن وتحديد مدي إرتباط هذه المقاطع بالصفات الوراثية سواء الكمية التي تعتمد في توارثها علي العديد من الجينات مثل كمية المحصول أو النوعية التي تعتمد في توارثها علي جين واحد أو عدد قليل من الجينات.

وتسمي هذه المقاطع من المادة الوراثية بالجينات وتلعب الخرائط الوراثية دور بارز في برامج التربية والتحسين الوراثي فهي تعتبر المرشد الذي عن طريقه يمكن أن يبدأ المربي برنامجه بخطي ثابتة واثقة آمنة حتى يصل إلي الهدف المنشود في أقصر وقت ممكن. فمثلا إذا إستطعنا أن نحدد مقطع أو مقاطع معينة من المادة الوراثية (DNA) يرتبط ظهوره بوجود صفة إقتصادية هامة مثل المقاومة لمرض معين أو زيادة كمية

المحصول... الخ. وعلى أيه حال، فإن طريق إجراء إختبارات علي مستوي DNA بإستخدام تقنيات البيولوجيا الجزيئية يمكن إنتخاب النباتات الحاملة لهذه المقاطع والتي ترشد المربي علي وجود الصفة المرغوب فيها مباشرة وبدقة مما يمكنه من الوصول إلي الهدف المنشود من برنامج التربية من خلال جيلين أو ثلاثة بدلا من ١ إلي ١٥ جيلا بإتباع الطرق التقليدية.

١- الإرتباط الوراثى أو الخرائط الهجينة

Genetic Linkage or Hybrid Maps

تبنى الفكرة في الإرتباط الوراثى (الخرائط الإرتباطية) على إنه عند التهجين بين نباتين أو أي كائنين فإن نتائج التلقيحات بين أزواج الإليلات الجينية تكون ٥٠ % تراكيب أبوية وأقل من ٥٠ % تراكيب ذات إتحادات جديدة فإذا ما ظهرت النتائج لكثير من ٥٠ % تراكيب أبوية واقل من ٥٠ % إتحادات جديدة دل ذلك على وجود إرتباط لتلك الصفات أو بمعنى آخر وجود الجينات المسئولة عن تلك الصفات على كروموسوم واحد. وحيث إن الإتحادات الجديدة تحدث عند حدوث العبور بين الموقعين التى تقع فيهم الجينات فإن إحتمال حدوث العبور يتوقف على المسافة التى تفصل بين الجينات على الكروموسوم.

٢- تهجين الأحماض النووية وخرائط التماثل

Nucleic Acid Hybridization and Homology Map

وهناك تقنيات حديثة تسمى تهجين الأحماض النووية **Nucleic acid hybridization and homologies** وهي طريقة يستدل بها على ترتيب أو تسلسل معين من القواعد النيتروجينية أو على جين معين فعند تسخين معلق من DNA مزدوج السلسلة والمحتوى على مجموعة من الجينات غير

المعروفة الوظيفة فإن الروابط الهيدروجينية بين أزواج القواعدالنيتروجينية تنكسر فتنفصل كلتا السلسلتين في كل جين وعند تبريد المعلق المحتوى على DNA فإن السلسلتين تعاودا الإرتباط لان كل منهما يميلا لتكملة بعضهما البعض تماما، فإذا تم خلط DNA من خلية ما مع DNA مصنع أو الحامض النووى mRNA مصنع حيث يعزل البروتين المسبب لظاهرة فسيولوجية معينة ويتم دراسة تسلسل وترتيب الأحماض الأمينية به وتعطى تلك البيانات إلى الكمبيوتر لإستنباط وتوقع تسلسل الجين المسئول عن هذا البروتين ثم يقوم جهاز PCR بتكوين شظايا الحامض النووى DNA أو RNA المتوقع، لكن نظرًا لوجود عدة إحتمالات لتتابع النيوكليتيدات داخل الجين محل الدراسة ونظرًا لأن الشفرة الوراثية للأحماض الأمينية ليست شفرة واحدة فللحمض الأميني أكثر من شفرة واحدة فإذا ما خلط DNA المصنع وحدث الإرتباط بين الجين المطلوب البحث عنة مع إحدى جزيئات DNA المصنع سمى الناتج Homologous DNA وتسمى تلك التقنية بإسم DNA Hybridization

- ويمكن جعل أحد الأحماض النووية الداخلة في تركيب DNA المستخدم في التعرف على الجين مشع Radioactive بذلك يمكن إصطياده ومن طبق الزراعة Petri dish الذي يتم تحضينه تحت التبريد لمدة ٢٤ ساعة وعليه لوحة من فيلم حساس ليظهر عليها تأثير القواعد المشعة لنتعرف على الجينات التى حدث لها تهجين فيتم عزلها وتنقيتها وإكثارها ثم إستخدامها في هندسة نبات آخر .

٣- الخرائط الجزيئية Molecular Maps

تعد خاصية إعادة الإتحاد ذات فائدة كبيرة في البيولوجيا الجزيئية حيث تستخدم في قياس طول الكروموسوم ومعرفة عدد النيكلوتيدات حيث إنه تحت

الظروف القياسية فإن الجينوم الأكبر حجماً سيأخذ وقتاً أطول في إعادة الإتحاد عن الجنيوم الأصغر، ومن معرفة الزمن يمكن تحديد طول الكروموسوم وعدد نيكليوتيداته، كما يمكن رسم خريطة لجزئ DNA إعتماداً على حقيقة إن المناطق المحتوية على T, A تنفصل بمعدل أسرع نتيجة إحتوائه على زوجين من الروابط الهيدروجينية عن المناطق المحتوية على G, C نتيجة إرتباطها بثلاث روابط هيدروجينية ويمكن التعرف على هذه المناطق تحت الميكروسكوب الإلكتروني على شكل عروات Loops أو فقاعات Bubbles كما يمكن قياس المسافات بين العروات أيضاً وبين نهاية جزيئى DNA.

٤- إستخدام الميكروسكوب الإلكترونى في رسم الخرائط الكروموسومية

عند الحصول على طفرة ما في النبات أو الحيوان ونريد التعرف على مكانها لتساعدنا على رسم الخرائط الوراثية، يتم عزل DNA من كل من النبات الطافر والنبات السليم بإستخدام حمام مائي على درجة ١٠٠°م وبإستخدام مادة قلوية لترفع pH إلى ١١,٥ فيتم هدم DNA إلى سلسلتين منفصلتين وعند خلط DNA من كل من النباتين الطافر والسليم يتم إعادة إتحاد السلسلتين ولكن بصورة خليطة ويحدث إنبعاج لأحد الخيطين single stranded loops لعدم تمكن الازدواج في الجين الطافر بين أحد السلسلتين السليمة مع السلسلة الطافرة والتي يمكن تحديد مكانها على أي من الكروموسومات وطولها بواسطة الميكروسكوب الإلكتروني.

٥- خرائط الإنتشار الإنزيمي المقيد

Restriction Fragment Length Polymorphism

تستخدم فيها إنزيمات القطع المحددة أو إنزيمات الإندونيوكليز التى تقطع جزئ DNA في أماكن محددة عند تتابعات معينة من النيكلوتيدات حيث قام العالمان Smith & Nathans بتوصيف تلك الإنزيمات وقد حازا على جائزة نوبل عام ١٩٧٨ لإكتشافهم إنزيمات الإندونيوكليز المقيدة، وبإستخدام تلك الإنزيمات يمكن تقطيع DNA إلى قطع ويمكن تحديد حجم كل قطعة بإستخدام نظام التفريد الكهربي بإستخدام جيل البولى أكريميليد أو الأجاروز lyacrylamide أو Agrose نظراً لأن كل وحدة كروماتيدية سوف تحمل شحنة سالبة ناتجة عن مجموعة الفوسفات وعليه فإن معدل الهجرة لقطع DNA خلال عملية التفريد الكهربي يعطى مقياس دقيق لأطوالها حيث يتناسب معدل الهجرة عكسياً ونسبيا مع طولها، وتصبغ قطع DNA بصبغة الاثديوم بروميد Ethidium bromide حيث تربط الصبغةDNA وعند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية يظهر DNA كوميض فلورسنتى فيسهل تعيينها وتصويرها وسوف نتناول ذلك بشئ من التفصيل لاحقاً.

ثانيا: دراسة تتابع النيكلوتيدات داخل الجين

Ultimate Structure Maps

لمعرفة التركيب المتناهي الدقة للخرائط فإن ذلك يتم بمعرفة تتابع النيكلوتيدات ومعرفة التسلسل النووى داخل الجين حتى يمكن إختيار إنزيمات القطع المحددة الواجب إستخدامها للحصول على الجين المطلوب وهو ما يعرف بإسم الخرائط الجينية فائقة الدقة Ultimate Fine Structure Maps، وقد إكتشف Sanger وزملاءه ١٩٧٦طريقة إنزيمية ومنهيات لسلسلة DNA لإنتاج قطع من DNA تكون نهايتها عبارة عن نيكلوتيدات خاصة تحتوى على سكر رايبوزى من نوع خاص هو -2,3

Dideoxyribolose حيث تشتمل ذرتى الكربون الثانية والثالثة على ذرة هيدروجين ناقصة لذرتي الأوكسجين وبدلاً من مجموعة OH على ذرة الكربون الثالثة والضرورية جداً ليستطيع إنزيم DNA polymerase من العمل على إتحاد النيكلوتيدات وتكوين رابطة الاستر بين مجموعة الهيدروكسيل بالسكر ومجموعة حمض الفوسفوريك في النيكلويتيدة التالية لتتكون سلسلة DNA الفردية قبل إتحادها مع مثيلتها لتكوين سلسلتين الحامض النووى DNA المزدوج الحلزوني. فإذا عزل جين ما فأريد معرفة تركيبه الدقيق وترتيب نيكلوتيداته، يتم وضع أجزاء DNA لإجراء أربعة تفاعلات متوازية لبناء خيط مكمل له بواسطة إنزيمات الإندونيوكليز والتي تقوم بفك حلزون قطع DNA (القالب) ونسخ صورة مرآة منه بإستخدام أربعة أنواع من النيكلوتيدات؛ ثلاثة منها نيوكليتيدات عادية والرابعة نيوكلتيدة من نوع 2,3-Dideoxyribolose كمنهيات للتفاعل فيستعمل في التفاعل الأول *in vito* نيوكليتيدة ddATP وفى التفاعل الثاني نيوكليتيدة ddGTP وفى التفاعل الثالث نيوكليتيدة ddCTP وفى التفاعل الرابع نيوكليتيدة ddTTP وهى ذات نشاط إشعاعي حيث تحتوى على الفوسفور ٣٢ المشع فينتج عن التفاعلات قطع من DNA لكنها متقطعة دائما عند النهايات المستخدمة وعند فصلها بالتفريد الكهربي بإستخدام چيل البولى أكريميليد polyacrylamide يمكن تعيين موقعهم في الچيل بواسطة الإشعاع، وبذا سوف ينتج سلماً يشير إلى تتابعات النيكلوتيدات وسوف تذهب أقصر القطع إلى أطول مسافة أو أقرب جهة للانود (الألكترود الموجب) وستكون كل حزمة تالية محتوية على سلاسل أطول وهكذا يتم قراءة السلم في چيل polyacrylamide المستعمل في الفصل.

ثالثاً: معالجة الجين المعزول لكى يعبر وراثياً عن نفسه

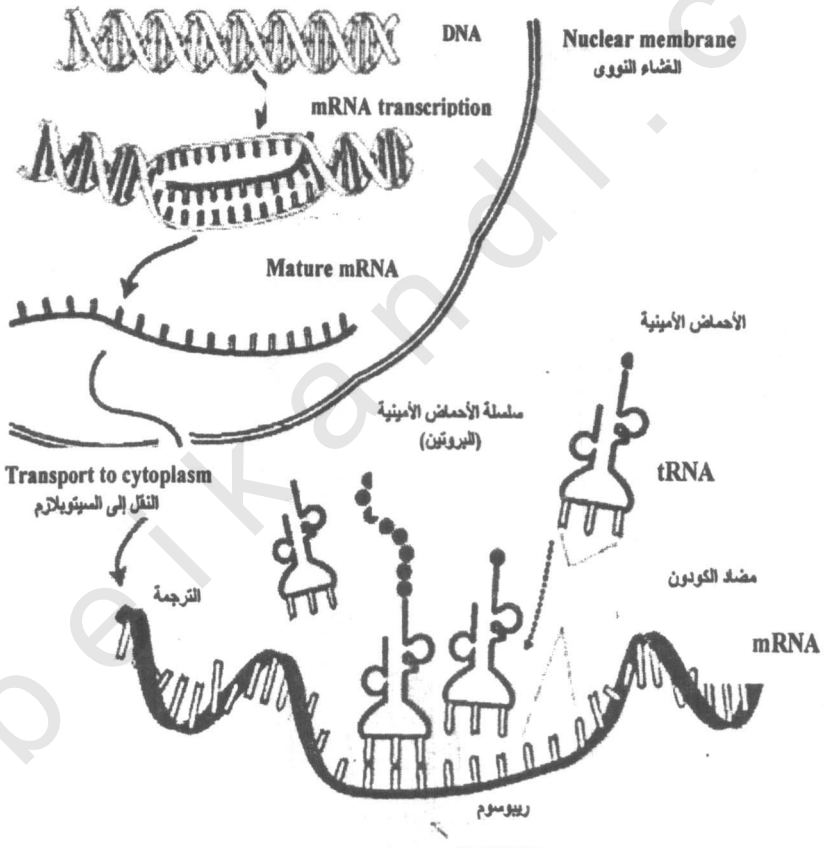
Gene Expression

لكي يتم تعبير الجين وراثياً أي نسخ الجين لنفسه وتكوين صورة على شكل الحامض النووى mRNA ليتم ترجمتها على الرايبوسومات لتكوين البروتين اللازم لإظهار صفة نباتية مرغوبة (شكل مظهري Phenotype) يجب أن يتكون هذا الجين من ثلاثة مناطق:

- المنطقة الأولى تسمى تسلسل المحفز Promoter sequence وهي تساعد في تحديد توقيت عمل الجين وموقع تعبير الجين فهي بمثابة شفرة للجين نفسه وتحدد مكان بدء نسخ الحامض النووى RNA الرسول (إبدأ من هنا) (شكل ٢٥).
- المنطقة الثانية هي منطقة التشفير وهى تحمل معلومات تحدد طبيعة البروتين الذي يشفره الجين التركيبى Structure gene.
- المنطقة الثالثة والتي يطلق عليها منطقة الادينين المتعددة Ploy adenylation (Poly-A) وهى المسئولة عن إنهاء عمل نسخة الحامض النووى tRNA الرسول للحامض النووى RNA transcript Messenger على الوجه الصحيح وكأنها تقول للجين إنهى عملية النسخ هنا.

ولحسن الحظ أن أمام المتخصص فى الهندسة الوراثية حرية واسعة في مزج هذه المناطق والموائمة بينهما وتجميعهما من جينات مختلفة لتنتج ما يسمى بالجينات الكيميرية أو الخليطه Chimeric genes وبذلك أمكن للمتخصصين فى الهندسة الوراثية إختيار محفزات متباينة فأمكنهم توجيه تعبير الجين إلى أعضاء بذاتها مثل الأوراق أو البذور أو الجذور أو الدرنات

بل إلى أنماط بذاتها من الخلايا داخل النسيج الواحد. وقد يصمم الجين الكيميرى أو الخليطه من جينات كائنات مختلفة فالمحفز من فيروس نباتي ومنطقة التشفير من بكتيريا *E. coli* وموقع تعدد الادننة Poly A من *Agrobacterium.* ثم يتم الإيلاج في خلية نباتية تقوم بنسخ الحامض النووى mRNA لتترجمه الرايبوسومات Ribosomes لتنتج البروتينات.



شكل ٢٥: التعبير الجينى Gen expression

رابعاً: مرحلة تطعيم الجين وإكثاره Gene Cloning

تأتى مرحلة تطعيم الجين الذي تم تركيبة على بلازميد خلية بكتيرية والبلازميدات هي تراكيب وراثية غير كروموسومية للبكتيريا وهى عبارة عن جزيئات من DNA تتضاعف مستقلة عن الكروموسوموم في النواة غير الحقيقية وتحتوى تلك البلازميدات على موروثات تمكنها من الإنتقال من خليتها المانحة Donor cell إلى خلية أخرى لذلك تسمى تلك البلازميدات بالبلازميدات المعدية أو بلازميدات الإتصال. وقد تتصل بعض البلازميدات بكروموسوم الخلية عن طريق عملية إتصال مزدوج (عبور وراثي) Crossover وعند إتصال البلازميد مع كروموسوم الخلية فإنه لا يتضاعف أو ينسخ مستقلا بذاته بل يصبح تضاعفه مرتبطا بتضاعف الكروموسوم ثم بعد التضاعف تعيد إستقلاليتها عن الكروموسوم وهى نفس خاصية الفيروسات المعتدلة Temperate Viruses والتي إستخدمت في هندسة الكائنات الأخرى وراثياً عبر النهايات اللاصقة لإنزيم قطع واحد حيث يتم القطع فى نفس المكان من التتابع فيؤدى ذلك الى تكوين نهايات لاصقة يمكن بواسطتها لحام قطعة من DNA المعزول الى جينوم الكائن المهندس وراثياً.

ويمكن التخلص من البلازميدات بعد قيامها بدورها كناقل Vector دون قتل الخلايا الحاوية للبلازميدات وذلك بعملية المعالجة Curing عن طريق تثبيط إنقسام البلازميد أثناء إنقسام الخلايا النباتية مثلا في معلق الخلايا فيتم تخفيف البلازميدات في المستعمرة وذلك بإستخدام ملح بروميد الإيثديم Ethidium bromide ولقد أمكن إستغلال البلازميدات كناقل لإيلاج الجينات في جينوم كائن آخر حيث أن البلازميد تخترق النواة عند إنقسامها وتقوم بفرد حلقتها ولصقها بإحدى كروموسومات النواة فعند تضاعف

الكروموسوم أثناء الإنقسام يتم عمل نسخة إضافية من البلازميد الذي سرعان ما ينفصل عن الكروموسوم ويخرج من النواة إلى السيتوبلازم الجديد مرة أخرى، ويتم إختيار البلازميد الذي يحتوى على علامة **marker** كأن يكون محتوى على جين لمقاومة للإستربتوميسين أو ينقل للبلازميد جين مقاوم للمضاد الحيوي كاناميسين ثم يتم فتح حلقة البلازميد بإستخدام إحدى إنزيمات القطع المحددة وينقل اليها الجين الجديد المرغوب إكثاره وتطعيمه عن طريق إنزيم اللصق أو اللحام الليجيز، ثم يتم إلتحام الجين الجديد بحلقة البلازميد ثم يتم إيلاج البلازميد المطعوم إلى داخل بكتيريا ***E. coli*** أو ***Agrobacterium tumefaciens*** التى تتكاثر بسرعة هائلة فيتم مضاعفة عدد البلازميدات المحتوية على الجين الجديد ولتميز الخلايا البكتيرية المحتوية على البلازميد المطلوب يتم معاملتها بأحد المضادات الحيوية إستربتوميسين أو الكاناميسين فخلايا البكتيريا التى تقاوم تكون هي المحتوية على الجين المطلوب.

خامساً: نقل الجين إلى الجينوم Transformation

هناك طرق عديدة لنقل الجين المعزول وإيلاجها في جينوم الكائن المرغوب هندسته نوجزها في التالي:

١- النقل بواسطة البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens*

أول نظام لهندسة النباتات وراثياً وهو الأوسع إستخداماً هو نقل الجين المرغوب إلى النبات بإستخدام قدرة البكتيريا ***Agrobacterium tumefaciens*** الممرضة في نقل جزء من DNA إلى خلايا النبات وتقوم البكتيريا بنقل جزء من DNA لديها (أو الخاص بها) تسمى Transferred DNA (tDNA) بالإندماج فى كرموسومات النبات المصاب لتدفعه إلى إنتاج الهرمونات النباتية لترفع مستواها في تلك الخلايا إلى المستوى الذي

يؤدى إلى سرعة تكاثر الخلايا وتكوين كتل من الخلايا والتي تعرف بالتورد القمى Crown Gall (شكل ٢٦)٠

شكل ٢٦: تكاثر الخلايا وتكوين كتل من خلايا بالتورد القمى

ليصبح هذا التورد مكان صالحاً وبيئة ملائمة ومصدر غذائي لتلك البكتيريا فيما يعرف بمرض التورد القمى Crown gall disease ولكي تكون تلك البكتيريا فعالة كأداة للنقل الجيني لابد من إستئصال جيناتها المسببة للمرض بمعنى نزع سلاحها disarming٠ ولقد نجح Mary Dell Chilton سنة ١٩٨٣ وآخرون من شركة مونسانتو وجامعة واشنطن من إستئصال الجينات الممرضة دون المساس بآلية نقل DNA وبالرغم من بساطة الطريقة ودقتها إلا أن كثير من المحاصيل من بينها محاصيل الحبوب مثل الأرز والقمح والذرة ليست من عوائل الأجروبكتريوم لذلك تم البحث عن نظم بديلة (شكل ٢٧)٠

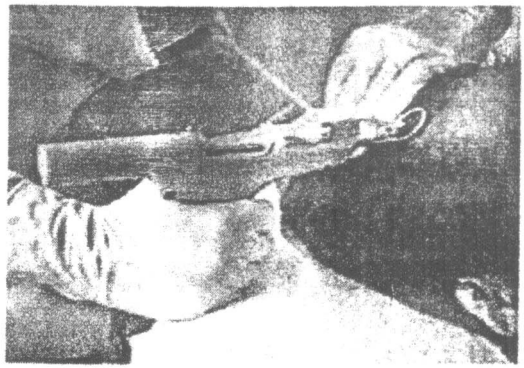
ب- دمج الجينات إلى خلايا البروتوبلاست

Competent Cells Technique

فى هذه التقنية يزال جدر الخلايا لأن ثقوب الخلية الموجودة بجدر الخلية أصغر من أن تسمح DNA بأن تمر بسهولة أما عندما تزال الجدر فلن يعيق نقل DNA سوى الغشاء البلازمي والذي يمكن لمركب عضوي مثل البولي إثيلين جليكول (PEG) من تسهيل إختراق DNA للغشاء البلازمي وهو أكثر العوامل المساعدة شيوعا في أداء هذا العمل كما يمكن دمج DNA فى خلايا البروتوبلاست بواسطة الثقب الكهربي Electroporation وفى هذه الطريقة تقوم نبضات كهربائية قصيرة بأحداث ثقوب سريعة الزوال في غشاء الخلية العارية يمكن أن تمر جزيئات DNA من خلالها لكن تلك التقنية أي عزل البروتوبلاست وجد أنها تقنية صعبة في كثير من الحبوب وينتج عنها نباتات عقيمة.

ج- طريقة الحقن المجهري Microinjection Technique

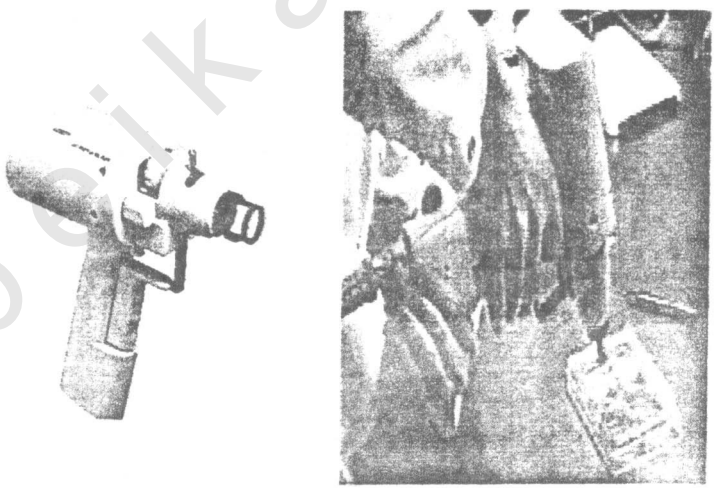
طريقة الحقن المجهري Microinjection تتم بإستخدام إبر خاصة لحقن المادة الوراثية داخل نواة الخلية تحت ميكروسكوب خاص يسمى Micro manipulator وإستخدمت تلك الوسيلة في نقل DNA ولكن وجد أنها تقنية غير عملية لأسباب عدة منها أن طرف الإبرة المستخدمة عادة ما ينسد أو ينكسر بسهولة كما أن إدخال DNA للخلايا عملية مجهدة ولا تلائم العمل التجاري ولا يمكن بها ضمان إلتحام الجين المنقول إلى جينوم الخلية (شكل٢٨).



شكل ٢٨: الحقن المجهري

د- تقنية المسدس الجينى Gene Gun Technique

وهى طريقة لقذف الخلايا النباتية بالمادة الوراثية المنقولة بعد تغليفها لجسيمات معدنية فلزية ذات أقطار ١-٢ ميكرون مثل كريات الذهب. يتم قذف تلك الجسيمات بسرعة عالية بإستخدام Gene gun (المسدس الجينى) لتخترق طلاقاته جدر الخلايا وتنقل الجين المرغوب (شكل ٢٩).



شكل ٢٩: تقنية قاذفات الجسيمات الدناوية

ونظراً لأن الثقوب التى يحدثها القذف السريع صغيرة للغاية فهذه الثقوب تكون مؤقتة ولا تعرض سلامة الخلايا للخطر ويتكون المسدس الجينى gene gun من قاذف خرطوشي عيار ٠,٢٢ مم كقوة دافعة يحتوى على بارود فقط٠

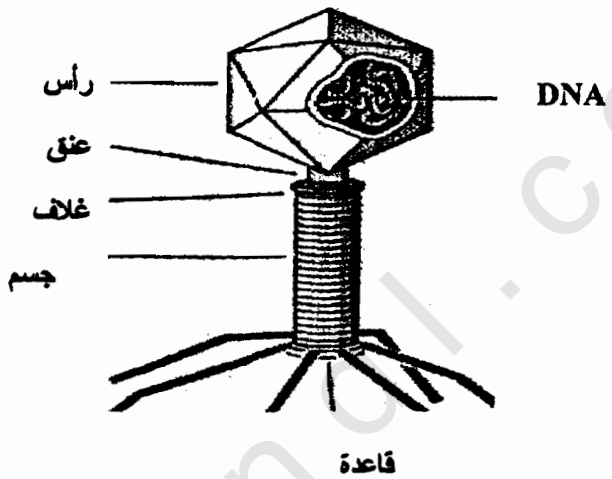
هـ النقل بالفاج Phage Transportation

سميت ظاهرة إنتقال صفة وراثية من خلية بكتيرية إلى خلية بكتيرية أخرى بواسطة الفاج بإسم النقل بالفاج Transudation حيث تندمج قطعة من كروموسوم بكتيري داخل جسم الفاج وعندما يغزو الفيروس خلية عائل جديد فإن الخلية المستقبلة تنقل على كروموسومها القطعة التى في حوزة الفيروس ومن أشهرها Lambda phage (شكل ٣٠)٠

فعند مهاجمة هذا الفيروس لبكتيريا القولون *E. coli* فإن الخلايا تظل فترة وهى في طور القدرة الكامنة للتحلل Lysogenic حيث تحتوى على نسخة من DNA الفيروس مندمج مع كروموسوم الخلية بين موقع الجين جلكتوز وموقع الجين البيوتين فإذا ما عرضت الخلايا إلى الحث Induction فإن الفيروس قد ينفصل عن كروموسوم الخلية من نفس النقطة التى إتصل بها بالكروموسوم بعملية عكس عملية الإندماج ليبدأ في مضاعفة نفسه وتكوين الفيريونات الكاملة٠

قد تنفجر الخلية ولكن في حالات أخرى لا ينفصل الفاج الأولى من نفس نقطة الإتصال بل من أماكن أخرى لذا تحتوى حلقته على DNA الفيروس مضافا إليه قطعة من كروموسوم الخلية فإذا إحتوى الفيروس على جين الجلاكتوز سمى الفيروس بإسم فاج لامبدا ناقصة الجلاكتوز (وتسمى بذلك الإسم ناقصة defective) حيث أن كمية DNA التى يمكن تعبئتها في الغطاء

البروتيني للفاج ثابتة ومحددة فإن إضافة موروث الچلاكتوز تعنى بالضرورة إستبعاد جزء من موروثات الفاج لامبدا من ناحية أخرى مما يؤدى إلى نقصها لصفات وراثية وهو ما يفسر عدم القدرة على الحصول على فاج يحتوى على أكثر من موروث أو جين واحد.



شكل ٣٠: النقل بالفاج لامبدا

وعند إستخدام هذه الفاجات لإصابة خلايا بكتيريا ليس لها القدرة على تمثيل الچلاكتوز فتتحول الخلايا إلى خلايا لها تلك القدرة على فصل الجينات التى تم إنتقالها بالفاج.

سادسا: زراعة الأنسجة النباتية Plant Tissue Culture

قد تستخدم الأجزاء نباتية **Explants** بعد معالجتها بالهندسة الوراثية فى الإستزراع على بيئات فى مزارع إختيارية معقمة وتحفظ معملياً ***in vitro*** للحصول على نباتات مهندسة وراثياً بالكامل. كان إجراء الأبحاث على الحمض النووي حتى سنة ١٩٧٠م من أصعب الأمور التي كانت تواجه

علماء الوراثة والكيمياء. وكانت معظم الأبحاث تجرى بشكل غير مباشر على الحمض النووي الريبوزي والبروتين. ولكن تحول الحال بشكل كامل فأصبح علم الوراثة المتعلق بفحص DNA والمعروف بعلم الوراثة الجزيئية من أسهل العلوم وأكثرها تطورا. ولقد أصبح من السهل صنع نسخ عديدة من أي جين (مورث) أو مقطع محدد من DNA ، كما أمكن معرفة تسلسل الأحماض النووية بسرعة تتعدى المئات في اليوم الواحد. كما إستطاع العلماء إستكشاف الجينات الموجودة على الكروموسومات كما إستطاعوا تغييرها وتعديلها حسب الشكل المراد وليس هذا فحسب بل إستطاعوا أن يعيدوا هذه الجينات المعدلة إلى الخلية وغرزها في الكروموسوم المراد.

كما أمكن إنتاج كميات كبيرة من البروتينات كالهرمونات واللقاحات المختلفة والتي كانت تنتج في السابق من جثث الموتى أو تستخلص من الحيوانات والتي كانت تحفها المخاطر من إنتقال العدوى إلى الإنسان. كما فتحت هذه الثورة العلمية المجال أمام الكثيرين من محبي هذا العلم في إختراع وإكتشاف طرق جديدة وحديثة في التعامل وحفظ وتغيير هذه المادة الحيوية في الإنسان والحيوان والنبات. ولقد غير هذه العلم المنطلق كالصاروخ الكثير من المفاهيم الطبية والتي دفع كثير من كليات الطب إلى تعديل مقرراتها لتزويد طلابها بالمزيد من هذا العلم. ولقد أطلق على عملية نسخ وتعديل وزرع الجينات إسم الهندسة الوراثية Genetic Engineering وهو إسم عام لا يحدد فكرة معينة أو تقنيه محدده، ولكنه يعني بكل ما يقام به من تغيير أو تعديل المادة الوراثية. ويتفرع من هذا العلم الكثير من التقنيات وهي متناثرة وموزعة على الكثير من فروع الطب والعلوم.

وفيما يلى أهم خمس تقنيات تختص بالهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية:

١- قص أوقطع الحمض النووي Cleavage of DNA بإنزيمات خاصة تعمل كمقصات وتسمى Restriction Nucleases وساهم إكتشاف هذه المقصات كثيرا في مهمة التحكم في DNA.

٢- فصل DNA المقطوع على لوح من الجل بإستخدام تقنية التفريد الكهربائى Gel electrophoresis ومن ثم معرفة التسلسل النووي DNA sequencing لكل القطع التي يتم عزلها بشكل سريع ودقيق، والتي تسمح للعلماء بمعرفة التركيب البنائى للجينات ومعرفة وإستنتاج نوع البروتين الذي ينتج منه.

٣- تقنية تهجين الحمض النووي Nucleic acid hybridization، والتي تمكننا في معرفة أحجام القطع من الحمض النووي والكشف عن القطع المحددة من الحمض النووي في خليط معقد من القطع المتشابهة.

٤- إستنساخ المادة الوراثية DNA cloning والتي تسمح بإنتاج نسخ عديدة ومتطابقة من قطع DNA .

٥- تقنية هندسة أو تعديل DNA والتي تسمح بإنتاج نسخة معدلة من جين ما ثم أعادته مرة أخرى إلى الخلية.

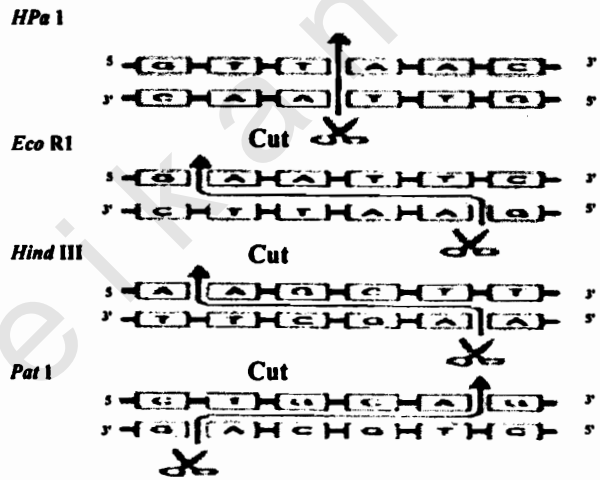
١- قص وقطع الحمض النووي Cleavage of DNA

كما هو معروف فإن البروتينات توجد داخل الخلية على شكل قطع منفصلة عن بعضها البعض وهذا بالطبع يسهل عملية فصلها بطرق تقنية مناسبة. ولكن الجينات موجودة على الكروموسومات على شكل حبات متصلة ببعضها البعض وليست على شكل قطع منفصلة. وهذا التسلسل والترابط في

الجينات جعل عملية فصل وعزل وإستخلاص جين محدد عن بقية الجينات مهمة صعبة إن لم تكن مستحيلة حتى قبل عام ١٩٧٠، ولكن إكتشاف الإنزيمات القاطعة Restriction Nucleases ساعد في عملية إستخلاص الجينات وقطع DNA ونسخها.

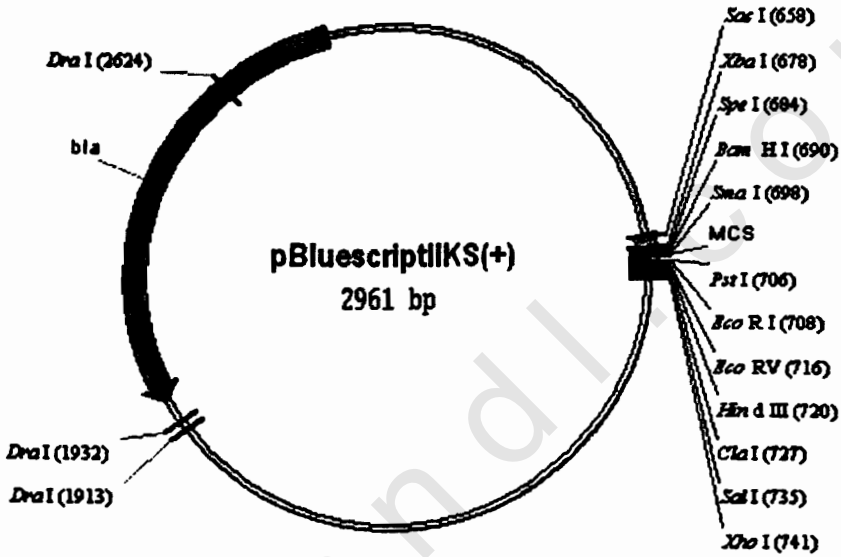
• الإنزيمات القاطعة Restriction Nucleases

لا شك أن لكل كائن حي طرق دفاعية مختلفة تحميه من غارات الأعداء وهجوم المعتدين، فالبكتيريا هي إحدى هذه الكائنات والتى لها أعداء كثيرة ومن أهم أعدائها الفيروسات المختلفة. ولقد قامت بعض من البكتيريا بإنتاج إنزيمات مهمتها تدمير الفيروسات. وتقوم هذه المقصات أو أدوات القطع بقص الحمض النووي للفيروس وبذلك يشل عمله ويبطل مفعولة.



شكل ٣١: الإنزيمات القاطعة

وبما أن DNA مادة موجودة بشكل طبيعي في البكتيريا كما هو الحال في الفيروسات والكثير من الكائنات الحية فإن هذه المقصات قد تشكل خطرا على البكتيريا نفسها عند قصها DNA الخاص بها (شكل ٣١- ٣٢)٠



شكل ٣٢: مثالاً للإنزيمات القاطعة

ولكن هذا لا يحدث والسر في ذلك هو قيام البكتيريا بتحوير أجزاء من DNA الخاص بها عن طريق إضافة مجموعة الميثيل Methyl إلى بعض الأحماض النووية من نوع الأدينين أو السيتوسين Methylation at A or at C ومن ثم لا يستطيع المقص أو القاطع من قص الحمض النووي الخاص بالبكتيريا٠ وعند إكتشاف هذه القواطع في السبعينيات من القرن العشرين بدأ العلماء في إستخدامها كمقصات لقص DNA٠ وساعدتهم هذه المقصات في عملية التحكم في المادة الوراثية DNA٠ ويوجد حاليا أكثر من مائه نوع من هذه المقصات (شكل ٣٢)٠ وتقسم هذه المقصات إلى نوعين رئيسيين، النوع

الأول يقص شريط DNA لمزدوج بشكل رأسي مستقيم Blunt ends والنوع الثاني يقص بشكل متعرج Staggered cuts وبالتالي يجعل طرفي DNA المقطوع مادة قابلة "للصق قطعة غريبة من DNA فيها"٠ وعن لصق قطعة من DNA في داخل الفراغ الناتج من القطع ينتج لنا قطعة مركبة من قطعتين مختلفتين من DNA وهذه القطعة تسمى DNA معاد التوليف (هجين) أو Recombinant DNA٠

- **والسؤال هنا هو كيف يتعرف الإنزيم القاطع على المكان المفترض أن يحدث القطع فيه؟**

كل إنزيم قاطع يعبر عن مقص خاص لقطع DNA في نقطة محددة٠ ويتعرف الإنزيم القاطع على مكان القطع حسب تسلسل DNA للقطعة٠ فكل إنزيم قاطع يقطع في تسلسل محدد٠ فمثلا الإنزيم القاطع المعروف بالهيبا و احد I *Hpa* يقطع عندما يجد ٦ من الأحماض الأمينية في هذا التسلسل GTTAAC بينما الإنزيم القاطع إيكو أر واحد RI *Eco* يقطع عندما يجد ٦ من الأحماض الأمينية في هذا التسلسل GAATTC٠ وللمعلومية فإن هيبا واحد سمي بهذا الإسم لأنه يوجد في بكتيريا الهيموفلس بارا إنفلونزا *Hemophilus parainfluenzae* وهذا الإنزيم يعتبر من الإنزيمات التي تقطع بشكل رأسي مستقيم، بينما إنزيم الايكو آر *Eco*RI واحد فهو مأخوذ من بكتيريا *E. coli*، ويعتبر من الإنزيمات التي تقطع بشكل متعرج٠

ويوضح جدول (٢) تسلسل مواقع القطع Recognition sites لبعض الإنزيمات القاطعة كالآتى:

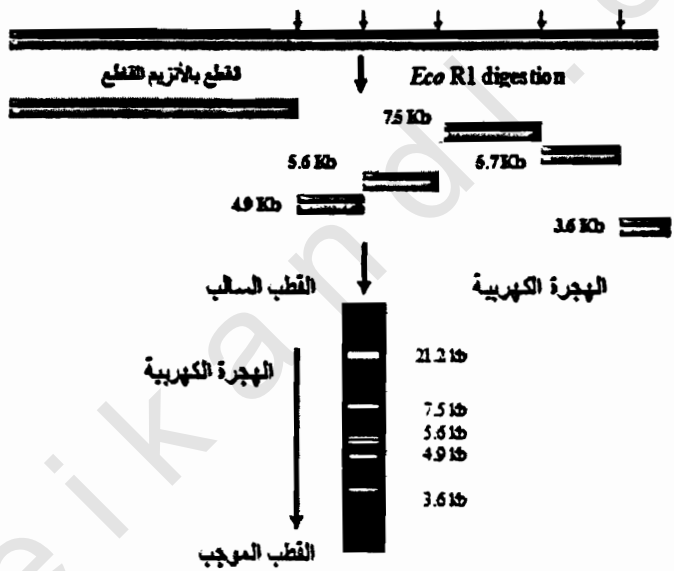
الإنزيم القاطع	المصدر	المقطع الذي يميزه القطع
***Bam*HI**	***Bacillus amyloliquefaciens H***	**GGATCC**
***Eco*RI**	***Escherichia coli* RY13**	**GAATTC**
***Hae*III**	***Haemophilus aegyptius***	**GGCC**
***Hind*III**	***Haemophilus influenzae* Rd**	**AAGCTT**
***Hpa*I**	***Haemophilus parainfluenzae***	**GTTAAC**
***Hpa*II**	***Haemophilus parainfluenzae***	**CCGG**
***Mbo*I**	***Moraxella bovis***	**GATC**
***Not*I**	***Nocardia otitidis-caviarum***	**GCGGCCGC**
***Sfi*I**	***Streptomyces fimbriatus***	**GGCCNNNNNGGCC**

- **القطع المحددة Restriction Fragments**

عندما يضاف الإنزيم القاطع إلى محلول به شريط من DNA فإنه يقطعه إلى عدة قطع وليس إلى قطعتين فقط. وكل قطعة مقطوعة بالإنزيم تسمى قطعة محددة. ويختلف طول هذه القطع حسب المسافة التي بين كل مقطع وآخر. ولكن يجب أن تكون كل قطعة محددة لها نفس الحجم في كل نوع من الكائنات الحية. وذلك يعني أن للإنسان قطعة محددة معينه يقطعها الإنزيم القاطع ***Hpa*I** واحد في الكروموسوم، ويمكن التأكد من ذلك بتحليل قياس لهذه القطعة بتقنيه حركة DNA الكهربائية على الجيل (شكل٣٣).

وإذا أفترض أن إنسان ليس لديه نفس الحجم المفترض لقطعة ما من DNA ففي هذه الحالة نستنتج أن بهذا الشخص طفرة (تغير في تسلسل DNA)

في أحد لأماكن التي كان من المفترض أن يقصها الإنزيم ومن ثم لم يتم القطع فيها. وبذلك فإن حجم القطعة يكون قد إختلف وتعرف هذه الظاهرة عند علماء الوراثة بتفاوت القطع المحددة المصحوب بطفرة **Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)** ولقد أنشأ العلماء خريطة تسمى خريطة القطع المحددة لكثير من الكائنات الحية كما ذكر من قبل أو تبين هذه الخريطة مكان القطع ومحلها مقارنة بالقطع الأخرى، وتم عمل هذه الخريطة عن طريق تقطيع جميع الكروموسومات بإضافة أنواع مختلفة من الإنزيمات



شكل ٣٣: قطع DNA بإنزيمات القطع على لوح چيل الأجروز

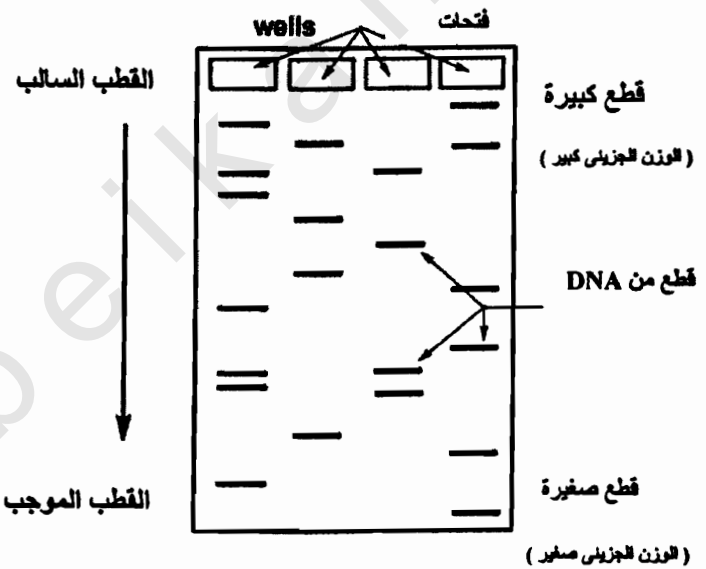
القاطعة ثم رتبت هذه القطع بشكل منتظم. وكان الهدف من هذه الخريطة هو تحديد نقاط وعلامات على طول الشريط الطويل من **DNA** التي تتركب منه الكروموسومات وعند المقارنة بين هذه القطع في الكائنات المختلفة. ولقد

وضعت هذه القطع على لوح من الأجروز وفصله وأخرج حجمها كما هو موضح في الشريط الأسود، ويمكن وضع هذة القطع على لوح الچيل وفصلها إلى وحدات أصغر ٠

• قطع DNA على لوح من الچل بالتفريد الكهربي

Gel Electrophoresis

إستعمل العلماء تقنية فصل البروتينات عن بعضها البعض عن طريق تحركها على الچل (هجرة كهربية) وإنفصالها عن بعضها البعض حسب الوزن الجزيئى لها فى صورة حزم **bands or fragments** وكذلك حسب الشحنة الكهربية الموجودة على الحزم ، وذلك عن طريق تعريضها إلى تيار كهربائي وهي على لوح من المادة الهلامية المعروفة بالچل٠ ولقد إستعمل العلماء نفس الفكرة في فصل قطع DNA عن بعضها البعض (شكل ٣٤)٠



شكل ٣٤: قطع DNA على لوح من الچل بالكهرباء

ومن المعروف أن للحمض النووي شحنة سالبة ولذلك فعند وضع بعض من DNA في طرف من أطراف قالب الچيل ثم تعرض لسريان تيار كهربائي بحيث يكون القطب السالب عند الطرف الذي وضعنا فيه DNA والقطب الموجب عن الطرف الأخير من القالب فإن DNA ينتقل تلقائيا بإتجاه الطرف الموجب. وتتوقف حركة قطع أو حزم DNA على حسب أحجامها على طول اللوح. فالقطع أو الحزم الصغيرة تتحرك بشكل أكبر من القطع الكبيرة. وبذلك يمكن فصل هذه القطع عن بعضها البعض. ويمكن تحديد الحجم الفعلي لكل قطعة أو حزمة عن طريق إضافة قطع معروفة الحجم من DNA والتي تكون بمثابة مقياس يرجع إليه لإستنتاج أحجام القطع. وعلى أية حال هناك نوعان أساسيان من ألواح الچل، الأول يسمى بچل الأجروز Agarose gel والثاني بچل البولي أكريلاميد Polyacrylamide gel.

ونظراً لصغر الفراغات التي بين جزيئات الأجروز فإنه يستخدم لفصل القطع الصغيرة الحجم من DNA وفي العادة التي تكون أصغر من ٥٠٠ جزيء من الحمض النووي والتي تتفاوت بين بعضها البعض بجزيء أو جزيئين. بينما يستخدم البولي أكريلاميد للأحجام الأكبر من DNA والتي يتراوح حجمها بين ٣٠٠ إلى ١٠٠٠٠ جزيء من DNA. ومادة الأجروز هي مادة كربوهيدراتية مستخرجة من الطحالب وعند تحضيرها فإنها تشبه في قوامها الچيلى الذي نأكله ولكنها أقوى في قوامها بعض الشيء ولكنها قابلة للتهتك أو الانقطاع عند التعامل معها بلا حذر.

ولقد واجهه العلماء صعوبات في فصل القطع الكبيرة من DNA وذلك لأن هذه الشظايا وعند وضعها على چل الأجروز وبعد توصيل التيار الكهربائي إليها تتوقف لأنها تتمدد بشكل متعرج على شكل ثعبان ملتوي بإتجاه القطب السالب والآخر بإتجاه القطب الموجب. ولقد حلت هذه المشكلة عن

طريق تعريض جل الأجروز إلى مستويات متفاوتة من القوة الكهربائية على طول اللوح وبذلك فإن قطعة DNA الطويلة عندما تتعرض إلى تيار كهربائي مختلف يجعلها تعدل من تمددها المتعرج قبل أن تدخل في التيار الكهربائي الجديد ويستمر هذا التفاوت في التيار والتعديل في قوام القطعة حتى تصل إلى المكان الذي يجب أن تقف فيه حسب حجمها. ويسمى هذا النوع من الفصل بالفصل عن طريق المجال الكهربائي المتردد Pulsed-field.

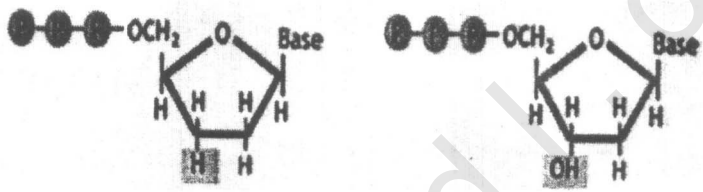
ولقد مكنت هذه التقنية من فصل قطع كبيرة من DNA وحتى فصل قطع من الكروموسومات على الجل وتتراوح القطع التي يمكن فصلها بهذه الطريقة بين ٢٢٠٠٠٠ إلى ٢٥ مليون جزيء من DNA. وتجدر الإشارة أن القطع المفصولة بالبولي أكريلاميد والأجروز لا تكون واضحة للعيان ولذلك يجب تعرض لوح الجل للصبغ بمادة بروميد الإثيديوم Ethidium bromide والتي تلمع عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية. وهناك طريقه أكثر دقه لمشاهدة القطع على لوح الجيل وهذه الطريقة تعتمد على إضافة مادة مشعة نووية إلى DNA قبل أن يوضع على لوح الجل ولكن هذه الطريقة تحتاج إلى إحتياطيات معينه لكي لا تضر من يستخدمها.

• معرفة التسلسل النووي DNA Sequencing

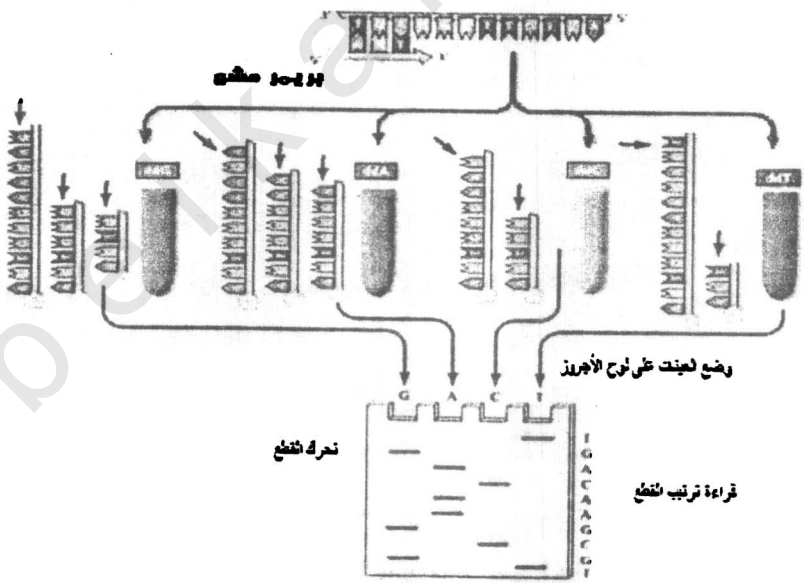
لا شك أن العلماء يحتاجون إلى معرفة التركيبة التسلسلية لكل جين وهذا يمكنهم من معرفة المزيد عن البروتين الذي يصنعه ذلك الجين وعن التركيبة التنظيمية لعمل الجين وقد يصلون على ضوء ذلك إلى معرفة الأمور التي تتحكم في عمله (شكل ٣٥). كما أنه بمعرفة التسلسل النووي للجين يمكن مقارنته بالجينات التي سبق إكتشافها، وقد يعطي هذا معلومات غزيرة عن وظيفة هذا الجين ويختصر الكثير من الأبحاث ويتجنب إعادة إجرائها. ومن

الطرق الأكثر شيوعاً لمعرفة التسلسل النووي لأي قطعة من DNA هي الطريقة الإنزيمية The enzymatic method، ويطلق على هذه الطريقة أيضاً طريقة سانجر Sanger procedure نسبة إلى سانجر الذي أسس هذه الطريقة. كما أنها أيضاً تعرف بالتسلسل عن طريق دي ديوكسي dideoxy sequencing.

وترتكز هذه الطريقة على مفهوم أن شريط DNA في الأساس تكون من جزيئات من الديوكسي نيوكلويتيد. ويختلف الديوكسي نيوكلويتيد عن دي



الفرق بين الديوكسي نيوكلويتيد عن الدي ديوكسي نيوكلوتيد



شكل ٣٥: الطريقة الإنزيمية لمعرفة التسلسل النووى

ديوكسي نيوكلوتيد بعدم وجود مجموعة (هيدروكسيل) في النقطة الثالثة من حلقة السكر الخماسية الشكل. ويوجد على النقطة الثالثة من حلقة السكر الرايبوزي مجموعة هيدروكسيليه (OH) وهذه النقطة هي التي ترتبط في النقطة الخامسة من الجزيء الذي يليها وهكذا يتم الترابط لتكوّن شريط طويل من DNA. ولقد قام سانجر بالإستفادة من هذه الخاصية فبدّل الجزيء من (OH) إلى (H) عن طريق إضافة دي ديوكسي نيوكلوتيد (ddNTPs) بدل من ديوكسي نيوكلوتيد (dNTPs) وذلك عن طريق نسخ الشريط مرة أخرى ويؤدي هذا الى توقف ترابط الجزيئات ويكون في طرف كل جزيء نوع واحد من الأحماض النووية.

وفيما يلي الخطوات الأساسية للقيام بهذا الإختبار بالترتيب:

١- القيام بنسخ DNA وذلك على الشكل التالي:

أ- يضاف إلى عينة DNA قطع من بريمر متخصص specific primer والذى سوف يلصق DNA المراد نسخة ومعرّف (ملتصق بطرفه) بعنصر مشع.

ب- تقسم العينة إلى أربع أنابيب إختبار وكل أنبوبة يكتب عليها الإسماء التالية dGTP, dATP, dCTP, and dTTP

ت- يضاف إنزيم DNA البوليمريز DNA Polymerase

ث- يضاف إلى كل أنبوبة نوع واحد من الدي ديوكسي نيوكليتيد حسب إسم الأنبوب. ويضاف معه كمية من ديوكسي نيوكليوتيد، وبذا سوف يحدث التفاعل ويبدأ البريمر ببناء وتركيب ورص هذه الأحماض الأمينية. وعند إضافة الدي ديوكسي نيوكليتيد فإن الشريط يتوقف عند هذه النقطة، ثم يحدث تفاعل أخر لنسخ شريط أخر، وعند إضافة دي ديوكسي نيوكليتيد يتوقف

التفاعل وهكذا تستمر العملية وينتج في النهاية قطع منسوخة ومتفاوتة الطول في كل أنبوب إختبار.

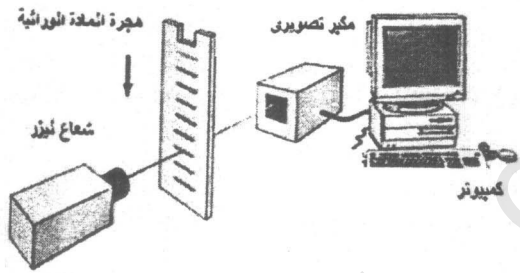
٢- يضاف كمية من كل الأنابيب الأربعة في فتحات خاصة wells على لوح چل الأجروز ثم يمرر تيار كهربائي ومن ثم تظهر على طول اللوح القطع المنسوخة والمتفاوتة الطول وكل فتحة تعطي ترتيب القطع.

٣- يعرض الچل للأشعة Autoradiography لكي يتسنى رؤية DNA ولكن بصورة مشعة.

٤- يتم القراءة على لوح چل الأجروز من أسفل إلى أعلى، وكلما تمر الأشعة على نسخة من DNA يتم التعرف عليها وكذلك ترتيبها ونوع الديديوكسي نيوكليتيد الموجود في طرفها إلى أن ينتهي لوح الأجروز.

ولتسهيل عملية القراءة يستخدم الكمبيوتر فى القراءة بشكل آلي وذلك بتعريض لوح چل الأجروز لأشعة اليزر وعن طريق وحدة إستشعار ومكبر للنبضات photomultiplier يستطيع الكمبيوتر أن يحدد نوع الدي ديوكسي نيوكليتيد وترتيبها وطبعها ورسمها بيانيا. وبذا يتلون كل حمض نووي بلون مختلف. ولا تستخدم المواد المشعة في القراءة الآلية بالكمبيوتر بل يستعاض عنها بمادة مضيئة فلوروسنت fluorescent توضع على البريمر على أن يكون لكل دي ديوكسي نيوكليتيد لون مختلف عن الآخر (أي أربعة ألوان من المادة المضيئة) وبذلك يمكن أن تمر جميع القطع في ممر واحد (شكل ٣٦).ونظراً إلى أن جهاز الكمبيوتر قابل للخطأ فإنه يلزم التدقيق والمراجعة لتفادي حدوث الأخطاء. ولقد جهزت أجهزة كمبيوتر عملاقة تعمل على مدار الساعة وتحت مظلة مشروع الجينوم البشري بالكشف والتعرف الكامل (٩٩% تقريباً) من التسلسل النووي لجميع DNA الموجود في الإنسان وقد

سبق ذلك الكشف عن التسلسل النووي لكثير من الكائنات الحية والعمل جاري لمعرفة المزيد.



شكل ٣٦: إستخدام الكمبيوتر فى القراءة بشكل آلي

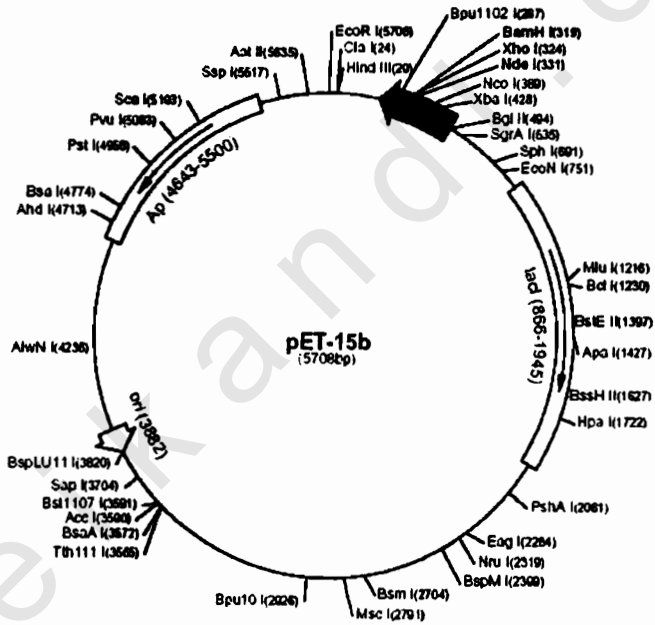
الناقلات Vectors

الناقلات هي في الغالب فيروسات أو قطع من الحمض النووي موجودة في البكتيريا. كما أن هناك أنواع صناعية أو شبه صناعية تم تكوينها في المعامل الطبية لأنها في الأصل مصنعة من مواد موجودة في الطبيعة.

- **البلازميدات Plasmids**

وهي من أشهر الناقلات، وهو عبارة عن قطعة صغيرة من الحمض النووي قابلة للتكاثر بمعزل عن بقية الحمض النووي الموجود في الكروموسومات. وهي شبيهة بالفيروس الصغير ولكنها لا تحتوي على طبقة خارجية من البروتين. ومرة أخرى، البلازميد عبارة عن قطعة من الحمض النووي موجود في البكتيريا خاصة في *E. coli* وبعض أنوع الخميرة Yeast

(شكل ٣٧)٠ وللبلازميد القدرة على التكاثر الذاتي وبمعزل عن بقية الكروموسومات الموجودة في الخلية٠ كما أن هناك بلازميدات تستطيع التكاثر داخل البكتيريا والخميرة في آن واحد٠ ويوجد نوعان من البلازميدات على حسب نوع الحمض النووي فيها، فهناك البلازميد المصنوع من DNA ونوع الآخر المصنوع من RNA٠ وهناك أنواع عديدة من البلازميد فمنها الصغير ومنها الكبير كما أن منها ما لا يحتوي على أي جين بينما هناك أنواع كبيرة تحتوي على عدة جينات٠



شكل ٣٧: شكل من أشكال البلازميد

وبالإضافة إلى وحدة التكاثر الذاتي الموجودة على البلازميد هناك الكثير من الجينات التي قد تكون على البلازميد وهي مفيدة للعلماء في عملية نسخ الجينات والقطع النووية فمثلا قد يوجد على البلازميد جين خاص يكافح

المضادات الحيوية كالأمبيسيلين والتتراسيكلين. وهذه الجينات الواقية من المضادات الحيوية تساعد في التعرف وعزل البكتيريا التي تحتوي على البلازميد الذي عليه الجين الذي يمكن إستنساخه. ويعتقد نظرياً أن الفيروسات المنتشرة في الأصل كانت بلازميدات حيث أنها إكتسبت غلاف بروتيني خارجي وأصبحت فيروساً.

• الناقلات الفيروسية Viral Vectors

إن أشهر هذه الأنواع هي الفيروسات المعروفة بالفاج Phage. وهي عبارة عن قطعة من DNA مغلفة بغلاف بروتيني. ومن أشهر أنواع الفاج ما يسمى بفاج لمبدا lambda phage وهو فيروس موجود في *E. coli*. وهذا النوع من الناقلات تستطيع أن تحمل قطعة من DNA حتى كيلو من القواعد Kilo base. ولكن قد حوّرت هذه الفيروسات لكي تستطيع حمل كمية أكبر من DNA. فعلى سبيل المثال الكوزميد Cosmids عبارة عن تهجين قطعة من الحامض النووى DNA تسمى التسلسل اللاصق cohesive sequence وتعرف إختصاراً Cos sequence من فاج ليمبدا Phage مع بلازميد Plasmid والذي يستطيع نقل حتى ٤٠ كيلو من القواعد 40 Kilo base أو (40 kb) و الباك الفيروسي المسمى بكروموسوم البكتيريا الصناعي (PAC P1-Derived Artificial Chromosomes) أو الكروموسومات الصناعية وهي عبارة عن تحوير الفاج البكتيرى Bacteriophage وإضافته إلى البلازميد.

• **الناقلات الكروموسومية الصناعية**

Artificial Chromosomes

ونظرا للحاجة إلى نقل إحجام كبيرة من DNA فقد قام بعض العلماء بتحوير بعض الناقلات الطبيعية لكي تقوم بهذه المهمة. ويوجد حاليًا ناقلات على شكل كروموسوم وفيها القطع الأساسية لكي تعمل على شكل كروموسوم. ومن هذه الأنواع ما يعرف بإسم الياك أو كروموسوم الخميرة الصناعي Yeast Artificial Chromosomes (YAC) والذي يستطيع نقل أكثر من ٥٠٠ كيلو من القواعد (500 kb). والياك عبارة عن قطعة من DNA مترابطة وتحتوي على طرفين للكروموسوم (Telomeres 2) ومركز للكروموسوم Centromere ومركز للتكاثر (Autonomous replicating sequence (ARS. بينما الباك البكتيري Bacterial Artificial Chromosomes (BAC) والذي يستطيع حمل حتى ١٥٠ كيلو من القواعد (150 kb) وهو تحوير للبلازميد المعروف ببلازميد تناسل بكتيريا E coli plasmid-factor fertility .

• **النسخ والإستنساخ Cloning**

تشتهر كلمة الإستنساخ بين الناس لإرتباطها بخلق الكائنات أو إنشاء نُسخ منها. ولكن بالمصطلح الطبي فإن كلمة نسخ أو إستنساخ تعنى عملية إنشاء صورة طبقا الأصل من المادة التي يراد نسخها. وقد يكون النسخ لقطعة من DNA أو نسخ كائن حي متكامل. ولا شك أن لغتنا العربية تفرق بين كلمة نسخ وإستنساخ ولكننا سوف نستخدم كلمة نسخ أو إستنساخ في حديثنا لنشير لنفس المضمون. وتعني كلمة إستنساخ باللغة العربية ماينتج عنه نسخة أو مستنسخ Clone. وعندما قام أحد العلماء وفريقه العلمي بنشر خبر إستنساخ

النعجة "دولي" في أحد مختبرات إسكتلندا (مختبر روزيلين) عام ١٩٩٧ زاد إهتمام العالم بموضوع الإستنساخ وزاد الفضول العلمي في الحديث عن إستنساخ الإنسان٠

وفجر ذلك الخبر الكثير من التحفظات الدولية من كثير من المراكز الدينية والعلمية لها قد يقع على الجانب الأخلاقي من عملية إستنساخ الإنسان٠ وبعد ذلك أصبحت كلمة إستنساخ شائعة بين العامة عند الحديث عن عملية خلق نسخة أخرى من الحيوان أو الإنسان وبذلك ظهر اللبس بين الكثيرين في معنى هذه الكلمة٠ ولا شك فإن العلماء كانوا ومازالوا يستعملون هذه الكلمة في الإشارة إلى عملية صنع نسخة من أي مادة وراثية وليس بالضرورة خلق أو نسخ كائن حي بالكامل٠

ولذلك قسم العلماء الإستنساخ أو النسخ إلى ثلاثة أنواع :

١. نسخ أو إستنساخ القطع من DNA عن طريق الهندسة الوراثية وبما يعرف بتكنولوجيا إعادة توليف المادة الوراثية **Recombinant DNA technology**٠
٢. الإستنساخ التكاثري أو الجنسي **Reproductive cloning**٠
٣. الإستنساخ العلاجي **Therapeutic cloning** ٠

١- نسخ أو إستنساخ القطع من DNA عن طريق الهندسة الوراثية Recombinant DNA Technology

إن ما يهتم به العلماء في باب الإستنساخ هو نسخ قطع من DNA سواء أكانت هذه القطع عبارة عن جين (مورث) أو جميع الجينوم (كل DNA الموجود في الكائن الحي)٠ وأشهر العمليات التي تجرى هي نسخ قطعة من

DNA. ويحتاج العلماء للقيام بنسخ القطع لأنهم يحتاجون إلى كمية كبيرة من هذه النسخ وذلك لندرة إستخلاصها في كل مرة من داخل الخلية وذلك لوجود التعقيدات الإنشائية للكروموسومات. وعلى سبيل المثال، فإن الجين المنتج لسلسلة بيتا في الهيموجلوبين والمعروف بمورث بيتا جلوبين (Beta-Globin Gene) يمثل فقط ٠,٠٠٠٠٠٥% من حجم DNA الكلي في الخلية (يتراوح حول ٣بلايين قاعدة نيوكليوتيدية). كما أن الجين العملاق والمعروف بجين الدستروفين Dystrophin gene والذي قد يصل حجمه ٢٥ ميجا قواعد (25 Megabases) لا يمثل أكثر من ٠,٠٠٨% من الحجم الكلي DNA في الخلية. ولذلك فإن العلماء يحتاجون إلى إجراء نسخ لهذه الجينات أو القطعة من DNA لكي يتسنى لهم التعامل بها وإجراء التجارب عليها.

وهناك طريقتان رئيسيتان للنسخ:

- النسخ عن طريق إستخدام الخلايا الحية Cell-based DNA cloning.
- النسخ بطريقة الخلايا غير الحية Cell-free DNA cloning وذلك بإستخدام تقنية (PCR) Polymerase chain reaction والذى سبق التحدث عنه.
- نسخ أو إكثار المادة الوراثية إعتماداً على الخلايا Cell-based DNA cloning.

ويرتكز النسخ بإستخدام الخلايا الحية على ثلاث خطوات:

١- بناء جزيئات من DNA المعاد توليفها بالإلتصاق بناقل Vector لديه القدرة على التكاثر، وذلك عن طريق إستخدام الإنزيمات القاطعة.

1- Construction of recombinant DNA molecules by in vitro attachment to replicon (Vector)

٢- النقل بإستخدام البكتيريا أو الخميرة

2- Transformation using bacteria or yeast

٣- إختيار المستعمرات البكتيرية التي تحتوي على الناقل والقطعة المعاد توليفها والسماح لها بالتكاثرفى أطباق الزراعة أو في محاليل سائلة.

3- Selective propagation of cell clones in culture Plates

٤- عزل سلالات DNA المعاد توليفها

4- Isolation of recombinant DNA clones

وسوف نتناول الخطوات السابقة بشئ من التفصيل:

١- بناء جزيئات من DNA المعاد توليفها

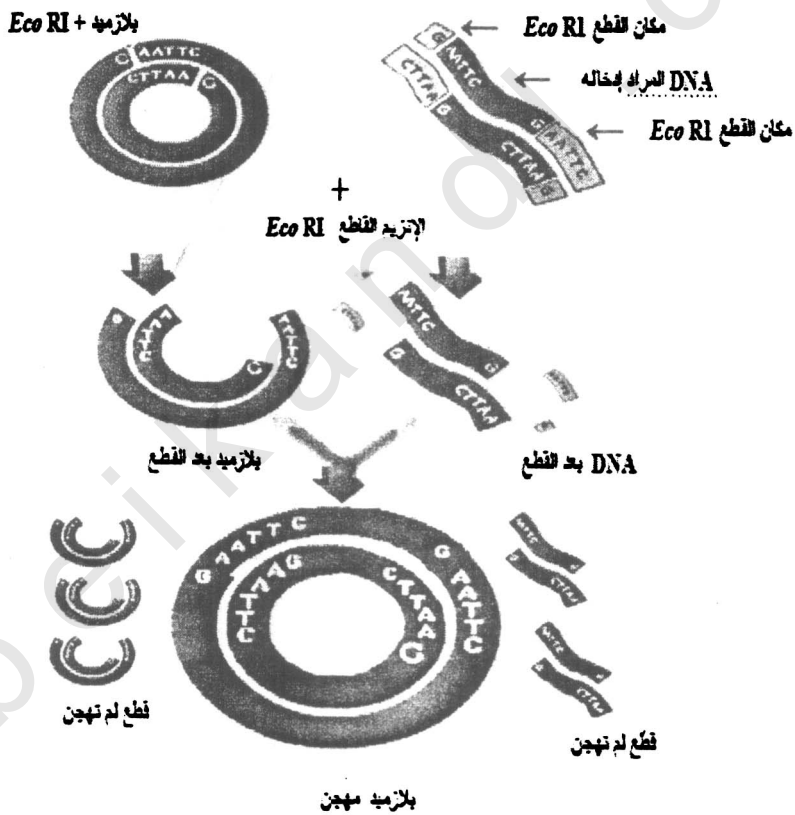
Construction of recombinant DNA molecules

يعتمد النسخ بإستخدام الخلايا الحية على قدرة قطعة DNA المراد نسخها على التكاثر الذاتي عندما توضع داخل الخلية الحية. ولا شك أن قطع DNA العادية ليس لديها القدرة على التكاثر الذاتي ولذلك فإن العلماء تغلبوا على هذا الأمر بأن أدخلوا القطعة المراد نسخها في ناقل من النواقل Vectors المعروفة بقدرتها على التكاثر الذاتي. وبغض النظر عن نوع الناقل فإن طريقة إدخال قطعة DNA المراد نسخها إلى الناقل تقريبا واحدة. وتلك هى الخطوات التى تتم وببساطة كما يلي:

١- بعد أن يتم تحديد القطعة المراد نسخها يضاف إليها إنزيم قاطع محدد وليكن مثلا إنزيم (أ) فيقوم هذا الإنزيم بقطع DNA في مكان محدد حسب التسلسل النيوكليوتيدى.

٢- يضاف نفس الإنزيم للناقل والذي يقوم بقطعه أيضا في نفس التسلسل النيوكليوتيدى.

٣- تضاف القطع المراد نسخها بعد قطعها بالإنزيم القاطع إلى الناقل الذى قطع أيضاً. فتتداخل التسلسلات النيوكليوتيدية بين الناقل وبين قطع DNA المراد نسخها، فتنشأ من ذلك قطعة مهجنة من الناقل وبداخله القطعة المراد نسخها (شكل ٣٨). وترتبط قطعة DNA بالبلازميد من أطرافها برابطة هيدروجينية وهي رابطة ضعيفة لذلك يضاف إنزيم يسمى ليجييز أو اللاصق Ligase لكي يجعل الترابط بين قطعة DNA والناقل إلى رابطة تساهمية قوية Covalent bond.



شكل ٣٨: تصميم القطع المهجنة من DNA فى كلاً من البلازميد و الحامض النووى DNA

ومما لا شك فيه إن أكثر الناقلات إستخداما هي البلازميدات ولكن يمكن إستخدام الفاج أيضا، والياك أو أي ناقل أخر . في العادة يكون العامل المحدد لنوع الناقل المراد إستخدامه هو كبر القطعة المراد إستنساخها. ففي حالة القطع الصغيرة يستخدم البلازميد أو الفاج بينما يستخدم الياك أو الباك في حالة القطع الكبيرة.

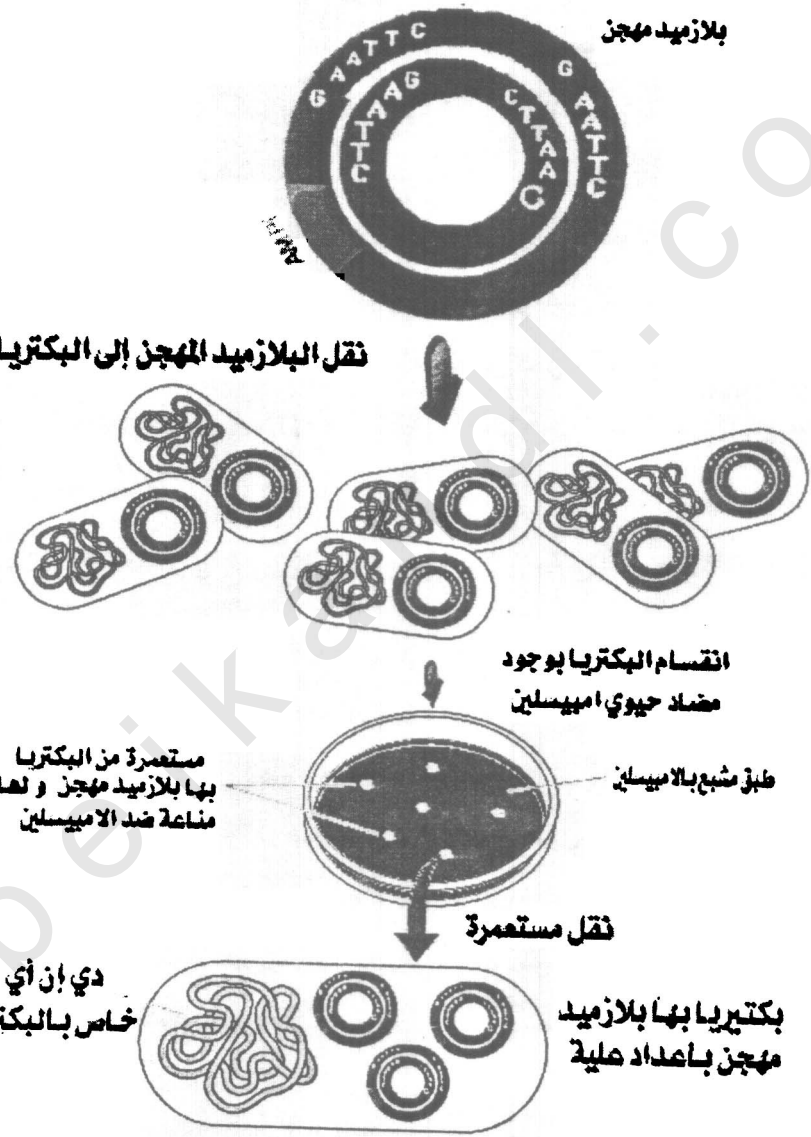
٢- نقل القطعة المهجنة والموجودة بداخل الناقل إلى خلية حية

في الغالب تستعمل بكتيريا خاصة وهى *E. coli* في عملية الكلونة وذلك لسهولة إدخال الناقل إليها، وإلى سرعة إنقسامها (تنقسم البكتيريا تقريبا كل ٢٠ دقيقة) ، إضافة إلى توفر طرق الإختيار خاصة التي تعتمد على خاصة الحماية من المضادات الحيوية. ويدخل البلازميد أو الفاج تلقائيا إلى داخل البكتيريا بينما تحتاج النواقل الأخرى إلى مساعدة، ذلك بتغيير تركيز الأملاح المحيطة بالبكتيريا أو بالتعرض إلى نبضة كهربائية لكي يسمح الجدار المحيط بالبكتيريا بدخول النواقل. ومن طبيعة البكتيريا إنها تنقسم تلقائيا وبشكل سريع وكذلك البلازميدات (شكل ٣٩).

٣- عزل سلالات المادة الوراثية والسماح لها بالتكاثر فى أطباق الزراعة

بإختيار المستعمرات البكتيرية التي تحتوي على الناقل والقطعة المهجنة مع تكاثر الخلايا البكتيرية وتكاثر البلازميد التي بداخلها ينتج لدينا أعداد كثيرة من المستعمرات البكتيرية وبها البلازميد المهجن. ولكن قد يكون في داخل الطبق الذي زرع فيه البكتيريا بعض البكتيريا التي لا تحتوي على البلازميد المهجن وللتعرف على البكتيريا التي تحتوي على البلازميد المهجن

فإنه عادة ما يتم بإستعمال ناقلات عليها جينات واقية من المضادات الحيوية، كالجين الواقي من المضاد الحيوي أمبيسيلين أو التترسيكلين وغيرها. وبذلك فالمضاد الحيوي سوف يمنع تكاثر أي خلية بكتيرية لا تحتوي على البلازميد



شكل ٣٩: نقل القطعة المهجنة والتي هي بداخل الناقل إلى خلية

المهجن.

٤- عزل المادة الوراثية المستنسخة

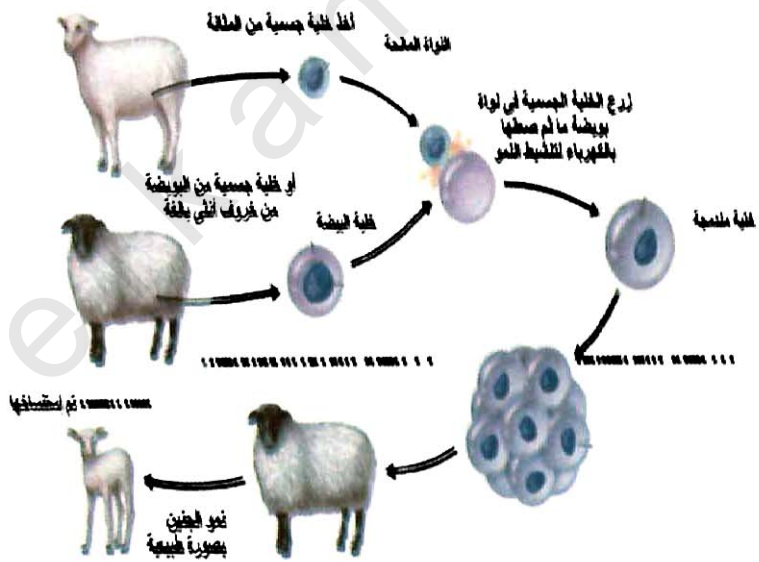
DNA Cloned Fragment Isolation

بعد أن يتم التعرف على المستعمرات التي تحتوي على البلازميد المهجن فإنه يمكن نقلها إلى طبق جديد ويحافظ عليها وتغذى لكي تستمر فى التكاثر. يكون لهذه البكتيريا أعداد كثيرة من البلازميد وبذلك تنتهي عملية النسخ. ويستفاد من هذه القطع المنسوخة في القيام بالمزيد من البحوث أو التجارب عليها كأن يقام مثلا إنتاج مكتبة من DNA أو محاولة إستنتاج التسلسل النووي النيوكليوتيدى للقطعة. كما يمكن تحوير هذه العملية بحيث يحتوي البلازميد على قطعة من cDNA ومن ثم تحوير المراحل الأخيرة من الكلونة لإنتاج بروتين بدلا من DNA. وهذه الطريقة هي التي تستعمل في إنتاج بعض الهرمونات كهرمون النمو.

الإستنساخ التكاثري Reproductive Cloning

يعرف الإستنساخ التكاثري أو الجنسي بأنه إنتاج كائن حي بنفس مواصفات المادة الوراثية النووية Nuclear DNA لكائن حي أخر (المنسوخ منه). لقد قام الفريق العلمي بمختبر روزلين عام ١٩٩٧ بعملية إستنساخ جنسي للنعجة دولي. وتعرف هذه العملية أيضاً بنقل نواة الخلية الجسمية Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) وبشكل مبسط نقل نواة من خلية من خلايا الجسم غير الجنسية أي غير الموجودة بالمبيض (في الأنثى) ومن خلايا الخصية (في الذكر). والخلية التي إستعملت لإستنساخ دوللي كان من خلايا الثدي لنعجة أخرى (شكل ٤٠).

ومن ثم أخذت أيضاً بويضة من المبيض وقام العلماء من التخلص من النواة التي بداخل تلك البويضة ثم قاموا بزرع النواة التي أخذوها من الثدي في داخل البويضة. ثم قاموا بصعق تلك البويضة بالكهرباء لتنشط عملية الإنقسام. وبعد أن بدأت هذه البويضة في الإنقسام قاموا بزرعها داخل رحم نعجة وبعدها نمى الجنين في الرحم ليكون نعجة كاملة. وعلميًا فإن دوللي أو أي حيوان أو إنسان يستنسخ بهذه الطريقة ليس في الحقيقة نسخة مطابقة للام أو الأب الذي أخذ منه النواة حيث أن هناك بعضاً من المادة الوراثية موجوداً خارج النواة وهو بالتحديد موجود في داخل البويضة التي أزيل منها النواة، وهذه المادة الوراثية موجودة على جسيمات صغيرة تسمى بالميتوكوندريا **Mitochondria**. ومع أن الميتوكوندريا مصنع هام للطاقة إلا أنه يكثر فيها الطفرات مع تقدم العمر وقد يكون لها علاقة بالتقدم فى السن.



شكل ٤٠: إستنساخ النعجة دوللى بالكامل

الإستنساخ العلاجي Therapeutic Cloning

ويقصد بذلك إستنساخ كائنات حية لأخذ خلايا جذعية stem cells ولا يسمح لها للوصول إلى تخليق كائن حي كامل. تنبع أهمية هذه الخلايا قدرتها على إنتاج أي خلايا أو أعضاء كالكلية والكبد والخلايا الدموية والتي يرجى من إستخدامها علاج الكثير من الأمراض التي لا يوجد لها علاج ناجح حتى الآن. ولقد قامت إحدى الشركات العلمية في ولاية ماسيشيوستز بالولايات المتحدة الأمريكية Advanced Cell Technologies في شهر نوفمبر من عام ٢٠٠١ بالإعلان عن محاولة ناجحة لإستخلاص خلايا جذعية من أجنة مستنسخة وذلك بعد أن قامت بإستخدام ثمان بويضات بشرية تم تفريغها من نويتها ثم زرع بداخلها أنوية خلايا من الجلد. ولقد نجحوا في إنتاج خلايا جذعية من بويضة واحدة بينما فشلت البويضات السبع الأخرى.

obeikandl.com