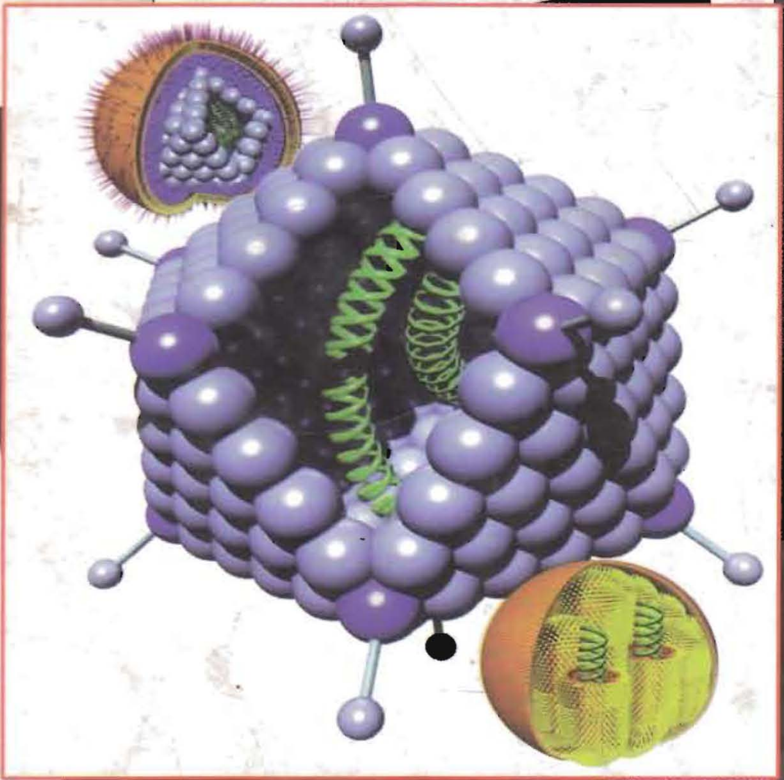
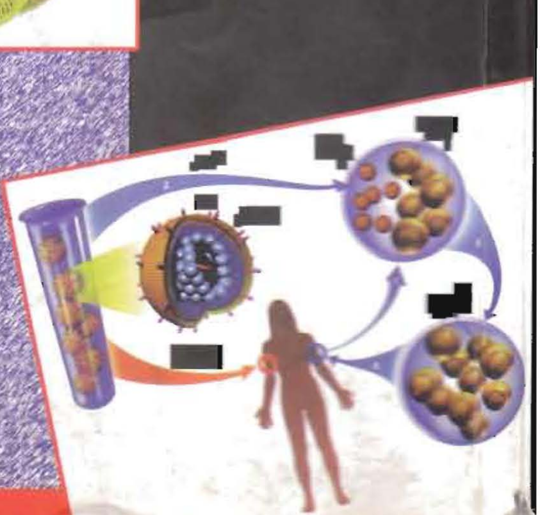
# الهندسة الوراثية



تأليف
د.عبد الحسين الفيصل



# الهندسة الوراثية

# الهندسة الوراثية

تأليف

د. عبد الحسين الفيصل

[redacted]

دار الشروق

1999

رقم التصنيف : 575.1

المؤلف ومن هو في حكمه: عبد الحسين الفيصلي

عنوان الكتاب: الهندسة الوراثية

الموضوع الرئيسي: 1- العلوم الطبيعية

2- علم الوراثة

رقم الإيداع 1079 / 6 / 1999

بيانات النشر : عمان. دار الشروق

● تم إعداد بيانات الفهرسة الأولية من قبل المكتبة الوطنية

ردمك ISBN 9957 - 00 - 063 - 4

● الهندسة الوراثية .

● عبد الحسين الفيصلي .

● الطبعة العربية الأولى : الإصدار الأول [redacted] 1999 .

● جميع الحقوق محفوظة © .

دار الشروق للنشر والتوزيع

هاتف 4618190 / 4618191 / 4624321 فاكس . 4610065

ص.ب 926463 الرمز البريدي . 11110 عمان - الاردن

■ التوزيع [redacted]

دار الشروق للنشر والتوزيع

رام الله - المنارة - الشارع الرئيسي

جميع الحقوق محفوظة. لا يسمح بإعادة إصدار هذا الكتاب أو تخزينه في نطاق استعادة المعلومات أو نقله أو استنساخه بأي شكل من الأشكال دون إذن خطي مسبق من الناشر.

**All rights reserved**. No Part of this book may be reproduced, or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording or by any information storage retrieval system, without the prior permission in writing of the publisher.

■ التنضيد والاخراج الداخلي وتصميم الغلاف وفرز الألوان و الأفلام :

الشروق للدعاية والإعلان والتسويق / قسم الخدمات المطبعية

هاتف : 4618190/1 فاكس 4610065

ص.ب . 926463 عمان (11110) الأردن

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ قُل لا أَمْلكُ لنَفْسي نَفْعاً وَلا ضَرّاً إلاّ ما شَاءَ اللَّهُ وَلَوْ كنُتُ أَعْلَمُ الغَيْبَ لاسْتَكْثَرتُ منَ الخَير وما مَسَّنَي السُّوْءُ إنْ أَنا إلاَّ نَذيرٌ وبَشيرٌ لِّقوم يُؤْمنُونَ ﴾ .

صدق الله العظيم

# الإهداء

إلى من شاركتني الحلو والمرْ

وأحبتني في الجهر والسرْ

وأنبتت في أرضي

الريحانَ...

واللوزَ...

والعطرْ...

إلى زوجتي وأم أولادي سيف وأوس وهشام

حفظهم الله جميعاً.

مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

salamalhelali@yahoo.com

https://www.facebook.com/salam.alhelali

https://www.researchgate.net/profile/Salam_Alhelali?ev=hdr_xprf

07807137614

# المحتويات


المقدمة .......... 17

## الفصل الأول
## المبادئ العامة للهندسة الوراثية

مقدمة .......... 21
أهمية الهندسة الوراثية .......... 23
الخطوات العامة في الهندسة الوراثية .......... 23
أولاً : عزل المورث المطلوب وربطه إلى ناقل مناسب .......... 24
ثانيا : إدخال النواقل الهجينة إلى المضائف .......... 28
ثالثا : الكشف عن تعبير المورثات الجديدة .......... 30
تطبيقات الهندسة الوراثية .......... 32
1 . تشخيص الأمراض الوراثية .......... 32
2 . التطبيقات الصناعية .......... 33
3 . التطبيقات الزراعية .......... 33

## الفصل الثاني
## مقدمة في الوراثة الجزيئية

مقدمة .......... 37
تركيب الأحماض النووية .......... 38
نظرية الحلزون المزدوج .......... 41
ترتيب وتنظيم الحامض النووي DNA في الأحياء حقيقية النوى .......... 44
ترتيب الحامض النووي DNA في الأحياء بدائية النوى .......... 47
التضاعف شبه المحافظ للحامض النووي DNA .......... 49
المورثات .......... 52

تركيب المورثات ........ 52
الشفرة الوراثية ........ 57
تعبير المورثات ........ 57
استنساخ المورثات ........ 57
الترجمة ........ 60
تنظيم تعبير المورثات ........ 63

## الفصل الثالث

## الأنزيمات اللازمة في الهندسة الوراثية

مقدمة ........ 71
أنزيمات هدم الأحماض النووية ........ 71
1 . أنزيمات الهدم الداخلي ........ 72
2 . أنزيمات الهدم الخارجي ........ 72
أنزيمات هدم الحامض النووي RNA ........ 72
أنزيمات هدم الحامض النووي DNA ........ 74
الأنزيمات المقيدة أو القاطعة وأنواعها ........ 75
مواقع عمل أنزيمات التقييد ........ 80
فصل قطع الحامض النووي DNA المعاملة بالأنزيمات القاطعة ........ 86
الطرد المركزي الفائق ........ 86
الهجرة الكهربائية عبر الهلام ........ 89
التركيز بالتماثل الكهربائي ........ 95
بناء خرائط مواقع أنزيمات التقييد لجزئية حامض نوويDNA ........ 96
أنزيمات اللحام ........ 102
تحوير النهايات العمياء في قطع الحامض النووي DNA ........ 103
أولا : الروابط ........ 104
ثانياً : التوصيلات ........ 104

ثالثاً : التذييل بالبوليمر المتجانس ........................ 106
**أنزيمات بلمرة الأحماض النووية** ........................ 110
**أنزيمات تحوير الحامض النووي** DNA ........................ 113
**أنزيمات أزالة الأنطباق والبرم** ........................ 113

## الفصل الرابع
## استخلاص الأحماض النووية

**مقدمة** ........................ 119
**طرق فصل الأحماض النووية العامة** ........................ 119
-الفصل بالفينول : كلوروفورم : أيزوبروبانول ........................ 119
-الفصل بالطرد المركزي الفائق مع ملح كلوريد السيزيوم ........................ 122
-الفصل بالطرد المركزي الفائق مع قاعدة كيميائية ........................ 127
**طرق استخلاص الأحماض النووية من الانسجة والخلايا** ........................ 128
-استخلاص الحامض النووي DNA من كريات الدم ........................ 128
-استخلاص الحامض DNAمن النماذج النسيجية والزرع النسيجي ........................ 129
-استخلاص الحامض النوويDNA البكتيري ........................ 131
-استخلاص الحامض النووي البلازميدي ........................ 131
-استخلاص الحامض النووي المايتوكوندري ........................ 132
-استخلاص الحامض النووي العاثي ........................ 133
-الاستخلاص المحدود ........................ 133
-الاستخلاص الواسع ........................ 134
-استخلاص الحامض النوويDNA من الهلام ........................ 135
-استخلاص الحامض النووي الريبوزي المرسال mRNA ........................ 137

## الفصل الخامس

## نواقل الهندسة الوراثية


مقدمة ........ 141
البلازميدات ........ 141
البلازميدات الاقترانية وغير الاقترانية ........ 144
تصنيف البلازميدات ........ 148
البلازميدات كنواقل في الهندسة الوراثية ........ 149
مميزات البلازميدات النموذجية المستخدمة في الهندسة الوراثية ........ 150
هندسة البلازميدات ........ 150
أولاً : الغرس التثبيطي ........ 151
ثانياً : الغرس بدون تثبيط أو الغرس الطبيعي ........ 159
العاثيات ........ 162
العاثيات كنواقل في الهندسة الوراثية ........ 170
هندسة العاثيات ........ 170
-الغرس التثبيطي ........ 170
-الغرس الطبيعي ........ 171
عاثيات بكتريا القولون كنواقل في الهندسة الوراثية ........ 174
أولاً : العاثيات مزدوجة شريط الحامض النووي DNA ........ 174
1 . العاثي لامبد λ ........ 174
-مشتقات العاثي لامبدا ........ 174
-العاثي شارون 16A ........ 177
-العاثي لامبداNM607 ........ 177
-العاثياتEMBL4 وEMBL5 ........ 177
-العاثي لامبدا-λB λWES ........ 183
2 . العاثي ميو MU ........ 183
ثانياً : العاثيات مفردة شريط الحامض النوويDNA ........ 185
-العاثي QX 174 ........ 187

-العاثي M13 ........ 187
-مشتقات العاثيM13 ........ 188
-العاثيM13 mp ........ 189
-عاثيات أخرى مشتقة من العاثيM13 ........ 189
**الكوزميدات** ........ 192
**الرواشح** ........ 194
-راشح القرنابيط CaMV ........ 194
-راشح جيمني Gemini ........ 197
-راشح السيميان Simian V40 ........ 197
-راشح البابيلوما البقريBPV ........ 198
**نواقل التعبير** ........ 199
-نواقل التعبير البسيطة ........ 200
-نواقل الكاسيت ........ 202

## الفصل السادس

## المجســــــات الموسمـــــة

**مقدمة** ........ 209
**الاحتياطات الواجب اتخاذها عند التعامل مع المواد المشعة** ........ 211
**الاستخدامات العامة للمجسات في الوراثة** ........ 214
-مراقبة التفاعلات ........ 214
-كشف وعزل المورثات ........ 214
-تحليل تركيب المورثات ........ 216
-تحليل تعبير المورثات ........ 218
**التقنيات المستخدمة في تحضير المجسات** ........ 218
**طرق تحضير المجسات المشععة** ........ 218
-ترجمة الثلمة ........ 218
-العوامل المؤثرة في تفاعل ترجمة الثلمة ........ 220
- عيوب طريقة ترجمة الثلمة ........ 222

- أطالة البادئة ........ 222
-طرق أطالة البادئات ........ 223
- تصنيع البادئة العشوائي ........ 223
- تفاعل البادئة المفردة ........ 225
- توسيم نهايات الحامض النووي ........ 226
- ترميم نهاية الحامض النووي ........ 231
- تصنيع مجس الحامض النوويRNA ........ 232
**تحضير المجسات غير المشععة** ........ 234
**توسيم الخلايا الحية** ........ 237
**تصنيع المجسات بالطريقة الجافة الآلية** ........ 240

## الفصل السابع

## تهجين الحامض النووي

مقدمة ........ 245
**تهجين الأغشية** ........ 246
**طرق تهجين الأغشية** ........ 246
-وذمة ساوثرن ........ 246
-تهجين أوراق النتروسليلوز أو النايلون ........ 249
-وذمة نورثرن ........ 251
-تبقيع الحامض النووي ........ 251
-تبقيع مستعمرات البكتريا أو العاثيات ........ 252
-تهجين التحضيرات الخلوية ........ 255
-تهجين البروتينات أو ذمة ويسترن ........ 259
**قراءة تسلسل ترددات الحامض النووي** ........ 261
-طريقة ماكسام وجلبرت ........ 262
-طريقة سانجر وكولسون ........ 266

## الفصل الثامن

## بناء المكتبات الوراثية أو بنوك المورثات


مقدمة ............ 275

بناء مكتبة المورثات ............ 276

أولاً : تهيئة قطع الحامض النووي المناسبة لبناء مكتبة المورثات ............ 276

-عزل قطع الحامض النووي من الجين ............ 277

-عزل واستخلاص قطع الحامض النوويDNA من الهلام ............ 283

- استخدام الحامض النووي المتممcDNA ............ 288

ثانياً : اختيار الناقل المناسب وهندسة قطع الحامض النووي معه ............ 291

-اختيار البلازميدات كنواقل ............ 292

-اختيار العاثيات كنواقل ............ 293

-اختيار الكوزميدات كنواقل ............ 294

ثالثاً : أدخال النواقل المهندسة وراثياً إلى المضائف ............ 295

-التحول ............ 298

-التعبئة خارج الخلايا ............ 300

-استخدام العبوات التجارية في التعبئة خارج الخلايا ............ 301

حساب عدد الكلونات الممثلة في مكتبة المورثات ............ 303


## الفصل التاسع

## عـــــــزل المورثـــــات


مقدمة ............ 307

عزل المورثات بالانتخاب المباشر ............ 307

عزل المورثات من مكتبة المورثات ............ 310

أولاً- عزل المورثات بأستخدام مجس حامض نووي ............ 310

-عزل مورث معين من مكتبة cDNA ............ 314

-عزل مورث معين باستخدام مجس قصير التردد ............ 315

- عزل مورث معين باستخدام مجس من مورث نظير ........ 318
- عزل مورث ينتمي إلى عائلة ........ 319
ثانياً : عزل المورثات باستخدام مجس مناعي ........ 320
-العزل المناعي للمورثات ........ 322
تشخيص المورثات المعزولة من مكتبة المورثات ........ 323
-الترجمة خارج الخلايا ........ 325
-ترجمة الهجين الحر ........ 325
-ترجمة الهجين المعزول ........ 327

## الفصل العاشر

## تطبيقات الهندسة الوراثية في الأبحاث العلمية والتقنيات الحديثة

مقدمة ........ 333
تطبيقات الهندسة الوراثية في مجال البحث العلمي ........ 334
أولاً : تشخيص المورثات ........ 334
ثانياً : أيجاد العلاقات التطورية بين الأنواع ........ 340
ثالثاً : أبحاث الأدلة الجرمية وتشخيص المجرمين ........ 345
رابعاً : تحديد تتابعات المورثات على الصبغي أو المشية على الصبغي ........ 348
الهندسة الوراثية والتقنية الحياتية (البايوتكنولوجي) ........ 351
-إنتاج الهرمونات البشرية في الأحياء الدقيقة ........ 352
-ستراتيجية إنتاج الأنسولين ........ 355
-ستراتيجية إنتاج الهرمونات البشرية المنظمة للنمو ........ 357
-إنتاج هرمون السوماتوستاتين ........ 359
-إنتاج هرمون السوماتوتروبين ........ 363
-إنتاج الهرمونات البشرية من الحيوانات النقيلة ........ 363
-إنتاج البروتينات البشرية المختلفة من الحيوانات النقيلة ........ 364
-إنتاج هرمون الساماتوتروبين من الفئران ........ 365

**استخدام الحيوانات النقيلة للأغراض العلاجية وزراعة الأعضاء** ........ 367
**انتاج حيوانات نقيله مقاومة للحشرات** ........ 367
**انتاج اللقاحات الراشحية الطبية** ........ 369
**استخدام الهندسة الوراثية في إنتاج المضادات الحيوية** ........ 370
- الاستراتيجية العامة لإنتاج الاكتينورودين ........ 371
**التقنية الحياتية في النبات** ........ 373
-استخدام البلازميد Ti لإدخال مورثات جديدة في النبات ........ 373
**المراجع** ........ 381

# المقدمة

إنه لمن دواعي سروري ، وقد أتم الله عز وجل نعمته وأنجزنا هذا الكتاب . أن أضعه بين يدي طلبتنا الأعزاء وأعضاء هيئةالتدريس في الجامعات للاستفادة مما حفلت به فصوله من علوم ومعارف الهندسة الوراثية بمعظم طرقها وتقنياتها .

إن الهندسة الوراثية وكما هو معروف لدى الجميع أحد أهم إنجازات العلم في القرن العشرين وقد تجاوز هذا الحقل العمل المختبري ليدخل حيز التطبيق في الكثير من نواحي الحياة . وأصبحت لدى دول العالم شركات متخصصة في منتجات الهندسة الوراثية تجني من ورائها مبالغ ضخمة وتقيم مشاريع صناعية وزراعية وصحية كبيرة لأجل الاستفادة من نتائج هذه المعرفة .

وحري بنا -نحن أبناء العروبة- أن لا نبقى مجرد مستهلكين لعلوم عصرنا وأن ندخل كل معتركات المعرفة قديمها وحديثها بغية معرفة العصر الذي نعيش فيه معرفة دقيقة وحتى نأخذ مكاننا الطبيعي و المتقدم بين الأمم وأن نقوم بالدور نفسه الذي قام به اجدادنا .

لقد توخيت البساطة والتفصيل في عرض تقنيات الهندسة الوراثية وابتعدت تماماً عن الحشو الأدبي لأجعل المعلومات مباشرة وأكثر وضوحاً . واعتمدت في ذلك على تجربتي في مجال الهندسة الوراثية وما توصلت اليه من خلال تدريس هذه المادة في جامعات مختلفة أو من خلال الأبحاث العلمية التطبيقية منها والنظرية .

وفي سبيل أن يكون هذا الكتاب عوناً للطلبة والباحثين بما يسهل استيعاب هذا العلم الغريز في مادته فقد جاءت كل مسألة أو موضوعة مزودة برسوم توضيحية وببعض الابحاث العلمية الشخصية مع نتائجها وكيفية تحليلها كي أعبد الطريق لمن أراد السير فيه .

لقد وضع هذا الجهد المتواضع ليوفر القاعدة النظرية والعملية للهندسة الوراثية وليتناسب مع طلبة علوم الحياة في كليات العلوم والتربية والعلوم المساندة وطلبة الزراعة والكيمياء والطب البيطري لصلته الوثيقة باختصاصهم . كما يمكن الاستفادة منه في التقنيات الصحية والطبية لما له من أهمية في ذلك .

وفي الختام . . أقدم الشكر والتقدير لدار الشروق للنشر والتوزيع لتبنيها نشر هذا الكتاب وانطلاقاً من تعزيز نشر المعرفة والثقافة العلمية ومحاربة الجهل وتواصلاً مع تاريخنا العلمي العربي الذي قدم خدمات جليلة للانسانية لا تمحى أبد الدهر .

ومن الله التوفيق

**المؤلف**

# 1

# المبادئ العامة للهندسة الوراثية

**مقدمة**

**أهمية الهندسة الوراثية**

**الخطوات العامة في الهندسة الوراثية**

**أولاً: عزل المورث المطلوب وربطه إلى ناقل مناسب**

**ثانيا: إدخال النواقل الهجينة إلى المضائف**

**ثالثا: الكشف عن تعبير المورثات الجديدة**

**تطبيقات الهندسة الوراثية**

1 - تشخيص الأمراض الوراثية

2 - التطبيقات الصناعية

3 - التطبيقات الزراعية

## مقدمة

تعتبر الوراثة الصفة المشتركة لجميع صور الحياة القادرة على التكاثر وإنتاج نسل . وقد حاولت الوراثة بفروعها المختلفة ، تفسير آلية انتقال الصفات من جيل إلى آخر ، كما ساهمت أيضاً بتقديم تفسيرات علمية دقيقة لظهور الاختلافات بين أفراد النوع الواحد ، أو أفراد النسيلة الواحدة أو حتى بين الجماعات . ومنذ إعادة اكتشاف قوانين الوراثة عام 1900 ، اتضح وبشكل مقنع تماماً بأن كل التفصيلات البايولوجية تعود لجذور وراثية . فالصفات العامة للأفراد مثل لون العين والبشرة والشعر الطويل وما الى ذلك من الصفات العامة ، وكذلك أنواع البروتينات وغيرها ما هي إلا نواتج حقيقية لفعل المادة الوراثية . وأصبح اليوم علم الوراثة العلم الذي يوفر كل العناصر الأساسية التي يبحث عنها البايولوجيون حتى أطلقوا على المادة الوراثية بالكأس المقدسة أو المادة المقدسة . فقد كشفت الأبحاث العلمية التي تلت إثبات الأهمية الوراثية للحامض النووي DNA بأن هذه المادة تحمل كل أسرار الكائنات الحية التي خلقها اللّه .

لذلك فأنه ما أن أصبح العلماء على قاب قوسين أو أدنى من كشف تركيب المورثات وتحديد خرائطها التفصيلية حتى بدأت الأصوات تتعالى من خطورة مثل هذه الأبحاث . وسبقت صيحات التحذير هذه ظهور الهندسة الوراثية كعلم مستقل . لقد أستند أصحاب صيحات التحذير هذه إلى المنطق العلمي وإلى الالتزام الديني وهم ليسوا بمخطئين في ذلك . فالهندسة الوراثية سلاح ذو حدين قادر على مساعدة البشرية في حل الكثير من المعضلات الصحية والزراعية والصناعية وتخطي صعوباتها كما أنه في نفس الوقت قادر على إحداث أكبر الأضرار وأفدحها .

وما الصحوة الزراعية التي يشهدها العالم والتي من خلالها أزداد الإنتاج الزراعي - كماً ونوعاً - إلا نتيجة لتطور الأساليب الزراعية واستعمال الوسائل العلمية في الزراعة ودخول الهندسة الوراثية كعامل رئيس . كما أن الكثير من الأدوية والعقاقير والهرمونات والمضادات الحيوية واللقاحات وغيرها والتي تعج به مستشفياتنا يعود الفضل بإنتاجها إلى الهندسة الوراثية . ومن جانب أخر فإن الهندسة الوراثية تبقى

المشتبه الرئيس في ظهور أمراض قاتلة مثل مرض نقص المناعة المكتسب (الإيدز) الذي يسببه راشح غريب يدعى(HIV) وربما أمراض أخرى .

وتحفل ملفات الوراثة بذكريات مؤلمة عن إساءة استعمال هذا العلم . فقد تبنت النازية والفاشية علم الوراثة في مرحلة من المراحل ، وأهتمت بفرع من فروعه يسمى اليوجينيا Eugenics يعنى بتحسين نوعية جنس الإنسان عن طريق معالجة وراثته البيولوجية . فاليوجينيون أو المؤمنون بهذا العلم يعتقدون أن أسباب التدهور الاجتماعي من سرقة وفقر وجريمة وإدمان الكحول وغيرها تكمن في بايولوجيا هؤلاء شأنها شأن الأمراض ذات المنشأ الوراثي . وأستندت النازية إلى هذه الأفكار في تصنيفها للأجناس البشرية ودعوتها لسيادة الجنس الآري الذي ينحدر منه الألمان . وأستناداً إلى الأفكار اليوجينية هذه اعتبروا اليهود -على سبيل المثال -وسطاً بين قذارة الصرب واليونانيين ومشهورين بالخداع والسرقة . وأطلقوا على الأجناس الأخرى الكثير من الصفات المشينة خدمة لإعلاء الجنس الآري . ومع إن الحقبة التأريخية هذه قد طويت وأن اليوجينيا أصبح علماً للوراثة السكانية أو ما يطلق عليه بوراثة العشائر ، إلا أن العالم بقى حساساً تجاه استخدام العلوم استخداماً غير مسؤول ودون ضوابط .

إن التطور الهائل في مجال التقنية والعلوم ، والذي رافقه تطور مقابل في المستوى العلمي والثقافي للأفراد والمجتمعات . جعل من العلوم في متناول الجميع ، حتى أصبحت أحدث تقنيات العلوم تستخدم في المختبرات الجامعية او ما يطلق عليه بالعمل الروتيني . حيث إن توفر المنتجات التجارية من أنزيمات وأجهزة وما إليها من وسائل الهندسة الوراثية جعل من اليسير العمل في مجال الهندسة الوراثية .

إن مثل هذا الانتشار السريع لمثل هذه التقنيات يعيد للأذهان أهمية وجود برتوكولات واتفاقيات وضوابط دولية لضمان الاستخدام السليم لمثل هذه المعرفة وإلا أصبحت بيئتنا ملوثة بأشكال الأحياء الهندسة وراثياً والتي لا يعرف أضرارها سوى الله سبحانه وتعالى .

إن عدم وجود مثل هذه الاتفاقيات والضوابط لا يمنعنا من أن نخوض تجربة هذه المعرفة العلمية وتقييمها والاستفادة منها .

في هذا الفصل نوضح الأبعاد العامة لتقنيات الهندسة الوراثية وتعريفها وبيان أساليب العمل بها .

## أهمية الهندسة الوراثية

تكمن أهمية الهندسة الوراثية ، في أحداث تغيرات وراثية مسيطر عليها ذات أهمية اقتصادية أو علمية . وعن طريق ذلك تمكن العلماء من الكشف عن كثير من الحقائق حول دور المورثات في الحياة الخلوية ، والتي كانت قبل ذلك مجرد أحلام أو افتراضات نظرية . وبسبب هذه الحقائق أعيدت صياغة العديد من النظريات البايولوجية التي كانت سائدة في يوم ما . ودخل العلماء معتركاً جديداً اطلقوا عليه البايو تكنولوجيBiotechnology أو ما يطلق عليه بالتقنيات الحياتية . تمكن العلماء من خلال الهندسة الوراثية من إنتاج سلالات بكتيرية وأخرى مختلفة تقوم بتنفيذ أوامر جديدة لم تعرفها من قبل ،حيث تجري لهذه الكائنات عمليات إضافة أو حذف وراثي أزال من خلالها هؤلاء العلماء الحواجز التي كنا نعرفها بين الأحياء بدائية النوى و الاحياء حقيقية النوى . وها نحن اليوم نسمع بالبكتريا التي تنتج الأنسولين البشري وهرمون النمو البشري والمضادات الحياتية واللقاحات وأشكال من المركبات الكيميائية والتي لم نكن نتوقع يوماً ما بأنها ستنتج من معامل حياتية وبهذه الطريقة . كما ظهرت اليوم المحاصيل الزراعية الناتجة عن الهندسة الوراثية وظهرت نباتات مقاومة للأملاح وأخرى مقاومة للحشرات والأعشاب وتنوعت ضروب الفواكه والثمار . ولا أحد يعرف المدى الذي ستقف عنده تطبيقات مثل هذه التقنية .

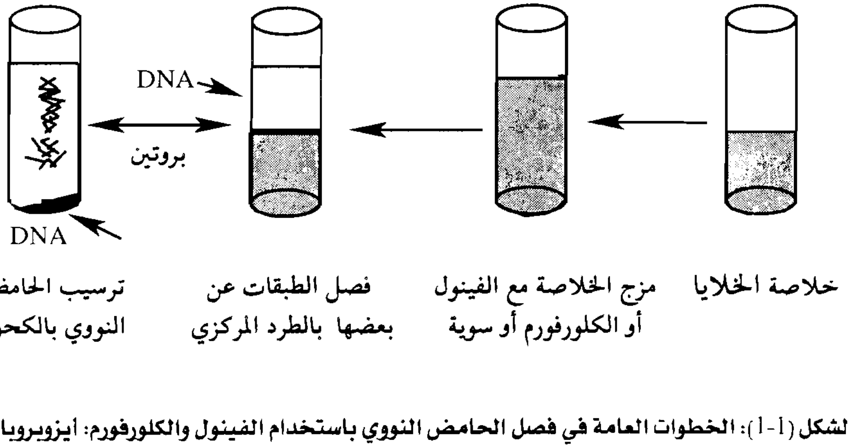
## الخطوات العامة في الهندسة الوراثية

تعتبر الهندسة الوراثية تقنية مستقلة بحد ذاتها دخلت إلى نواحي الحياة من أوسع أبوابها حتى اننا الآن نجداليوم استخداماً واسعاً لما تم التوصل إليه في هذا الميدان في الزراعة و الصحة والصناعة والإنتاج الحيواني والعديد من المجالات الأخرى .

تعتمد الهندسة الوراثية كما قلنا سابقاً على التلاعب بالمورثات بطريقة تسمح بإنتاج كائنات حية متواضعة بصفات متقدمة . ويستخدم العديد من الوسائل والمواد لهذا الغرض وسنأتي هنا للتعرض ، بصوره عامة ، إلى خطوات ووسائل الهندسة الوراثية .

**أولاً: عزل المورث المطلوب وربطه إلى ناقل مناسب**

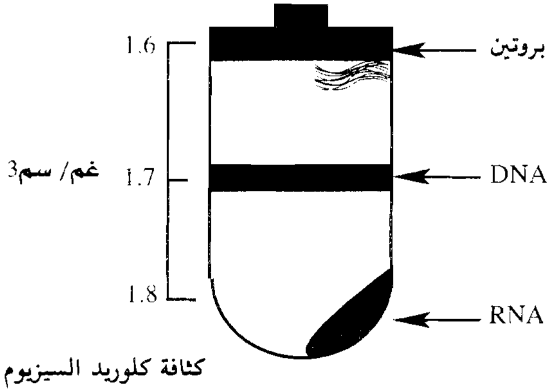
إن أول خطوة في عزل مورث معين من مجين كائن ما هو استخلاص الحامض النوويDNA وتنقيته من الشوائب . و تستخدم طرق عدة لاستخلاص الحامض النووي DNA أهمها : طريقة الفينول : كلوروفورم : أيزوبروبانول والتي يتم فيها تحطيم الجدران الخلوية باستخدام محلول سلفات دودوسيل الصوديوم Sodium Dodycil sulfate (SDS) وفصل البروتينات عن الحامض النووي بمعاملة محلول الخلايا المحطمة بالفينول أو الكلورفورم و الايزوبربانول أو الفينول والكلوروفوم سوية بدرجة حراره65مْ مع المزج الجيد الهادئ . تتم بعد ذلك إزالة الطبقة العلوية التي تمثل طبقة الحامض النووي وترسيب الحامض بالايثانول المثلج ومن ثم تجمع الخيوط البيضاء التي تمثل الحامض النووي بالطرد المركزي والتجفيف (الشكل1-1) .




**الشكل (1-1): الخطوات العامة في فصل الحامض النووي باستخدام الفينول والكلورفورم: أيزوبروبانول**

اما الطريقة الثانية الشائعة أيضاً فهي استخدام مدرج السيزيوم . يضاف كلوريد السيزيوم بعيارية معينة إلى محلول الخلايا المحطمة ويمزج جيداً في أنبوبة نايتروسليلوز . تغلق الأنبوبة جيداً ويطرد الخليط مركزياً بقوة 50,000 دورة في الدقيقة لمدة 48 ساعة ينفصل بعدها الحامض النووي DNAعند مستوى كثافة السيزيوم 1.7 غم/ سم3 ويستخدم بروميد الاثيديوم لتعيين منطقة الحامض النووي اضافة إلى جهاز أشعة بنفسجية . تفصل طبقة الحامض النووي عن طريق ثقب في جدار الأنبوبة تحت الطبقة ويجمع محلول الحامض في أنبوبة خاصة ليتم تخليصه من الأملاح وترسيبه (الشكل 1-2) .

ولأجل عزل قطعة حامض نووي معينة تحمل المورث المطلوب ، فأنه يجب تقطيع الحامض النووي بأحد الأنزيمات القاطعة Restriction enzymes . والأنزيمات القاطعة هي انزيمات متخصصة غالباً في تقطيع سلاسل الحامض النووي من مواقع معينة تختلف اعتماداً على نوع الأنزيم . ومنذ اكتشاف هذه الأنزيمات عام 1970 وما تلاها فأنه تتوفر الآن العشرات من هذه الأنزيمات . ونظراً لاختلاف طبيعة عمل هذه الأنزيمات فقد قسمت إلى ثلاث مجاميع . وتعتبر أنزيمات المجموعة الثانية أهم هذه الأنزيمات لقطعها المتخصص جداً وتمثل هذه المجموعة العمود الفقري في أعمال الهندسة الوراثية (جدول 1) .




الشكل رقم (1-2): أنبوبة النتروسليلوز بعد الانتهاء من الطرد المركزي الفائق حيث يستقر الحامض النووي DNA عند الكثافة 1.7 غم /سم3 .

**جدول (1): بعض الانزيمات القاطعة الشائعة الاستخدام ومواقع عملها.**

| الأنزيم | موقع قطعه على الحامض النوويDNA |
|---|---|
| Hind III | A↓AGCTT |
| Eco R1 | G↓AATTC |
| Bam H1 | G↓GATCC |
| Sau 3A | ↓GATC |
| Hae III | GG↓CC |
| Pvu I | CGAT↓CG |
| Pvu II | CAG↓CTG |

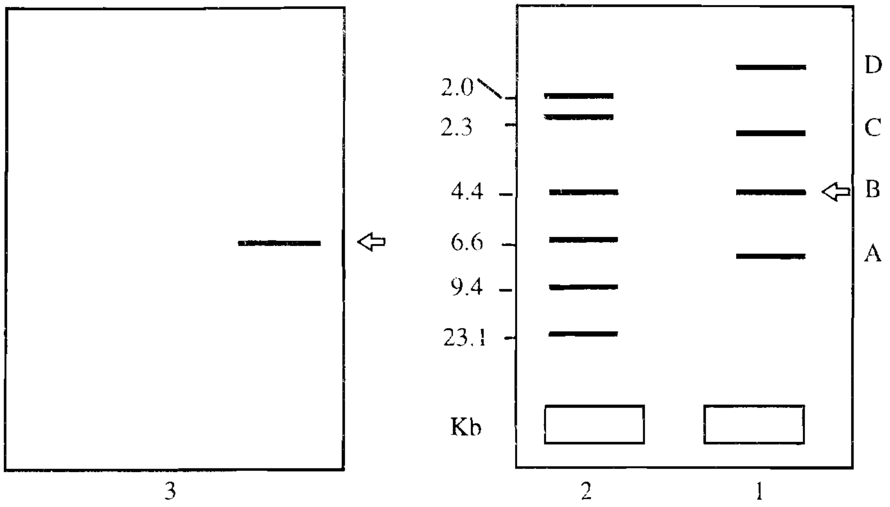
يعامل تركيز معين (10 مايكروجرام مثلاً) من الحامض النووي مع عدة وحدات من الأنزيم القاطع( 10 وحدات مثلاً) بوجود محلول دارئ Buffer خاص بالأنزيم في قنينة خاصة ويحضن التفاعل بدرجة حرارة مناسبة للأنزيم لفترة 2–24 ساعة .ترحل قطع الحامض النووي كهربائياً بوجود قطع حامض نووي معلومة الحجم Marker عبر هلام الأجاروز مثلاً .

ونظرا لأن الحامض النووي DNA سالب الشحنة لذلك تهاجر قطع الحامض النووي باتجاه القطب الموجب ، وتتناسب سرعة الهجرة مع حجم هذه القطع حيث تهاجر القطع الصغيرة بشكل أسرع من القطع الكبيرة ، مما يؤدي إلى فصل هذه القطع عن بعضها .

تعُيَن قطعة الحامض النووي المطلوبة والتي تحتوي على المورث المطلوب بعد نقل قطع الحامض النووي من الهلام إلى ورقة نايتروسليلوز أو نايلون حسب طريقة ساوثرن Southren Blot ثم تهجن الورقة مع مجس موسم اشعاعياً Labelled probe يمثل مورثاً نظيراً أو ترددأ لقطعة حامض نووي نظيرة للمورث المطلوب عزله .

بعد تنظيف الورقة عن طريق غسلها بمحاليل غسيل معينة تغطى بفلم أشعة أكس وتحفظ في غطاء خاص لمدة 7-14 يوماً . تظهر قطعة الحامض النووي التي تحمل المورث المطلوب كحزمة سوداء على الفلم بعد تحميضه (الشكل1-3) .

في كثير من الأحيان يتم اللجوء إلى ما يسمى ببنك المورثات أو مكتبة المورثات Genes Bank لعزل مثل تلك المورثات ، ويمكن أن تبنى مثل تلك المكتبات باستخدام قطع الحامض النووي أو قطع حامض نووي متمم (cDNA) Complementary DNA مستمدة من الحامض النووي المرسال (mRNA) Messenger RNA ويمكن الرجوع حول تفصيل ذلك إلى الفصول القادمة .




-هلام الاجاروز بعد الهجرة الكهربائية - - فلم اشعة × بعد التحميض .

1- نموذج الحامض النووي DNA بعد معاملته بأنزيم قطع معين .

2- نموذج قياسي من DNA العاثي لامبدا معامل بالانزيم Hind III .

3- الاشارة الاشعاعية السوداء التي تدل على حزمة الحامض النووي التي تحمل المورث المطلوب عزله ( ⇦ ⇦ ) .

**(شكل 3-1): قطع حامض نووي (DNA) مهجره كهربائياً عبر هلام الاجاروز ونتائج تهجينها بعد نقلها الى ورق خاص باستخدام مجس موسم إشعاعياً. الحزمة رقم (3) تمثل قطعة الحامض النووي B المهجنة مع المجس.**

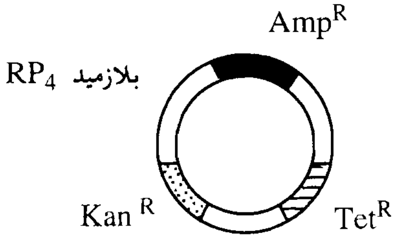
بعد تعيين موقع الحامض النووي التي تحمل المورث المطلوب تربط هذه مع ناقل مناسب . النواقل : هي جزئيات حامض نووي DNA قصيرة دائرية غالباً وقادرة على التضاعف المستقل عن الخلية أو سوية معها . وأفضل النواقل المعروفة جيداً والمستخدمة كثيراً في أعمال الهندسة الوراثية هي البلازميدات والعاثيات والكوزميدات (شكل 1-4) . تحتوي معظم هذه النواقل على مورثات معينة تسمح بالتعرف عليها في حالة وجودها في خلايا مضيف معين . ويمكن أن تكون هذه المورثات طبيعية مثل مورثات مقاومة المضادات الحيوية الموجودة في البلازميدات أو مورثات مزروعة في الناقل .

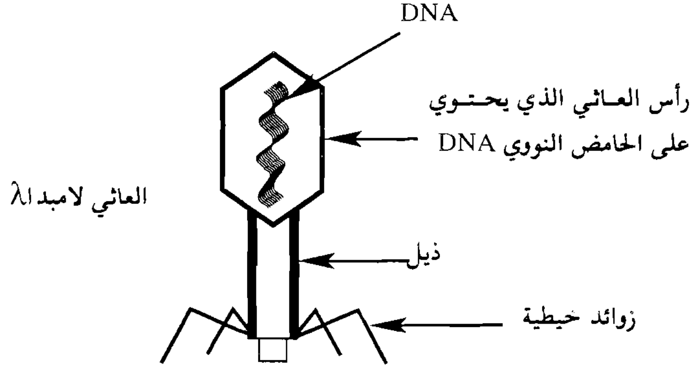
ولنفترض أن الناقل المستخدم هو بلازميد PBR322 ولأجل زرع قطعة الحامض النووي أو المورث في الناقل فأنه لابد من فتح الناقل بنفس أنزيم القطع المستخدم في تقطيع الحامض النووي لجين الكائن الأول . تُلْحم بعد ذلك قطعة المورث مع الناقل باستخدام أنزيم اللحـــام Ligase ويكون عندئذٍ الناقل الهجين جاهزاً للخطوة التالية .

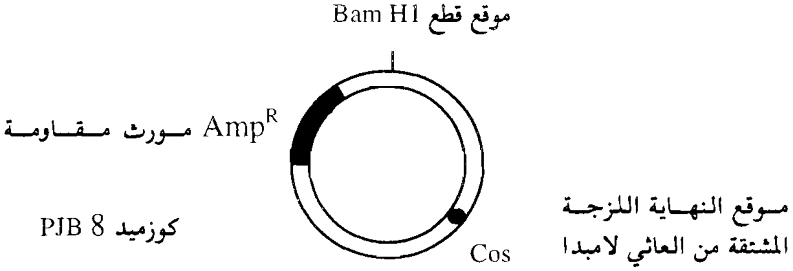
**ثانياً: إدخال النواقل الهجينة الى المضائف**

إن الخطوة التالية في الهندسة الوراثية هو إدخال النواقل الهجينة إلى خلايا مضائف مناسبة تسمح للمورث الجديد بالتعبير عن نفسه . إن أفضل الطرق المستخدمة في إدخال النواقل الهجينة هي ما تدعى بطريقة التحول Transformation التي يتم فيها معاملة خلايا المضيف (بكتيريا عادة) بواسطة محاليل ملحية بدرجة حرارة منخفضة لزيادة نفاذية جدرانها ثم مزج الخلايا المؤهلة للتحول Competent cells مع محول الناقل الهجين لأجل السماح له بالدخول إلى الخلايا ثم زراعة الخلايا على وسط غذائي انتخابي مناسب .إن طريقة التحول ليست صالحة لجميع أنواع البكتيريا ولكنها مناسبة جداً لأفضل المضائف المستخدمة في المختبرات وهي بكتيريا القولون <u>E.coli</u> . وقد تم تطوير هذه الطريقة مراراً لزيادة كفاءتها وشمل أنواع مختلفة من البكتيريا والخلايا الحية الأخرى .

كما تستخدم طريقة خلايا البروتوبلاست Protoplasts عند استخدام خلايا مضيفة بنائية .




**شكل(1-4): اشكال مختلفة من النواقل المستخدمة في الهندسة الوراثية.**

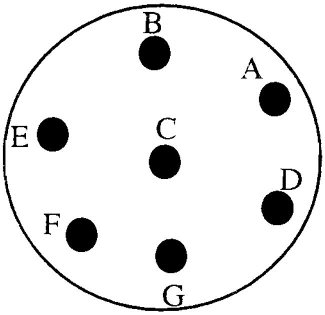
**ثالثاً: الكشف عن تعبير المورثات الجديدة**

تتضمن هذه المرحلة التأكد من نجاح المورث الجديد في التعبير عن نفسه في الخلايا المضيفة . وتعتبر هذه المرحلة حاسمة نظراً لوجود الكثير من العقبات التي قد تمنع المورث من العمل وبالتالي تصبح عملية الهندسة برمتها غير مجدية . تعتمد عملية التعبير عن المورث على نوع المورث ونوع الكائن الذي تم عزل المورث منه وكذلك نوع الناقل المستخدم في الكلونة . فمثلاً يمكن التعبير عن المورثات التي تعود للأحياء حقيقية النوى عندما تكون بهيئة cDNA وعندما يحمل الناقل محفزاً Promoter مناسباً للبكتيريا المضيفة . بينما لا يمكن التعبير عن نفس المورثات عندما تكون في هيئتها الطبيعية (مورثات مؤلفة من محاور Exons ومتداخلاتIntrons) عند استخدام نفس الناقل والمضيف . ويعود ذلك لعدم قدرة البكتيريا على إزالة الترددات المشفرة للمتداخلات في الحامض النووي المرسال mRNA المستنسخ من هذه المورثات .

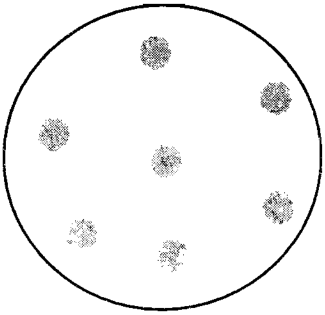
كما أن وجود محفز بكتيري في الناقل ضروري جداً لعملية استنساخ المورث المزروع إذ لا يتمكن أنزيم بلمرة الحامض النووي الريبوزي RNA Polymerase البكتيري من تمييز موقع بدء الاستنساخ والذي يطلق عليه صندوق تاتا TATA Box في محفزات مورثات الأحياء حقيقية النوى . لذلك فأنه لابد من استعمال محفز بكتيري لإنجاح عملية الاستنساخ وإنتاج شريط حامض نووي مرسال ، سنتناول هذا في الفصول القادمة إضافة إلى عقبات أخرى .

يمكن الكشف عن تعبير المورثات الجديدة من خلال استخدام كواشف كيميائية أو مناعية كفيلة بإعطاء نتيجة ذلك . وتعتبر الطريقة المناعية الأكثر استخداماً في ذلك . يتم في هذه الطريقة نقل المستعمرات البكتيرية المتحولة إلى ورق ترشيح ثم تعريضه إلى بخار الكلوروفورم لأجل تحليل الخلايا وإطلاق البروتينات . ولنفترض بأننا نحكم على تعبير مورث معين من خلال بناء البروتين A لذلك فأنه يستخدم مضاداً مناعياً للبروتين A وموسم اشعاعياً بنظير اليود 125 ($I^{125}$ ) مثلا . وعند غمس ورقة الترشيح مع محلول المضاد المناعي الموسم فأنه في حالة وجود البروتين A

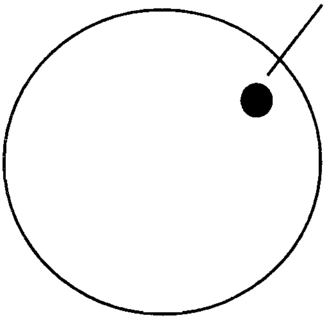
في أية مستعمرة من المستعمرات المنقولة على ورقة الترشيح فإن المضاد المناعي سيلتصق معه لتكوين معقد مشع . تغسل ورقة الترشيح لإزالة المواد المناعية الزائدة وتغطى بفلم حساس وتحفظ لفترة أسبوع أو أكثر وستظهر المستعمرات التي تحتوي البروتينA سوداء اللون على الفلم بعد التحميض بينما لا يظهر أي أثر للمستعمرات التي فشلت في التعبير عن المورث (الشكل 1-5) . كما يمكن توسيم المضاد المناعي بمواد متوهجة فلورسنية يمكن الكشف عن معقداتها بكل سهولة وخلال فترة قصيرة جداً باستخدام المجهر الفلورسني ( المجهر المتوهج) .




(1)- المستعمرات البكتيرية على الوسط الغذائي



(2) - نقل المستعمرات الى ورق خاص وتعريضه الى بخار الكلوروفورم لأجل تحليل المستعمرات وإطلاق بروتيناتها ثم تهجينها مع مضاد مناعي موسم باليود 125




(3)- اللوح الفوتوغرافي بعد التحميض

**شكل1-5 : الكشف عن تعبير المورثات عن طريق التهجين المناعي، الإشارة الموجبة تمثل منطقة ارتباط المجس المناعي مع البروتين الخاص بالمورث الجديد.**

أما بالنسبة لاستخدام الكواشف الكيميائية فيتطلب ذلك استخلاص البروتينات الخلوية من كل مستعمرة نامية وتحليله ، حيث يعتبر الكشف ناجحاً في حالة الحصول على بروتين إضافي للبروتينات الطبيعية الأخرى المعروفة في البكتيريا وذا مواصفات مماثلة لمواصفات البروتين A مثلاً . كما أنَّ هناك طرقاً كيميائية أكثر تعقيداً وتحديداً من الطريقة السابقة ويمكن الرجوع إليها في مصادر الكيمياء الحياتية .

## تطبيقات الهندسة الوراثية

تعتبر الهندسة الوراثية إحدى الثورات العلمية في القرن العشرين . ويتكهن البعض بأنها ستتصدر الأهمية الأولى في القرن الواحد والعشرين حيث أدت تقنيات الهندسة الوراثية إلى الكشف عن الكثير من المعلومات التي تتعلق بالمورثات وعملها وطرق استنساخها وغيرها من المعلومات التي كانت ولعهد ليس بعيداً من المعلومات الغامضة . وكان من نتيجة الكشف عنها معرفة الكثير من أسرار الكائنات الحية . بالإضافة الى الجانب الأكاديمي للهندسة الوراثية فقد تجمعت العديد من المعلومات والأفكار التي أهلت الهندسة الوراثية للولوج في العالم التطبيقي للمعرفة . وهكذا دخلت الهندسة الوراثية المجال الواسع في الصناعة والطب والزراعة وغيرها من المجالات الحياتية الهامة وكان من نتيجتها إنتاج العديد من المضادات الحيوية كالبنسلين والسيفالوسبورين والستربتومايسين وعوامل النمو والعديد من الأنزيمات واللقاحات كما استخدمت الهندسة الوراثية لإنتاج العديد من الطرز النباتية المقاومة للمبيدات وللحشرات والفطريات والتي أدت إلى تحسين الإنتاج الزراعي وتطويره . كما استخدمت هذه التقنيات في البحوث الطبية لتشخيص الأمراض ذات المنشأ الوراثي ولمعرفة الاختلالات الوراثية المرتبطة ببعض الأمراض كما هي الحال في مرض فقر الدم المنجلي الوراثي والسكر والسرطان وأنواع مختلفة من الأمراض الأخرى ونوجز هنا بعض تطبيقات الهندسة الوراثية .

1 . **تشخيص الأمراض الوراثية** : تمثل الأمراض الوراثية أحد أهم الفروع الطبية نظراً لعدم توفر طرق التشخيص الملائمة وصعوبة علاج الكثير منها ومن أهم

الأمراض فقر الدم المنجلي Sickle cell anemia والثالاسيما Thalassaemia وقد أجريت حول هذه المرضين العديد من الأبحاث التي بينت أسباب حصولهما (طفرات وراثية) . وباستخدام الهندسة الوراثية فأنه أصبح بالإمكان التشخيص المبكر لهذه الأمراض في المرحلة الجنينية . حيث يتم أخذ عينة من خلايا الجنين واستخلاص الحامض النووي منها بعد تكثيرها مختبرياً ثم تقطيعه بأنزيمات معينة . وباستخدام مجس معلم إشعاعياً (مورث بيتا- جلوبين في فقر الدم المنجلي) فأنه يمكن الكشف عن وجود هذا المرض . ويتم استخدام تقنية الهندسة الوراثية في متابعة العديد من الأمراض التي ترتبط بعيوب وراثية كالطفرات الوراثية أو الانتقال الصبغي أو تنشيط مورثات غير طبيعية . وتعتبر أبحاث السرطان باستخدام هذه التقنية من التطبيقات الرائدة في هذا المجال . وعلاوة على ذلك فأن الهندسة الوراثية تستخدم الآن في مشاريع كبيرة تهدف إلى وضع خرائط صبغية تبين مواقع المورثات البشرية عليها .

كما تستخدم في مجال تحديد القرابة والكشف عن المجرمين والجرائم باستخدام طريقة بصمة الحامض النووي (DNA-fingerprints) .

2 . **التطبيقات الصناعية** : باستخدام الهندسة الوراثية فأنه تم الآن معرفة مواقع العديد من المورثات وفي كائنات مختلفة ، وأصبح - نتيجة لذلك - بالإمكان عزلها وهندستها وراثياً ونقلها إلى كائنات جديدة . وأصبح بإمكاننا اليوم إنتاج العديد من المضادات الحيوية كالبنسلين والسيفالوسبورين والستربتومايسين ، كما أصبح بإمكاننا إنتاج أنواع مختلفة من الهرمونات مثل الأنسولين وهرمونات النمو (السوماتوتربين) وكذلك إنتاج اللقاحات وغيرها . كما أمكن اليوم من خلال الهندسة الوراثية تصنيع أنواع مهمة من البروتينات الوحيدة الخلية و الأصباغ الغذائية الطبيعية وكذلك استخدامها في مجال تحليل المركبات الكيميائية السامة .

3 . **التطبيقات الزراعية** : أما في المجال الزراعي فقد استخدمت الهندسة الوراثية في تطوير نباتات مقاومة للرواشح ونباتات مقاومة لمبيدات الأعشاب وذلك من خلال هندسة مورثات الرواشح أو مورثات بكتيرية مقاومة للمبيدات ثم زراعتها في أنسجة النباتات .

وقد انتجت باستخدام هذه الطريقة نباتات تبغ مقاومة لراشح التبغ الفسيفسائي Tobacco mosaic v. وأخرى مقاومة لمبيدات الأعشاب وغيرها من النباتات المحسنة . كما تم زراعة مورثات مهندسة وراثياً معزولة عن البكتيريا Serratia marcescens في نباتات البازلاء وغيرها لمقاومة مرض الذبول Wilt ، هذا إضافة إلى المحاولات الناجحة العديدة في مجال تحسين الثروة الزراعية والحيوانية .

# 2

# مقدمة في الوراثة الجزيئية

مقدمة

تركيب الأحماض النووية

نظرية الحلزون المزدوج

ترتيب الحامض النووي DNA في الأحياء حقيقية النوى

ترتيب الحامض النووي DNA في الأحياء بدائية النوى

التضاعف شبه المحافظ للحامض النووي DNA

المورثات

تركيب المورثات

الشفرة الوراثية

تعبير المورثات

استنساخ المورثات

الترجمة

تنظيم تعبير المورثات

## مقدمة

لقد كان الاعتقاد السائد قبل التعرف على الحامض النووي DNA كمادة وراثية أن البروتينات هي المادة المسؤولة عن وراثة الكائنات الحية على الرغم من أن الأحماض النووية كانت معروفة جيداً ومنذ عام1871 . ويعود سبب الاهتمام بالبروتينات آنذاك إلى الصفات الخاصة التي تمتلكها . فالبروتينات ذات أهمية كبيرة في جميع النشاطات الحياتية وتمتلك خصائص وتركيب كيميائي متميز .

فالبروتين هو عبارة عن جزيئة بوليمر مؤلفة من شريط أو أكثر من متعدد الببتيدات . وكل من هذه الأشرطة مؤلف من وحدات متكررة تدعى بالأحماض الأمينية ترتبط مع بعضها البعض بواسطة أواصر ببتيدية . إن البروتين في جميع الأحياء قاطبة مؤلف من عشرين حامضاً أمينياً ، وإن هذه الأبجدية محفوظة في الكائنات ومنذ زمن لا يقل عن بليوني سنة . بالإضافة إلى ذلك فأنه يمكن الحصول على أشكال مختلفة من البروتينات عن طريق الاختلاف في نوع سلاسل عديد الببتيد أو أعدادها وكذلك ترتيب توالي الأحماض الأمينية في هذه السلاسل . وبناء على ذلك فأنه يمكن الحصول على أعداد ضخمة جداً من البروتينات . بالإضافة إلى أن بعض البروتينات يمكن أن تكون بأشكال أيزوميريه مختلفة . نتيجة حركة ذرات الكاربون المرتبة حول ذرة الكاربون الفا التي تمثل عمود الوحدة البنائية للحامض الأميني .

إن جميع هذه المواصفات وغيرها ، جعلت من البروتين محوراً لجميع الأبحاث العلمية المتعلقة بالكشف عن المادة الوراثية ، وأدت إلى تأخير أبحاث علم الوراثة وأهمل دور الحامض النووي DNA لفترة جاوزت الستين عاماً على الرغم من وجود بعض الأصوات التي حاول جذب الانتباه إليه ولكن دون جدوى .

في عام 1928 ظهر أول دليل على أهمية الحامض النووي كمادة وراثية وذلك من خلال تجارب الباحث فريدريك كرفش عام 1928 على المكورات الثنائية لذات الرئة Diplococcus Pneumoniae .

وعلى الرغم من أن تجارب هذا الباحث لم تحدد فيما إذا كان الحامض النووي المسؤول عن الصفات الوراثية التي ظهرت في تجاربه هو DNA أو RNA إلا أنه تم تطوير هذه التجارب ليتم إثبات دور الحامض النووي DNA كمادة وراثية . وهكذا سلط الضوء نحو الهدف الحقيقي لتتوالى بعدها الأبحاث العلمية التي أكدت الخبر وبينت للعالم الضلالة التي كانوا فيها طيلة الستين سنة التي سبقت هذه النتائج .

## تركيب الأحماض النووية

الأحماض النووية هي بوليمرات مؤلفة من وحدات متكررة تدعى النيولكيوتيدات . والأحماض النووية نوعان هما الحامض النووي منقوص الأوكسجين الذي يرمز له اختصاراً DNA والحامض النووي الريبوزي RNA . تتألف الوحدة الأساسية للحامض النووي (النيوكليوتيد) من قاعدة نايتروجينية وسكر خماسي بالإضافة إلى مجموعة فوسفات .

هناك مجموعتان من القواعد النايتروجينية هما البيرميدينات المؤلفة من حلقة سداسية مفردة وتمثل قواعد الثايمين والسايتوسين واليوراسيل هذه المجموعة . أما المجموعة الثانية فهي مجموعة البيورينات المؤلفة من حلقه سداسية مرتبطة مع حلقة خماسية وتضم هذه المجموعة قواعد الأدنين والجوانين (الشكل 2-1) .

أما السكر الخماسي الذي يدخل في تركيب النيوكليوتيد فهو نوعان هما السكر الخماسي منقوص الأوكسجين الموجود في الحامض النووي DNAحيث يحتوي هذا السكر على مجموعة واحدة من الهيدروكسيل مرتبطة مع ذرة الكاربون الثالثة ، والسكر الخماسي الريبوزي الموجود في الحامض النووي RNA والذي يحتوي على مجموعتي هيدروكسيل مرتبطتين مع ذرة الكاربون الثانية والثالثة .

وترتبط هذه المركبات الثلاثة بطريقة معينة مؤلفة النيوكليوتيد (الشكل 2-2) .

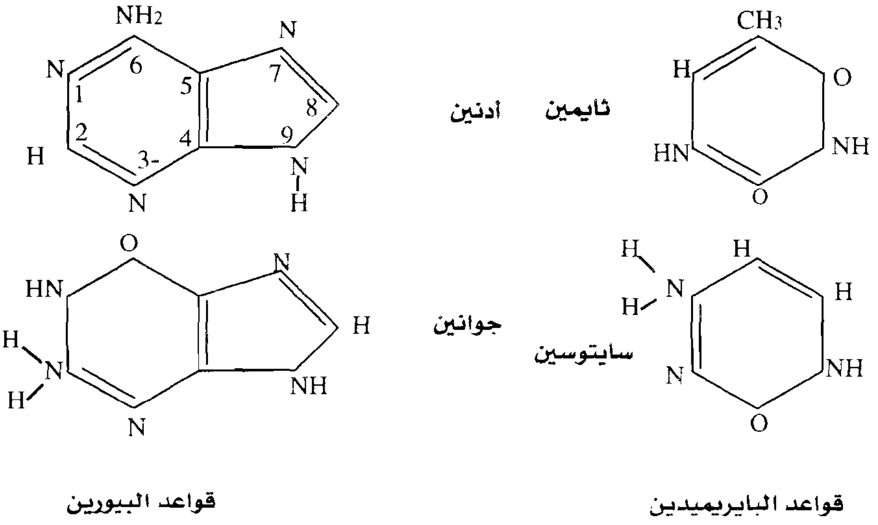
ونظراً لوجود أربع قواعد نايتروجينية في الحامض النووي DNA لذلك فأن هناك أربعة أنواع من النيوكليوتيدات تبعاً لذلك . تترتب وحدات النيوكليوتيدات بطريقة خاصة لتأليف سلسلة عديده النيوكليوتيدات حيث ترتبط ذرة أوكسجين من مجموعة

الفوسفات المربوطة بذرة الكاربون الخامسة للسكر الخماسي مع ذرة الكاربون الثالثة للسكر الخماسي للنيوكليوتيد التالي وترتبط ذرة الأوكسجين التابعة لمجموعة الفوسفات لهذا النيوكليوتيد مع ذرة الكاربون الثالثة للنيوكليوتيد التالي الآخر وهكذا يتوالى ارتباط النيوكليوتيدات مع بعضها برابطة الفوسفور ثنائي الاستر Phospho-diester bond وتمثل العمود الفقري لسلاسل الحامض النووي .

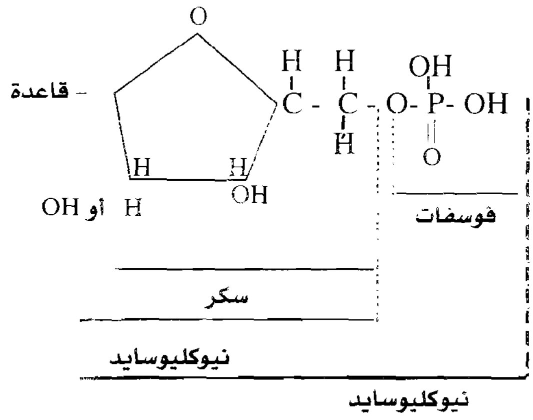
إن اتجاه ارتباط ذرة الكاربون الخامسة لنيوكليوتيد مع ذرة الكاربون الثالثة لنيوكليوتيد آخر يستمر على طول السلسلة مما يولد قطبية مهمة جداً في تضاعف الحامض النووي وتعبير المورثات . ونتيجة لذلك فأن إحدى نهايات سلسلة الحامض النووي تحتوي على مجموعة فوسفوريل 5-Phosphoryl بينما تحتوي النهاية الثانية على مجموعة هيدروكسيل 3- Hydroxyl- ونظراً لوجود سلسلتين في الحامض النوويDNA فأنهما تترتبان بطريقة ذات اتجاهات متعاكسة (الشكل 2-3) .

ترتبط سلسلتا الحامض النووي DNA مع بعضهما بواسطة القواعد النايتروجينية التي ترتبط مع بعضها عن طريق الروابط الهيدروجينية . ويتم من خلالها ارتباط الادنين مع الثايمين والجوانين مع السايتوسين (الشكل 2-4 و 2-5) .

ويذكر أن الحامض النووي RNA يختلف قليلاً عن الحامض النوويDNA حيث إنه بالإضافة الى اختلاف نوع السكر الخماسي فأن اليوراسيل يحل بدلاً من الثايمين في الحامض النووي RNA . بالاضافة إلى أن الحامض النووي RNA هو سلسلة مفردة .




(الشكل 2-1): القواعد النيتروجينية في الحامض النووي الريبوزي منقوص الاوكسجين




(الشكل 2-2): تركيب النيوكليوتيد

## نظرية الحلزون المزودج

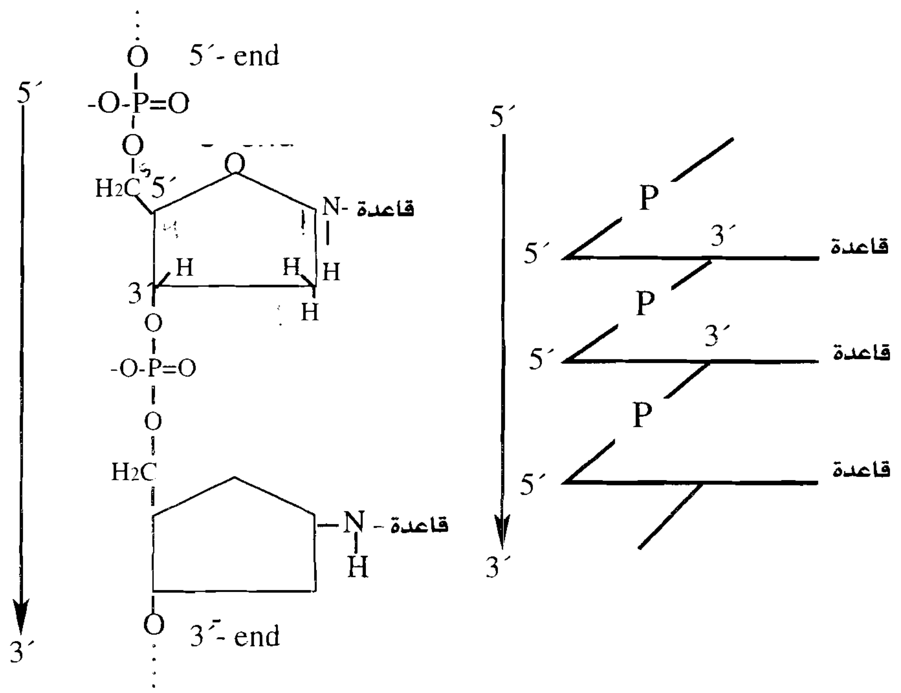
تدعى هذه النظرية أيضاً بالموديل ثلاثي الأبعاد للحامض النووي DNA وقد وضعها العالمان الحائزان جائزة نوبل واطسون وكريك عام 1953 . استندت هذه النظرية إلى نموذج ثلاثي الأبعاد تم بناؤه ، ويمثل الحامض النووي DNA . يفترض النموذج أن الحامض النووي يتألف من سلسلتين أو شريطين مرتبطين مع بعضهما ويلتف هذا المزدوج بطريقة تشبه الحلزنة . لقد وجد هذان الباحثان بأن قطر الشريط المزدوج الذي يفي بارتباط الجوانين مع السايتوسين والثايمين مع الادنين خلال الفراغ بين الشريطين هو 20 انكستروم أو مايعادل 2 نانوميتر . وأن الحلزنة نحو اليمين ويتحلزن الشريط المزدوج كل 34 انكستروم لتوفير عشر قواعد متزاوجة في هذه المسافة . لذا فإن المسافة بين كل زوج قاعدي وآخر ستكون 3.4 انكستروم (الشكل 2-6) . لقد استندت هذه النظرية إلى العديد من الحقائق العلمية التي تم اكتشافها حول تركيب الحامض النووي مثل نسب القواعد النايتروجينية وطريقة ارتباطها والنيوكليوتيدات وتركيبها وارتباطها مع بعضها ونموذج أشعة أكس المأخوذة لبلورة الحامض النووي وغير ذلك من المعلومات . لذلك فأن هذه النظرية جاءت لتربط هذه المعلومات مع بعضها لتعطي الصورة الجميلة التي وضعها الباحثان واطسون وكريك للحامض النووي . لقد أوضح موديل الحامض النووي الخاص بهذه النظرية أربعة أمور مهمة تعبر عن أهم صفات المادة الوراثية وهي :

1 . الاستقرارية خلال العمليات الايضية .

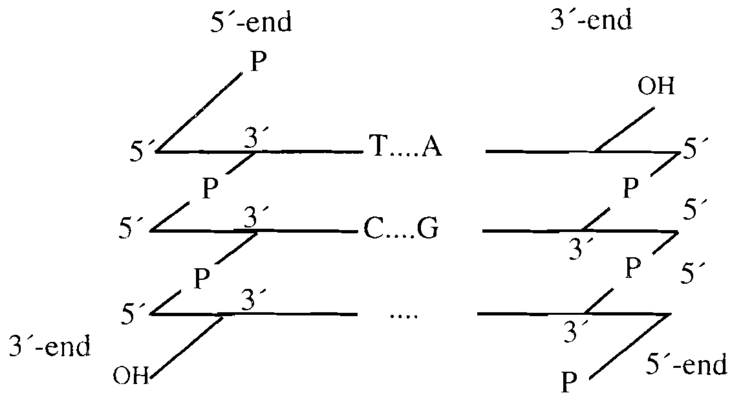
2 . تضاعف محكم شبه محافظ .

3 . وجود تنوع جزيئي .

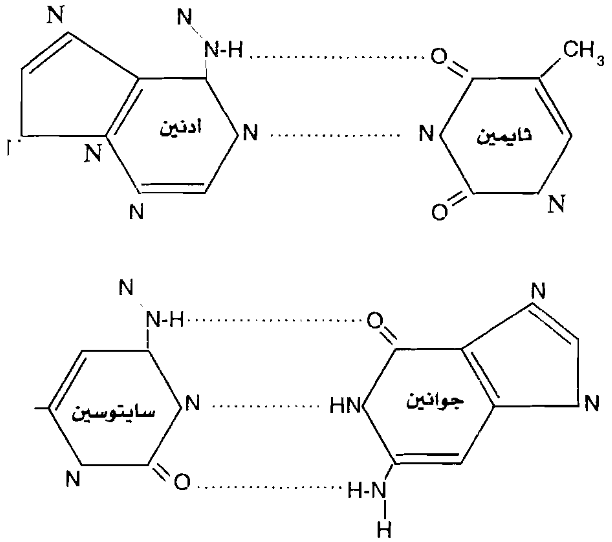
4 . وجود سعة كافية في الموديل لحصول الطفرات الوراثية .



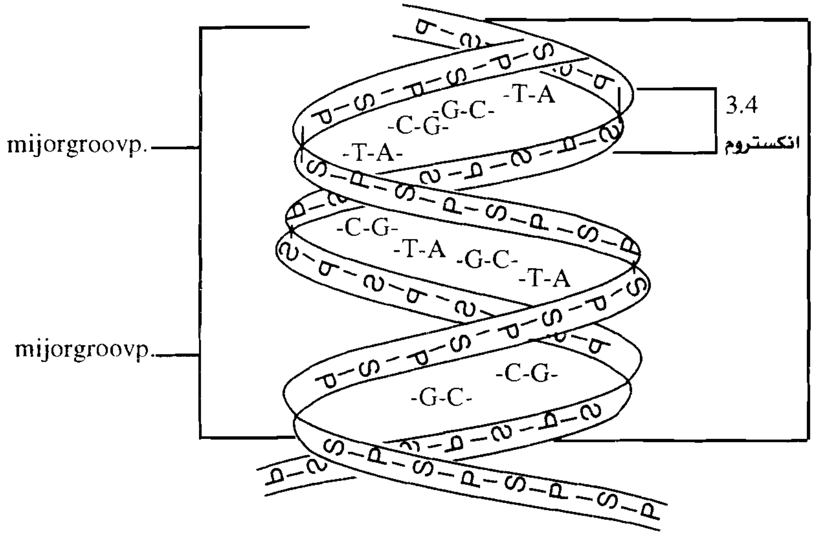

(الشكل 2-3): ارتباط النيوكليوتيدات في سلسلة متعدد النيوكليوتيدات حيث إن المجموعة الفوسفورية لذرة الكاربون الخامسة لسكر نيوكليوتيد ترتبط مع ذرة الكاربون الثالثة لسكر نيوكليوتيد آخر.




(الشكل 2-4): الاتجاهات المتعاكسة لأشرطة الحامض النووي حيث تمثل أواصر الفوسفور ثنائي الأستر العمود الفقري للأشرطة بينما تمثل مجموعة 5-P المجموعة النهائية لكل شريط




(الشكل 2 -5) ارتباط ازواج القواعد النايتروجينية في سلسلتي الحامض النوويDNA.




(الشكل 2-6): رسم تخطيطي لنموذج واطسن وكريك لتركيب الحلزون المزدوج في الحامض النوويDNA.

## ترتيب وتنظيم الحامض النووي *DNA* في الأحياء حقيقية النوى

يترتب هذا الحامض في الأحياء حقيقية النوى بطريقة دقيقة ومكثفة . إذ يتوزع الحامض النووي على مجموعة كاملة من الأجسام الطويلة التي تدعى بالصبغيات أو الكروموسومات تقع داخل نواة متميزة محاطة بجدار نووي يفصلها عن السايتوبلازم بشكل شبه تام . ويمكن رؤية هذه الصبغيات أثناء انقسام الخلايا بينما تختفي في طور الراحة . كما يمكن رؤية خيوط الحامض النووي في هذه الطور تحت المجهر الالكتروني . تظهر هذه الخيوط رفيعة ذات مواقع منتفخة بحيث يشبه الخيط الواحد المسبحة تدعى هذه المواقع بالنيكليوسومات Nucleosomes (الشكل 2-7) .

تدعى الحالة التي توجد فيها الصبغيات على هذه الهيئة بالكروماتين . يحاط الحامض النووي الصبغي ببروتينات خاصة تدعى بالبروتينات الهستونية أو الهستونات وهي بروتينات قاعدية ذات شحنة موجبة في الوسط الحامضي المتعادل . كما ان هناك نوعاً آخر من البروتينات الصبغية تدعى بالبروتينات غير الهستونية وهي بروتينات حامضية ذات شحنة سالبة في الوسط المتعادل . لقد تم تمييز خمسة أنواع من الهستونات وهي $H_4,H_3,H_{2b}, H_{2a}, H_1$ وهي ثابتة في جميع الأحياء تقريباً . تترتب الهستونات بطريقة خاصة مع الحامض النووي مكونة معقد تركيبي يمثل الوحدة الأساسية للكروماتين يدعى بالنيوكليوسوم (الشكل 2-7) .

ويعتقد أن تركيب وترتيب النيوكليوسومات لهما أهمية كبيرة في التعبير الوراثي . ويتكثف البروتين أثناء الانقسام ليؤدي إلى تجميع البروتينات الصبغية بطريقة شعاعية تستند إلى قلب من البروتينات غير الهستونية .

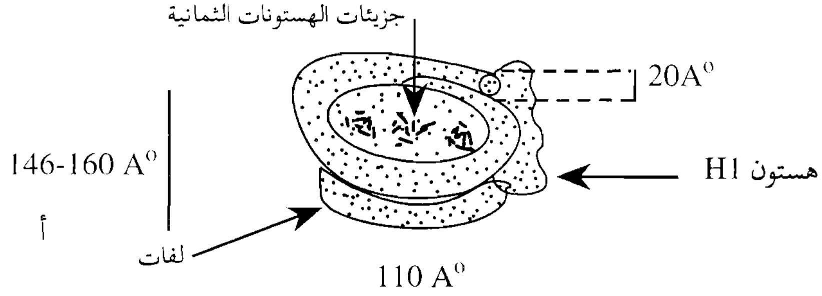
تظهر الصبغيات في الطور التمهيدي مؤلفة من قطعتين مرتبطتين في منطقة معينة تدعى بالسنترومير Centromere وتدعى القطع بالكروماتيدات . ويظهر الصبغي مؤلفاً من كروماتيدتين بسبب تضاعف الحامض النووي في الطور البيني . كما يختلف موقع السنترومير في الصبغيات (الشكل 2-8) .

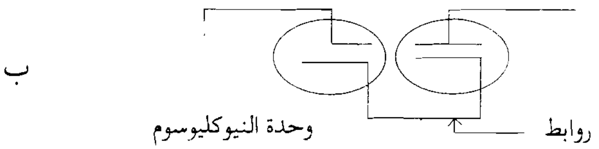
تختلف درجة تكثف الحامض النووي على الصبغي من منطقة إلى أخرى . وتظهر المناطق الكثيفة كحزم واضحة وغامقة عند تلوين الصبغيات فيما تبدو المناطق

الأقل كثافة كحزم فاتحة اللون . تدعى المناطق الكثيفة والشديدة الاصطباغ بالكروماتين المتغاير أو المتباين Heterochromatin وتقع معظم الترددات غير المشفرة في الحامض النووي في هذه المناطق بينما تدعى المناطق الأقل كثافة واصطباغاً بالكروماتين الحقيقي Euchromatin وتنتشر في هذه المناطق المورثات التركيبية ذات القدرة على التعبير .

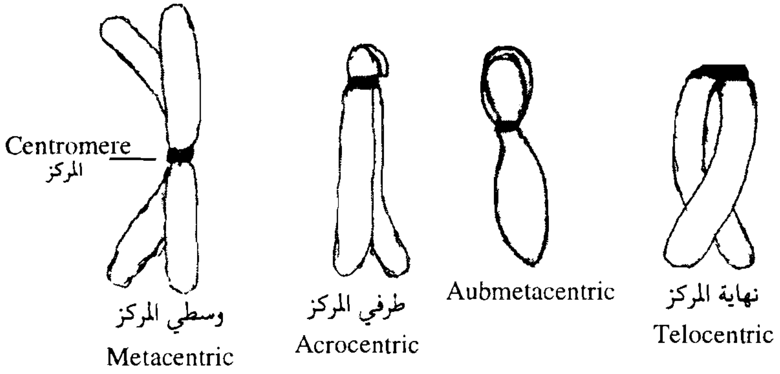
ويمكن رؤية بعض الصبغيات في عدد من الأحياء كالفرشاة نتيجة تضخم مناطق معينة من الحامض النووي بطريقة تتشعب من الصبغي معطية شكل الفرشاة وتدعى هذه الصبغيات بالصبغيات الفرشائية Lambbrush chromosome ويمكن مشاهدتها في الغدد اللعابية لبعض الحشرات (الشكل 2-9) .

وبالإضافة إلى وجود الحامض النووي DNA في الصبغيات فأن بعض العضيات السايتوبلازمية تحتوي على كمية منه كما هي الحال في المايتوكوندريا والبلاستيدات النباتية .

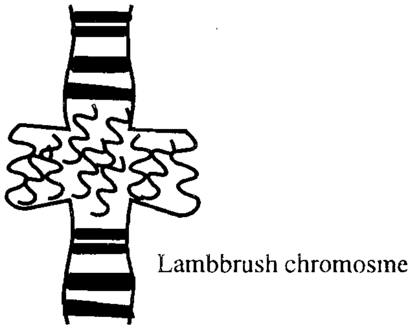



**(الشكل 2-7): أ -تركيب النيوكليوسوم ويلاحظ التفاف جزيئة الحامض النووي حول لب مكون من ثماني جزيئات من الهستونات وجزيئة تاسعة خارجية لتثبيت لفات الحامض النووي. ب- أسلوب ارتباط وحدات النيوكليوسوم المكونة للكروماتين**




(الشكل 2-8): المواقع المختلفة للسنترومير (المركز) في الصبغيات.

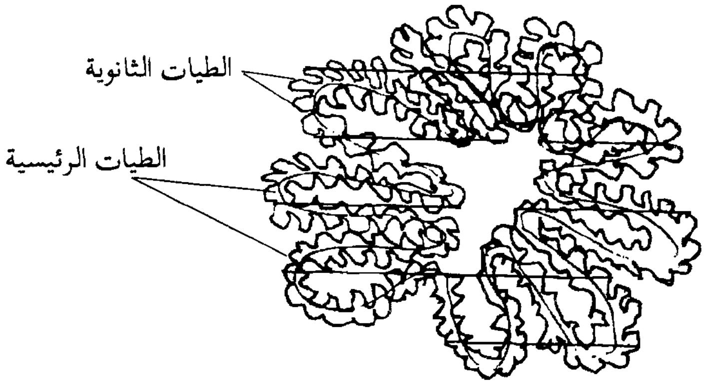



(شكل2-9): الصبغي الفرشائي ويلاحظ التضخم الحاصل في بعض المورثات المحمولة على هذا الصبغي لأجل الايفاء بالحاجة الخلوية للبروتينات المشفرة منها

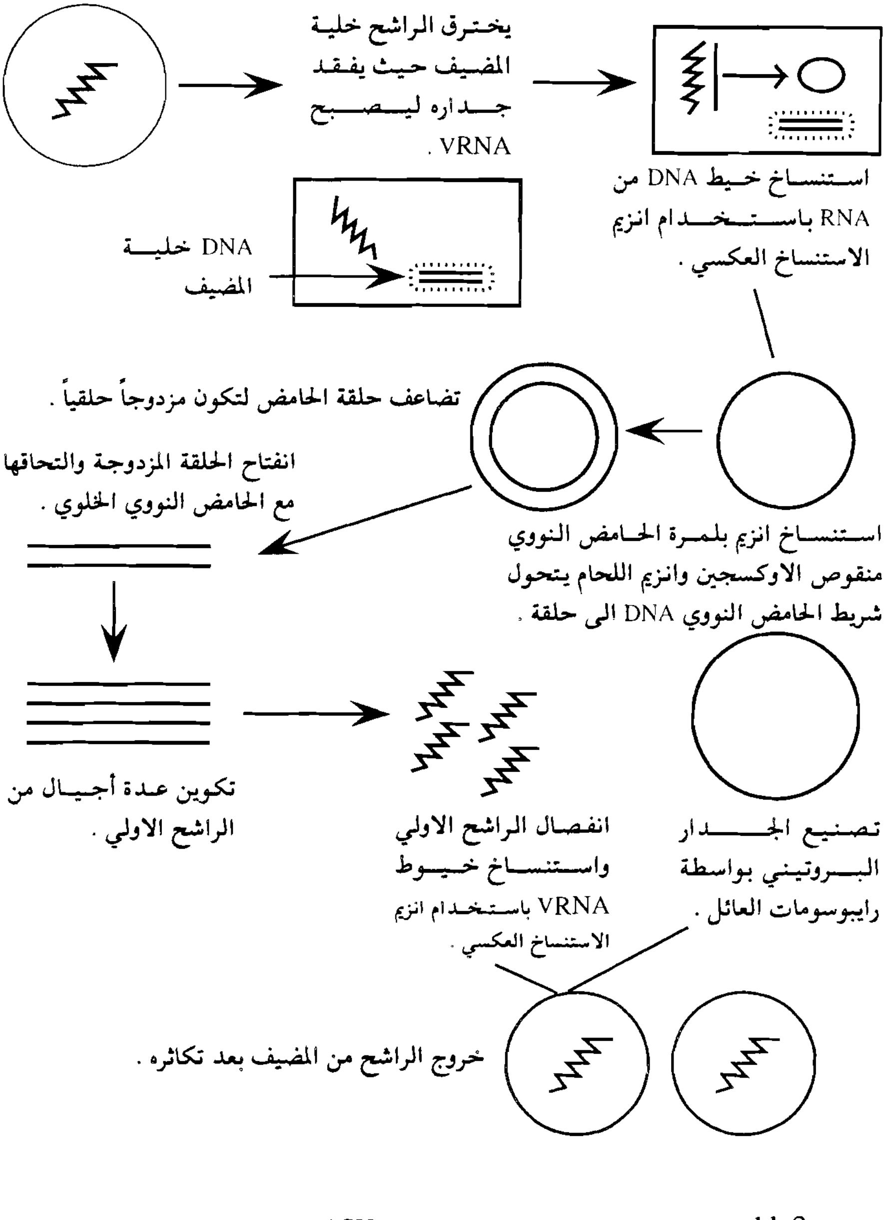
## ترتيب الحامض النووي *DNA* في الأحياء بدائية النوى

تحتوي الأحياء بدائية النوى كالبكتيريا على حامض نووي حر في السايتوبلازم يظهر تحت المجهر الإلكتروني كحزمة دائرية متشعبة ذات نهايات تعطي الحامض النووي شكلاً نجمياً ويدعي عادة بالصبغي الملتف Folded chromosome . يحتوي هذا الصبغي على كمية قليلة من البروتينات التي يعتقد أن لها أهمية في إعطاء الشكل الخاص بالحامض النووي في هذه الأحياء (شكل 2-10) ، تمتلك معظم البكتيريا جزءاً آخر مستقلاً من الحامض النووي الإضافي يكون بهيئة حلقة دائرية يدعى بالبلازميدPlasmid . وقد تحتوي بعض انواع البكتيريا عدداً منه وتحتوي هذه البلازميدات على عدد من المورثات الخاصة التي تساعد البكتيريا على إظهار صفة مقاومة المضادات الحياتية بالإضافة إلى مساهمات أخرى . ويذكر أن البلازميدات تتضاعف بصورة مستقلة عن الحامض النووي الصبغي شأنها شأن المايتوكوندريا والبلاستيدات .

أما الرواشح أو الفايروسات والعاثيات فأنها تمتلك أشرطة مزدوجة أو مفردة من الحامض النووي القصير الطول والذي يحتوي على عدد من المورثات التركيبية . فيما تمتلك رواشح أخرى الحامض النووي RNA ولهذه طريقة خاصة في التضاعف (الشكل2-11) . وتعتبر الرواشح عموماً أنظمة وراثية غير قادرة على التضاعف المستقل . تحاط الرواشح ببروتينات خاصة تقع المادة الورثية في مركزها .




**(الشكل2-10): الصبغي الملتف في الأحياء بدائية النواة كالبكتيريا ويلاحظ أن هذا الالتفاف يساعد الحامض النووي في إشغال حيز صغير جداً من حجم الخلية**



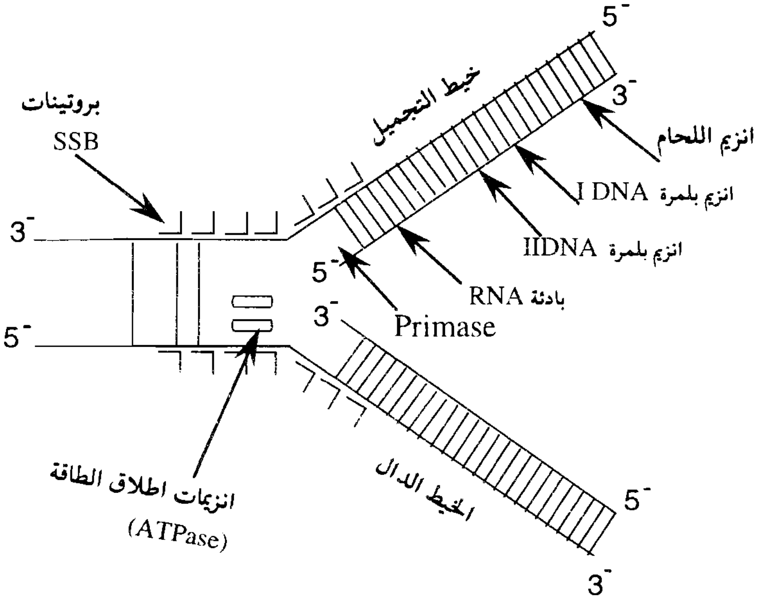

**(الشكل 2-11): دورة تضاعف راشح سرطان العضلاتASV، يستخدم الراشح أنزيم الاستنساخ العكسي للتحول الى نسخة حامض نووي منقوص الأوكسجين بدلاً من حامض نووي ريبوزي ليتضاعف ثم يتحول إلى نسخة حامض نووي ريبوزي ليخرج بعدها الراشح من المضيف .**

## التضاعف شبه المحافظ للحامض النووي *DNA*

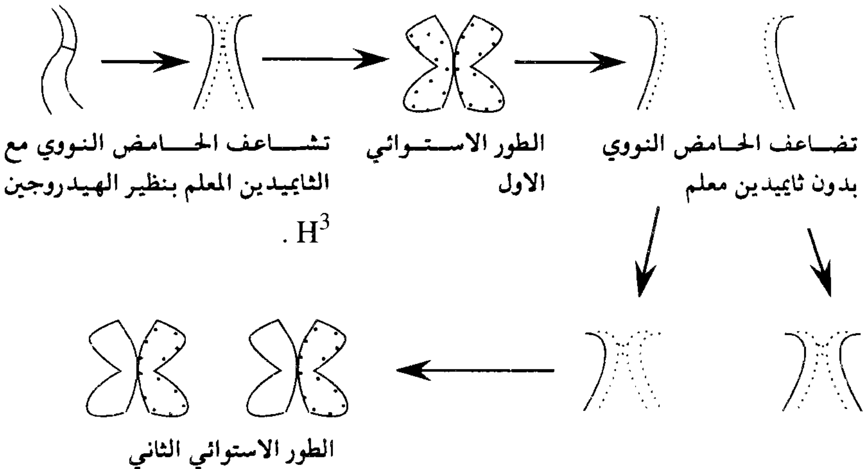
إن آلية تضاعف الحامض النووي في الأحياء تتم استناداً إلى ما افترضته نظرية الحلزون المزدوج . إن عملية تضاعف الحامض النووي هي ببساطة شديدة انفصال شريطي الحامض النووي المتضاعف واستخدام كل شريط كقالب لبناء شريط جديد .

تتم هذه العملية بتحطيم الأواصر الهيدروجينية التي تربط أزواج القواعد النايتروجينية في الشريطين بواسطة أنزيمات معينة سيتم التطرق إليها لاحقاً في الفصول القادمة . يتم بعدها انفصال الأشرطة في منطقة أو مناطق معينة تدعى بمناطق بدء التضاعف أو أصل التضاعف (يبدأ) عند هذه المناطق بناء الأشرطة الجديدة باستخدام النيوكليوتيدات الأربعة واستناداً إلى تسلسل النيوكليوتيدات في القالب يتم ربطها مع بعضها البعض . ويستمر انفصال الأشرطة وبناء الأشرطة الجديدة حتى اكتمال انفصال الأشرطة الأبوية (الشكل 2-12) . تدخل في هذه العملية العديد من الأنزيمات مثل أنزيمات بلمرة الحامض النووي DNA Polymerases وانزيمات فك حلزنة الحامض النووي Topoisomerases وأنزيمات كسر الأواصر الهيدروجينية ATPases وغيرها من الأنزيمات .

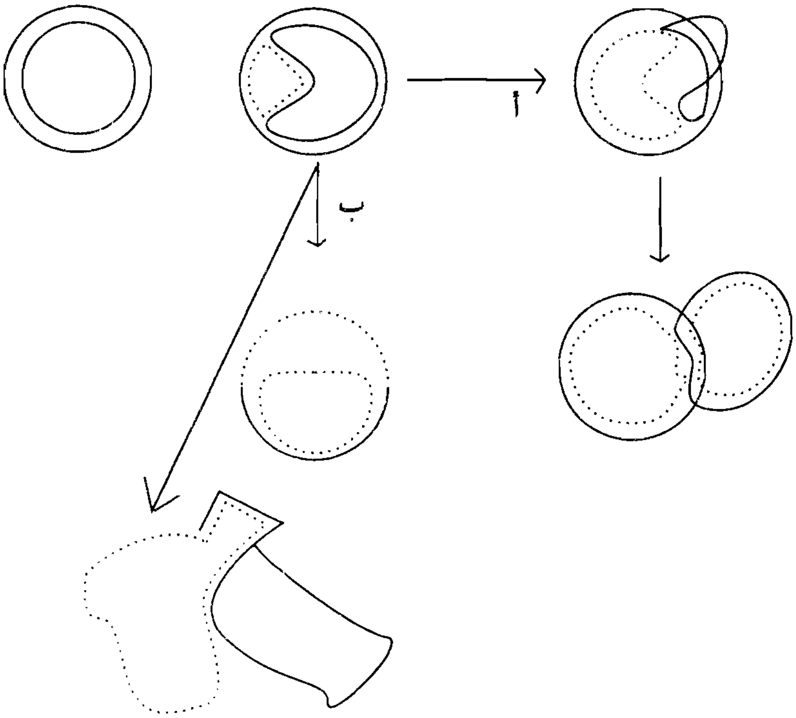
إن آلية التضاعف شبه المحافظ للحامض النووي هي طريقة عامة تتبعها جميع الأحياء فهي متماثلة في الرواشح والعاثيات والبكتيريا والحيوانات والنباتات مع وجود فروق بسيطة في ذلك (الشكل 2-13) (شكل 2-14) .




(الشكل 2-12) : الأنزيمات المرافقة لعملية التضاعف وأماكن عملها خلال تصنيع أشرطة الحامض النووي الجديدة




(الشكل 2-13): تخطيط لتضاعف الحامض النووي في الباقلاء حيث يلاحظ وجود كروماتيدة واحدة حاوية على البقع الفضية (أبوية) بينما تمثل الكروماتيدة الثانية الكروماتيدة المتضاعفة




(الشكل 2-14 ): الاشعاع الذاتي لمراحل تضاعف الحامض النووي الخلوي لبكتيريا القولون E.coli النامية على وسط غذائي يحتوي على الثايميدين المُعَلَّم بنظير الهيدروجين $H^3$ لأقل من انقسامين خلويين. يظهر الحامض النووي الجديد ذو نقاط فضية لماعة أثناء الفحص المجهري ويأخذ التضاعف شكلاً خاصاً (ب) ويمثل الشكل (أ) توضيحاً لما يحدث.

## المورثات *Genes*

**المورثات :** عبارة عن ترددات من النيوكليوتيدات تتراوح بين 500-1000 زوج قاعدي Base bair(bp) وتترتب ضمن ترددات الحامض النووي DNA . تفصل بين مورث وآخر فاصلة مؤلفة من عدد قليل من الترددات .

ونظراً لتوزع المادة الوراثية على مجموعة كاملة من صبغيات الأحياء حقيقية النوى فأن المورثات تتوزع أيضاً على هذه الصبغيات . ونظراً لاختلاف أطوال الصبغيات فإن عدد المورثات التي تحملها مختلف ولكن بشكل عام فإن معدل المورثات يبلغ حوالي 100 الف مورث . أما بالنسبة للأحياء بدائية النوى فأن جميع المورثات الخاصة بها محمولة على نفس شريط الحامض النووي إلا أن عددها أقل من تلك الموجودة في الأحياء حقيقية النوى وقد يصل بعضها في الرواشح إلى أربعة أو خمسة مورثات فقط . يحتوي الحامض النووي DNA بالإضافة إلى المورثات التركيبية على ترددات مختلفة بعضها معروف الوظيفة ومعظمها لا يزال مجهولاً كما هي الحال في الترددات المتكررة Repetitive sequences والترددات التابعية Satellite DNA وغيرها .

## تركيب المورثات

يتألف المورث من عدد من المناطق مختلفة الوظيفة . إذ تحاط المناطق الوسطية من المورث والتي تمثل أصل الشفرات الوراثية بمناطق مثل المحفز Promoter الذي يقع في النهاية الخامسة للمورث ويحمل ترددات معينة تمثل شفرة خاصة تسهل تعرف أنزيمات بلمرة الحامض النووي RNA والاستقرار عليه لبدء عملية بناء شريط الحامض النوويRNA له . وتتميز جميع محفزات المورثات بأحتوائها على ترددات معينة مؤلفة من سبعة ترددات يتوالى فيها الثايمين مع الادنين . . TATA. تدعى هذه الترددات بترددات تاتا أو صندوق تاتا أو صندوق بريبنو أو صندوق هوجنكز . كما يحتوي المحفز على ترددات أخرى تعمل على تنظيم عملية الاستنساخ . وتلعب البروتينات غير الهستونية دوراً إضافياً لدور المحفز . ويذكر بأن قوة تعبير المورثات يعتمد

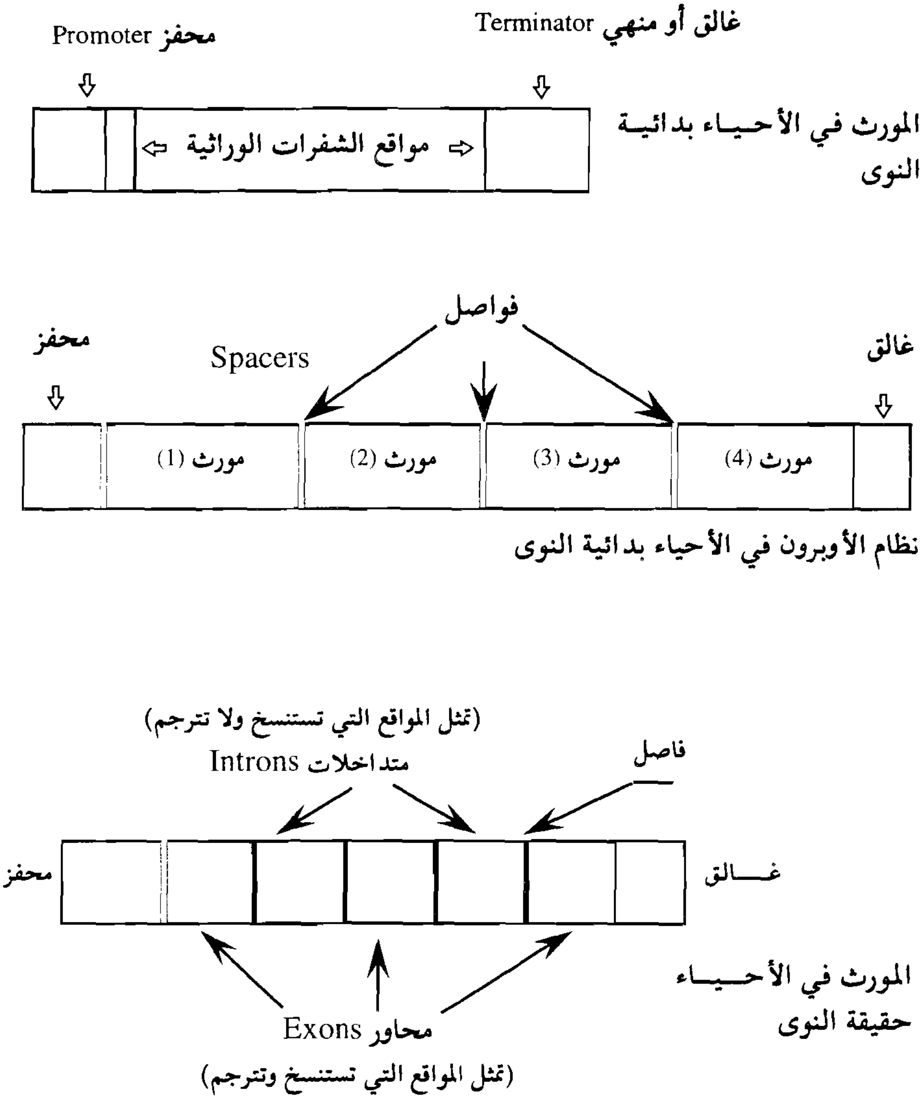
على المحفز . أما في النهاية الثالثة للمورث فتقع منطقة المنهي أو الغالق Terminator التي لها دور في إيقاف عملية الاستنساخ . تحتوي ترددات الغالق على ترددات معينة تتعاكس مع الترددات التالية لها أو إنها مؤلفة من أوتار مؤلفة من الجوانين والسايتوسين متبوعة بثايمين وأدنين ثم جوانين وسايتوسين ثم ثايمين وأدنين . تمثل هذه الترددات شفرات وراثية خاصة تعمل على ايقاف عمل أنزيم الاستنساخ عند هذه الشفرات . وقد تساهم في بعض الأحياء شفرات إضافية متناثرة في منطقة المحفز على الايقاف أيضاً .

في الأحياء بدائية النوى فإن هذه الشفرات تمثل مواقع لارتباط بروتينات معينة تعمل على ايقاف عملية الاستنساخ تدعى هذه ببروتينات الغلق كما أنها تساعد على فصل شريط الحامض النووي RNA من المورث(الشكل 2-15) .

إن هناك عدداً من الاختلافات الجوهرية في تركيب المورثات في الاحياء اذ تمثل المنطقة المشفرة في مورثات الأحياء بدائية النوى منطقة واحدة مستمرة بينما يحتوي المورث في الأحياء حقيقية النوى على مناطق مشفرة تدعى بالمحاور Exons ومناطق غير مشفرة تدعى بالمتداخلات Introns . تترتب هذه بطريقة متوالية اذ يتبع كل محور متداخل وكل متداخل يتبع بمحور . كما يختلف عدد المحاور والمتداخلات لكل مورث . واستناداً إلى ذلك فأن المنطقة الوسطية المشفرة لمورثات الأحياء بدائية النوى هي في الحقيقة محور مفرد فقط (الشكل 2-15) .

أما الاختلاف الآخر فهو أن العديد من مورثات الأحياء بدائية النوى تشترك في محفز واحد وغالق واحد وهو ما يدعى بنظام الاوبرون . حيث يتم استنساخ هذه المورثات مرة واحدة لإنتاج جزئية حامض نووي RNA طويلة جداً في حين أن لكل مورث في الأحياء حقيقية النوى محفزاً وغالقاً خاصاً به (الشكل 2-15) .

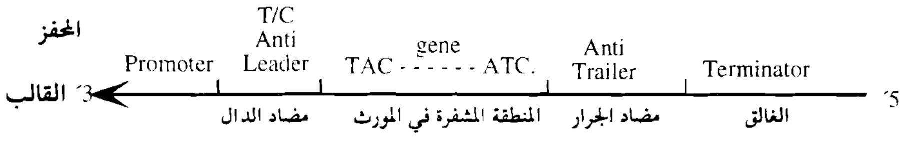
ويذكر أن جميع مورثات البكتيريا ومعظم الأحياء بدائية النوى تكون أحادية النسخةSingle copy gene بينما يمكن إيجاد مورثات أحادية وثنائية ومتعددة النسخ في الأحياء حقيقية النوى .

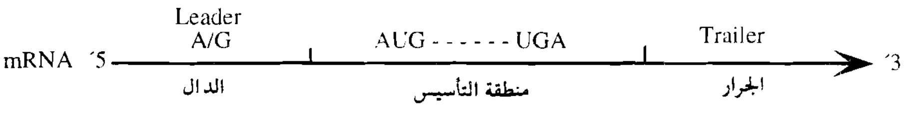



(الشكل 2-15): تركيب المورثات في الأحياء حقيقية وبدائية النوى. ويلاحظ بأن هناك اختلافاً واضحاً في تركيب المورثات للمجموعتين

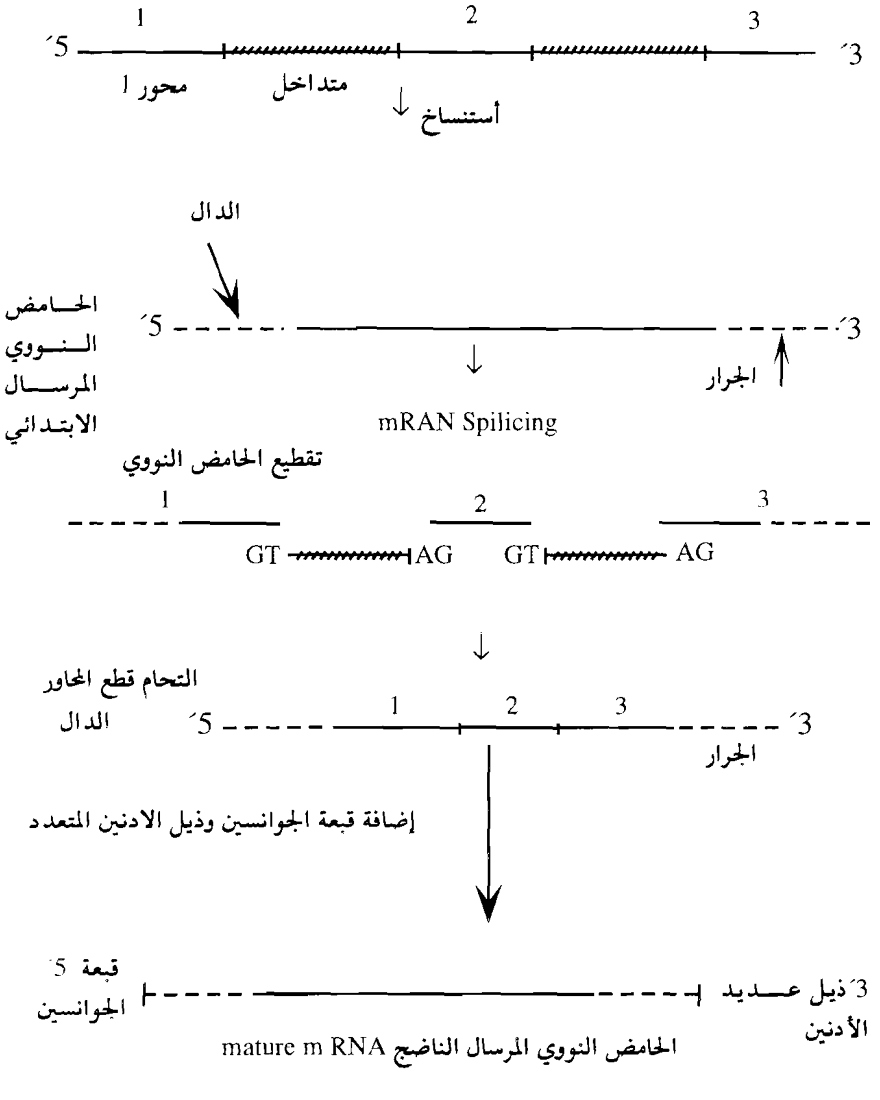
وبالإضافة إلى منطقتي المحفز والغالق التي تم الحديث عنهما فأن المورثات تحتوي أيضاً على مناطق أخرى تدعى بمضاد القائد أو الدال Antileader يقع بعد منطقة المحفز وفي بداية المنطقة المشفرة وله أهمية كبيرة في توجيه الحامض النووي mRNA بالاتجاه الصحيح عن التحامه مع الريبوسوم لوجود مناطق مكملة (راجع الاستنساخ والترجمة) .

كما تحتوي المورثات على مناطق أخرى تقع في نهاية المنطقة المشفرة قبل منطقة الغالق تدعى بمضاد الجرار Antitrailar وله أهمية في أداء وظيفة الحامض النووي RNA والحفاظ عليه من التحطم ووظائف أخرى . ويذكر بأنه في عملية الاستنساخ فأنه يتم نسخ مناطق مضاد القائد ومضاد الجرار لتكوين منطقة القائد والجرار في الحامض النووي mRNA كما أن هذه المناطق ليست قابلة للترجمة (الشكل 2-16) و (الشكل2-17) .




**(الشكل 2-16): قالب الحامض النووي منقوص الاوكسجين والحامض النووي المرسال.**




**(الشكل2-17): عمليات القطع والتحوير في الحامض النووي المرسال الابتدائي في الخلايا حقيقية النوى**

## الشفرة الوراثية *Genetic code*

كما ذكرنا في تركيب المورثات فأن هناك مناطق مشفرة في المورث وهذه المناطق التي يتم نسخها وترجمتها فيما بعد . تقرأ نيوكليوتيدات المورثات بشكل ثلاثي وتقرأ عادة كقواعد ثلاثية وتمثل كل ثلاث قواعد نايتروجينية شفرة وراثية مفردة او ما يدعى بالكودون Codon وتمثل كل شفرة وراثية بعد استنساخها وترجمتها حامضاً أمينياً . وحيث إن هناك أربعة أنواع من القواعد النايتروجينية فأن هناك 64 شفرة وراثية ($4^4$) تمثل عشرين حامضاً أمينياً . ونظراً لقلة عدد الأحماض الأمينية مقارنة بعدد الشفرات الوراثية فقد وجد أن هناك بعض الأحماض الأمينية تكون ممثلة بأكثر من شفرة وراثية واحدة (جدول 1-2) .

## تعبير المورثات *Genes expression*

يقصد بتعبير المورثات هو قدرتها على التعبير عن نفسها حيث أن هناك مورثات مكبوتة ليست لها هذه القدرة ، ويتم التعبير بخطوتين : الأولى وهي استنساخ المورثات وبناء نسخة حامض نووي mRNA نظيرة منه ، والثانية ، هي ترجمة الشفرات الوراثية التي حملها الحامض النووي mRNA .

## استنساخ المورثات *Gene Transcription*

استناداً إلى نظرية «مورث لكل سلسلة عديد ببتيد مفردة» ، فأن كل مورث يحمل تتابعات معينة خاصة من الشفرات الوراثية يمكن ترجمتها فيما بعد لإنتاج سلسلة عديد الببتيد . إلا أن هذه العملية لا تكون مباشرة مع المورث بل أن هناك وسيطاً في هذه العملية إلا وهو الحامض النووي المرسال (mRNA) .

يتم بناء جزيئة الحامض النووي المرسال بواسطة أنزيمات بلمرة خاصة بذلك تدعى بأنزيمات بلمرة الحامض النووي RNA Polymerse-RNA وتمتلك الأحياء بدائية النواة كالبكتيريا أنزيماً مفرداً لذلك هو أنزيم بلمرة الحامض النووي RNA العام حيث يتم بواسطة هذا الأنزيم استنساخ جميع أنواع الحامض النووي RNA .

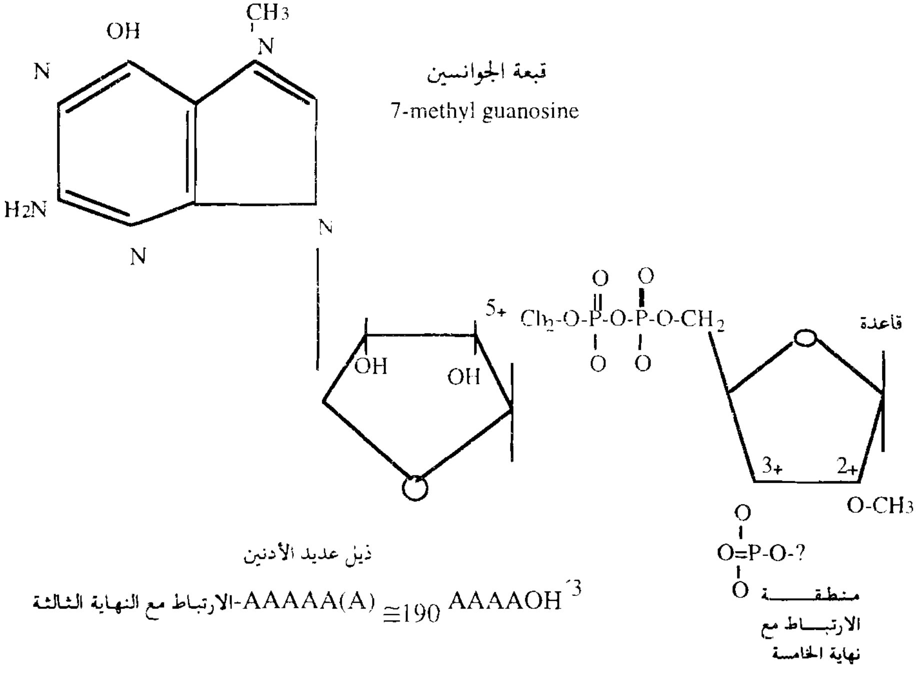
أما الأحياء حقيقية النوى فتمتلك ثلاثة أنواع من هذه الأنزيمات وهي أنزيم بلمرة الحامض النووي RNA الأول RNA PoL I المسؤول عن استنساخ الحامض النووي الريبوسومي rRNA (28 S,18S) وأنزيم بلمرة الحامض النووي RNA الثاني RNA POL II المسؤول عن استنساخ الحامض النووي RNA المرسال وأنزيم بلمرة الحامض النووي RNA الثالث RNA POL III المسؤول عن استنساخ الحامض النووي الناقل t RNA والحامض النووي الريبوسومي (rRNA 5S) .

| | U | C | A | G | |
|---|---|---|---|---|---|
| U | UUU } Phe<br>UUC<br>UUA } Leu<br>UUG | UCU<br>UCC } Ser<br>UCR<br>UCG | UAU } Tyr<br>UAC<br>UAA منهية Ochre<br>UAG منهية Ambar | UGU } Cys<br>UGC<br>UGA opal<br>UGG Tryp | U<br>C<br>A<br>G |
| C | CUU<br>CUC } Leu<br>CUA<br>CUG | CCU<br>CCC } Pro<br>CCA<br>CCG | CAU } His<br>CAC<br>CAA } GluN<br>CAG | CGU<br>CGC } Arg<br>CGA<br>CGG | U<br>C<br>A<br>G |
| A | AUU<br>AUC } ILeu<br>AUA<br>AUG بادئ met | ACU<br>ACC } Thr<br>ACA<br>ACG | AUU } AspN<br>AAC<br>AAA } Lys<br>AAG | AGU } Ser<br>AGC<br>AGA } Arg<br>AGG | U<br>C<br>A<br>G |
| G | GUU<br>GUC } Val<br>GUA<br>GUG بادئ | GCU<br>GCC } Ala<br>GCA<br>GCG | GAU } Asp<br>GAC<br>GAA } Glu<br>GAG | GGU<br>GGC } Gly<br>GGA<br>GGG | U<br>C<br>A<br>G |

**(جدول 2-1 ): الأحماض الأمينية الطبيعية وشفراتها الوراثية. كل شفرة مكونة من تتابع ثلاثي النيوكليوتيد ويلاحظ وجود أكثر من شفرة لبعض الأحماض وكذلك شفرات الابتداء والانتهاء.**

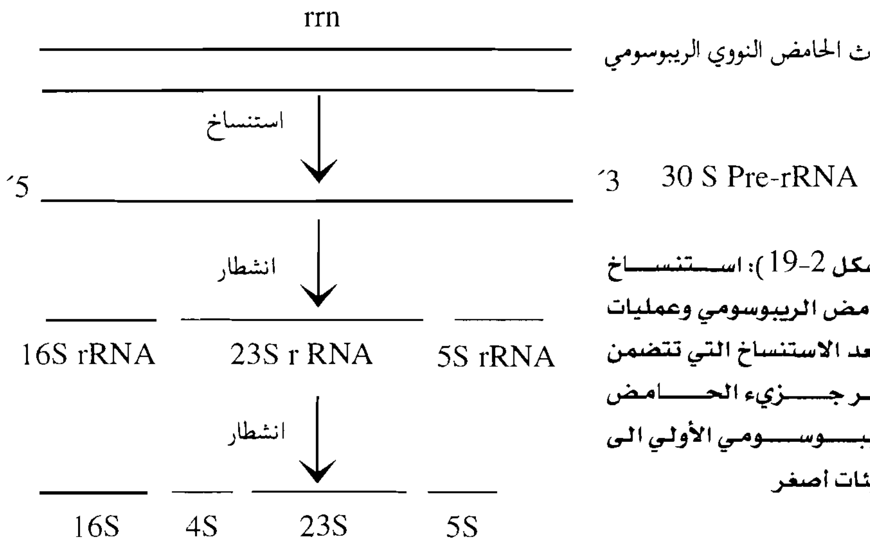
تبدأ عملية الاستنساخ باستقرار أنزيم بلمرة الحامض النووي RNA فوق منطقة المحفز الكائنة قبل المناطق التي تمثل الشفرات الوراثيةوعلى أحد أشرطة الحامض النووي DNA الذي يدعى بالشريط الحساس . يبدأ عندها بناء نسخة RNA بإضافة

النيوكليوتيدات اعتماداً على تردد القواعد النايتروجينية في المورث حتى الوصول الى منطقة الغالق حيث يتم إيقاف عملية الاستنساخ وانفصال شريط الحامض النووي RNA عن المورث . ويذكر أنه في الأحياء بدائية النوى يتم استنساخ عدة مورثات مرة واحدة لاشتراكها بمحفز واحد وغالق واحد . وبعد تحرر شريط الحامض النووي RNA من المورث ويدعى عندئذ بالشريط غير الناضج فأنه يجرى عليه العديد من التحويرات . فمثلاً يتم التخلص من المناطق التي تمثل المتداخلات حيث لا يمكن ترجمتها وثم ربط المحاور مع بعضها . كما تتم إضافة ذيل عديد الأدنينPoly A للنهاية الثالثة وقبعة الجوانسين للنهاية الخامسة . (شكل 2-18) . وبالإضافة إلى الحامض النووي RNA المرسال فأنه يتم استنساخ نوعين آخرين من الحامض النووي RNA وهما :




**(الشكل 2-18 ): التركيب الكيميائي لقبعة الجوانسين $5\text{-}mG^7$ في النهاية الخامسة لجزيئة الحامض النووي المرسال وذيل الأدنين في النهاية الثالثة**

الحـامض النووي RNA الريبـوسـومي(rRNA) والناقل(t RNA) . وتوجـد مورثات خاصة لإنتاج هذه الأنواع كما أن هناك بعض التحويرات الخاصة التي تحصل لهما بالإضافة إلى ما سبق (شكل 2-19) .



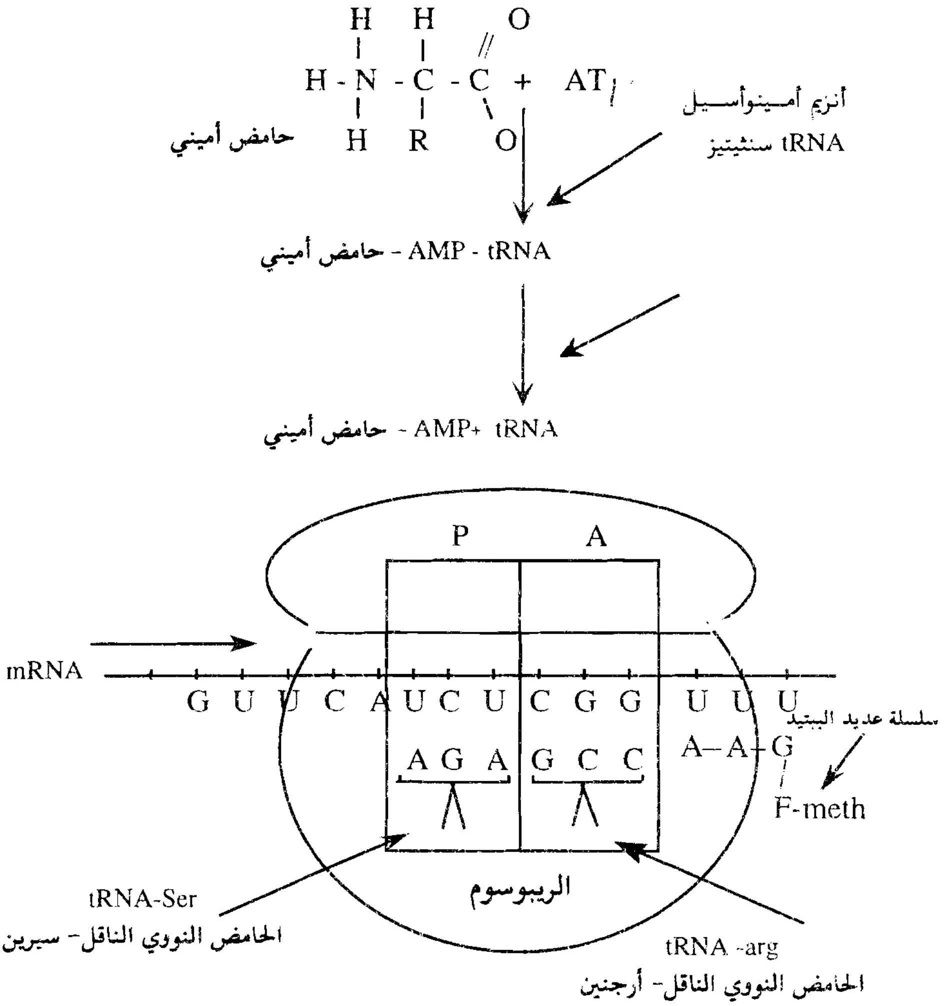

**(الشكل 2-19): استنساخ الحامض الريبوسومي وعمليات ما بعد الاستنساخ التي تتضمن شطر جزيء الحامض الريبوسومي الأولي الى جزيئات أصغر**

## الترجمة *Translation*

وهي عملية ترجمة الشفرات الوراثية المحمولة على الحامض النوويRNA المرسال في الريبوسومات لإنتاج سلاسل عديد الببتيدات . يرتبط الحامض النووي المرسال بواسطة منطقة الدال بموقع معين على الحامض النووي الريبوسومي لتكامل الترددات الموجودة في منطقة الدال مع تلك الموجودة في الحامض النووي الريبوسومي المؤلف للريبوسومات .

يتم بعدها تحرك الحامض النووي المرسال نحو الأمام للكشف عن شفراته الوراثية تباعاً و يتم بناء سلسلة عديد الببتيد اعتماداً على هذه الشفرات حيث تضاف الأحماض الأمينية واحداً تلو الاخر مستندة إلى ترتيب الشفرات الوراثية .

ويقوم الحامض النووي الناقلt RNA بدور مهم في ذلك حيث يحمل هذا الحامض شفرة مضادة Anticodon تمثل مفتاح لارتباط حامض أميني معين معه ويساعده في هذا الارتباط الأنزيمAminoacyl tRNA Synthetase الذي يعمل على ربط الأحماض الأمينية مع الشفرات المضادة للأحماض النووية الناقلة . ثم تقوم هذه الأحماض النووية الناقلة بنقل الأحماض الأمينية من السايتوبلازم إلى الريبوسومات حيث تضعها مقابل الشفرات الوراثية المناسبة لها . وتشترك في هذه العملية العديد من البروتينات الاخرى التي تساهم في اطالة سلسلة عديد الببتيد وربط الأحماض الأمينية مع بعضها وكذلك في إطلاق وتحرير هذه السلاسل (الشكل 2-20) .

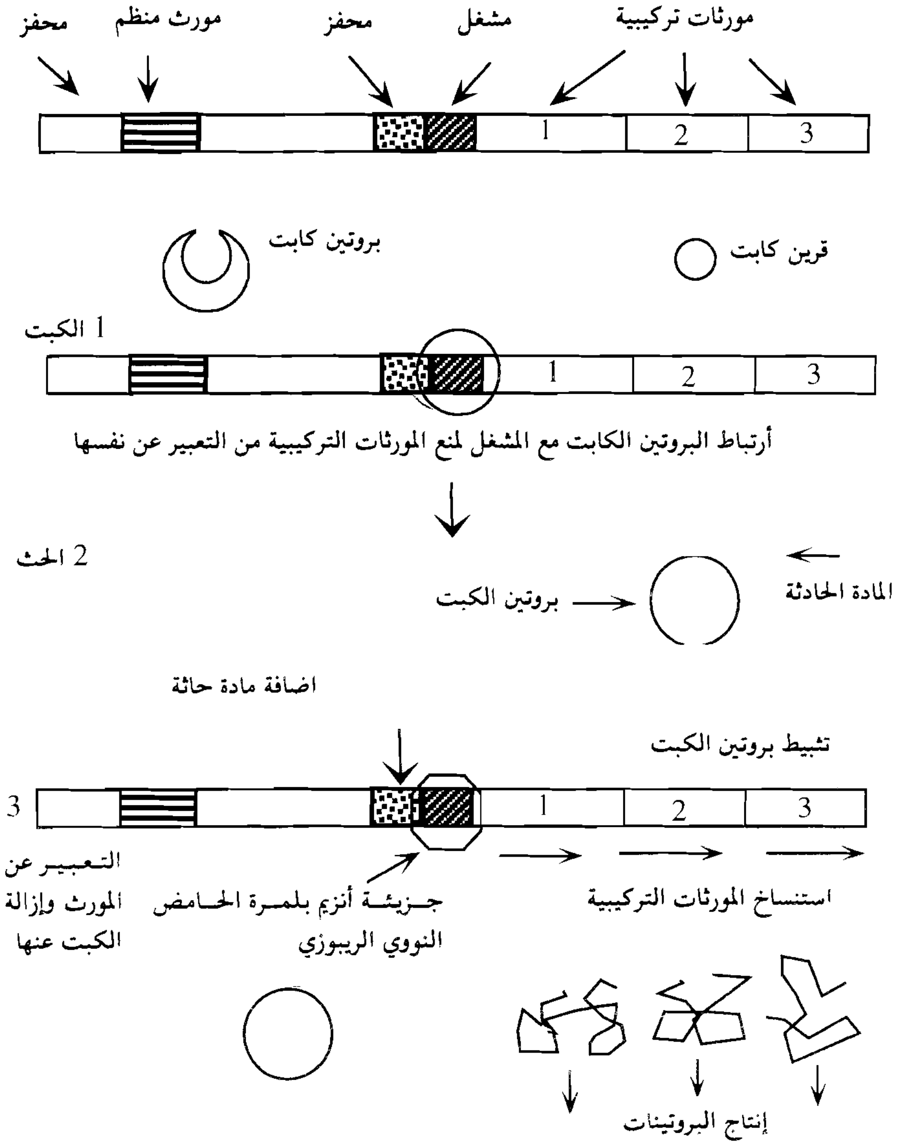



(الشكل 2-20): آلية الترجمة في الريبوسوم. يرتبط الحامض النووي المرسال بالريبوسوم عن طريق الترددات المكملة لترددات الحامض النووي الريبوسومي وتبدأ الترجمة عادة بربط حامضي الميثونين والفورميل ثم تتوالى ترجمة بقية الشفرات الوراثية. كما يلاحظ أهمية المركب الحلقي AMP و انزيم الاامينواسيل tRNA سنثيتيز في ربط الأحماض الأمينية مع جزيئة الحامض النووي الناقل اعتماداً على الشفرة المضادة المحمولة عليه.

## تنظيم تعبير المورثات

تختلف أشكال الخلايا في الكائن الحي اختلافاً كبيراً وخصوصاً في الأحياء متعددة الخلايا . فعلى الرغم من امتلاك خلايا كائن حي معين مجين واحد إلا أنها تختلف مظهرياً عن بعضها . فالخلايا العصبية في الإنسان لا تشابه خلاياه الدموية أو العضلية . لقد وجد أن هذا الاختلاف المظهري يعود إلى الاختلاف في تشغيل مجاميع المورثات . فبعض الخلايا تشغل مجموعة مورثات معينة وتكبت أخرى وخلايا أخرى تشغل مجموعة أخرى وتكبت ثانية وهكذا . إن الاختلاف في الشكل المظهري لخلايا النوع الواحد وكذلك الاختلاف في وظيفتها يؤكد وجود آليات عديدة تتضمن السيطرة على عمل المورثات .

يمكن تمييز نوعين من المورثات من حيث العمل في الخلايا . الأولى تعرف بأنها دائمة التعبير وهي التي تقوم برفد الخلية بمنتجاتها باستمرار . أما الثانية فهي المورثات المؤقتة التعبير ويتم التعبير عنها تحت ظروف حياتية خاصة . يختلف تنظيم تعبير المورثات في الأحياء بدائية النوى عن ماهو موجود في الأحياء حقيقية النوى . إذ يتم التنظيم في الأولى عن طريق نظام الاوبرونات والمنع الامدادي الرجعي بينما لا تمتلك الأحياء حقيقية النوى نظام الاوبرونات أنما توجد انظمة أخرى للتحكم . يتألف نظام الاوبرون من مجموعة من المورثات التركيبية زائد مورث كابت . وهناك نوعان من الاوبرونات هما : الاوبرونات القابلة للحث واوبرونات الكبت . تعمل الاوبرونات القابلة للحث بطريقة التحكم السالب والموجب . ويتم التحكم السالب عن طريق وجود المادة الحاثة أو غيابها حيث إن وجود المادة الحاثة يؤدي الى تثبيط عمل بروتين الكبت ويطلق عمل الاوبرون بينما يؤدي غيابها إلى إطلاق عمل بروتين الكبت الذي يرتبط مع مشغل المورثات التركيبية ويوقف عملية استنساخها (الشكل 2-21) .



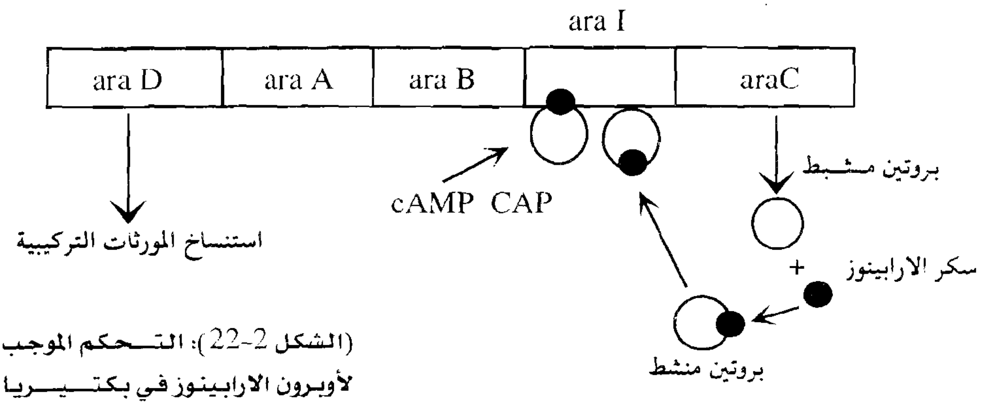

**(الشكل 2-21)**: الاويرون القابل للحث ويلاحظ بأن بروتين الكبت قادر على منح المورثات التركيبية من التعبير عن نفسها حيث يرتبط مع المشغل عند عدم وجود مادة حاثة ولكن اضافة مادة حاثة تؤدي الى فك ارتباطه بالمشغل لتحريره وبالتالي تمكين المورثات التركيبية من التعبير عن نفسها.

أما التحكم الموجب فيتم من خلاله حث الاوبرون على العمل في حالة وجود المادة الحاثة ويتم الحث عن طريق تكوين معقد بروتين الهدم CAP-أحادي فوسفات الادنين الحلقي cAMP الذي يرتبط مع محفز المورثات التركيبية للاوبرون . ويحثها على العمل أما غياب المادة الحاثة فيؤدي إلى توقف تكوين معقدات مما يسمح لبروتين الكبت بالارتباط مع مشغل المورثات التركيبية ومن ثم ايقاف الاوبرون عن العمل (الشكل 2-22) .

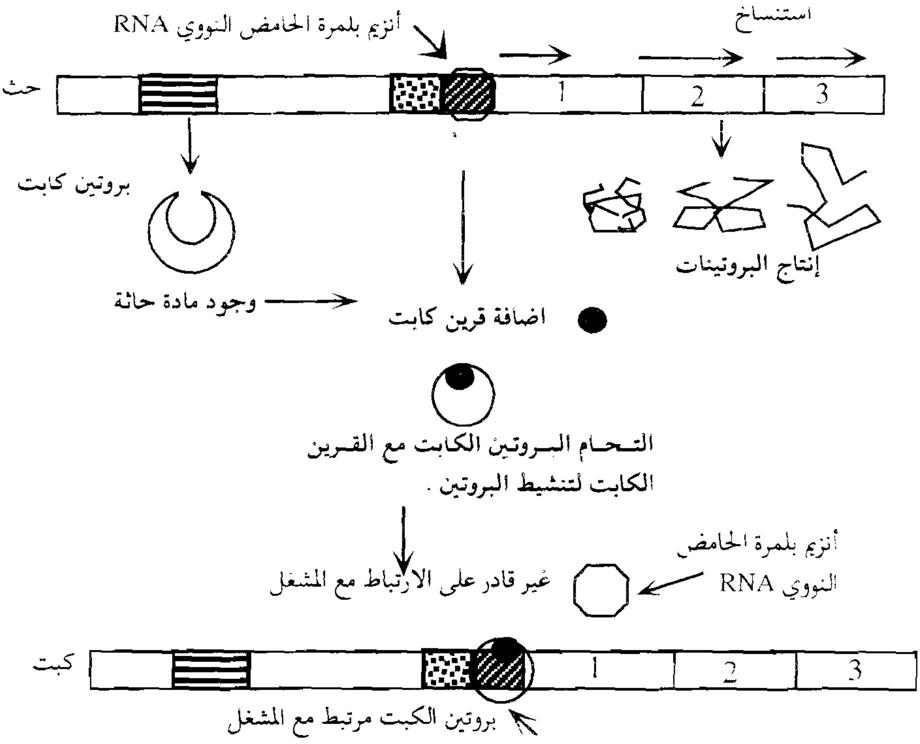
ويذكر بأن غياب المادة الحاثة في التحكم الموجب ليس كافياً لوحده لكبت الاوبرون بل لابد من وجود مادة اخرى . ويعتبر أوبرون اللاكتوز من أفضل الأمثلة على التحكم السالب والموجب في الاوبرونات القابلة للحث . كما يعتمد اوبرون الارابينوز على التحكم الموجب . أما الاوبرونات القابلة للكبت فتعمل بطريقة مختلفة إذ يتمكن البروتين الكابت من ايقاف عمل الاوبرون بعد ارتباطه مع جزيئة ثانية تدعى القرين وتتكون جزيئات القرين عند وجود المادة الحاثة . بينما يتم تحفيز الاوبرون على العمل عند غياب المادة الحاثة لعدم تكوين جزيئات القرين . ويعتبر اوبرون التربتوفان أفضل الأمثلة على هذا النوع من الاوبرونات (الاشكال 23 و24 و25 و2-26) .

أما النظام الثاني المعتمد في تنظيم تعبير مورثات الأحياء بدائية النوى فهو نظام المنع الامدادي الرجعي . يعتمد هذا النظام على ايقاف عمل المورثات عندما تتكون نواتج ثانوية ايضية بمستوى عالٍ . أما في الأحياء حقيقية النوى فلا وجود لنظام الاوبرونات فيها ويعتمد نظام التحكم فيها على برامج أخرى أكثر تعقيداً ولا يزال الغموض يحيط بهذا النظام على الرغم من معرفة بعض جوانبه .

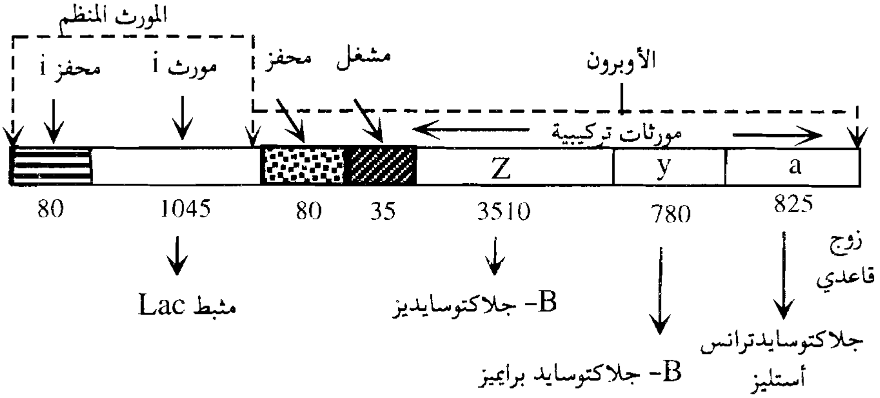
أثبتت تجارب تهجين الحامض النووي بأن خلايا النوع الواحد لا تختلف في مجينها . ولكن الاختلاف فيها يعود إلى نظام تشغيل المورثات .



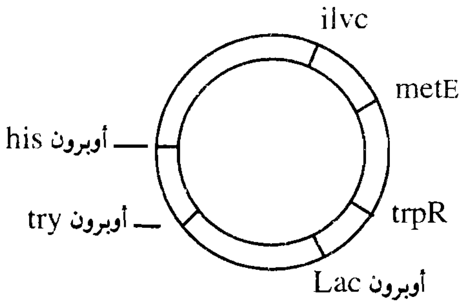

**(الشكل 2-22): الـتـحـكم الموجب لأوبرون الارابينوز في بكتـيـريا القولون بوجود سكر الارابينوز**



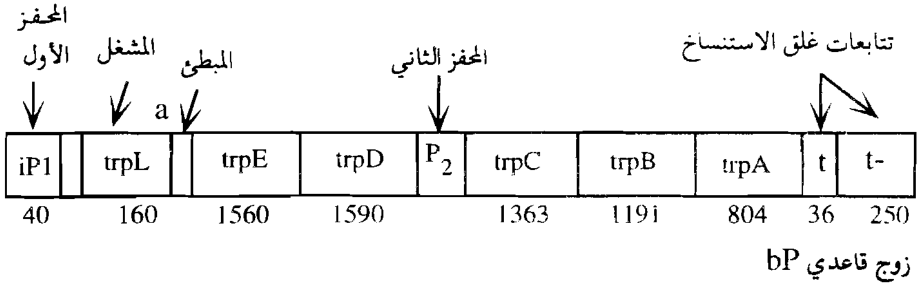

**(الشكل 2-23): نموذج لأوبرون التـنـشـيط حـيث لا يتـمكن بروتين الكبت من منع المورثات التركيبية عندما يكون لوحده ولكن بالأرتباط مع قرين الكبت يتمكن من تنظيم عمل المورثات التركيبية.**




(الشكل 2-24): نموذج أوبرون اللاكتوز في بكتيريا القولون.




(الشكل 2-25): موقع الأوبرونات في بكتيريا القولون




(الشكل2-26): تركيب أوبرون التريتوفان في بكتيريا القولون حيث يظهر أن هناك المحفز الرئيس iP1 والمحفز الثاني P2 لزيادة استنساخ مورثات التريتوفان trpC,B,A والمبطئ a الواقع بعد مورث المنظم trpL ولا يظهر مورث المنظم trpR لأنه يقع بعيداً عن الأوبرون.

لقد وجد أن نظام تشغيل المورثات أو السيطرة على تعبيرها يختلف تبعاً لمجموعة المورثات المطلوب التعبير عنها ولا توجد تفصيلات كثيرة حول أنظمة التحكم هذه نظراً للتشابه الكبير في البروتينات غير الهستونية في الأحياء حقيقية النوى لذلك فانه يعتقد أن لها دوراً في هذه العملية .

يعتبر نظام السيطرة الهرمونية أفضل الأنظمة المعروفة الآن في الأحياء حقيقية النوى المتطورة حيث تعمل الهرمونات كإشارات لحث المورثات على التعبير أو ايقافه .

يعتبر هرمون الاكديسونEcdysone من الأمثلة المعروفة في نظام السيطرة الهرموني حيث وجد أن معاملة يرقات ذبابة الفاكهة أدت إلى ظهور انتفاخات تشبه الفرشاة على صبغيات الغدة اللعابية وهو ما يؤكد على أن لهذا الهرمون دوراً في حث المورثات ويمكن أن يمثل الهرمون في هذه الحالة إشارة معينة لإطلاق برامج وراثية جاهزة وكامنة .

وعلى الرغم من ورود العديد من الأدلة حول دور الهرمونات في تنظيم تعبير المورثات إلا أن الموضوع أعقد بكثير من ذلك . إن أفضل الأمثلة التي يمكن سوقها في هذا المجال هي المورثات السرطانية الابتدائية . تمثل هذه المورثات المورثات الطبيعية النظيرة للمورثات السرطانية الراشحية الموجودة في الرواشح المرتدة . لقد وجد أن نسبة كبيرة من السرطانات يعود سببها الى تنشيط المورثات الابتدائية إذ تتحول هذه المورثات الكامنة إلى مورثات نشطة جداً حيث تبدأ بالتعبير عن نفسها بقوة . لقد وجد أن آلية تنشيط مثل هذه المورثات مختلفة حتى في المورث الواحد . إذ يتمكن مورث معين مكبوت من التحول إلى الصورة النشطة عبر طفره وراثية لزوج واحد من القواعد النيتروجينية أو عبر انتقال المورث جنب محفز قوي لمورث آخر من خلال الانكسار الصبغي وحصول الانتقال الصبغي .

كما أن هناك طرقاً أخرى لحدوث التنشيط . إن اختلاف هذه الآليات يؤكد تعقيد نظام السيطره على تعبير المورثات . إن أحدث ما يبحث في هذا المجال هو المورثات الكابتة والتي يعتقد أنها تمثل أحد أنظمة السيطرة على التعبير . ولا يزال يتسابق العلماء في ابراز دور هذه المورثات للأهمية الكبيرة لها والتي تعلق عليها الآمال للسيطرة على السرطان .

# 3

# الأنزيمات اللازمة في الهندسة الوراثية

**مقدمة**

**أنزيمات هدم الأحماض النووية**

1. أنزيمات الهدم الداخلي

2 . أنزيمات الهدم الخارجي

**أنزيمات هدم الحامض النووي RNA**

**أنزيمات هدم الحامض النووي DNA**

**الأنزيمات المقيدة أو القاطعة وأنواعها**

**مواقع عمل أنزيمات التقييد**

**فصل قطع الحامض النووي DNA المعاملة بالأنزيمات القاطعة**

**الطرد المركزي الفائق**

**الهجرة الكهربائية عبر الهلام**

**التركيز بالتماثل الكهربائي**

**بناء خرائط مواقع أنزيمات التقييد لجزئية حامض نوويDNA**

**أنزيمات اللحام**

**تحوير النهايات العمياء في قطع الحامض النووي DNA**

أولا : الروابط

ثانياً: التوصيلات

ثالثاً: التذييل بالبوليمر المتجانس

**أنزيمات بلمرة الأحماض النووية**

**أنزيمات تحوير الحامض النووي DNA**

**أنزيمات أزالة الأنطباق والبرم**

## مقدمة

تتطلب الهندسة الوراثية تقطيع الحامض النووي DNA وعزل القطع الناتجة لاختيار المناسب منها . كما قد تتطلب هذه العمليات تحوير هذه القطع لجعلها مناسبة أو معاملة هذه القطع لإضافة أو إزالة مجاميع كيميائية معينة أو لحامها مع ناقل مناسب أو قطع إضافية لزيادة كفاءة الهندسة . تتم جميع هذه العمليات عن طريق عمل مجموعة كبيرة من الأنزيمات التي يطلق عليها أنزيمات الهندسة الوراثية . وتعتبر هذه الأنزيمات من أكثر ركائز الهندسة الوراثية أهمية لما لها من دور كبير في عزل المورثات والتعرف على تركيبها . فمثلاً الخرائط الأنزيمية للمورثات تساعدنا في تمييز مواقع المورثات ومواقع الأنزيمات فيها . ويمكن من خلالها أيضاً اختيار الأنزيمات المناسبة لعزل مورثات معينة . وهكذا نجد أن الهندسة الوراثية في حقيقة الأمر بدأت مع بزوغ معرفة واكتشاف هذه الأنزيمات ونظراً لاختلاف وظائف هذه الأنزيمات فقد قسمت تبعاً لذلك إلى خمس مجاميع رئيسة هي :

1 . أنزيمات هدم الأحماض النووية

Nucleic acids hydrolysis enzymes or Nucleases

2 . أنزيمات اللحام Ligases

3 . أنزيمات البلمرة Polymerases

4 . أنزيمات التحوير Modifying enzymes

5 . أنزيمات إزالة الانطباق Topoisomerases

## انزيمات هدم الأحماض النووية *Nucleases*

تعمل هذه الأنزيمات على استهداف رابطة الفسفور ثنائي الأستر Phospho-diester bonds التي تربط النيوكليوتيدات بعضها ببعض طولياً والتي تمثل العمود الفقري لسلاسل الأحماض النووية ، قسمت هذه الأنزيمات على مجموعتين هما :

أ . **أنزيمات الهدم الداخلي** Endonucleases : وهي أنزيمات الهدم التي تهاجم روابط الفوسفور ثنائي الأستر من داخل سلاسل الحامض النووي وتؤدي إلى إنتاج قطع مختلفة الحجم من الحامض النووي (الشكل 3-1) .

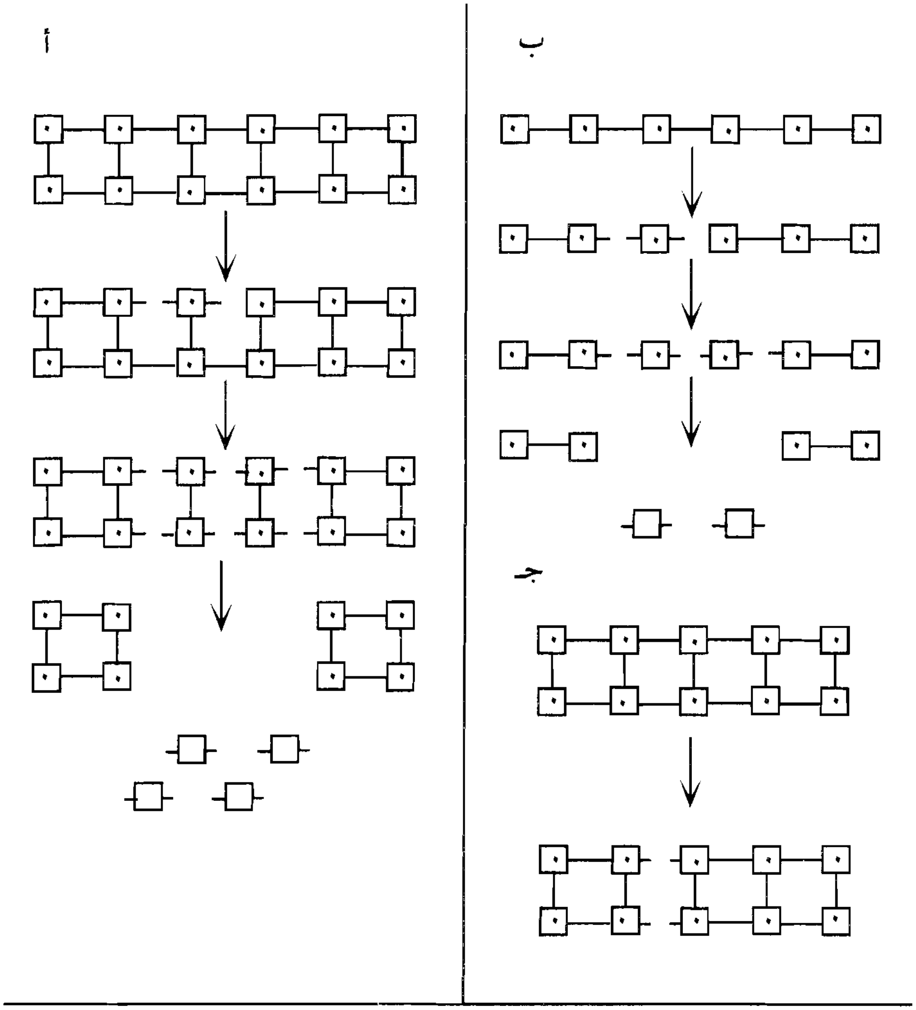
ب . **أنزيمات الهدم الخارجي** Eonucleases : وهي أنزيمات الهدم التي تهاجم روابط الفوسفور ثنائي الأستر في نهايات سلاسل الحامض النووي مؤدية إلى إنتاج وحدات مفردة على الأغلب من النيوكليوتيدات (الشكل 3-2 ) .

وفي كلتا المجموعتين فأنه يمكن وجود أنزيمات هدم خاصة بالحامض النووي DNA تدعى Deoxyribonucleases - DNases وأخرى خاصة بالحامض النووي RNA تدعى Ribonucleases- RNases .

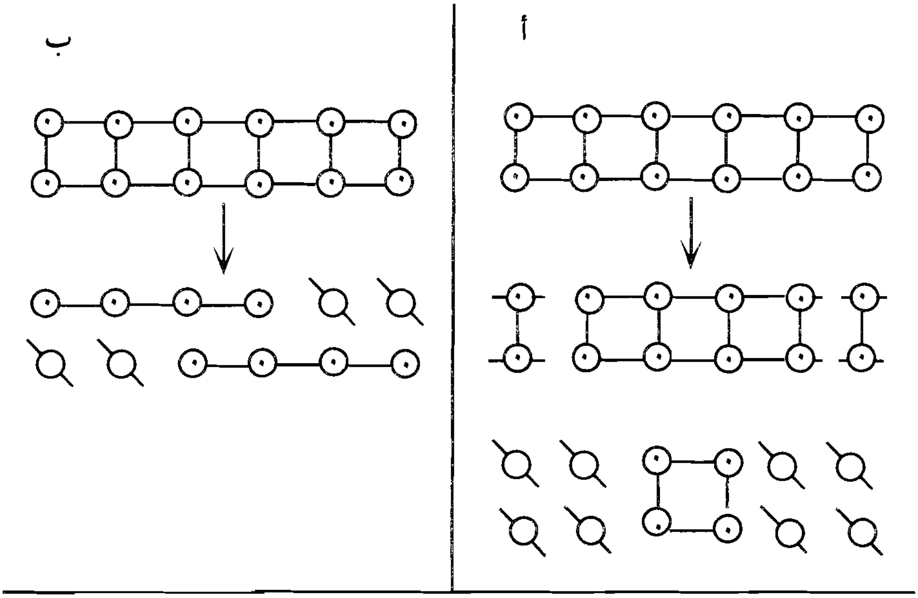
## أنزيمات هدم الحامض النووي *RNases ( RNA)*

استخلصت هذه الأنزيمات من مصادر مختلفة . فقد استخلصت ثلاثة أنواع من هذه الأنزيمات من بكتيريا القولون E.coli وهي RNase I الذي يعمل على هدم سلسلة الحامض النووي داخلياً أعتباراً من النهاية الثالثة لإنتاج قطع مؤلفة من نيوكليوتيده واحدة وأنزيم RNase II الذي يعمل على هدم سلسلة الحامض النووي داخلياً وخارجياً اعتباراً من النهاية الخامسة لإنتاج قطع مؤلفة من نيوكليوتيده مفردة وأنزيم RNase III الذي يعمل على الهدم الداخلي للمناطق المزدوجة من الحامض النووي .

كما تم استخلاص أنزيم هدم داخلي من بنكرياس الحيوانات سمي (RNase A) يهاجم داخلياً مواقع ارتباط البيرميدينات مع ذرة الكاربون الثالثة في السكر الخماسي ، حصراً لإنتاج قطع حامض نووي مؤلفا من نيوكليوتيدات بيرميدينية مفردة إضافة إلى قطع حامض نووي مختلفة الطول . كما تم عزل أنزيم هدم داخلي آخر من قطر الاسبرجلس Aspergillus oryzae سمي (RNase T1) يعمل على مهاجمة روابط الأستر الموجودة في مواقع نيوكليوتيدات تحتوي على الجوانين فقط ومن النهاية الخامسة .




(الشكل3-1): عمل أنزيمات الهدم الداخلي. تستهدف هذه الأنزيمات أواصر السكر - فوسفات الداخلية لأشرطة الحامض النووي DNA المفردة أو المزدوجة لإنتاج نيوكليوتيدات مفردة أو مزدوجة عن طريق تحطيم هذه الاشرطة (أ و ب) فيما تقوم أنزيمات أخرى بفك آصرة السكر - فوسفات بين زوج واحد من نيوكليوتيدات شريط مزدوج من الحامض النووي DNA (جـ) دون فصل النيوكليوتيدات عن الشريط.




(الشكل3-2) : عمل انزيمات الهدم الخارجي. تستهدف هذه الأنزيمات نفس الأواصر التي تستهدفها أنزيمات الهدم الداخلي الا أنها تختلف عنها في الموقع الخارجي أو الطرفي لعملها

## أنزيمات هدم الحامض النووي *DNases -(DNA)*

تعمل هذه الأنزيمات على مهاجمة روابط الفوسفور ثنائي الأستر في سلاسل الحامض النووي DNA . وقد تم عزلها من أنواع مختلفة من الأحياء .

فقد وجد أن لبكتيريا القولون E.coli ثلاثة أنزيمات DNases خارجية الهدم أطلق عليها (Exonuclease I,II,III) . حيث يعمل الأنزيم الأول على مهاجمة روابط الأستر في السلاسل المفردة للحامض النووي DNA أو RNA مؤدياً الى تقطيعها الى وحدات ثلاثية النيوكليوتيدات ومن النهاية التي ترتبط فيها مجاميع الهيدروكسيل مع ذرة الكاربون الثالثة للسكر . بينما يهاجم الأنزيم الثاني السلاسل المزدوجة للحامض النوويDNA عند نفس مواقع عمل الأنزيم الأول . ويختص

الأنزيم الثالث في مهاجمة روابط الأستر في السلاسل الحلزونية المزدوجة من الحامض النوويDNA .

كما تم استخلاص نوعين من أنزيمات الهدم الداخلي وذلك من طحال وبعض غدد الحيوانات سميت بـ II و DNaseI . حذف يعمل الانزيم الأول DNase I على مهاجمة الروابط الداخلية للحامض النووي DNA مؤدياً إلى إنتاج وحدات لا يتجاوز طولها أربعة نيوكليوتيدات تحتوي كل وحدة منها على مجموعة فوسفات مرتبطة مع ذرة الكاربون الخامسة ومجموعة هيدروكسيل مرتبطة مع ذرة الكاربون الثالثة للسكر . بينما يعمل الأنزيم الثاني DNaseII المستخلص من الطحال والغدة الثيموسية لبعض الحيوانات على هدم الحامض النووي DNA داخلياً منتجاً وحدات لا يزيد طولها على ستة نيوكليوتيدات ترتبط مجاميع الهيدروكسيل فيها مع ذرة الكاربون الخامسة بينما ترتبط مجاميع الفوسفات مع ذرة الكاربون الثالثة .

وبالإضافة إلى هذه الأنزيمات فقد تم عزل مجموعة أخرى من أنزيمات الهدم الداخلي للحامض النووي DNA سميت بالأنزيمات المقيدة أو المحددة أو القاطعة Restriction enzymes أكثر تخصصاً من سابقاتها وأكثر أهمية في الهندسة الوراثية .

## الأنزيمات المقيدة أو القاطعة

### *Restriction endonucleases or enzymes*

يرجع تأريخ اكتشاف هذه الأنزيمات إلى عام 1962 حيث تم تفسير ظاهرة المناعة Host-controlled restriction التي تبديها بكتيريا القولون E.coli من السلالات K و E عند إصابتها بالعايئات الى وجود أجهزة تقييد تعمل على منع أو عرقلة نمو وتكاثر العاثيات .

تتألف هذه الأجهزه من مجموعة أنزيمات تعمل بطريقة ما على إتلاف المادة الوراثية للعاثيات أو تقييد فعاليتها . لذلك أطلق على هذه الأنزيمات بالأنزيمات المقيدة أو المحددة .

لقد وجد دوسيوكس و آربر Dussiox &Arber في عام 1962 أثناء عملهم مع بكتيريا القولون والعاثي لامبدا بأنه يحدث انخفاض كبير في كفاءة إصابة العاثي عندما يراد إصابة بكتيريا القولون سلاله K بعاثيات معزولة من السلالة E أو العكس . وكذلك انخفاض في كفاءة الإصابة عند تربية عاثيات معزولة من السلالةK في السلاله E وإعادة الإصابة للسلالةK أو العكس .

وقد عزت هذه الظاهرة إلى الفعل المناعي للمضيف الأخير والمتمثل بتحديد فعالية العاثيات عن طريق الأنزيمات المقيدة أو المحددة . كما فسر عدم تأثير هذه الأنزيمات في المادة الوراثية للمضيف بحصول تحوير في مواقع معينة وعلى طول المادة الوراثية للمضيف بحيث لا تتمكن هذه الأنزيمات من التأثير في المضيف . وقد وجد لاحقاً أن هذا التحوير يتمثل في المثيلة Methylation التي تتضمن إضافة مجاميع المثيل $CH_3$- إلى مواقع عمل هذه الأنزيمات .

وعلى الرغم من معرفة آلية الفعل المناعي في البكتيريا اعتماداً على الأنزيمات المقيدة إلا أن فهم كيفية عمل هذه الآلية أستغرق سنوات طويلة بعد ذلك . وقد نال كل من آربر وسمث وناثان جائزة نوبل للعام 1978 كونهم اكتشفوا هذه الآلية التي تمثل أحد المفاتيح المهمة في الهندسة الوراثية . لقد تم عزل أنواع عديدة من الأنزيمات المقيده منذ العام1970 . ويصل عدد الأنزيمات المكتشفة لحد الأن أكثر من300 أنزيم قادرة على تمييز أكثر من 100 موقع تقييد أو قطع على المادة الوراثية .

## أنواع الأنزيمات المقيدة أو القاطعة

قسمت هذه الأنزيمات اعتماداً على قدرتها على القطع المتخصص واحتياجاتها الكيميائية للقيام بوظائفها الى ثلاثة أنواع هي :

**أولاً** : الأنزيمات المقـــيـــدة – الطراز الأول Type I Restriction enzymes :
وتشمل الأنزيمات الأولية المستخلصة من بكتيريا القولون السلالة K و E المصابة بالعاثي لامبدا وتعمل هذه الأنزيمات على القطع العشوائي للحامض النووي DNA . ولوحظ بأن هذه الأنزيمات ترتبط في مواقع القطع ثم تبدأ بهدم السلاسل المزدوجة في اتجاه واحد لمسافة تتراوح بين 1000-5000 نيوكليوتيد ثم تبدأ بعدها بهدم سلسلة

مفردة لمسافة أخرى وتتوقف بعدها عن العمل . تحتاج هذه الأنزيمات لعوامل مساعدة مثل أيونات المغنيسيوم $Mg^{+2}$ وجزيئة أدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP وأدينوسيل ميثونين S-adenosyl . Methionine .

**ثانياً** : الأنزيمات المقيدة- الطراز الثاني Type II Restriction enzymes : تعتبر هذه المجموعة من الأنزيمات من أهم مجاميع أنزيمات التقييد لاستخدامها واسع النطاق في الهندسة الوراثية . تمتاز هذه الانزيمات بقدرتها على قطع الحامض النوويDNA عند مواقع معينة Restriction sites فقط بحيث تعطي عدداً ثابتاً من القطع لكل نوع من الأحياء . تستهدف هذه الأنزيمات ترددات معينة بحيث إنها تقوم بالقطع قبل أو بعد هذه الترددات مباشرة .

فمثلاً يمكن للأنزيم القاطع Eco R1 أن يتعرف على التردد ´5 G*AATTC´3 ويقوم بالقطع بين الجوانين والادنين من النهاية الخامسة . وهكذا فأن الأنزيم يقوم بقطع سلاسل الحامض النووي DNA في جميع المواقع التي تحتوي على هذا التردد . ويختلف عدد ترددات مواقع القطع التي تتعرف عليه الأنزيمات من أنزيم الى آخر ولكنها في الغالب تتراوح بين أربعة الى ستة ترددات (جدول 3-1 ) . ونظراً للأعداد الكبيرة التي أكتشفت من هذه الأنزيمات فأنه تم اقتراح نظام تسمية وضعه كل من سميث وناثان Smith & Nathan عام 1973 وعلى النحو التالي :

أ) يرمز لجنس الكائن الذي اكتشف فيه الأنزيم بالحرف الأول من اسم الأنزيم ويرمز لنوع الكائن بالحرفين الثاني والثالث من اسم النوع . فمثلاً الأنزيم المسمى Eco مأخوذ من البكتيريا E.coli فالحرف الأول من اسم الأنزيم مأخوذ من اسم جنس البكتيريا Eschericia والحرفان الثاني والثالث مأخوذان من اسم نوع البكتيريا coli .

وكذلك الحال بالنسبة للأنزيم Hin المأخوذ من اسم البكتيريا **Haemophilus influenzae** والأنزيم Hpa مأخوذ من اسم البكتيريا **Haemophilus parai mfluenzae** وكذلك الحال بالنسبة لبقية الأنزيمات .

(جدول 3) : بعض الأنزيمات المقيدة ومواقع التقييد والقطع الخاصة بها.

| | |
|---|---|
| Aha III | TTT↓AAA |
| AsuI | G↓G (N) CC |
| Ava II | G↓G $\overset{A}{T}$CC |
| Alu I | AG↓CT |
| AvoI | C↓CCGGG. C↓TCGAG |
| AvrII | C↓CTAGG |
| Aluy II | GA↓CGTC. |
| Aha II | GG↓CGCC |
| AcyI | GG↓CGCC |
| | GA↓CGTC |
| Acc I | GT↓ATAC |
| | GT↓CGAC |
| Ata II | GACGT↓C |
| ApaI | GGGCC↓C |
| AsuII | TT↓CGAA |
| Bal I | TGG↓CCA |
| Bsr NI | CC↓$\overset{A}{T}$GG |
| Bst EII | G↓GT(N)ACC |
| Bbv I | GCAGC(N)8 |
| | CGTCG(N)12 |
| Bin I | GGATC(N)4 |
| | CCTAG(N)5 |
| Bgl II | A↓GATCT |
| Bsp PI | G↓CCGGC |
| Bam HI | G↓GATCC |
| Bde I | GGCGC↓C |
| BCII | T↓GATCC |
| Clo I | AT↓CGAT |
| ChI | T↓GGCCC |
| Dde I | C↓T(N)AG |
| DpnI | GA↓TC |
| EcoRII | ↓CC$\overset{A}{T}$GG |
| EcoRI | G↓AATTC |
| EcoRV | GAT↓ATC |
| Fnv 4HI | GC↓(N)GC |
| Fok I | GGATG(N)9 |
| | CCTAC(N)13 |
| Fnv DII | CG↓CG |
| Hae I | TGG↓CCA |
| Hinf I | G↓A(N)TC |
| Hpa II | C↓CGG |
| Hae III | GG↓CC |
| Hha I | GC↓GC |
| HindIII | A↓AGCTT |
| Hap I | AGG↓CCT |
| Hae II | AGCGC↓T.GG CGC↓C |
| Hgr CI | G↓GCGCC.G↓GTACC |
| Hind II | GTC↓GAC |
| Hpa I | GTT↓AAC |
| Hund II | GTT↓AAC |
| HgI JII | GGGCC↓C |
| Hgr AI | GTGCA↓C |
| KpnI | GGTAC↓C |

| | |
|---|---|
| Mba I | ⇩GATC |
| Mlu I | A⇩CGCGT |
| Mst I | TG⇩CGCA |
| Mst II | CC⇩T(N) AGG |
| Nru I | TC⇩GCGA |
| Nc II | CC⇩$^{G}_{C}$ GG |
| Nat I | GC⇩GGCCGC |
| Not I | GC⇩GGCCGC |
| Nsp CI | ACATG⇩T |
| Nsp BII | CAG⇩CTG, CCG⇩CGG |
| Nar I | GG⇩CGCC |
| Nae I | GCC⇩GGC |
| Pvu II | CAG⇩CTG |
| Pvv I | CGAT⇩CG |
| Pst I | CTGCA⇩G |
| Rso I | GT⇩AT |
| Sau I | CC⇩T (N) AGG |
| Sau 3A | ⇩GATC |
| So NI | G⇩CGC |
| Stv I | AGG⇩CCT |
| ScaI | AGT⇩ACT |
| SmaI | CCC⇩GGG |
| Sac II | CCGC⇩GG |
| Sa II | G⇩TCGAC |
| SphI | GCATG⇩C |
| TaqI | T⇩CGA |
| Xmn I | GAA(NN⇩NN)TTC |
| Xho II | A⇩GATCT, G⇩GATCC |
| Xma I | C⇩CCGGG |
| Xma III | C⇩GGCCG |
| Xho I | C⇩TCGAG |
| Xba I | T⇩CTAGA |

ب) في حالة إحتواء السلالة البكتيرية على بلازميد أو عاث فأنه يجب إضافة اسم البلازميد أو العاثي إلى اسم الأنزيم . فمثلاً في حالة الأنزيم Eco المشتق من أسم البكتيريا E.coli فأذا كانت البكتيريا تحتوي على البلازميدR1 فأن اسم الأنزيم يصبح EcoR1 وكذلك الحال بالنسبة للأنزيم Hind المستخرج من البكتيريا **H.influenzae** الحاوية على البلازميد Rd .

جـ) في حالة وجود أكثر من أنزيم لنفس النوع من البكتيريا فأنه تستخدم الأرقام الرومانية بعد نهاية الأسم كما هي الحال في الأنزيم EcoR1 و EcoRII و HindIو Hind IIو Hind III .

**ثالثاً** : الأنزيمات المقيدة - الطراز الثالث Type III Restriction enzymes :
وهي أنزيمات وسط في صفاتها بين الطراز الأول والطراز الثاني الذي يحتاج أيونات المغنسيوم وجزيئات ATP وأدنيلات الميثونين . تقوم أنزيمات الطراز الثالث بالقطع في مواقع محدده وتحتاج إلى أيونات المغنيسيوم وجزيئات ATP إلا أن حاجتها لادنيلات الميثونين تكون جزئية .

## مواقع عمل أنزيمات التقييد

كما ذكرنا سابقاً فأن أنزيمات التقييد- الطراز الثاني تمتلك مواقع معينة على الحامض النوويDNA تتخصص في قطعها . لكن تختلف هذه الأنزيمات في بعض الأمور فيما يخص طبيعية موقع التقييد أو القطع ومكان القطع ونواتجه . ومن أهم هذه الاختلافات ما يلي :

**أولاً** : من ملاحظة نواتج قطع بعض الأنزيمات فأنه يتبين بأن بعض هذه الأنزيمات يؤدي إلى إنتاج قطع ذات نهايات لزجة Cohesive or sticky ends بينما تنتج أنزيمات أخرى قطعاً ذات نهايات عمياء وغير لزجة Blunt ends . فمثلاً يقوم الأنزيم Bam H1 بتمييز موقع التردد 5GGATCC´3´ وقطعه بين الجوانين عند النهاية الخامسة منتجاً 5-G´ و 3´-GATCC .

´5GGATCC ´3 —Bam H1→ ´5-G + GATCC -´3

´3 CCTAGG´5 ´3-CCTAG + G-´5

كمـا أن الأنزيم Eco R1 يميـز موقع التـردد ´5G*AATTC-´3 ويقوم بالـقطع بين الجوانين والأدنين عند النهاية الخامسة منتجاً القطع التالية : ´5-G ,AATTC-3

´5G AATTC´3 —EcoR1→ ´5-G + AATTC-´3

´3 CTTAAG´5 ´3-CTTAA + G-´5

أمـا الأنزيم Pst1 فـأنه يميـز التـردد ´5-ATGCA* G-´3 ويقطع بين الجـوانين والأدنين عند النهاية الثالثة منتجاً القطع التالية :

´5-CTGCAG -´3 —Pst1→ ´5-CTGCA + G-´3

´3 GACGTC-´5 ´3-G + ACGTC-´5

ويلاحظ من القطع الناتجـة عن عـمل هذه الأنزيمات بأن نهـايات القطع النـاتجـة تكون مكملة أو متـممة Complementary مما يسمح لها بالالتصاق مرة أخرى لذلك تسمى هذه القطع بالقطع ذات النهايات اللزجة . ويعود إنتاج هذه النـهايات إلى موقع القطع على سلسلتي مـزودج الحـامض النووي حـيث يكون غـيـر مـتناظر . أمـا في الأنزيمات Hpa1 و Hae III وSma1 فـأن مواقع القطع هذه تكون مـتناظرة تماماً كـمـا يلاحظ مما يلي :

´5-GG↓CC´3 —Hae III→ ´5-GG + CC-´3

´3 -CC↑GG-´5 ´3-CC GG-´5

´5-GTT↓AAC´3 —Hap1→ ´5-GTT + AAC-´3

´3 -CAA↑TTG-´5 ´3-CAA TTG-´5

لذلك فأنه لا وجود للتكامل في نهايات القطع الناتجة وتدعى مثل هذه القطع بالقطع ذات النهايات العمياء لعدم قدرتها على الالتحام مره أخرى إلا بعد تحويرات معينة .

ثانياً : من ملاحظة القطع الناتجة من عمل الأنزيمات Bam H1 و Eco R1 والقطع الناتجة عن الأنزيم Pst1 فأنه يلاحظ بأن النتوءات الخاصة بالنهايات اللزجة مختلفة الاتجاه ، فمثلاً نتوءات القطع الناتجة عن الأنزيمات Bam H1 وEco R1 ممتدة من النهاية الثالثة بينما تكون ممتدة من النهاية الخامسة في القطع الناتجة من الأنزيم Pst1 .

ثالثاً : إن ترددات مواقع التقييد تختلف في عدد نيوكليوتيداتها . فبعض الأنزيمات يميز مواقع تقييد رباعية التردد وتقطع قبلها أو بعدها أو بينها كما هي الحال في الأنزيمات Mbo1 و HaeIII و Sau 3A .

Mbo1 ´5-↓GATC-´3 HaeIII ´5- GG↓CC-´3

Sau 3A ´5-↑GATC -´3

والبعض الآخر من الأنزيمات يميز مواقع تقييد خماسية التردد مثل الأنزيم

Avo II الذي يميـــز الموقع 5-G⇩GTCC´3´ والأنـــزيم EcoRII الذي يميـــز الموقع 3´-5⇩CCAGG-´3 وغيرها من الأنزيمات .

وتكون معظم الأنزيمات الأخرى ذات مواقع تقييد سداسية التردد وتشذ عن ذلك مجموعة من الأنزيمات مثل الأنزيم HgaI الذي يميز الموقع 3´-5⇩GACGA-´3 ويقوم بالقطع بعده بخمسة نيوكليوتيدات في السلسلة الاولى وعشرة نيوكليوتيدات في السلسلة الثانية .

´5-GACGC(N)5⇩

´3⇧(N)10 CAGCG´5

وكذلك الأنزيم BbvI الذي يقوم بالقطع بعد ثمانية نيوكليوتيدات من موقع التقييد 5-GCAGC(N)8⇩´ في السلسلة الأولى وبعد أثني عشر نيوكليوتيد في السلسلة الثانية 5´CGTCG $(N)_{12}$⇩3´ . هذا إضافة إلى أنزيمات أخرى (لاحظ جدول الأنزيمات المقيدة ومواقع عملها) .

رابعاً : أن معظم ترددات مواقع تقييد الأنزيمات هي ترددات بالندرومية Palindromes حيث يمكن قراءة تردد موقع التقييد بنفس الاتجاه في كلتا سلسلتي الحامض النووي . فمثلاً يمكن قراءة التردد 3´-5-GAATTC-´3 لموقع تقييد الأنزيم Eco R1 بنفس الاتجاه في سلسلتي الحامض النووي .

´5⇨GAATTC-´3

´3-CTTAAG-´5

إلا أن مواقع تقييد البعض الآخر منها غير بالندرومية مثل مواقع تقييد الأنزيمات BbVI وBin I وFok I حيث تختلف مواقع تقييد هذه الأنزيمات في سلسلتي الحامض النووي . فمثلاً يقطع الأنزيم BinI بعد أربعة نيوكليوتيدات من التردد 5-CGATC$(N)_4$´3´ في السلسلة الأولى وبعد خمسة نيوكليوتيدات من التردد في السلسلة الثانية 5´-3-5(N)CTAGC-´5 .

خامساً : الاختلاف في قطع الحامض النووي الناتجة عن القطع بالأنزيمات . إن معظم الأنزيمات المقيدة ذات مواقع تقييد ثابتة لذلك فإن قطع الحامض النووي الناتجة عن فعل هذه الأنزيمات تكون ذات نهايات معروفة وثابتة ، فمثلاً القطع الناتجة من عمل الأنزيم EcoR1 تنتهي دائماً بالترددات التالية ´5-G و´3-CTTAA وكذلك الحال في معظم الأنزيمات . إلا أنه في أنزيمات أخرى مثل الأنزيم DdeI و HinfI و AsuI فإن نهايات القطع الناتجة عن نشاطها تكون مختلفة ذلك لأن هذه الأنزيمات تستطيع تمييز أكثر من موقع تقييد مختلف . فمثلاً الأنزيم DdeI يميز الترددات التالية كمواقع قطع له وهي ´5-CTTAG-´3 و ´5-CTGAG-´3 و´5-CTCAG-´3 و ´5-CTAAG-´3 ومن ملاحظة مواقع قطع هذا الأنزيم المؤشرة بالأسهم فأنه القطع الناتجة عن نشاطه ستكون بأربع نهايات مختلفة وهي :

| | | | |
|---|---|---|---|
| ´5-C | ´5-C | ´5-C | ´5-C |
| 3-GAATC | 3-GACTC و | 3-GAGTCو | 3-GATTCو |

ويلاحظ أن الاختلاف هنا هو دائماً في النيوكليوتيد الوسطي من النهاية الثالثة الناتئة .

والحال نفسه مع الأنزيم HinfI الذي يميز موقع التقييد 5-GANTC-3 (حيث إن N يمكن أن تكون A أو T أو C أو G) والأنزيم AsuI الذي يميز موقع التقييد 5-GGNCC-3 . كما أنه يمكن الحصول على قطع حامض نووي DNA بنهايات مختلفة عديدة كما هي الحال مع القطع الناتجة عن الأنزيم BglI الذي يميز موقع التقييد 5-GCCNNNNNNHC-3 والأنزيم XmnI الذي يميز موقع التقييد5-GAANN NNTTC-3 وغيرها من الأنزيمات.

سادساً : بعض الأنزيمات له مواقع تقييد مشتركة وقد تقطع هذه المواقع بنفس المكان أو أماكن مختلفة بنفس الموقع . تدعى هذه الأنزيمات بالأنزيمات المتناظرة Isoschizomers وقد تكون متناظرة تماماً Perfect isoschizomers عندما يكون مكان قطعها متشابهاً كما هي الحال مع الأنزيمات Hind III و HsuI والأنزيمات BamHI و Xho I .

Hind III, HsuI: ´5-A⇩AGCTT-´3

Xho I, Bam HI: ´5-G⇧GATCC -´3

كما أن بعض الأنزيمات المتناظرة تكون غير تامة التناظر Imperfect isoschiz-omers حيث إن لها مواقع تقييد متشابهة وأماكن قطع مختلفة مثل الأنزيمات SmaI وXmaI والأنزيمات Sal I وHind II .

Sma I : ´5-CCC⇩GGG-´3 Hind II: ´5-G⇩TCGAC-´3

Xma I: ´5- C⇧CC GGG-´3 Sal I : ´5-G⇧TCGAC-´3

سابعاً : يمكن لعدد من الأنزيمات القاطعة أن تعمل في تردد مشترك لموقع تقييد معين حيث إن لكل منها موقع تقييد داخل التردد المشترك . فمثلاً الأنزيمات BamH I وMboI و Sau 3A تعمل على التردد 3´-5-GGATCC´ حيث يتمكن الأنزيمان MboI و Sau 3A من العمل على التردد الرباعي GATC الذي يقع ضمن التردد السداسي الذي يمثل موقع تقييد الأنزيم BamHI .

وكذلك الأنزيمات Alu I وHind III حيث يقطع الأنزيم الأول في التردد الرباعيAGCT الذي يقع ضمن التردد السداسي AAAGCTT الذي يمثل موقع تقييد الانزيم الثاني . أن هذه الأنزيمات تؤدي إلى إنتاج قطع حامض نووي لزجة النهايات لذلك فأنه من المحتمل أن يتم استخدام قطع حامض نووي ناتجة عن أحد هذه الأنزيمات وهندستها في ناقل´مقطوع بأنزيم آخر من نفس هذه المجموعة . وقد يؤدي ذلك الى فقدان موقع تقييد أحد هذه الأنزيمات وربما كليهما .

## فصل قطع الحامض النووي *DNA* المعاملة بالأنزيمات القاطعة

تعتبر طرق الكيمياء الحيوية في فصل الجزيئات أحد أهم المفاتيح المستخدمة في فصل الأحماض النووية المستخدمة في الهندسة الوراثية . لقد تم تطوير عددٍ من هذه الطرق لأجل فصل الجزيئات الكيميائية بمختلف تشكيلاتها البنائية . وتتوفر الآن عدة طرق مختلفة للفصل منها الطرد المركزي الفائق والهجرة عبر هلام والكروماتوغرافي وغيرها . وتعتبر طريقة الطرد المركزي الفائق والهجرة عبر هلام من أهم طرق فصل قطع الحامض النووي DNA المعاملة بالأنزيمات القاطعة المتوفرة في كثير من المختبرات والتي يمكن الحصول من خلالها على قطع نقية ومعروفة الحجم والوزن الجزيئي .

### الطرد المركزي الفائق *Ultracentrifugation*

تعتبر هذه الطريقة من أقدم طرق الفصل المستخدمة في فصل الاحماض النووية والبروتينات إضافة إلى استخدامها في فصل وتحليل الخلايا والعضيات السلايتوبلازمية والجزئيات البايولوجية الكبيرة . تتعرض الجزيئات المفصولة بهذه الطريقة الى عدة عوامل أثناء الطرد تؤدي في النهاية الى فصلها كطبقات متسلسلة الكثافة والوزن الجزيئي . فالجسم المتحرك أثناء الطرد المركزي في دائرة نصف قطرها (r) يتعرض لقوة طرد مركزي Fc تساوي حاصل ضرب كتلته ($m^-$) في مجال الطرد ($w^2 r$) . ويمكن تمثل ذلك بالمعادلة التالية :

$$Fc = m^- \; w^2 r$$

وحيث إن كتلة الجسيم المتحرك ($m^-$) مساوية لكتلة السائل المزاح (m) (الذي يمثل القوة المعاكسة لحركة الجسيم) في عامل الطفو الذي يساوي $1\text{-}v^-P$ (حيث إن ($v^-$) هي الحجم الجزيئي النوعي للجسيم و (P) هي كثافة المحلول) . لذا فأنه يمكن كتابة المعادلة السابقة كالتالي :

$$Fc = m^- w^2 r = m\,(1\text{-}VP) w^2 r$$

ويتحرك الجسيم في مجال الطرد بسرعة ثابتة (V) عند تساوي قوة الطرد المركزي Fc لمعامل N احتكاك الجسيم (f) . لذلك فأن سرعة ترسيب الجسيم تساوي :

$$V = \frac{Fc}{f} = \frac{m(1-\bar{V}P)\, w^2 r}{f}$$

وتبين هذه المعادلة بأن سرعة الترسيب تتناسب طردياً مع شدة مجال الطرد المركزي . وهذا يعني أن الترسيب يعتمد على خواص الجسيم والمحلول ولا يعتمد على مدى سرعة دوران العينة .

كما أنه يمكن استنتاج أن سرعة ترسيب جزيء معين تتناسب مع كتلته وأن الجزيء الكثيف يتحرك بسرعة أكبر من الجزيء الأقل كثافة . كما أن شكل الجزيء يؤثر في شدة لزوجته في محلول الطرد . فمعامل الاحتكاك لجزيء مضغوط أقل من معامل الاحتكاك لجزيء أكثر تعقيداً . كما أن سرعة الترسيب تعتمد على كثافة المحلول (P) فتترسب الجزيئات عندما يكون عامل الطفو ($\bar{V}$ P) أقل من واحد وتعوم إذا كان أكثر من ذلك ولا تتحرك عندما يساوي صفراً .

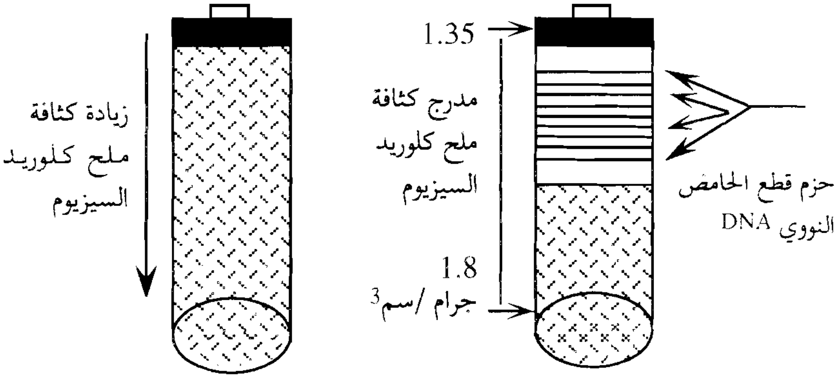
ولأجل استخدام الطرد المركزي الفائق في فصل جزيئات مختلفة الحجم والوزن الجزيئي من الحامض النووي DNA فأنه يتم تحضير محلول مدرج الكثافة مثل استخدام محلول السكروز 5% مع محلول السكروز 20 % أو استخدام ملح كلوريد السيزيوم$CsCl_2$ بعيارية مولارية 5.6 ثم يضاف محلول قطع الحامض النووي إلى محلول الطرد . عندما يتم الدوران فأن قطع الحامض النووي ستتحرك داخل المحلول صعوداً ونزولاً حتى يحصل التوازن بين القوة الطاردة المركزية مع الانتشار . ويمكن الحصول على هذا التوازن باستخدام قوة طرد مركزي تتراوح بين 40-70 الف دورة في الدقيقة rpm لمدة 48 ساعة . وفي نهاية الدوران تنفصل قطع الحامض النووي كحزم داخل أنبوب الطرد المركزي . ويمكن رؤية هذه الحزم بهيئة برتقالية عندإضافة الاثيديوم برومايد قبل الطرد المركزي وعند إضاءة الأنبوبة بالأشعة فوق البنفسجية . حيث تقع أخف الجزيئات في الأعلى بينما تقع أثقلها بالقرب من القعر (الشكل3-3) .

ويمكن حساب الوزن الجزيئي أو كتلة الجزيئات اعتماداً على إتزان الترسيب حيث إن كتلة الحزمة تساوي :

$$m=\frac{2KT}{(1-V^{-}P)w^2} \; Loge \; \frac{C2}{C_1(r_2^2 - r_1^2)}$$

حيث إن $C_1$ و $C_2$ هي التركيز عند مسافة $r_1$ و $r_2$ من محور الدوران و K هي ثابت بولتزمان Boltzmann's Constant و T هي درجة الحرارة المطلقة .

وتعتبر طريقة الفصل بواسطة الطرد المركزي الفائق من أجود الطرق للحصول على نماذج نقية . إلا أنه من الصعوبة جداً الحصول على نماذج من الجزيئات التي تختلف عن بعضها بأزواج قليلة من النيوكليوتيدات ، كما أنه من الصعوبة حساب أوزانها الجزيئية المضبوطة . لذلك فأن هذه الطريقة أهملت بشكل شبه تام في عمليات فصل قطع الحامض النووي المعاملة بالأنزيمات القاطعة وأستعيض عنها بطرق الهجرة الكهربائية الأكثر دقة والأسهل تقنية وأزهد تكلفة .




**(الشكل3-3): الطرد المركزي الفائق بوجود كلوريد السيزيوم ويلاحظ تكون مدرج كثافة للملح بحيث تزداد الكثافة بأتجاه القعر وتبعاً لاختلاف كتلة قطع الحامض النووي فأنها تنفصل في مواقع مختلفة.**

**الهجرة الكهربائية عبر الهلام** *Gel Electrophoresis* :

تعتمد هذه الطريقة في فصل جزيئات الحامض النووي على شحنة هذه الجزيئات وقطبية المحلول المستخدم بوجود تيار كهربائي .

وحيث إن جزيئات الحامض النووي سالبة الشحنة لذلك فأنها تهاجر نحو القطب الموجب . لقد وجد أن سرعة حركة هذه الجزيئات نحو القطب الموجب تعتمد على وزنها الجزيئي .

تجري الهجرة الكهربائية لهذه الجزيئات عادة في هلام وليس في محاليل حرة . ويتوفر الآن نوعان من الهلام هما هلام الآجاروز Agarose وهلام البولي اكريلمايد Polyacrylamide وتختلف استعمالاتها كما سيرد لاحقاً .

إن سرعة هجرة قطع الحامض النووي أو غيرها(V) في المجال الكهربائي يعتمد على قوة هذا المجال (E) وكذلك على صافي الشحنة الكهربائية(Z) و معامل الاحتكاك (f) الناشئ عن وجود الهلام . ويمكن تمثيل سرعة الهجرة بالمعادلة التالية :

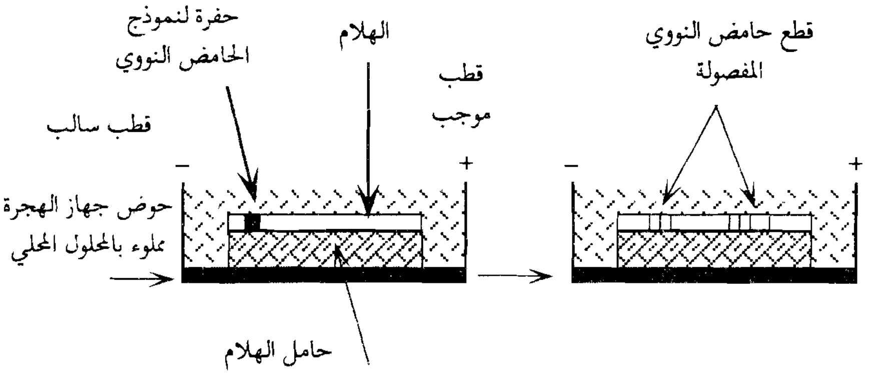
$$V = \frac{EZ}{f}$$

وتصطدم القوه الكهربائية التي تدفع بالجزيء (القطعة) نحو القطب المعاكس باللزوجة!٧ والتي تنشأ من أحتكاك الجزيء مع الهلام . ويعتمد معامل الاحتكاك f على كل من كتلة الجزيئات المهاجرة وشكلها ولزوجة الوسط . وهذا ما يفسر الاختلاف في استخدام نوع الهلام وتركيزه . إذ أن هلام الاجاروز أكثر كثافة من هلام البولي اكرليمايد ولهذا السبب فأن الأول يكون مناسباً لفصل جزيئات الحامض النووي يتراوح حجمها بين 1 – 60 كيلو قاعدة (kb) أو أكثر . بينما يستخدم الثاني لفصل الجزيئات الصغيرة التي تتراوح أحجامها بين واحد كيلو قاعدة فأقل . يعود الاختلاف في مسامية هلام الاجاروز والبولي اكرليمايد إلى مكوناتها . إذ أن هلام الاجاروز مؤلف من الجالاكتوز و مشتقاته التي تؤلف بعد الغليان والتبريد شبكة معقدة نتيجة تولد الأواصر الهيدروجينية بينها مما يحفظ مسامات كبيرة الحجم

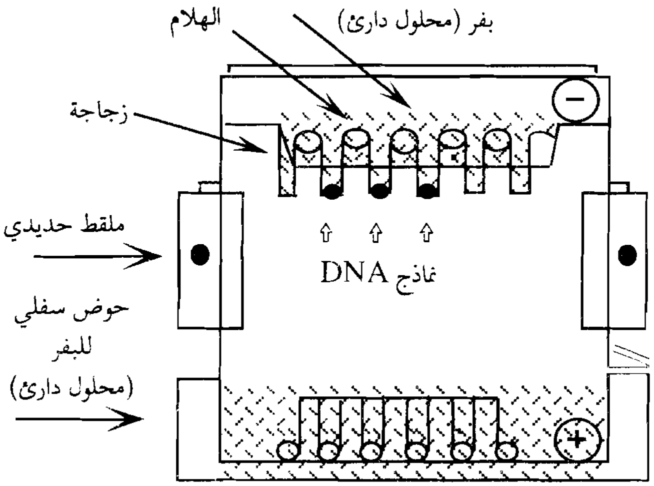
مما يسمح للجزيئات الكبيرة الحجم من الأحماض النووية بالهجرة خلاله (شكل3-4) . ولا تتوفر مثل هذه المسامات الكبيرة في هلام البولي اكرليمايد نظراً لتعقد ارتباط مادة الاكرليمايد البلورية مع قاعدتها .

لذلك فإن استخدام 0.3-0.8 % من هلام الاجاروز وبسمك نصف سنتميتر سيكون مناسباً لفصل جزيئات الحامض النووي التي تتراوح ما بين 1-60 كيلو قاعدة . بينما يعتبر هلام البولي اكرليمايد 40% وبسمك 0.3 مليميتر مناسباً لفصل جزيئات الحامض النووي التي تتراوح ما بين 1-300 زوج قاعدي . وبزيادة تركيز الهلام يزداد قدرة فصل الجزيئات الأكبر حجماً . ويتضح من ذلك بأن قدرة الهلام على فصل قطع الجزيئات النووي تتناسب طردياً مع تركيزه . وتتناسب سرعة الهجرة عكسياً مع تركيز الهلام . كما أنه من الممكن مزج الهلامين لتصنيع هلام أجاروز – بولي اكرليمايد يمكن من خلاله فصل جميع أنواع القطع .

وهكذا فأنه في حقيقة الأمر أن الهلام يعمل كغربال للجزيئات حيث تتحرك الجزيئات الصغيرة بسرعة خلال الهلام بينما تبقى الجزيئات الكبيرة عند القمة ليتم الحصول على مدرج من الجزيئات تختلف بأوزانها الجزيئية . ويمكن مشاهدة هذا التدرج عندما يتم صباغة الهلام . فمثلاً يتم صباغة هلام الاجاروز بالاثيديوم برومايد بتركيز 0.5 مايكروغرام /سم3 لمدة ساعة ثم إضاءة الهلام بالأشعة فوق البنفسجية حيث تظهر جزيئات الحامض النووي DNA المفصولة كحزم حمراء برتقالية لماعة . كما يمكن إظهار حزم الحامض النووي في هلام البولي اكرليمايد باستخدام نترات الفضة حيث تظهر حزم الحامض النووي كحزم سوداء اللون أو بنية .




أ-جهاز الهجرة الكهربائية الأفقي المناسب عند استخدام هلام الاجاروز .




ب- جهاز الهجرة الكهربائية الرأسي المناسب عند استخدام هلام البولي اكرليمايد .

**(الشكل4-3) : نوعان من أجهزة الهجرة الكهربائية المستخدمة في فصل قطع الحامض النووي** DNA .

كـمـا يمكن توسـيم قطع الحـامض النووي بالمواد المشـعـة لإظهـارها على فلم شعاعي . إن حركة جزيئات الحامض النووي خلال الهلام تتناسب خطياً مع لوغاريتم وزنها الجزيئي . ويمكن تمثيل ذلك بالمعادلة التالية :

$$D=b\ (\text{Log}\ M)\ -a$$

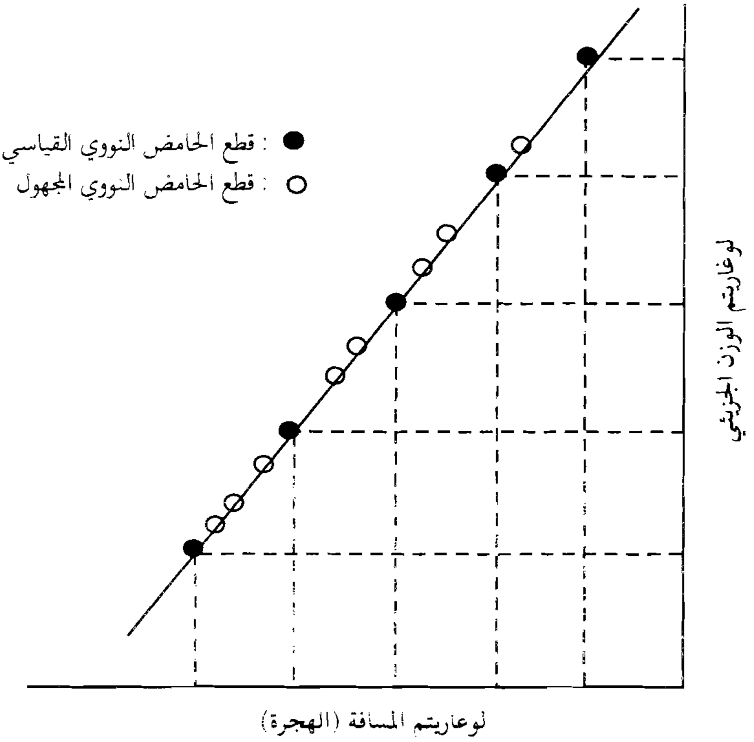
حيث إن D = مسـافة حركة الحزمة و M وزنها الجزيئي وa و bثوابت تعـتـمـد على ظروف الهجرة الكهربائية .

إلا أن هذه المعـادلة لا تستـخدم كـثيـراً في المختـبرات لاختـلاف ظروف الهـجرة الكهـربائيـة في كل مـرة ويسـتـعـاض عنهـا باسـتـخـدام مـا يدعى بالمنحنى القياسيStanderd Curve حيث يكون ضرورياً هجرة جزيئات حامض نووي قياسية Marker مـعـروفـة الأوزان الجـزيئـيـة مع الجـزيئـات المطلوب فـصلهـا وتقـدير أوزانهـا الجزيئية .

يتم في هذه الطريقة صباغة الهلام بعد الانتهاء من الهجرة الكهربائية وقياس المسافات التي قطعتها كل قطعة من قطع الحامض النووي القياسية وتثبيت المسافات ولوغاريتم أوزانها الجزيئية على محاور المنحنى القياسي . يتم بعد ذلك تحديد نقاط تقاطع المسافات مع لوغاريتم أوزانها الجزيئية ليتم رسم المنحنى القياسي . تقاس بعد ذلك المسافات التي قطعتها كل حزمة من حزم الحامض النووي المجهولة وتثبيتها على محور المسافات في المنحنى القياسي .

يرسم خط مستقيم من محور المسافة لكل حزمة نحو المنحنى وخط مستقيم آخر من هذه النقطة نحو محور لوغاريتم الأوزان الجزيئية . ويحسب الوزن الجزيئي لكل حزمـة من الحزم المجـهولة في مـوقع تحـديده على مـحـور لوغـاريتم الأوزان الجـزيئـيـة (شكل3-5 ) . وعلى الرغم من سهولة هذه الطريقة فأن نسبة الخطأ في تقدير الأوزان الجـزيئـيـة فـيـهـا يقل عن 5% وهو يمثل خطأ يمكن تحـمله في مـعظم تأخـذ تجـارب

الهندسة الوراثية . ومع ذلك فأن هناك طريقة رياضية أخرى يمكن من خلالها تقدير الأوزان الجزيئية لقطع حامض نووي مجهولة . تعتمد هذه الطريقة كسابقتها على استخدام قطع حامض نووي قياسية في الهجرة الكهربائية . وبعد الانتهاء من الهجرة وصباغة الهلام فأنه يتم تحديد المسافة التي قطعتها ثلاث قطع من قطع الحامض النووي القياسي وكذلك أوزانها الجزيئية ومن ثم استخراج ما يدعى بعتبة المسافة (mo) . ويتم ذلك بالمعادلة التالية :




**(الشكل3-5) : المنحنى القياسي المستخدم في حساب الأوزان الجزيئية لقطع حامض نووي مجهولة مقارنة مع قطع حامض نووي قياسي**

$$m_0 = \frac{\left(\frac{m_2-m_3}{m_1-m_3} \times \frac{L_2-L_1}{L_3-L_2}\right) m_1 - m_3}{\left(\frac{m_2-m_3}{m_1-m_3} \times \frac{L_2-L_1}{L_3-L_2}\right) - 1}$$

ثم يتم استخراج الثوابت $K_1$ و $K_2$ حسب المعادلات التالية :

$$K_1 = \frac{L_2-L_1}{\frac{1}{m_0-m_2} - \frac{1}{m_0-m_1}}$$

$$K_2 = \frac{K_1-L_1}{m_0-m_1}$$

حيث إن $L_1$ ، $L_2$، $L_3$ تمثل المسافات التي قطعتها قطع الحامض النووي القياسي التي تم اختيارها .

و $m_1$، $m_2$، $m_3$ تمثل أوزانها الجزيئية .

وباستخدام نتائج المعادلات السابقة فأنه يمكن تعيين الوزن الجزيئي لأية قطعة من قطع الحامض النووي المجهول باستخدام المعادلة التالية :

$$L = K_2 + \frac{K_1}{m_0-m}$$

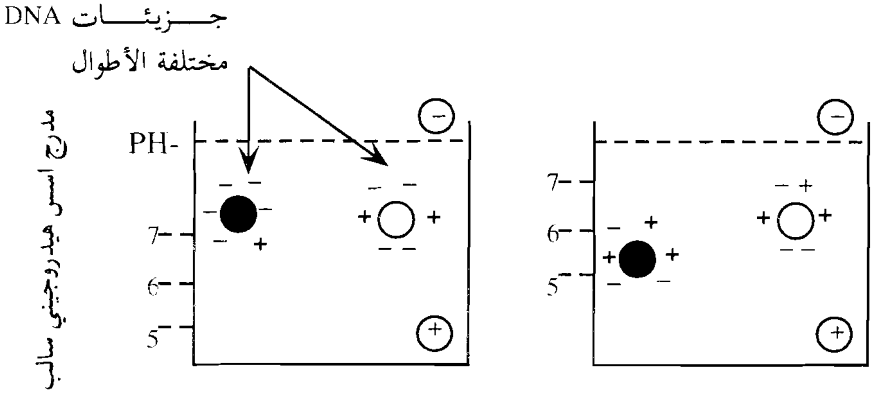
حيث تمثل L الوزن الجزيئي للقطعة المجهولة و m هي المسافة التي قطعتها .

## التركيز بالتماثل الكهربائي *Isoelectric focusing*

إن الأنزيمات القاطعة تعمل على قطع سلاسل الحامض النووي DNA في مواقع مختلفة وقد تشترك بعض القطع الناتجة عن الهضم بهذه الأنزيمات بنفس الوزن الجزيئي إلا أنها تمثل في الواقع عدة مواقع مختلفة على سلاسل الحامض النووي . لذلك فأن الطرق السابقة تعمل على تجميع جزيئات الحامض النووي التي لها نفس الوزن الجزيئي في حزمة واحده دون أن تتمكن من فصل قطع الحامض النووي المتنوعة التي لها نفس الوزن الجزيئي . لذلك فأنه في سبيل فصل قطع الحامض النووي التي لها نفس الوزن الجزيئي عن بعضها فأنه يتم اللجوء إلى طريقة أخرى تعرف بطريقة التركيز بالتماثل الكهربائي . تعتمد هذه الطريقة على حقيقة أن كل قطعةمن قطع الحامض النووي لها نقطة تماثل كهربائي معينة Isoelestric Point (IP) عند أس هيدروجيني (PH) سالب . وعند هذا الاس الهيدروجيني يكون صافي الشحنة على الحامض النووي يساوي صفراً . وعلى الرغم من أن جميع قطع الحامض النووي المراد فصلها بهذه الطريقة لها نفس الوزن الجزيئي إلا أن بعضها يختلف في نقطه تماثله الكهربائي . ويعود الاختلاف في نقطة التماثل الكهربائي (PI) إلى الاختلاف في نسب مكوناتها من القواعد النتروجينية مما يؤدي إلى الاختلاف في عدد الشحنات الموجبة أو السالبة أو السالبة والموجبة الموجودة عليها .

أن نقطة التماثل الكهربائي لجزيئة حامض نووي DNA معين هي النقطة التي تتعادل فيها الشحنات السالبة مع الموجبة بحيث تصبح الشحنة الصافية تساوي صفراً . وتصل الجزيئة إلى هذه النقطة عند حركتها في وسط متدرج الاس الهيدروجيني السالب وتكتسب أثناء حركتها الأيونات الكهربائية حتى تصل إلى حالة الاتزان في شحناتها الكهربائية ويكون ذلك عادة عند PH سالب معين . وتتوقف الجزيئة عن الحركة عند هذا الموضع وهي في حالة الاتزان (الشكل3-6 ) . ويمكن بواسطة هذه الطريقة فصل جزيئات تختلف قيم التماثل الكهربائي لها بمقدار 0.001 وهو ما يساوي الاختلاف في شحنة كهربائية واحدة .ويمكن دمج طريقة الترحيل أو الهجره الكهربائية مع التركيز الكهربائي وذلك بإجراء الهجرة الكهربائية لقطع الحامض النووي باستخدام هلام الاجاروز أو البولي اكرليمايد لأجل فصل هذه

القطع اعتماداً على وزنها الجزيئي ثم يوضع الهلام أفقياً على هلام له قيم تماثل كهربائي كثيرة مثل هلام البولي أمفوليت ثم يسمح لها بالهجرة الكهربائية رأسياً حيث تنفصل الجزيئات المتشابهة الوزن الجزيئي اعتماداً على قيم التماثل الكهربائي لها .




(الشكل6-3) : طريقة الفصل التي تدعى بالتركيز بالتماثل الكهربائي حيث تنفصل الجزيئات الى مواقع مختلفة بسبب اختلافها في نقطة التماثل الكهربائي Isoelectisc Point.

## بناء خرائط مواقع أنزيمات التقييد لجزيئة حامض نووي *DNA*

تعتبر الخرائط الأنزيمية التي تحدد مواقع عمل أنزيمات التقييد أو القطع وكذلك عدد قطع الحامض النووي DNA الناتجة عن المعاملة بالأنزيمات ذات أهمية كبيرة في العديد من الدراسات مثل دراسات التطور وإيجاد علاقات القرابة . إذ يمكن بناء شجرة تطورية لمجموعة من الأنواع والأجناس اعتماداً على الخرائط الأنزيمية لأحماضها النووية . كما يمكن اكتشاف الأمراض الوراثية الناتجة عن الطفرات الوراثية . حيث إن كل أنزيم تقييد معين يعطي عدداً محدوداً ومعروفاً من قطع الحامض النووي ولكل نوع . لذلك فأنه في حالة وجود طفرة وراثية معينة في أحد مواقع التقييد لأنزيم معين فأن عدد القطع الناتجة سيكون أقل من العدد الطبيعي بسبب اختفاء موقع تقييد واحد . كما يمكن استخدامها في اكتشاف طفرات وراثية من تلك التي تؤدي إلى ظهور موقع تقييد جديد لأنزيم معين .

هذا إضافة إلى أن معرفة الخرائط الأنزيمية يسهل عملية تحديد مواقع المورثات وكذلك اختيار الأنزيمات المناسبة في عمليات عزل هذه المورثات وهندستها . تساهم الهجرة الكهربائية عبر الهلام في تقدير حجم قطع الحامض النووي الناتجة عن المعاملة بالأنزيمات وكذلك تحديد أوزانها الجزيئية باستخدام قطع دلائل معروفة الحجوم أو الأوزان الجزيئية Markers . ولأجل بناء خريطة أنزيمات معينة لجزيئة حامض نووي (DNA) فأنه يتوجب القيام بسلسلة من التفاعلات الأنزيمية المنفردة ومعرفة عدد وأحجام قطع الحامض النووي الناتجة عنها عن طريق الهجرة الكهربائية ومقارنتها مع دلائل معروفة الحجوم . يتم بعدها إجراء تفاعلات أنزيمية مزدوجة يشترك فيها أنزيمان في كل مرة Double digestion . وقد يتم تفاعل الانزيمان في أنبوبة واحدة في حالة اشتراكهما بنفس ظروف التفاعل أو أجرائها على مرحلتين . المرحلة الأولى تتضمن إجراء التفاعل مع أنزيم واحد وبعد الانتهاء يتم تنقية قطع الحامض النووي الناتجة عن التفاعل وتخليصها من مخلفات التفاعل الأول ثم إجراء المرحلة الثانية وهي إضافة الأنزيم الثاني (مع توفير الظروف المناسبة له) لمحلول القطع الناتجة عن التفاعل الأول . وهكذا يتم الحصول على نواتج تمثل التفاعل المزدوج .

وبمقارنة نتائج التفاعلات المزدوجة مع نتائج التفاعلات المنفردة نتمكن من بناء خريطة أنزيمية لمواقع قطع هذه الأنزيمات . في بعض الأحيان تتم الحاجة إلى إجراء تفاعلات جزيئة Partial digestion لحل بعض الغموض الذي قد يكتنف نتائج التفاعلات الكاملة المنفردة أو المزدوجة

في التفاعلات الجزئية يتم توفير ظروف معينة لا يتمكن فيها الأنزيم من إكمال عمله في جميع مواقع التقييد الخاصة به . فمثلاً يمكن حضانة التفاعل بدرجة حرارة منخفضة مثل 4 مْ لتثبيط عمل الأنزيم جزئياً أو تقليل وقت التفاعل بحيث لإنتاج الفرصة الكاملة للأنزيم لقطع جميع مواقع تقييده . وفي جميع الأحوال فأن العمل مع التفاعلات الجزئية يحتاج إلى إجراء التفاعل في ظروف مختلفة وتحليل نتائجها وثم اختيار الظرف الأمثل الذي يخدم الهدف من هذا التفاعل .

إن نتائج التفاعلات الجزئية تكون معقدة حيث تختلط فيها القطع الكاملة مع القطع المجزأة كلياً أو جزئياً ولكنها تعطي صورة واضحة يمكن فيها تجاوز الغموض الذي قد ينتج من التفاعلات الكاملة . ولأجل تقريب الصورة عن الخرائط الأنزيمية فأننا سنأخذ بعض الأمثلة لجعلها أكثر وضوحاً وفهماً .

لنفترض في المثال الأول بأن جزيئة بلازميد حلقي مزدوج يبلغ حجمها 20كيلو قاعدة ويراد بناء الخريطة الأنزيمية لأنزيمات القطع Pvu II، Bam H1، Sau 3A لهذه الجزيئة .ومن خلال تحليل نتائج التفاعلات الأنزيمية المنفردة لهذه الأنزيمات فقد وجدت النتائج التالية :

إن هناك قطعة واحدة من الحامض النووي البلازميدي يبلغ حجمها 20 كيلو قاعدة ناتجة عن قطع الأنزيم Sau 3A . وهذا يعني أن لهذا الأنزيم موقع قطع واحد وأدت المعاملة به إلى فتح حلقة البلازميد فقط ولهذا كان حجم القطعة الناتجة عن التفاعل مساوياً لحجم البلازميد الأصلي . كما أن نواتج تفاعل الأنزيم Bam H1 هي ثلاث قطع من الحامض النووي بأحجام 12، 6، 2 كيلو قاعدة . مما يؤكد وجود ثلاثة مواقع قطع لهذا الأنزيم على الحامض النووي . بينما أنتج التفاعل مع الأنزيم PvuII قطعتين يبلغ حجمها 16 و 4 كيلو قاعدة نظراً لوجود موقعين للقطع خاصة بهذا الأنزيم .

**أما نتائج التفاعلات المزدوجة فهي كالتالي :**

تفاعلBamH1+ Sau 3A أعطى أربع قطع يبلغ حجمها 11، 6، 2، 1 كيلو قاعدة بينما كان عدد القطع في تفاعل Pvu II + Sau3A ثلاث قطع يبلغ حجمها 4، 7.5، 8.5 كيلو قاعدة . أما التفاعل الثالث المزدوج Pvu II+ Bam H1 فقد أنتج خمس قطع يبلغ حجمها 9.5، 4.5، 2.5، 2، 1.5 كيلو قاعدة . ويلاحظ من نتائج هذه التفاعلات ما يلي :

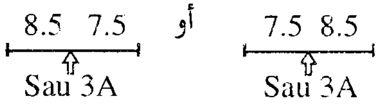
وجود موقع تقييد للأنزيم Sau 3A داخل القطعة 12 كيلو قاعدة الناتجة عن تفاعل الأنزيم Bam H1 يقع في موقع يشطر قطعة الحامض النووي هذه إلى جزئين الأول يبلغ حجمه1 كيلو قاعدة والأخر 11كيلو قاعدة .

| | |
|---|---|
| Sau 3A | 20 Kb |
| Bam H1 | 12kb + 6kb + 2kb |
| Sau3A + Bam H1 | 1kb + 11 kb + 6kb + 2kb |

كما أن موقع تقييد الأنزيم Sau 3A يقع على القطعة ذات الحجم 16 كيلو قاعدة الناتجة من تفاعل الأنزيمPvu II وذلك من مقارنة التفاعلات المنفردة والمزدوجة لهذه الأنزيمات وكالتالي :

| | |
|---|---|
| Sau 3A | 20 kb |
| Pvu II | 16 kb + kb |
| Sau 3A + Pvu II | 8.5 kb+ 7.5 kb+ 4 kb |

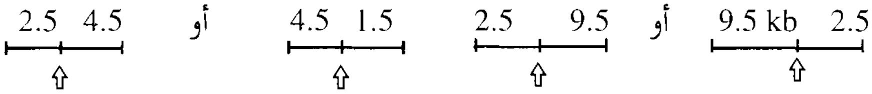
لذلك فأن موقع تقييد الأنزيم Sau 3A هو كالتالي :




أما نتائج التفاعل المزدوج Pvu II + Bam H1 فأنها تؤكد وجود موقع تقييد للأنزيم Pvu II يقع على القطعة 6 كيلو قاعده الناتجة من الأنزيمBam H1 بحيث يجزئها إلى قطعتين هما 4.5 و 1.5 كيلو قاعدة . بينما يقع موقع التقييد الثاني لنفس الأنزيم على القطعة 12 كيلو قاعده الناتجة من تفاعل الأنزيمBam H1 بحيث يجزئها الى قطعتين حجمها 9.5 و 2.5 كيلو قاعدة وكما هو موضح كالتالي :

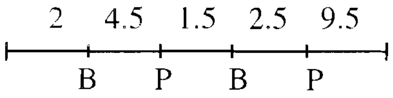
| | |
|---|---|
| Bam H1 | 12 kb + 6kb + 2kb |
| Pvu II | 16 kb + 4kb |
| Bam H1 +PvuII | 9.5kb + 2.5kb + 4.5 kb + 1.5 + 2kb |

لذلك فأن مواقع تقييد الأنزيم PvuII كالتالي :

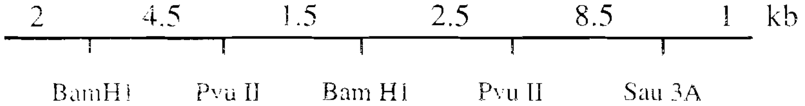



الموقع الثاني الموقع الأول

وحيث إن الأنزيم Pvu II يشطر البلازميد إلى قطعتين هما 16 و4 كيلو قاعدة لذلك فأن الاحتمال الوحيد لخريطة الأنزيماتPvuII وBamH1 هي كالتالي :




أما موقع تقييد الأنزيم Sau 3A فيكمن تعيينه من مقارنة نواتج التفاعلات المزدوجـــةSau3A+BamH1 و Sau3A+ PvuII حـــيث إن الأنزيم Sau3A يقطع القطعة12 كيلو قاعدة الناتجه من تفاعل الأنزيمBamH1 الى قطعتين هما 11و1 كيلو قاعدة (التفاعل المزدوجSau3A+BamH1) ويقع موقع التقييد له بينهما . كما أن الأنزيم Sau3A يقطع القطعة 16 كيلو قاعدة (الناتجة عن الأنزيم PvuII) في موقع يبعد عن أحد مواقع تقييد الأنزيم PvuII بمسافة 7.5 كيلو قاعدة كما أنه يبعد عن الموقع الثاني (التفاعل المزدوج Sau3A+ PvuII) بمسافه8.5 كيلو قاعدة وعلى ذلك فأن الخريطة الأنزيمية لهذا البلازميد ستكون كالتالي :



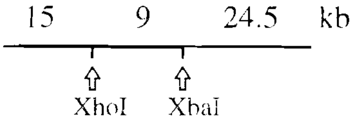

ولأجل زيادة وضوح كيفية رسم الخرائط الأنزيمية للحامض النووي DNA نأخذ المثال الأخر التالي :

يبلغ حجم العاثي لامبدا 48.5 كيلو قاعدة تقريباً ولرسم الخريطة الأنزيمية للأنزيمات XbaI و XhoI وKpnI لهذا الجين فأنه يتوجب إجراء تفاعلات أنزيمية مفردة ومزدوجة لهذه الأنزيمات . وقد كانت نتائج هذه التفاعلات كما يلي :

| الأنــزيم | عدد القطع الناتجة | حجم القطع بالكيلو قاعدة |
|---|---|---|
| XbaI | 2 | 24.5 , 24 |
| XhoI | 2 | 33.5 .15 |
| KpnI | 3 | 30.17.15 |
| XbaI+XhoI | 3 | 24.5.9,15 |
| XbaI +KpnI | 4 | 24,17,6,1.5 |
| KpnI جزئي | 6 | 1.5,17,18.5 ,30,31.5,48.5 |

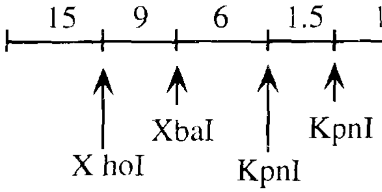
ويمكن من تحليل هذه النتائج استنتاج الخريطة التالية :

بما أن المادة الوراثية للعاثي لا مبدا خيطية وليست حلقية لذلك فأن هناك موقع تقييد واحد لكل من الأنزيمات XbaI ، XhoI وكالتالي :




أما بالنسبة للانزيم KpnI فاستناداً إلى نتائج تفاعله فأن له موقعي تقييد يقعان ضمن القطعه24.5 كيلو قاعدة الناتجة عن تفاعل الأنزيم XbaI (لاحظ التفاعل المزدوجXbaI+ KpnI ) . ولكن لا يمكن تحديد موقعيهما إلا بواسطة إجراء التفاعل الجزئي مع الأنزيم KpnI .

ويستنتج من نتائج هذا التفاعل بأن القطعة 48.5 كيلو قاعدة تمثل الحامض النووي غير المحطم بالأنزيم بينما تمثل القطع 30 ، 17 و 1.5 كيلو قاعده نواتج التفاعل الكامل للأنزيم وتمثل القطع 31.5 و 18.5 كيلو قاعدة نواتج التفاعل الجزئي للأنزيم . واستنادا إلى ذلك فأن موقعي تقييد الأنزيم KpnI يجب إن يقعا على جانبي القطعة 1.5 كيلو قاعدة . لهذا فأن الخريطة الأنزيمية الكاملة للمادة الوراثية للعاثي لامبدا ستكون كالتالي :




## أنزيمات اللحام *Ligases*

تعمل هذه الأنزيمات على إعادة روابط الفوسفور ثنائي الأستر بين النيوكليوتيدات . وهي بهذه الوظيفة تكون على عكس وظيفة الأنزيمات القاطعة أو المقيدة التي تحطم هذه الروابط . يتوفر نوعان من هذه الأنزيمات هما DNA Ligase المعزول من أنواع مختلفة من الكائنات الحية ويعمل هذا الأنزيم على إعادة ارتباط قطع الحامض النووي ذات النهايات اللزجة فقط ويحتاج الى العامل المساعد$NAD^+$ في هذه العملية . أما الأنزيم الآخر فهو الأنزيم T4 Ligase المعزول من العاثي T4 بعد إصابته لبكتيريا القولون E.coli . يتميز هذا الأنزيم عن الأنزيم الأول في أن له القدرة على إعادة التحام قطع الحامض النووي ذي النهايات اللزجة أو العمياء على حد سواء . إضافة إلى احتياجه للعامل المساعد ATP لاتمام عمله . ونظراً لعزل المورثات المشفرة لهذه الأنزيمات فقد تم هندستها وراثياً وأصبح بالإمكان الحصول على كميات كبيرة منه مختبرياً وبطرق سهلة نسبياً .

إن الوظيفة الطبيعية لأنزيمات اللحام في الخلايا الحية هي لحام مناطق مجاميع الهيدروكسيل في النهاية الثالثة 3-OH في النيوكليوتيدات مع مجاميع الفوسفات في النهاية الخامسة5-P للنيوكليوتيدات المجاورة لها وتكوين روابط الفوسفور ثنائية الأستر وذلك أثناء تضاعف الحامض النووي DNA . كما أن لها نفس الدور أثناء عمليات تصليح الحامض النووي DNA Repair حيث تقوم هذه الأنزيمات بتكوين روابط فوسفات ثنائي الأستر بين النيوكليوتيدات المستصلحة . وتحتاج هذه الأنزيمات في سبيل إقامة هذه الروابط الى عوامل مساعده تتحول كيميائياً إلى مركب الأدنين أحادي الفوسفات AMP Adenosine monophosphate الذي يرتبط مع الأنزيم محفزاً إياه على توليد هذه الروابط .

لا تعمل أنزيمات اللحام على توليد الروابط الهيدروجينية التي تربط القواعد النتروجينية للنيوكليوتيدات المتكاملة لشريطي الحامض النووي DNA بل أنها تعمل فقط على تكوين روابط الأستر النهائية في موقع الالتحام . كما أن أنزيمات اللحام لاتعمل إلا بعد التقاء النهايات الصحيحة وهو ما تحدده الصدفة . لذلك فأنه يستخدم تركيز عالٍ من الحامض النووي مختبرياً في عمليات اللحام لزيادة هذه الفرصة وخصوصاً عندما تكون نهايات القطع عمياء .

بينما تكون فرصة الالتقاء الصحيح لهذه النهايات كبيرة في حالة وجود النهايات اللزجة . إذ تساعد أواصر الهيدروجين بين قواعد النيوكليوتيدات المتكاملة على توفير هذه الفرصة . ومع ذلك فأنه في حالة عدم بناء رابطتي الأستر في النهايات المتقاربة في الوقت المناسب فأن هذه القطع ربما تنفصل مرة أخرى بسبب ضعف روابط الهيدروجين . وعلى ذلك فأن تركيز قطع الحامض النووي المطلوب لحامها سواء كانت نواقل أو قطعاً أخرى أو قطعاً مختلفة وتركيز أنزيم اللحام ونوع النهايات لها دور كبير في سرعة حصول العملية . هذا إضافة إلى الظروف الفيزيائية الصحيحة اللازمة لمثل هذه التفاعلات . وتبقى في جميع الأحوال عملية لحام النهايات اللزجة أسهل بكثير من لحام النهايات العمياء . إلا أنه من الممكن تحوير هذه النهايات بأساليب مختلفة بحيث يمكن تحويلها إلى نهايات لزجة .

ومن أهم أساليب التحوير هذه استخدام جزئيات رابطة Linkers أو توصيلات Adaptors أو ذيول متجانسة Homopolymer Tails

## تحوير النهايات العمياء في قطع الحامض النووي *DNA*

في عمليات الهندسة الوراثية يفضل استخدام قطع حامض نووي وناقل ذات نهايات متجانسة بحيث يمكن إجراء الهندسة في أفضل صورة ممكنة . وعلى الرغم من أن هذه النهايات يمكن توفيرها عن طريق قطع الحامض النووي المراد هندسته والناقل بنفس الأنزيم القاطع أو بأنزيمات متناظرة . لأن ذلك لا يمكن الحصول عليه دائماً . إذ أن الصورة الأكثر توفراً في تجارب الهندسة الوراثية هي وجود نهايات لزجة للناقل ونهايات عمياء لقطع الحامض النووي المراد هندستها . لذلك فأنه تحت مثل

هذه الظروف فأنه يتطلب تحوير النهايات العمياء لجعلها متجانسة مع النهايات اللزجة للناقل . وسنتحدث عن أشهر طرق التحوير هذه وتطبيقاتها .

**أولاً: الروابط** *Linkers*

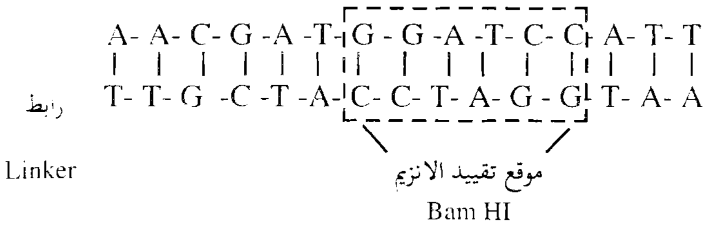
الروابط هي جزئيات حامض نووي DNA مزدوجة معروفة التردد ومصنعة مختبرياً . وهي أيضاً جزئيات ذات نهايات عمياء إلا أن ترددها يحتوي على موقع تقييد مفرد لأنزيم تقييد معين أو أكثر من موقع لأكثر من أنزيم . يتم العمل باستخدام هذه الروابط عن طريق توفيرها في التفاعل بتركيز عالٍ مع وجود قطع الحامض النووي ذات النهايات العمياء المراد تحويرها ووجود أنزيم اللحام T4 والظروف المناسبة لإجراء هذا التفاعل .

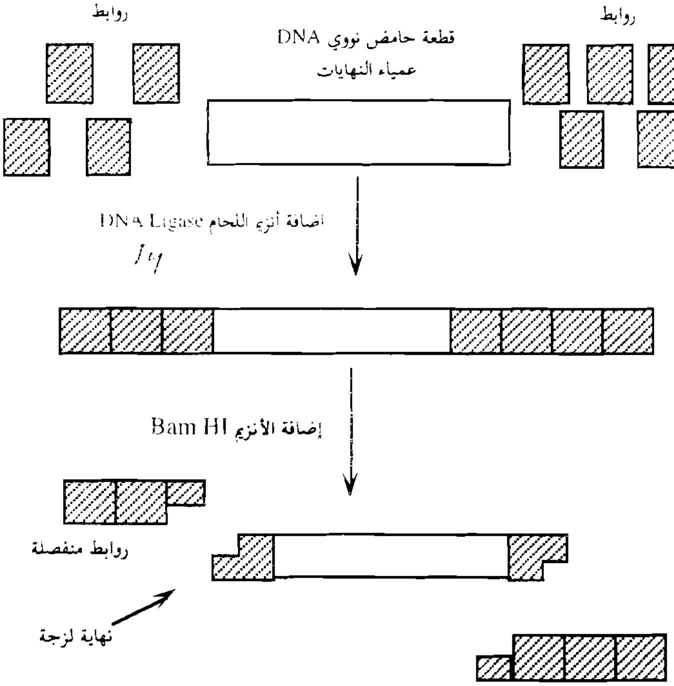
يتم التحام أكثر من جزيئة رابط في كل نهاية من النهايات العمياء لقطع الحامض النووي . وبعد الانتهاء من هذا التفاعل تتم تنقية نواتج التفاعل ثم معاملتها مع الأنزيم الذي له موقع تقييد في الروابط حيث يعمل هذا الأنزيم على قطع جزء من الروابط بصورة غير متناظرة منتجاً النهايات اللزجة . فلو أفترضنا أن الروابط المستخدمه في هذا المثال تحتوي على موقع تقييد للأنزيم BamHI فأن النهايات اللزجة الناتجة من تفاعل هذا الأنزيم مع الروابط ستحتوي على التردد 5- GATCC-3 كنهاية لزجة في كل نهاية من نهايات قطع الحامض النووي (الشكل 3-7) .

**ثانياً: التوصيلات** *Adaptors*

إن استخدام الروابط في عملية خلق نهايات لزجة لنهايات عمياء تعتبر وسيلة ممتازة لزيادة كفاءة اللحام وكفاءة الكلونة أيضاً . ولكن مع جميع المزايا الجيدة للروابط يبقى استخدامها محفوفاً بالمشاكل في حالة احتواء قطع الحامض النووي ذات النهايات العمياء على مواقع تقييد لنفس الأنزيم الذي له موقع تقييد في جزيئة الرابط . ويمكن أن تكون المشكلة مستحيلة الحل في حالة أن قطع الحامض النووي المراد تحوير نهاياتها كبيرة الحجم ويمكن أن تحتوي على العديد من مواقع التقييد الخاصة بهذا الأنزيم . لذلك فأن الروابط لا تعتبر الحل المناسب على الاطلاق في مثل

هذه الحالات ويتوجب استخدام طرق أخرى للتحوير . وتعتبر التوصيلات أحد أنجع هذه الطرق والتي يمكن استخدامها بنجاح دون الوقوع في المشاكل التي تواجهنا عند استخدام الروابط . التوصيلات كالروابط في أنها ذات جزيئات حامض نووي DNA مزدوج معروفة التردد ومصنعة مختبرياً . لكنها تختلف عن الروابط في أن لها نهاية عمياء وأخرى لزجة . ويهدف استخدامها في لحام نهاياتها العمياء مع النهايات العمياء لقطع الحامض النووي المراد تحوير نهاياته وهكذا تمتلك هذه القطع نهايات لزجة جديدة .




**(الشكل3-7) : آلية استخدام الروابط Linkers لخلق نهايات لزجة لقطع حامض نووي DNA عمياء النهايات.**

إن النهاية اللزجة للتوصيلات لا تحمل مجموعة فوسفات نهائية في النهاية الخامسة لذلك فأنه لا توجد فرصة أمام هذه النهايات على الالتحام مع النهايات العمياء لقطع الحامض النووي المراد تحويرها وتبقى فرصة الالتحام مفتوحة تماماً أمام النهاية العمياء للتوصيلات . لذلك فأنه يتوجب إضافة مجموعة فوسفات إلى النهايات اللزجة للتوصيلات بعد الانتهاء من عملية التحوير وقبل إجراء عملية الهندسة مع ناقل معين . ويتم ذلك بمعاملة القطع محورة النهايات مع أنزيم كاينيز متعدد النيوكليوتيدات Polynucleotide kinase بوجود جزيئة أدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP حيث يقوم الأنزيم بنزع مجموعة فوسفات من جزيئة ATP وربطها مع النهاية الخامسة للنهايات اللزجة (شكل 3-8 ) .

وعلى الرغم من أن التوصيلات جيدة في مواصفاتها إلاَّ أن العمل معها لا يخلو من صعوبات . تكمن هذه الصعوبات في احتمال وجود مواقع تقييد للأنزيم المنتج للنهايات اللزجة للتوصيلات في قطع الحامض النووي المحور النهايات حيث يصبح من الصعوبة استخلاص التوصيلات من قطع الحامض النووي المحورة والمهندسة مع ناقل . لذلك فأنه من أجل التغلب على هذه الصعوبات فقد صممت توصيلات تحتوي على مواقع تقييد لأنزيمات أخرى إضافة للأنزيم المنتج للنهايات اللزجة مما يسهل استخلاصها باستخدام هذه الأنزيمات .

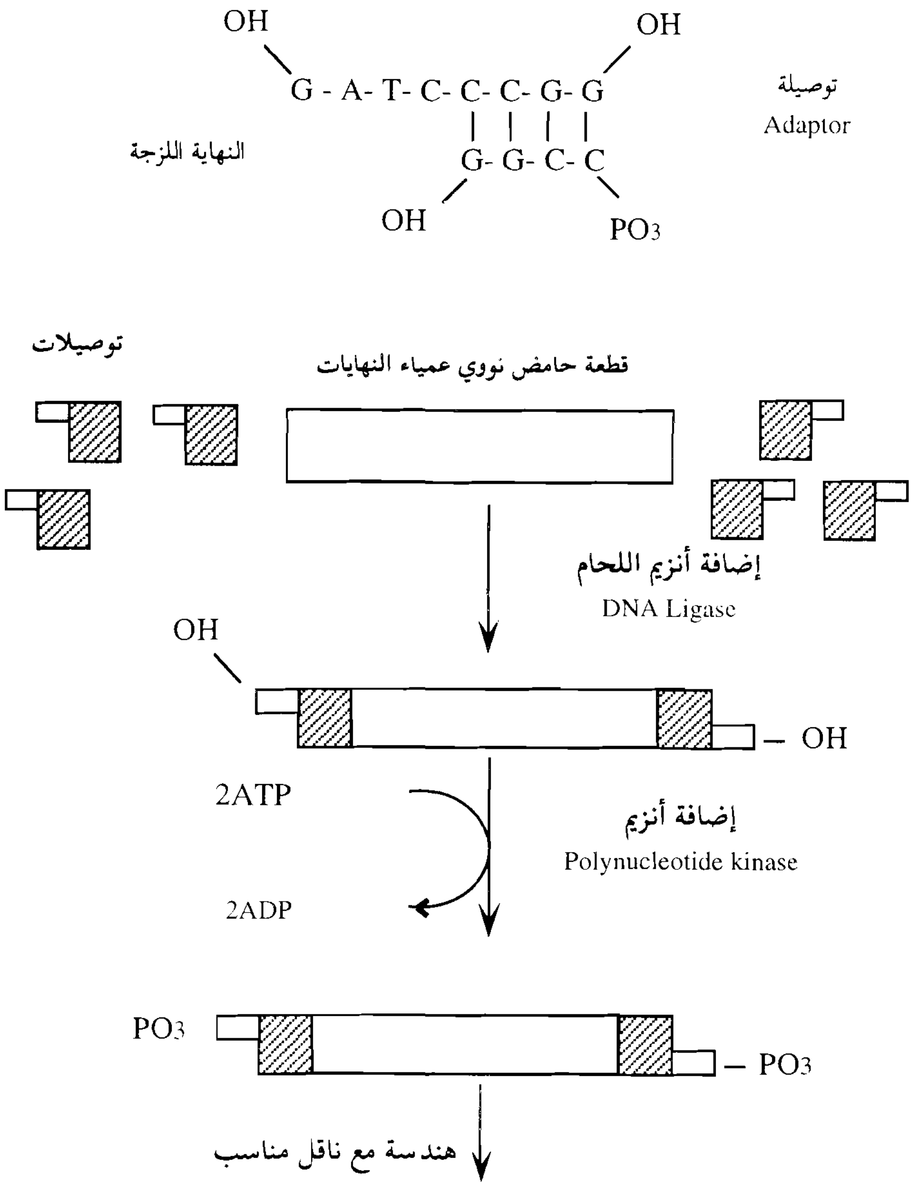
### ثالثاً: التذييل بالبوليمر المتجانس *Homopolymer tailing*

يعتبر التذييل بالبوليمرات المتجانسة طريقة جديدة تختلف عن الطرق التي ذكرت سابقاً ولكنها تؤدي الى نفس النتيجة . البوليمرات المتجانسة هي عبارة عن ترددات متشابهة لنيوكليوتيد واحد ويتراوح عددها بين 5-50 نيوكليوتيداً ويتم تصنيعها مختبرياً باستخدام أنزيم الترانسفيريز النهائي أو الطرفي Terminal(TdT) deoxynucleotidyl transferase الذي يقوم بإضافة هذه النيوكليوتيدات بصورة متعاقبة إلى النهاية الهيدروكسيلية الثالثة المكشوفة (3´-OH) . ونظراً لحاجة هذا الأنزيم لنهاية هيدروكسيلية مكشوفة (ناتئة) لذلك فأنه يتم معاملة قطع الحامض

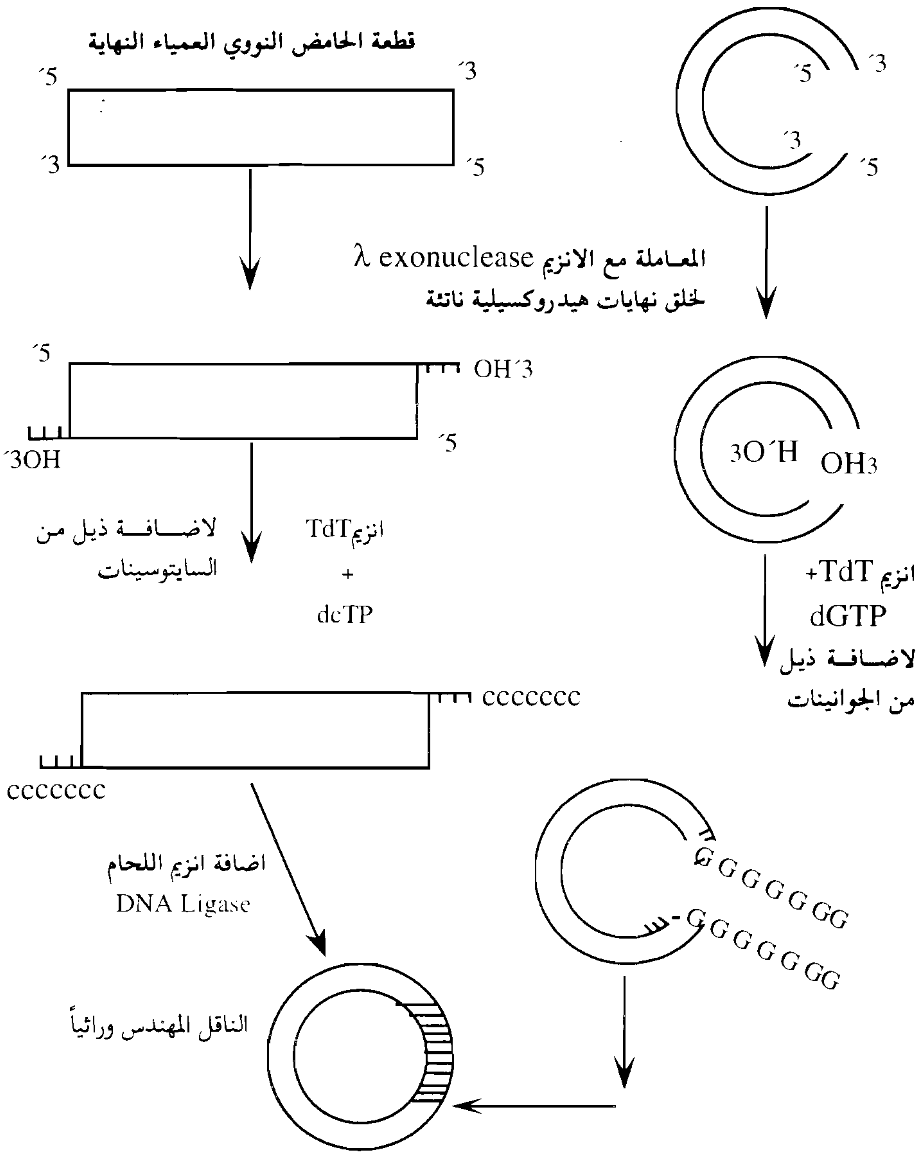
النووي ذات النهايات العمياء بأنزيم النيوكلييز الخارجي المعزول من العاثي لامبدا exonuclease λ الذي يقوم بإزالة النيوكليوتيدات من النهاية الخامسة لهذه القطع مؤدياً إلى الحصول على نهايات هيدروكسيلية ناتئة أو مكشوفة وجاهزة لعمل الأنزيمTdT (شكل3-9 ) . ولأجل تذييل هذه النهايات فأنه تتم إضافة نيوكليوتيدات تحتوي على السايتوسين مثلاً للتفاعل إضافة للأنزيم حيث يقوم الأنزيم عندها بربط هذه النيوكليوتيدات اعتباراً من النهاية الهيدروكسيلية الناتئة للقطع منتجاً ذيولاً سايتوسينية عند هذه النهايات . كما تتم معاملة الناقل المراد هندسة هذه القطع معه بنفس الطريقة وبإضافة نيوكليوتيدات تحتوي على الجوانين لإنتاج ذيول جوانين مكملة لذيول السايتوسين في قطع الحامض النووي المراد هندسته .

كما يمكن استخدام نيوكليوتيدات تحتوي على الادنين أو الثايمين لانتاج ذيول وذيول مكملة لها بنفس الأسلوب السابق .

لا يمكن التكهن بعدد النيوكليوتيدات المؤلفة للذيول المرتبطة مع النهايات الهيدروكسيلية لقطع الحامض النووي المرادة هندستة أو الناقل . ولكن لعددها أهمية في استقرار منتجات الهندسة . إذ أنه كلما كان عدد النيوكليوتيدات المؤلفة للذيول أكثر كلما إزداد استقرار نواتج الكلونة . وفي حالة وجود اختلاف كبير في عدد هذه النيوكليوتيدات في أطراف قطع الحامض النووي والناقل فأنه يتوجب استخدام أنزيم الكلينو Klenow fragments لأجل بناء الفراغات الناتجة عن هذا الاختلاف إضافة لاستخدام أنزيم اللحام . وعلى أية حال فأنه إذا كان عدد النيوكليوتيدات المرتبطة في المناطق المتكاملة 20 نيوكليوتيداً أو أكثر فأنه لاحاجه لاستخدام أنزيم البلمرة (الكلينو) ذلك لوجود استقرارية كافية في نواتج الهندسة تسمح بنقلها الى المضائف دون عمليات إضافية حيث ستقوم أنزيمات الخلايا المضيفة بتصليح الفراغات وإجراء اللحام لها طبيعياً .




**شكل3-8 : آلية استخدام التوصيلات Adaptors لخلق نهايات لزجة لقطعة حامض نووي DNA عمياء النهايات.**




**شكل 9-3:** آلية التذييل بالبوليمر المتجانس Homopolymer.

تعمل أنزيمات البلمرة على تصنيع سلاسل جديدة من الحامض النووي المتمم لقالب من الحامض النووي DNA أو RNA . وتعمل معظم أنزيمات البلمرة مستخدمة قالب مزدوج بحيث إن هناك منطقة تعمل كبادئة يبدأ منها تصنيع السلسلة الجديدة . من الناحية الخلوية فأن هناك عدة طرز من أنزيمات بلمرة الحامض النووي DNA أو RNA ومع ذلك فأن الهندسة الوراثية لا تحتاج جميع هذه الأنزيمات أنما تقتصر في الغالب على استخدام عدد محدود منها .

فقد تم تشخيص وعزل ثلاثة طرز من أنزيم بلمرة الحامض النووي DNA في كل من البكتيريا والأحياء حقيقية النوى . بينما تم عزل ثلاثة أنزيمات بلمرة للحامض النوويRNA في الأحياء حقيقية النوى ونوع واحد في الأحياء بدائية النوى مثل البكتيريا .

ومع ذلك فأن هناك أربعة أنزيمات من هذه تستخدم حالياً في مجال الهندسة الوراثية . ويعتبر أنزيم بلمرة الحامض النووي DNA الطراز الأول DNA PolymeraseI أو ما يدعى بأنزيم كورنبرج أول هذه الأنزيمات التي أستخدمت في الهندسة الوراثية . يعمل هذا الأنزيم الذي عزل من بكتيريا القولون E.coli على تمييز المناطق الصغيرة المفردة الشريط في الأشرطة المزدوجة للحامض النووي DNA والناتجة عن فقدان نيوكليوتيدات قليلة بحيث تؤدي إلى حصول فراغ بين جانبي أحد أشرطة مزدوج الحامض النووي . ويعمل هذا الأنزيم على البدء في بناء هذا الفراغ اعتباراً من النهاية الثالثة مستخدماً الشريط الآخر كقالب له . ونظراً لوجود نشاط هدم في هذا الأنزيم إضافة لنشاط البناء فأنه يقوم بهدم شريط الحامض النووي من الجانب الآخر وأستكمال بناء الشريط الجديد (الشكل 3-10 ) . أما مختبرياً فأن هذا الأنزيم يعمل على شريط مفرد للحامض النووي كقالب بوجود بادئة قصيرة ذات نهاية هيدروكسيلية إضافة الى النيوكليوتيدات وآيونات المغنيسيوم لتصنيع شريط ثان مكمل للقالب .

´5 A-T-G-C-T-G-G-G-T-C-A-C-G-T ´3
| | | | |          | | | | | |
´3 T-A-C-G-A          A-G-T-G-C-A-´5

إضافة انزيم بلمرة الحامض النووي DNA الأول Pol I وكذلك النيوكليوتيدات اللازمةdNTP .

أ- مرحلة بناء فراغ بأستخدام نشاط البناء .

A-T-G-C- T-G-G-G-T-C-A-C-G-T
| | | | | : : : | | | | | |
T-A-C-G-A-C-C-C-A-G-T-G-C-A

ب-مرحلة إزالة النيوكليوتيدات المجاورة اعتباراً من النهاية الخامسة باستخدام نشاط الهدم .

A-T-G-C-T-G-G-G-T-C-A-C-G-T
: : : | | | | | |
C-C-C-A-G-T-G-C-A

C- T - G- A- A-

جـ- مرحلة بناء الفراغ الناتج عن نشاط الهدم باستخدام نشاط البناء مرة أخرى .

A- T- G- C- T- G- G- G -T- C- A- C- G- T
| | | | | | | | | | | | | |
t- a- c- g- a- c- c- c -A- G- T- G- C- A

**(الشكل 3-10): نشاط البناء والهدم في أنزيم بلمرة الحامض النووي DNA PolymeraseI.ويلاحظ بأن الأنزيم استخدم الشريط الكامل كقالب واستخدام قطعة الشريط القصير كبادئة لأجل البناء اعتباراً من النهاية الثالثة. بينما أبتدأ نشاط الهدم من النهاية الخامسة**

يرجع نشاط البناء والهدم في هذا الأنزيم لوجود عدة تحت وحدات مؤلفة للأنزيم . كل واحدة من هذه التحت وحدات مؤلفة من سلاسل ببتيدية معينة ويختص قسم منها بنشاط البناء والآخر بنشاط الهدم فيما تقوم تحت وحدة أخرى بالسيطرة على هذه الأنشطة . ونظراً لتطور الإمكانات التكنولوجية فقد تم فصل الوحدة المسؤولة عن نشاط البناء في أنزيم البلمرة رقم I (DNAPoLI) عن بقية الوحدات . سميت هذه الوحدة بأنزيم قطع كلينو Klenow fragment . ويستخدم هذا الأنزيم على نطاق واسع في بناء أشرطة الحامض النووي DNA (الشكل3-11 ) .

أما الأنزيم الثالث المستخدم في الهندسة الوراثية فهو أنزيم الاستنساخ العكسي Reverse transcriptase المعزول من الرواشح المرتدة Retroviruses . يختلف هذا الأنزيم عن أنزيمات البلمرة السابقة في أنه يستخدم قالباً مؤلفاً من شريط حامض نووي RNA لبناء نسخة متممة له من شريط DNA ويستخدم هذا الأنزيم كثيراً في بناء ما يدعى بسلاسل الحامض النووي DNA المتمم DNA-Complementary Strands .

أما الأنزيم الرابع فهو أنزيم بلمرة الحامض النووي RNA الثاني المعزول من البكتيريا E.coli . ويمكن استخدامه في تصنيع نسخ mRNA لمورث معين أو مورثات معينة لأجل معرفة البروتين المشفر له .

قطعة حامض نووي DNA ذات فراغ

```
A-A-T-G-G-C-C-A-G-T-A
| | | | |     | | | |
T-T-A-C-C-    T-C-A-T
```

إضافة أنزيم قطع الكلينو ↓ dNTP + Klenow frament

القطعة بعد الاستصلاح

```
A-A-T-G-G-C-C-A-G-T-A
| | | | |     | | | |
T-T-A- C-C- g-g-T-C-A-T
```

**(شكل3-11): آلية استصلاح قطع الحامض النووي**DNA **باستخدام نشاط البناء فقط لأنزيم بلمرة الحامض النووي** DNA POL I

## أنزيمات تحوير الحامض النووي *DNA modifying enzymes*

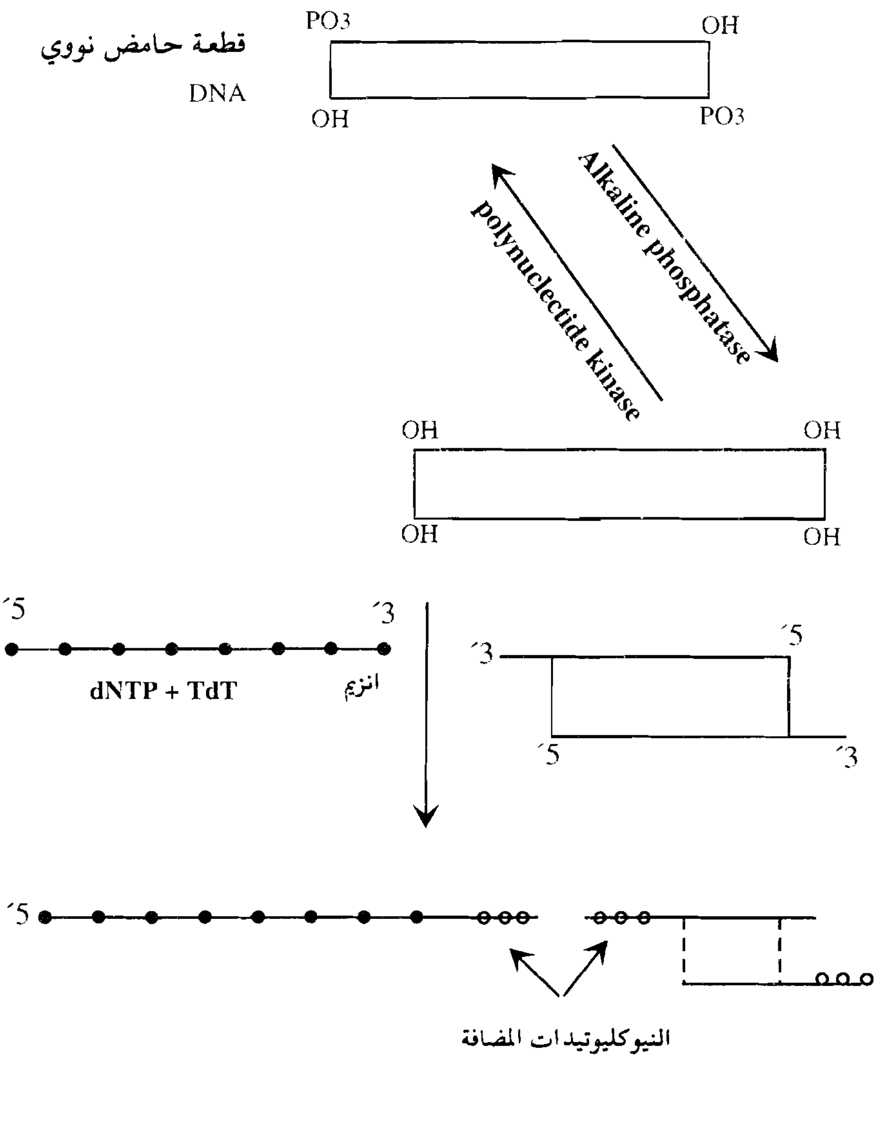
تتطلب بعض طرق الهندسة الوراثية تحويراً للحامض النووي المستخدم في الهندسة أو ناقله وذلك عن طريق إضافة أو حذف بعض المجاميع الكيميائية بواسطة الأنزيمات . وقد تم الحديث عن معظم هذه الأنزيمات خلال الفصول السابقة وخصوصاً فيما يتعلق بالمجسات أو تحوير النهايات العمياء . ويمكن أن نشير هنا إلى أهم هذه الأنزيمات وهو أنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase المعزول من بكتيريا القولون E.coli أو من أنسجة أمعاء الأبقار ويعمل هذه الأنزيم على إزالة مجموعة الفوسفات الموجودة في النهاية الخامسة لقطع الحامض النووي . وتساعد هذه الإزالة في تقليل احتمالية التصاق قطع الحامض النووي اللزجة مع بعضها بعد القطع بالأنزيمات المحددة .

أما أنزيم كاينز متعدد النيوكليوتيد Polynucleotide kinase فأن له قدرة إضافة مجموعة فوسفات للنهاية الخامسة من قطع الحامض النووي . وهو هنا يؤدي وظيفة معاكسة لأنزيم الفوسفاتيز القاعدي . أما الأنزيم الآخر المهم في عمليات التحوير فهو أنزيم الترانسفيريز النهائي أو الطرفي Terminal deoxynucleotidal transferase الذي يقوم بإضافة نيوكليوتيد أو أكثر للنهاية الهيدروكسيلية الثالثة لقطع الحامض النووي (الشكل 3-12) .

## أنزيمات إزالة الأنطباق *Topoisomerases*

وهي الأنزيمات التي تعمل على إزالة البرم من أنواع الحامض النووي DNA شديدة الانطباق Supercoiled . ونظراً إلى أن عمليات تضاعف هذا الحامض النووي أو تصنيعه تحتاج أولاً : لإزالة الانطباقات الشديدة لتسهيل عمل أنزيمات البلمرة لذلك فأنه يتطلب أولاً إزالة الانطباق من شريطي الحامض النوويDNA .ويتم ذلك بواسطة أنزيمات إزالة الأنطباق أو البرم . اكتشف نوعان من الأنزيمات التي لها علاقة بهذه العملية منذ العام 1971 سميت هذه بأنزيم التوبوايزميريز Topoisomerase I I والتوبوايزوميريز Topoisomerase II, II . تقوم هذه الأنزيمات بوظيفة قطع وغلق

مزدوج الحامض النووي مما يؤدي إلى إزالة الانطباقات الشديدة مؤدية إلى الحصول على حامض نووي مزدوج حلقي غير مبروم . تعمل هذه الأنزيمات على التخلص من الانطباقات من خلال كسر أواصر السكر - فوسفات المؤلفة للعمود الفقري لشريط واحد مفرد والتآصر مع النهايات المفتوحة في هذا الموقع والتحرك بعكس أتجاه البرم أو الالتفاف أو الانطباق حيث تنتهي العملية بإزالة البرم في هذا الموقع . ويقوم بهذه المهمة الأنزيم الأول فيما يقوم الأنزيم الثاني أو ما يدعى بالجايريز Gyrase بلحام نهايات الشريط مرة أخرى . ويذكر بأن هذه العملية تحصل في كل موقع يحتوي على برم أو أنطباق وعلى ذلك فأنه يتم كسر ولحام مناطق مختلفة من الحامض النووي لأجل إزالة البرم كلياً . وعلى الرغم من أهمية هذه الأنزيمات إلا أنه لا تستخدم حالياً إلا بحدود ضيقة في مجالات الهندسة الوراثية وذلك لأن الشركات العالمية تزود المختبرات بنواقل بلازميدية جاهزة للعمل .




(الشكل3-12) : آلية عمل بعض الأنزيمات المستخدمة في تحوير جزيئات الحامض النووي DNA

4

# استخلاص الأحماض النووية

**مقدمة**

**طرق فصل الأحماض النووية العامة**

-الفصل بالفينول: كلوروفورم: أيزوبروبانول

-الفصل بالطرد المركزي الفائق مع ملح كلوريد السيزيوم

-الفصل بالطرد المركزي الفائق مع قاعدة كيميائية

**طرق استخلاص الأحماض النووية**

-استخلاص الحامض النووي DNA من كريات الدم

-استخلاص الحامض DNA من النماذج النسيجية والزرع النسيجي

-استخلاص الحامض النوويDNA البكتيري

-استخلاص الحامض النووي البلازميدي

-استخلاص الحامض النووي المايتوكونديري

-استخلاص الحامض النووي من العاثيات

-الاستخلاص المحدود

-الاستخلاص الواسع

-استخلاص الحامض النووي DNA من الهلام

-استخلاص الحامض النووي الريبوزي المرسال mRNA

## مقدمة

إن عملية تحليل الحامض النووي تتطلب وجود نموذج نقي للحامض النووي لأجل الدراسة ومعرفة كل ما يتعلق به من معلومات . لذلك فأن عمليات الاستخلاص تعتبر إحدى الركائز المهمة في دراسة الأحماض النووية . استخلصت الأحماض النووية قبل فترة طويلة من معرفة أهميتها الوراثية . إذ كانت الاحماض النووية والبروتينات أنذاك قلب الأبحاث العلمية . فالنتائج التي سجلت حول تركيب الأحماض النووية والتي سبقت ظهور النموذج الثلاثي الأبعاد الذي وضعه واطسون وكريك عام 1953 بينت أن وجود نموذج نقي للحامض ضروري جداً للحصول على نتائج واضحة . وعلى سبيل المثال فأن التركيب الذي حصلت عليه روزالين من خلال تحليل بلوره حامض نووي بأشعة أكس اعتمد أساساً على نموذج حامض نووي نقي استخلص من الخلايا . لهذا فأن الاستخلاص النقي للأحماض النووية يعتبر أساسياً في عملية التحليل الكيميائي والوراثي . ونظراً لاختلاف مصادر الأحماض النووية فقد تنوعت طرق الاستخلاص وسنأتي في هذا الفصل على ذكر معظم طرق الاستخلاص المعمول بها في المختبرات العالمية . ونظراً لأن عملية استخلاص الأحماض النووية تتطلب تنمية بعض الأحياء مثل البكتيريا والعاثيات والخلايا النسيجية لذلك فأنه سنتطرق لطرق تنمية هذه الأحياء لضرورتها في العمل أثناء الحديث عن الاستخلاص .

## الطرق العامة لفصل الأحماض النووية

### أولاً: طريقة الفينول: كلوروفورم: أيزو أميل:

تعتمد هذه الطريقة على قدرة الفينول والكلوروفورم على مسخ البروتينات الموجودة في النموذج وعزلها عن الأحماض النووية . كما أن لها القدرة على تثبيط عمل الأنزيمات المحطمة للحامض النووي DNA وكذلك تثبيط البروتينات وبالتالي الحفاظ على الأحماض النووية من التدمير . ويزيد الايزوبروبانول من كفاءة الكلوروفورم في التخلص من البروتينات .

إن الفينول السائل المجهز من قبل الشركات العالمية يحتوي على العديد من المعادن الثقيلة والشوائب والتي من الممكن أن تتآصر مع الأحماض النووية وخصوصاً الحامض النووي DNA مما يعرقل عمل العديد من الأنزيمات التي من الممكن استخدامها فيما بعد . إضافة إلى ذلك فأن للفينول قدرة كبيرة على الإشباع بالماء . لذلك فأنه لابد من إجراء عملية غسيل لسائل الفينول قبل استخدامه . تتم هذه العملية في كابينة كيميائية هود (Hood) وذلك بوضع قنينة الفينول في حمام مائي بدرجة حرارة 65 مْ لمدة ساعة قبل إجراء الغسيل وإضافة 0.1 من مادة 8-Hydroxy quinoline . تعمل هذه المادة على تلوين الفينول باللون الأصفر إضافة إلى قدرتها الكبيرة على التآصر مع المعادن الثقيلة الموجودة في الفينول ويتم التخلص منها عند إجراء عملية الغسيل . يستخدم محلول STE في عملية الغسيل وهو محلول ملحي ضعيف (STE:0.1 M Nacl,0.05M Tris-Hcl,0.01M EDTA PH.8.0) يضاف 50 سم3 من محلول الغسيل STE لكل100سم3 فينول ويمزج جيداً بواسطة الخلط بواسطة ماصةPipet زجاجية ويترك لدقيقتين حتى انفصال طبقة الغسيل عن الفينول (طبقة الغسيل علوية دائماً) حيث تصبح طبقة الغسيل بيضاء عكرة تمزج هذه الطبقة مرة أخرى وتترك الطبقات لتنفصل مرة ثانية وتعاد عملية الخلط أو المزج لمرة ثالثة تزال بعدها طبقة الغسيل ويضاف 50 سم3 من محلول الغسيل الى قنينة الفينول (على اعتبار أن قنينة الفينول تحتوي على 100 سم3 فينول) وتعاد عملية الغسيل كما سبق لعدة مرات حتى تصبح طبقة محلول الغسيل رائقة تماماً ، عندها تغطى طبقة الفينول بطبقة من محلول الغسيل لمنع تأكسد الفينول مع الهواء ويحفظ الفينول في قنانٍ صغيرة معتمة(20-40سم3) ويخزن بدرجة حرارة 20 - م . لأجل استخلاص وفصل الحامض النووي DNA يخلط حجم مساوٍ من الفينول مع محلول الخلايا المحطمة في أنبوبة زجاجية صلبة ومعقمة (أنبوبة الطرد المركزي) . يمزج المحلول جيداً وبهدوء عن طريق غلق الأنبوبة بواسطه ورق برافين أو قطعة مطاط و تقليبها إلى الأعلى والأسفل بهدوء لعدة مرات حتى امتزاج المحلول جيداً .

توضع الأنبوبة في حمام مائي بدرجة حرارة 65مْ لدقيقتين أوثلاث تعاد عملية المزج مرة أخرى وهكذا لثلاث أو أربع مرات . تفصل بعدها طبقة الحامض النووي

DNA عن طريق الطرد المركزي بقوة 5000 دورة في الدقيقة لمدة خمس دقائق . ينفصل المحلول بعدها إلى ثلاث طبقات علوية تمثل الحامض النووي DNA وسفلية تمثل طبقة الفينول . بينما يتكتل البروتين كطبقة سميكة بيضاء اللون لزجة بينهما .

إن محلول الحامض النووي DNA يكون لزجاً في هذه المرحلة (خصوصاً DNA الأحياء حقيقية النوى لضخامته) لذلك يتوجب فصل طبقة الحامض النووي العلوية بواسطة ماصة باستور معقمة وبحذر شديد لأجل عدم سحب طبقة البروتين معها . ينقل سائل الحامض النووي DNA إلى أنبوبة نظيفة معقمة ثانية ويضاف حجم مساوٍ من الكلوروفورم : أيزواميل بنسبة 1:24 ويمزج جيداً كما سبق وتفصل طبقة الحامض النووي DNA بواسطه الطرد المركزي . تفصل طبقة الحامض النووي وتنقل إلى أنبوبة ثالثة ويضاف حجم مساوٍ من الكلورفورم وتعاد عملية المزج مرة ثالثة وكما سبق . يفصل الحامض النوويDNA بعدها بواسطة الطرد المركزي . تنقل طبقة الحامض النووي بعدئذ إلى أنبوبة رابعة ويضاف 10 مايكروليتر من محلول ملح الطعام Nacl ذي عيارية 2.5M ويمزج المحلول جيداً ثم يضاف حجمان ونصف من كحول الايثانول المطلق المثلج (20--م) ويمزج المحلول بعد ذلك بهدوء شديد عن طريق التقليب الى الأسفل والأعلى حيث يظهر الحامض النووي DNA كخيوط بيضاء . تخزن بعد ذلك الأنبوبة بدرجة حرارة 20 -م لمدة ساعتين ثم يطرد المحلول مركزيا بقوة 5000-2000 دورة في الدقيقة لمدة خمس دقائق لأجل ترسيب جميع خيوط الحامض النووي . تزال طبقة الكحول من الأنبوبة ويجفف نموذج الحامض النووي بدرجة حرارة 37مْ ثم يذاب بواسطة 200 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم أو محلول (0.01MTris.cl,0.5mEDTA.PH7.0)TE وينقل المحلول إلى أنبوبة صغيرة الحجم ويخزن بدرجة حرارة 20-م حتى استخدامه . تؤدي إضافة محلول ملح الطعام إلى زيادة كفاءة الكحول في سحب الماء من الحامض النووي .كما يمكن استخدام كحول الايزوبروبانول بدلاً من الايثانول المطلق في ترسيب الحامض النووي ويضاف بنسبة مساوية لحجم محلول الحامض النووي (الشكل 4-1 ) .

**ثانياً: طريقة الطرد المركزي الفائق مع ملح كلوريد السيزيوم**

يعتبر الطرد المركزي الفائق Ultracentrifugation من الطرق الشائعة الاستخدام في فصل الجزيئات العضوية والبايولوجية . يتعرض الجسيم المتحرك أثناء الطرد المركزي في دائرة نصف قطرها (r) عند سرعة زاوية قدرها (w) الى مجال طرد خارجي يساوي $w^2r$ وتساوي القوة الطاردة المركزية Fc على هذا الجسيم حاصل ضرب كتلته $m^-$ في مجال الطرد :

$$Fc= m^- W^2r= m\ (1-V^-P)\ W^2r$$

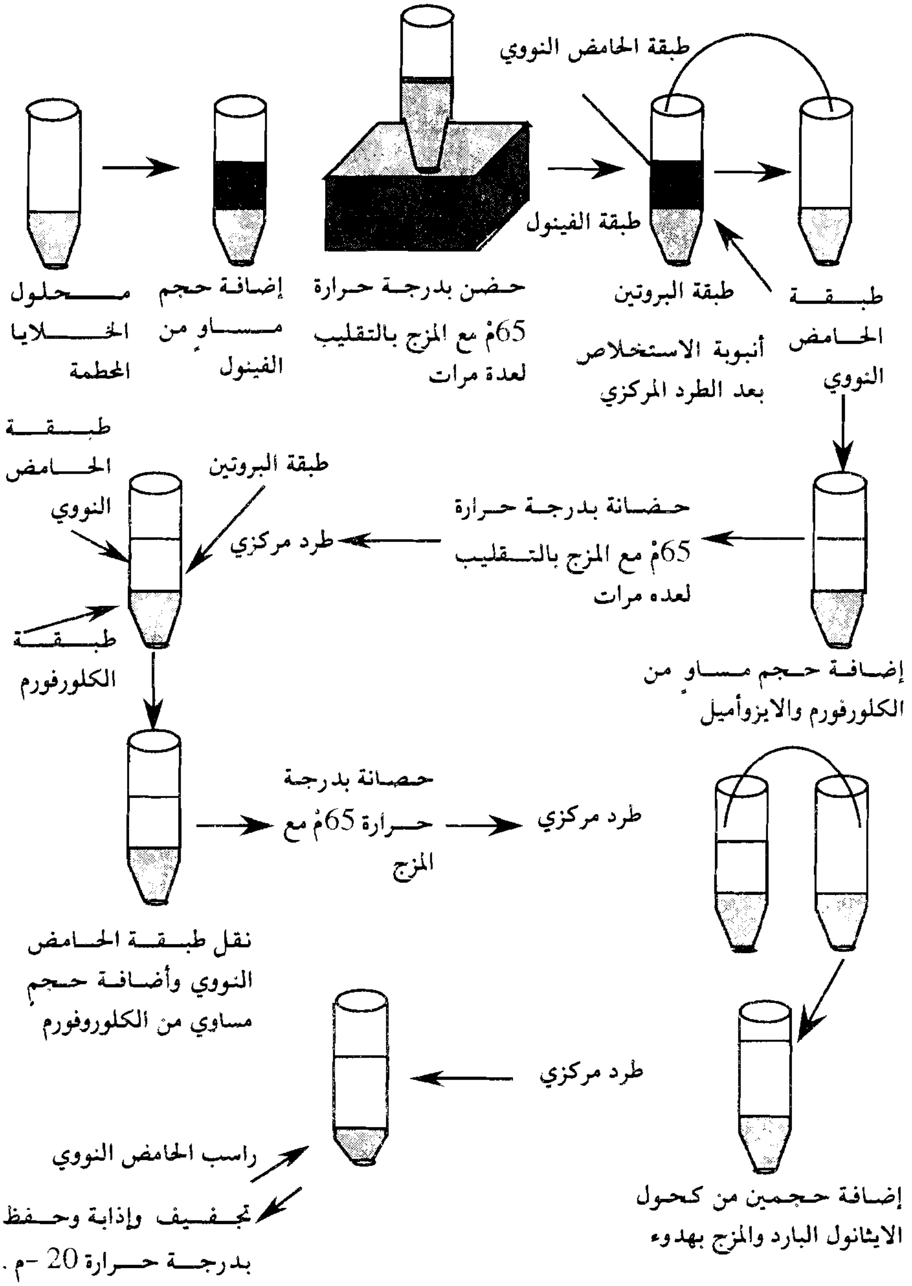
والكتلة $m^-$ أقل من الكتلة m لأن السائل المزاح يبذل قوة معاكسة ويساوي هذا $(1-V^-P)$ حيث $V^-$ هي الحجم الجزئي النوعي للجسيم و P هي كثافة المحلول .

ويتحرك الجسيم في هذا المجال بسرعة ثابتة V عندما تساوي $Vf = Fc$ حيث إن f هو معامل احتكاك الجسيم . لذلك فأن سرعة ترسيب هذا الجسيم تساوي

$$V = \frac{Fc}{f} = \frac{m\ (1-V^-P)W^2r}{f}$$

ويلاحظ من ذلك بأن سرعة الترسيب تتناسب طردياً مع شدة مجال الطرد المركزي .

وتأتي أهمية هذه الطريقة في فصل الحامض النووي من أنها توفر مدرج كثافة عن طريق انتشار جزيئات كلوريد السيزيوم بكثافات مختلفة على طول الانبوبة أثناء عملية الطرد المركزي الفائق .

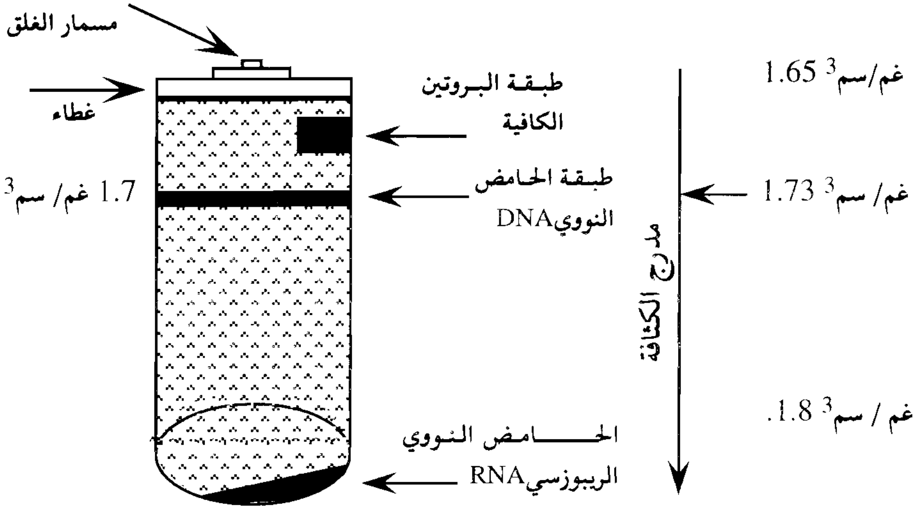



**(الشكل4-1) : تخطيط لطريقة فصل الحامض النووي بواسطة الفينول والكلوروفورم والايزواميل.**

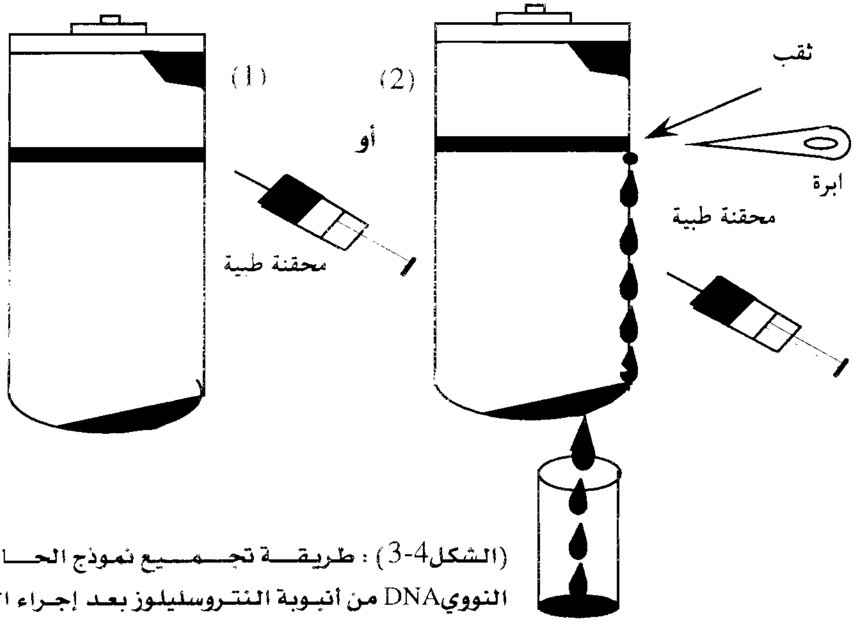
يتم في هذه الطريقة مزج محلول الخلايا المتحطمة مع 5.6 مولاري من ملح كلوريد السيزيوم CsCl (لأجل توفير كثافة قدرها 1.7غم/سم3) حتى ذوبان جميع الملح . وتستخدم لذلك أنبوبة نايتروسليلوز معاملة بمحلول EDTA . يضاف 100 مايكروليتر من الأثيديوم برومايد 10ملغم/سم3 ويتم التخلص من الهواء المتبقي في الأنبوبة عن طريق إضافة البرافين السائل المعقم . تغلق الأنبوبة جيداً وبصورة محكمة ويراعى التخلص تماماً من جميع الفقاعات الهوائية مهما كانت صغيرة عن طريق إضافةالبرافين بواسطة ماصة باستور والضغط الخفيف على الأنبوبة .

إن وجود الفقاعات الهوائية سيؤدي إلى تبعثر طبقة الحامض النووي عند إجراء الطرد المركزي لذلك يتوجب التخلص منها نهائياً . تطرد الأنبوبة بعد ذلك مركزياً بصوره فائقة في جهاز الطرد المركزي الفائق السرعة بقوة 48,000 دورة في الدقيقة لمدة 48 ساعة . تتحرك أيونات السيزيوم $Cs^{+}$ أثناء عملية الطرد المركزي تدريجياً باتجاه القعر وترافق هذه الحركة مع الانتشار أو الحركة العشوائية للجزيئات مما يعيق الترسب الكلي لأيونات السيزيوم . وبعد حوالي48 ساعة فأن عملية ترسب الأيونات وانتشار الجزيئات تتوازن في المحلول ولاتحدث بعد ذلك أية حركة انتقال للأيونات باتجاه القعر ويؤدي ذلك الى حصول على مدرج من تراكيز أيونات السيزيوم ابتداء من القعر الأكثر تركيزاً 1.8 غم/سم باتجاه السطح الاقل تركيزاً 1.65 غم /سم . إن الحامض النوويDNA يتحرك أيضاً باتجاه الأعلى والأسفل تماماً كما تفعل أيونات السيزيوم حتى يستقر عند مستوى معين يتناسب مع كثافته .

وحيث إن كثافة الحامض النووي DNA تماثل كثافة أيونات السيزيوم عند تركيز 5.6 مولاري والتي تساوي 1.7 غم/ سم$^{3}$ لذلك فأن الحامض النووي DNA سيتجمع عند كثافة 1.7 غم/سم$^{3}$ ويمكن رؤية حلقة الحامض النووي في أنبوبة الطرد المركزي بعد الانتهاء وذلك بتعريض الأنبوبة للأشعة فوق البنفسجية حيث يظهر كطبقة حمراء لماعة بسبب تأصر بروميد الأثيديوم معه . كما يمكن مشاهدة البروتينات كطبقة طافية بينما يترسب الحامض النووي RNA في قعر الأنبوبة (الشكل4-2) .




(الشكل4-2) : أنبوبة النتروسليلوز بعد إجراء الطرد المركزي الفائق مع ملح كلوريد السيزيوم 5.6 مولاري ويلاحظ بأن حلقة الحامض النوويDNA تقع في نفس موقع كثافة كلوريد السيزيوم المستخدم




(الشكل4-3) : طريقة تجميع نموذج الحامض النوويDNA من أنبوبة النتروسليلوز بعد إجراء الطرد المركزي الفائق بوجود كلوريد السيزيوم

يتم سحب طبقة الحامض النووي DNA من أنبوبة الطرد باستخدام حقنة طبية حيث يتم غرز الأبرة تحت حلقة الحامض النووي مباشرة ثم تسحب الطبقة بعد ذلك . كما يمكن ثقب أنبوبة الطرد تحت حلقة الحامض النووي وتجميع المحلول النازل في قنانٍ صغيرة (الشكل4-3 ) .

إن طبقة الحامض النووي DNA المعزولة تحتوي على كمية كبيرة من كلوريد السيزيوم وكذلك أثيديوم برومايد لذلك فأنه يجب التخلص من هذه المواد قبل ترسيب الحامض النووي . يتم تخليص الحامض النووي من الأملاح عن طريق غلق الأنبوبة أو الأنابيب الحاوية على محلوله بطبقة من غشاء شبه نفاذ أو وضع محلول الحامض النووي في كيس شبه نفاذ مغلق بأحكام .يوضع الكيس أو الانابيب في محلول ملحي ضعيف مثل محلول TE الذي ذكر سابقاً وتترك النماذج لمدة 24ساعة بدرجة حرارة 4مْ ويراعى استبدال المحلول ثلاث أو أربع مرات خلال هذه الفترة حيث تخرج أيونات الملح نحو محلول TE بسبب الاختلاف في التركيز وباستبدال محلول TE عدة مرات فأنه سيتم التخلص كلياً من هذا الملح . ولأجل التخلص من مادة الاثيديوم برومايد المتآصرة مع الحامض النووي يضاف كحول البيوتانولButanol إلى محلول الحامض النووي ويمزج جيداً حيث يتلون الكحول باللون الأحمر وبإزالة الكحول وباستبداله بكمية أخرى لعدة مرات فأنه سيتم التخلص كلياً من الاثيديوم برومايد حيث تكون آخر طبقة للكحول رائقة عديمة اللون .

يتم ترسيب الحامض النووي DNA بعد ذلك بواسطة كحول الايثانول المطلق البارد أو الايزوبانول كما سبق الحديث عنه . يجفف الحامض النووي ويذاب بكمية من محلول TE ويحفظ في درجة حرارة 20-مْ حتى استخدامه .

تعتبر طريقة الطرد المركزي الفائق مع ملح كلوريد السيزيوم من أفضل الطرق العامة المستخدمة في فصل الحامض النووي لأنها توفر نموذجاً نقياً وخالياً من الشوائب . تستخدم هذه الطريقة بشكل واسع في فصل البلازميدات المغلقة والمفتوحة حيث إن الاثيديوم برومايد يرتبط بكفاءة عالية مع البلازميدات المفتوحة مقارنة مع الارتباط المحدود مع البلازميدات المغلقة ويؤدي ذلك إلى الاختلاف في كثافتيهما

حيث تصبح البلازميدات المفتوحة الحلقة أكثر كثافة من البلازميدات المغلقة . لذلك تنفصل طبقة البلازميدات المغلقة كطبقة علوية تليها طبقة البلازميدات المفتوحة الأكثر كثافة .

كما تستخدم هذه الطريقة في تنقية جميع نماذج الأحماض النووية المستخلصة بالطرق الأخرى . كما يمكن استخدامها في فصل الأحماض النووية للعاثيات والرواشح وغيرها .

**ثالثاً: طريقة الطرد المركزي الفائق مع قاعدة كيميائية**

تستخدم هذه الطريقة لفصل الجزيئات الصغيرة من الحامض النووي DNA مثل جزيئات البلازميدات والعاثيات والرواشح عن الجزيئات الكبيرة من الحامض النووي DNA البكتيري أو غيره . يتم في هذه الطريقة استخدام اس هيدروجيني (PH) عالٍ يتراوح بين11-12 باستخدام هيدروكسيد الصوديوم حيث يؤدي هذا الاس العالي إلى فصل أشرطة الحامض النووي المزدوجة إلى أشرطة مفردة الشريط وعند تخفيض الاس الهيدروجيني بإضافة خلات الصوديوم الحامضية Acetic Sodum acetate فأنه يتم ارتباط الأشرطة المفردة مرة أخرى ونظراً لتعقد الجزيئات الكبيرة من الحامض النووي فأنها في هذه المرحلة ستعمل على تكوين شبكة معقدة بيضاء اللون ويتداخل البروتين الممسوخ أصلاً نتيجة معاملة محلول الخلايا المحطمة بمحلول SDS مع هذه الشبكة . وفي هذه المرحلة يمكن إجراء الطرد المركزي الفائق بسرعة 48.000 دورة في الدقيقه لمدة ساعة حيث يترسب الحامض النووي الصبغي والبروتين والحامض النووي RNA في قعر الأنبوبة تاركاً الحامض النووي البلازميدي أو العاثي أو الراشحي أو المايتوكونديري في المحلول الرائق وباستخدام الايثانول المثلج أو الايزوبروبانول فأنه يتم ترسيب الحامض النووي . يجفف بعد ذلك ويذاب بكمية مناسبة من محلول TE أو الماء المقطر المعقم ويحفظ بدرجة حرارة 20 -م .

وبالإضافة إلى الطرق السابقة فإن هناك طرقاً أخرى مثل الطرد المركزي بوجود تراكيز مختلفة من السكروز إلا أنه أكثر استخداماً لفصل البروتينات مما هو لفصل الأحماض النووية .

## طرق استخلاص الأحماض النووية من الخلايا والانسجة

نظراً لاختلاف النموذج المراد استخلاص الحامض النووي منه فأن هناك طرقاً عديدة للوصول إلى هذا الهدف وتشترك جميعها في التخلص من البروتينات والشوائب الأخرى . وفيما يلي نورد أهم طرق الاستخلاص .

### أولاً: استخلاص الحامض النووي *DNA* من كريات الدم

يجمع نموذج الدم المراد استخلاص الحامض النووي DNA منه في أنبوبة تحتوي على مضاد التجلط مثل EDTA أو محلول سترات الصوديوم أو غيره ويفصل مصل الدم عن الخلايا عن طريق الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة في الدقيق| لمدة خمس دقائق . يتم التخلص من الراشح وتعاد إذابة الخلايا المترسبة بواسطة كمية مناسبة من المحلول الفسلجي (0.9 غرامNacl /100 سم$^3$ ماء مقطر) لإزالة بقايا المصل ويعاد الطرد المركزي ليتم التخلص من الطبقة الرائقة . يضاف 2-3سم$^3$ من الماء المقطر إلى الخلايا وتمزج جيداً بواسطة عمود زجاجي نظيف حيث يقوم الماء المقطر بتحطيم جدران خلايا الدم الحمراء وتدميرها ليتم التخلص منها لعدم فائدتها في الاستخلاص (عدم وجود نوى فيها) .

يطرد المحلول مركزيا كما سبق ويتم التخلص من الطبقة المائية الحمراء العلوية التي تمثل محلول كريات الدم الحمراء المتحللة . تغسل الكريات المتبقية بالمحلول الفسلجي لعدة مرات مع الطرد المركزي .

يضاف للخلايا المترسبة في الدوره الأخيرة من الطرد المركزي السابق 0.5-2سم$^3$ من محلول تحليل الخلايا (PH7.0-0.05 M Tris-cl.% 0.5 SDS.0.1 M Nacl.) Lytic solution (0.001 M EDTA الذي يعمل على تحليل جدران الخلايا الدموية البيضاء وإطلاق موادها . يحتوي المحلول المحلل على مادة سلفات دودوسيل الصوديوم SDS التي تعمل على تحليل جدران النوى وإطلاق المادة الوراثية وكذلك تعمل على تكثيف البروتينات . يتم تحطيم البروتينات هذه بإضافة أنزيم البروتينيز (Proteinase K) إلى المحلول كما يضاف أنزيم الارانيز RNase A للتخلص من الحامض النووي

RNA . وبعد مزج المحلول جيداً بواسطة عمود زجاجي يتم تفريغه في أنبوبة زجاجية صلدة (أنبوبة الطرد المركزي) ويتم فصل الحامض النووي DNA باحدى طرق الفصل العام [التي تم الحديث عنها في مقدمة الفصل] .

**ثانياً: استخلاص الحامض النووي *DNA* من النماذج النسيجية أو الزرع النسيجي**

يؤخذ نموذج النسيج المطلوب استخدامه ويعامل بالفورمالين لتعقيمه ويقطع إلى أجزاء صغيرة جداً بواسطة سكين حادة جداً ومعقمة داخل طبق زجاجي معقم ونظيف . تنقل الأجزاء النسيجية الصغيرة بعد ذلك الى مجانس فائق السرعة Motor Homogenizer مع كمية من محلول (MSB-EDTA .0.21M Mannitol, 0.07 M Sucrose, 0.05 M Tris-cl PH 8.0 ,0.01 M EDTA) وتفتت الأجزاء إلى خلايا بواسطة المجانس لمدة دقيقتين . ترسب الخلايا بواسطة الطرد المركزي بقوة 5000 دورة في الدقيقة لمدة خمس دقائق ويتم التخلص من الراشح . تغسل الخلايا لعدة مرات بواسطة المحلول الفسلجي والطرد المركزي . كما يمكن تفتيت الأجزاء النسيجية إلى خلايا بطريقة ثانية وهي معاملة الأجزاء بأنزيم التربسين بتركيز 0.25٪ حيث يقوم الانزيم بتفتيت النسيج إلى خلايا مفردة بعد تركه مع الأجزاء النسيجية لفترة دقيقتين أو خمس دقائق .

ولا تحتاج خلايا الزرع النسيجي إلى هذه المعاملات التي تحدثنا عنها الآن وكل ما يراد هو تجميع الخلايا الزرعية من وعاء التنمية بواسطة قاشطة زجاجية في أنبوبة زجاجية معقمة وطردها مركزياً لأجل التخلص من المواد الغذائية . كما يمكن معاملة النسيج الزرعي مع أنزيم التربسين لعدة ثوانٍ قبل القشط . تغسل الخلايا لعدة مرات بالمحلول الفسلجي مع الطرد المركزي ثم تنقل الخلايا الى جهاز تحطيم الخلايا . هناك نوعان من أجهزة تحطيم الخلايا الأول يدعى بالمجانس الزجاجي Pestıl glass Homogenizer تلحق به ذراعان الأولى موسومة بالحرف A والثانية موسومة بالحرفB . يقوم هذا المجانس بتحطيم جدران الخلايا عن طريق تسليط ضغط كبير عليها . يوضع نموذج محلول الخلايا في أسطوانة المجانس الزجاجي مع قليل من محلول :MSB-EDTA ثم يستخدم الذراع A أولاً وتضغط لعدة مرات بشدة وبحذر

وبصورة عمودية ويعاد تسليط الضغط بواسطة الذراعA لعدة مرات لـ (10-20 مرة تقريباً) وتستبدل الذراعA بالذراع B ويعاد تسليط الضغط مرة أخرى . إن قطر أسطوانة المجانس الزجاجي أكبر بأجزاء من المليمتر من قطر النهاية الكروية للذراع A وB لذلك فأن الضغط المسلط على الخلايا كبير جداً ويكفي لتحطيم الخلايا وإطلاق محتوياتها السايتوبلازمية إلى المحلول .

كما يمكن استخدام المجانس المعدني Metal Homogenizer مع النتروجين السائل . يوضع محلول الخلايا في المجانس المعدني المبرد مقدماً وتضاف كمية من النتروجين السائل ويغلق المجانس بواسطة الغطاء غلقاً محكماً ثم يدور المجانس كهربائياً لدقيقة أو دقيقتين يضاف بعدها مزيد من النتروجين السائل ويعاد تدوير الجهاز لفترة أخرى . يعمل النتروجين السائل على تجميد محلول الخلايا بينما تعمل الأسنان الداخلية للمجانس المعدني أثناء التدوير على تهشيم الخلايا المجمدة وتحويل المحلول برمته إلى مسحوق يجمع محلول الخلايا المهشمة بواسطة عمود معدني نظيف في أنبوبة طرد مركزي زجاجية وتترك في درجة حرارة الغرفة لفترة وجيزة حتى ذوبان المحلول ثم يطرد المحلول مركزياً بقوة 2500 دورة في الدقيقة لمدة خمس دقائق حيث تترسب نوى الخلايا وبقايا جدران الخلايا في أسفل الانبوبة فيما تبقى المحتويات السايتوبلازمية الأخرى في المحلول الرائق . تزال الطبقة الرائقة ويذاب راسب النوى باضافة 3سم$^3$ من محلول TE و 200 مايكروليتر من محلول SDS(20%) ويمزج جيداً بواسطة عمود زجاجي حيث يصبح المحلول في هذه المرحلة لزجاً للغاية يضاف 10 مايكروليترات من محلول أنزيم البروتينيز K (تركيز5 غم / 250سم$^3$ TE) وخمسة مايكروليترات من محلول أنزيم RNase A (تركيز 10 ملغم / 100سم$^3$ ماء مقطر معقم) تمزج جيداً مع المحلول ويتم فصل الحامض النووي DNA بعد ذلك بإحدى طرق الفصل العامة التي تم الحديث عنها في مقدمة هذا الفصل . ويذكر أنه يمكن استخدام هذه الطريقة أيضاً في استخلاص الحامض النووي من الحيوانات المنوية .

## ثالثاً: استخلاص الحامض النووي *DNA* البكتيري

تنمى البكتيريا المطلوب استخدامها في الاستخلاص في وسط زرعي سائل مناسب وتحضن بدرجة حرارة 37مْ في حاضنة هزازة بدرجة هز 180 دورة في الدقيقة لمدة 24 ساعة . يجمع محلول الخلايا في أنابيب طرد مركزي وترسب البكتيريا عن طريق الطرد المركزي بقوة 4000 دورة في الدقيقة لمدة خمس دقائق . تزال الطبقة السائلة العلوية من الأنابيب وتغسل البكتيريا المترسبة عدة مرات بالمحلول الفسلجي للتخلص من المواد العالقة بها ويتم ترسيب البكتيريا في كل مرة بالطرد المركزي . تجمع البكتيريا بعد آخر محاولة للغسل وتذاب في2-5 سم$^3$ -5سم$^3$ من محلول STE (ذكر تركيبه سابقاً) ويضاف200-500 مايكروليتر من محلول SDS 10% ويمزج جيداً حيث يعمل على تدمير أغشية الخلايا البكتيرية وإطلاق المادة الوراثية وكذلك تكثيف البروتينات . كما يمكن إضافة أنزيمات البروتينيزK والارانيز A في هذه المرحلة ثم يفصل الحامض النووي بإحدى طرق الفصل التي تم الحديث عنها .

## رابعاً: استخلاص الحامض النووي البلازميدي

تنمى البكتيريا الحاوية على البلازميد المطلوب عزله في وسط زرعي مناسب سائل وتحضن بدرجة حرارة 37مْ في حاضنة هزازة بدرجة هز 180 دورة في الدقيقة لمدة 24ساعة ويضاف المضاد الحيوي الكلورومفينكول الى الوسط الزرعي لأجل زيادة نسخ البلازميدات في الخلايا حيث يعمل هذا المضاد الحيوي على تثبيط البروتنيات الضرورية لتضاعف الحامض النووي البكتيري بينما لا تتأثر البلازميدات . يبرد محلول الخلايا بعد ذلك بوضعه في الثلاجة لمدة نصف ساعة ويؤخذ منه 5 سم$^3$ وتوضع في أنبوبة معقمة مع 5 سم$^3$ من الوسط الغذائي السائل الجديد وتحضن البكتيريا مرة أخرى بنفس الظروف السابقة لفترة من الزمن حتى وصولها الى مرحلة تضاعف الحامض النووي DNA (مرحلة S-Phase) . ويذكر أن زمن أو فترة وصول البكتيريا إلى هذه المرحلة يختلف من نوع بكتيريا إلى آخر لذلك فأنه من الأفضل أخذ نموذج من الخلايا بعد كل 5 دقائق وقراءة كثافته الضوئية Optical density عند

درجة 550 أنكستروماً وعند وصول الكثافة الضوئية لقيمة 0.5 عند درجة 550 انكستروماً تكون عندها الخلايا في مرحلة-S . يتم وضع نموذج الخلايا عندها في الثلج لعدة دقائق لايقاف الخلايا في هذه المرحلة ثم تطرد مركزياً بقوة 4000 دورة في الدقيقة لخمس دقائق . تزال الطبقة الرائقة وتغسل الخلايا لعدة مرات بالمحلول الفسلجي المثلج مع الطرد المركزي . يذاب راسب الخلايا بعد ذلك بإضافة 2-5سم$^3$ من محلول STE ويضاف 200-500 مايكروليتر من المحلول المحلل (0.2N NaoH, 1SDS%) يحضر المحلول قبل عدة دقائق من استخدامه) . يمزج المحلول جيداً حيث تساهم القلوية العالية بوجود محلول SDS على تكثيف البروتينات والحامض النووي البكتيري الذي يظهر عندئذٍ كطبقة بيضاء لزجة جداً بينما تبقى البلازميدات في المحلول الرائق .

يضاف بعد ذلك أنزيم RNase A بتركيز 1 مايكروغرام/لتر لأجل التخلص من الحامض النووي RNA . يوضع المزيج في الثلج ويضاف إليه خلات الصوديوم NaAc (PH 4.8,0.3M Sodium acetate) لأجل خفض الاس الهيدروجيني وتكثيف الحامض النووي DNA البكتيري ويبقى المزيج في الثلج لفترة نصف ساعة تترسب خلاله البروتينات والحامض النووي البكتيري . يطرد المزيج مركزيا بقوة 5000 دورة في الدقيقة لعشر دقائق حيث يتم الحصول على رائق يحتوي على البلازميدات . ينقل الرائق إلى أنبوبة زجاجية نظيفة ويفصل الحامض النووي البلازميدي بإحدى طرق الفصل العامة السابقة .

## خامساً: استخلاص الحامض النووي المايتوكونديري

نظراً لاختلاف الأوزان الجزيئية للعضيات السايتوبلازمية لذلك فأن عملية الطرد المركزي بسرع مختلفة كفيلة بفصل هذه العضيات والحصول عليها بصوره شبه نقية . يتم إتباع نفس الطريقة المستخدمة في استخلاص الحامض النووي DNA من الأنسجة أو الخلايا الزرعية لأجل استخلاص الحامض النووي المايتوكونديري والفرق الوحيد هو في قوة الطرد المركزي المستخدمة بعد استخدام المجانس الزجاجي أو

المعدني حيث تترسب المايتوكوندريا عند قوة 4000 دورة في الدقيقة بدلاً من 2500 دورة في الدقيقة المستخدمة لترسيب النوى وتستكمل الطريقة الى النهاية للحصول على الحامض النووي المايتوكونديري .

## سادساً: استخلاص الحامض النووي من العاثيات

### أ) الاستخلاص المحدود

وفيه يتم الحصول على كمية قليلة من الحامض النووي العاثي تكفي لإجراء بعض التحاليل ويلجأ إلى هذه الطريقة لأجل السرعة والسهولة في الحصول على النماذج . تنمى البكتيريا المضيفة للعاثيات المطلوب عزل حامضها النووي في وسط زرعي سائل مناسب بدرجة حرارة 37مْ في حاضنة هزازة بقوة 180 دورة في الدقيقة لمدة 24ساعة . يؤخذ 1سم$^{3}$ من محلول الخلايا البكتيرية ويضاف إلى 50 سم$^{3}$ من الوسط الزرعي السائل الجديد في أنبوبة مستقلة ويحضن في الحاضنة الهزازة حتى وصول كثافة البكتيريا إلى 10 خلية /سم$^{3}$ ويتم مراقبة ذلك بواسطة قياس الكثافة الضوئية أو باستخدام جهاز الهيموسايتوميتر لعد البكتيريا في حجم معين من السائل الزرعي . يتم تحضير سلسلة من تخفيفات العاثيات تتراوح بين $10^{-10}-10^{-4}$ وذلك باستخدام الوسط الزرعي السائل في تحضير هذه التخافيف .

يؤخذ 200 مايكروليتر من كل تخفيف من العاثيات ويمزج مع 1سم$^{3}$ من محلول الخلايا البكتيرية في أنابيب زجاجية تحضن الأنابيب التي تحتوي على مزيج البكتيريا والعاثيات بدرجة حرارة 37 مْ لمدة نصف ساعة لإتاحة الفرصة للعاثيات لأجل إصابة البكتيريا . يضاف 1 سم$^{3}$ من الوسط الغذائي نصف الصلب Semisolid medium الدافئ الى كل أنبوبة ويمزج ويصب فوراً فوق سطح وسط غذائي صلب بصورة مستقلة وتوضع علامات على سطح أطباق الأوساط الغذائية الصلبة لمعرفة التخفيفات . تترك الأوساط الغذائية لمدة نصف ساعة حتى يتصلب سطحها تنقل بعدها إلى حاضنة بدرجة حرارة 37مْ وتحضن لفترة 24-48 ساعة . تفحص الأطباق الزرعية ويتم اختيار الأطباق التي امتلأت بالعاثيات حيث تظهر

المستعمرات البكتيرية فيها متحللة ولا تبقى سوى آثارها بينما تظهر مستعمرات العاثيات كدوائر رائقة شفافة ممتصة داخل الوسط الغذائي . يضاف إلى كل طبق من هذه الأطباق 5سم$^3$ المحلول المعقمSM (5,8 غم ملح 2,Nacl غم 50,Mg SO4 سم$^3$ Tris -cl 2% جيلاتين تذاب في لتر من الماء المقطر وتعقم في جهاز التعقيم بالبخار والضغط) تترك الأطباق لفترة 3-4 ساعات حيث تنتشر العاثيات من الوسط الغذائي الى محلول SM يتم بعدها تجميع المحلول في قنينة واحدة .

تضاف للقنينة مادة جلايكول متعدد الاثيلين Polyethylen glycol PEG بتركيز 5 ملغرام لكل150سم$^3$ من المحلول وكذلك يضاف 2.5 ملغرام / لكل 150سم$^3$ من المحلول من ملح الطعام Naclحيث يقوم مركب PEG بوجود الملح بامتصاص الماء وتكثيف العاثيات لتسهيل ترسيبها بالطرد المركزي . يمزج محلول العاثيات و مادة PEG والملح جيداً حتى الذوبان التام توضع قنينة المحلول بعد ذلك فيها الثلج لمدة ساعتين أو أكثر حيث تترسب العاثيات كطبقة بيضاء اللون . يطرد المحلول مركزياً بقوة 5000 دورة في الدقيقة لمدة عشر دقائق ليتم التخلص من الراشح ويذاب الراسب الذي يمثل العاثيات بإضافة 5 سم$^3$ من محلول TE يتم بعدها فصل الحامض النووي العاثي بإحدى طرق الفصل العامة السابقة .

ويفضل عادة في استخلاص الحامض النووي للعاثيات أو البلازميدات استخدام الطرد المركزي الفائق بوجود ملح كلوريد السيزيوم .

### ب) طريقة الاستخلاص الواسع

يتم في هذه الطريقة الحصول على كمية أكبر من الحامض النووي العاثي لغرض استخدامها في التحليل الوراثي الواسع . يتم في هذه الطريقة أخذ 1 مايكروليتر ،10 ، و 100 مايكروليتر من محلول العاثيات ويمزج كل واحد منها مع 200 مايكروليتر من محلول خلايا البكتيريا بكثافة 109 خلية /سم$^3$ توضع هذه في أوعية Flasks يحتوي كل منها على 50 سم$^3$ من الوسط الغذائي السائل مقوى بنصف سم$^3$ من محلول 1 مولاري MgSo4 ونصف سم$^3$ من 0.2% مالتوز وتحضن بدرجة

حرارة 37 مْ في حاضنة هزازة بقوة 180 دورة في الدقيقة لمدة 12 ساعة . تفحص الأوعية لملاحظة تحلل البكتيريا ويتم اختيار الأوعية ذات التحلل الكبير لأجل الاستخلاص . تجمع الأوعية الجيدة التحلل في قنينة طرد مركزي من نوع بيكمان Beckman ويضاف اليها أنزيمي DNase1 و RNase A بتركيز نهائي قدره 1 مايكروجرام/سم$^3$ وتترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة ثم يضاف إليها 2.92 غرام من ملح الطعامNacl و5 غرامات من مادة PEG وتمزج جيداً حتى الذوبان الكلي . توضع القنينة بعدها في الثلج لمدة نصف ساعة أوساعة لأجل ترسيب العاثيات ثم تطرد مركزيا بقوة 4000 دورة في الدقيقة لمدة عشر دقائق . يزال الراشح ويذاب راسب العاثيات بإضافة 20سم$^3$ من محلول SM و 150 مايكروليتراً من محلول EDTA نصف مولاري . ينقل المحلول الى أنابيب زجاجية صلدة ويضاف لكل أنبوبة 5-10 مايكروليترات من محلول SDS تركيز 25% وتمزج جيداً بواسطة عمود زجاجي . ثم يصفى الحامض النووي العاثي بواسطة الاستخلاص باستخدام الفينول : كلوروفورم : أيزوبروبانول ثم بواسطة الطرد المركزي الفائق مع ملح كلوريد السيزيوم .

## سابعاً: استخلاص الحامض النووي DNA من الهلام

في بعض الأحيان وأثناء استخلاص الحامض النووي DNA فأنه يحصل وبسبب عدم كفاءة الاستخلاص أن يتحطم الحامض النووي كلياً أو جزئياً بسبب تعرضه للأنزيمات المحطمة أو البروتينات المحطمة وفي حالة التحطم الكلي للحامض النووي فأنه سوف لا يمكن الاستفادة منه في معظم تجارب الهندسة الوراثية . أما في حالة التحطم الجزئي فأنه يمكن تخليص نموذج الحامض النووي من الأجزاء المكسورة أو المحطمة منه عن طريق الهجرة الكهربائية في هلام الاجاروز من النوع الخفيف Low melting agarose . تظهر الأجزاء المحطمة بعد صباغة الهلام بالاثيديوم بروماييد كمسحة ممتدة من منطقة بداية الهجرة نحو الأمام بينما يظهر الحامض النووي الكامل كحزمة واحدة فقط عندها يتم قطع الاجاروز المحيط بالحزمة ونقله إلى أنبوبة نظيفة ليتم استخلاص الحامض النووي الكامل منه بطرق مختلفة . أسهل هذه الطرق هو

إضافة أنزيم الاجاريز Agarase للانبوبة حيث يقوم الأنزيم بتحطيم الاجاروز والتخلص منه ويتم ترسيب الحامض النووي بإضافة الايثانول المثلج أو الايزوبروبانول .

كما يمكن بنفس الطريقة عزل حزم الحامض النووي DNA المقطعة بواسطة الأنزيمات القاطعة والمستخدمة في الهندسة الوراثية .

**أما الطريقة الثانية** : فهي عمل حفرة أمام الحزمة المراد عزلها وباتجاه الهجرة الكهربائية وإضافة بفر TE إلى الحفرة وتشغيل جهاز الهجرة الكهربائي حيث تزحف الحزمة باتجاه الحفرة ثم تنتقل جزيئات الحامض النووي الى البفر TEويتم تجميع البفر بين الحين والآخر وإضافة بفر جديد حتى اكتمال تجميع ماده الحامض النووي ثم يتم ترسيب الحامض بإضافة الايثانول بعد تخليصه من بروميد الاثيديوم . كما أن هناك طريقة ثالثة تستند إلى استخدام عمود يحتوي على مادة السفيدكس Seph)F50 adex G50) أو السليكون محفوظة في ماء مقطر يحتوي على 0.15% من مادة الكاثون GG (Lathon GG) كمادة حافظة . يتم شراء هذه الأعمدة عادة من شركة فارمكا Pharmacia على سبيل المثال أو غيرها كما يمكن تحضيرها مختبرياً عن طريق تعبئة عمود زجاجي بالمواد السابقة . قبل إجراء عملية فصل الحامض النووي يتم غسل عمود الفصل بواسطة محلول TE وذلك بإضافة المحلول للعمود وتركه يخرج من نهايته وتعاد عملية الغسل لعده مرات ( 4-6 مرات) . يضاف بعدها النموذج المطلوب عزل الحامض النووي DNA منه إلى عمود الفصل ويترك السائل يخرج أولاً من نهاية العمود حيث يتم تجميعه في قنينة أولى ثم يضاف بعد ذلك محلول TE (بعد خروج المحلول الأول كلياً) ويجمع النموذج من نهاية العمود في قنينة ثانية (تحتوي هذه القنينة على الحامض النوويDNA) . يتم ترسيب الحامض النووي بالايثانول البارد واستكمال الطريقة للنهاية . تعمل مادة السفيدكس أو السليكون كوسط يتأصر معه الحامض النووي DNA تاركا المحلول يخرج لوحده وعند إضافة محلول TE فأنه يعمل على جرف الحامض النووي مرة أخرى ليخرج من نهاية العمود مع المحلول .

هناك طريقة رابعة حديثة جداً استنبطتها شركة بايوتكنولوجي الأمريكية تهدف أصلاً تنقية الحامض النوويDNA من الشوائب التي قد تعلق كبقايا الفينول أو الكلوروفورم أو البروتينات أو المعادن الثقيلة وغيرها ولكن يمكن استخدامها في استخلاص الحامض النووي المعزول من الهلام . تدعى هذه الطريقة بالجين كلين Gene clean وتباع موادها تجارياً بواسطة الشركة السابقة الذكر . يتم في هذه الطريقة إضافة يوديد الصوديومNaI (حجمان ونصف الحجم ليصبح التركيز النهائي في المحلول 4 مولاري) الى نموذج الحامض النووي المراد تنقيته أو استخلاصه . كما يضاف 2 مايكروليتر من مادة السليكا Silica matrix . تمزج المواد جيداً ويوضع النموذج في الثلج لمدة خمس دقائق لإتاحة الفرصة للحامض النووي بالالتصاق كليا بالسليكا ويطرد النموذج مركزياً لعدة ثوان بسرعة 2000 دورة في الدقيقة يتم بعدها التخلص من الراشح . يتم غسل الراسب بواسطة محلول التنظيف الذي يدعىNew Wash (يتألف هذا المحلول من ملح الطعام Nacl و Tris cal و EDTA ، ايثانول وماء غيرمعروف العيارية أو التركيز وتحتفظ الشركة بذلك دون إعلانه في نشرة المحاليل) .يمزج الراسب مع محلول التنظيف جيداً ثم يطرد النموذج مركزياً مرة أخرى ويتم التخلص من الراشح وتعاد عملية الغسيل هذه لثلاث مرات يتم بعدها استخلاص الحامض النووي من مادة السليكا مرة أخرى بإضافة كمية من محلول TE وحضانة النموذج بدرجة حرارة 55 مْ لدقيقتين ثم يطرد مركزياً حيث يحتوي الراشح بعدها على الحامض النووي DNA النقي جداً .

**ثامناً: استخلاص الحامض النووي الريبوزي المرسال mRNA**

يستخدم الحامض النووي المرسال في العديد من تجارب الهندسة الوراثية مثل بناء سلسلةDNA مكمل c DNA . كما يمكن تعقب نشاط مورث معين عبر تعقب الحامض النووي المرسال له أو البروتين الناتج . وفي الحقيقة فأن التعامل مع الحامض النووي الريبوزي RNA أسهل بكثير من التعامل مع الحامض النوويDNA حيث لا يمثل الحامض النووي RNA الكلي سوى 10% من الحامض النووي الكلي .

إن معظم طرق استخلاص الحامض النوويDNA تؤدي إلى الحصول على الحامض النووي الريبوزي RNA مالم يتم استخدام أنزيم RNase A . لذلك فأنه يمكن الحصول على الحامض النووي الريبوزي الكلي Total RNA باستخدام طرق الاستخلاص السابقة ولكن يفضل استخدام طريقة الاستخلاص بواسطة الطرد المركزي الفائق مع ملح كلوريد السيزيوم حيث يكون نموذج الحامض النووي الريبوزي RNA نقياً تماماً وهو مهم جداً حيث إن هذا الحامض سريع التكسر بواسطة الملوثات كالبكتيريا أو غيرها من الأحياء . هذا إضافة إلى أن طرق الفصل الأخرى مثل استخدام الفينول تؤدي إلى فقدان جزء من الحامض النووي الريبوزي المرسال . يذاب الحامض النووي الريبوزي الكلي المعزول بالطرق السابقة بواسطة 10 مايكروليترات من محلول TE المعقم .

يتم فصل الحامض النووي المرسال mRNA من نموذج الحامض النووي الريبوزي الكلي باستخدام عمود الفصل الذي يدعى بـ Oligo T cellulose chromatography . يغسل العمود أولا بمحلول هيدروكسيد الصوديوم عيارية 0.1 مولاري ثم يغسل بعد ذلك بمحلول ملحي مخفف ثم بمحلول ملحي مركز . يضاف نموذج الحامض النووي الريبوزي الكلي إلى العمود بعد ذلك حيث يرتبط الحامض النووي الريبوزي المرسال بالعمود بوجود التركيز العالي من المحلول الملحي ويخرج ما تبقى من المحلول من نهاية العمود . وبعد الانتهاء من خروج المحلول الأول تتم إضافة المحلول الملحي المخفف الى العمود ويتم تجميع السائل الخارج من نهاية العمود حيث يقوم المحلول الملحي المخفف بفك تأصر الحامض النووي الريبوزي المرسال من العمود ليخرج مع المحلول من نهاية العمود . ويمثل هذا النموذج محلول الحامض النووي الريبوزي المرسال ويمكن التأكد منه عن طريق قراءة الامتصاص بجهاز المضياف Spectrophotomater عند درجة 260 نانوميتراً . يتم بعد ذلك ترسيب الحامض النووي بإضافة محلول كلوريد الصوديوم (تركيز نهائي 0.3 مولاري) وحجمين من كحول الايثانول المثلج .

# 5

# نواقل الهندسة الوراثية

**مقدمة**

**البلازميدات**

**البلازميدات الإقترانية وغير الاقترانية**

**تصنيف البلازميدات**

**البلازميدات كنواقل في الهندسة الوراثية**

**مميزات البلازميدات النموذجية المستخدمة في الهندسة الوراثية**

**هندسة البلازميدات**

أولاً: الغرس التثبيطي

ثانيا: الغرس بدون تثبيط أو الغرس الطبيعي

**العاثيات**

**العاثيات كنواقل في الهندسة الوراثية**

**هندسة العاثيات**

أولاً: الغرس التثبيطي

ثانيا: الغرس الطبيعي

**عاثيات بكتريا القولون كنواقل في الهندسة الوراثية**

أولاً: العاثيات مزدوجة شريط الحامض النووي DNA

ثانياً: العاثيات مفردة شريط الحامض النووي DNA

**الكوزميدات**

**الرواشح**

**نواقل التعبير**

-العاثي QX 174

-العاثي M13

-مشتقات العاثيM13

-العاثيM13 mp

-عاثيات أخرى مشتقة من العاثيM13

## مقدمة

نواقل الهندسة الوراثية Vehicles هي جزئيات بايولوجية مؤلفة من الحامض النووي DNA أو الحامض النووي وكمية من البروتينات . تستخدم هذه كوسائط لنقل مورث معين أو أجزاء معينة من الحامض النووي DNA إلى خلايا أخرى لإظهار صفة جديده فيها .

تتميز هذه النواقل بقدرتهاعلى التضاعف داخل الخلايا الجديدة ، وكذلك مضاعفة الأجزاء المهندسة فيها كما يمكن لها الانتقال إلى الأجيال الجديدة من الخلايا . وبالإضافة إلى ذلك فأن هذه النواقل يجب أن تكون مستقرة وغير قابلة للتحلل داخل الخلايا الجديدة وأن لها قدرة أستيعابية جيدة تمكن الباحثين من هندسة قطع حامض نووي لا بأس بها كما يمكن الحصول عليها واستخلاصها من الخلايا عند الحاجة .

ونظراً لاختلاف أهداف الهندسة الوراثية فقد توفر الآن العديد من هذه النواقل كالبلازميدات والعاثيات والكوزميدات والرواشح وغيرها .

## البلازميدات *Plasmids*

هي جزيئات حامض نووي DNA حلقي ذو تضاعف مستقل عن الصبغيات . لذا فهي تمثل وحدة تضاعف مستقلة Replicon . يتراوح حجم البلازميدات بين0.05 إلى 20% من حجم الصبغي (بين 0.1 كيلو قاعدة الى 250 كيلو قاعدة) (جدول 5-1) ، على الرغم من أن البلازميدات مواد وراثية غير ضرورية لنمو وتكاثر الخلايا إلا أنها قادرة على تزويد الخلايا بصفات إضافية في ظروف معينة لاحتوائها على مورثات خاصة بها مثل مورثات مقاومة المضادات الحيوية .

جدول5-1 : احجام وعدد نسخ بعض البلازميدات وصفاتها المظهرية.

| البلازميد | الحجم بالكيلو قاعدة kb | الصفة المظهرية | عدد النسخ | البكتيريا المضيفة |
|---|---|---|---|---|
| PBR345 | 0.46 | مقاومة الاميسلين | 150-100 | E.coli |
| PUC 8 | 2.75 | مقاومة الامبلسين | 150-100 | E.coli |
| PAT 153 | 3.658 | مقاومة الامبلسين والتتراسايكلين | 150-100 | E.coli |
| PBR 322 | 4.362 | مقاومة الامبلسين والتتراسايكلين | 100-50 | E.coli |
| CVg-YIP | 5.5 | مقاومة الامبلسين والتتراسايكلين | حوالي30 | yeast |
| YRp7 | 5.7 | مقاومة الامبلسين والتتراسايكلين | حوالي30 | yeast |
| PBR 325 | 5.995 | مقاومة الامبلسين والتتراسايكلين والكلورمفينكول | حوالي30 | E.coli |
| 2 μ m | 6.3 | لا يوجد | 100-30 | yeast |
| COL E1 | 6.36 | أنتاج الكولسين | 15-10 | E.coli |
| RSF 1030 | 8.48 | مقاومه الامبلسين | 40-20 | ? |
| RSF 2124 | 11.205 | مقاومه الامبلسين | 40-20 | |
| PSC101 | 12.871 | مقاومةالتتراسايكلين | 30-15 | E.coli |
| RP4 | 54 | مقاومة الامبلسين والتتراسايكلين والكنامايسين | 5-2 | pesudomonas and other |
| R1 | 93.885 | عدد من المضادات الحياتية | 6-3 | |
| F | 95 | --- | 2-1 | E.coli |
| Ent P307 | 98.42 | انتاج سموم داخلية | 3-1 | |
| TOL | 117 | -- | 2-1 | Pesudomonas putide |
| PTi Ach5 | 213 | -- | 2-1 | Agrobacterium tumefaciens |

$X^6 10$ دالتن 4.2 = 6.36 Kb

$X^6 10$ دالتن 62 = 95 Kb

يمكن إيجاد هذه البلازميدات في الكثير من البكتيريا وبعض الخمائر وتعتبر هذه الأحياء مصدر معظم البلازميدات المستخدمة في الهندسة الوراثية . تتضاعف البلازميدات داخل الخلايا الحية مستخدمة الأنزيمات الخلوية لذلك إلا أنها تسيطر على عملية تأسيس هذا لتضاعف عن طريق مورثاتها الخاصة . فبعض البلازميدات تقوم بالاتحاد مع الحامض النووي DNA الخلوي لأجل التضاعف وتدعى هذه بالايبوسومات Episomes وعادة ما تكون هذه البلازميدات صغيرة الحجم بينما تمتلك البلازميدات الكبيرة الحجم أنزيماتها الخاصة بها .

ويختلف عدد نسخ البلازميدات من خلية إلى أخرى تبعاً لذلك حيث تمتلك بعض الخلايا أكثر من خمسين نسخة كما هي الحال في البلازميدات PBR322 و PBR345 . تدعى مثل هذه البلازميدات بالبلازميدات عالية النسخ High copy number . بينما توجد بعض البلازميدات بهيئة نسخة مفردة أو ثنائية كما هي الحال في البلازميدات كبيره الحجم مثل البلازميدات TOL و PTiAch5 . ويمثل عدد النسخ عدد جزيئات البلازميد الموجود في الحالة الطبيعية في خلية واحدة . وعلى الرغم من عدم معرفة تفاصيل أسباب زيادة نسخ البلازميدات أو انخفاضها إلا أنه يعتقد أن قدرة البلازميدات على السيطره على تأسيس التضاعف تمكنها من زيادة أعدادها . إلا أنه بالإمكان زيادة أعداد البلازميدات داخل الخلايا وخصوصاً من غير الايبوسومات بإضافة مثبطات إنتاج البروتينات مثل الكلورمفنيكول Chloramphen-icol إلى الوسط الغذائي حيث يتوقف تضاعف الصبغيات بينما يشتد تضاعف البلازميدات . قد تحتوي الخلايا على أكثر من نوع من البلازميدات ولا بد لهذه البلازميدات أن تكون متطابقة Compatible حيث يتم فقدان البلازميدات غير المتطابقة تدريجياً من الخلية ولا يعرف سبب ذلك ولكن يعتقد أن تضاعف البلازميدات له دور في ذلك .

تعتبر البلازميدات ذات أهمية بايولوجية وطبية وصناعية ذلك لاحتوائها على مورثات ذات أهمية كبيره في هذه المجالات . ففي مجال علوم الحياة فأن البلازميدات تعتبر أهم نواقل الهندسة الوراثية وتستخدم في العديد من الأبحاث العلمية التي

تستهدف سبر أغوار المادة الوراثية وتهيئة الخرائط الوراثية بالإضافة الى استخداماتها العديدة في دراسات التطور والتطبيقات العملية لعلوم الحياة . أما في المجال الطبي فأنه يكفي معرفة أن العديد من البلازميدات تحتوي على مورثات مقاومة المضادات الحياتية لتتضح أهميتها الطبية . إضافة إلى أن بعضها يقوم بتصنيع بعض البروتينات التي تستخدم في قتل أنواع معينة من البكتيريا والسيطره على أنواع أخرى كما هي الحال في البلازميدات الكوليسنية في بكتيريا القولون القادرة على إنتاج بروتين الكولسين الذي يقتل البكتيريا ذات العلاقة التطورية المتقاربة أو الخلايا الحساسة التي تفتقر إلى هذا البلازميد . وكذلك البلازميدات القادرة على إنتاج بروتين الفبريوسين Vibriocin الذي يقتل بكتيريا الكوليرا .

كما تعتبر المكورات المسبحية **Streptococcus lactis** من أفضل الأمثلة على الأهمية الصناعية والتي تحتوي على بلازميدات قادرة على إنتاج أنزيمات ذات أهمية كبيرة في صناعة الأجبان والتخمر .

**البلازميدات الاقترانية وغير الاقترانية:**

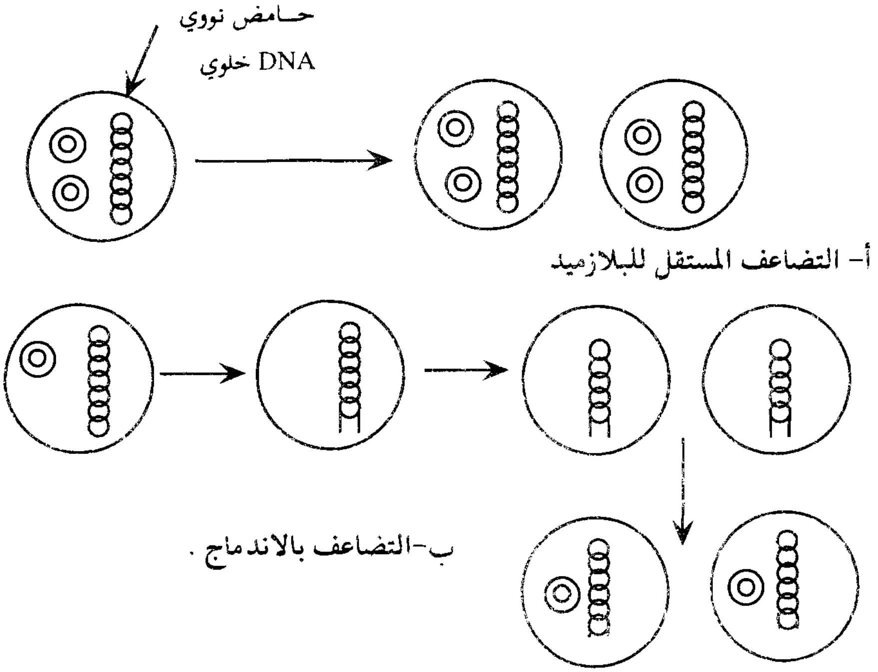
*Conjugative and Non-conjugative Plasmids*

تقسم البلازميدات إلى مجموعتين هما البلازميدات الاقترانية والبلازميدات اللااقترانية . وقد تدعى البلازميدات الاقترانية ببلازميدات الخصوبة Fertility Plasmids أو بلازميدات الجنس Sex Plasmids . وقد يوجد كلا النوعين من البلازميدات في خلية واحدة أو تكون منفصلة .

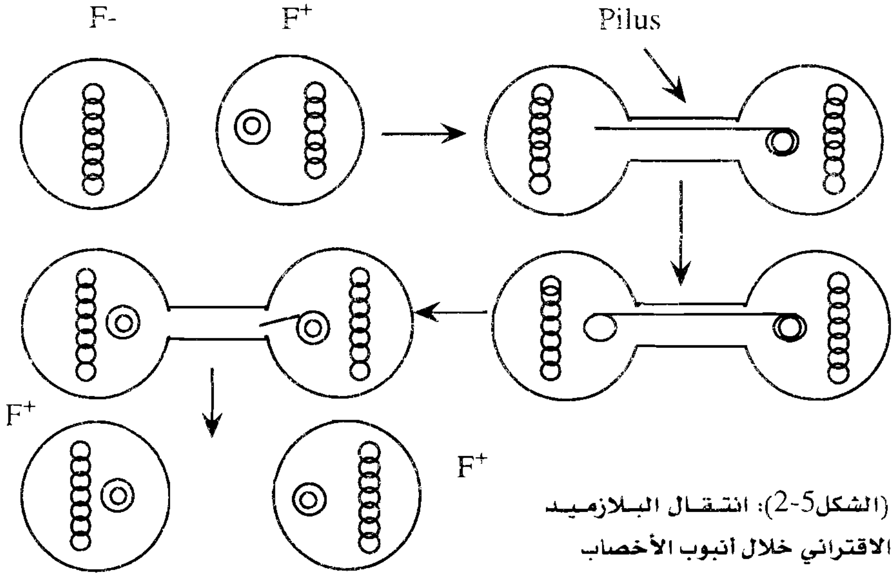
البلازميدات الاقترانية : هي البلازميدات التي لها القدرة على السماح بحصول اقتران جنسي بين خليتي بكتيريا بحيث يتمكن البلازميد الاقتراني من تزويد الخلية الثانية بنسخة منه . يتم السيطرة على عملية الاقتران عن طريق مجموعة من المورثات التي تدعى بالمورثات الناقلة Transfer genes ويرمز لها بـ tra . توجد هذه المورثات في البلازميدات الاقترانية فقط . وقد تتمكن البلازميدات غير الاقترانية تحت بعض الظروف من الانتقال من خلية إلى أخرى عند حصول الاقتران وذلك عند وجودهما

معاً في إحدى الخليتين . أما البلازميدات اللاأقترانية فأنها تتضاعف داخل الخلية بصورة مستقلة عن الحامض النووي DNA الخلوي أو بالاندماج كأيبوسومات (الشكل5-1 ) .

يرمز للخلايا ذات القدرة الاقترانية بـ $F^+$ وهي الخلايا التي تحتوي على بلازميد اقتراني ، بينما يرمز بـ $F^-$ للخلايا الخالية منه . وعند حصول الاقتران بين خلية$F^+$ وأخرى$F^-$ فأنهما يرتبطان بواسطة أنبوب أخصابPilus ينتقل عبره أحد أشرطة الحامض النووي DNA المزدوج البلازميدي إلى الخلية $F^-$ بعدها يتضاعف الشريطان في كل من الخليتين وبذلك تتحول الخليه$F^-$ إلى خلية $F^+$ ذات بلازميد اقتراني (شكل5-2) وعلى الرغم من القدرة التضاعفية المستقلة للبلازميد الاقتراني Autonomous إلا أنه يلتحم مع الحامض النووي الخلوي من وقت إلى آخر وترجع قابليته هذه لاحتوائه على ترددات تدعى بالعناصر الانتقالية (Transposable (Tn elements أو عناصر الاندماج (Insersion elements (IS وهي ترددات من القواعد النايتروجينية المكملة لترددات مماثلة موجودة في الحامض النووي الخلوي . تقوم الأنزيمات الخلوية بفتح حلقة الحامض النووي البلازميدي وكذلك الحامض النووي الخلوي عند هذه الترددات يتم بعدها التحام نهايات البلازميد المفتوح مع الأطراف المفتوحة للحامض النووي الخلوي حيث يتم استيعاب جزيئة البلازميد الاقتراني . تدعى مثل هذه الخلايا بالخلايا الاتحادية عالية التردد (High frequency re-(Hfr combinant cells (الشكل5-3 ) .




(الشكل5-1 ) : تضاعف البلازميدات اللااقترانية في البكتيريا.



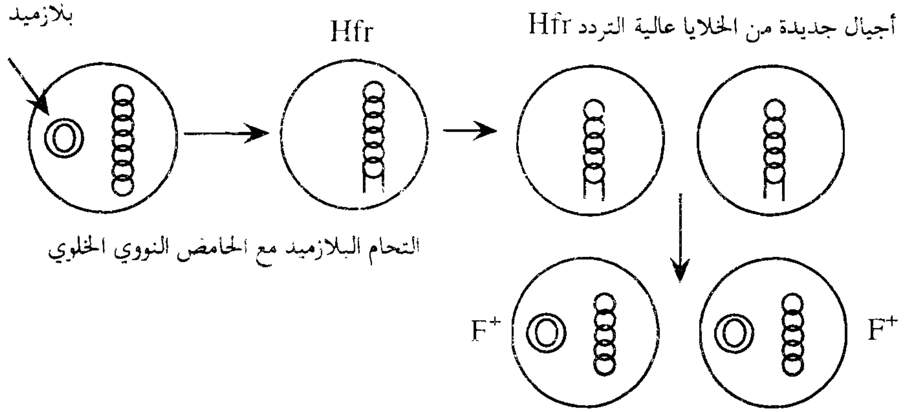

(الشكل5-2): انتـقـال البـلازمـيـد الاقتراني خلال أنبوب الأخصاب

تقوم الخلية بعدها بمضاعفة الحامض النووي المركب وتنقسم . وبهذه الطريقة ينتقل البلازميد الى الأجيال الجديدة من الخلايا .

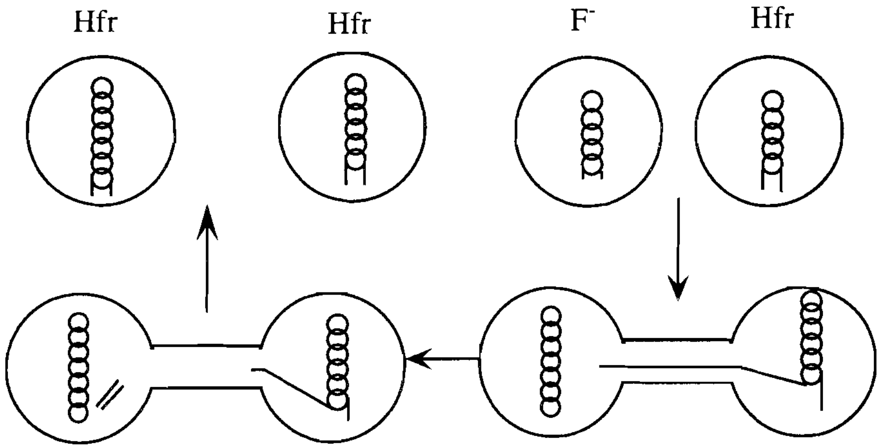
وقد تقوم خلايا Hfr بنقل البلازميد الى خلايا $F^-$ . ويؤدي مثل هذا الانتقال إلى الحصول على اتحادات وراثية جديدة حيث تنتقل أجزاء من الحامض النووي الخلوي مع البلازميد الى الخلايا الجديدة . (الشكل5-4 ) .

أما البلازميدات اللاقترانية فأنها كما قلنا تتضاعف داخل الخلية بصورة مستقلة أو بالاندماج مع الحامض النووي الخلوي كأيبوسومات . وتعود قدرتها على الاندماج لوجود عناصر الأندماج . يختلف عدد نسخ عناصر الاندماج من نوع الى آخر . ففي بكتيريا القولون E.coli K ثماني نسخ من العنصر IS1 وخمس نسخ من العنصر IS2 ونسخة أو أكثر من العناصر IS3 وIS4 .

وقد تحتوي بعض البلازميدات والبكتيريا على عناصر انتقالية .وتختلف العناصر الانتقالية عن الاندماجية في أن الأولى تحتوي على مورث مقاومة مضاد حياتي معين أو أكثر من مورث .




**(الشكل5-3) : تكوين الخلايا الاتحادية عالية التردد Hfr من خلال التحام البلازميد مع الحامض النووي الخلوي**




**(الشكل5-4) : الاقتران بين الخلايا الاتحادية عالية التردد Hfr والخلايا الخالية من البلازميد الاقتراني لإنتاج أجيال جديدة من خلايا Hfr**

## تصنيف البلازميدات

تصنف البلازميدات الطبيعية اعتماداً على طبيعة المورثات المحمولة إلى خمس مجاميع هي :

**أولاً : بلازميدات الخصوبة** F-Plasmids : وهي البلازميدات التي تحتوي على المورثاتtra التي تساهم في حصول الاقتران الجنسي بين الخلايا البكتيرية .

**ثانياً : بلازميدات المقاومة** R-Plasmids : وهي مجموعة البلازميدات التي تحتوي في مادتها الوراثية على مورث واحد أو أكثر لمقاومة المضادات الحيوية .

**ثالثاً : بلازميدات الكوليسين** Col-Plasmids : وهي البلازميدات التي تمتلك مورث الكوليسين القادر على إنتاج بروتين الكوليسين .

**رابعاً : البلازميدات التحللية** Degradative Ps : وهي بلازميدات تمتلك مورثات تساعد الخلايا البكتيرية من تمثيل الجزيئات غير الاعتيادية مثل التولوين وحامض السيليسيلك .

**خامساً : البلازميدات المرضة Virulence Ps** : وهي البلازميدات التي تسبب الأمراض لخلايا العائل مثل البلازميدات Ti الموجود في بكتيريا Agrobacterium tumifaciens والتي تؤدي إلى إصابة نباتات ذوات الفلقتين بمرض الثآليل التاجية Crowngall disease .

## البلازميدات كنواقل في الهندسة الوراثية

تعتبر البلازميدات أفضل أنواع النواقل في الهندسة الوراثية وذلك لحجمها المناسب في العمل وتنوعها وسهولة استخلاصها والتعامل معها إضافة إلى صفات أخرى مثل وجود مواقع كسر أنزيمية متعددة ومورثات مقاومة المضادات الحيوية وغيرها وتضاعفها المستقل ووجودها بأشكال مختلفة (مسترخيةRelaxed وحلقيةCircular وخطية Linera) بالإضافة إلى سهولة تربية البكتيريا ذات البلازميدات ومميزات أخرى عديدة .

ونتيجة إلى التطور الهائل في تقنيات الوراثة الجزيئية والكيمياء الحيوية والهندسة الوراثية فقد أمكن الحصول على أعداد متنوعة من البلازميدات المحورة من البلازميدات الطبيعية وجعلها أكثر ملائمة كنواقل للهندسة الوراثية . إذ يتم إزالة الأجزاء غير المرغوب فيها في البلازميد الطبيعي عن طريق تقطيع البلازميد بالانزيمات القاطعة Restriction enzymes ثم عزل القطع المرغوب فيها عن طريق الهجرة الكهربائية خلال هلام Gel electrophoresis واستخلاصها وربطها مع بعضها بواسطة الأنزيمات اللاحمة Ligases مع إضافة أجزاء بلازميدية أخرى أو عدمها لتهيئة بلازميد جديد ذي مواصفات أجود وأكثر كفاءة . لقد تم باستخدام هذه التقنيات بناء العديد من البلازميدات المختبرية التي أدت إلى تطور هائل ومتنوع في قدرات الهندسة الوراثية . إلا أنه وفي كل الاحوال فأن القدرة الاستيعابية للبلازميدات تظل محدودة ولا تزيد عن 5-10 كيلو قاعدة من القطع الجديدة .

## مميزات البلازميدات النموذجية المستخدمة في الهندسة الوراثية

**أولاً** : أن يكون البلازميد بحجم مناسب (10-20 كيلو قاعدة) . إذ أن البلازميدات الصغيرة الحجم عادة ما تكون عديدة النسخ في الخلايا كما أنها سهلة التعامل ومع ذلك فأن الضرورة تتطلب أحياناً استخدام بلازميدات أكبر حجماً لاستيعاب قطع مهندسة كبيرة الحجم كما هي الحال في الصبغيات الكاملة .

**ثانياً** : أن يكون البلازميد معروف الخريطة الوراثية حيث يمكن عندها بسهولة معرفة مواقع المورثات والأنزيمات القاطعة .

**ثالثاً** : أن يكون ذا صفة انتقائية خاصة Selectable markers يمكن من خلالها تمييز الخلايا الحاوية عليه مثل وجود مورثات مقاومة المضادات الحيوية أو العوز الغذائي أو العيش في ظروف خاصة .

**رابعاً** : أن يكون قادراً على التضاعف داخل خلايا المضيف وله قدرة على الانتقال إلى الأجيال الجديدة من الخلايا .

**خامساً** : أن يكون مستقراً Stable داخل المضيف ولا يضيع أو يفقد عند انقسام الخلايا .

**سادساً** : أن يحتوي على أكثر من موقع مفرد لأنزيمات قاطعة .

**سابعاً** : أن يحتوي البلازميد على الأقل على تردد واحد يعمل كمنشأ تضاعف لتمكين البلازميد من التضاعف المستقل عن الحامض النووي الخلوي - وعلى أية حال فأنه يمكن استخدام الأيبوسومات في الهندسة الوراثية على الرغم من عدم احتوائها على منشأ للتضاعف .

### هندسة البلازميدات

تستخدم البلازميدات كنواقل في الهندسة الوراثية بطريقتين وهما الأكثر شيوعاً وهما :

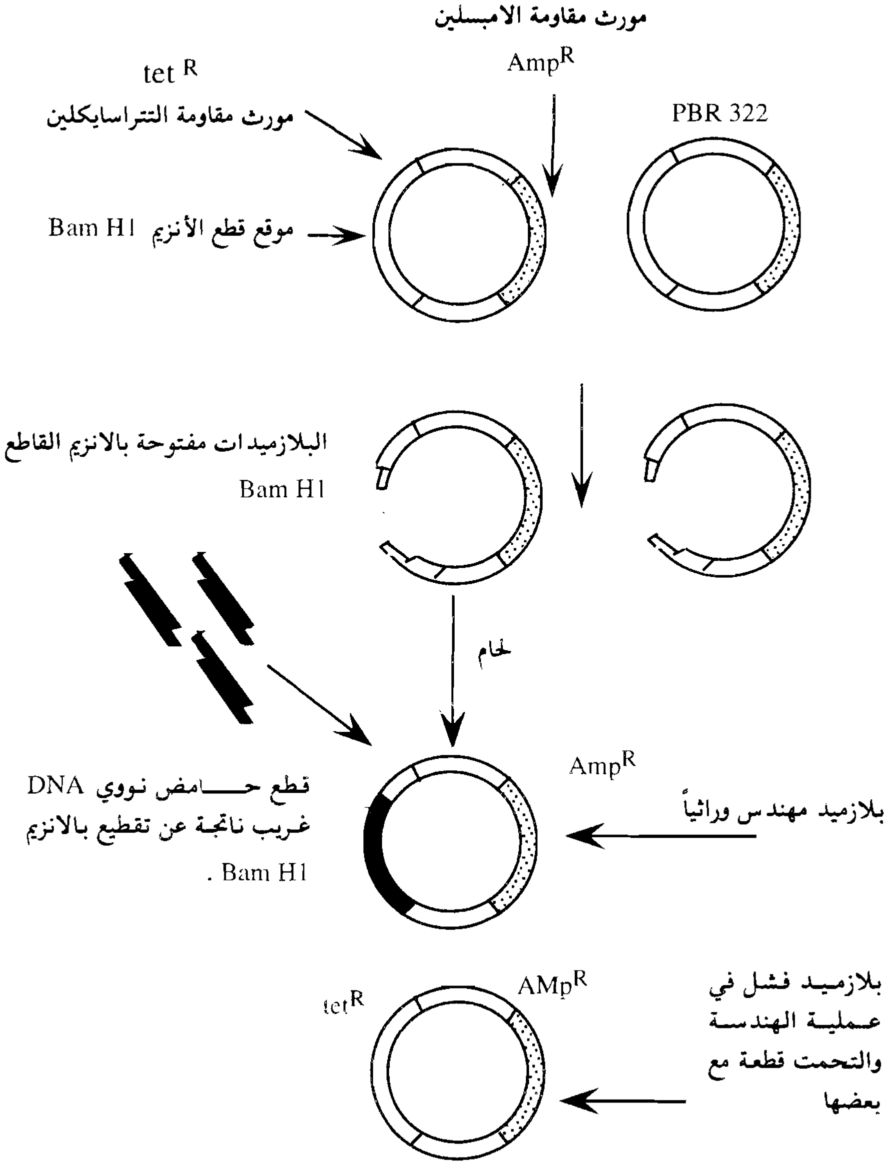
## أولاً: الغرس التثبيطي *Insertional Inactivation*

يتم في هذه الطريقة استخدام بلازميدات ذات صفتين انتقائيتين مثل وجود مورثين لمقاومة مضادين حيويين . إذ يتم زرع أو هندسة قطعة الحامض النووي DNA الغريب في موقع يقع وسط أحد هذه المورثات مما يؤدي إلى إتلاف المورث وتثبيطه وبالتالي اختفاء صفة مقاومة أحد المضادات الحيوية . ويتم عزل البلازميدات المهندسة باستخدام الصفة الانتقائية الثانية . ويعتبر البلازميد PBR322 أحد هذه النواقل ويحتوي على مورثين لمقاومة التتراسايكلين والامبسلين (الشكل5-5) * .

يحتوي هذا البلازميد على مواقع مفردة للعديد من الأنزيمات القاطعة ويمكن استخدام أي منها لفتح البلازميد . فمثلاً عند استخدام الأنزيم القاطع Bam H1 فأنه سيتم كسر مورث مقاومة التتراسايكلين وعند هندسة قطعة حامض نوويDNA غريب مقطوعة بنفس الانزيم فأنه ستستقر بين جنبات مورث مقاومة التتراسايكلين مما يؤدي الى تلف المورث . وعلى ذلك فأنه في سبيل عزل البلازميدات المهندسة وراثياً فأنه يجب عزل البلازميدات المقاومة للامبسلين فقط بينما البلازميدات التي تظل محافظة على مقاومة الامبسلين والتتراسايكلين تعتبر بلازميدات غير مهندسة وراثياً لفشل التحام قطعة الحامض النووي الغريب في المكان المطلوب والتحام مورث مقاومة التتراسايكلين مرة أخرى ليعود كما كان قبل الهندسة (الشكل 5-5) .

---

* وقد اشتق هذا البلازميد من البلازميدات RSF 2124 و PSC 101 و PAB1 .




(الشكل5-5) : استراتيجية الهندسة بالغرس التثبيطي للبلازميد PBR 322. تؤدي الهندسة إلى إتلاف مورث المقاومة الذي يحمل بين جنباته قطعة الحامض النووي الغريب. كما قد تفشل بعض البلازميدات في الهندسة مؤدية إلى تكوين البلازميد الأصلي

في حقيقة الأمر إن التحام قطع الحامض النووي الغريب يكون عشوائياً . لذلك فأن هناك احتمال التحام قطعتي مورث التتراسايكلين في البلازميد مرة أخرى دون إعطاء فرصة لالتحام القطعة الغريبة . وهكذا فأنه سيكون لدينا في الواقع خليط من البلازميد الأصلي والبلازميد الهجين (المهندس وراثياً) فأذا ما تم نقل هذه البلازميدات إلى البكتريا فأنه لابد من تصفية مستعمرات البكتيريا للحصول على البكتيريا الحاوية على البلازميد الهجين .

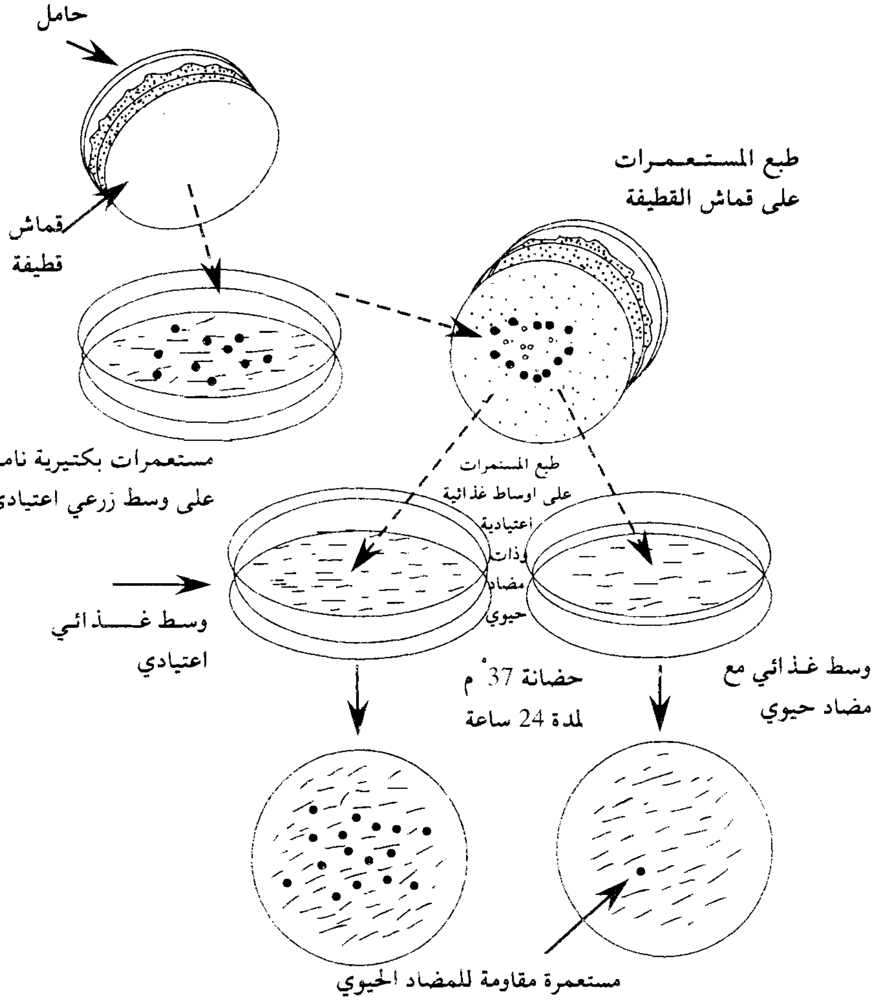
يتم ذلك عن طريق زرع البكتيريا على وسط غذائي يحتوي على الأمبسلين . وعند حضانة الأوساط الغذائية لفترة مناسبة 24-48 ساعة فأن جميع البكتيريا الحاوية على البلازميد الهجين PBR322 $Amp^R$ $tetra^S$ والبكتيريا الحاوية على البلازميد غير الهجين PBR 322 $Amp^R$ $tetra^R$ ستنمو على هيئة مستعمرات .

ولأجل التمييز بين المستعمرات الهجينة وغير الهجينة فأنه يتم نقل مستعمرات البكتيريا بواسطة ورق ترشيح مُعَلَمْ الجهات كما يتم تعليم الأطباق الغذائية بنفس الطريقة إلى أوساط غذائية جديدة تحتوي على التتراسايكلين (الشكل5-6) .

وبعد حضانة الأوساط الغذائية فأنه ستنمو فقط المستعمرات غير الهجينة الحاوية على البلازميدات التي فشلت في الحصول على قطع حامض نووي غريب PBR 322 $Amp^R$ $tetra^R$ . بينما تفشل المستعمرات الهجينة في النمو بسبب عدم استطاعتها مقاومة التتراسايكلين لتلف المورث المسؤول عن ذلك في بلازميداتها . بعد ذلك يتم الرجوع الى المستعمرات الأصلية المزروعة على وسط الأمبسلين لعزل المستعمرات الهجينة وتكثيرها . كما يمكن استخدام مورث مقاومة الأمبسلين في هذا الناقل لإجراء عمليات الهندسة بالغرس التتبيطي .

ونتيجة للأهمية الكبيرة للبلازميد PBR 322 فقد تم اشتقاق العديد من البلازميدات منه لزيادة كفاءته وسعة استيعابه وذلك عن طريق إضافة مورثات مثل البلازميدPBR325 الذي يحتوي على مورث مقاومة الكلورمفينكول مضاف إلى المورثات الأخرى والذي أمكن من خلاله استخدامه في الغرس التثبيطي ، أو

الاشتقاق عن طريق حذف جزء من البلازميد PAT 153 الذي اشتق بإزالة حوالي 700 زوج قاعدي أو الحذف والإضافة كما هي الحال في البلازميدات PCU8 وPCU9 الذين تم بناؤهما عن طريق حذف جزء واسع من البلازميد الأصلي وإضافة مورث $Lac\ Z^-$ بصورة طبيعية أو ربطه بصورة متعاكسة . كما تم اشتقاق العديد من البلازميدات الأخرى بصورة مختلفة .



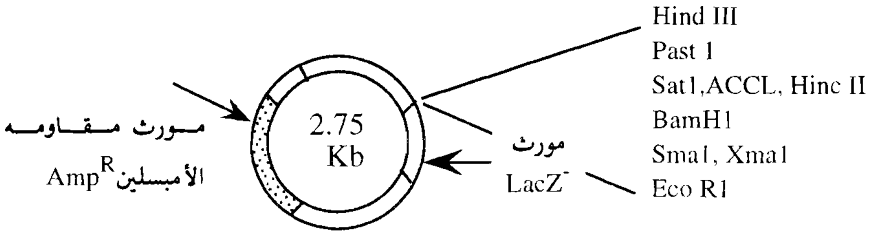

(الشكل 5-6): طريقة نقل المستعمرات البكتيرية من أجل التمييز بين المستعمرات الهجينة من غير الهجينة

لا يقتصر استخدام طريقة الغرس التثبيطي على البلازميدات المحتوية على مورثات مقاومة المضادات الحيوية بل أيضاً مع البلازميدات التي تحتوي على مورث مقاومة مضاد حيوي مفرد وآخر مشفر لأنزيم غذائي معين . كما هي الحال في البلازميد PUC8 الذي يحتوي على مورث مقاومة الامبسلين وآخر يدعى بالمورث $Lac\ Z^-$ يشفر لجزء من أنزيم البيتاجلاكتوسايديز B- glactocidase .

يحتوي هذا المورث على موقع مفرد للأنزيم القاطع Bam H1 . أن أنزيم بيتاجلاكتوسايديز هو أحد الأنزيمات التي تقوم بتمثيل سكر اللاكتوز Lactose الى جلوكوز وجلاكتوز . يشفر هذا الأنزيم عادة من قبل المورث $Lac\ Z^-$ الموجود في المادة الوراثية الخلوية لبكتريا القولون E. coli . إلاأن هناك بعض السلالات الطافرة من هذه البكتريا تفتقد الى جزء من هذا المورث يطلق عليه $Lac\ Z^-$ ويشفر هذا المورث لسلسلة الفا α -Peptide التي هي جزء من الانزيم بيتا - جلاكتوسايديز .

لا تتمكن مثل هذه السلالة من تصنيع الانزيم بيتا - جلاكتوسايديز الا عند وجود البلازميد PUC8 الذي يمتلك الجزء المفقود من مورث البكتريا .

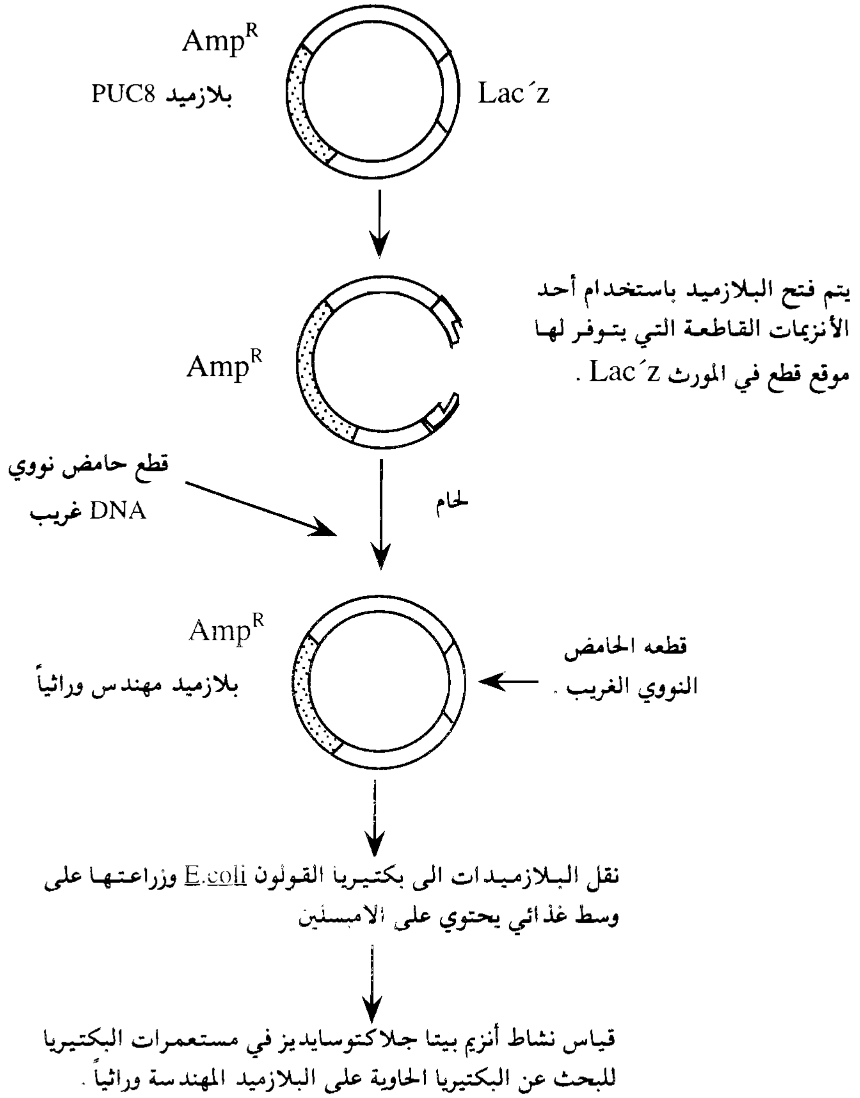
لذلك فأنه عند هندسة البلازميد PUC8 فأن قطعة الحامض النووي الغريبة ستستقر بين جانبي المورث $LacZ^-$ بعد فتحه بواسطة الأنزيم Bam H1 . ونظراً إلى عشوائية التحام قطع الحامض النووي الغريب فأنه سيكون لدينا خليط من البلازميد الهجين والبلازميد الطبيعي وعند نقلها إلى بكتيريا القولون E.coli فأنه يتطلب منا التمييز بين المستعمرات ذات البلازميد الهجين والمستعمرات ذات البلازميد الطبيعي . يتم ذلك بزراعة البكيتريا على وسط غذائي يحتوي على الامبسلين وتحضن البكتيريا حتى ظهور المستعمرات ثم تجرى فحوصات على المستعمرات لقياس نشاط أنزيم بيتا - جلاكتوسايديز . إن المستعمرات التي تحتوي على البلازميد الهجين ستكون مقاومة للامبسلين لكنها غير قادرة على إنتاج الأنزيم .



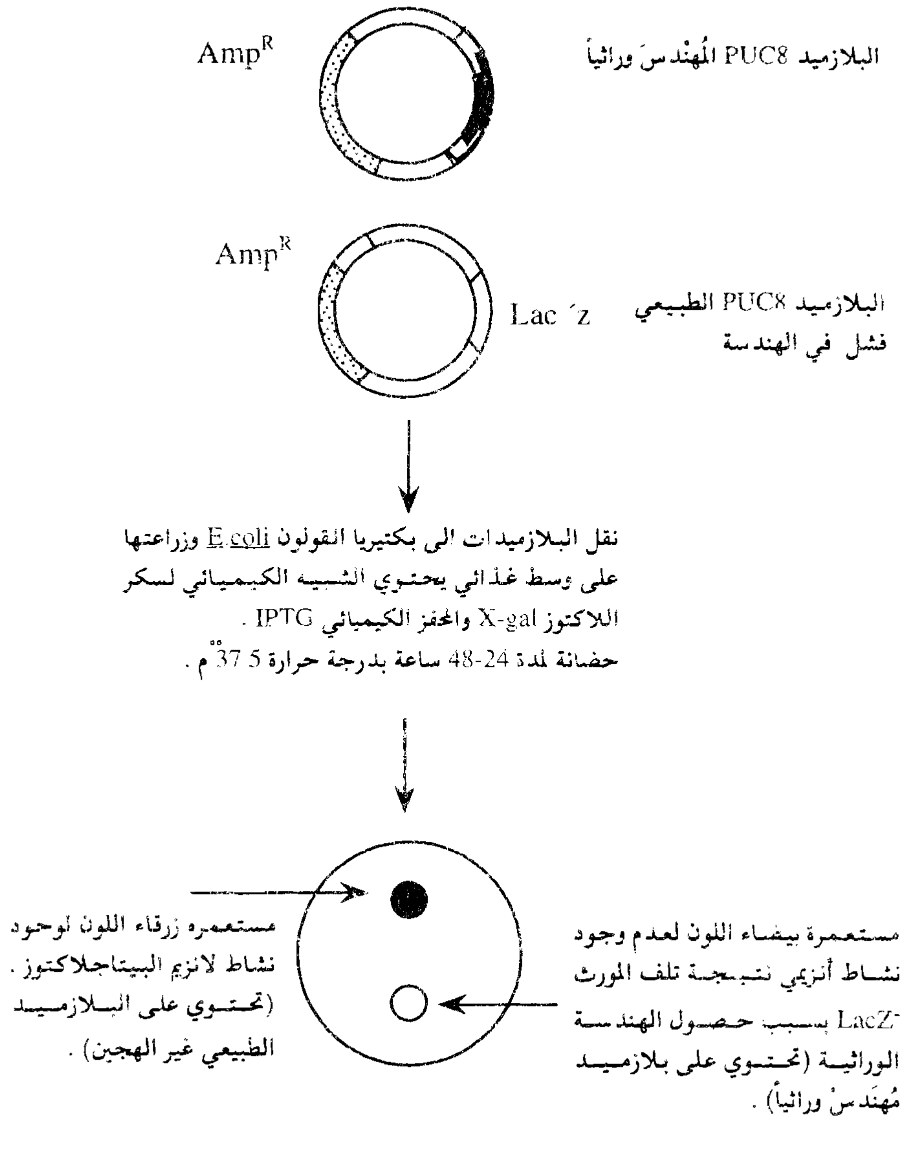

**(شكل 5-7): البلازميد PUC8 الذي يحتوي على مورث مقاومة الأمبسلين ومورث Lac´Z الذي يشفر لجزء من انزيم البيتاجلاكتو سايديز. يحتوي مورثLac´Z على مجموعة من مواقع القطع المفردة لعدد كبير من أنزيمات القطع.**

حيث يتم تثبيط المورث $LacZ^-$ بواسطة قطعة الحامض النووي الغريب المهندسة . أما المستعمرات التي تحتوي على البلازميد الطبيعي غيرالهجين فتكون مقاومة للأمبسلين وقادره على إنتاج الأنزيم بيتا - جلاكتوسايديز (الشكل5-8 ) .

ولأجل قياس نشاط أنزيم البيتا -جلاكتوسايديز فأنه تستخدم تفاعلات كيميائية معينة لذلك - ويستخدم الشبيه الكيميائي لسكر اللاكتوز والذي يرمز له بـ X-gal (5-bromo -4- chloro-3- indolyl-B-D-galacto pyranoside) ، لقياس نشاط أنزيم بيتا - جلاكتوسايديز . أذ يقوم هذا الأنزيم في حالة وجوده بتحطيم المركب X-gal وتلوين المحلول باللون الأزرق الغامق . لذلك فأنه يضاف محلول المركب X-gal مع أحد المحفزات الأنزيمية مثل IPTG (Isopropyl-thiogala ctoside). الى الوسط الزرعي الذي تنمو عليه المستعمرات البكتيرية وستصطبغ المستعمرات التي تحتوي على البلازميد غير الهجين باللون الأزرق بينما تبقى المستعمرات الحاوية على البلازميدات المهندسة (الهجينة) دون أصطباغ وباللون الأبيض . كما يمكن إضافة مركب X-gal والمحفز الأنزيمي IPTG إلى الوسط الزرعي أثناء تحضير الأوساط الزرعية وثم تستخدم لتنمية البكتيريا وسيتم الحصول على نفس النتائج السابقة (الشكل5-9) .




(الشكل5-8) : أستراتيجية الهندسة بالغرس التثبيطي للبلازميد PUC8. تؤدي الهندسة إلى غرس قطعة الحامض النووي الغريبة بين جنبات المورث $LacZ^-$ مما يؤدي إلى إتلافه وفقدانه قدرته على التعبير عن نفسه وعدم بناء أنزيم بيتاجلاكتوسايديز



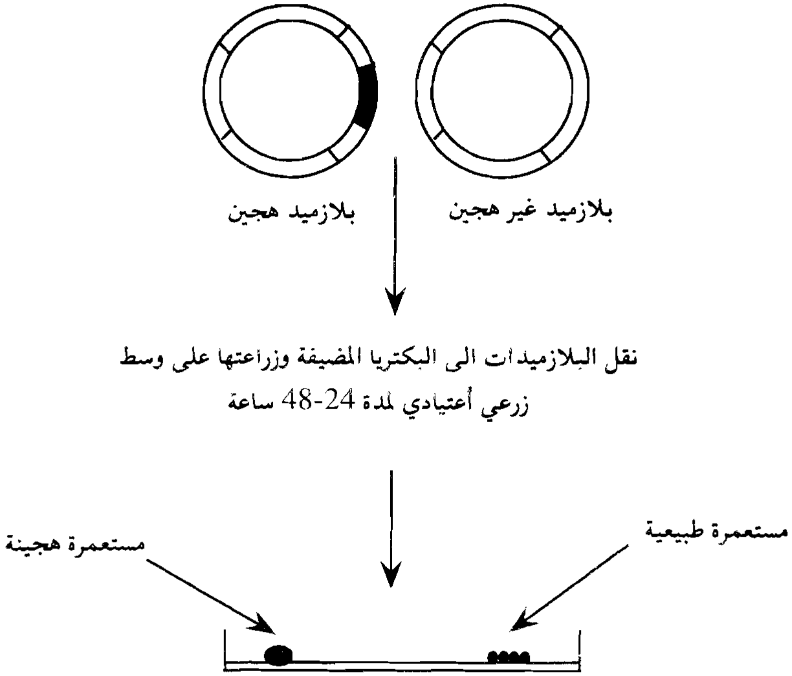

**(الشكل 5-9): استخدام الشبيه الكيميائي لسكر اللاكتوز X-gal والمحفز IPTG لانتقاء وتمييز البلازميدات الهجينة المهندسة وراثياً.**

### ثانياً: الغرس بدون تثبيط أو الغرس الطبيعي

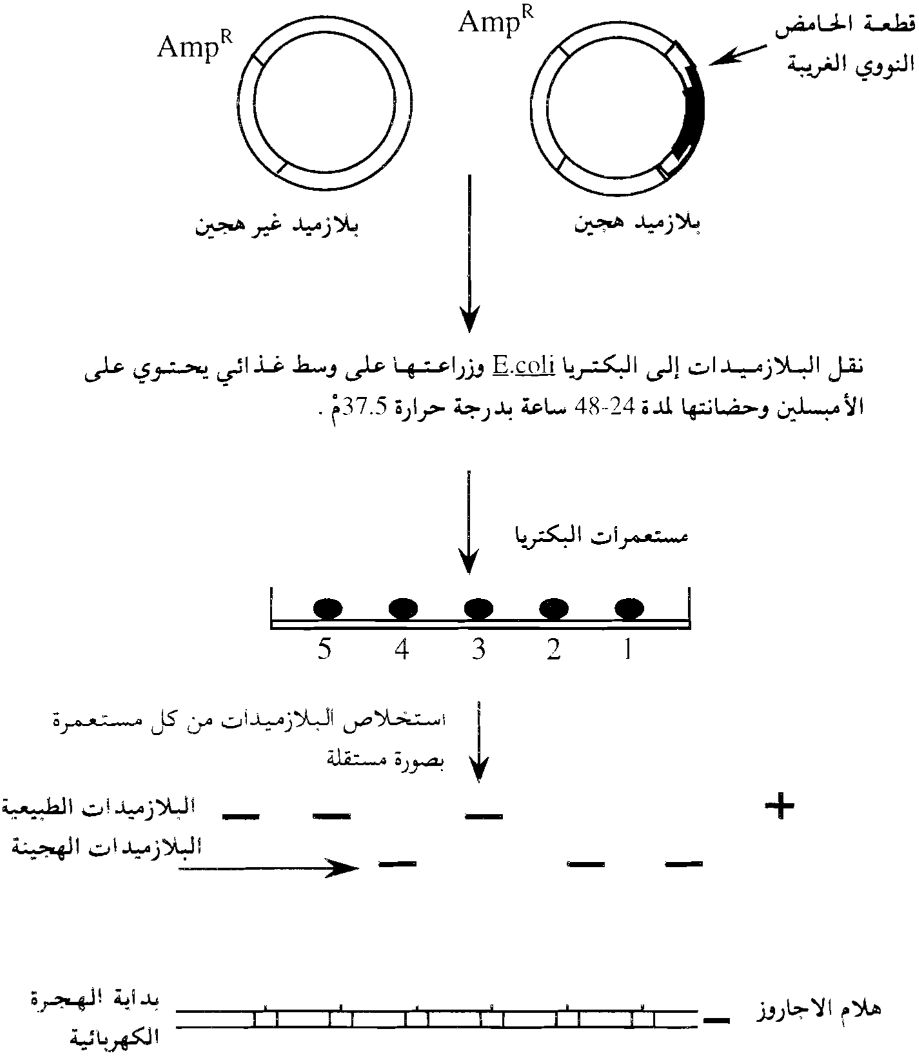
وهو أسلوب محدود مقارنة بالطريقة السابقة . تستخدم في هذه الطريقة بلازميدات ذات صفة انتقائية واحدة في الغالب مقاومة مضاد حيوي معين . ويأتي استخدامها على نطاق ضيق في كونها غير ملائمة لمعظم تجارب الهندسة الوراثية لكنها جيدة بالنسبة لهندسة مورثات يؤدي وجودها الى إضفاء صفة لون معين أو اختلاف في شكل المزرعة البكتيرية مقارنة مع لونها أو شكلها بوجود بلازميدات غير هجينة . يمكن بواسطة هذه الطريقة استخدام جميع أنواع البلازميدات الصغيرة ذات الصفة الانتقائية المفردة في هذا النوع من هندسة المورثات . ويمكن تمييز المستعمرات الحاوية على البلازميدات الهجينة باستخدام طرق الفحص البصري أو استخدام كواشف كيميائية (الشكل5-10) .

كما يمكن استخدام بلازميدات ذات صفة انتقائية مفردة مثل البلازميدات PSP65، PAM19 الحاوية على مورث مقاومة الامبسلين ، تتم هندسة قطع الحامض النووي الغريب في موقع بعيداً عن المورث الانتقائي . تنقل البلازميدات بعدها إلى البكتيريا . وتنمى البكتيريا على وسط غذائي صلب يحتوي على الامبسلين .

تؤخذ بعدها مستعمرات عشوائية وتنمي بشكل منفرد في أوساط غذائية سائلة لمدة 24 ساعة . يؤخذ 1سم3 من كل زرع وينتقل بشكل مستقل ومنفرد الى مرق غذائي جديد ثم تنمى البكتيريا حتى وصول الكثافة الضوئية إلى0.5 (O.D 500=0.5) يتم بعدها استخلاص البلازميدات من كل زرع . تُرحل نماذج الحامض النووي البلاميدي بشكل مستقل مع حامض نووي دليل Marker عبر الهلام ومن ثم تحليل النتائج بعد صباغة الهلام بالاثيديوم برومايد والأشعة فوق البنفسجية . وبمقارنة الأوزان الجزيئية لنماذج البلازميدات المهجرة كهربائياً يمكن معرفة البلازميدات الهجينة حيث تكون أثقل من البلازميدات غير الهجينة التي تسبق في الهجرة البلازميد الهجينة (الشكل 5-11) . كما يمكن معاملة الحامض النووي البلازميدي للنماذج بواسطة أنزيم قاطع معين ثم ترحيلها كهربائياً مع نموذج لبلازميد غير هجين ويمكن معرفة البلازميدات الهجينة عبر وجود قطعة حامض نووي إضافية في خريطتها الأنزيمية .




**(الشكل5-10) : استراتيجية الغرس بدون تثبيط حيث لا تؤدي الهندسة الوراثية إلى تدمير أو تلف مورث معين. ويمكن تمييز مستعمرات البكتيريا الحاوية على البلازميدات الهجينة من شكل المستعمرات أو لونها**




(الشكل5-11): استراتيجية الغرس بدون تثبيط باستخدام بلازميد ذي صفة انتقائية واحدة واستخدام الهجرة الكهربائية عبر هلام الاجاروز لانتقاء وتمييز البلازميدات الهجينة.

## العاثيات أو البكتيريوفاج *Bacteriophages*

تختلف العاثيات كثيراً عن البلازميدات . إذ تعتبر العاثيات أحياء مستقلة ذات معيشة تطفلية إجبارية بينما لا تمثل البلازميدات مثل ذلك . كما تحاط العاثيات بأغلفة بروتينية تستقر بداخل الحامض النووي DNA . يتراوح حجم الحامض النووي العاثي من 6-50 كيلو قاعدة . كما تختلف العاثيات في أنها لا تستقر داخل خلايا العائل بل تغادره حال انتهاء التضاعف وقد تترك جزءاً من ذريتها لاستمرار التضاعف كما هي الحال في العاثي M13 إلا أنها جميعاً تغادر الخلايا المصابة بصورة أو أخرى بينما يحافظ البلازميد على استقراره داخل الخلايا حتى وأن ازداد عدد نسخه ولا ينتقل إلا في حالة الاقتران .

تفضل العاثيات في الهندسة الوراثية لانها تتمكن من استيعاب 15-25 كيلو قاعدة وهو أكثر قدرة من ثلاث إلى أربع مرات من قدرة استيعاب البلازميد دون أضرار . كما تفضل العاثيات لتوفر الحامض النووي الخاص بها وكذلك بروتيناتها بشكل منفصل ويمكن تخليق العاثي مختبرياً من خلال مزج الحامض النووي مع البروتين بطريقة تدعى بالتعبئة الحياتيةIn vitor packaging .

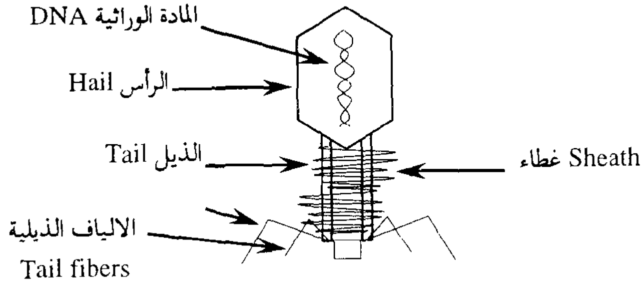
وعلى الرغم من أن هناك حرية أقل في تحوير الحامض النووي للعاثيات مقارنة بالبلازميدات وذلك لوجود العديد من المورثات الضرورية للتضاعف والتي لا يمكن إزالتها إلا أن كفاءة الهندسة الوراثية باستخدام العاثيات يبقى عالياً حيث يمكن الحصول على كمية كبيرة من العاثيات الهجينة (المهندسة وراثياً) من المايكروغرام الواحد(mg) من الحامض النووي مقارنة مع كفاءة البلازميدات . تعتبر العاثيات احدى مجاميع الرواشح وتنتمي إلى مجموعتي الرواشح المعقدة والمتحلزنةComplex and Helical viruses . فالعاثي لامبداً Lambda λ ينتمي إلى مجموعة الرواشح المعقدة . إذ يتألف من رأس عديد الأضلاع وذيل وملحقات أخرى تتألف جميعاً من وحدات بروتينية خاصة ويستقر الحامض النووي DNA المزدوج الذي يبلغ حجمه

حوالي 49 كيلو قاعدة في رأس العاثي . يتمكن العاثي من دخول البكتيريا عن طريق استقراره بواسطة الأشواك الموجودة في نهاية منطقة الذيل على سطح الخلية . يقوم بعدها بحقن مادته الوراثية إلى سايتوبلازم الخلية (الشكل5-12 ) .

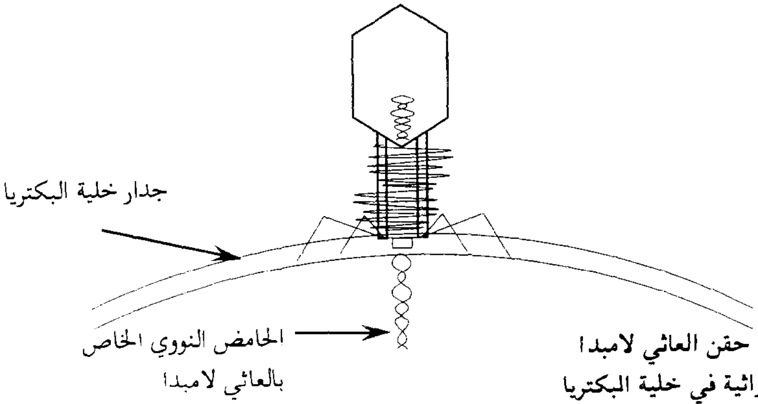
أما العاثي M13 فينتمي الى مجموعة الرواشح المتحلزنة الخيطية ويتصف بشكله العصوي وتتميز بروتيناته الغلافية بأنها على هيئة أسطوانة مجوفة يستقر بداخلها حامض نووي DNA مفرد الخيط يبلغ حجمه حوالي 6.4 كيلو قاعدة ويترتب بهيئة اللولب .

يتمكن هذا العاثي من إصابة البكتيريا عن طريق تحفيز جدارها الخارجي لتكوين أنبوب أوبروز أنبوبي Pilus يتم من خلاله حقن مادته الوراثية نحو السايتوبلازم (الشكل 5-13) .

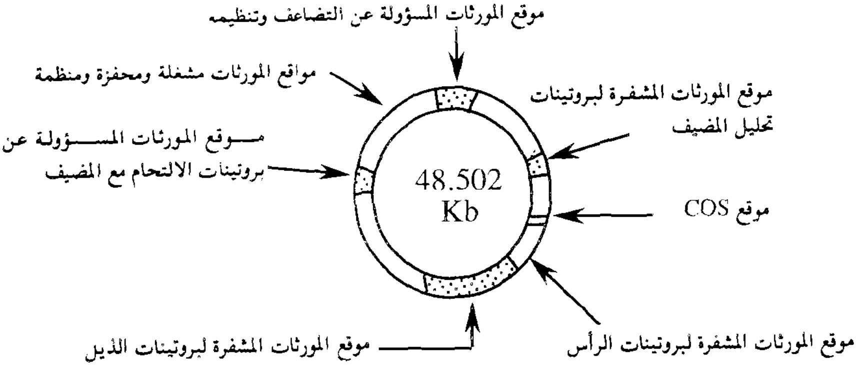
تعتبر أغلب العاثيات أيبوسومات حيث تتمكن من الالتحام مع الحامض النووي DNA الخلوي للبكتيريا نظراً لاحتوائها على ترددات الاندماج أو العناصر الانتقالية وتسلك في ذلك سلوك بلازميدات الخصوبة F-Plasmids . العاثيات ذات أهمية بايولوجية خاصة عندما تستخدم في مجالات الهندسة الوراثية وبناء بنوك المورثات وغيرها . ويمكن تمييز نوعين من العاثيات اعتماداً على طبيعة الحامض النووي . فهناك عاثيات مزدوجة الحامض النووي DNA كالعاثي لامبدا وعاثيات مفردة الحامض النووي DNA كالعاثي M13 . كما يمكن تمييز ثلاثة أنواع من دورات تضاعف العاثيات .




أ- الشكل الخارجي للعاثي لامبدا

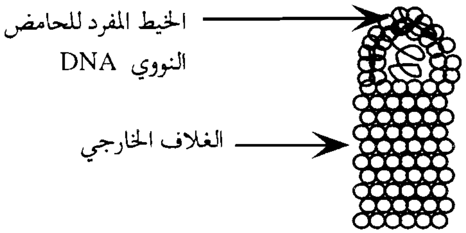



ب- آلية حقن العاثي لامبدا
لمادته الوراثية في خلية البكتريا

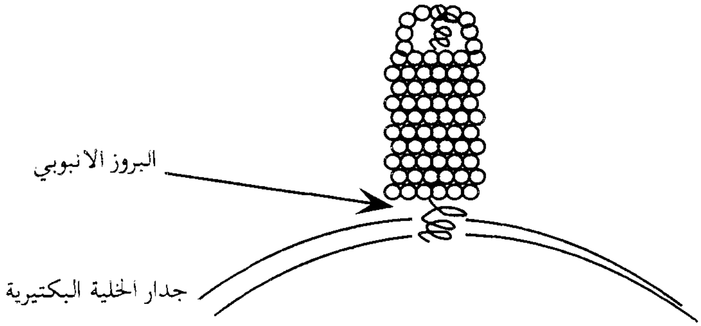



حـ- خريطة لمواقع المورثات المهمة في الحامض النووي DNA

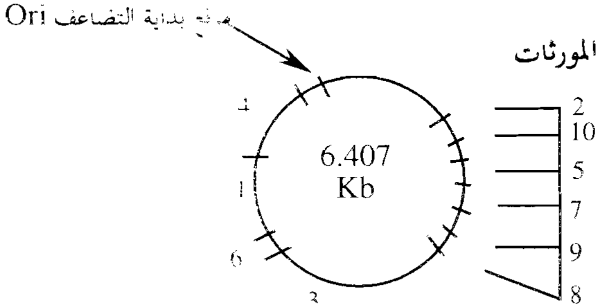
**(الشكل 5-12): تخطيط للعاثي لامبدا وأهم المورثات الموجودة في مادته الوراثية.**




أ- الشكل الخارجي للعاثي M13 .



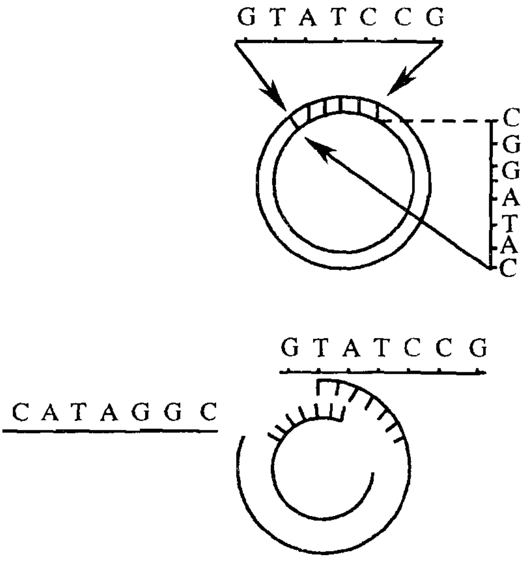

ب- آلية حقن للعاثي M13 لمادته الوراثية في البكتريا



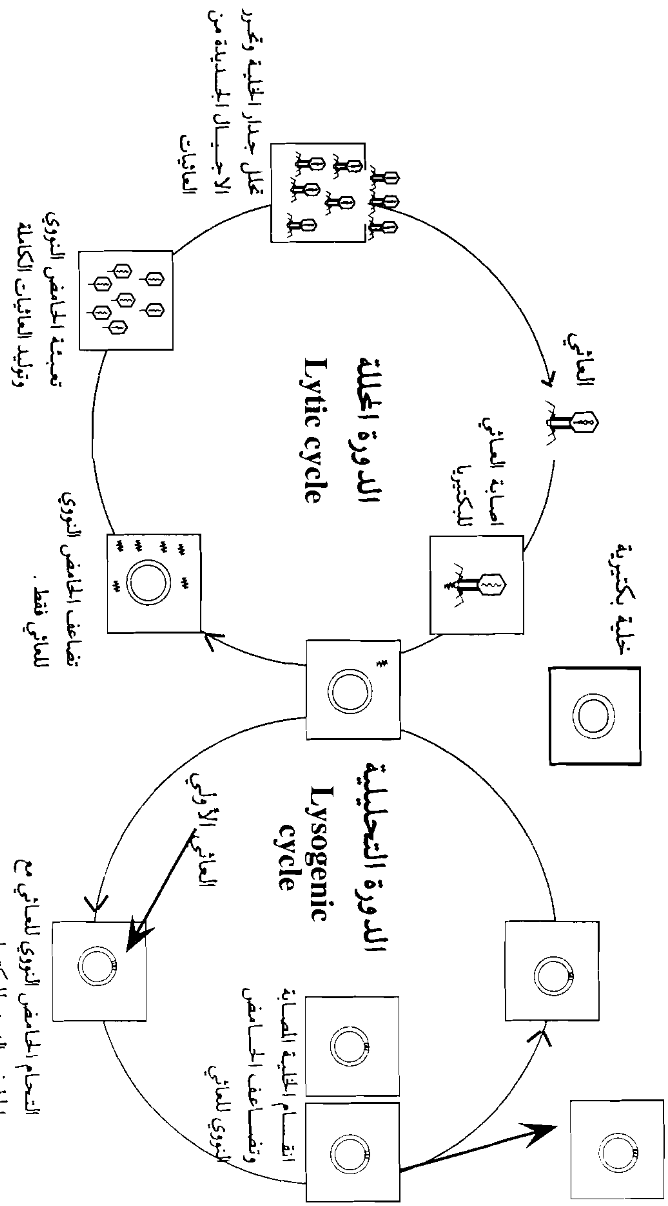

جـ- خريطة تخطيطية لمواقع مورثات الحامض النووي للعاثي M13 .

**(الشكل13-5) : تخطيط للعاثي M13 وخريطته الوراثية**

فهناك العاثيات المحللة Lytic phages والتي لا تستغرق دورتها في الخلية سوى أقل من عشرين دقيقة . تطلق بعدها جيلاً من العاثيات التي تقوم بتحليل جدار الخلية البكتيرية . تتميز هذه العاثيات في أنها تهيئ بروتينات اغلفتها (الكابسيد capsid) مباشرة بعد تضاعف المادة الوراثية في كل مرة . كما أن العاثيات الجديدة لاتتمكن من الاستقرار داخل العائل أبداً بل تغادره مباشرة بعد تعبئتها في الأغلفة . يتم تضاعف المادة الوراثية لها دون الالتحام مع المادة الوراثية للبكتيريا حيث يتحول الشكل الخيطي للمادة الوراثية الخاصة بالعاثي داخل خلية البكتيريا الى الشكل الحلقي عن طريق استخدام النهايات اللزجة Cohesive ends لمزدوج الحامض النووي . إذ تحتوي كل نهاية منه على ترددات من القواعد النايتروجينية المتممة للأخرى (الشكل5-14 ) . يتضاعف بعدها الحامض النووي بطريقة التضاعف شبه المحافظ . إذ يبدأ التضاعف عن طريق شوكة تضاعف ناشئة عن انفصال خيطي الحلقة المزدوجة للحامض النووي في نقطة واحدة يتم بعدها بناء أشرطة حامض نووي جديده استناداً إلى قالب المادة الوراثية الأصلية .




**(الشكل5-14) : النهايات اللزجة COS في العاثي لا مبدا التي تساهم في وجوده بهيئة خيطية او حلقية.**



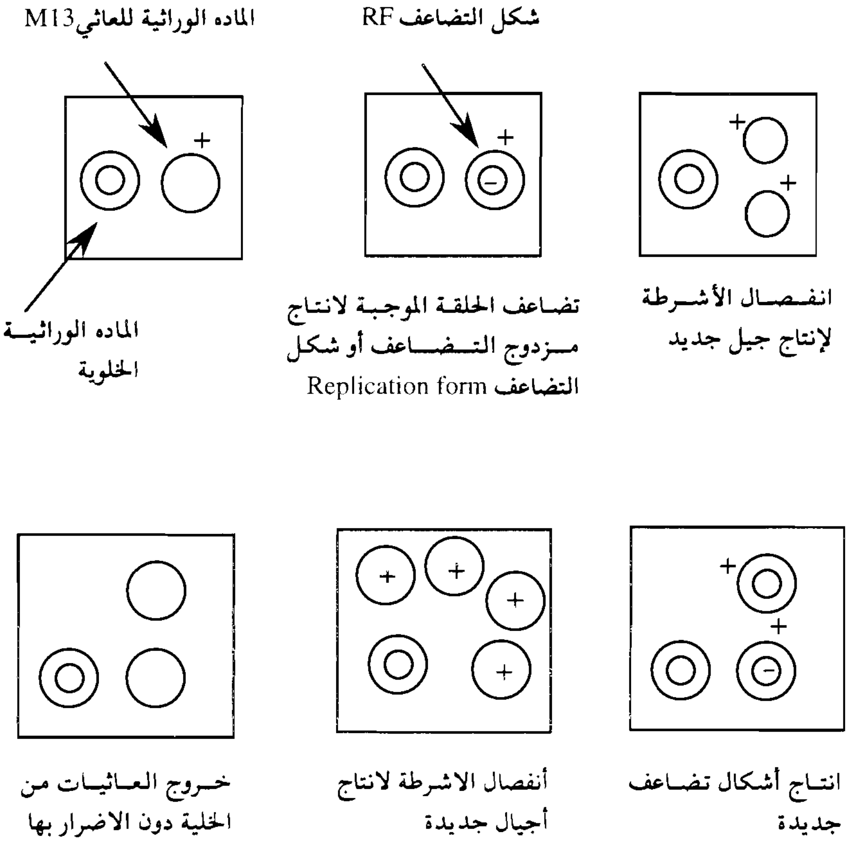

**(الشكل5-15 ) : دورتا تضاعف العاثي لامبدا. يلاحظ ان المادة الوراثية للعاثي تتضاعف بصورة مستقلة عن المادة الوراثية الخلوية في الدورة المحللة كما يؤدي التضاعف الى تحلل الخلية المضيفة. بينما تلتحم المادة الوراثية للعاثي مع المادة الوراثية الخلوية كعاثٍ أولي ويتضاعف مع انقسام الخلية وينفصل بعد ذلك ويغادر الخلايا أو يعيد اصابتها ولا يؤدي ذلك إلى موت الخلايا المضيفة**

وبعد إتمام التضاعف تنفصل أزواج أشرطة المادة الوراثية ثم تتحول إلى الشكل الخيطي عن طريق فتح الحلقة من منطقة التحام النهايات اللزجة ليتم تعبئتها بالاغلفة البروتينية وثم تخرج الأجيال الجديدة بعد أن تقوم بتدمير جدار البكتيريا المضيفة (الشكل5-15) .

ويذكر أن هذه العاثيات تقوم باستخدام أحد مورثاتها الذي يرمز له بالمورث A والذي يشفر لأنزيم القطع الذي يقوم بفتح حلقات المادة الوراثية بعد الانتهاء من التضاعف .

أما النوع الثاني من دورات التضاعف فهو الدورة الانحلالية Lysogenic cycle . تختلف هذه الدورة عن الدورة السابقة في أن المادة الوراثية (DNA) للعاثيات تبقى داخل البكتيريا وربما لالاف من الانقسامات الخلوية . إن المادة الوراثية لهذه العاثيات تلتحم مع المادة الوراثية للخلية المصابة عندما تكون بالشكل الخيطي وذلك لامتلاكها القدرة على التصرف كأبيوسومات . تدعى هذه بالعاثيات الابتدائية أو الأولية Prophages وتمر بعدها بفترة كمون quiescent ولا يمكن عندها تمييز البكتيريا المصابة عن غيرالمصابة حيث يتوقف نشاط العاثي الابتدائي نهائياً فيما عدا إنتاج البروتين الكابت الذي يحافظ على حالة الكمون . وبين الحين والاخر ينفصل العاثي الابتدائي من المادة الوراثية الخلوية ويبدأ بمضاعفة نفسه كعاثٍ محللLytic phage (شكل5-15 ) . ويمر العاثي لا مبدا في كلا دورتي التضاعف هذه .

أما العاثي M13 فتمثل دورته التضاعفية النوع الثالث حيث لا يحتاجه تضاعفه للاندماج مع المادة الوراثية الخلوية للبكتيريا ، كما أن العاثي لا يكمن عند دخوله للمضيف كما هي الحال في الدورة الانحلالية ، إضافة إلى أن الأجيال الجديدة منه تخرج بطريقة لا تؤدي إلى قتل الخلية البكتيرية ولكن تبقى خلايا المصابة تُنتج بأستمرار أجيالاً جديدة من العاثي (شكل5-16) .




**(الشكل5-16 ) : دورة التضاعف الخاصة بالعاثي M13 ويلاحظ استقلال تضاعف العاثي عن المضيف وكذلك إمكانية وجود العاثي بهيئة حلقة مزدوجة أو مفردة وهو مهم جداً في الهندسة الوراثية.**

## العاثيات كنواقل في الهندسة الوراثية

تعتبر العاثيات من النواقل المناسبة للهندسة الوراثية لسهولة التعامل معها وسرعة تضاعفها واحتوائها على مواقع مفردة للعديد من الأنزيمات القاطعة . إضافة إلى سهولة تربيتها واستخلاصها . وتتقارب في مميزاتها هذه من مميزات البلازميدات . ويعتبر العاثي لامبدا من أهم العاثيات المستخدمة في الهندسة الوراثية . وتكمن أهميته ليس بصورته الطبيعية بل بالمشتقات العديدة له . بينما يعتبر العاثي M13 من أهم النواقل المستخدمة في قراءة ترددات الأحماض النووية DNA . هذا بالإضافة إلى معرفة كامل خرائطهما الوراثية والانزيمية .

## هندسة العاثيات

يتم استخدام العاثيات كنواقل في الهندسة الوراثية بطرق مشابهة لتلك التي تحدثنا عنها في هندسة البلازميدات وهي الغرس التثبيطي والغرس دون تثبيط أو الغرس الطبيعي .

### أولاً: الغرس التثبيطي

وهي نفس الطريقة المستخدمة في هندسة البلازميدات حيث يتم غرس قطعة الحامض النووي DNA الغريب في داخل مورث يحمل صفة انتقائية حيث يؤدي ذلك إلى تثبيط هذه الصفة ويتم تمييز المضائف الحاوية على العاثيات الهجينة اعتماداً على نشاط الأنزيم المشفر من مورث الصفة الانتقائية .

فمثلاً معظم عاثيات M13 وبعض العاثيات المشتقة من لامبدا تحتوي على المورث $LacZ^-$ الذي تم الحديث عنه سابقاً .

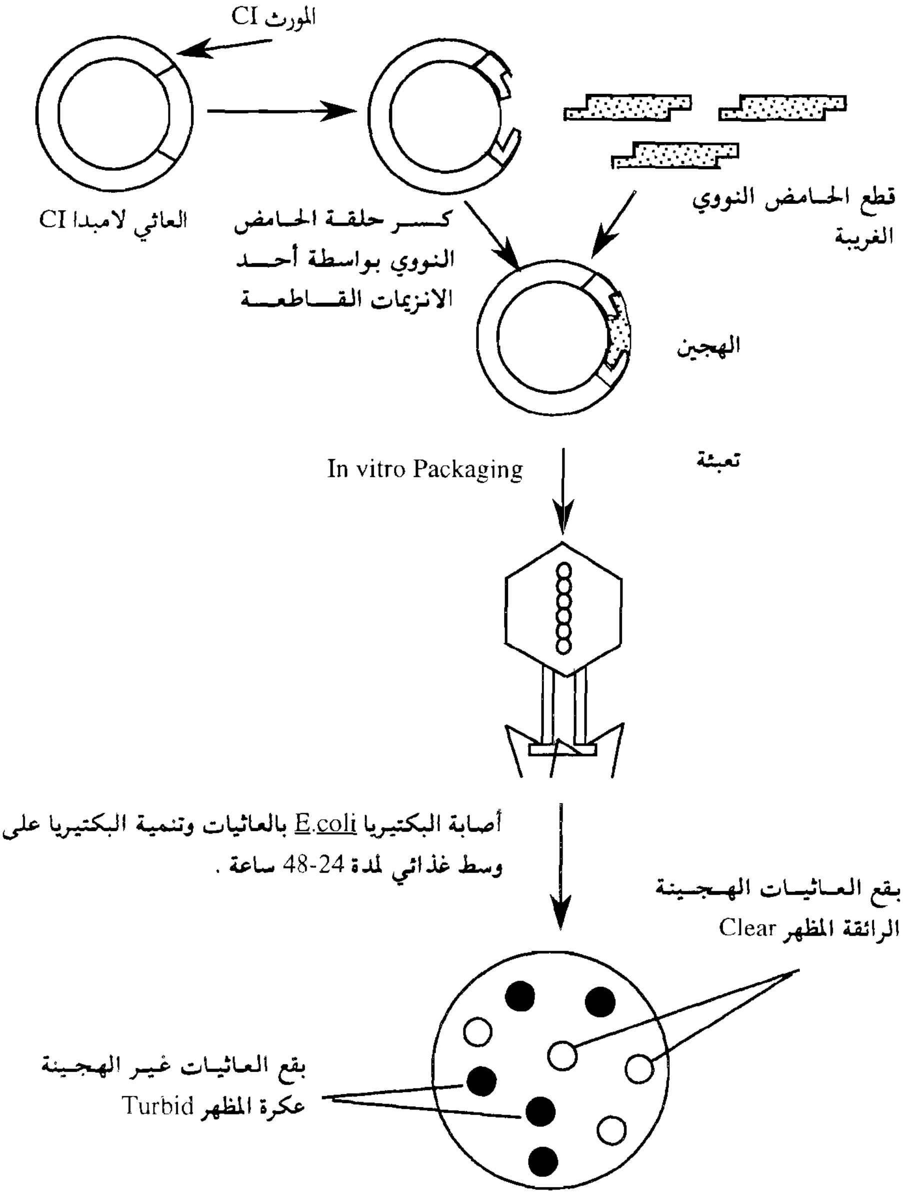
إن هندسة قطعة حامض نووي غريبة في داخل هذا المورث سيؤدي إلى توقف تصنيع أنزيم البيتاجلاكتوسايديز . ويمكن تمييز العاثيات الهجينة عن الطبيعية عن طريق زراعة البكتيريا المصابة بالعاثيات على وسط زرعي مقوى بالمادة X-gal حيث تصطبغ بقع العاثيات غير الهجينة باللون الأزرق الغامق بينما تبقى بقع العاثيات الهجينة شفافة أو غير مصبوغة . كما تستخدم نفس الطريقة في العاثي لامبدا شارون

A16 الحاوية على نفس المورث . أما في العاثي لامبدا CI فأن الغرس التثبيطي يتم داخل المورث CI الذي يؤدي الى تثبيط هذا المورث ويمكن التمييز بين العاثيات الهجينة عن غير الهجينة مظهرياً حيث تظهر بقع العاثيات غير الهجينة عكرة المظهر Turbid بينما تظهر بقع العاثيات الهجينة رائقة Clear (الشكل5-17) .

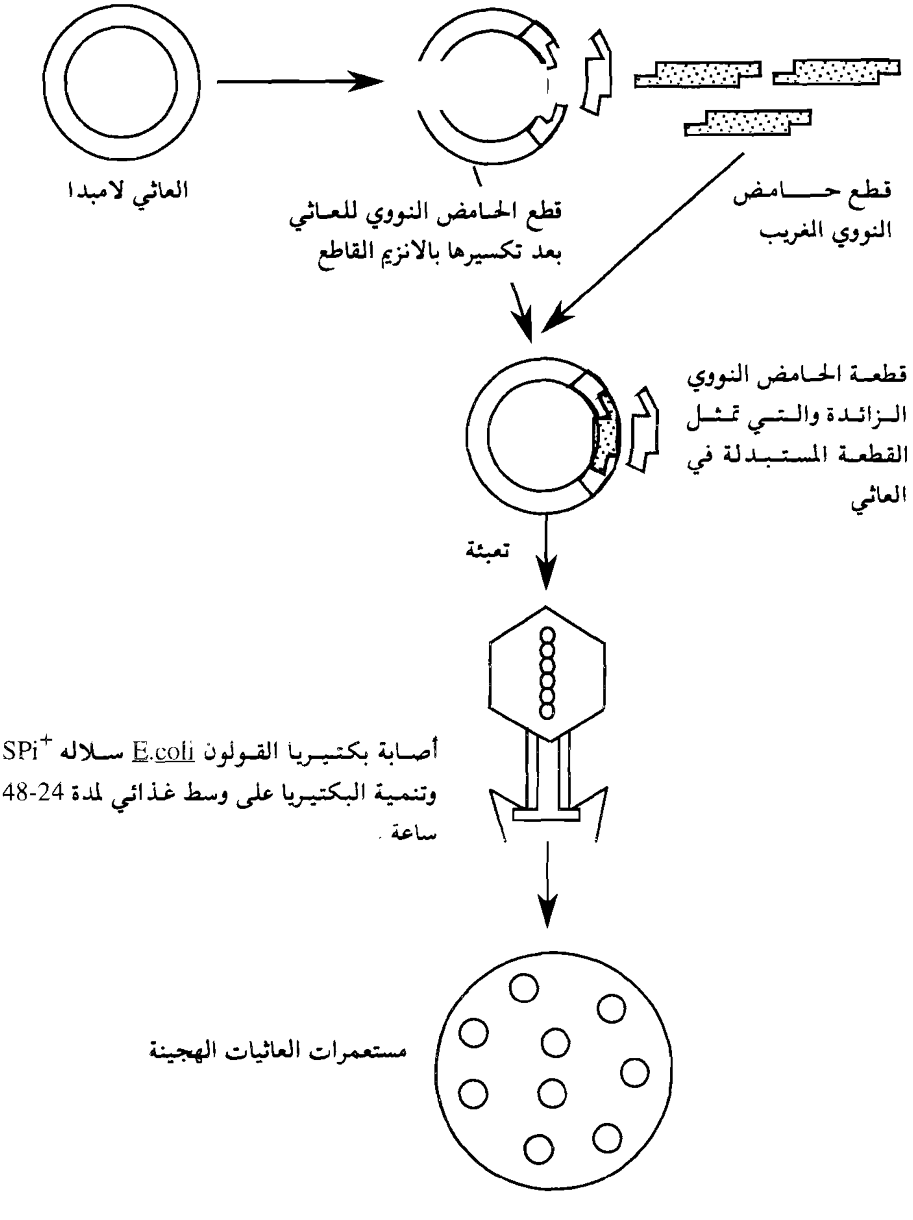
### ثانياً: الغرس بدون تثبيط أو الغرس الطبيعي

يتم الغرس في هذه الطريقة دون إذاء مورثات الناقل ويتم التعرف على العاثيات الهجينة بأساليب أخرى . فمثلاً العاثي لامبدا لا يتمكن من إصابة بكتيريا القولون E.coli طالما احتوت المادة الوراثية للبكتيريا على بلازميد مندمج يدعى بـ P2 ويرمز لهذه العاثيات بـ $SPi^{+}$ . لقد تم تحوير مثل هذه العاثيات بحيث إنه عند هندسة قطعة حامض نووي غريبة فيها فأنها تتحول الى $SPi^{-}$ ولذلك فأن العاثيات الهجينة ستتمكن من إصابة البكتيريا الحاوية على البلازميد P2 بينما لا تتمكن من ذلك العاثيات غير الهجينة . وعادة ما تستخدم هذه البكتيريا عند استخدام مثل هذه النواقل (الشكل 5-18) .

كما تستخدم طريقة أخرى لتمييز العاثيات الهجينة اعتماداً على حجم المادة الوراثية للعاثي حيث إن معظم العاثيات المشتقة من العاثي لامبدا تفتقد إلى قطعة حامض نووي بحجم 37 كيلو قاعدة ولا تتمكن هذه العاثيات من إعطاء عاثيات ناضجة عند التحام أذرعها سوية أو مع قطع حامض نووي غريب ذي حجم أقل من 37 كيلو قاعدة . ولكن يمكن الحصول على عاثيات ناضجة فقط عند هندسة قطع حامض نووي لا يقل حجمها عن 37 ولا يزيد عن 32 كيلو قاعدة . ولذلك فعند هندسة هذه العاثيات فانه يمكن تمييز العاثيات الهجينة (ذات القطع37-52 كيلو قاعدة) عن غير الهجينة من النمو . فعند زراعة البكتيريا المصابة بالعاثيات فأن العاثيات غير الهجينة ستفشل في النمو بينما ستنمو العاثيات الهجينة (ويمكن ملاحظة ذلك من تحلل البكتيريا فالبكتيريا غير المتحللة نتيجة عدم نمو العاثيات تبدو كمستعمرات بكتيرية واضحة بينما تتحلل مستعمرات البكتيريا المصابة بالعاثيات الهجينة) .




**(شكل5-17) : ستراتيجية الغرس التثبيطي في العاثي لامبدا CI. ويلاحظ بأن قطعة الحامض النووي الغريبة تقع بين جنبات المورث CI مما يؤدي إلى اتلافه وتوقفه عن التعبير وتظهر مستعمرات العاثيات الهجينة رائقة المظهر بينما تظهر مستعمرات العاثيات غير الهجينة عكرة المظهر**




(الشكل5-18): ستراتيجية استخدام بكتيريا القولون سلالة $Spi^+$ لتنمية العاثيات الهجينة حيث لا تتمكن العاثيات غير الهجينة من إصابة البكتيريا بسبب التحام البلازميد P2 مع المادة الوراثية الخلوية

كما يحدث الغرس دون تثبيط واستخلاص العاثيات الهجينة بنفس الطريقة التي تم الحديث عنها في البلازميدات والاختلاف الوحيد هو في محاليل استخلاص الحامض النووي العاثي . (لاحظ الفصول القادمة حول ذلك) .

## عاثيات بكتيريا القولون *E.coli* كنواقل للهندسة الوراثية

### أولاً: العاثيات مزدوجة شريط الحامض النووي *DNA*

**1 . العاثي لامبدا λ**

وهو أحد الرواشح الكبيرة الحجم والمعقدة .إذ يبلغ حجم جينومه حوالي 49 كيلو قاعدة ويحتوي على العديد من المورثات المسؤولة عن التضاعف وبناء البروتينات .

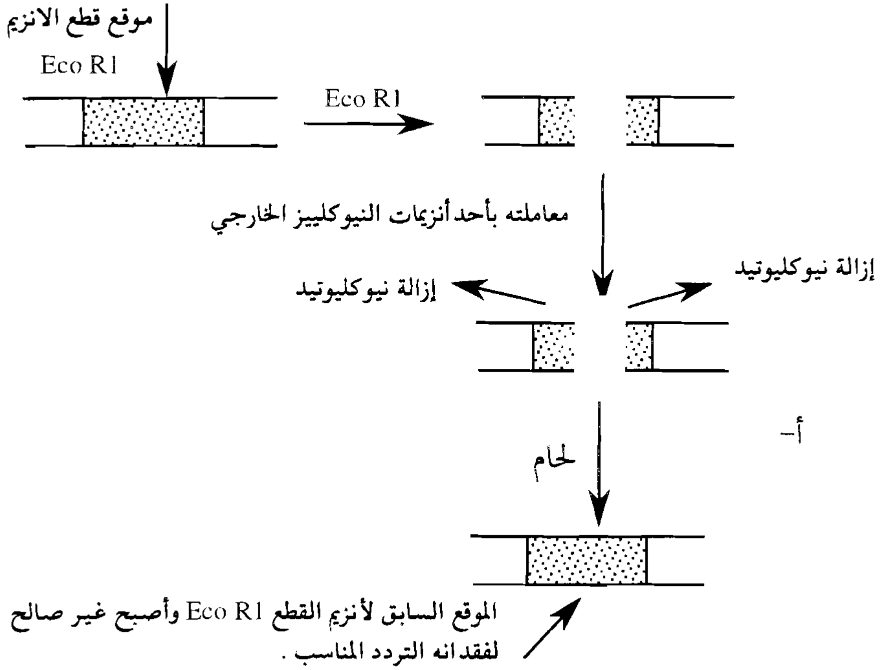
تأتي أهمية هذا العاثي ليست في صورته الطبيعية بل في المشتقات العديدة له حيث تم بناء العديد من العاثيات عن طريق تحويره . ونظراً لاحتواء الصورة الطبيعية للعاثي على العديد من المواقع الخاصة بالأنزيمات القاطعة فأنه من الصعوبة استخدامه في الهندسة الوراثية ومع ذلك فأنه يمكن استخدامه في هندسة قطع حامض نووي DNA صغيرة الحجم ولا تتجاوز 3 كيلو قاعدة مع وجود صعوبات في استخلاصه (الشكل5-12 ) .

**مشتقات العاثي لامبدا**

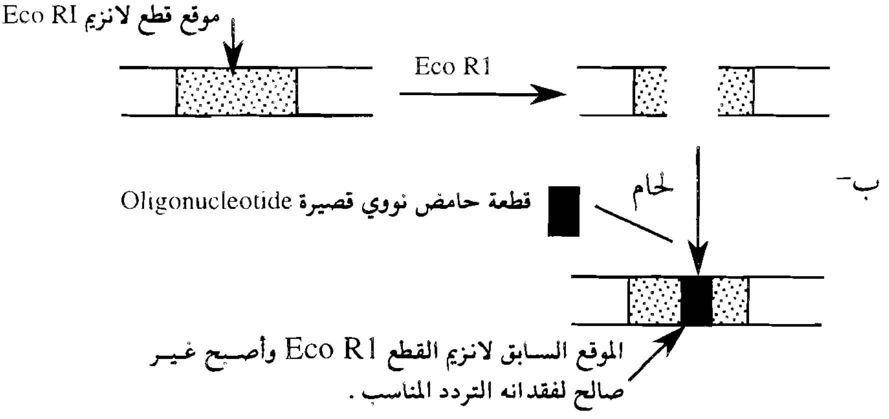
المشتقات، هي عاثيات غير طبيعية يتم إنتاجها مختبرياً باستخدام طرق الهندسة الوراثية . أذ تتم إزالة قطع غير ضرورية من الحامض النووي الخاص بالعاثي وجعله أصغر حجماً مما يزيد من كفاءته في الهندسة . لقد استهدف العمل لإنتاج مشتقات من هذا العاثي المواقع المتكررة لبعض الأنزيمات القاطعة حيث تم التخلص من عدد من هذه المواقع وإنتاج عاثيات ذات مواقع مفردة لأنزيمات القطع مع المحافظة على مواقع مورثات التضاعف وإنتاج البروتينات مما جعل العمل مع هذه العاثيات أسهل بكثير من العاثي الطبيعي .

وقد تمت إزالة حوالي 18 كيلو قاعدة من العاثي الأصلي مع الحفاظ على قابلية إصابته وتضاعفه وبذلك تم رفع كفاءة الهندسة فيه إلى حوالي 15 كيلو قاعدة مقارنة مع 3 كيلو قاعدة من العاثي الطبيعي . إلا أن معظم العاثيات المشتقة فقدت عدداً من المورثات الضرورية لالتحامها مع الماده الوراثية الخلوية لذلك فأن المشتقات الجديدة لا تتمكن من دخول الدورة الانحلالية وتسلك كعاثيات محللة . كما استهدف العمل مع العاثي الطبيعي توفير مواقع مفردة لأنزيمات قاطعة جديدة لجعل العمل أكثر يسراً وسهولة . ويذكر بأن المادة الوراثية للعاثي الطبيعي تحتوي على ستة مواقع قطع للانزيم BglII وخمسة مواقع قطع للانزيم Bam H1 وموقعين خاصين بالانزيم Sal I إضافة إلى عدد آخر من المواقع الخاصة بأنزيمات أخرى . يتم التخلص من المواقع المتكررة الزائدة الخاصة بأنزيمات القطع باستخدام طرق التطفير خارج الخلايا In vitro mutagenesis أو الانتخاب الطبيعي . ففي التطفير خارج الخلايا يتم تغيير قاعدة نايتروجينية واحدة داخل موقع القطع بحيث يصبح الموقع غير نافع للأنزيم القاطع . فمثلاً في حالة التخلص من موقع للانزيم Bam H1 فأن التردد المستهدف G GATCC يمكن أن يصبح G GTTCC بإحلال الثايين بدلاً من الأدنين أو تغيير أية قاعدة ضمن التردد لنفس الغرض . كما يمكن فتح مواقع الانزيم عن طريق معاملة المادة الوراثية بالانزيم نفسه ثم تعزل القطع الناتجة وتعامل بأحد انزيمات النيوكلييز الخارجي Exonucleases حيث تتم إزالة قاعدة نايتروجينية من نهايات القطع ثم يتم لحام القطع مرة أخرى وهكذا يتم التخلص من مواقع الأنزيم ، كما يمكن غرس قطعة حامض نووي صناعية قصيرة جداً Oligonucleotide في موقع قطع الأنزيم بعد فتحه ثم إعادة اللحام حيث يؤدي ذلك إلى ضياع موقع قطع الأنزيم (الشكل5-19 ) .

أما استخدام الانتخاب الطبيعي فيعتمد على عزل سلالات من العاثيات ذات الطفرة الوراثية في موقع واحد أو أكثر من مواقع قطع الأنزيمات . ويتم تصفية العاثيات الطافرة بإصابة بكتيريا القولون بالعاثيات وحيث إن هذه البكتيريا تمتلك العديد من أنزيمات القطع فأنها ستعمل على تدمير العاثيات التي تمتلك مواقع قطع لانزيماتها بينما تبقى العاثيات الطافرة دون ضرر . وبعزل هذه الأفراد وتكرار الإصابة فأنه من الممكن الحصول على عاثيات فاقدة للعديد من مواقع القطع الأنزيمية .




أ- تغيير تردد موقع قطع أنزيم عن طريق استخدام أنزيمات النيوكلييز الخارجية .




ب-تغيير تردد موقع قطع أنزيم عن طريق استخدام قطعه حامض نووي قصيره .

(الشكل5-19) : بعض الطرق المستخدمة في التطفير خارج الخلايا.

**العاثي شارون 16A** *Charon 16A*

أحد مشتقات العاثي لامبدا والذي يستخدم كناقل غرس تثبيطي . اشتق هذا العاثي عن طريق إزالة المنطقة المركزية من الحامض النووي للعاثي لا مبدا والتي يبلغ حجمها حوالي 18 كيلو قاعدة وأضيف بدلها المورث $Lac\ Z^-$ الذي يحتوي على موقع فريد للأنزيم EcoR1 .

يستوعب هذا الناقل قطعاً من الحامض النووي الغريب بحجم يتراوح بين 10-15 كيلو قاعدة وتغرس هذه القطع بين جنبات المورث $Lac\ Z^-$ بعد قطعه بالأنزيم EcoR1 . يتم التعرف على العاثيات الهجينة باستخدام الشبيه الكيميائي X-gal حسب ما تم شرحه سابقاً (الشكل 5-9) .

**العاثي لامبدا** *NM 607*

ويشتق بإزالة المنطقة المركزية من العاثي لامبدا وإضافة المورث CI الذي يحتوي على موقع مفرد للأنزيم القاطع EcoR1 . لهذا السبب فهو من نواقل الغرس التثبيطي . يستوعب هذا الناقل قطعاً من الحامض النووي الغريب بحجم يتراوح بين 9-15 كيلو قاعدة .

تغرس القطع المطلوب هندستها بين جنبات المورث CI بعد قطعه بواسطة الأنزيمEcoR1 ويتم تمييز العاثيات الهجينة عن طريق اللون الرائق للمستعمرات البكتيرية (الشكل5-17 ) .

**العاثيات** *EMBL4* و *EMBL5*

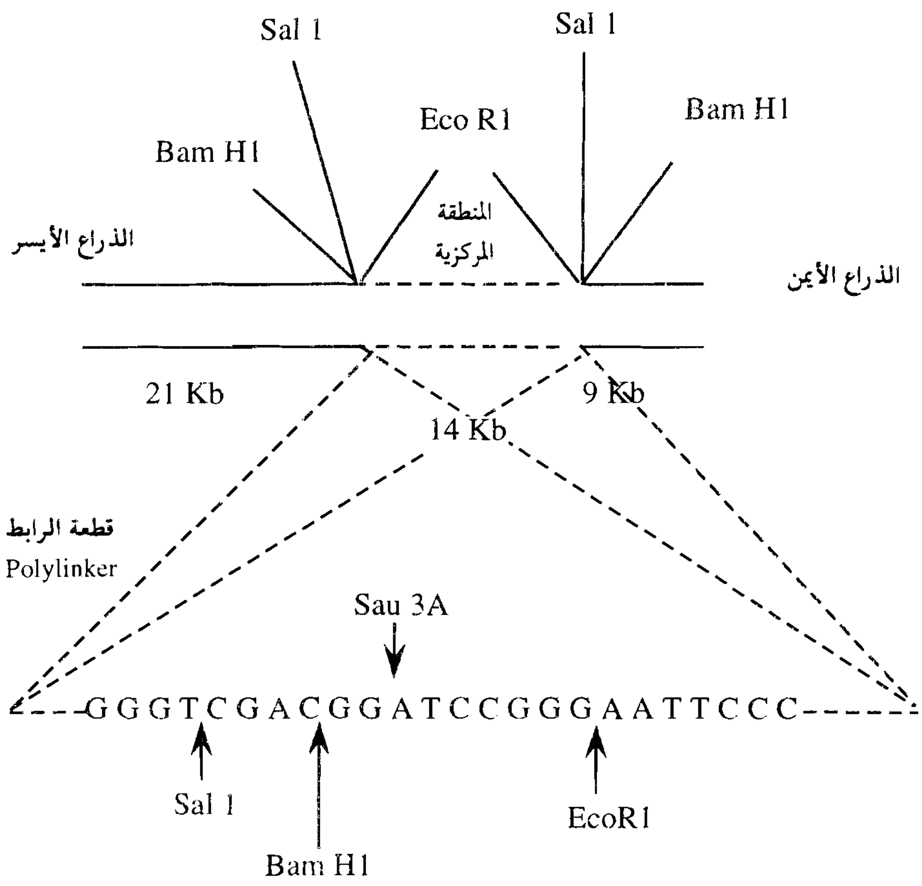
نواقل استبدال تم اشتقاقها عن طريق قطع المنطقة المركزية للعاثي لامبدا ثم ربط نهايات القطعة المركزية بتوصيلات Adaptorsأو روابط Linkers (التوصيلات والروابط ترددات صغيرة الحجم تحتوي على موقع فريد لأكثر من أنزيم قاطع) . تحتوي روابط القطعة المركزية في هذه العاثيات المشتقة على مواقع فريدة لثلاثة من أنزيمات القطع و هي EcoR1 و BamH1 وSal1 . ويمكن عن طريق هذه المواقع قطع الحامض

النووي للعاثي إلى ثلاثة أجزاء هي الطرف الأيمن والطرف الأيسر والمنطقة المركزية ويمكن غرس قطع الحامض النووي الغريب بدلاً من القطعة المركزية (الشكل5-20) . ويمكن لهذه العاثيات أن تستوعب اكثر من 23 كيلو قاعدة من الحامض النووي الغريب . ويمكن أن تستخدم بالهندسة الوراثية عن طريق الاستخدام العشوائي حيث تخلط قطع الحامض النووي الغريب مع الأجزاء الثلاثة للعاثي ويضاف أنزيم اللحام والبقر الخاص بذلك ويترك الغرس يحصل بصوره عشوائية حيث تلتحم بعض قطع الحامض النووي الغريب مع أذرع العاثي لإنتاج عاثيات هجينة . كما يحصل أن يعاد التحام القطعة المركزية في موقعها بين الأذرع لإنتاج عاثيات غير هجينة ويمكن تمييزها عن طريق استخلاص الحامض النووي لها بعد الإصابة وتحليله بواسطة الهجرة الكهربائية والقطع بواسطة الأنزيمات القاطعة . ولأجل الحصول على كفاءة هندسة عالية فانه يفضل فصل قطع العاثي عن طريق الطرد المركزي الفائق بوجود ملح كلوريد السيزيوم أو القاعدة واستخدام الأذرع فقط والتخلص من القطعة الوسطية .

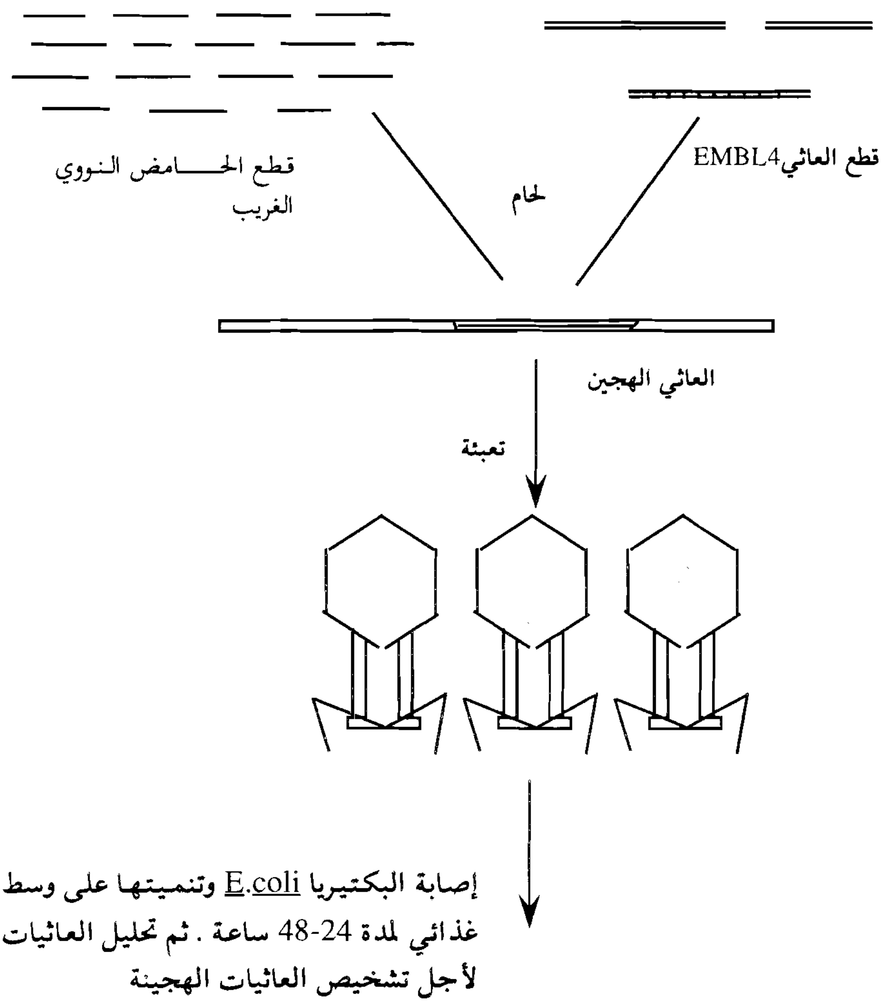
كما يمكن الحصول على الأذرع فقط عن طريق الهجرة الكهربائية لها خلال هلام الاجاروز ثم عزل مواقع الأذرع فقط (الاشكال 5-21 و 5-22 و 5-23) .

ويمكن تمييز العاثيات الهجينة أيضاً عن طريق إصابة بكتيريا القولون E.coli سلالة 322 الحاوية على البلازميدP2 .

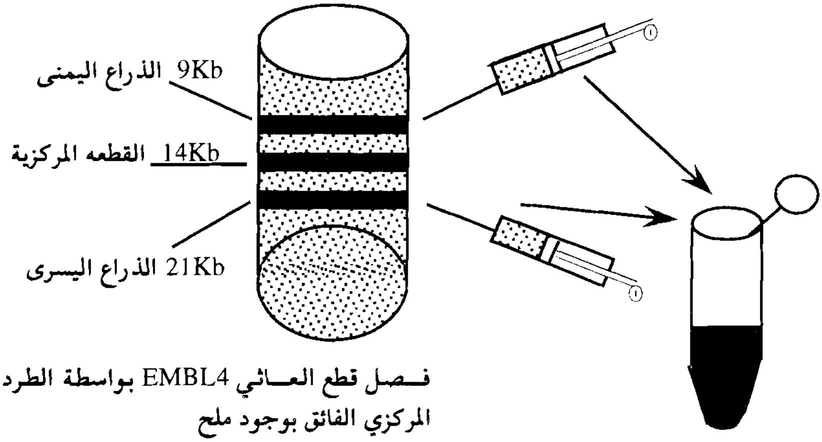
إذ تتمكن العاثيات الهجينة فقط من النمو .




(الشكل5-20) : الناقل EMBL4 المؤلف من ثلاث قطع وهي الطرف الأيمن والأيسر والمنطقة المركزية ويلاحظ موقع الروابط الموصولة في نهايات القطعة المركزية. تعطي هذه الروابط حرية اختيار أكثر من انزيم قاطع واحد في الهندسة




(الشكل5-21): ستراتيجية الهندسة الوراثية باستخدام الناقل EMBL4 المشتق من العائي لامبدا ويلاحظ حصول الغرس بالاحلال أو الاستبدال حيث تغرس القطعة الغريبة بدلاً من المنطقة المركزية للناقل

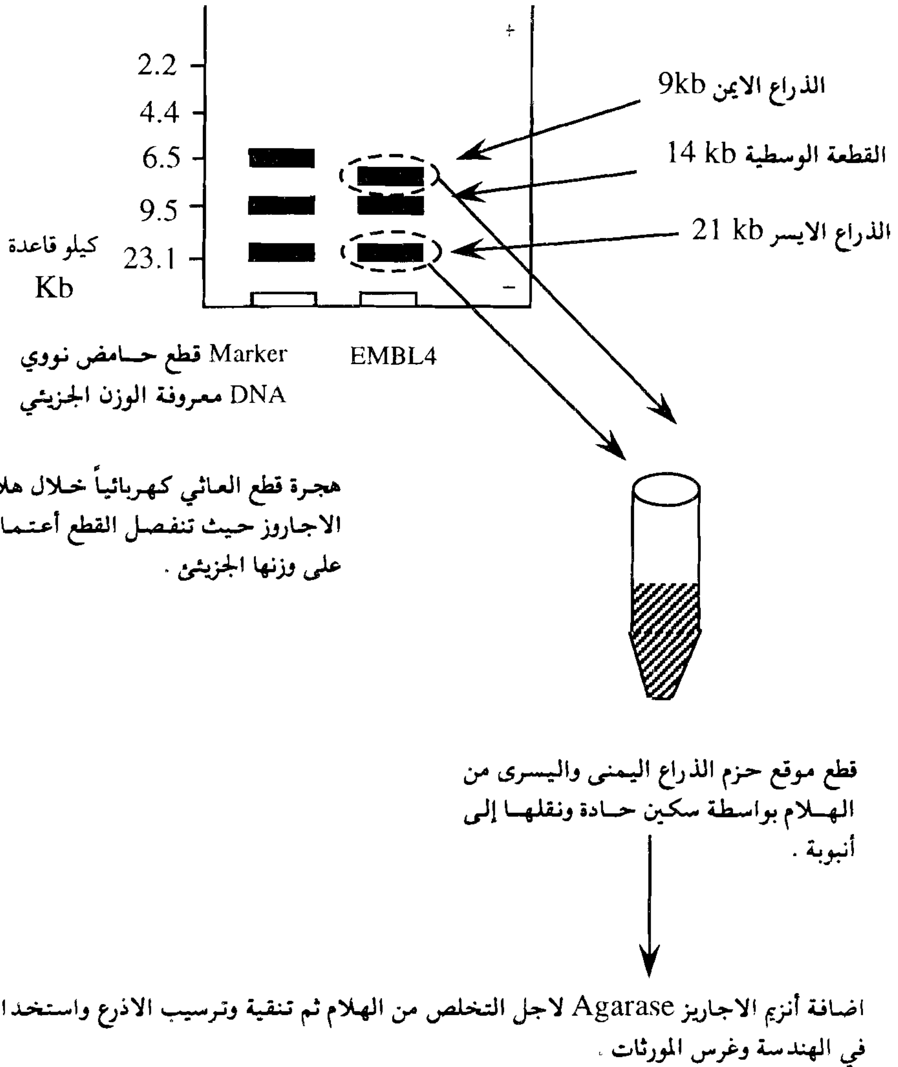



فصل الذراع الايمن والايسر بواسطة الحقن الطبية وتجميعها في أنبوبة واحدة

↓

تنقية الاذرع (لاحظ طرق التنقية والاستخلاص في الفصول الاخرى) ثم أستخدامها في الهندسة وغرس المورثات .

**(الشكل5-22) : طريقة تنقية أذرع الناقل EMBL4 بواسطة الطرد المركزي الفائق باستخدام محلول ملحي حيث تنفصل القطع اعتماداً على وزنها الجزيئي واعتماداً على كثافة المدرج الملحي.**




(الشكل5-23) : طريقة الهجرة الكهربائية خلال هلام الاجاروز حيث تنفصل قطع الناقل EMBL4 اعتماداً على أوزانها الجزيئية وبعد صبغ الهلام واضاءته يتم قطع موقع الأذرع وثم تنقيتها لأجل التخلص من القطعة الوسطية لزيادة كفاءة الهندسة باستخدام هذا الناقل

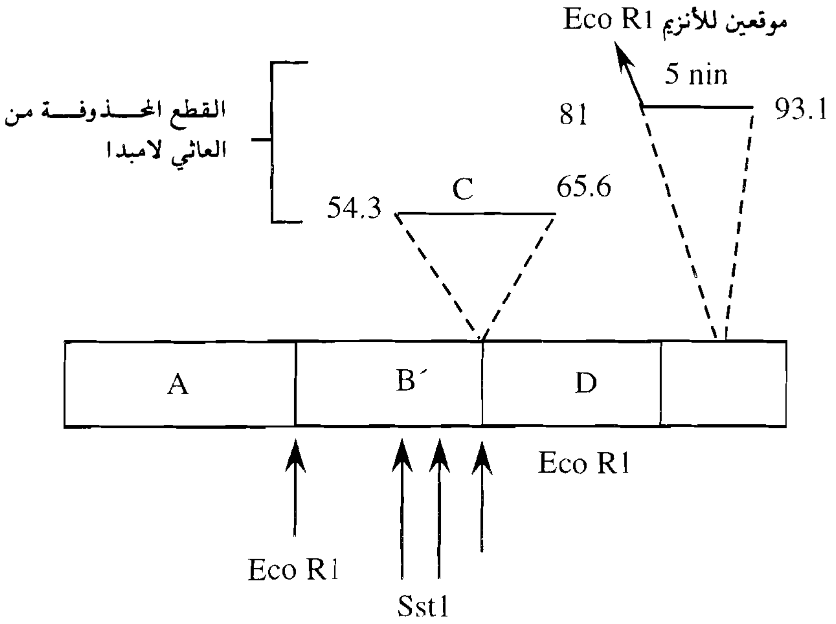
**العاثي لامبدا** -$\lambda WES\ \lambda\ B$ :

أشتق هذا العاثي نتيجة إزالة حوالي 17.4% من طول العاثي لامبدا الطبيعي . إذ حذف الموقعين C و nin 5 وكذلك إزالة المواقع الطرفية للأنزيم EcoR1 . كما تم فصل القطعة B عن طريق استخدام مواقع قطع الأنزيم EcoR1 التي تحيط بهذه القطعة وثم ربطت مرة ثانية بشكل معكوس ورمز لها بالقطعة -B وتمثل هذه المنطقة التي يتم بدلاً عنها غرس قطع الحامض النووي الغريب (الشكل5-24) .

2- **العاثي ميو** Mu :

وهو من العاثيات مزدوجة الحامض النووي DNA ويصيب البكتيريا <u>E.coli</u> السلاله K . يمتلك هذا العاثي قطعة حامض نووي بكتيري تقع على طرفي مادته الوراثية . يتضاعف هذا العاثي كعاثٍ محلل ويدخل البكتيريا ليتخلص من قطع الحامض النووي البكتيري المرتبطة مع مادته الوراثية ثم يلتحم كعاثٍ أولي أو ابتدائي مع الحامض النووي البكتيري . وبعد التضاعف تنفصل العاثيات الجديدة ويتم تعبئتها لإنتاج الأجيال الجديدة . ويذكر أن هذه العاثيات تحمل قطعاً مختلفة من الحامض النووي البكتيري لذلك فأن هذا العاثي يعتبر مهماً في دراسات الخرائط الوراثية لهذه السلالة من البكتيريا أو أنواع أخرى مثل الشيكلا وغيرها .

كما يمكن توسيع عوائله عن طريق فك القطعة G وإعادة لحامها بصورة معكوسة -G ويحدث ذلك تلقائياً خلال مرور العاثيات بالدورة الانحلالية (الشكل5-25) .




**(الشكل 5-24) : الخارطة الوراثية المبسطة للعاثي لامبدا ⁻λWESλ B. ويلاحظ ان اشتقاقها تم من خلال حذف القطعة C والموقع 5nin (الخطوط المتقطعة) ويلاحظ ان العاثي الجديد يحتوي على موقعين للأنزيم EcoR1 يحيطان بالقطعة -B التي ربطت بالمعكوس في هذا العاثي**

ويذكر أن حجم قطعة الحامض النووي البكتيري التي ترتبط مع الجهة اليسرى من المادة الوراثية للعاثي يبلغ 50-100زوج قاعدي بينما يبلغ حجم القطعة المرتبطة بالجهة اليمنى 1000-2000 زوج قاعدي . لقد تم اشتقاق عاثٍ واحد من هذا الناقل أطلق عليه Mud حيث ربط جزء من أوبرون اللاكتوز المسؤول عن البيتاجلاكتوز Lac c- ويمكن استخدامه في الهندسة الوراثية عن طريق ربط قطع الحامض النووي الغريبة في موقع وسطي في هذا المورث ويمكن تمييز العاثيات الهجينة باستخدام المادة X-gal . ويذكر أن هذا التحوير قد رفع كفاءة الناقل Mu بحيث يتمكن المشتق الجديد من استيعاب قطع حامض نووي تتجاوز في حجمها 15 كيلو قاعدة .

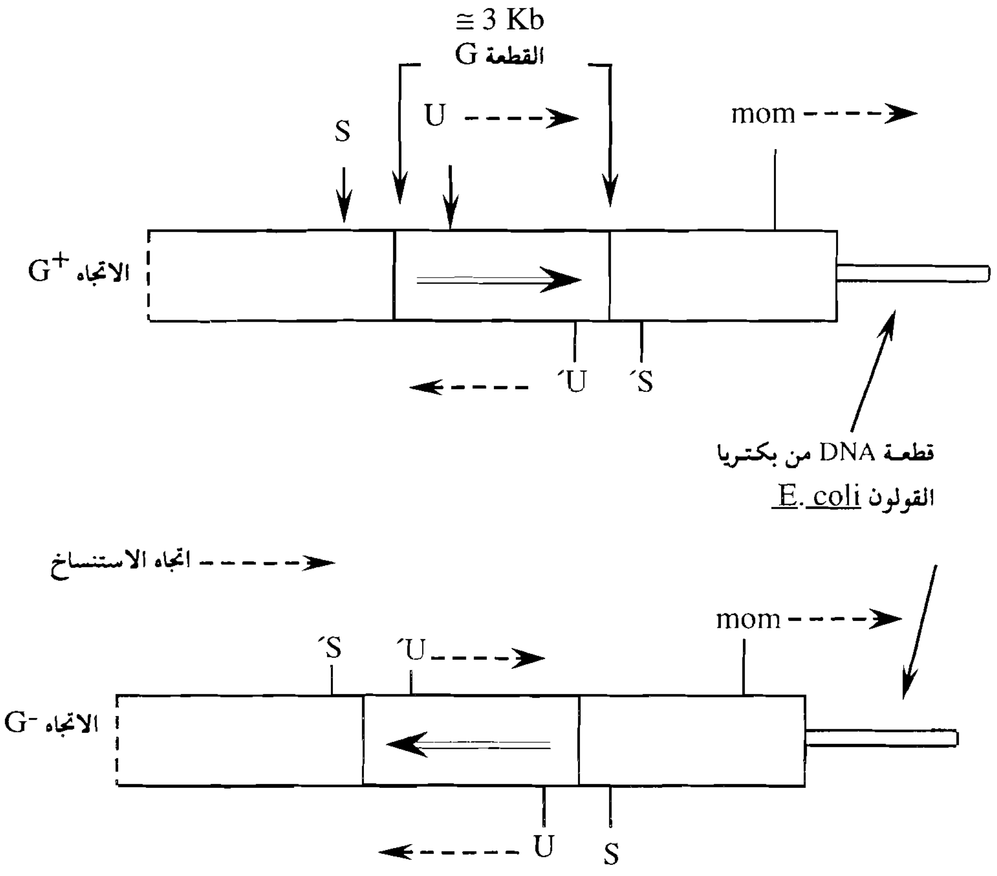
## ثانياً: العاثيات مفردة شريط الحامض النووي *DNA*

تضم هذه العاثيات مجموعتين يتراوح حجم مادتها الوراثية بين 5000-6000 نيوكليوتيد وتشفر10-11 مورثاً . تختلف هاتان المجموعتان في تركيبها وطريقة إصابتها . حيث تتميز المجموعة الأولى بتضلع غلافها البروتيني Polyhedral ويتميز غلافها بالسطوح المتعددة Icosahedral وتضم العاثيات QX174 وS13وG4 (الشكل5-26 ) .

تقوم هذه العاثيات بإصابة البكتيريا بعد استقرارها على الجدار الخارجي عن طريق حقن مادتها الوراثية التي تتحول إلى مزدوج حلقي . ثم يقوم المزدوج بإنتاج أجيال جديدة ذات خيط مفرد يتم تعبئتها بالأغلفة الخاصة وتنطلق بعد أن تحلل خلايا البكتيريا المصابة .

أما المجموعة الثانية فهي العاثيات مفردة شريط الحامض النووي الخيطيFilamentous phages . تضم هذه المجموعة عاثيات سميكة الغلاف تصيب البكتيريا عن طريق تكوين أنبوب تحقن من خلاله مادتها الوراثية وتتضاعف بنفس الطريقة السابقة إلا أنها لا تؤدي إلى تحلل مضائفها . اذ يلتحم غلاف العاثي مع الغشاء الخلوي للبكتيريا وحال تكوين أجيال جديدة من المادة الوراثية فأنها تحاط ببروتين خاص لأجل حمايتها من الأنزيمات ثم تندفع بأتجاه الغشاء الخلوي حيث تحاط بالأغلفة الملتحمة وتخرج دون أن تسبب بتحلل الخلايا .

تعتبر هذه المجموعة مهمة في الهندسة الوراثية حيث يمكن عزلها كمزدوج أو كشريط مفرد إضافة إلى وجودها بحجوم مختلفة . كما يمكن استخدامها كنواقل مشابهة للبلازميدات . تتضمن هذه المجموعة العاثيات M13وf1 وfd ويعتبر العاثيM13 أهم هذه المجموعة لمناسبته في الهندسة الوراثية ولوجود مشتقات عديدة منه .




(الشكل 5-25): العاثي ميو Mu وآلية انفصال القطعة G والتحامها بصورة معكوسة خلال الدورة الانحلالية له. S و U و-S و-U مورثات مشفرة لبروتينات ألياف الذيل. mom مورث مشفر لأنزيم يعمل على تحوير قواعد الأدنين في المادة الوراثية للعاثي بعد دخوله للمضيف لأجل حمايتها من هجوم الأنزيمات القاطعة الخاصة بالمضيف

**العاثي** *QX174*

يتألف شريط الحامض النووي DNA لهذا العاثي من 5375 نيوكليوتيدات تؤلف 10مورثات . يعتبر هذا العاثي من أوائل العاثيات التي تمت معرفة خرائطها الوراثية حيث نشرت كامل خريطته الوراثية عام 1975 .

يعتبر هذا العاثي بنفس أهمية العاثي M13 في الأبحاث الخاصة بدراسة الخرائط الوراثية إلا أنه من الصعب اشتقاق عاثيات أخرى منه لاحتوائه على مورثات متداخلة Overlapping genes وكذلك لوجود عدة مورثات مسؤولة عن تضاعفه ولكنه يستخدم بكثرة في أبحاث إصلاح الحامض النووي DNA Repair . إذ تتم معاملة شريط الحامض النووي له بحامض الهيدروكلوريك لفترة قصيرة للحصول على حامض نووي يحتوي على حذف في بعض القواعد البيورينية Apurinic DNA وثم تتم إصابة خلايا الفايبروبلاست المحطمة الغشاء جزيئاً لمعرفة قدرة هذه الخلايا على إصلاح الحامض النووي (الشكل5-27 ) .

**العاثي** *M13*

تتألف المادة الوراثية لهذا العاثي من شريط مفرد حلقي مؤلف من 6407 نيوكليوتيدات ويشفر لحوالي 10 مورثات (الشكل 5-28 ) .

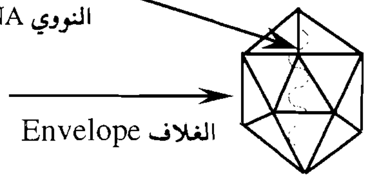
يعتبر هذا العاثي جذاباً في الهندسة الوراثية لعدة خصائص أهمها :

1 . محتواه الوراثي أقل من 10 كيلو قاعدة وهو حجم مثالي للنواقل .

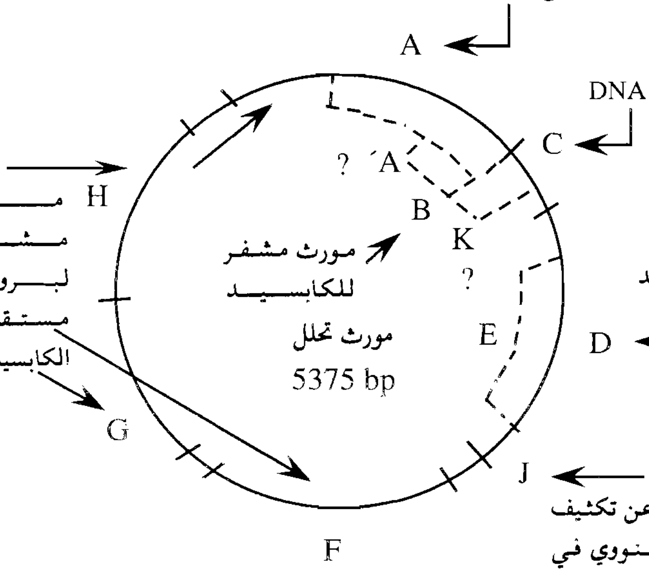
2 . إن مزدوج الحامض النووي لها (بعد الإصابة) يسلك سلوكاً مشابهاً للبلازميد داخل الخلايا .

3 . يمكن عزله بسهولة وكذلك إعادة الإصابة به .

4 . يمكن غرس مورثات مفردة الشريط وهي ضرورية في بعض الأبحاث مثل قراءة ترددات الحامض النووي DNA Sequencing والتطفير خارج الخلايا .




(الشكل 5-27): الشكل العام للعاثيات المضلعة مفردة شريط الحامض النووي




(الشكل 5-27) : الخريطة الوراثية للعاثي ϕ X174 ويظهر تداخل المورثات-A ،B ،K ،E مع المورثات A وC و D.

## مشتقات العاثي *M13*

### أولاً: العاثي *M13 mp*

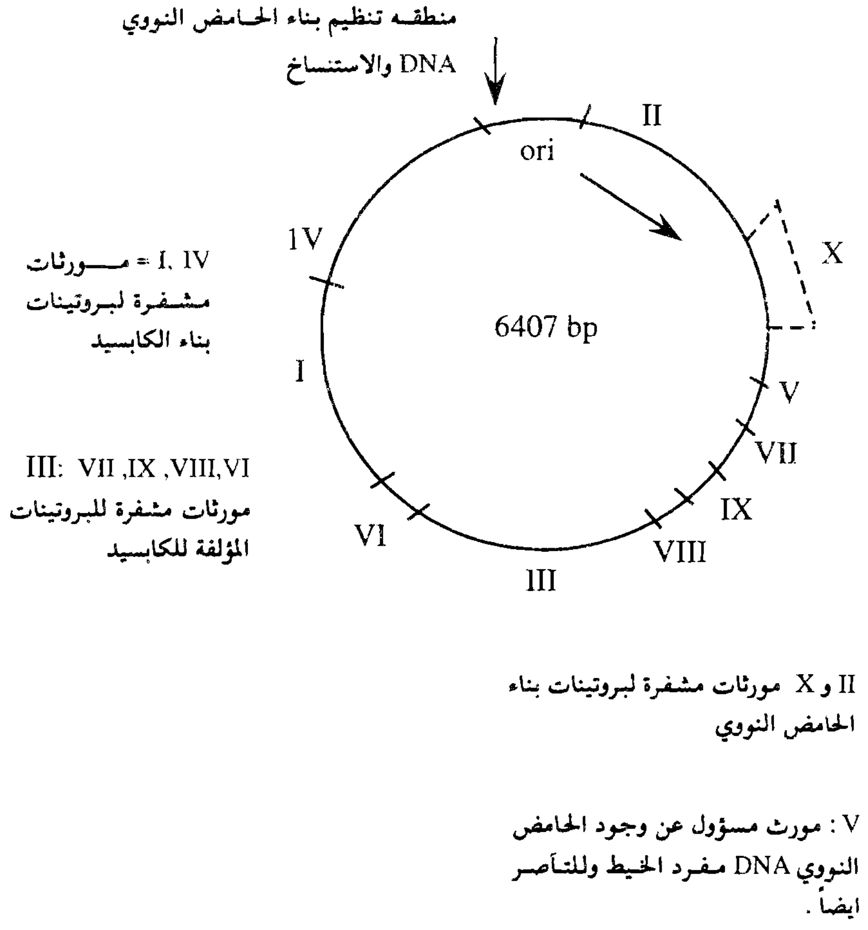
تشتق هذه العاثيات من طريقة إضافة المورث $LacZ^-$ في الموقع S1 الذي يتألف من 507 نيوكليوتيدات ولا يحتوي المورث $LacZ^-$ المغروس على أي موقع للقطع بواسطة الأنزيمات . سمي هذا المشتق بـ M13mp1 . يحتوي المورث $LacZ^-$ في العاثي السابق على تردد GGATTC يقع في بدايته وباستخدام طريقه التطفير خارج الخلايا فأنه يمكن استبدال G بالأدنين A والحصول على التردد GAATTC وهو موقع قطع للأنزيم EcoR1 سمي هذا المشتق بـ -M13mp2 . وعلى الرغم من حصول استبدال في إحدى قواعد المورث $LacZ^-$ إلا أنه وجد أن نشاط الأنزيم لا يتضرر ويمكن تمييز العاثيات الهجينة باستخدام المادة X-gal .

### ثانياً: عاثيات أخرى مشتقة من العاثي *M13*

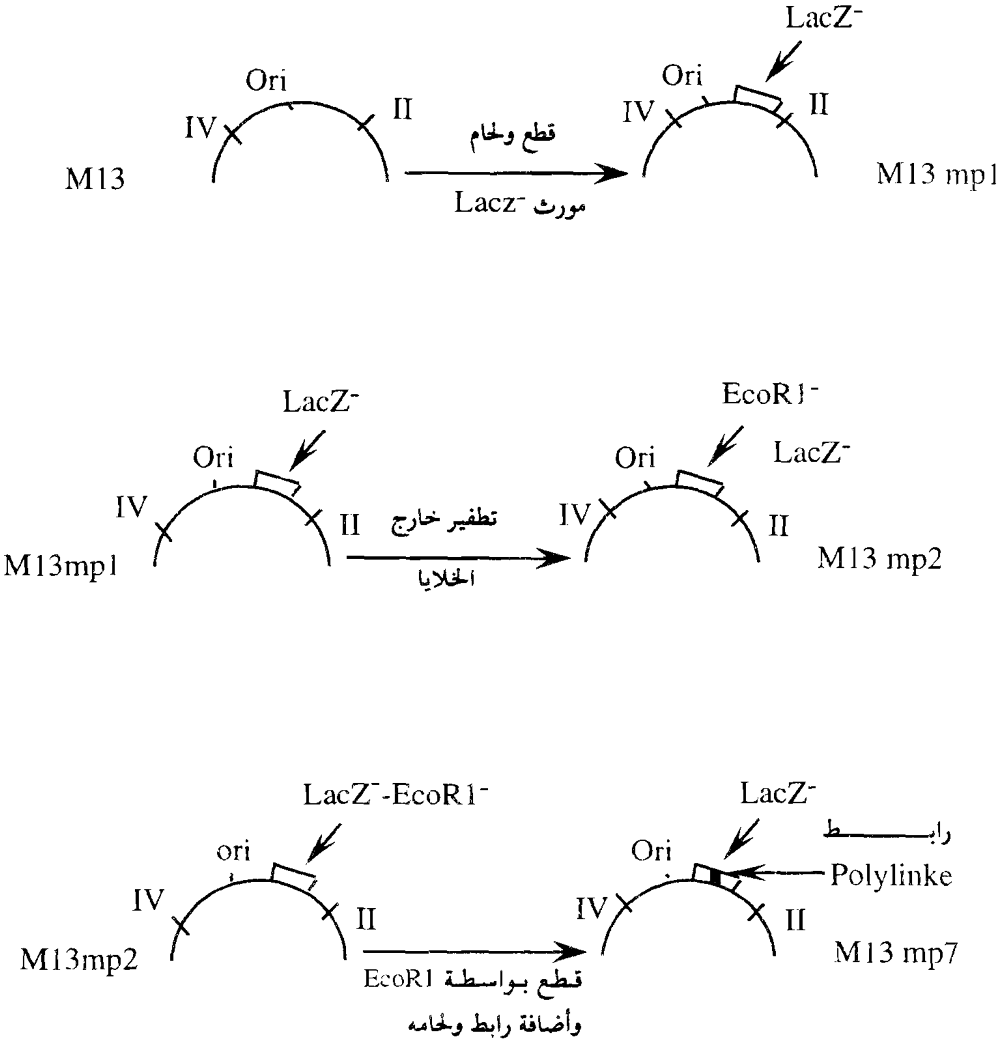
لقد أشتق العديد من العاثيات الجديدة من العاثي M13 من خلال خلق مواقع جديدة للقطع ولأنزيمات مختلفة إضافة إلى الانزيم EcoR1 لأجل زيادة كفاءة العاثيات .

تقوم فكرة خلق مواقع جديدة للقطع على استخدام الروابط المتعددة Polylinkers . يغرس هذا التردد عادة في موقع قطع الأنزيم Eco R1 (بعد كسره) الكائن في المورث $LacZ^-$ دون أن يؤثر في نشاط المورث . ويمكن غرس أو هندسة قطع الحامض النووي الغريبة في أي موقع من مواقع الأنزيمات الجديدة ويمكن عزل العاثيات الهجينة بمساعدة المادة X-gal . لقد أشتق العاثيM13mp7 بهذه الطريقة واحتوى الرابط المضاف على ثلاثة مواقع مفردة لأنزيمات القطع EcoR1 و BamHI و Sal I (الشكل 5-29) .

وقد استخدمت جزيئات روابط أخرى تحتوي مواقع مفردة لأنزيمات إضافية مثل سلسلة العاثيات M13 mp8- M13mp19 وقد اشتقت بعض هذه العاثيات عن طريق الغرس المعكوس لجزيئة الرابط كما هي الحال في العاثيات M13 mp 18 وM13 mp 19 و M13mp9 و M13 mp10 .




(الشكل 5-28): الخريطة الوراثية للعائي M13 ويلاحظ وجود تداخل مورث X مع المورث II




(الشكل 5-29): مشتقات مختلفة من العاثي M13 ويذكر بأن إضافة الرابط الى العاثي أعطى حرية أكبر في أستخدام انزيمات قاطعة أخرى لتوفر مواقع قطع مختلفة في الرابط

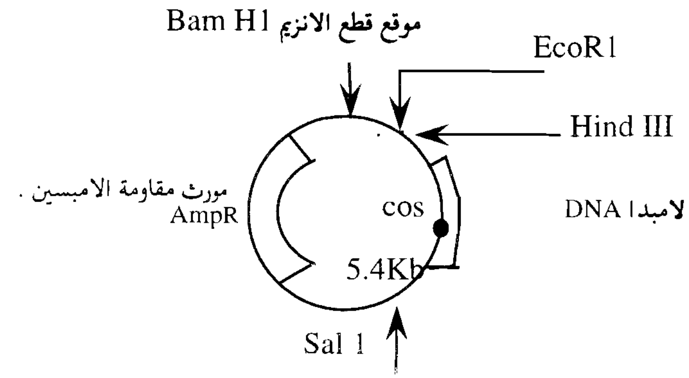
## الكوزميدات *Cosmids*

الكوزميدات هي هجن تجمع جزيئة حامض نووي عاثٍ وأخرى بلازميدية . تم تصميم الكوزميدات اعتماداً على حقيقة أن أنزيم تعبئة الحامض النووي العاثي في جزيئة البروتين لا يحتاج سوى إلى المواقع اللزجة التي يرمز لها بـ Cos للعمل . لهذا فأن عملية التعبئة المختبرية يمكن أن تحصل لأية قطعة حامض نووي تحمل المواقع اللزجة والتي يفصل بينها 37-52 كيلو قاعدة . لهذا فأن الكوزميد في الواقع بلازميد يحتوي على مواقع لزجة (الشكل5-30 ) .

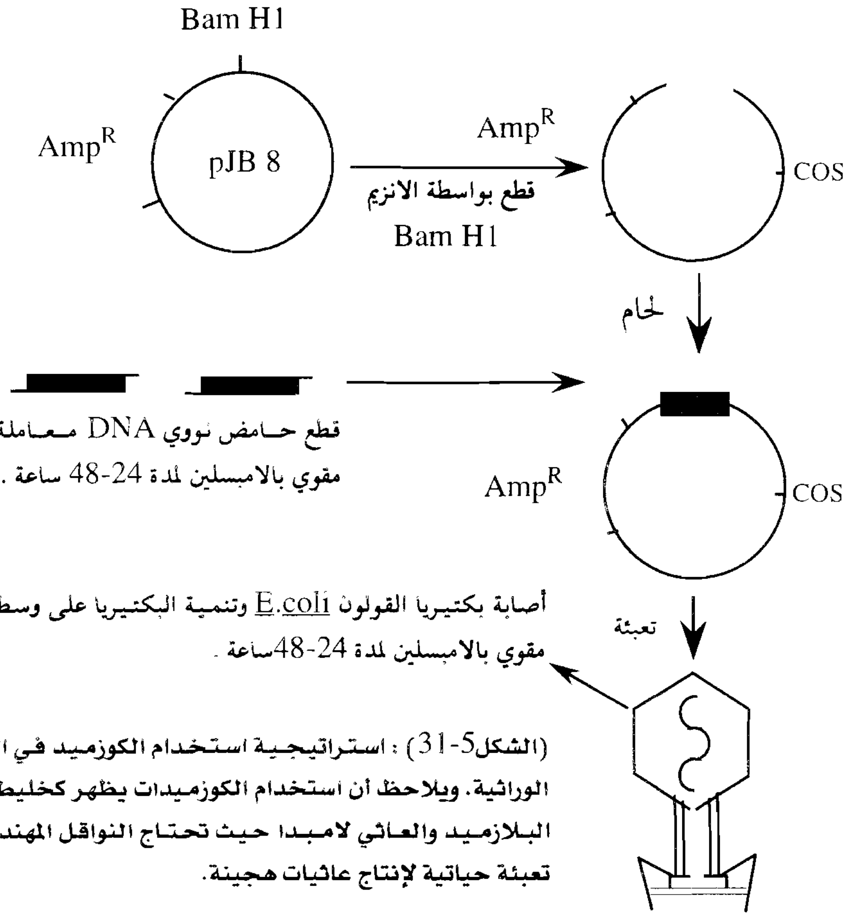
هذا بالإضافة إلى ضرورة وجود موقع مورث انتقائي مثل مورث مقاومة الأمبسلين وموقع أصل تضاعف . ونظراً لافتقاد الكوزميد لمورثات العاثي الأخرى فأنه لا ينتج التبقعات Plaques التي تتميز بها عاثيات لامبد بل ينمو كبلازميد داخل خلايا المضيف .

يتم استخدام الكوزميدات في الهندسة الوراثية عن طريق فتح موقع أنزيم القطع وغرس قطع الحامض النووي الغريبة بينها . وعادة ما يتم إنتاج قطع الحامض النووي المراد هندستها في الكوزميدات عن طريق الهضم الجزئي للحامض النووي بواسطة أنزيم قاطع معين . إذ أن الهضم الكلي يؤدي إلى إنتاج قطع حامض نووي صغيرة الحجم لا تصلح للهندسة في الكوزميدات . وبعد ذلك تعبئ هذه في البروتين لإنتاج عاثيات تستخدم لإصابة البكتيريا التي تنمى بعد ذلك على وسط انتقائي حاوية على الأمبسلين. إن جميع المستعمرات النامية تكون حاوية على الكوزميدات الهجينة حيث لا تتمكن الكوزميدات غير الهجينة أصلاً من التعبئة (الشكل5-31 ) . تصل كفاءة الهندسة الوراثية في الكوزميدات إلى أعلى ما يمكن فهي تستوعب قطعاً من الحامض النووي DNA يبلغ حجمها أكثر من40 كيلو قاعدة . وهو أكثر بكثير من مما تستوعبه البلازميدات أو العاثيات .

تعود هذه الكفاءة العالية إلى الحجم الصغير للكوزميدات وهوما جعلها أفضل النواقل المستخدمة في بناء بنوك المورثات Gene Banks .




(الشكل-5-30) : الكوزميد pJB8 . ويلاحظ فيه مناطق المشتقة من البلازميد PBR322 والموقع




(الشكل 5-31) : استراتيجية استخدام الكوزميد في الهندسة الوراثية. ويلاحظ أن استخدام الكوزميدات يظهر كخليط ما بين البلازميد والعاثي لامبدا حيث تحتاج النواقل المهندسة الى تعبئة حياتية لإنتاج عاثيات هجينة.

وأهم الكوزميدات المستخدمة C2XB (الشكل5-32 ) و PJB8 .

## الرواشح *Viruses*

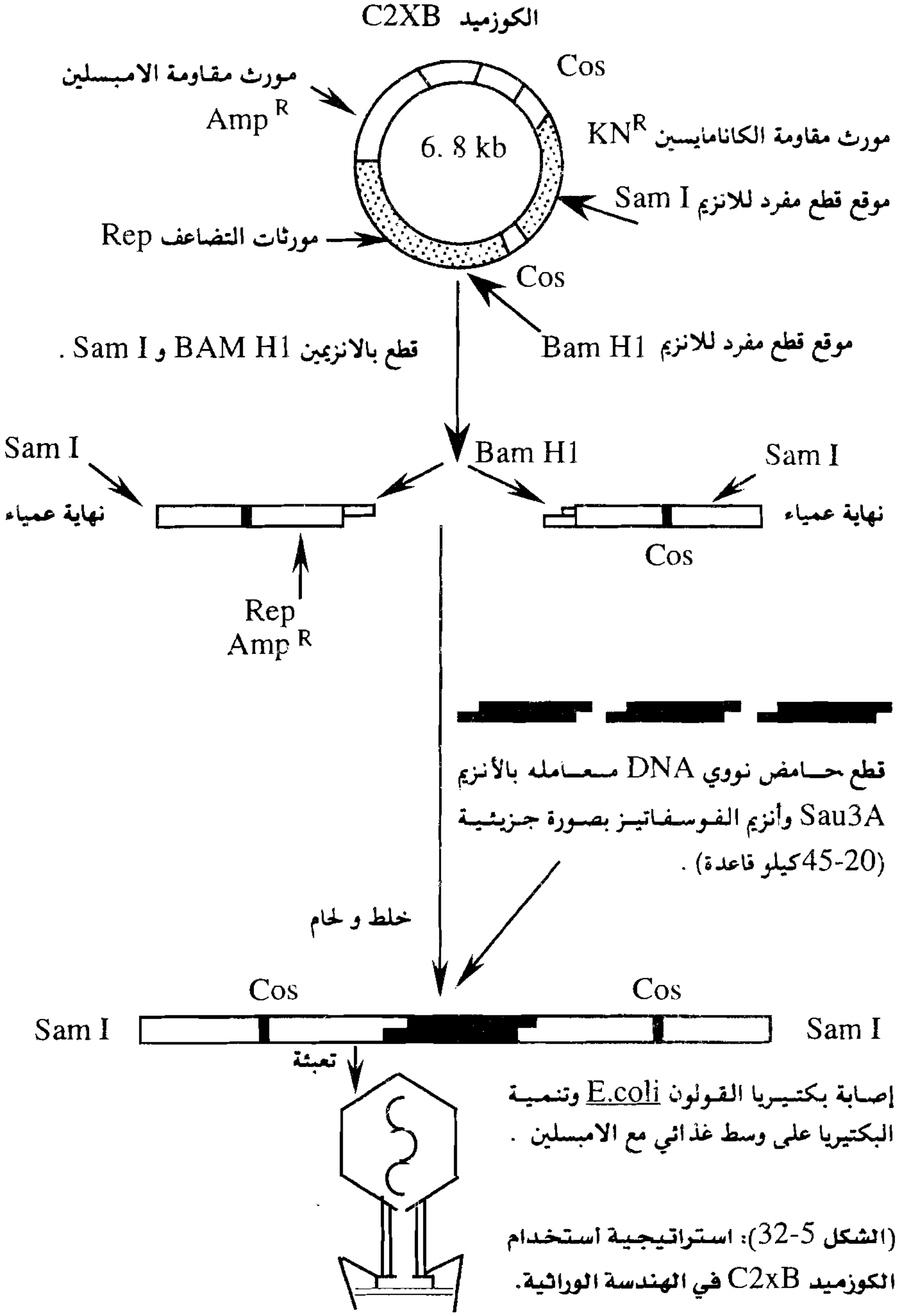
تعتبر الرواشح أقل الكائنات الصغيرة استخداماً كنواقل للهندسة الوراثية . ويعود ذلك لتخصص الرواشح ووجود تعقيدات كثيرة في مادتها الوراثية إضافة للخوف من احتمال ظهور سلالة ضارية يمكن أن تنشأ خطأً عند هندستها .

إلا أنه تم التعرف واستخدام عدد منها مثل راشح القرنابيطCamv و راشح السيمان 40 والبابيلوما البقري ورواشح جيمني .

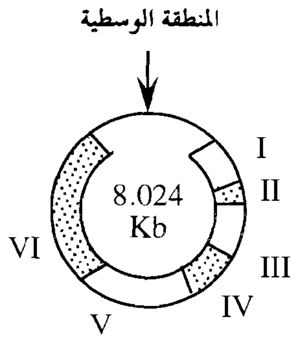
### أولاً: راشح القرنابيط *Caulimo virus Camv*

راشح القرنابيط هو راشح نباتي يصيب العديد من النباتات وتتألف مادته الوراثية من حامض نووي DNA يبلغ حجمه حوالي ثمانية كيلوقاعدة ويحتوي على ستة مورثات إضافة لقطعة وسطية Intergenic region . الخريطة الوراثية والأنزيمية له معروفة جيداً (الشكل5-33 ) ويمكن استخدامه كناقل هندسة وذلك بغرس قطع الحامض النووي الغريبة وسط المنطقة الوسطية دون أن يتأثر نشاط الراشح . الراشح سهل التعامل ويمكن أن تنتشر إصابته بسرعة ودون الحاجة إلى معاملات إضافية .

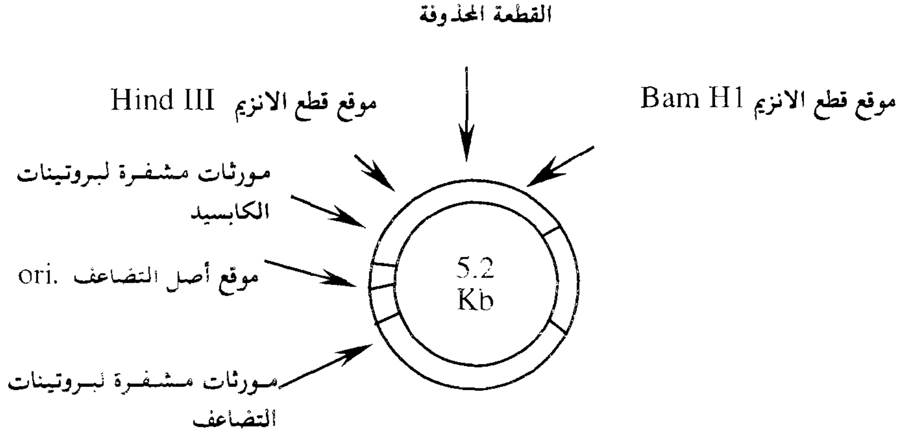
وعلى الرغم من كفاءة هذا الراشح كناقل في الهندسة الوراثية إلا أن هناك صعوبات تحد من كفاءته . أول هذه الصعوبات هي أن المادة الوراثية له تحتاج إلى تعبئة في البروتين بطريقة مماثلة لتعبئة العاثي لامبدا . لذلك فأن قدرته الاستيعابية تكون محدودة ولا تتجاوز 300 نيوكليوتيد . أما الصعوبة الأخرى فهي ضيق مدى عوائله حيث يصيب هذا الراشح عدداً قليلاً من النباتات التي تعود للمجموعتين Caulifolwer وTurnip . وهناك محاولات لزيادة قدرته الاستيعابية وزيادة أعداد مضائفه .




(الشكل 5-32): استراتيجية استخدام الكوزميد C2xB في الهندسة الوراثية.




(الشكل 5-33): خارطة مورثات راشح القرنابيط CaMV




(الشكل5-34) : خارطة عامة لراشح السيميات SV40 ويلاحظ القطعة المحذوفة منه لأجل اشتقاق الراشح SV40-5.

### ثانياً: رواشح جيمني *Gemini viruses*

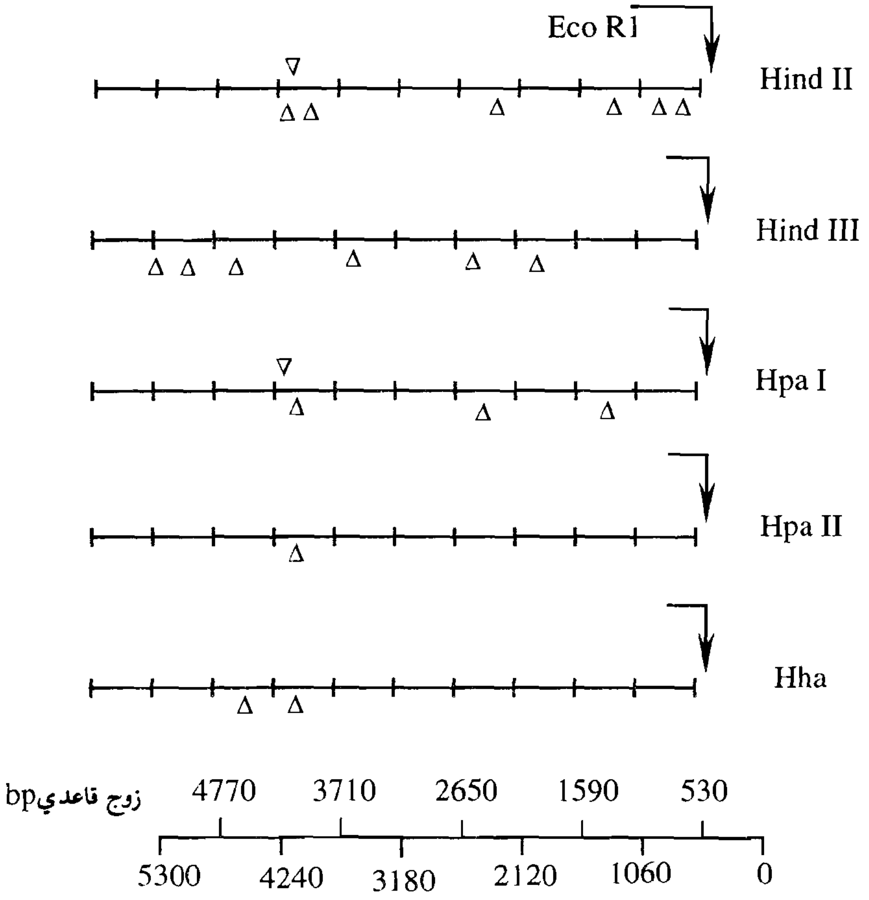
وهي رواشح حديثة الاكتشاف تتألف مادتها الوراثية من جزيئين لشريط حامض نوويDNA مفرد يبلغ حجمه حوالي 3.5 كيلو قاعدة .

تصيب هذه الرواشح عدداً من النباتات الراقية . إلا أنه نظراً لعدم المعرفة الكافية بخريطتها الوراثية والأنزيمية وكذلك عدم معرفة مواقع المورثات ووظائفها والأجزاء اللازمة لتضاعفها فأن الاستفادة منها كنواقل في الهندسة الوراثية محدود جداً ولكنها يمكن أن تكون من النواقل الواعدة في حالة استكمال المعلومات عنها .

### ثالثاً: راشح السيميان *Simian 40V(SV40) 40*

وهو من رواشح الثديات . يتألف من مادة وراثية صغيرة الحجم حوالي 5.2 كيلو قاعدة (الشكل5-31) . ونظر لصغر حجمه ووجود العديد من المواقع الضرورة لتضاعفه فأن قدرته الاستعابية محدودة ولا يستوعب سوى 200-300 نيوكليوتيد مهندسة .

وقد أجري العديد من المحاولات لزيادة قدرته الاستعابية ورفع كفاءته وذلك باشتقاق عدد من النواقل منه مثل SVGT-1 و SVGTλ و SVGT-5 إلا أنها جميعاً ذات صعوبات ليست باليسيرة . ويعتبر الناقل SVGT-5 أفضلها حيث اشتق عن طريق حذف الترددات التي تقع بين موقع قطع الأنزيم HindIII وموقع قطع الانزيم Bam HI إلا أنه يحتاج إلى راشح آخر لأجل مساعدته في استكمال دورته التحليلية (الشكل5-35) .




**(الشكل35-5) : خارطة لبعض الأنزيمات القاطعة في المادة الوراثية لفايروس السيميان 40.**
**ويلاحظ ان جميع هذه الخرائط تبدأ بموقع قطع الأنزيم Eco R1 (الموقع صفر)**

## رابعاً: راشح البابيلوما البقري *Bovine Papilloma V. (BPV)*

وهو أحد الرواشح التي تصيب العديد من الحيوانات . و تتألف مادته الوراثية من حلقتي حامض نووي DNA يبلغ حجمها حوالي ثمانية كيلو قاعدة . يتصرف هذا الراشح كبلازميد عند إصابته للخلايا ويمكن إيجاد حوالي 100 نسخة منه في

الخلية الواحدة دون أن يؤدي إلى موتها . كما أنه ينتقل إلى الخلايا الجديدة عن الإنقسام الخلوي . راشح البابيلوما لا يمكن اعتباره ناقلاً مثالياً لصعوبة التعامل معه حيث يحتاج إلى تطابق مناعي مع خلايا مضيفه لذلك فأنه أجريت محاولة لتهجين هذا الراشح مع البلازميد PBR 322 لتمكينه من إصابة خلايا اللبائن وخلايا البكتيريا أيضاً إضافة إلى خلق سعة هندسة كبيرة ويتوقع أنْ يتم غرس قطع من الحامض النووي DNA غريبة بأحجام تتجاوز 10 كيلو قاعدة . كما أنه يعتبرُ من النواقل التي يتوقع استخدامها بكثرة في عمليات الهندسة الوراثية مستقبلاً .

**نواقل التعبير:** *Expression Vectors*

اصطدمت هندسة العديد من المورثات بمعوقات أدت إلى عدم قدرة هذه المورثات على التعبير عن نفسها . وظهرت هذه المشكلة واضحة عند هندسة مورثات معزولة أحياء حقيقية النوى في أحياء بدائية النوى مثل البكتيريا . وقد عزي هذا الأمر إلى وجود اختلاف في محفزات مورثات هذه الأحياء تؤدي إلى توقف عملية تعبير المورثات . أذ لا يتمكن أنزيم استنساخ الحامض النووي (RNA) البكتيري من التعرف على محفز المورث المهندس لاختلاف تردداته عن تلك الموجودة في محفزات مورثات البكتيريا . وذلك ما يؤدي إلى عدم قدرة هذا الأنزيم على الاستقرار والتعرف على الموقع المطلوب وبالتالي تفشل عملية الاستنساخ (لاحظ الفصل الخاص بذلك) .

هذا إضافة إلى مشاكل أخرى تتعلق بتنظيم عمل المورثات المهندسة .كما أنه في حالة حصول التعبير للمورث الجديد فأن هناك أحتمالاً قوياً في أن البروتينات الناتجة عنه لا تتمكن من اختراق جدار الخلية البكتيرية لعدم تمكن هذه البروتينات من بناء أواصر الكبريت الثنائية التي يتم تكوينها فقط عندما تريد البروتينات مغادرة الخلايا .

ولأجل تفادي هذه المشاكل فأنه تم بناء عدد من النواقل الخاصة بالتعبير سميت بنواقل التعبير . يمكن وضع هذه النواقل في مجموعتين اعتماداً على تعقدها وهي :

1 . نواقل التعبير البسيطة .

2 . نواقل الكاسيت .

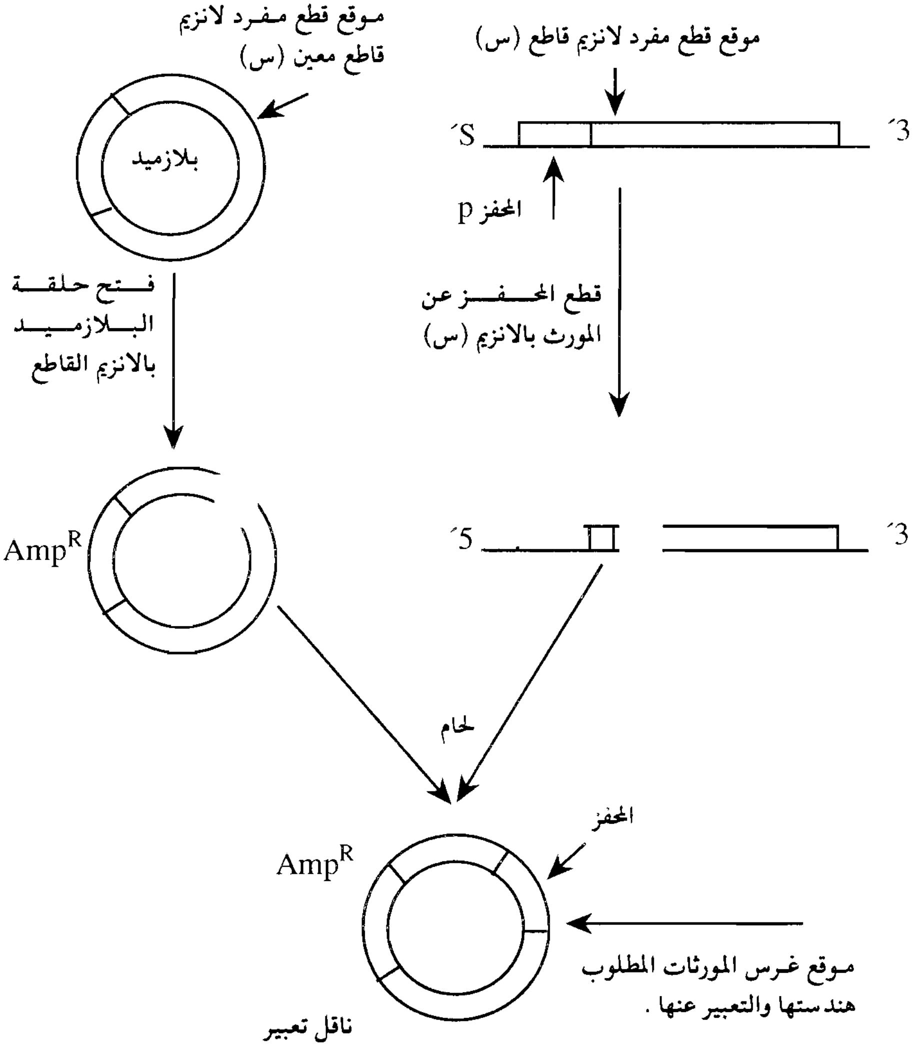
## أولاً: نواقل التعبير البسيطة

وهي نواقل الهندسة المعروفة التي سبق الحديث عنها مضافاً إليها موقع محفز قوي . يتم بناء هذه النواقل عن طريق فصل منطقة المحفز لمورث بكتيري وربطه مع تردد يحتوي على موقع مفرد لأنزيم قاطع ويتم غرس المورث المطلوبة هندسته في هذا الموقع بعد فتحه أو كسره بالانزيم القاطع (شكل5-36) . وهكذا فأن المورث الجديد سوف يقع تحت تأثير محفز ناقل التعبير . وبالتالي فأن أنزيم أستنساخ الحامض النووي RNA سوف يعمل بصوره طبيعية . ونظراً لأختلاف قوة محفزات المورثات اعتماداً على حاجة الخلايا من إنتاجها . لذلك فأن هناك محفزات قوية تؤدي إلى التعبير عن مورثاتها بصورة عالية وإنتاج بروتينات بكميات عالية بينما توجد محفزات ضعيفة ذات معدل استنساخ منخفض . لذلك فأن عملية بناء نواقل التعبير تحتاج إلى اختيار محفزات قوية تساعد المورث الجديد على التعبير عن نفسه بقوة . ومن هذه النواقل . الناقل الذي يحتوي على المحفز trp المعزول من المورثات المشفرة لأنزيمات تصنيع حامض التربتوفان . والناقل الذي يحتوي على المحفز tac الهجين من محفزي المورثين trp و Lac وكذلك الناقل الذي يحتوي على المحفز Lacإضافة لنواقل أخرى تحتوي على المحفزات λ PL و rec A وغيرها .

كما أن هناك نواقل تعبير طبيعية وهي نواقل مشتقة من نفس المضيف ويمكن استخدامها كنواقل عادية ونواقل تعبير بنفس الوقت .

ونظراً لافتقاد هذه النواقل مواقع لتنظيم عملية تعبير المورثات لذلك فأنه يتم السيطرة على هذه العملية عن طريق إضافة أو فقدان مادة معينة من الوسط الغذائي .

فمثلاً يتم تنظيم تعبير المورثات في الناقل الذي يحتوي على المحفز trp عن طريق إضافة التربتوفان للوسط الغذائي لأجل ايقاف التعبير أو إزالة التربتوفان لأجل استمرار التعبير . كما يستخدم لنفس الغرض المركب 3-indoly acetic acid .




(الشكل 5-36) : طريقة بناء نواقل التعبير البسيطة وذلك بإضافة محفز مورث مناسب بكتيري أو غيره إلى البلازميد .

كـمـا تتم السـيطرة على تعـبيـر المورثات في الناقلtac والناقلLac عن طريق إضافة المادة Isopropyl-B-D-thioglactoside-IPTG لأجل حث التعبير وفقدانها لأجل إيقافه .

تفتقر نواقل التعبير البسيطة إلى الأجزاء المنظمة لعملية التعبير . لهذا السبب فأن هناك عدداً من المشاكل التي يمكن أن تواجه الباحث في حالة استخدامها . ومن هذه المشاكل :

1 . تحتاج عملية الهندسة باستخدام هذه النواقل الى تنظيم التعبير عن طريق إضافة مواد حاثة أو كابتة للوسط الغذائي وذلك يتطلب الدقة في تنظيم كمية وتركيز هذه المواد .

2 . نتيجة لفقدان نواقل التعبير لمواقع منظمة العملية التعبير فقد يؤدي ذلك إلى إرتفـاع مسـتـوى البـروتين المشـفـر من المورث المهندس إلى الحد الذي يؤدي إلى التأثير في العمليـات الفسلجيـة الخلوي بطريقـة أو أخرى مما يؤدي الى موت الخلايا المضيفـة أو إصابتهـا بالعطب أو يؤدي إلى التأثيـر في الناقل نفسـه بحيث يمكن أن يفقد استقراره في الخلية و ربما فقدانه نهائياً .

لهذه الأسباب وغيرها فأنه تم التفكير ببناء نواقل تعبير أخرى تحتوي إضافة للمحفز القوي وتردد الموقع المفرد لأحد أنزيمات القطع على مواقع لتنظيم التعبير .أطلق على هذا النوع من النواقل بنواقل الكاسيت .

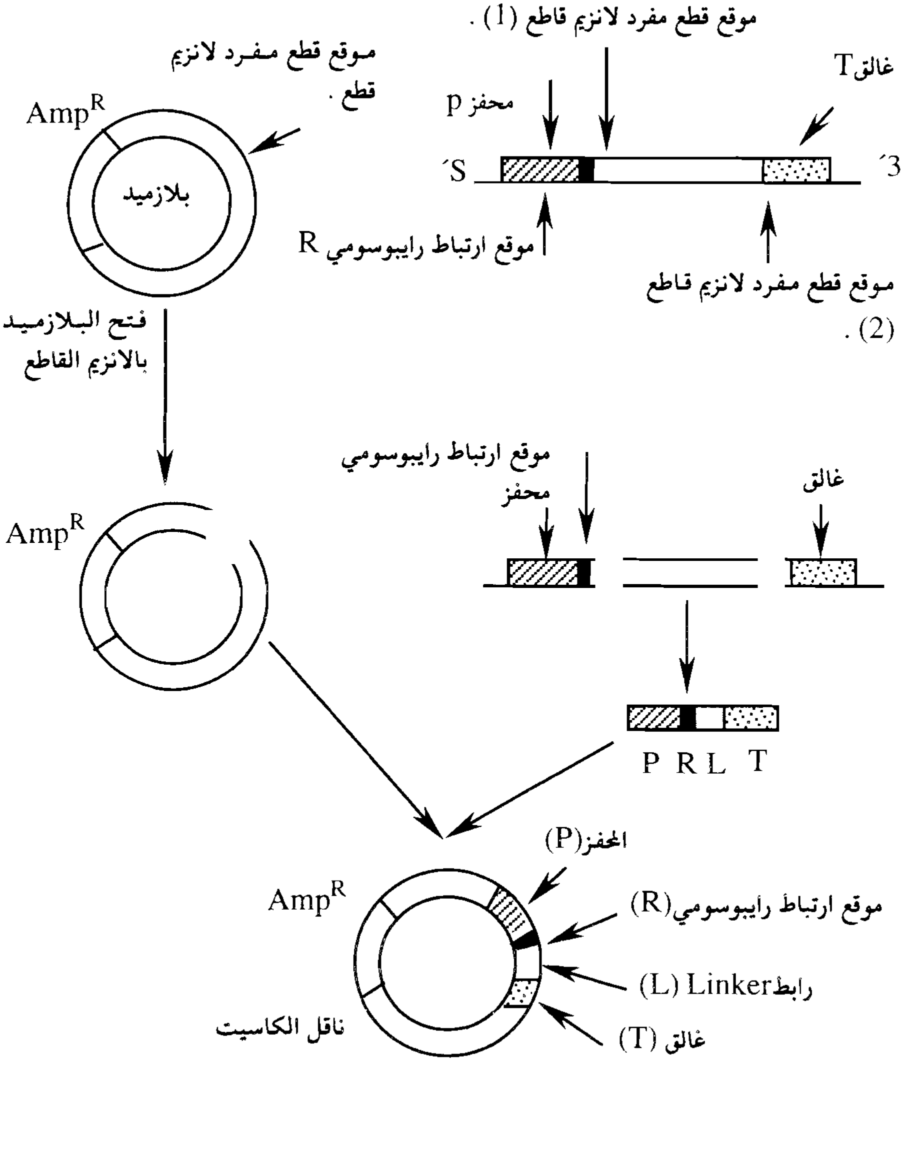
## ثانياً: نواقل الكاسيت

صممت نواقل الكاسيت لتجاوز عيوب نواقل التعبير البسيطة السابقة . يشتمل هذا التصميم على احتواء النواقل إضافة إلى المحفز القوي وتردد الموقع المفرد الخاص بالأنزيم القاطع جميع المواقع الأخرى اللازمة لتنظيم عملية التعبير . وعلى ذلك فأن ناقل الكاسيت يتألف من محفز قوي وموقع للارتباط الرايبوسومي وغالق إضافة إلى موقع مـفـرد لأنزيم قـاطع مـعين (الشكل5-37) . ونظراً لأن هذا التـركـيب يعني في

الحقيقة مورثاً ناقص الترددات المشفرة . لذلك فأن بناء هذه النواقل يتضمن معاملة مورثات ذات محفزات قوية بواسطة أنزيمات قطع نهائية تعمل على كسر موقع الترددات المشفرة وإزالة نيوكليوتيداتها والحفاظ على المواقع المطلوبة في نواقل الكاسيت . وعادة تتم هذه العملية تحت سيطرة كبيره لضمان عدم إتلاف المواقع المطلوبة وكذلك التخلص من الترددات المشفرة . وبعد الانتهاء من المرحلة الأولى لبناء الكاسيت فأنه تتم إضافة جزيئات رابطة مكسورة بواسطة أنزيم قطع معين ثم لحامها مع المواقع المتبقية من المورث السابق ثم إيداعها في ناقل كلون معين ليتم الحصول على ناقل كاسيت مكتمل .

وعلى الرغم من أن هذه النواقل أفضل من سابقتها إلا أنها لا تخلو من المشاكل .إذ أنه من الصعوبة تماماً إزالة جميع الترددات المشفرة للمورث المراد الحصول منه على المحفز والمواقع الأخرى خوفاً من تلف هذه الأجزاء . لذلك فأن العديد من نواقل الكاسيت تحتفظ بترددات مشفرة من المورث الأصلي تختلف بحجمها وهذا ما يؤدي إلى الحصول على بروتينات هجينة مؤلفة من البروتين المشفر من المورث المهندس وراثياً وأجزاء من البروتين الذي يمثل الترددات المشفرة المتبقية من المورث الأصلي . وبطبيعة الحال فأن استخلاص البروتين الناتج عن المورث المهُندَسْ سيكون محفوفاً بالصعوبات وخصوصاً عندما يتعلق الأمر بالأنزيمات أو الهرمونات . كذلك كفاءة ترجمة الحامض النووي المرسال mRNA المستنسخ من المورث المهندس ستكون منخفضة جداً إذا ما كانت المسافة بين موقع الارتباط الريبوسومي في الكاسيت وشفرة الميثونين في المورث التي تبتدأ بها تصنيع جميع سلاسل عديد الببتيد أكثر من20 نيوكليوتيداً .

ولأجل تجاوز هذه الصعوبات فأنه يستخدم الآن وبنجاح كبير تصنيع المحفزات والغوالق ومواقع الارتباط الريبوسومي مختبريا ثم يتم ربطها بتسلسل صحيح مع ناقل كلونة أعتيادي . تتم عملية التصنيع المختبري لهذه المواقع بواسطة تقنية يطلق عليها تفاعل سلسلة البوليمريز Polymerase chain reaction (PCR) .




(الشكل5-37) : مخطط بناء نواقل الكاسيت. يتوفر في هذه النواقل جميع مؤلفات تعبير المورثات هذا بالإضافة إلى وجود قطعة رابطة بين موقع R وT تحتوي على عدد من المواقع المفردة لأنزيمات قطع مختلفة ويتم غرس المورث المطلوب هندسته في أحد هذه المواقع بعد فتحه بالأنزيم المطلوب

حيث تتم في هذه التقنية تغذية كومبيوتر بالمعلومات الخاصة بتسلسل تردد محفز معين أو غالق معين أو حتى مورث ثم تنقل هذه المعلومات تلقائياً الى جهاز مرتبط بالعديد من القناني التي تحتوي جميع عوامل بناء الحامض النووي DNA . يقوم بعدها الجهاز بربط النيوكليوتيدات اعتماداً على المعلومات التي وفرها الكومبيوتر دون الاستعانة بالإنسان حتى اكتمال بناء التردد المطلوب ثم يتم استخلاص المنتج وبناء نسخ عديدة منه بنفس التقنية ولكن بأسلوب مختبري بسيط (لاحظ الفصول الأخرى) . وبعد بناء جميع الأجزاء المطلوبة لبناء الناقل يتم ربطها لتجهيزناقل كاسيت وهكذا يتم الحصول على نواقل تعبير مثالية وأمينة ودقيقة جداً .

# 6

# المجسات الموسمة

**مقدمة**

**الاحتياطات الواجب اتخاذها عند التعامل مع المواد المشعة**

**الاستخدامات العامة للمجسات في الوراثة**

-مراقبة التفاعلات

-كشف وعزل المورثات

-تحليل تركيب المورثات

-تحليل تعبير المورثات

**التقنيات المستخدمة في تحضير المجسات**

طرق تحضير المجسات المشععة

-ترجمة الثلمة

-العوامل المؤثرة في تفاعل ترجمة الثلمة

-عيوب طريقة ترجمة الثلمة

-أطالة البادئة

-طرق أطالة البادئات

-تصنيع البادئة العشوائي

-تفاعل البادئه المفردة

-توسيم نهايات الحامض النووي

-ترميم نهاية الحامض النووي

-تصنيع مجس الحامض النووي RNA

**تحضير المجسات غير المشععة**

**توسيم الخلايا الحية**

**تصنيع المجسات بالطريقة الجافة الآلية**

## مقدمة

تعتبر المجسات Probes إحدى التقنيات الرائعة التي جادت بها أفكار العلماء في سنوات الخمسينات . وقد اسهمت هذه التقنية في تطوير العديد من العلوم . كما ساهمت في كشف آلية العديد من التفاعلات التي تجري في الخلايا الحية . تقوم تقنية المجسات على استبدال عنصر معين مثل الهيدروجين أو الكاربون أو النتروجين أو الفوسفور وغيرها بعناصر نظيرة ذات نشاط إشعاعي .فمثلاً يمكن استبدال ذرة الهيدروجين الطبيعية بذرة نظير الهدروجين الثالث $H^3$ (تريتوم) واستبدال الفوسفور بنظير الفوسفور $P^{32}$ وكذلك استخدام نظائر النتروجين 14 و 15 والكاربون 14 بدلاً من الذرات الطبيعية . كما يمكن استخدام مواد متوهجة كالفلورسنات في تحضير المجسات . تهدف تقنية المجسات الموسم إلى تتبع أثر النشاط الإشعاعي أو الضوئي للنظائر والمواد المستخدمة ومعرفة حركة المركبات والتفاعلات الأنزيمية والنواتج التفاعلية والتمثيل وغير ذلك الكثير . كما تستخدم هذه المجسات أيضا في الحقل الطبي كما هي الحال في تشخيص أمراض مختلفة مثل قصور الغدة الدرقية وغيرها .

وحديثاً استخدمت هذه التقنية لأجل تشخيص الأورام السرطانية حيث تحقن مواد كيميائية موسمة ومعينة في جسم المريض ويمكن متابعتها من خلال جهاز الأشعة الطبقية Tomograph حيث تتركز هذه المواد في الأنسجه المتسرطنة ويمكن من خلالها تحديد حجم النسيج السرطاني وموقعه وعمقه .

أما في حقل الهندسة الوراثية والوراثة الجزيئية فإن استخدامها اعتبر أحد المفاتيح الرئيسة التي ساهمت في ظهور هذين الفرعين من علوم الوراثة . لقد استخدمت المجسات المشعة منذ عام 1952 لأجل التعرف على آلية تضاعف الحامض النووي DNA (تجارب هرشي وشاس) من خلال استخدام النظائر المشعة للكبريت $S^{35}$ و الفسفور $P^{32}$ .

أثبتت هذه التجارب أن الحامض النووي DNA يسلك سلوكاً شبه محافظ في التضاعف . وأعتبرت نتائج هذه التجارب إثباتاً واضحاً لنظرية الحلزون المزدوج التي تم الحديث عنها في الفصل الثاني .

كما استخدمت المجسات في العام 1958 لإثبات التضاعف شبه المحافظ للحامض النووي DNA في البكتيريا والرواشح والأحياء الراقية . بعد ذلك تم تطوير استخدام هذه التقنية للحصول على قطع حامض نووي ومورثات موسمة . وقد ساهم هذا التطوير في تقدم علوم الوراثة قدماً للأمام .

يستند استخدام المجسات الموسمة إشعاعياً إلى حقيقة علمية هي أن جميع البروتينات والأحماض النووية غير ذائبة في المركب حامض الخليك ثلاثي الكلورة (TCA) (IM)Trichroracetic acid بينما تتمكن الأحماض الأمينية والنيوكليوتيدات المفردة من الذوبان فيه .

ولأجل قياس أو تعقب تصنيع حامض نووي معين مثلا فأنه يتم ذلك بإضافة نيوكليوتيد معين ذو قاعده نتروجينية موسمة اشعاعياً بالفوسفور $P^{32}$ أو النتروجين 15 أو 14 أو غيره إلى خليط التفاعل المحتوى على ما تبقى من نيوكليوتيدات طبيعية والظروف الأخرى مثل الأنزيمات والبفرات الخاصة . وبعد ترك التفاعل في ظروفه الملائمة ولفترة زمنية يضاف المركب TCA الى التفاعل ثم يصفى الخليط بواسطة عمود هلام أو ورق ترشيح حيث تمر النيوكليوتيدات غير الداخلة في التفاعل (الفائضة) بينما يبقى في العمود أو ورق الترشيح الحامض النووي المُصنع .

وبقياس كمية الإشعاع فأنه يمكن معرفة كمية الحامض النووي المصنعة في التفاعل . كما يمكن قياس هذه الكمية في الخلايا عن طريق إضافة المواد الموسمة إلى الأوساط الغذائية .

ويمكن القول نفسه بالنسبة لمعرفة البروتينات المصنعة . ونتيجة لتطور التقنيات الحديثة فأنه أصبح اليوم من الممكن قياس كمية الإشعاعات بصورة دقيقة عن طريق جهاز يدعى Scantalation counter حيث يعمل السائل المستخدم فيه Scantlation fluid على تحويل الطاقة المنبعثة من المواد المشعة الى ضوء يتم استلامه من قبل خلايا حساسة وتقاس كمية الإشعاع اعتماداً على كثافة الضوء .

إن متابعة تفاعل معين خاص بالبروتينات أو الأحماض النووية داخل الخلايا يحتاج إلى استخدام مواد معينة خاصة بهذه المركبات الحياتية دون غيرها . فمثلاً

يستخدم الجلايسين كمصدر للكاربون بينما يمكن توسيم الحامض الأميني أسبرتيت لمتابعة تضاعف أو قياس كمية الحامض النووي ذلك لأن الحامض الأميني اسبرتيت يدخل في إحدى مراحل تصنيع البيورينات . أو بتوسيم الأحماض الأمينية الليوسين والفنيل النين عند تحضير بعض البروتينات . إذ أنه من المعروف بأن هذين الحامضين لا يمكن أن يتحولا إلا إلى بروتينات . أما بالنسبة لدراسة البروتينات في الحيوانات الراقية فأنه من المؤكد بأنه لا يمكن وضع مواد مشعة في غذائها ولكن الحال هو في استخلاص بروتينات من أنسجة هذه الحيوانات وتوسيمها ثانية أو دراستها عن طريق الأنسجة الخلوية الزرعية Tissue Culture .

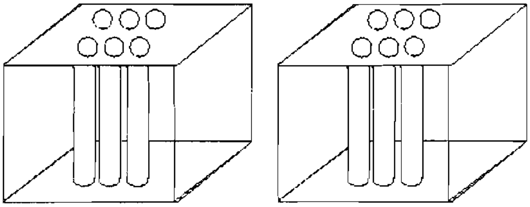
## الاحتياطات الواجب اتخاذها عند التعامل مع المواد المشعة

لا بد من القول بأنه ليس جميع المواد المشعة خطرة جداً حيث إن البعض منها يمكن التعامل معه دون اتخاذ احتياطات كبيرة ويعتمد ذلك على قوة الإشعاع الصادر من المادة المشعة . فنظير الهدروجين الثالث $H^3$ ونظائر النتروجين 14, 15 $N^{14}, N^{15}$ والكاربون 4 $C^4$ ليست نظائر خطرة لأن قوة الإشعاعات الناشئة عنها ضعيفة بحيث إنها لا تتمكن حتى من إختراق الجلد . أما نظير الفوسفور 32 ($P^{32}$) على سبيل المثال فيعتبر من العناصر المشعة القوية ويطلق عليه عنصر مشع (حار) Hot Source وتنطلق منه كافة الإشعاعات الخطرة مثل أشعة بيتا وجاما والفا إضافة إلى غيرها .

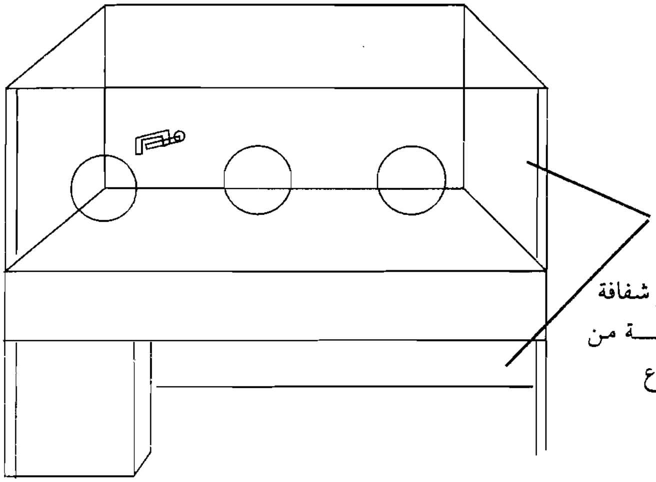
ولكن في جميع الأحوال فأن من الأفضل تخصيص موقع عمل خاص بالنظائر المشعة ومراعاة شروط الأمان عند العمل لأجل الوقاية من الإشعاع . يتوجب في موقع العمل هذا أن يكون مطلياً من الداخل بصبغ لماع بحيث يمكن غسله عند الحاجة لذلك وأن تزود الغرفة بطاولة خشبية مصقولة السطح ويفضل عدم استخدام المعادن في صناعتها وكذلك عدم وضع الزجاج على سطح الطاولة (لتقليل انعكاس الإشعاعات أثناء العمل) .

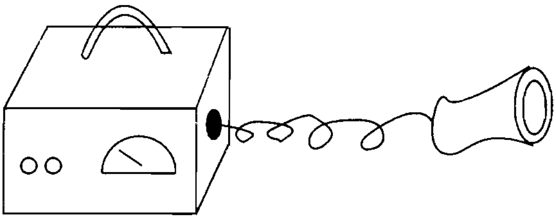
كما يجب أن تزود الطاولة بحاجز بلاستيكي علوي عازل وبسمك يكفي لمنع مرور الإشعاعات وكذلك بحاجز سفلي . ويمكن استخدام عوازل Plexiglass وبسمك 10 مليميترات في ذلك .

ونظراً لأن بعض المواد المشعة مذابة في سوائل متطايرة أو ممزوجة مع مسحوق لذلك فأنه يجب ان تتوفر كابينة خاصة (Hood) مزود بساحبة هواء لإجراء جميع العمليات بداخلها . ويجب أن يحتوي مختبر المواد المشعة على كفوف مدعومة بالرصاص وحوامل زجاجية سميكة لوضع أنابيب المواد المشعة فيها كما يتوجب وجود جهاز الكشف عن الإشعاعات Geiger Counter وتوفر بالطوات مغلفة بالنايلون (ويمكن ارتداء الصدرية العادية أوالبالطو وفوقها صدرية نايلون) وكفوف وأدوات تستخدم لمره واحدة . ويذكر بأنه يمنع منعاً باتاً استخدام الفم في سحب السوائل وضرورة استخدام الأقنعة الطبية في العمل . أما فيما يخص نفايات المواد المشعة فأنه يجب عزل الأوراق الملوثة والكفوف والأدوات غير اللازمة في كيس خاص موسم بعلامة الإشعاعات . كما تحفظ السوائل المشعة في قنان تحتوي على فورمالين لتخفيف الإشعاع أو سوائل صابونية وتغلق جيداً ويذكر أنه يمكن التخلص من السوائل المشعة وبكمية لا تزيد قوتها الإشعاعية عن 10-20 uci مايكروكيوري /في اليوم الواحد وذلك برميها في حوض الغسيل وفتح ماء الحنفية برفق لعدة دقائق . يجب أن لا تعقم النفايات المشعة على الإطلاق وتحفظ أكياس النفايات وقناني السوائل المشعة في صندوق من الرصاص لمدة 3-4 أشهر وهي مدة تساوي حوالي ثماني مرات ضعف نصف عمر نظير الفوسفور 32 ويمكن رميها بعد ذلك في النفايات الاعتيادية . كما يتوجب دائماً عند استخدام المواد المشعة ارتداء أفلام الكشف عن الإشعاعات ويجب وضعها على الجيب الأمامي (الصدري) وعلى أحد أصابع اليد وإرسالها كل أسبوع لجهاز قياس التعرض للإشعاعات في مركز بحوث الطاقة الذرية لقراءة كمية الإشعاع في هذه الافلام ، كما يجب استخدام جهاز الكشف عن الإشعاعات(الجايجر) في بداية العمل ونهايته للكشف عن التلوث ليتم بعد ذلك إزالته بواسطه الغسل بالمحاليل الصابونية أو غيرها (الشكل 6-1) .



حوامل الانابيب الخاصة بالمواد المشعة مصنعة من البلاستيك الثقيل




**(الشكل 6-1): تخطيط لمنضدة العمل اللازمة عند التعامل مع المواد المشعة ويلاحظ إحاطتها من الأعلى والأسفل بواسطة حواجز شفافة واقية إضافة إلى جهاز قياس الإشعاع وحوامل أنابيب المواد المشعة.**

## الاستخدامات العامة للمجسات في الوراثة

يمكن استخدام مجس الحامض النووي الموسم في عدة مهام منها :

1- مراقبة التفاعلات .

2- كشف وعزل المورثات .

3- تحليل وتركيب المورثـات .

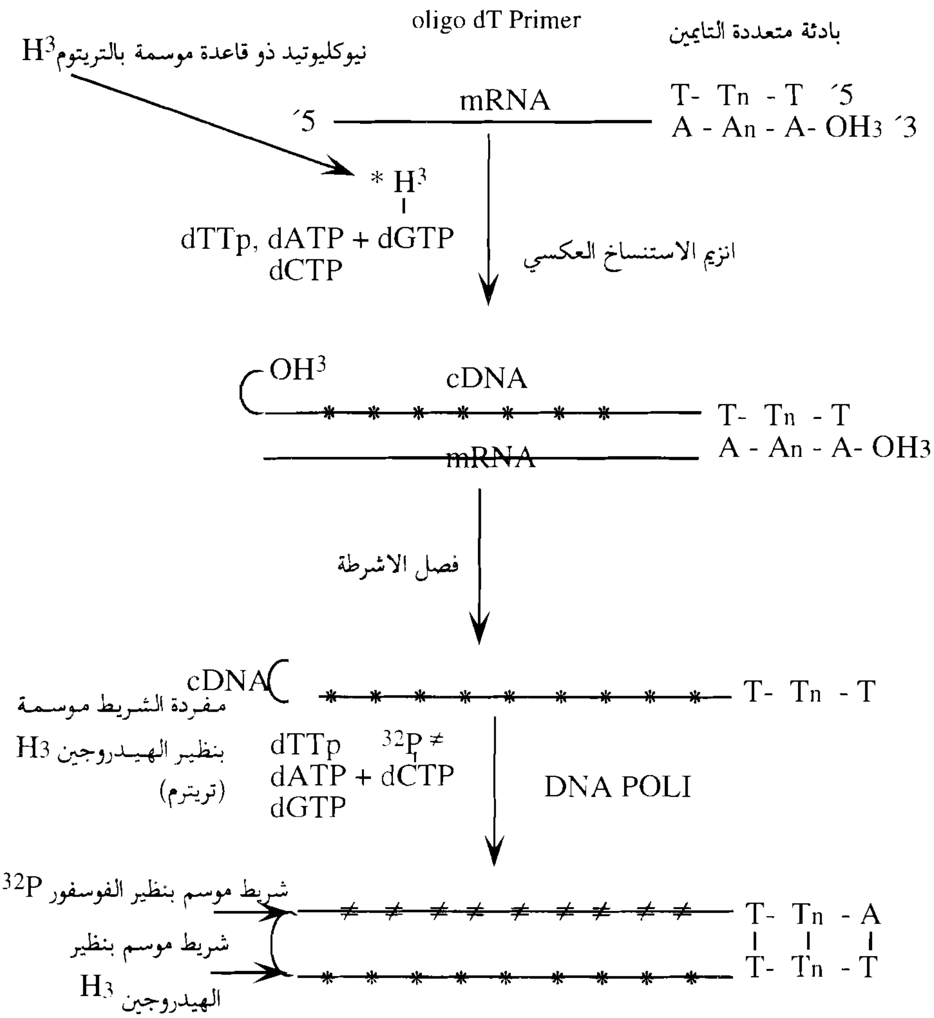
4- تحليل تعبير المورثات .

### أولاً: مراقبة التفاعلات

إن استخدام النظائر المشعة في عملية تصنيع الحامض النووي DNA أو غيره يساعد كثيراً في معرفة آلية هذه التفاعلات وكذلك في تحديد العوامل المؤثرة التي يتم فيها التفاعل . وأفضل مثال على ذلك هو استخدام أكثر من نظير مشع في عملية مراقبة تفاعل تصنيع سلاسل الحامض النووي DNA المتمم (cDNA) . Comple-mentary DNA حيث يستخدم نظير الهيدروجين الثالث $H_3$ في مراقبة تصنيع السلسلة الأولى أو الشريط الأول من الحامض النووي بينما يستخدم نظير الفوسفور 32 $P^{32}$ في مراقبة تصنيع الشريط الثاني (الشكل 6-2) . كما تستخدم النظائر مع قياسي معين Marker للمساعدة في قياس أحجام والأوزان الجزيئية للحامض النووي عند استخدام الهجرة الكهربائية عبر هلام الاجار أو الالكريلمايد .

### ثانياً: كشف وعزل المورثات

يمكن أن تستخدم المجسات الموسمة في كشف وعزل المورثات كما هي الحال في الكشف عن المورثات المهندسة في النواقل والتهجين على الصبغيات Insitu hybridization . ففي الأولى فأنه يتم استخلاص الأحماض النووية للنواقل المهندسة وراثياً بشكل مستقل وثم تثبيتها على ورق فلتر أو نايلون ثم معاملتها .




**(الشكل 6-2): استخدام النظائر المشعة في مراقبة تفاعلات بناء أشرطة الحامض النووي المتمم cDNA ويلاحظ استخدام نظر الهيدروجين $H^3$ في توسيم الشريط الأول ونظير الفوسفور $P^{32}$ في توسيم الشريط الثاني .**

بعد ذلك بمادة قلوية لفصل أشرطة الحامض النووي ثم تهجن الورقة بواسطة مجس موسم شعاعياً مثلاً يمثل المورث المطلوب عزله . يرتبط هذا المجس مع بقعة الحامض النووي التي تحتوي على المورث النظير وباستخدام فلم أشعة X وتعريضها للفلتر لفترة معينة ثم تحميض الفلم حيث يظهر أثر ارتباط المجس كنقطة سوداء .

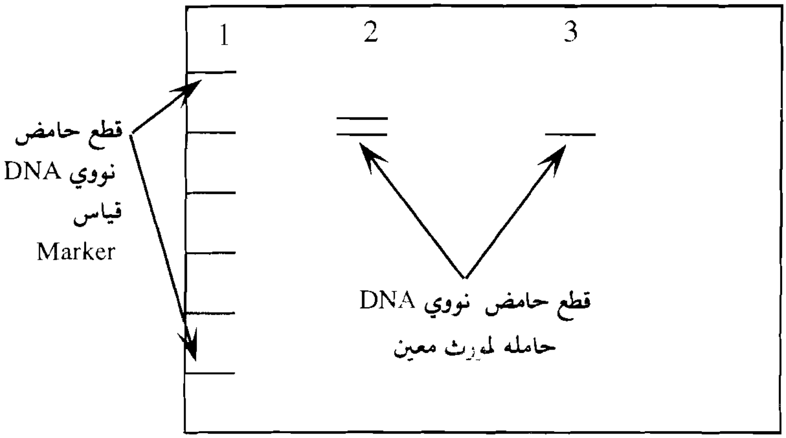
يتم بعدها تحديد الناقل الذي يحتوي على المورث المطلوب (الشكل 6-3) . كما يمكن استخدام التهجين في الهجرة الكهربائية والنقل على ورق لتحديد وكشف المورثات .

أما في كشف المورثات وتحديدها على الصبغيات فأنه يتم تنمية الخلايا على شرائح زجاجية ثم معاملتها بمادة الكولجسين Colchesine لأجل ايقاف انقسام الخلايا عند المرحلة الاستوائية تثبت الخلايا بعدها على الشرائح بمعاملتها بمدرج من الكحول ثم خليط من حامض الخليك والميثانول . يتم بعدها تهجين الخلايا بواسطة مجس موسم شعاعياً (مثلاً بنظير الهيدروجين الثالث $H^3$) وتطلى الشرائح بعدها بطبقه جلاتينية فوتوغرافية وتحفظ الشرائح في الظلام لفترة معينة تحمض بعدها وتفحص حيث تظهر بقع سوداء فوق الصبغي الذي يحتوي على المورث المطلوب الكشف عنه (الشكل 6-4) .

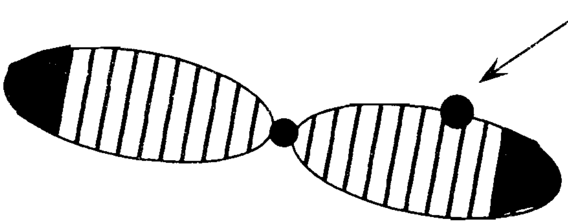
### ثالثاً: تحليل تركيب المورثات

الفائدة من تحليل تركيب المورثات هو معرفة توقع البروتين المشفر منها وكذلك معرفة الخريطة الجزيئية للمورثات . يتم ذلك بمعرفة تسلسل ترددات النيوكليوتيدات المؤلفة للمورث أو ما يدعى DNA Sequencing عبر استخدام نيوكليوتيدات موسمة القواعد . كما يمكن تحليل تركيب المورثات عن طريق الهجرة الكهربائية للحامض النووي والنقل الورقي والتهجين .

باستخدام مجس موسم شعاعياً (لاحظ الهجرة الكهربائية وطرق التهجين في الفصول الاخرى) .




(الشكل 6-3): تخطيط لفلم أشعة أكس بعد تعريضه لورقة فلتر مهجنة بحامض نووي مقطع بالأنزيمات القاطعة ومجس مشع. الحزم في الموقع 2 و3 تمثل قطع الحامض النووي التي ارتبط فيها المجس بينما تمثل الحزم في الموقع 1 الحامض النووي القياسي.




(الشكل 6-4): تخطيط لصبغي موسم شعاعياً ومصبوغ بطريقة تحزم -G وتظهر البقعة السوداء التي تمثل موقع مورث معين بعد ارتباط المجس المشع بها.

**رابعاً: تحليل تعبير المورثات**

يتم تحليل تعبير المورثات عن طريق استخدام أجسام مناعية موسمة تعمل هذه على التآصر مع البروتين الناتج عن التعبير وإعطاء هيئة مميزة يمكن من خلالها التأكد من حصول نشاط للمورث المطلوب مراقبته . تختلف الهيئة المميزة باختلاف المجس المستخدم فمثلاً في حالة استخدام مجس فلورسني فأن المعقدات الناتجة عن عملية التفاعل يمكن أن تعطي حزماً ضوئية ذات ألوان معينة يستدل بها على حصول تعبير وراثي . كما أن هناك طرقاً أخرى سيتم الحديث عنها في الفصول اللاحقة يمكن استخدامها لتحليل تعبير المورثات كما هي الحال في الهجرة الكهربائية للبروتينات .

## التقنيات المستخدمة في تحضير المجسات

نظراً للتطور الحاصل في هذه التقنية فقد تعددت وسائل توسيم المجسات اعتماداً على الهدف منها ويمكن وضعها تحت نوعين من الطرق وهي طرق تحضير المجسات المشعة وغير المشعة .

## طرق تحضير المجسات المشعة

هناك عدة طرق لتحضير المجسات المشعة وهي :

1 . ترجمة الثلمة Nick translation
2 . إطالة البادئة Primer Extension .
3 . توسيم نهايات الحامض النووي Ends labelling .
4 . تصنيع مجس الحامض النووي الرايبوزي RNA .
5 . الطريقة الجافة الآلية Automated solid phase method .

**ترجمة الثلمة** *Nick translation*

نشرت هذه الطريقة من قبل رجبي وجماعته Rigby etal سنة 1977 في

مجلة البايولوجيا الجزيئية وأصبحت من أكثر الطرق شيوعاً في توسيم مجسات الحامض النووي DNA المستخدمة في عمليات التهجين المختلفة . تعتمد هذه الطريقة على قابلية أنزيم بلمرة الحامض النووي DNA الأول DNA POL1 في الهدم والبناء . إذ يقوم هذا الأنزيم بهدم وإزالة النيوكليوتيدات في مواقع الفراغات أو الطفرات وثم بناء الفراغات مستخدماً نشاط البناء فيه ،لذلك فأنه في حالة اضافة نيوكليوتيدات موسمة شعاعياً فأنها ستأخذ مكانها في عملية البناء وبالتالي الحصول على مجس موسم شعاعياً . تتميز المجسات الناتجة عن هذا التفاعل بإمكانية استخدامها في أشكال مختلفة من التهجين ذلك لكونها ذات نشاط عالٍ شعاعياً يكفي حتى لمتابعة مورث ذي نسخة فريدة في حامض نووي DNA معين . هذا بالإضافة إلى الحجم والتركيز المتميزين للمجس المحضر بهذه الطريقة .

يتضمن تفاعل ترجمة الثلم فعلاً تحفيزياً لنوعين من الأنزيمات وهما أنزيم Pancreatic deoxyribonuclease (DNase I) وأنزيم بلمرة الحامض النووي DNA الاول DNA Polymerase I (DAA Pol I) .

يقوم الأنزيم الأول بإحداث ثلم Nicks بصوره عشوائية في كلا شريطي الحامض النووي وعلى طولهما مؤدياً إلى تكوين نهايات حرة هيدروكسيلية 3-hydroxyl وفوسفورية 5- Phosphoryl .

بينما يمتلك أنزيم بلمرة الحامض النووي DNA الاول نشاطين رئيسين إذ يقوم بالعمل عند النهايات الحرة ويتضمن نشاطه الأول إزالة النيوكليوتيدات ابتداءً من النهاية الخامسة وانتهاءً بالنهاية الثالثة في كلا شريطي الحامض النووي . ويتضمن النشاط الثاني له إضافة النيوكليوتيدات ابتداءً من النهاية الثالثة مستخدماً الحامض النووي القديم كقالب للبناء وحيث إن واحداً أو أكثر من النيوكليوتيدات الموجودة في التفاعل موسمة بنظائر مشعة فأن الحامض النووي الناتج يحتوي على بؤر إشعاعية وبذلك يتم الحصول على مجس . وحيث إن الحامض النووي الأصلي قد تم ثلمه في مناطق كثيرة لذلك فأن إضافة نيوكليوتيدات مشععة يكون أكثر وبزيادة عدد الثلم يزداد النشاط الإشعاعي وبالتالي زيادة قدرة المجس على تعقب نسخ ضئيلة من

المورثات وكمية قليلة من الحامض النووي DNA تصل إلى أقل من نصف بيكاجرام . ويذكر أنه يمكن استخدام مايكروجرام من الحامض النووي DNA الموسم بواسطة هذه الطريقة (الشكل 6-5) .

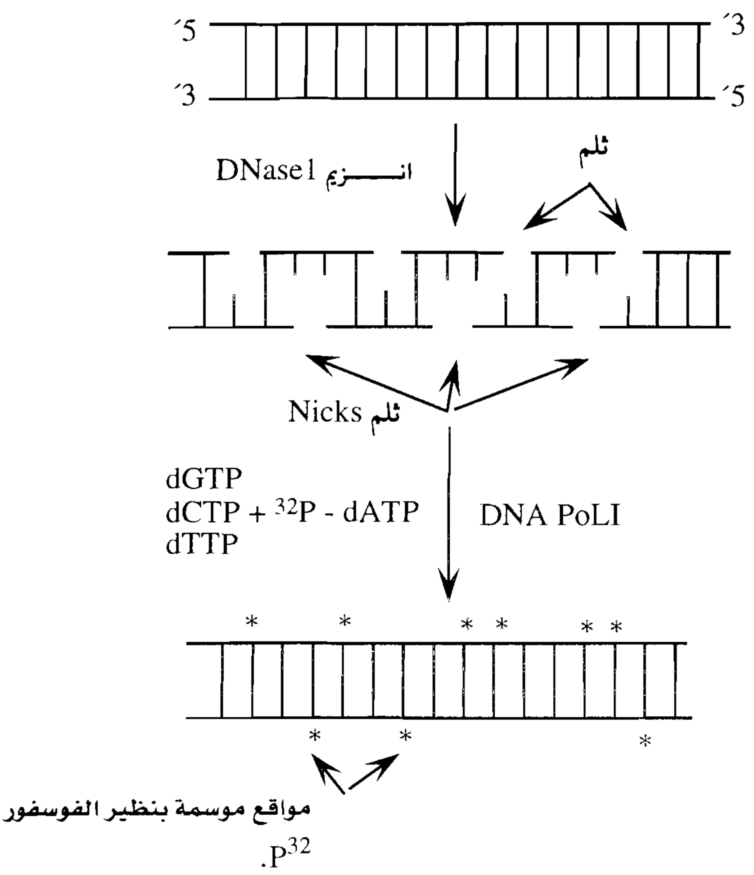
## بعض العوامل المؤثرة في تفاعل ترجمة الثلمة

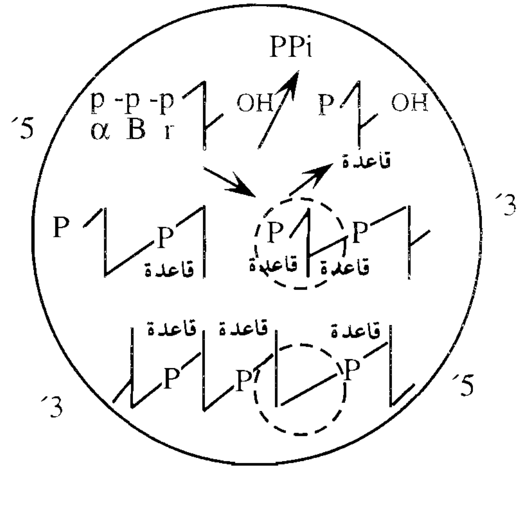
يتأثر هذا التفاعل بالعديد من العوامل التي يمكن ان تؤدي إلى تقليل كفاءته . ومن هذه العوامل :

1 . **التلوث** : إن وجود مواد ملوثة مع كمية الحامض النوويDNA المستخدمة في التفاعل مثل بقايا الفينول والكلوروفورم أو أملاح السيزيوم أو بروميد الأثيديوم أو بقايا البروتين ، يمكن أن يؤدي إلى توقف عمل أنزيم بلمرة الحامض النووي DNA Pol I لذلك فأنه من المفضل في هذا التفاعل تنقية الحامض النووي تماماً بواسطة أعمدة الفصل Columns أو الهلام وكذلك تقليل كمية الحامض النووي المستخدم .

2 . **تركيز الأنزيمات** : إن زيادة أو نقصان تركيز الأنزيمات المستخدمة في التفاعل يمكن أن يكون له تأثير عكسي على التفاعل . فزيادة الأنزيم DNase I يمكن أن يؤدي إلى زيادة فعاليته مما قد يؤدي إلى تلف الحامض النووي المستخدم في التفاعل أو تقطيعه إلى قطع قصيرة . كما أن نقصان تركيزه يمكن أن يؤدي إلى الحصول على مواقع ثلم اقل من المطلوب . والحال أيضاً مع أنزيم البلمرة DNA Pol I الذي تؤدي زيادة تركيزه أو انخفاضها إلى تشويه المجس المحضر .

3 .**حرارة التفاعل** : يحتاج هذا التفاعل إلى درجة حرارة منخفضة (15م) وإن أية زيادة في الحرارة تؤدي إلى زيادة في نشاط أنزيم DNase I وبالتالي تؤدي إلى تحطيم المجس حيث يبدأ الأنزيم بالعمل على المجس بعد الانتهاء من القالب . هذا بالإضافة إلى الحصول على مجس متفرع . كما وجد بأن زمن التفاعل بدرجة الحرارة المناسبة يختلف ويتراوح بين 30 دقيقة إلى خمس ساعات وإن زيادة درجة الحرارة أو انخفاضها أو زيادة تركيز الأنزيم تؤدي إلى الحصول على مواد قليلة داخلة في التفاعل وبالتالي تزداد كمية المواد غير الممتدة في التفاعل مما يقلل من كفاءة المجس .




(الشكل 6-5) : طريقة ترجمة الثلم Nick translation ويلاحظ أن أنزيم بلمرة الحامض النووي DNA Pol I يعمل على ردم الثلم مستخدماً نشاط الهدم وإعاده البناء مستخدماً النيوكليوتيدات المتوفرة في التفاعل وحيث أن واحداً منها على الاقل موسم بنظير الفوسفور $P^{32}$ لذلك فأنه سيتم إنتاج مجس مشعع.

## عيوب طريقة ترجمة الثلمة

هناك عيوب لهذه الطريقة ويمكن التغلب عليها بالخبرة في إنجاز هذا التفاعل ومن هذه العيوب :

1 . تحتاج هذه الطريقة إلى كمية كبيرة نسبياً من الحامض النووي DNA تقدر بواحد مايكروجرام وعلى الرغم من أنه يمكن استخدام أقل من هذه الكمية في التفاعل إلا أن قوة الجس الإشعاعية Specific acitivty تنخفض .

2 . الحاجة إلى ضبط وقت التفاعل ودرجة حرارته .

3 . السيطرة على عمل الأنزيمات الداخلة في التفاعل .

4 . لا يمكن استخدام هذا التفاعل في توسيم الأحماض النووية مفردة الشريط .

## إطالة البادئة Primer extension

يعتمد هذا التفاعل على قدرة أنزيم بلمرة الحامض النووي DNAPoLI على بناء نسخة جديدة تبدأ من بادئة مستخدما قالباً من الحامض النووي DNA المفرد الشريط . ويمكن استخدام أطوال مختلفة من القوالب لإنتاج نسخ مختلفة الحجم . ونظراً لوجود نشاط هدم وبناء لهذا الأنزيم لذلك فأنه لا بد من استخدام جزء الأنزيم المسؤول عن نشاط البناء فقط .

إن انزيم بلمرة الحامض النووي DNA PoL I مؤلف من جزئين من متعدد البيتيدات الأول يمثل الجزء المسؤول عن نشاط الهدم بينما يمثل الجزء الثاني والذي يتراوح حجمه حوالي 76000 دالتون الجزء المسؤول عن نشاط البناء . لقدتم فصل الجزء المسؤول عن البناء والذي سمي بقطع كلينو Klenow fragments بمعاملة الأنزيم الأصلي بمادة Subtilisin أو بالأنزيم بروتييز Protease . ويستخدم هذا الأنزيم الآن بصورة شائعة في تحضير المجسات .

**طرق إطالة البادئات :**

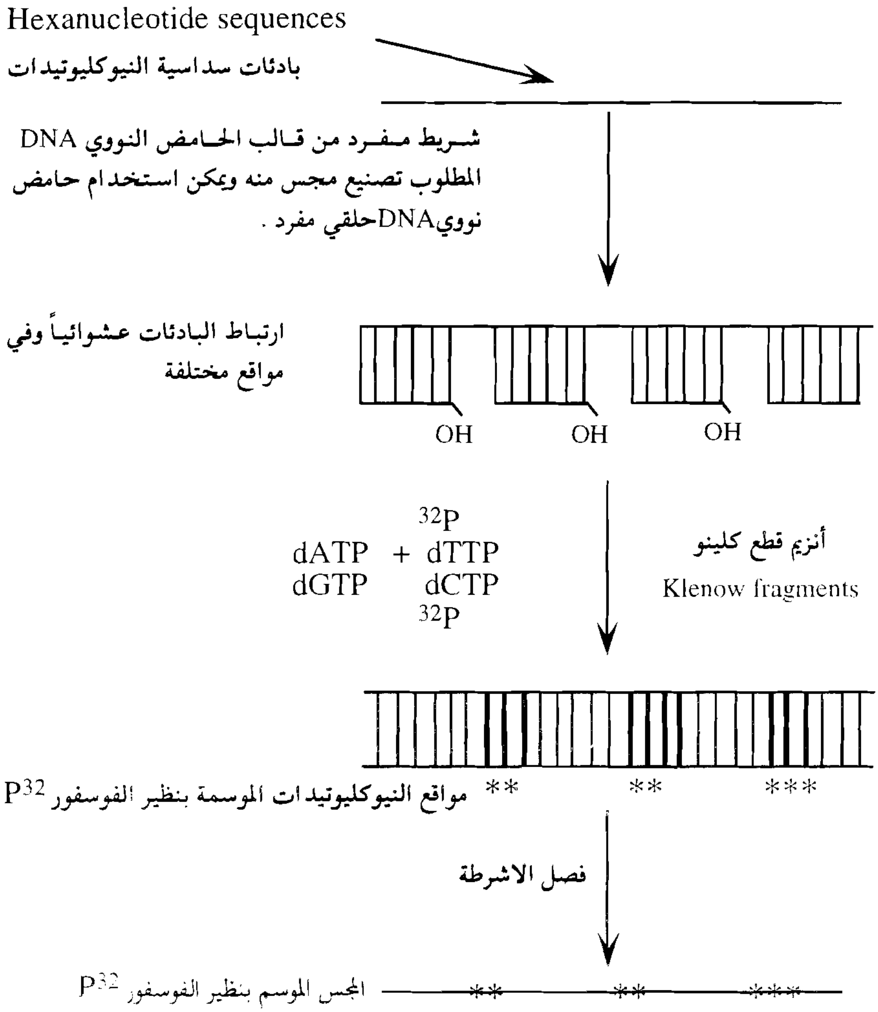
**أولاً : تصنيع البادئة العشوائي** Random Primer Synthesis

وهناك نوعان من هذا التفاعل اعتماداً على نوع الأنزيم المستخدم وهي :

**أ) تصنيع البادئة العشوائي باستخدام أنزيم قطع الكلينو :** استخدمت هذه الطريقة عام 1983 من قبل الباحثان فينبرج وفوجلستين وانتشرت بعد ذلك .

يحتاج هذا التفاعل إلى قالب من الحامض النوويDNA مفرد الشريط ومستقيم وبتركيز واطئ (حوالي 25 نانوجرام) ويمكن فصل الأشرطة المزدوجة بواسطة غلي محلول الحامض النووي بدرجة حرارة 100مْ لمدة عشر دقائق وترك المحلول بعد ذلك يبرد بدرجة حرارة الغرفة أو بإضافة قاعدة مثل محلول هيدروكسيد الصوديوم ، كما يمكن استخدام الحامض النووي المفرد الشريط للعاثي M13 على سبيل المثال . يجري هذا التفاعل بوجود قالب الحامض النووي والنيوكليوتيدات اللازمه إضافة إلى وجود واحدة أو أكثر من النيوكليوتيدات الموسمة شعاعياً إضافة إلى بادئة والأنزيم Klenow Fragments و البفر الخاص بذلك . لوحظ أن كفاءة هذا التفاعل تكون في أفضل حالاتها عندما يتم التفاعل بدرجة حرارة 25مْ وعندما يكون تركيز القالب 25-30 نانوجرام حيث يمكن ان تصل نسبة المواد الداخلة في التفاعل وتصنيع المجس إلى أكثر من 70% خلال ثلاث ساعات .

ويعود انتشار استخدام هذه الطريقة إلى إمكانية الحصول على قوة إشعاعية عالية إضافة إلى أنه يمكن استخدام حامض نووي غير نقي نسبياً كقالب مثل احتوائه على بعض الهلام أو وجود قلوية فيه . كما يمكن إجراء التفاعل بدرجات حرارة تزيد على درجة حراره الغرفة حتى درجة 37مْ . كما يمكن الحصول من هذا التفاعل على مجس بتركيز ما بين 25-30 نانوجرام وهو ما يكفي لتعقب مورثات حتى بنسخة واحدة (الشكل 6-6) .




(الشكل 6-6): تفاعل البادئة العشوائي باستخدام أنزيم قطع الكلينو ويلاحظ استخدام بادئات تنتشر عشوائياً على قالب الحامض النووي المستخدم حيث يبدأ الأنزيم بردم الفراغات مستخدماً النهايات الهيدروكسيلية الحرة من البادئات

**ب) تصنيع البادئة العشوائي باستخدام أنزيم الاستنساخ العكسي Reverse transcriptase :**

يعتمد هذا التفاعل على قدرة أنزيم الاستنساخ العكسي على تصنيع نسخة حامض نووي DNA من قالب مؤلف من الحامض النووي RNA . يحتاج هذا التفاعل إضافة إلى قالب الحامض النووي RNA بادئة مؤلفة من متعدد الثايمين Oligo-dT والنيوكليوتيدات اللازمة ووجود واحد أو أكثر منها موسمة إشعاعياً إضافة إلى الأنزيم . يجري هذا التفاعل بدرجة حرارة 37°م ويمكن الحصول من خلاله على مجس عالي القوة الإشعاعية وبتركيز مناسب . ويستخدم هذا التفاعل . كثيراً في تصنيع الحامض النووي المتمم cDAN وخصوصاً الشريط الأول منه . ويعاب على هذا التفاعل محدودية استخدامه واستمرار الأنزيم بنسخ جميع قالب الحامض النووي RNA .

يعتبر تفاعل تصنيع البادئات سواء باستخدام أنزيم قطع الكلينو أو الاستنساخ العكسي تفاعلاً جيداً لأنه يؤدي إلى الحصول على مجسات نقية وبتركيز أكثر من تركيز القالب المستخدم في التفاعل . ولكن بمقارنته مع تفاعل ترجمة الثلمة فأن التركيز الناتج يكون قليلاً . إلا أن تفاعل تصنيع البادئات وخصوصاً باستخدام قطع الكلينو يعتبر مثالياً في استخدامات معينة مثل التهجين بطريقة ساوثرن حيث يفضل استخدام مجس عالي النشاط الإشعاعي وقليل التركيز .

**ثانياً: تفاعل البادئة المفردة**

إن أنزيم قطع الكلينو يمكن أن يستخدم لإنتاج مجسات من قطع دائرية الحامض النووي كما هي الحال في توسيم مجس للعاثي M13 في مثل هذا التفاعل فانه يتم استخدام حوالي 50 نانوجرام من خيط أو شريط العاثي M13 و2 نانوجرام من البادئه ويبدأ الأنزيم عمله من النهاية الثالثة أو الخامسة اعتماداً على مكان التفاف البادئة مع قالب شريط الحامض النووي للعاثي . فلو افترضنا بأنه لدينا عاثٍ مهندس وراثياً مع مورث معين فانه عند التفاف البادئة مع النهاية الخامسة للعاثي فان عملية

البناء تبدأ للناقل (من نهاية المورث المهندس وراثياً) ويمكن بتحديد كمية المواد الداخلة بالتفاعل السيطرة على عمل الأنزيم بحيث يتوقف البناء عند نهاية الناقل فقط دون بناء نسخة للمورث وذلك بإضافة مادة EDTA لايقاف التفاعل بعد فترة وجيزة . وهكذا يمكن الحصول على مجس موسم شعاعياً للناقل فقط ويمكن استخدامه في تعيين قطع المورث في فلتر يحتوي على قطع مختلفة من الناقل والمورث .

أما في حالة التفاف البادئة حول النهاية الثالثة للقالب فأن عملية البناء ستبدأ من بداية المورث المهندس وتنتهي ببناء نسخة من القالب جميعه (الناقل والمورث) . ويمكن بعد ذلك فصل المورث واستخدامه كمجس كما يمكن استخدام الناقل لوحده كمجس آخر . وتستخدم مثل هذه الطريقة على نطاق واسع في تحضير المجسات الخاصة بتقنية بصمة الحامض النووي DNA Fingerprint وكذلك لايجاد الخرائط الوراثية (الشكل 6-7) .

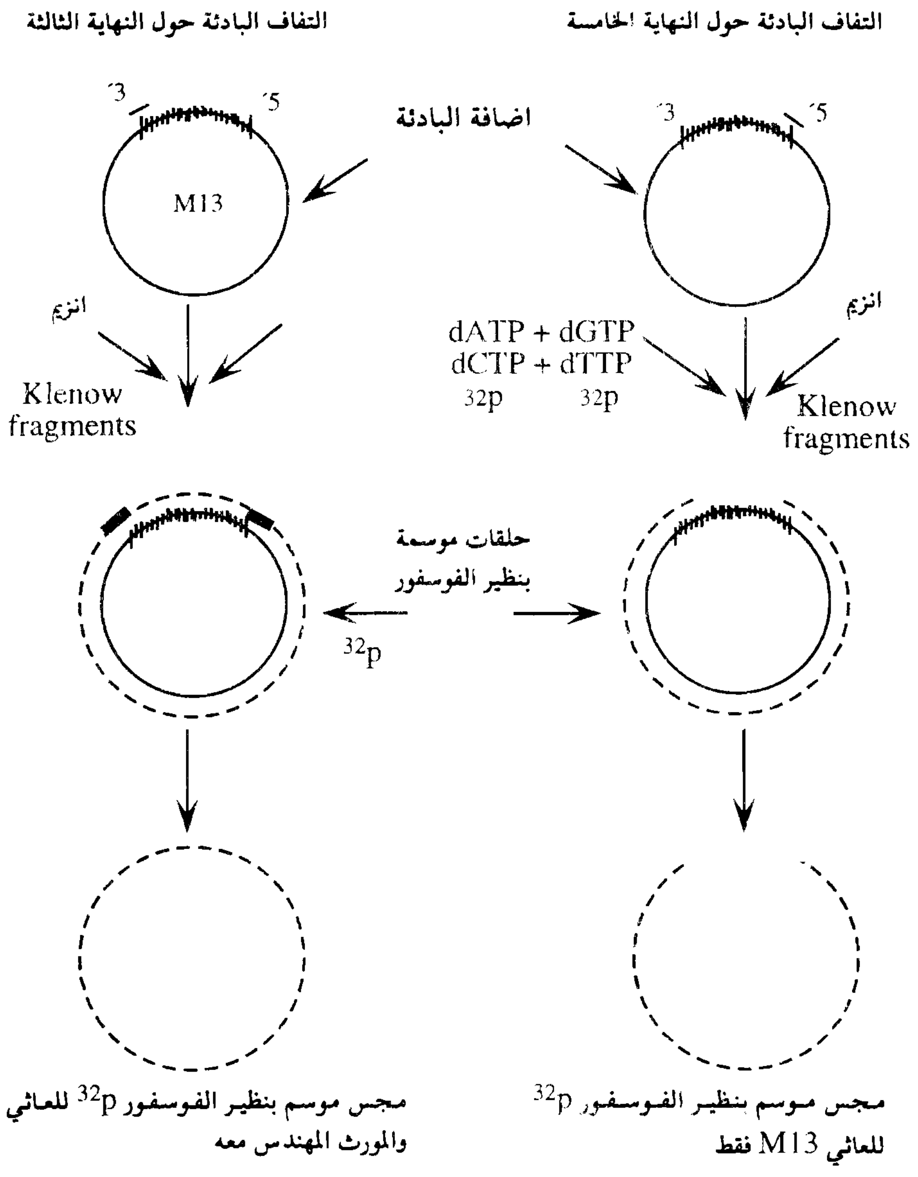
### توسيم نهايات الحامض النووي *Ends Labelling*

يتم في هذه الطريقة توسيم نهايات الحامض النووي 3-end ، 5-end عن طريق الهدم والبناء وإحلال النيوكليوتيدات الموسمة بدلاً من النيوكليوتيدات الطبيعية في البناء . ويذكر بأن القوة الإشعاعية للمجسات المحضرة بهذه الطريقة قد تكون منخفضة اعتماداً على طول الترددات التي تم فيها البناء وبزيادة مساحة البناء فأنه تزداد فرصة دخول النيوكليوتيدات الموسمة إشعاعياً وبالتالي تزداد الكفاءة أو القوة الإشعاعيه للمجس .

هناك عدة طرق في توسيم النهايات اعتماداً على النهاية المستخدمة وهي :

### أولاً: توسيم النهاية الخامسة *5-end* .

وهي طريقة شائعة في دراسة تسلسل نيوكليدتيدات الحامض النووي DNA . يتم في هذه الطريقة معاملة الحامض النووي DNA المراد توسيمه بأنزيم قاطع لإنتاج قطع حامض نووي قصيرة .




(الشكل 6-7): تفاعل البادئة المفردة باستخدام العائي M13 المهندس وراثياً وانزيم قطع الكلينو ويلاحظ بأن نوع المجس يختلف اعتماداً على موقع ارتباط البادئة والسيطرة على ظروف التفاعل

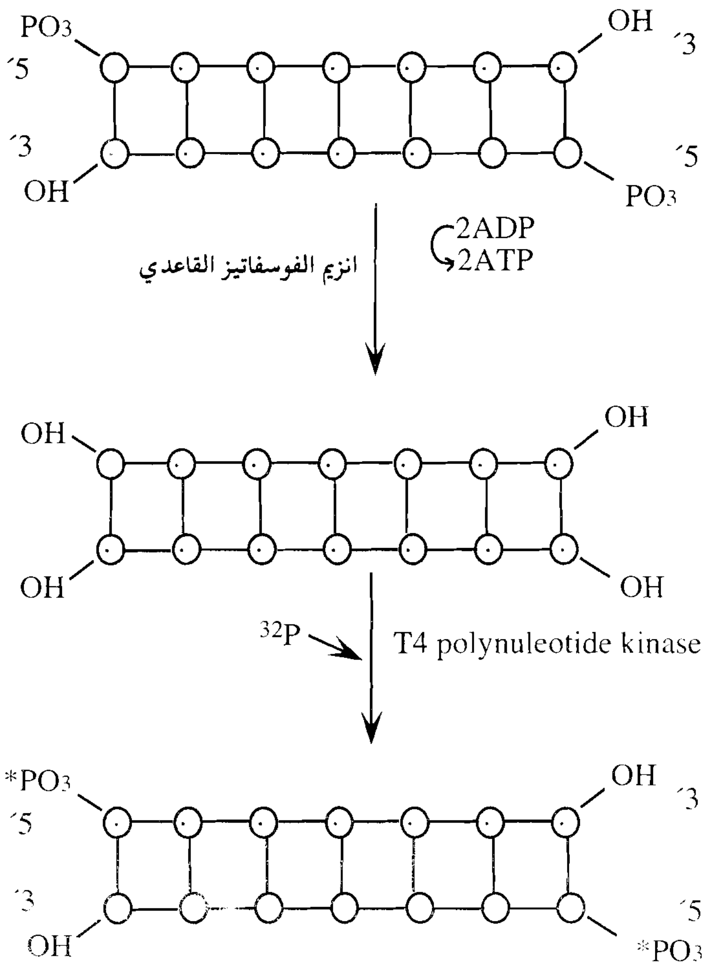
تعامل قطع الحامض النووي بأنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline Phosphtase بوجود الادنين ثنائي الفوسفات ADP حيث تتم إزالة الفوسفور من النهاية الخامسة ونقله إلى الأدنين ثنائي الفوسفات ثم يضاف الأنزيم T4 polynbucleotide kinase (المعزول من بكتريا القولون E.coli المصابه بالعاثي T4) الذي يقوم بإعادة فسفرة النهاية الخامسة وبوجود نظير الفوسفور 32 فأنه يتم توسيم النهاية الخامسة إشعاعياً (الشكل 6-8) .

### ثانياً: توسيم النهاية الثالثة *3-end*

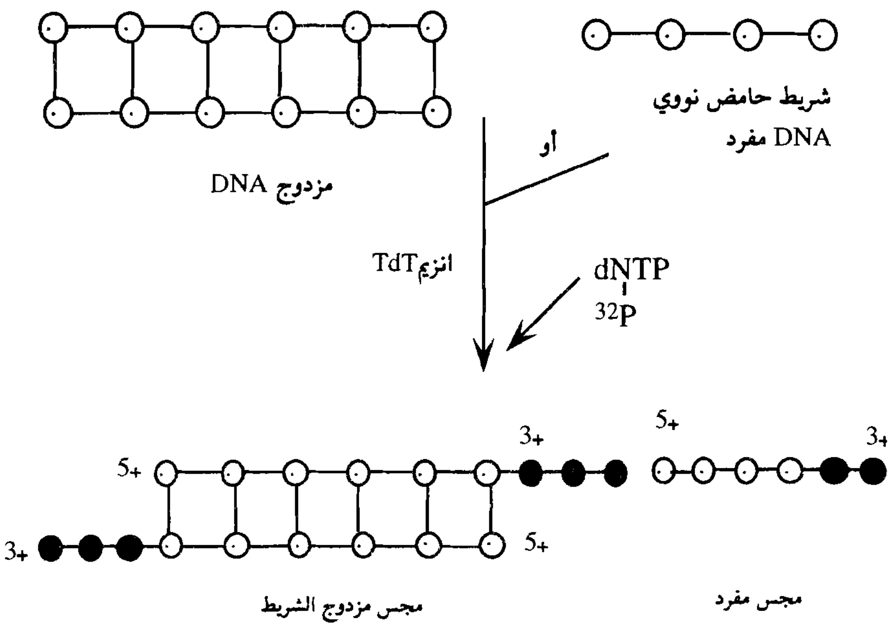
توسم النهاية الثالثة في هذا التفاعل عن طريق استخدام قطع حامض نووي DNA مكسوره بأنزيم قاطع يضاف إليها الأنزيم Teminal dioxynucleotidyl TdT Transferase وهو أنزيم مؤلف من بروتين ذي وزن جزيئي يبلغ حوالي 33,000 ويسلك سلوك أنزيم بلمرة الحامض النووي DNA في البناء إلا أنه لا يحتاج إلى قالب لبدء البناء .

يقوم أنزيم TdT بإضافة النيوكليوتيدات إلى النهاية الثالثة دون اعتبار لنوع نهاية الحامض النووي (عمياء أو لزجة) . وبوجود نيوكليوتيدات موسمة إشعاعياً فأنه سيتم توسيم النهاية الثالثة لقطع الحامض النووي . كما يمكن استخدام قطع حامض نووي ذات ثلم في هذا التفاعل . ويتم في هذه الطريقة إنتاج مجس ذي قوة إشعاعية ممتازة (الشكل6-9) .

كما يمكن استخدام الأنزيم Poly (A) polymerase لتوسيم النهاية الثالثة عند استخدام الحامض النووي RNA كقالب لإنتاج مجس موسم ويحتاج هذا التفاعل عندئذ إلى أنزيم اللحام T4 DNA Ligase ونيوكليوتيدات موسمة الأدنين .




(الشكل 6-8): توسيم النهاية الخامسة لمجس DNA حيث يزيل أنزيم الفوسفاتيز القاعدي ذرات الفوسفور من النهاية الخامسة ونقلها إلى جزئيات الأدنين ثنائي الفوسفات بينما تعمل فسفرة متعدد النيوكليوتيدات على إعادة ذرات الفوسفور وباستخدام الفوسفور المشع فأنه يتم توسيم النهايات الخامسة لأشرطة الحامض النووي DNA




**(الشكل 6-9): استخدام انزيم TdT في توسيم النهاية الثالثة للمجسات ويضيف هذا الأنزيم النيوكليوتيدات في النهاية الثالثة دون اعتبار لنوع قطع الحامض النووي DNA المستخدمة كما لا يحتاج لبادئة في البناء**

وفي كل من طريقة توسيم النهاية الخامسة والثالثة فأنه من الممكن استخدام شريط مفرد أو مزدوج من الحامض النووي إلا أن كفاءة التوسيم تكون عالية باستخدام الشريط المفرد . كما تحتاج هذه التفاعلات إلى كمية وافرة من الأنزيمات وتعتمد قوة النشاط الإشعاعي للمجس على قوة النشاط الإشعاعي للنيوكليوتيدات الموسمة (6000 uci , 3000 uci) .

### ثالثاً: ترميم نهاية الحامض النووي *End repair Labelling*

يتم في هذا التفاعل استخدام قطع حامض نووي مزدوجة الشريط معاملة بأنزيم قاطع ولايهم إذا كانت القطع لزجة أو عمياء وتقوم الأنزيمات المستخدمة في هذا التفاعل بترميم نهايات قطع الحامض النووي غيرالمتساوية الطول (اللزجة) وبهدم جزء من النهاية الثالثة للأشرطة المزدوجة المتساوية الطول ثم بنائها مرة أخرى وباستخدام نيوكليوتيدات موسمة إشعاعياً فأنه يتم توسيم هذه النهايات للحصول على مجس موسم إشعاعياً .

ونظراً لاختلاف الأنزيمات المستخدمة في أجزاء هذا التفاعل فإن هناك تفاعلين رئيسين هما :

**أ) الترميم باستخدام أنزيم قطع الكلينو**

يحتاج هذا التفاعل إلى قطع حامض نووي DNA مزدوجة وغير متساوية الطول حيث يتم الترميم من موقع النهاية الثالثة للاشرطة القصيرة . ويقوم الأنزيم باستخدام النيوكليوتيدات غير المزدوجة في النهاية الخامسة كقالب لترميم النهاية الثالثة وذلك بوجود النيوكليوتيدات الحرة اللازمة والتي لا بد أن يكون أحداها على الأقل موسماً شعاعياً . ونظراً لحساسية الأنزيم المستخدم لذلك فأنه يفضل إجراء هذا التفاعل بدرجة حرارة الغرفة ولمدة 15 دقيقة لتجنب حصول تثبيط انعكاس في فعالية الأنزيم .

كما يمكن استخدام أنزيم بلمرة الحامض النووي DNA الأول DNA Pol I لإجراء هذا التفاعل بعد تثبيط نشاط الهدم فيه وذلك بإجراء التفاعل في وسط ملحي عالي التركيز ودرجة حرارة منخفضة (5-10مْ) .

**ب) الترميم باستخدام الأنزيم** T4 DNA Polymerase

يشابه الأنزيم T4 DNA Pol في فعاليته أنزيم بلمرة الحامض النووي DNA الأول ولكنه يختلف عنه في اتجاه تفاعلاته حيث يبدأ نشاط الهدم فيه من النهاية الثالثة نحو الخامسة (3´⇦5´) بينما يبدأ نشاط البناء من النهاية الخامسة نحو الثالثة(5´⇦3´) . يستخدم هذا الأنزيم بالتوسيم بطريقة تسمى بالتصنيع الإحلالي .

Replacement Synthesis حـيث يقـوم الأنزيم بوجـود قطع حـامض نووي مزدوجة فقط دون وجود نيوكليوتيدات حرة (تضاف فيما بعد) بخلق ثغرة في موقع النهاية الثالثة من الأشرطة مستخدماً نشاط الهدم فيه وعند إضافة النيوكليوتيدات الموسمة إشعاعياً فانه يقوم بترميم هذه الثغرات عن طريق إضافة النيوكليوتيدات اعتماداً على قالب النهاية الخامسة . ويمكن في هذا التفاعل استخدام أشرطة مزدوجة متساوية أو غير متساوية الطول كما أنه لا بد من الذكر أنه لا يجب ترك الأنزيم يعمل لفترة طويلة حتى لا يتم توسيع الثغرات لغرض عدم الإضرار بالمجس .

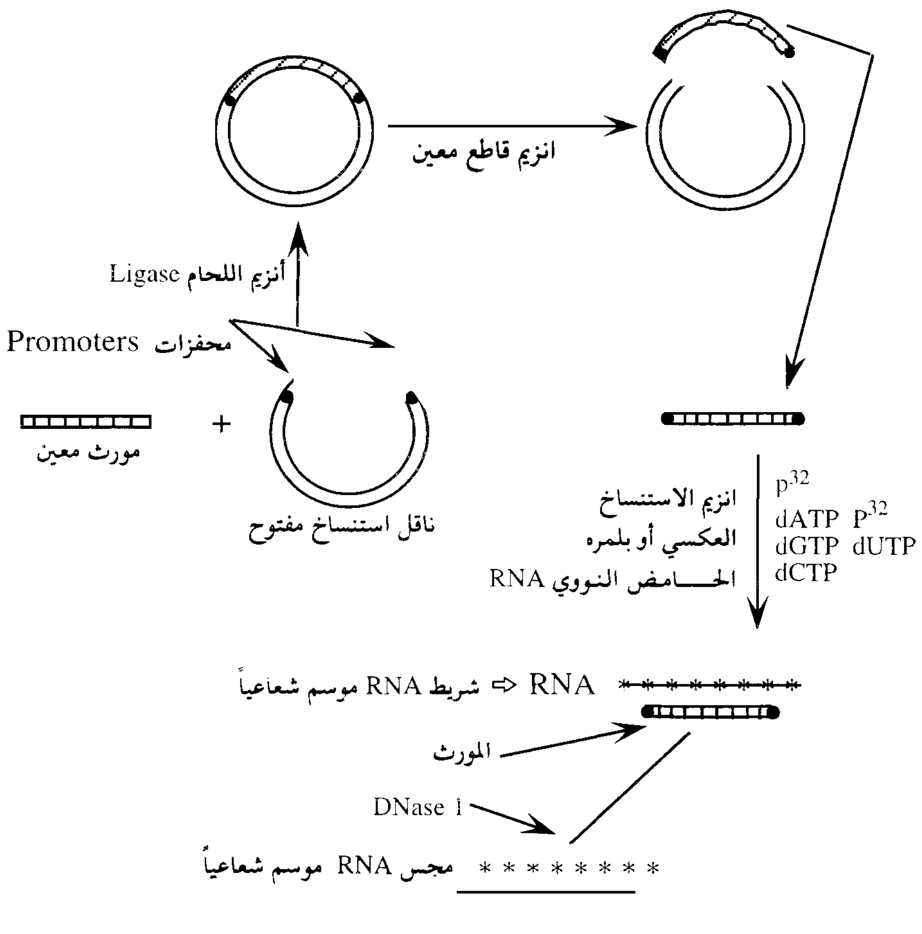
ويذكر أن قوة المجسات الإشعاعية المحضرة في هذه الطرق تكون عالية ويمكن استخدامها في تتبع وقراءة تسلسل نيوكليوتيدات الأحماض النووي (RNA, DNA) وبناء الخرائط وتحديد مواقع الأنزيمات .

## تصنيع مجس الحامض النووي الريبوزي *RNA*

يشتمل هذا التفاعل على استخدام أنزيم بلمـرة الحامض النووي RNA RNA Polymerase . يحتاج هذا الأنزيم لأجل البدء في عمله إلى منطقة محفز Promoter يبدأ منها تصنيع مجس الحامض النووي RNA . فلو أريد تصنيع مجس RNA موسم شعاعياً لقطعة حامض نووي DNA فأنه يجب هندسة هذه القطعة إلى ناقل استنساخ Transcription Vector بحيث تقع القطعة المراد هندستها بين محفزين (لاحظ فصل نواقل الهندسة الوراثية) .

يتم بعدها قطع الناقل بحيث يتم الحصول على قطعة الحامض النووي محاطة بمنطقتي المحفزين .عندها تضاف النيوكليوتيدات الموسمة إشعاعياً مع البفر الخاص الى التفاعل ويضاف أنزيم الاستنساخ العكسي Reverse transcriptase أو أنزيم بلمرة الحامض النووي RNA (اعتماداً على نوع المحفزات فمثلاً عندما تكون المحفزات بكتيرية فأنه يستخدم أنزيم RNA Pol وعندما تكون المحفزات الفاجية يستخدم أنزيم الاستنساخ العكسي مع بعض الشذوذ في هذه القاعدة) . إن وجود منطقتي محفز يسمح بالاستنساخ من كلتا النهايتين ويبدأ التفاعل من النهاية الخامسة عادة . وبعد الانتهاء من التفاعل فأنه من الضروري التخلص من قالب قطعة الحامض النووي DNA وذلك بإضافة أنزيم DNase النقي جداً . ويمكن بعد الانتهاء من التفاعل

والتخلص من القالب استخدام المجس في التهجين دون تنقية . إن هذا التفاعل يتميز بالحصول على تركيز عالٍ من المجس يتراوح بين 250-350 نانوجراماً وباتحاد يصل إلى أكثر من 80% وقوة إشعاعية عالية (الشكل 6-10) وتعتبر المجسات المحضرة بهذه الطريقة ذات حساسية عالية .




**(شكل 6-10): طريقة تحضير مجس RNA من قالب DNA. إن أنزيمات بلمرة الحامض النووي RNA المستخدمةفي هذه الطريقة تحتاج إلى محفزات متخصصة حسب نوع الأنزيم لذلك يتم اللجوء إلى نواقل الاستنساخ لربط قوالب الحامض النووي DNA الى هذه المحفزات**

تفوق حساسية المجسات بالطرق السابقة الأخرى ويمكن استخدامها في شتى أنواع التهجين الخاص بالأحماض النووية أو البروتينات .

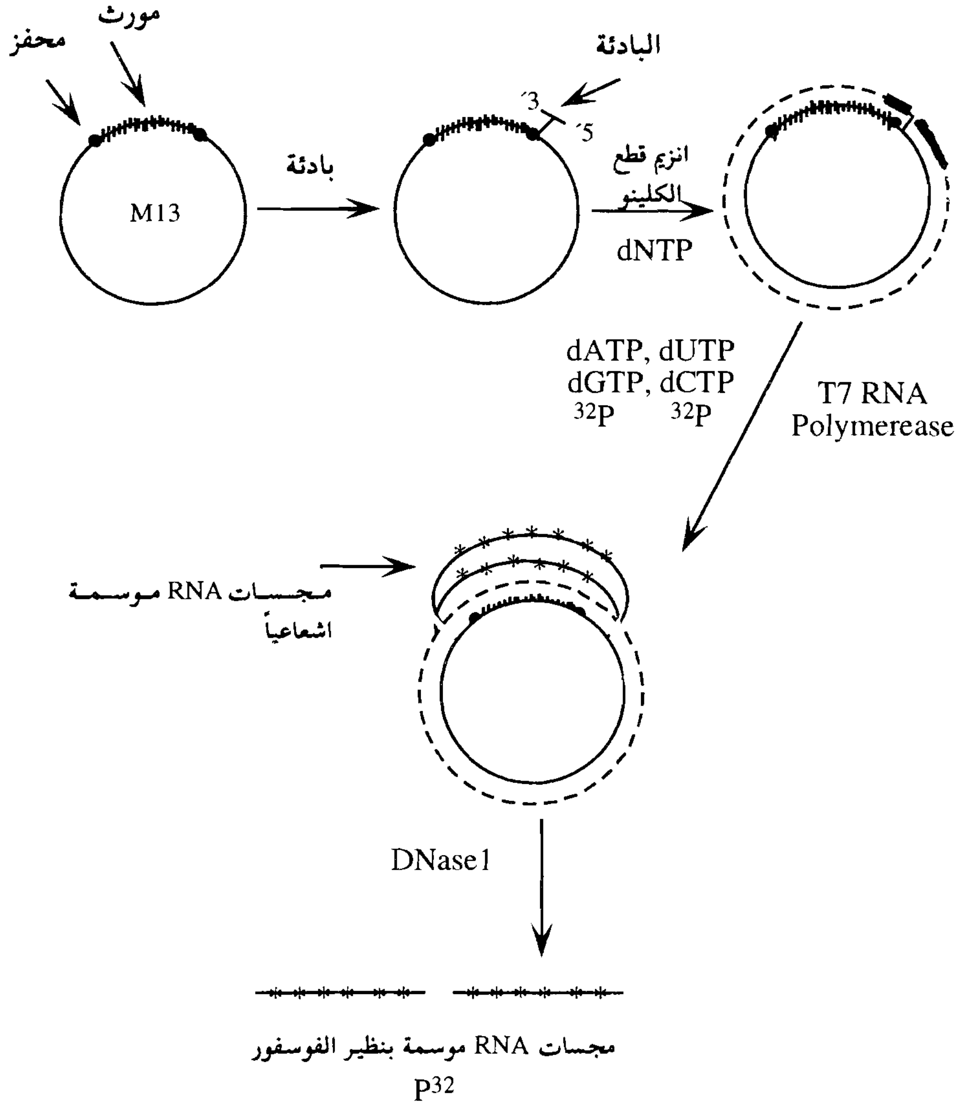
كما يمكن إجراء هذا التفاعل بصورة أخرى وبكفاءة أكبر وذلك عند استخدام قالب حامض نووي DNA حلقي . حيث وجد أن نسبة الاتحاد في هذا التفاعل أكثر من سابقتها .

تتم الطريقة الثانية لهذا التفاعل بهندسة قطعة الحامض النووي DNA (القالب) بين موقعي محفزي الناقل M13 . وباستخدام بادئة بالقرب من النهاية الثالثة ونيوكليوتيدات طبيعية فأنه يمكن ازدواج حلقة الناقل جزئياً عن طريق بناء حلقة ثانية بإضافة أنزيم قطع الكلينو وابتداء من النهاية الثالثة للبادئة باتجاه القطعة المهندسة ثم يضاف الأنزيم T7 RNA Polymerase اضافة إلى النيوكليوتيدات الموسمة إشعاعياً والبفر الخاص حيث يبدأ هذا الأنزيم بتصنيع مجس RNA ابتداء من منطقة المحفز الاولى ماراً بالقالب وانتهاء بمنطقة المحفز الثانية . ويعيد هذا الأنزيم دورة الاستنساخ عده مرات لكل قالب مما يزيد من تركيز المجس وكذلك قوته الإشعاعية (الشكل6-11) .

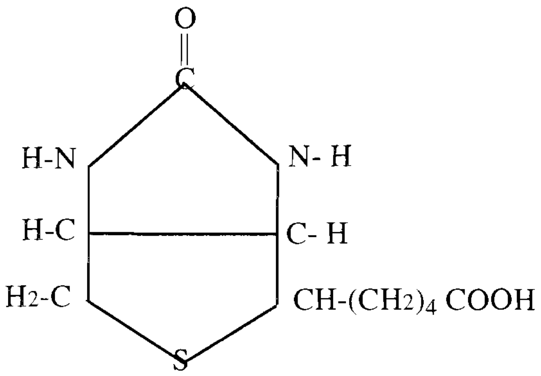
## تحضير المجسات غير المشعة

تتضمن طريقة تحضير هذه المجسات عدم استخدام مواد مشعة في التوسيم والاستعاضة عنها بمواد أخرى غير مشعة مثل البايوتين Biotin والسايتدين المسلفن Sulphonated Cytidine والمركب Acetylamino Fluorenyl وتتداخل هذه المواد بين أشرطة الحامض النووي Inter calation أو ترتبط مع النيوكليوتيدات . ولهذه المواد القابلية على إعطاء إشاره معينة كالضوء واللون عند معاملة المجس بمواد أخرى مثل الافدين Avidin والسترب أفدين Strep Avidin . ويعتبر البايوتين أكثر المواد غير المشعة المستخدمة في تحضير المجسات الموسمة .

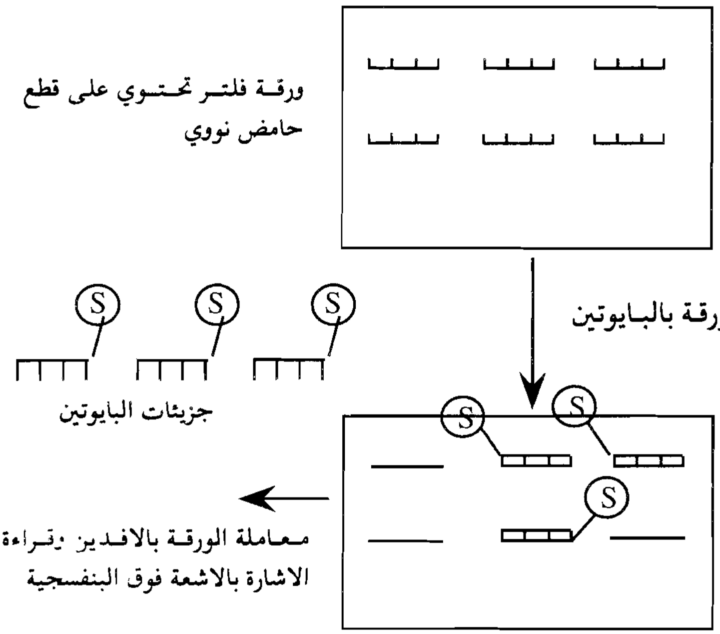
البايوتين هو أحد فيتامينات B مؤلف من نيوكليوتيد بايوتيني Biotinylated nuvleotide ذائبة في الماء (الشكل 6-12) .




(الشكل 6-11): طريقة تحضير مجس RNA باستخدام حلقة DNA كقالب. تتميز هذه الطريقة بالحصول على تركيز عالٍ من المجس وبقوه إشعاعية عالية




(الشكل 6-12): التركيب الكيمائي للبايوتين Biotin




(الشكل 6-13): طريقة التهجين بواسطة مجس بايوتيني حيث يتم ارتباط البايوتين مع قالب المجس DNA انزيمياً ثم استخدامه في التهجين

يتحد البايوتين مع شريطي الحامض النووي بطريقة التداخل الشبيه بتداخل مركب الاثيديوم برومايد وباستخدام مركبات مثل الأفدين والسترب أفدين فأنه يمكن الحصول على إشارة واضحة . كما يمكن استخدام مركبات ذات مجاميع نشطة ضوئياً مثل الاستيل امينو فلورونيل التي تتفاعل مع قواعد البايرميدين ويمكن تعقبها بواسطة الطرق الأنزيمية أو المناعية .

وعلى الرغم من أهمية هذه الطرق في تحضير المجسات إلا أنه لا يمكن استخدامها لتعقب مورثات ذات نسخة فريدة واحدة كما هي الحال في الكثير من مورثات اللبائن والأحياء الراقية الأخرى (الشكل 6-13) .

كما أن هناك طرقاً أخرى يستخدم فيها التوسيم المناعي لأجل الكشف عن العيوب في المورثات أو البروتينات . فمثلاً يمكن الكشف عن العيوب الوراثية عن طريق الكشف عن البروتينات غير الطبيعية . فمثلاً يرتبط سرطان الدم المزمن Chronic melogenous Leukemia ( CML) مع صبغي الفلادلفيا الذي يحتوي على انتقال صبغي بين الصبغي 22 والصبغي9 ينتج عنه وجود المورث السرطاني الابتدائي c-abl بجانب المورثات المناعية bcr . لذلك فأنه باستخدام مواد مناعية موسمة فأنه بالإمكان الكشف عن البروتين الهجين الذي يرتبط مع صبغي الفلادلفيا . ويمكن تطبيق نفس الطريقة في كشف البروتينات غير الطبيعية الأخرى .

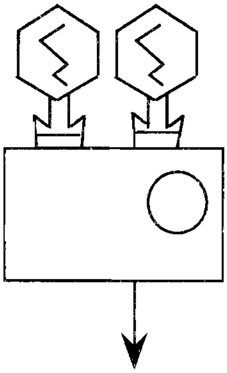
## توسيم الخلايا الحية

بالإضافة إلى الطرق السابقة التي تم الحديث عنها فأنه من الممكن استخدام النظائر المشعة في تعليم المركبات البايولوجية داخل الخلايا الحية . ويمكن استخدام جميع أنواع النظائر في هذا التوسيم بصورة مباشرة أو مرتبطة مع مواد أخرى مثل التايميدين والسايتدين وكلوريد الأمونيوم وغيرها . ويشترط في هذه التجارب أن تكون العناصر المشعة هي المصدر الوحيد للخلايا الحية في الوسط الغذائي .

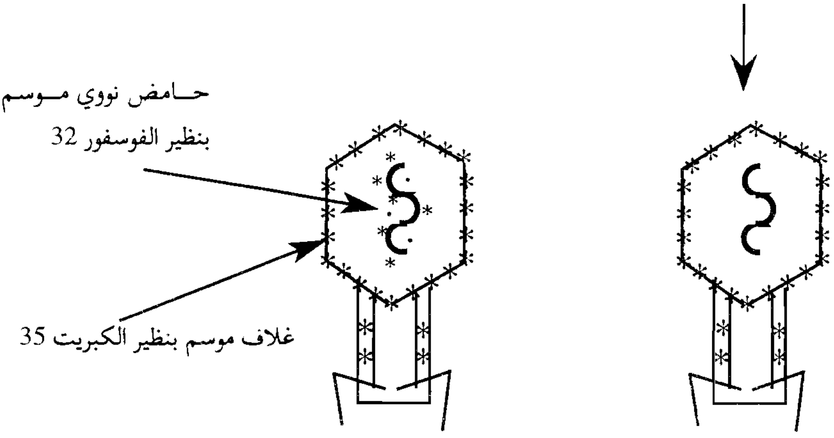
فمثلاً يستخدم كلوريد الأمونيوم الذي يحتوي في تركيبه نظير النتروجين 14 أو 15 كمصدر وحيد للنتروجين في الوسط الغذائي . لذلك فأنه عند تنمية البكتيريا

مثلاً على هذا الوسط فأن البكتيريا تكون مجبرة على استخدام نظير النتروجين في فعالياتها الفسلجية ونتيجة لذلك فأنه عند تضاعف الأحماض النووية فأن الأجيال الجديدة منها ستكون موسمة بنظير النتروجين . كما يمكن تنمية القمم النامية لجذور النباتات في محلول يحتوي على نظائر مشعة كمصدر وحيد لأجل مراقبة الانقسامات وغيرها .

وهكذا فأنه يمكن الكشف ومتابعة تفاعل معين داخل الخلايا بهذه الطريقة . وتستخدم مثل هذه الطريقة بشكل واسع في دراسة تضاعف المادة الوراثية في الأحياء بدائية النوى مثل البكتيريا والرواشح وكذلك الأحياء حقيقية النوى . كما تستخدم أيضاً في دراسة اتجاهات تفاعلات البلمرة ودراسة الصبغيات وغير ذلك . (الشكل6-14) .




**تنمية البكتيريا المصابة بالعاثيات على وسط غذائي يحتوي على نظير الكبريت $^{35}$(S) كمصدر وحيد للكبريت لأجل توسيم الأغلفة البروتينية للعاثيات الجديدة أو يحتوي على نظير الفوسفور $^{32}$(P) كمصدر وحيد للفوسفور لأجل توسيم الحامض النووي للعاثيات الجديدة**



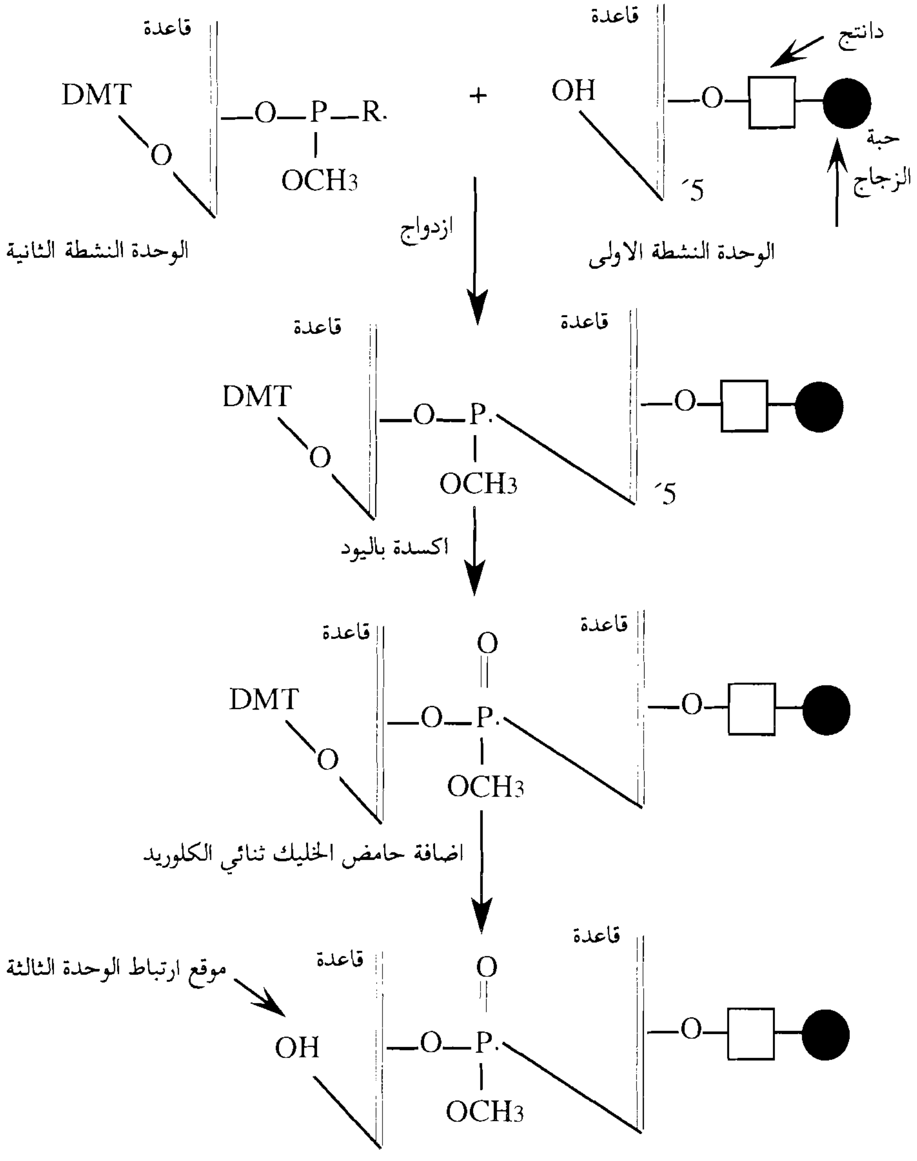

**(الشكل 6-14) : إحدى الطرق المستخدمة في التوسيم داخل الخلايا ويلاحظ بأنه بالإمكان الحصول على بروتينات وأحماض نووية موسمة بهذه الطريقة ويمكن استخدامها لمراقبة تصنيع البروتينات أو الاحماض النووية وغايات أخرى عديدة**

**تصنيع المجسات بالطريقة الجافة الآلية** *Automated solid plase method*

يمكن تصنيع مجسات الحامض النووي DNA أو RNA بطريقة الحالة الجافة الآلية ذلك بإضافة وحدات مفردة نشطة إلى حبيبات من الزجاج أو الترشيح Resin حيث ترتبط الوحدة الأولى مع الحبيبة الزجاجية ثم ترتبط مع هذه وحده ثانية وثالثة وهكذا . إن الوحدة الآحادية النشطة المستخدمة هي ديوكسي ريبو نيوكليوتيد -3 فوسفور اميتدير Deoxyribonucleoside 3, phosphor amidites وتسمى أيضا Protonated phosphoramidite وهي مشابهة للنيوكليوتيد الطبيعي وتحمل قاعدة نايتروجينية إلا أنها لا يمكن أن تحل في تفاعل البلمرة بدلاً من النيوكليوتيد الطبيعي نظراً لوجود مجاميع كيمائية إضافية (الشكل 6-15) . وفي تفاعل الحالة الجافة فأنه يمكن بتفاعلات كيميائية مختلفة التخلص من المجاميع الإضافية وربطها كنيوكليوتيد طبيعي .

ويمكن الحصول على هذه الوحدات وبقواعد نتروجينية مختلفة . يتم تصنيع مجس معين معروف الترددات وذلك بإضافة وحدة نشطة تحمل القاعدة النتروجينية الأولى في التردد المطلوب تصنيعه حيث ترتبط ذرة الأوكسجين لذره الكاربون الثالثة فيه مع الراتنج المرتبط مع الزجاج . تزال بعد ذلك مجموعة DMT المرتبطة مع ذرة الأوكسجين للكاربون الخامس عن طريق اضافة حامض الخليك ثنائي الكلوريد Dichloroacetic acid تتم بعد ذلك اضافة الوحدة النشطة الثانية التي تحتوي على القاعدة النتروجينية الثانية في التردد المطلوب تصنيعه . ترتبط ذرة الفوسفور للكاربون الثالث في الوحدة الجديدة مع ذرة الأوكسجين للكاربون الخامس في الوحدة الأولى المرتبطة مع راتنج الحبة الزجاجية .

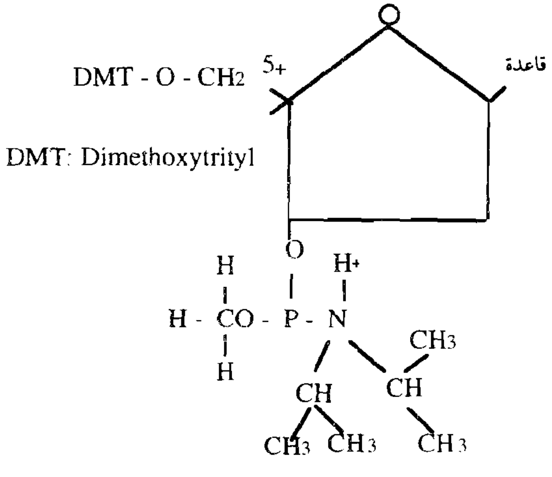
إن الفوسفور في الفوسفيت ثلاثي الأستر الذي يمثل منطقة ارتباط الوحدة الأولى مع الثانية هو ثلاثي التكافؤ ولأجل تحويله الى فوسفور خماسي التكافؤ مماثل لما هو في النيوكليوتيدات الطبيعية فأنه يضاف اليود لأجل أكسدته وتحويله إلى فوسفور ثلاثي الأستر . تزال بعد ذلك مجموعة DMT بنفس الطريقة السابق في الوحدة الاولى وحينئذ يزداد طول السلسلة الجديدة بمقدار وحدة واحدة . وهكذا تضاف الوحدات واحدة بعد الأخرى اعتماداً على تسلسل ترددات المجس المطلوب تصنيعه .




**(الشكل 6-15): طريقة تصنيع أشرطة الحامض النووي DNA في الحالة الجافة بواسطة الفوسفيت ثلاثي الأستر**

ويمكن الحصول على مجس موسم اشعاعياً باستخدام وحدات نشطة تحتوي على نظير الفوسفور 32 بدلاً من الفوسفور الطبيعي . وتستغرق كل دورة (إضافة وحدة واحدة) حوالي عشر دقائق .

تعتبر هذه الطريقة جيدة في تصنيع سلاسل الحامض النووي حيث إنه في كل نهاية خطوة أو دورة يتم التخلص من النواتج الجانبية وبعد تهيئة الترددات المطلوبة تتم إزالة مجاميع المثيل الواقية للفوسفات بإضافة الفينول الكبريتي Thiophenol ويحرر شريط الحامض النووي من الحبات الزجاجية بشق رابطة الاستر بين مجموعة الهيدروكسيل لذرة الكاربون الثالثة في الوحدة الأولى والراتنج المرتبط مع الحبات الزجاجية عن طريق إضافة محلول مركز من هيدروكسيد الأمونيوم ثم تزال مجاميع البنزويل والايزوبيتريل Isobutyryl من القواعد النتروجينية بتسخين أشرطة الحامض النووي مع هيدروكسيد الأمونيوم .(الشكل 6-16) . ويمكن تنقية المنتج بواسطة طرق التنقية المختلفة . يمكن استخدام المجسات الموسمة إشعاعياً والمحضرة بواسطة هذه الطريقة في البحث عن تتابع مكمل في جزيء طويل من الحامض النووي DNA أو حتى في صبغي . كما يمكن استخدامها كبادئات في عملية بلمرة الحامض النووي أو في تهجين الأوراق المختلفة .




(الشكل 6-16) : تركيب الوحدة النشطة Protonated Phosphoramidite المستخدمة في طريقة الحالة الجافة الآلية.

# 7

# تهجين الحامض النووي

**مقدمة**

**تهـجين الأغـشـيـة**

**طرق تهـجين الأغـشـيـة**

-وذمة ساوثرن

-تهجين أوراق النتروسليلوز أو النايلون

-وذمة نورثرن

-تبقيع الحامض النووي

-تبقيع مستعمرات البكتريا أو العاثيات

-تهـجين الـتـحـضـيـرات الخلوية

-تهـجين البـروتينات أو ذمـة ويسـتـرن

**قـراءة تسلسل ترددات الحـامـض النووي**

-طريقـة مـاكـسـام وجلبـرت

-طريقـة سـانجـر وكـولسـون

## مقدمة

إن تحليل الحامض النووي عبر استخدام الأنزيمات القاطعة والهجرة الكهربائية لا يعطي الصورة الواضحة واللازمة عن محتويات قطع الحامض المهجرة إذ أن أطوالها مختلفة ، إضافة للأعداد الهائلة منها والتي تختلف اعتماداً على حجم مجين الكائنات Genome .

كما أن قطع الحامض النووي تلك تحتوي الكثير منها على عدد من المورثات ، وحيث إن هندسة مورث معين يحتاج على الأقل معرفة وتحديد قطعة الحامض النووي التي تحتويه لأجل عزلها وتقطيعها مجدداً . لذلك فأن تقنية تهجير قطع الحامض النووي عبر الهلام أو الاكرليمايد أو غيرها في حقل كهربائي تبقى غير مفيده في هذا المجال . لهذا تم التفكير في اكتشاف طرق أخرى تحقق هذا الهدف .

لقد تمت الاستفادة في هذا الموضوع من المعلومات المتوفرة حول نشاط عمل أنزيمات بلمرة الحامض النووي والمعلومات المتوفرة حول قدرة ترددات الحامض النووي على الارتباط لتكوين أزواج من الأشرطة إلى التفكير باستخدام نفس المبدأ لتهجين الأحماض النووية والكشف عن مورثات معينة مستهدفة عبر توفير ظروف محددة ومجسات موسمة إشعاعياً تمثل نظائر المورثات المطلوب عزلها . وفي عام 1975 ظهرت أول طريقة لتهجين الحامض النووي DNA سميت وذمة أو وصمة ساوثرن South-ern Blot باسم مكتشفها .

بعدها ظهرت طرق أ خرى لتهجين الحامض النووي RNA وتهجين البروتينات و طرق أخرى . إن أي شريطين مفردين من الحامض النووي لهما القابلية على الارتباط مع بعضهما عن طريق ارتباط قواعدهما النايتروجينية . حيث إن أغلب هذه الارتباطات تكون غير مستقرة وضعيفة ما لم تكن النيوكليوتيدات في كلا الشريطين متكاملة Complementary ، ولا يحصل أيضا ذلك فقط بين أشرطة الحامض النووي DNA بل يمكن أن يحصل أيضاً مع شريط RNA وآخر DNA أو RNA . لذلك فأن هذه التقنية توفر الإمكانية لمعرفة مورث معين على سبيل المثال كما توفر القدرة على معرفة عدد نسخ المورثات في مجين معين أو اكتشاف التغيرات الحاصلة فيها مثل الحذف والإضافة والطفرات الوراثية وغير ذلك .

ونظراً للتطور الذي حصل في تقنيات التهجين فأن هناك الآن عدداً منها .

أ-تهجين الأغشية Filters hybridization

1- وصمة ساوثرن Southern Blotting

2- وصمه نورثرن Northern Blotting

3- تبقع الحامض النووي Dot Blot

ب- تهجين التحضيرات الخلوية Insitu Hybridization

جـ- تهجين البروتينات Western Blotting

د- قراءة تسلسل ترددات الحامض النووي DNA Sequencing

## تهجين الأغشية

يستهدف هذا النوع من التهجين إلى تهجين قطع الحامض النووي بعد نقلها إلى أوراق خاصة وتثبيت الحامض عليها وهو بصوره أشرطة مفردة .

تختلف طبيعة الأوراق المستخدمة في هذا التهجين إلا أن أشهر أنواعها وأفضلها هي أوراق النتروسليلوز وأوراق النايلون التي يطلق عليها Hybond . إن لهذه الأوراق القدرة على الاحتفاظ بالأحماض النووية نظراً لطبيعتها الكيميائية المحورة لأجل هذا الهدف .

## طرق تهجين الأغشية

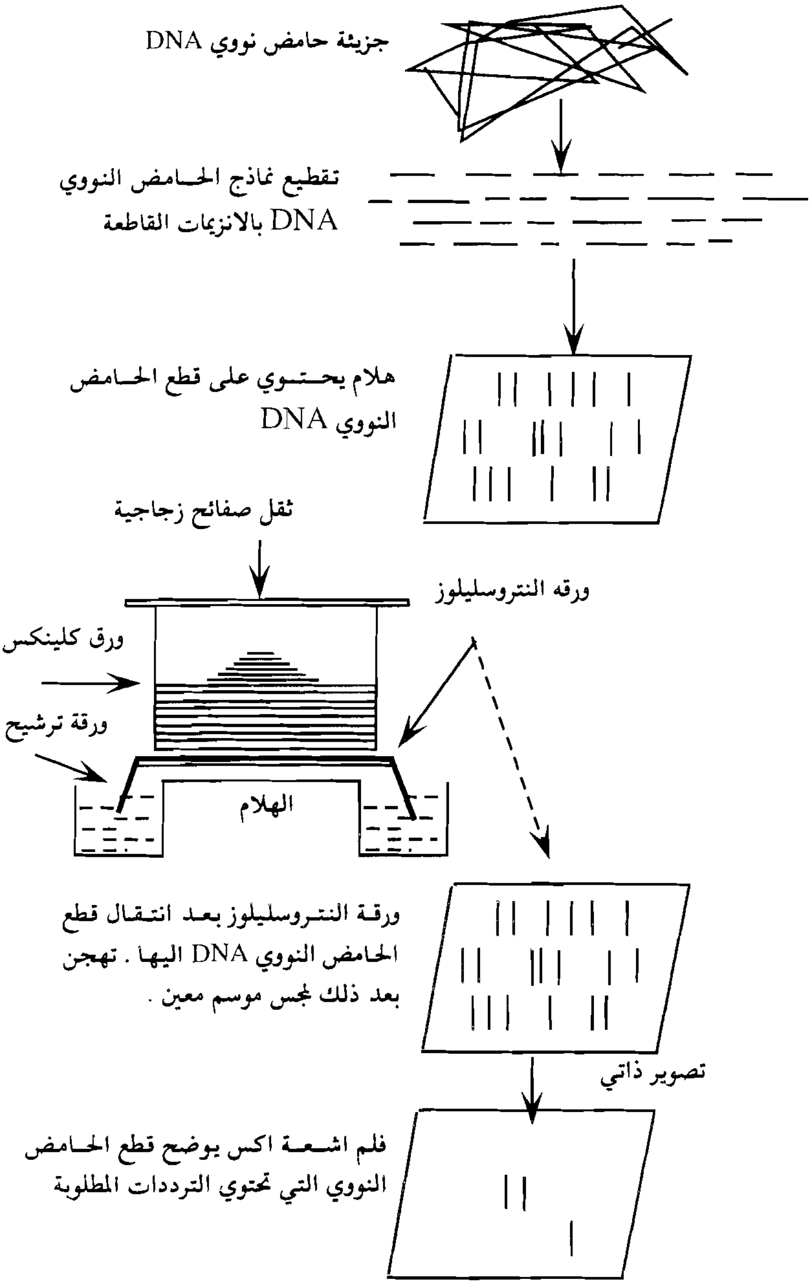
**طريقة وصمة او وذمة ساوثرن** *Southren Blot:*

تتلخص هذه الطريقة في تهجير قطع الحامض النووي DNA المعاملة بالأنزيم القاطع عبر هلام الأجاروز في حقل كهربائي ثم معاملة الهلام معاملة خاصة بواسطة محاليل وثم نقل قطع الحامض النووي إلى غشاء .

يتم معاملة هلام الأجاروز الذي يحتوي على قطع الحامض النووي اولاً :بواسطة محلول حامض الهيدروكلوريك (0.25 مولاري) لمدة عشر دقائق لأجل تكسير قطع الحامض النووي وهي في الهلام إلى قطعٍ صغيرة لتسهيل انتقالها إلى الغشاء ينقل الهلام بعدها إلى محلول قاعدي (مثلاً محلول مؤلف من 0.5 مولاري هيدروكسيد الصوديوم و 1.5 موري ملح كلوريد الصوديوم) لمدة ساعة واحدة حيث يعمل المحلول القاعدي على فصل أشرطة الحامض النووي عن بعضها البعض وثم تتم معادلة الأسس الحامضي للهلام بغمره في محلول متعادل (مثل المحلول 1.5 مولاري كلوريد الصوديوم ،0.5 مولاري تريس-كلور 0.001 مولاري EDTA ،7.2, PH) لمدة 45 دقيقة يكون هلام الأجار في هذه المرحلة سهل التهشم لذلك يراعى الاهتمام الزائد في طريقه حمله من المحلول ونقله الى وعاء التنافذ (يمكن استخدام وعاء الهجرة الكهربائية في ذلك Electrophoresis) يتألف جهاز التنافذ أو الامتصاص الشعيري من وعاء ذي خزانين جانبيين للمحاليل ومنصة وسطية مرتفعة .

يتم وضع البفر أو المحلول المستخدم في الامتصاص الشعيري في الخزانات الجانبية (يمكن استخدام محلول (10xSSC) 87.7 غرام كلوريد الصوديوم و 44.1غرام سترات الصوديوم تذاب في 1000 مل ماء مقطر ، PH 7.0) وتبلل ورقة ترشيح مستطيلة الشكل وتوضع على المنصة الوسطية للجهاز بحيث تتدلى جوانبها في محاليل الخزانات الجانبية وتراعى إزالة الفقاعات الهوائية بين ورقة الترشيح المبللة وسطح المنصة الوسطية . ينقل الهلام على سطح ورقة الترشيح ثم يغطى بورقة النتروسليلوز أو ورقة النايلون (هايبوند) ويراعى أن تكون ورقة النتروسليلوز أو النايلون بنفس حجم الهلام كما تراعى إزالة جميع الفقاعات التي يمكن أن توجد بين الورقة والهلام . ولأجل التخفيف من مشكلة الفقاعات الهوائية فأنه يفضل غمس الورقة في محلول الخزانات قبل وضعها فوق الهلام .

توضع بعد ذلك كمية كبيرة من أوراق الكلينكس بارتفاع انج واحد على الأقل فوق ورقة النقل ثم يوضع ثقل بوزن كيلوغرام مثل استخدام قطعتي زجاج مربعة الشكل (20x20 سم) فوق أوراق الكلينكس ويترك الجهاز لمدة 6-10 ساعات لافساح المجال أمام قطع الحامض النووي بالانتقال الكامل إلى ورقة النتروسيليلوز أو النايلون (الشكل7-1) .




**(الشكل 7-1): طريقة وذمة ساوثرن لتحليل قطع الحامض النووي DNA باستخدام مجس موسم معين**

تتم عملية انتقال قطع الحامض النووي من الهلام إلى ورقة النقل عندما يقوم البفر أو المحلول الموجود في الخزانات الجانبية باختراق الهلام بعد انتشاره في ورقة الترشيح السفلية التي تلاصق المنصة الوسطية وباتجاه ورقة النتروسليلوز أو النايلون حاملاً معه قطع الحامض النووي . وعندما تصل هذه إلى ورقة النتروسليلوز أو النايلون فأنها تلتصق بها بينما يستمر محلول الخزانات باختراق الورقة باتجاه أوراق الكلنكس التي تمتصه وتسرع في حصول العملية وهكذا فأن حزم الحامض النووي تنتقل الى ورقة النتروسليلوز او النايلون وتشغل نفس الموقع الذي كانت تشغله في الهلام . وبعد الانتهاء من عملية النقل يزال الثقل وورق الكلنكس ثم تزال ورقة النتروسليلوز ويتم توسيمها بإشارة على سطحها السفلي لتعيين السطح الذي انتقلت إليه حزم الحامض النووي ثم تجفف الورقة ويثبت الحامض النووي عليها بوضعها بين ورقتي ترشيح كبيرة الحجم وتوضع في جهاز صفيحة ساخنة Hot Plate مرتبطة مع مفرغة هوائية ويراعى أن يكون السطح الذي يحتوي على حزم الحامض النووي إلى الأعلى لأجل عدم ضياع حزم الحامض النووي أثناء الشفط . ويجري الشفط لمدة ساعتين بدرجة حرارة 80م . بعدها تصبح الورقة جاهزة للتهجين بالمجس المناسب .

**تهجين أوراق النتروسليلوز أو النايلون**

يتم تهجين هذه الأوراق باستخدام حقيبة بلاستيكية ذات نهاية عريضة سفلية مفتوحة ويمكن غلقها بواسطة الحرارة عند الحاجة ونهاية علوية مغلقة إلا من أنبوب بلاستيك ذي سدادة خاصة .

وتشبه هذه الحقيبة تماماً أكياس الدم المستخدمة عند حفظه .كما تستخدم في عملية التهجين قطعتان مستطيلتا الشكل وأصغر من حجم الحقيبة . تكون هذه القطع مثقبة بهيئة المنخل وعادة مصنوعة من البلاستيك .

يتم وضع ورقة النتروسليلوز أو النايلون بين القطع المثقبة ويتم إدخالها في حقيبة التهجين ثم تغلق النهاية السفلية لها بواسطة الحرارة و الضغط الميكانيكي . تعامل الورقة أولاً بواسطة محلول قبل التهجين Pre -hybridization لمدة ساعة بدرجة

حرارة 65م (بالنسبة لأوراق النايلون) أو لمدة 12 ساعة بدرجة حرارة 42م(بالنسبة لأوراق النتروسليلوز والنايلون أيضاً) . يحقن محلول قبل التهجين (يمكن استخدام المحلول الثاني : كامل محلول 5 xSSC و1 سم$^3$ محلول دينهارت و2.5 سم$^3$ ماء مقطر 25 مايكروجراماً DNA معزولاً من سمك السالمـون أو الثور مفصول الأشرطة denatarated) (يتألف محلول دينهارت من خليط مؤلف من جزء واحد لكل من محلول Ficol 400 و PVP و BSA وتخلط الأجزاء قبل إجراء عملية التهجين مباشرة ) في الحقيبة وتغلق الفتحة الأنبوبية بعد ذلك بإحكام .

يوضع الكيس في حمام مائي بدرجة حرارة 65°م لمدة ساعة واحدة أو بدرجة حرارة 42 م لمدة 12 ساعة ويراعى رج الحقيبة من وقت لآخر تتم معاملة هذه الأوراق بمحلول قبل التهجين لأجل التخلص من بعض قطع الأحماض النووية التي لم تثبت بشكل جيد على الورقة وكذلك لأجل التصاق الأشرطة المفردة للحامض النووي DNA السمكي المستخدم في المحلول مع المواقع غير المستهدفه في التهجين لافساح المجال امام المجس للالتصاق مع المواقع النظيرة أو المكملة له . كما يستهدف تنقيع الورقة بصورة جيدة بالمحلول . بعد الانتهاء من عملية تعريض الورقة لمحلول قبل التهجين يضاف محلول المجس الموسم إلى محلول قبل التهجين من الفتحة الأنبوبية كما يضاف نصف سم من محلول صوديوم دودوسيل سلفيت 3٪ Sodium dodo- cyl sulphate و 2 سم3 من محلول دكستران كبريتي Dextran suplhate وتغلق الفتحة الأنبوبية مرة أخرى بصورة محكمة ويخلط المحلول جيداً عن طريق تقليب الحقيبة لعدة مرات قبل وضعها في الحمام المائي .

توضع الحقيبة بعد ذلك في حمام مائي بدرجة 65م لمدة 24 ساعة مع رج الحقيبة من وقت الى آخر .

يراعى في حالة استخدام المجسات الموسمة بنظائر مشعة حارة استخدام الكفوف الواقية والقيام بهذه المهمة خلف الحواجز البلاستيكية لضمان التقليل من التعرض للإشعاعات .

بعد الانتهاء من الوقت اللازم للتهجين يتم تفريغ الحقيبة أولاً من سوائلها ثم قطع نهاية الحقيبة وإخراج الورقة المهجنة .

تغسل الورقة جيداً بمحاليل ملحية مخففة مدرجة التركيز بحيث تغسل أولاً بالمحلول الأكثر تركيز فالأقل وهكذا وبزمن إجمالي قدره 1-2 ساعة بدرجة حرارة تتراوح بين درجة حرارة الغرفة و 65م . ويذكر أن محاليل الغسيل تختلف حسب نوع الورق المستخدم في النقل والتهجين كما تعتبر هذه الخطوة حرجة جداً ويجب ضبط الظروف المناسبة من تركيز المحاليل ودرجة الحرارة وزمن الغسيل .

تؤخذ ورقة التهجين بعد ذلك وتجفف بواسطة ورق ترشيح وتغطى من الجانبين بواسطة نايلون رقيق Cling Film . وتوضع في غطاء معدني مزدوج وفي الغرفة المظلمة تتم تغطية الورقة بفلم أشعة أكس ويغلق الغطاء المعدني جيداً ويوضع بدرجة حرارة 70-م لمدة 7-10 أيام لإتاحة الفرصة للإشعاعات بترك آثارها بصورة واضحة على الفلم الفوتوغرافي . يحمض الفلم بعد ذلك في غرفة مظلمة وبعد الانتهاء من التحميض يغسل الفلم جيداً لإزالة آثار المواد الكيميائية ويترك ليجف ثم تحلل نتائجه لاحقاً .

### وذمة نورثرن Northern Blotting

على الرغم من الكفاءة العالية لطريقة ساوثرن في نقل قطع الحامض النووي DNA إلى ورق النتروسليلوز فأن هذه الطريقة غير مناسبة في ظروفها لنقل الحامض النووي RNA . لذلك فأنه تم تطوير طريقة اخرى يتم فيها معاملة الورق المستخدم في النقل كيميائياً لجعله ملائماً لنقل الحامض النووي RNA .

سميت هذه الطريقة بوذمة نورثرن ، ولا تختلف عن الطريقة السابقة سوى في نوع الورق المستخدم . تهجن هذه الأوراق باستخدام مجس موسم لحامض نوويDNA أو متمم cDNA .

### تبقيع الحامض النووي *Dot blot*

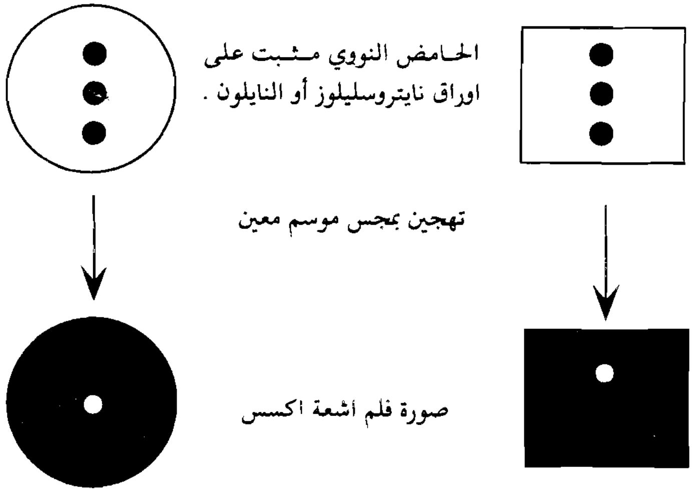
يمكن تثبيت الحامض النووي DNA دون معاملة بالأنزيمات القاطعة كما في الطريق السابقة ودون الحاجة إلى استخدام الهلام وغيره . يتم ذلك بأخذ كميات محددة من الحامض النووي وتثبته بشكل قطرات على ورق نايتروسليلوز أو نايلون ثم

تترك لتجف بعدها تعامل بمحلول حامض الهيدروكلوريك لمدة خمس دقائق والمحلول القاعدي لخمس دقائق أخرى ثم تجفف بأوراق ترشيح ويثبت الحامض النووي بطريقة الصفيحة الساخنة بدرجة حرارة 80م وجهاز الشفط السابق ذكره .

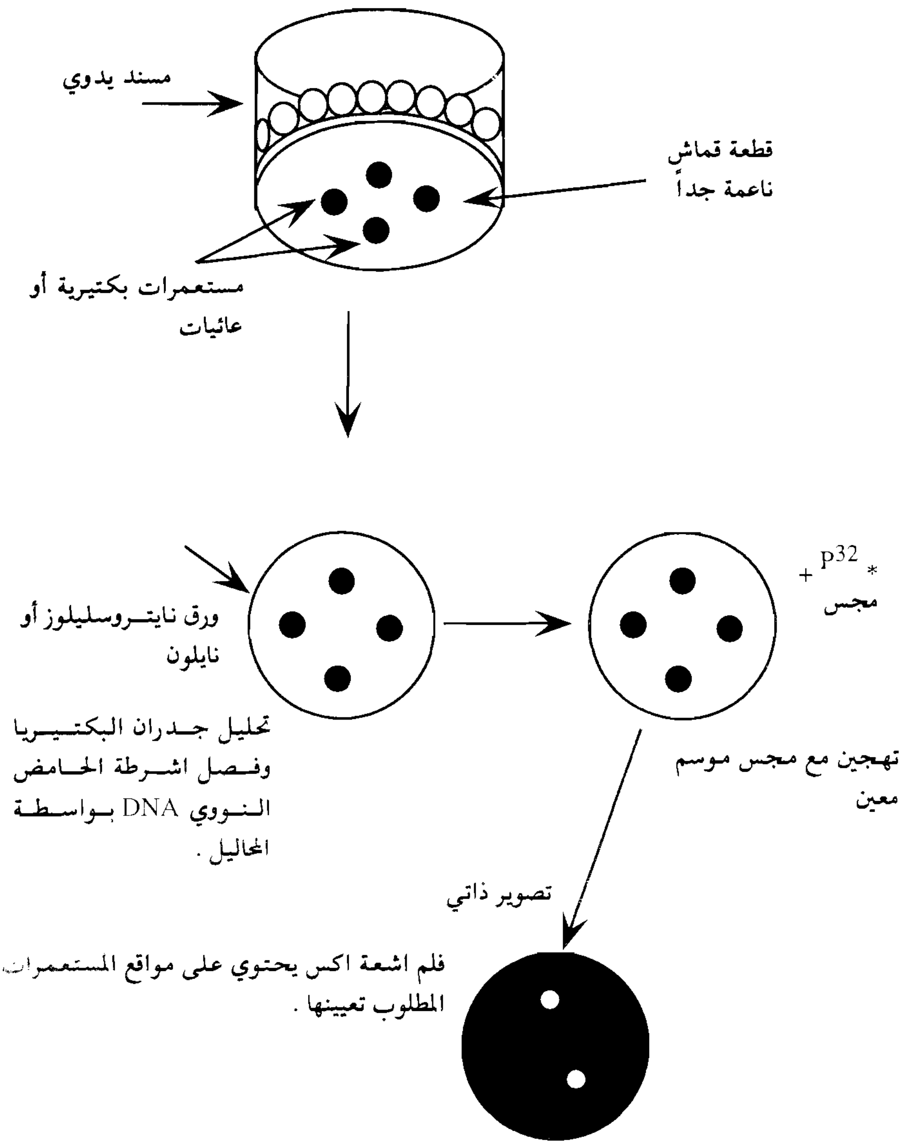
تهـجن بعـد ذلك الأوراق بنفس الطريقـة التي وردت في تهـجين أوراق النتروسليلوز أو النايلون (الشكل7-2) .

### تبقيع مستعمرات البكتريا أو العاثيات *Colony /Plaques blot*

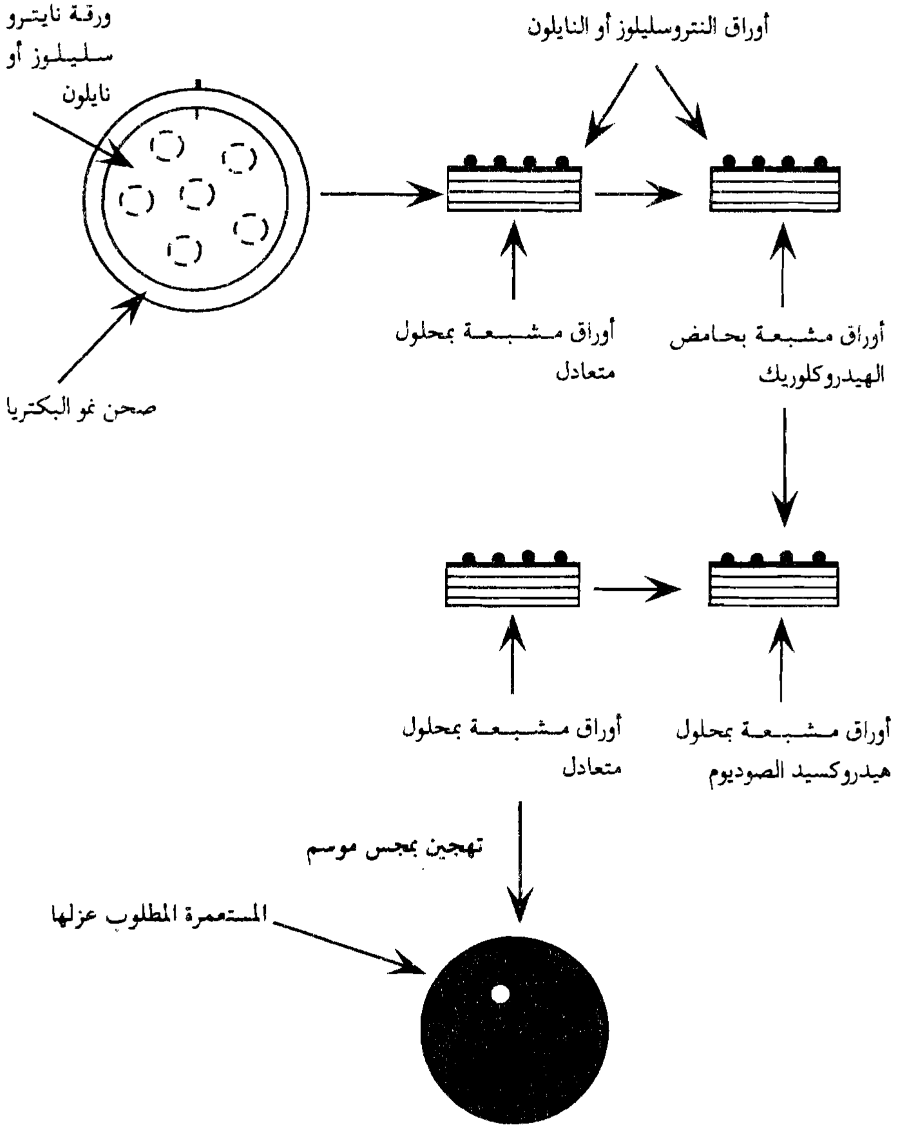
تعتبر هذه الطريقة تطوير للطريقة السابقة ويتم فيها تشخيص المستعمرات التي تحمل قطعاً معينة من الحامض النووي DNA وتستخدم حالياً بشكل واسع لتمييز المواد المهندسة وراثياً في المكتبات الوراثية .




(الشكل 7-2): تبقيع الحامض النووي DNA عن طريق اوراق النتروسليلور او النايلون.




(الشكل 7-3) تبقيع مستعمرات البكتريا او العاثيات




**(الشكل 7-4 ): اسلوب آخر في تبقيع مستعمرات البكتريا او العاثيات**

تتم في هذه الطريقة تنمية مستعمرات البكتريا أو العاثيات على وسط زرعي مناسب لفترة زمنية مناسبة . تثبت علامات بواسطة قلم التعليم على أطباق الزرع لتعيين موقع المستعمرات النامية ثم توضع ورقة دائرية (بنفس القطر الداخلي لصحون الزراعة) من أوراق النتروسليلوز أو النايلون فوق المستعمرات وتثبت على الورقة نفس العلامات المثبتة على الصحون الزرعية . تترك الورقة فوق المستعمرات لفترة تترواح بين ساعه- ساعتين تزال بعدها وتوضع (بحيث يكون السطح الحامل للمستعمرات نحو الأعلى) فوق طبقة من أوراق الترشيح المبللة بمحلول محلل للخلايا لمدة 10-20 دقيقة حيث يتم تحليل جدران الخلايا وإطلاق الحامض النووي DNA . تنقل الورقة وعلى النحو السابق وتوضع فوق طبقة أخرى من أوراق الترشيح المبللة بمحلول حامض الهيدروكلوريك 0.25 مولاري لمدة خمس دقائق تنقل بعدها على طبقة أخرى من أوراق الترشيح المبللة بمحلول قاعدي لمدة خمس دقائق وطبقة أخرى مبللة بمحلول متعادل لنفس الفترة .

تجفف الورقة بوضعها فوق أوراق ترشيح يابسة ثم يثبت الحامض النووي DNA بنفس الطريقة السابقة . وتهجن حسب طريقة التهجين المطلوبة (الشكل7-3) و (الشكل7-4) .

### تهجين التحضيرات الخلوية In situ hybridization

يتم في هذه الطريقة تعيين موقع مورث معين على الصبغيات باستخدام مجس موسم إشعاعياً (يستخدم عادة لهذا الغرض مجس موسم بنظير الهيدروجين $H_3$) وطريقة الصباغة المعروفه بتحزم -G- Banding G لتعيين الصبغي وموقع المورث . يمكن في هذه الطريقة استخدام تحضيرات خلوية من المزارع النسيجية أو القمم النامية للنباتات أو الأنسجة الحية بعد معاملات كيميائية خاصة .

تتلخص هذه الطريقة باستخدام خلايا منقسمة مثبتة في الطور الاستوائي Metaphase ويمكن الحصول على هذه الخلايا في هذا الطور عن طريق إضافة مادة الكولسميد Colcemide أو الكولجسين Colchesin بتركيز 3 مايكروجرام/سم$^3$ الى الخلايا المنقسمة ولمدة ساعتين . كما يمكن إضافتها لدورق الماء الذي ينمو فيه النبات

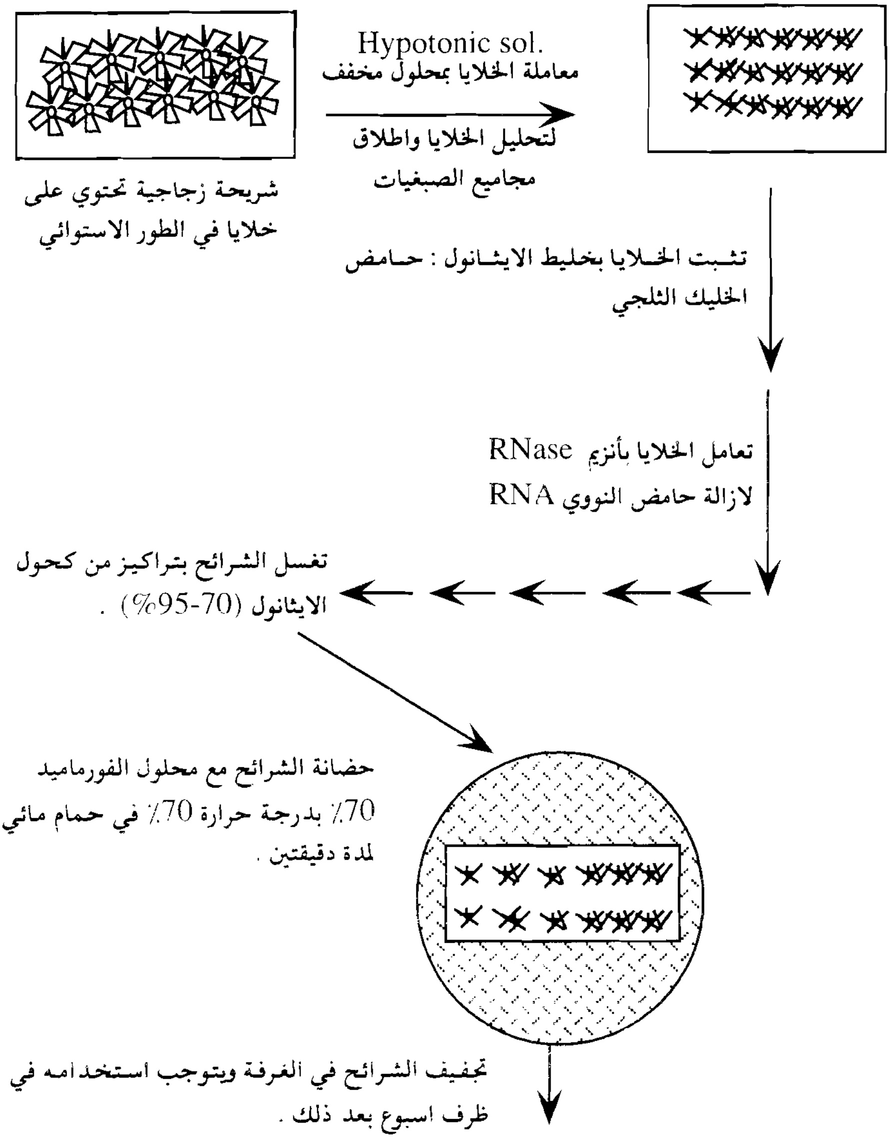
في حالة تحضير الخلايا من القمم النامية الجذرية . تثبت الخلايا هذه على شرائح زجاجية نظيفة تماماً وتُعامل مع محلول مخفف لتحطيم جدران الخلايا والنوى وإطلاق مجاميع الصبغيات . تثبت هذه على الشرائح عن طريق معاملتها مع خليط من كحول الايثانول وحامض الخليك الثلجي Glacidal acetic acid ثم تجفف الشرائح بدرجة حرارة الغرفة وتستخدم للتهجين خلال أسبوع من ذلك .

تعامل هذه الشرائح لأجل تهيئتها للتهجين بمحلول أنزيم RNase بتركيز 100مايكروجرام /سم3 وبدرجة حرارة 37°م لمدة ساعة . تغسل بعدها بمحاليل مدرجة من الايثانول (70-95%) تعامل بعدها بمحلول الفورماميد 70٪ بدرجة حرارة 70°م لمدة دقيقتين –خمسة أو بمحلول هيدروكسيد الصوديوم 15٪ لأجل فصل أشرطة الحامض النووي DNA في الصبغيات . تغسل الشرائح بعد ذلك بمحاليل الايثانول المدرجة وتجفف بدرجة حرارة الغرفة (الشكل7-5) .

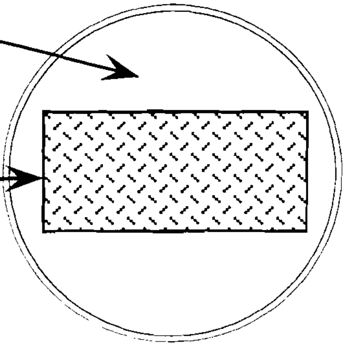
توضع الشرائح فوق أوراق مبللة بالفورماميد70٪ ومحلول ملحي مخفف في أطباق ويوضع محلول التهجين الذي يحتوي على المجس الموسم إشعاعياً فوق كل شريحة . تغلق الأطباق وتحضن بدرجة حرارة 37°م لمدة 13ساعة . تغسل الشرائح بعد الحضانة بمحاليل ملحية مختلفة التركيز لإزالة المواد المشعة غير المرتبطة والزائدة ثم تغسل في محاليل الكحول المدرجة . تجفف الشرائح وتغطى في غرفة مظلمة بطبقة رقيقة من الهلام الفوتوغرافي Photographic emulsian وتحفظ الشرائح في صندوق أسود محكم الغلق بدرجة حرارة 70°م لمدة أسبوع أو أكثر . تحمض الشرائح في غرفة مظلمة وتغسل بعد ذلك . بماء مقطر وتصبغ بصباغة تحزم -G تفحص بعد ذلك بواسطة المجهر الضوئي المركب حيث تظهر بقع فضية أو سوداء فوق صبغيات معينة تمثل موقع المورث المطلوب تعيين موقعه (شكل7-6) .

ويذكر أن هذه الطريقة حساسة جداً وتتطلب المهارة واستخدام محاليل معروفة التأثير خصوصاً في الغسل بعد التهجين . إذ يمكن في حالة عدم ضبط الطريقة الحصول على بقع فضية غير حقيقية تجعل من الصعوبة تحديد موقع المورث المطلوب .

ويمكن استخدام التحاليل الاحصائية في تعيين هذه النتائج ولكنها قد تكون غير مؤكدة .




**(الشكل 5-7): طريقة تهيئة ومعاملة الشرائح الزجاجية الحاملة للخلايا اللازمة في التهجين الخلوي**




تغلق الأطباق وتحضن بدرجة حرارة 37 م لمدة 12 ساعة .

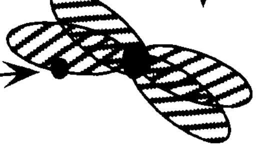
غسل بمحاليل ملحية لإزالة المواد الزائده عن التهجين .

غسل الشرائح بتراكيز مختلفة من كحول الايثانول 70 - 95 ٪

تجفيف الشرائح وتغطيتها في الهلام الفوتوغرافي بواسطة الغمس في محلول الهلام . ثم تحفظ في صندوق اسود بدرجة حرارة 70-م لمدة اسبوع- اسبوعين .

تحميض وأظهار الهلام ثم صباغتها بصبغة التحزم G

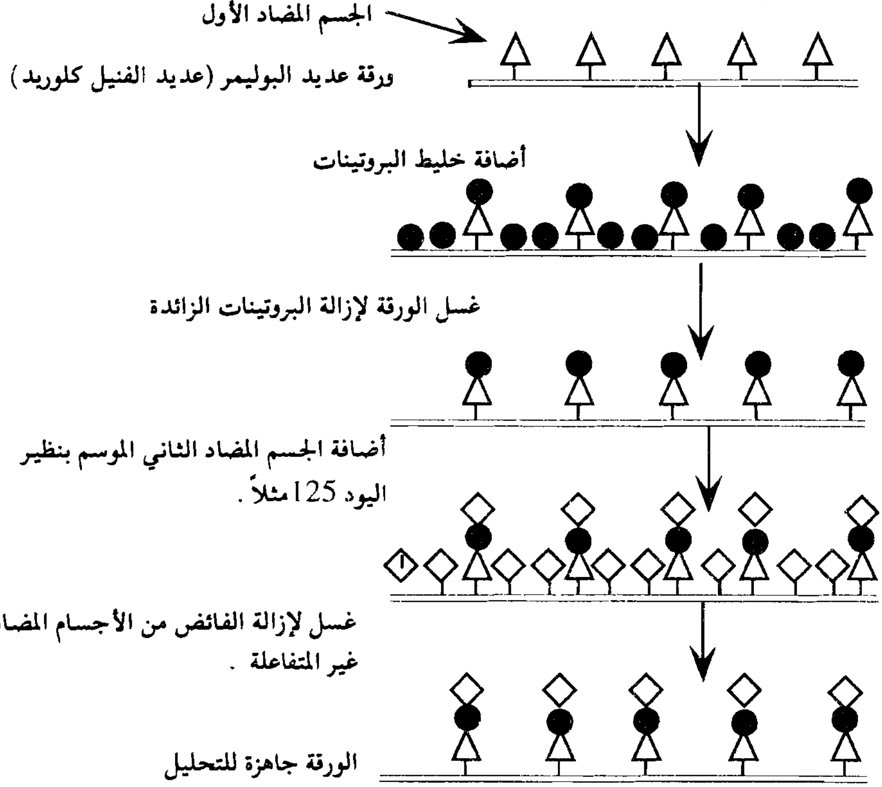
الفحص المجهري للصبغيات




(الشكل7-6): تهجين الصبغيات في التحضيرات الخلوية.

### تهجين البروتينات أو وذمة ويسترن Westren Blotting

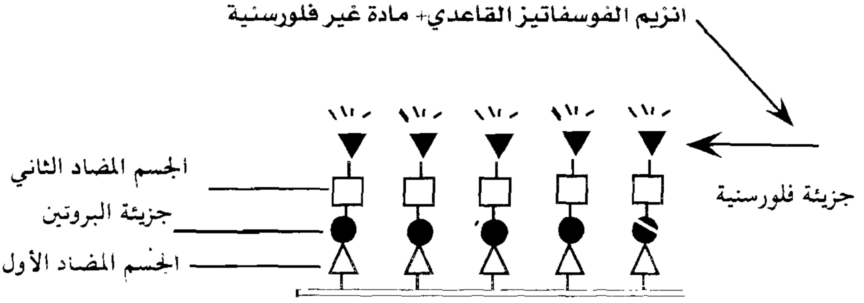
يمكن الكشف عن بروتين معين بطرق مختلفة ولكن هناك ثلاث طرق رئيسة لعمل ذلك منها ما يدعى بالقياس المناعي الجاف Solid Phase immunoassay وتتلخص هذه الطريقة بوضع جسم مضاد للبروتين المطلوب الكشف عنه على ورقة مؤلفة من عديد البوليمرات ثم يوضع نموذج خليط البروتينات على الورقة حيث سترتبط الأجسام المضادة مع البروتين الخاص بها وتلتصق بقوة على سطح الورقة مرة ثانية لإزالة المواد غير المتفاعلة ويتم قياس قوة الإشعاع للتعرف على كمية البروتين المطلوب في العينة المفحوصة .



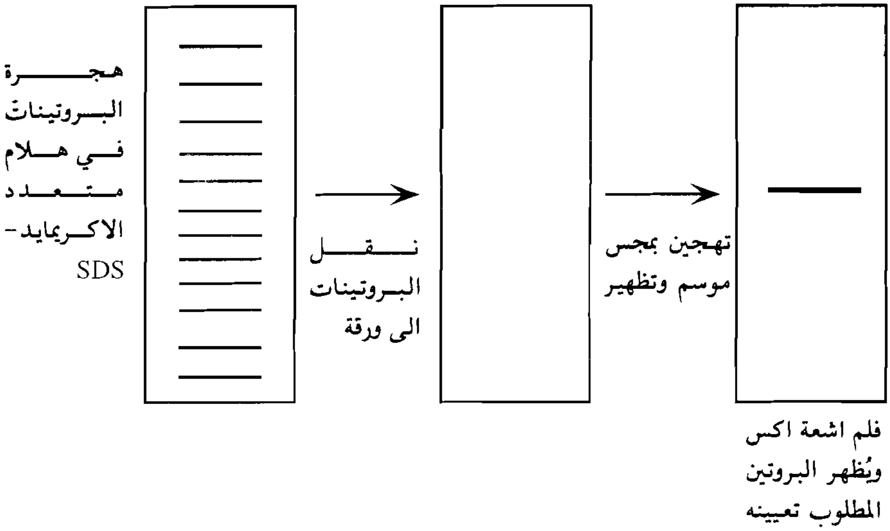

(الشكل7 -7): القياس المناعي الجاف ويمكن في هذه الطريقة تعيين كمية البروتين أو نوعه أو كمية الأجسام المضادة في عينة من الدم أو البول أو خليط بروتيني باستخدام مجس إشعاعي أو فلورسني.

(شكل7-7) وقد تم زيادة حساسية هذا الاختبار ذلك بإضافة أنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline Phosphatase الذي يعمل على إكساب الجسم المضاد المتخصص الثاني وميضاً فلورسنياً يمكن الكشف عنه تحت المجهر الفلورسني المزود بالأشعة فوق البنفسجية وسميت هذه الطريقة بطريقة اليزا ELISA وهي مختصر لطريقة قياس الامتصاص المناعي المرتبط بالأنزيم Enzyme linked immunosorbent . وتعتبر طريقة اليزا الطريقة الثانية في الكشف وتحديد كمية البروتينات (شكل7-8) .

أما الطريقة الثالثة فهي وذمة ويسترن . وفي هذه الطريقة يتم ترحيل أو هجرة البروتينات في هلام مؤلف من عديد الاكرليمايد المحتوى على مادة SDS ثم تنقل حزم البروتينات إلى ورق مصنوع من عديد البوليمر(النتروسليلوز) وتهجن بعد ذلك . بجسم مضاد متخصص موسم شعاعياً أو موسم بالبايوتين وبعد الانتهاء من التهجين تغسل الورقة لإزالة المواد غير المرتبطة وتغطى بفلم أشعة أكس في غرفة مظلمة وتحفظ لفترة معينة بدرجة حرارة 70°م ثم تحمض ويتم تحليل النتائج بعد ذلك حيث تظهر حزمة البروتين المطلوب تشخيصه كحزمة سوداء على أشعة أكس . (شكل 7-9) .




(الشكل 7-8): طريقة القياس المناعي المرتبط بالأنزيم ELISA حيث يتم توفير جزء فلورسني من التفاعل الأنزيمي لتمييز الأجسام المضادة المتفاعلة مع البروتين المطلوب تعيينه او تقدير كميته




**(الشكل 7-9): كشف البروتين عن طريق وذمة ويسترن وتظهر الحزمة السوداء في فلم أشعة أكس التي تقابل البروتين المطلوب تعيينه.**

**قراءة تسلسل ترددات الحامض النووي** *DNA Sequencing DNA* :

أحدث ايجاد طريقة لمعرفة تسلسل ترددات الأحماض النووية ثورة حقيقية في الوراثة الجزيئية والهندسة الوراثية حيث تمكن الباحثون بواسطتها من معرفة تركيب المورثات بالتفصيل وكذلك النيوكليوتيدات المحيطة بها والتي يعتقد أن لبعضها تأثيراً كبيراً في تنظيم عمل المورثات .

يرجع نشر أول تسلسل لقطعة حامض نووي يبلغ طولها 5386 زوجاً قاعدياً مأخوذاً من العاثي ϕ X174 إلى عام 1975 ثم تبعها تسلسل الحامض النووي لفايروس السيميان SV 40 (5243 زوجا قاعدياً) عام 1977 وتسلسل البلازميد322 PBR (4363 زوجاً قاعدياً) . وفي عام 1981 قام سانجر ومساعدوه بنشر تسلسل صبغي المايتوكوندريا البشرية الذي يبلغ طوله 16.5 كليو قاعدة وصبغي العاثي لامبدا الذي يبلغ طوله49 كيلو قاعدة عام 1983 .

إن هناك طريقتين لقراءة تسلسل ترددات الحامض النووي DNA ظهرت كلتاهما في سنة 1977 وهما طريقة ماكسام وجلبرت Maxam- Gilbert Method وطريقة سانجر- كولسون .Sanger- Coulsen m الا أنهما تختلفان في تفاصيلهما كثيراً .

**طريقة ماكسام وجلبرت** Maxam- Gilbert Method :

تعرف هذه الطريقة أيضاً باسم الشق الكيميائي المختص Specific Chemical Cleavage وتتلخص باستخدام شريط مفرد من الحامض النووي DNA موسم النهاية بنظير الفوسفور 32($^{32}$ P) ويستخدم لذلك عادة أنزيم كاينيز عديد الببتيد -Pol polypeptidal kinase الذي يضيف نظير الفوسفور الى مجموعة الهيدروكسيل في النهاية الخامسة للشريط .

يتم كسر هذا الشريط في مواقع عند أحد النيوكليوتيدات الأربعة وبصورة تفضيلية عن طريق المعاملة بمواد كيميائية متخصصة . ويؤدي ذلك إلى إنتاج أشرطة مختلفة الطول تبدأ دائماً من النهاية الموسمة وأنتهاءً بقاعدة معينة . ثم تفصل هذه الأشرطة عن طريق الهجرة الكهربائية باستخدام هلام عديد الاكريلمايد الذي يمكنه فصل هذه الأشرطة عن بعضها حتى لو كان الاختلاف بالطول في نيوكليوتيدة واحدة فقط . ثم يغطى الهلام بعد ذلك بفلم أشعة أكس لفترة معينة في الظلام والبرودة ويحمض ويقرأ أثر الإشعاع .

يتم إنتاج الأشرطة مختلفة الأطوال والمعروفة النهايات عن طريق استخدام مواد كيميائية متخصصة تعمل على إزالة نيوكليوتيد معين دون غيره .

فالبيورينات (جوانين وأدنين) يتم إزالتها عن طريق إضافة سلفات ثنائي مثيل Dimethyl sulfate الذي يضيف مجموعة مثيل ($CH_3$) لذرة النايتروجين السابعة في الجوانين والثالثة في الادينين .

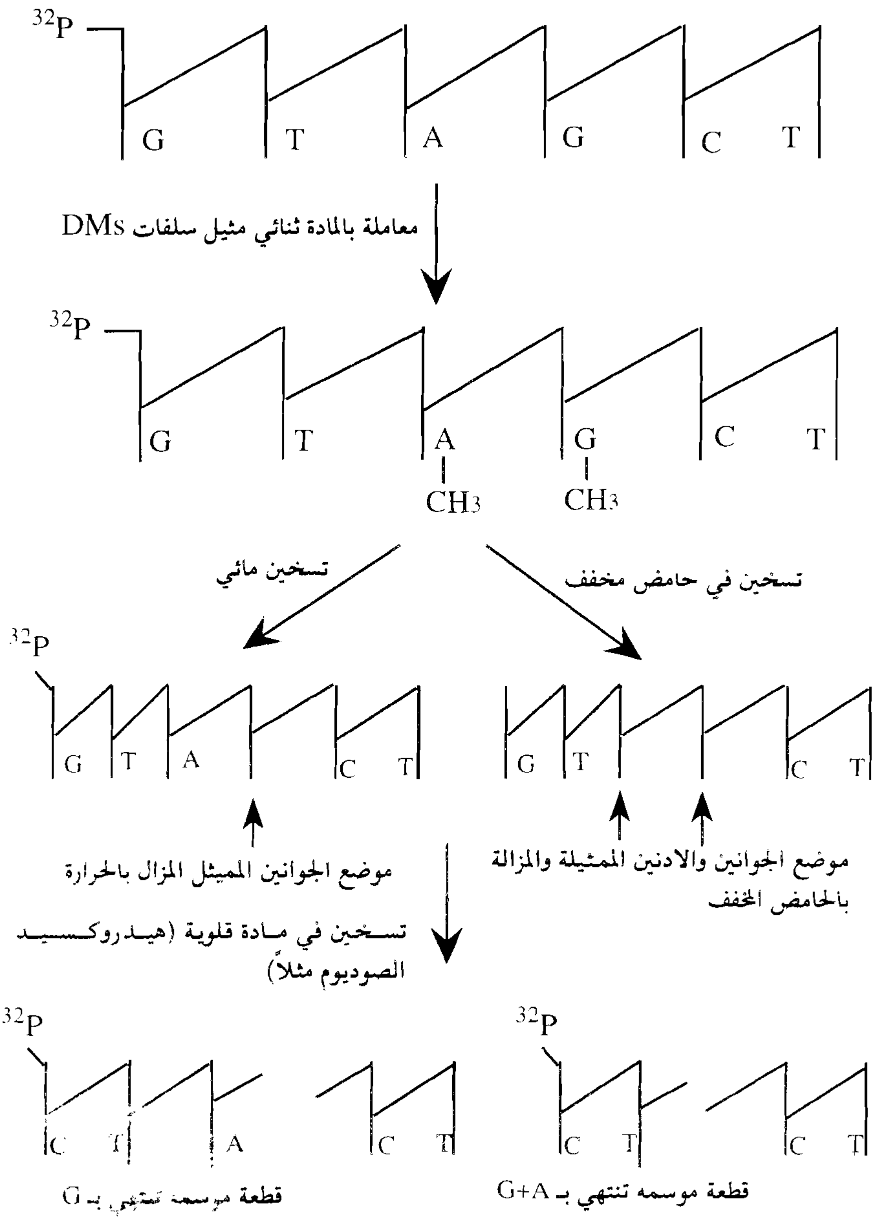
ثم يتم التخلص من القاعدة النتروجينية الميثلة بالتسخين عند أس هيدروجيني متعادل وهكذا يتم إنتاج شريط ذي نيوكليوتيد خالٍ من القاعدة

النتروجينية . يكسر العمود الفقري للشريط عندها في موقع هذه النيوكليوتيدة عن طريق إزالة حلقة السكر الخماسي وذلك بتسخين الأشرطة بوجود مادة قلوية قاعدية مثل هيدروكسيد الصوديوم .

إن الأشرطة الناتجة يتم كسرها من النيوكليوتيدات الحاوية على الجوانين لأن هذه القاعدة لها قابلية كبيرة جداً للارتباط مع مجموعة المثيل أكثر بكثير مما للادينين ويمكن إزالتها بالتسخين المائي فقط . وهكذا يمكن الحصول على أشرطة مختلفة الطول تبدأ بالفوسفور الموسوم بنظير الفوسفور 32 وتنتهي بنيوكليوتيدة تحتوي على الجوانين . ويمكن الحصول على أشرطة تنتهي بنيوكليوتيدات تحتوي على الجوانين أو الادنين وذلك بتسخين الأشرطة بعد إضافة مجموعة المثيل في حامض مخفف ثم تسخينها بوجود مادة قلوية لإزالة السكر . وهكذت يتم إنتاج أشرطة تنتهي بالقاعدة G في الحالة الأولى وأشرطة تنتهي بالقاعدتين A+ G في الحالة الثانية (الشكل7-10) .

أما بالنسبة للبايرميدينات (السايتوسين والثايمين) فأنه يتم ميثلتهما بإضافة الهيدرازين Hydrazine ثم إزالتهما بالتسخين المائي وثم كسر الأشرطة بإضافة الببريدين Piperidine . أن السايتوسين والثايمين يكونان متساويين في الشدة لذلك فأنه يتم إزالتهما سوية بعد الميثلة .

إن الأشرطة الناتجة عن هذا التفاعل تكون مختلفة الطول ولكنها جميعاً تنتهي بالسايتوسين والثايمين (T+C) . ولأجل التمييز بين الأشرطة فأنه يتوجب الحصول على أشرطة مختلفة الطول تنتهي جميعها بالسايتوسين فقط أو الثايمين فقط . ونظراً لأن وجود ملح كلوريد الصوديوم بعيارية 2 مولاري (2M) مع الهيدرازين يثبط التفاعل مع الثايمين فأنه يتم عندئذ الحصول على أشرطة تنتهي جميعها بالسايتوسين فقط (C) . وبعد الانتهاء من هذه التفاعلات يتم تهجير كل منها في موقع خاص كهربائياً بأستخدام هلام عديد الاكريلمايد وتستكمل عملية الحصول على صورة إشعاعية لها ويقرأ تسلسل ترددات الحامض النووي بمقارنة G و G+A وC و C-T .




**(الشكل 7-10): طريقة تحضير قطع موسمة من الحامض النووي معروفة النهايات في قراءة تسلسل ترددات النيوكليوتيدات وفق طريقة ماكسام وجلبرت**

فلو افترضنا بأن شريط الحامض النووي الموسوم يتألف من الترددات التالية 5TGGGCTTAGC-´3´ فأنه بإجراء التفاعلات السابقة فأنه سيتم الحصول على أنواع الأشرطة التالية :

**أنواع الأشرطة التي تنتهي بالقاعدة G :**

$^{32}$P- TG
$^{32}$P-TGG
$^{32}$P-TGGG
$^{32}$P-TGGGCTTAG

**أنواع الأشرطة التي تنتهي بالقاعدة C :**

$^{32}$P-TGGGC
$^{32}$P-TGGGCTTAGC

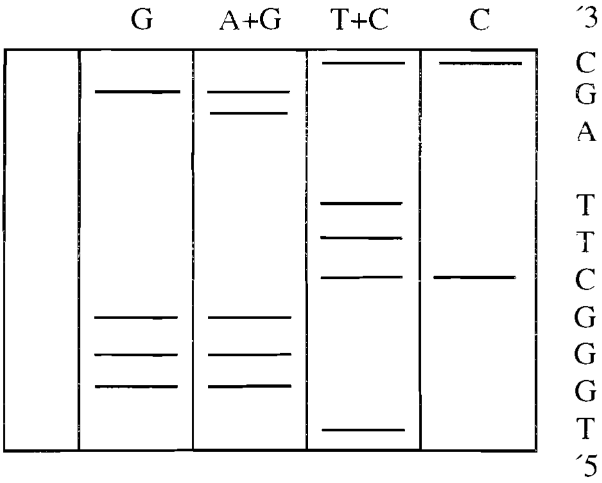
**أنواع الأشرطة التي تنتهي بالقاعدتين G أو A :**

$^{32}$P-TG
$^{32}$P-TGG
$^{32}$P-TGGG
$^{32}$P-TGGGCTT
$^{32}$P -TGGGCTTAG

**الاشرطة التي تنتهي بالقاعدتين C أو T :**

$^{32}$P-T
$^{32}$P-TGGGC
$^{32}$P-TGGGCT
$^{32}$P-TGGGCTT
$^{32}$P-TGGGCTTAGC

وعند إجراء الهجرة الكهربائية لها والحصول بعد ذلك على فلم أشعة أكس فأن النتائج ستكون كما هو في الشكل (7-11) .




(الشكل 7-11): **قراءة تسلسل التردد** TGGGCTTAG 5´ C-´3 **حسب طريقة ماكسام وجلبرت**

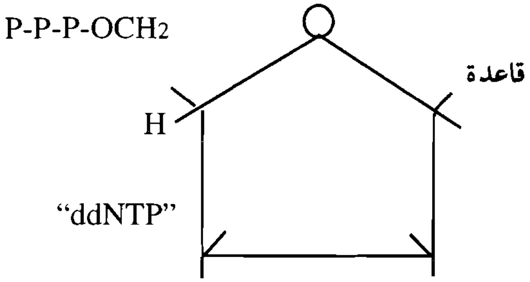
**طريقة سانجر-كولسون** Sanger-Coulson method

تعتمد هذه الطريقة على استخدام جزيئية 2.3 dideoxy nucleoside triphosphate وهي من مشابهات النيوكليوتيدات الطبيعية وتتمكن من الاتحاد في تفاعل تصنيع سلاسل الحامض النووي DNA بشكل اعتيادي من خلال النهاية الفوسفورية الخامسة لها ولكنها لا تتمكن من الارتباط مع النيوكليوتيد التالي لعدم قدرتها على توليد آصرة الفوسفور ثنائي الأستر حيث لا تمتلك هذه الجزيئية النهاية الهيدروكسيلية (3OH´) الضرورية لتوليد مثل هذه الآصرة (شكل7-12) .

لهذا السبب فأن نمو سلسلة الحامض النووي سيتوقف حال دخول هذه الجزيئية في البناء . ونظراً لوجود أربعة أنواع من الجزيئات المشابهة نظيرة للنيوكليوتيدات الطبيعية فأنه أصبح بالإمكان الحصول على سلاسل حامض نووي تنتهي بنيوكليوتيد معروف القاعدة النتروجينية . لذلك فأن هذه الطريقة تستلزم إجراء أربعة تفاعلات كيميائية تتم إضافة جزيئة مشابهة واحدة فقط إضافة للنيوكليوتيدات الطبيعية الأربعة في كل تفاعل للحصول على أربعة أنواع من السلاسل التي تنتهي كل منها بقاعدة مختلفة . وبالهجرة الكهربائية لها على هلام عديد الاكريلمايد فأنه سيتم الحصول على حزم مختلفة الحجم تمثل كل منها تسلسل القاعدة البديلة في قطعة الحامض مختلفة الحجم تمثل كل منها تسلسل القاعده البديلة في قطعة الحامض النووي . فمثلاً إذا كانت الجزيئة النظيرة هي 2.3 dideoxy cytosine. dd CTP triphosphate فأن الحزم الناتجة تقرأ على أنها G وأذا كانت الجزيئة النظيرة هي ddGTP فأن الحزم الناتجة تقرأ على أنها C وهكذا بالنسبة لبقية القواعد .

تستلزم طريقة سانجر-كولسون استخدام شريط مفرد من الحامض النووي DNA المطلوب معرفة تسلسل نيوكليوتيداته مهندس في العائي M13 . وبإضافة بادئه قصيرة موسمة إشعاعياً ($P^{32}$) إلى محلول العائي المهندس وراثياً بالقطعة المطلوبة ووجود النيوكليوتيدات الطبيعية الأربعة (يجب ان تكون إحداها موسمة بنظير الفوسفور 32) إضافة للقاعدة النظيره dd (مثلاً ddATP) فأن أنزيم قطع الكلينو سيستخدم البادئة كنقطة بداية لتصنيع سلسلة جديدة أو شريط جديد للشريط

المهندس والذي يستخدم كقالب ويستمر نمو الشريط الجديد حتى دخول جزيئة النظير ddATP في التفاعل حيث يتوقف التفاعل عندئذ عند هذه القاعده . وبما أن القواعد المضافة للتفاعل تحتوي بالإضافة للجزيئة النظيرة ddATP على الجزيئة الطبيعية dATP لذا فأن توقف التفاعل لا يحدث دائماً عند أول نيوكليوتيد يحمل الادنين يدخل في التفاعل بل فقط عند دخول الجزيئة النظيرة ddATP . لذلك يتم الحصول على أشرطة أو سلاسل مختلفة الطول الا أنها جميعاً تنتهي بجزيئة نظيره ddATP . فأذا ما تم أجراء أربعة تفاعلات منفصلة كل منها يحتوي على جزيئة نظيرة dd مختلفة فأنه سيتم الحصول على أربع مجاميع من الأشرطة مختلفة النهايات .




**(الشكل 7-12): الشبيه الكيميائي 2.3 dideoxynucleoside triphosphate المستخدم كبديل للنيوكليوتيد الطبيعي والذي يعمل على إيقاف البلمرة عند دخوله في البناء.**

يجري بعد ذلك فصل هذه الأشرطة بواسطة الهجرة الكهربائية على هلام رقيق (أقل من نصف مليمتر سمكاً)من عديد الاكرليمايد الذي يحتوي على اليوريا وبدرجة حرارة لا تقل عن 60°م (تساعد اليوريا والحرارة العالية على فصل الأشرطة المزدوجة للحامض النووي) . وبعد تصوير نتائج الهجرة على فلم أشعة أكس تتم قراءة التسلسل اعتباراً من الحزمة البعيدة جداً والتي تمثل أقصر القطع .

فلو افترضنا أن شريط الحامض النووي المطلوب معرفة تسلسل نيوكليوتيداته مؤلف من التسلسل 5´-GAATTCGCTAATGC-3´ وإن البادئة المستخدمة في

التفاعل مؤلفة من التسلسل 3´-5CTTAA´ فأنه بإجراء التفاعلات السابقه فأنه سيتم الحصول على أنواع الأشرطة التالية :

**-أنواع الأشرطة في حالة استخدام الجزيئة النظيرة ddATP :**

´5 - CTTAAGCGAdd

´5 - CTTAAGCGATTAdd

**-أنواع الأشرطة في حالة استخدام الجزيئة النظيره ddGTP :**

´5 - CTTAAGdd
´5 - CTTAAGCGdd
´5 - CTTAAGCGATTACGdd

**-أنواع الأشرطة في حالة استخدام الجزيئة النظيرة ddCTP :**

´5 - CTTAAGCdd
´5 - CTTAAGCGATTACdd

**-أنواع الأشرطة في حالة استخدام الجزيئة النظيرة ddTTP :**

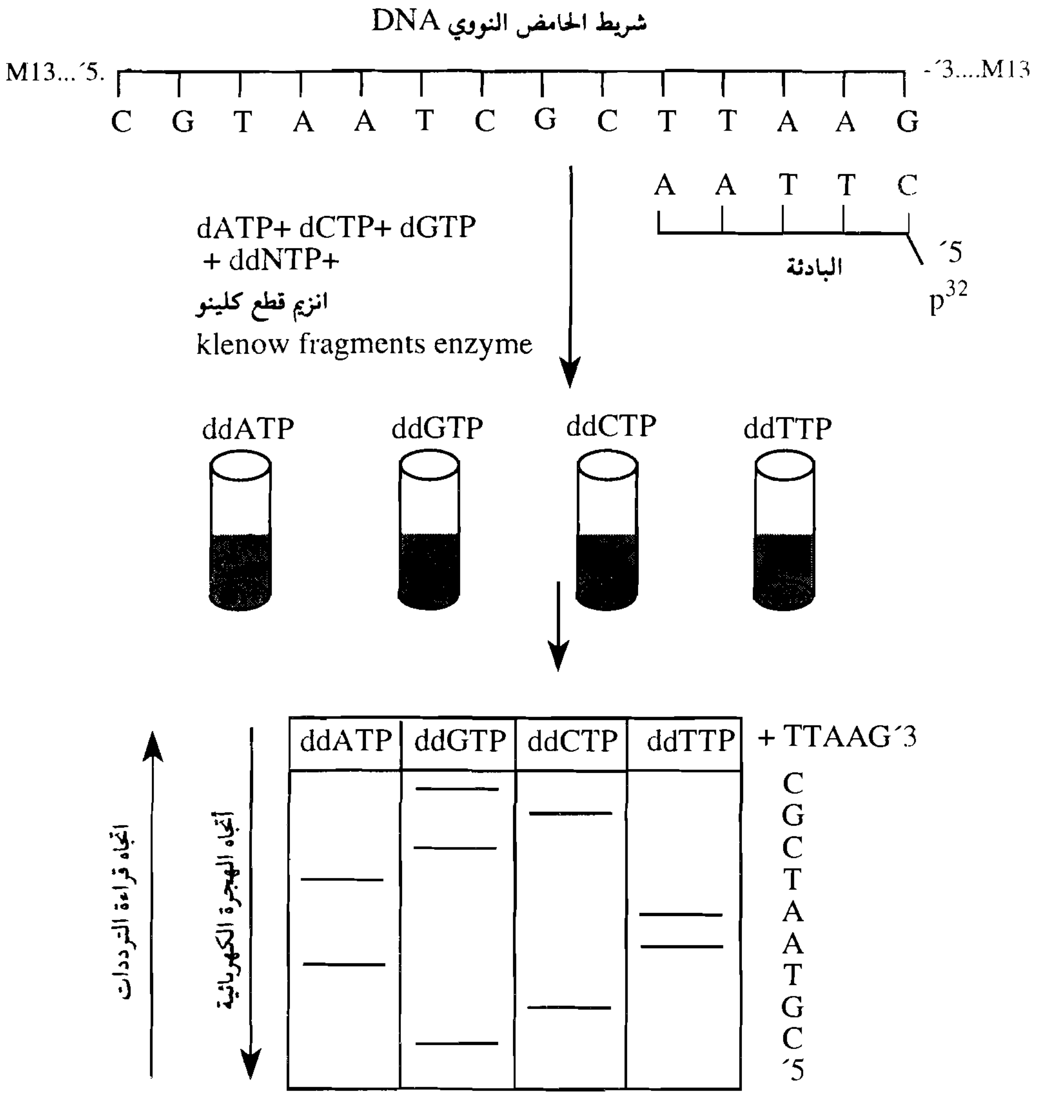
´5 - CTTAAGCGATdd
´5 - CTTAAGCGATTdd

وعند إجراء الهجرة الكهربائية لها والحصول بعد ذلك على فلم أشعة أكس فأن النتائج ستكون كما في (الشكل7-13) .

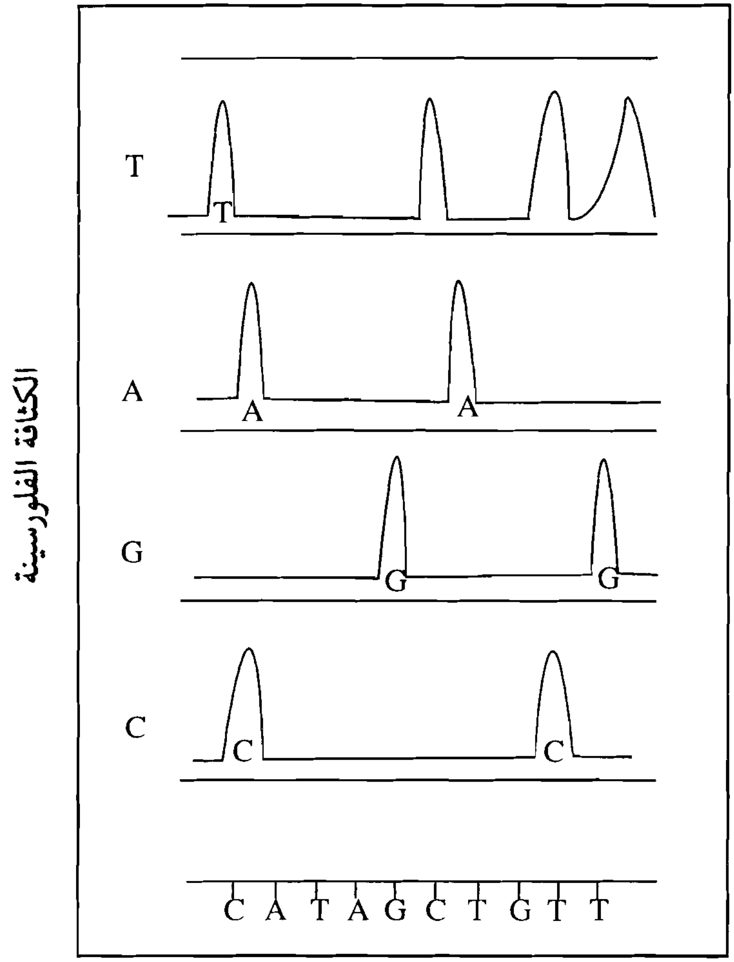
وقد أبتكرت طريقة ثالثة نشرت عام 1980 من قبل سمث وجماعته في مجلة الطبيعة Nature تعتمد هذه الطريقة على وجود طرف مضيء فلورسني في البادئة ويكون لكل تفاعل طرف مضيءيختلف عن الطرف المضيء للتفاعلات الأخرى وتخلط التفاعلات جميعها بعد ذلك في أنبوبة واحدة وتفصل السلاسل كهربائياً ويتم فحص الهلام بعد ذلك بطريقة الفحص الفلورسني المعروف أبتداء من نهاية الهلام حيث يبدأ أول ورود للتنيوكليوتيدة الأولى في تسلسل الحامض النووي المفحوص . وقد طورت هذه الطريقة بحيث أصبح الفحص يجري تلقائياً( اتوماتيكياً) لكل تفاعل بصوره مستقلة ويعطي الجهاز خطوطاً بيانية ملونة حسب لون الطرف المضيء المستخدم في التفاعل (الشكل 7-14) .

كما طورت طرق قراءة تسلسل نيوكليوتيدات الحامض النووي DNA عن طريق استخدام الحاسوب حيث يقوم الحاسوب بتسجيل تسلسل النيوكليوتيدات آلياً وخصوصاً تلك التي تمثل حجم كبير من الحامض النووي .

كما أن الحاسوب يقوم كذلك بتحديد مواقع قطع الأنزيمات وكذلك مواقع إشارات ابتداء وانتهاء تصنيع الحامض النووي RNA و تحديد الترددات المتعاكسة Palindromes . كما أنه يمكن للحاسوب القيام بتحديد الترددات المتماثلة ونسبها عند مقارنة ترددات أنواع مختلفة من الحامض النووي . كما أنه يمكن للحاسوب إعطاء تسلسل الأحماض الأمينية اعتماداً على تسلسل النيوكليوتيدات . وأصبح الحاسوب الآن جهازاً لا غنى عنه في الوراثة الجزيئية .




(شكل 7-13): طريقة سانجر-كولسون في قراءة تسلسل ترددات نيوكليوتيدات الحامض النووي DNA. ان دخول جزيئة dd في التفاعل تؤدي إلى إيقاف نمو سلسلة الحامض النووي عند موقع الدخول وعند استخدام أربعة انواع من جزيئات dd فانه يمكن الحصول على أربعة أنواع من جزيئات الحامض الموسمة النهاية




تردد نيوكليوتيدات الحامض النووي DNA

(شكل7-14): طريقة الفحص الفلورسني لقراءة تسلسل ترددات نيوكليوتيدات حامض نووي DNA معين. إن كل تفاعل يحتوي على طرف مضيء فلورسني ذي لون معين لذلك فأنه يمكن الحصول على أشرطة موسمة بالطرف المضيء اعتماداً على القاعدة المستخدمة في التوسيم وتقرأ النتائج آلياً بواسطة الحاسوب

# 8

# بناء المكتبات الوراثية أو بنوك المورثات

**مقدمة**

**بناء مكتبة المورثات**

**أولاً: تهيئة قطع الحامض النووي المناسبة لبناء مكتبة المورثات**

-عزل قطع الحامض النووي من المجين

-عزل واستخلاص قطع الحامض النوويDNA من الهلام

-استخدام الحامض النووي المتممcDNA

**ثانياً: اختيار الناقل المناسب وهندسة قطع الحامض النووي معه**

-اختيار البلازميدات كنواقل

-اختيار العاثيات كنواقل

-اختيار الكوزميدات كنواقل

**ثالثاً: أدخال النواقل المهندسة وراثياً إلى المضائف**

-التحول

-التعبئة خارج الخلايا

-أستخدام العبوات التجارية في التعبئة خارج الخلايا

**حساب عدد الكلونات الممثلة في مكتبة المورثات**

## مقدمة

تبدأ تقنية الهندسة الوراثية في مرحلتها الأولى بتهيئة ما يدعى بالمكتبة الوراثية Gene Library أو بنك المورثاتGenes Bank . ويهدف بناء هذه المكتبة إلى تمثيل جميع أو معظم الجين الذي يمثل المادة الوراثية لكائن معين على هيئة قطع حامض نووي DNA مهندسة بناقل معين . يتم فيما بعد استخدامها لعزل مورث أو مجموعة مورثات تخدم أهداف الهندسة الوراثية . إن أفضل المكتبات الوراثية هي تلك التي تحتوي على حجم معين مناسب من قطع الحامض النووي DNA كافية لتمثيل معظم أو جميع مورثات الكائن . ويعتمد استخلاص حجم هذه القطع على الأنزيم القاطع المستخدم في هذه المرحلة وكلما قل عدد القطع الناتجة عن معاملة الحامض النووي DNA بالأنزيم القاطع كان ذلك أفضل لبناء مكتبة المورثات . ويعتمد إختيار قطع الحامض النووي المناسبة للهندسة الوراثية على حجم الجين . فالجنيات المعقدة والكبيرة الحجم كما في مجينات الأحياء الراقية تحتوي على مئات الالاف من المورثات وأنه من الصعوبة تمثيل جميع هذه المورثات عند بناء المكتبات الوراثية . لذلك يتم اللجوء الى إختيار أحجام كبيرة نوعاً ما من قطع الحامض النووي DNA لأجل الهندسة وبناء مكتبة المورثات . هذا إضافة إلى أن مجنيات الأحياء الراقية تحتوي على مورثات كبيرة الحجم مناسبة تكفل الحصول على هذه المورثات كاملة هو معاملة الجين الكامل جزئياً بالأنزيم القاطع المناسب .

إذ يوفر القطع الجزيئي للمجين وجود قطع حامض نووي كبيرة الحجم ضمن مجاميع القطع الناتجة عن هذا الهضم . وبطبيعة الحال فأن كلونة مثل هذه القطع الكبيرة يحتاج إلى إختيار ناقل مناسب ذي قدرة استيعابية كبيرة . لذلك فأنه يلجأ إلى استخدام نواقل الكوزميدات التي توفر مثل هذا الغرض . أما بالنسبة لمكتبات المورثات الخاصة بالأحياء الصغيرة الجين فأنه يكفي على قطع حامض نووي بحجم 5-10 كيلو قاعدة تكفي لتمثيل معظم مورثاتها في المكتبة مقارنة مع 20-40 كيلو قاعدة الضروري لتمثيل معظم مورثات الأحياء الراقية في مكتباتها الوراثية (شكل 8-1) .

وفي العادة فأنه قبل البدء في بناء مكتبة المورثات فأنه يتم أولاً حساب سعة المكتبة اللازم لتمثيل معظم مورثات الجين ويعتمد ذلك على حجم قطع الحامض النووي المقترح استخدامه وكذلك حجم الجين الكامل ونسبة الاحتمالية المطلوبة في المكتبة . ونظراً لاختلاف أهداف بناء مكتبة المورثات فأن نسبة الاحتمالية تصبح ليست ضرورية في بعض التجارب . كما هي الحال في تجارب دراسة العلاقات التطورية أو لعزل قطع حامض نووي عشوائية لاستخدامها كمجسات في هذه التجارب . ولكن تبقى معرفة نسبة الاحتمالية في المكتبة الوراثية ضرورية جداً في حالة استهداف عزل مورث معين وكذلك لمعرفة كفاءة الكلونة والناقل معاً .

## بناء مكتبة المورثات

هناك عدة أهداف لبناء المكتبة الوراثية من هذه الأهداف :

1- تمثيل مورثات الكائن بهيئة قطع منفصلة تسهيلاً لدراستها وتحليلها .

2- استخدامها في عزل مورثات بعينها لاغراض خاصة بهدف البحث .

3- استخدامها في دراسات العلاقات التطورية والابوة .

4- استخدامها في التجارب الخاصة بالأدلة الجرمية التي تتعلق بالجرائم والمجرمين .

5- تحديد مواقع المورثات للأغراض الخاصة بالخرائط الوراثية .

6- أهداف أخرى سيتم الحديث عنها في سياق الموضوع .

هناك عدة مراحل في عملية بناء مكتبة المورثات وهي :

1- تهيئة قطع الحامض النووي المناسبة لبناء المكتبة .

2- إدخال النواقل المهندسة وراثياً في المضائف ومعرفة حجم المكتبة .

### أولاً : تهيئة قطع الحامض النووي المناسبة لبناء مكتبة المورثات

نظراً لاختلاف أهداف بناء مكتبة المورثات فأن هناك طريقتين أساسيتين لبلوغ هذا الهدف وهي :

أ-عزل قطع الحامض النووي من الجين في حالة البحث عن مورث ذي تعبير منخفض أو مثبط أو في حالة عزل قطع حامض نووي عشوائية مناسبة لدراسات التطور وإيجاد القرابة .

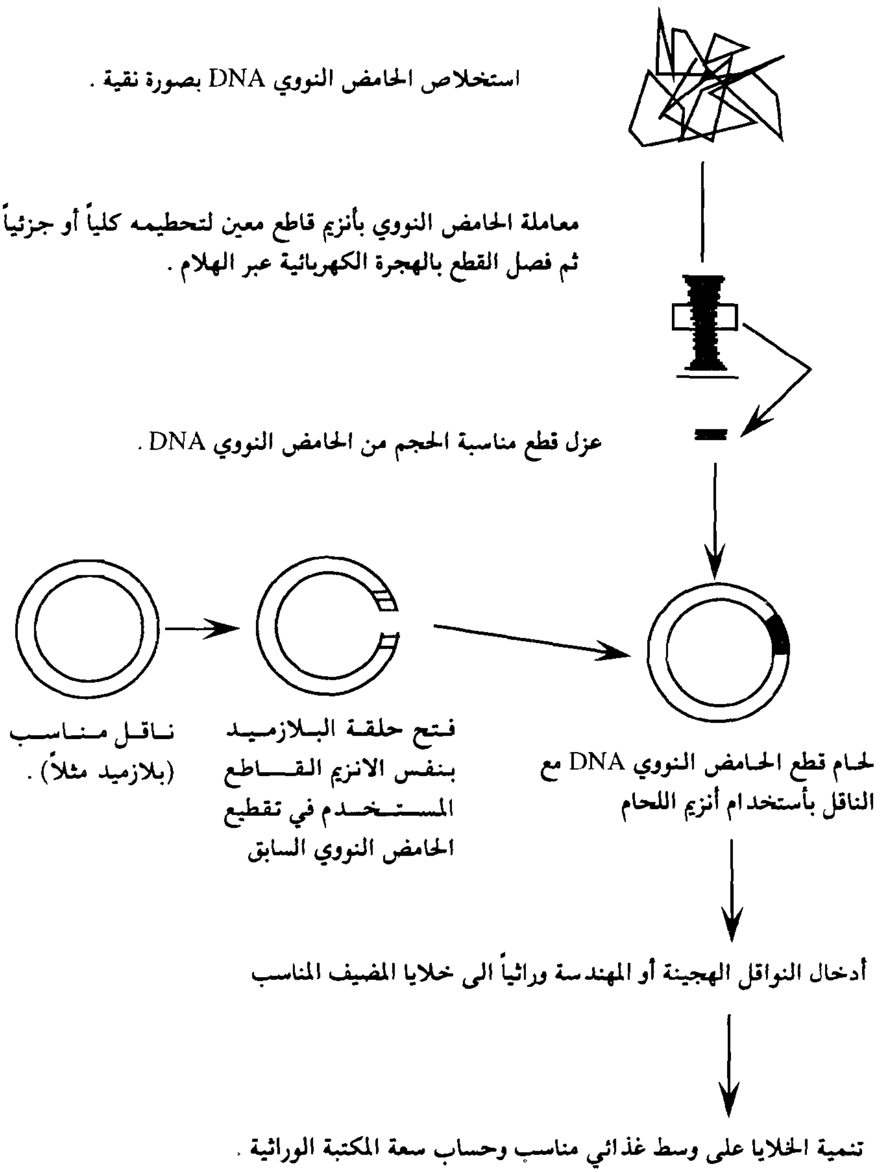
ب-استخدام الحامض النووي المتمم cDNA في حالة استهداف مورث معين ذي قوة تعبير عالية في خلايا معروفة كما هي الحال في عزل مورثات البومين البيض من خلايا قناة البيض أو مورثات الأنسولين من خلايا البنكرياس وغيرها .

## عزل قطع الحامض النووي من الجين

تبدأ عمليات الاستعداد لبناء المكتبة الوراثية باستخلاص الحامض النووي DNA من الكائن المراد بناء مكتبته الوراثية . يتوجب في الحامض النووي المستخلص أن يكون نقياً غير ملوث وأن يكون كاملاً غير مكسور . ولأجل ذلك فأنه يتوجب استخدام قنانٍ نظيفة تماماً وكذلك استخدام طريقة استخلاص مناسبة بحيث نحصل في النهاية على نموذج حامض نووي DNA خالٍ من الملوثات كالكلوروفورم أو الفينول أو أملاح السيزيوم أو غيرها .

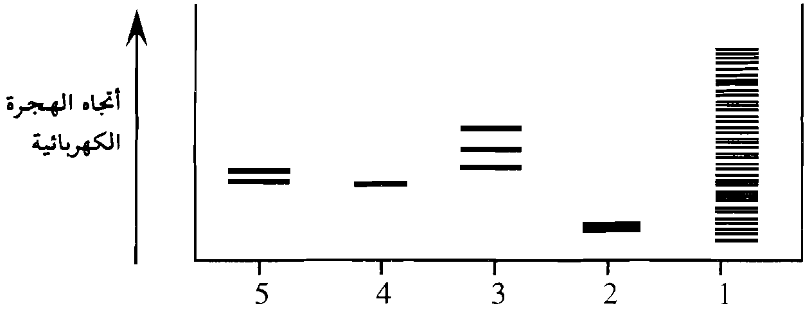
ونظراً لاختلاف طبيعة الخلايا التي سيتم استخلاص الحامض النووي منها . فأن هناك طرقاً شتى لذلك . ويمكن الرجوع للفصول السابقة حول ذلك .

إنه من الممكن فحص الحامض النووي DNA للتأكد من عدم تكسره بالبروتينات أو الأنزيمات الخلوية أثناء الاستخلاص وذلك عن طريق أخذ نموذج بسيط منه وترحيله كهربائياً عبر هلام الأجاروز حيث يظهر الحامض النووي الكامل غير المكسور كحزمة واحدة فقط لاتبعد كثيراً عن موقع بداية الهجرة . أما اذا كان الحامض النووي مكسوراً فأنه يظهر على الهلام بعد الهجرة الكهربائية كمسحة ضبابية تمتد من موقع بداية الهجرة نحو القطب الموجب . هذا فيما اذا كان نموذج الحامض النووي معقداً كما في نموذج الحامض النووي البكتيري أو الفطري أو النباتي أو الحيواني .




(الشكل 8-1): استراتيجية بناء المكتبة الوراثية

أما إذا كان النموذج يخص حامض نووي صغير الحجم كما في النماذج المعزولة من المايتوكوندريا أو البلازميدات أو العاثيات أو البلاستيدات أو غيرها من الجينات الصغيرة الحجم فأن النموذج المكسور يظهر كعدة حزم (3- فما فوق) . ويذكر بأنه في حالة النماذج الخاصة بالبلازميدات فقد يظهر الحامض النووي البلازميدي على هيئة حزمتين إحداهما تمثل البلازميد في حالة الاسترخاء Relax Plasmid والأخرى تمثل نفس البلازميد في حالة الالتفاف الفائق Supercoiled Plasmid (الشكل8-2) .




1 : نموذج DNA (لكائن حي راق) محطم إلى قطع وغيرها صالح .

2 : نموذج DNA (لكائن حي راق) غير مكسور وصالح .

3 : نموذج DNA بلازميدي محطم إلى ثلاث قطع .

4 : نموذج DNA بلازميدي غير مكسور .

5 : نموذج DNA بلازميدي غير مكسور وتمثل الحزمتان صور البلازميد عندما يكون في حالة الاسترخاء أو الالتفاف الفائق .

**(الشكل8-2): استخدام الهجرة الكهربائية عبر هلام الاجاروز لأجل التأكد من صلاحية الحامض النووي DNA المستخلص من خلايا معينة**

ويعتبر مثل هذا النموذج كاملاً غير مكسور لإمكانية وجود البلازميد أثناء الاستخلاص على هاتين الهيئتين .

كما أننا نستطيع التأكد من عدم وجود مواد ملوثة في نموذج الحامض النووي المستخلص وذلك بإجراء عدة تفاعلات أنزيمية باستخدام الأنزيمات القاطعة مع نماذج صغيرة جداً من الحامض النووي ومن ثم تهجيرها كهربائياً خلال هلام فحص نتيجة ذلك .

فاذا ما تم تكسير نماذج الحامض النووي (ظهور الحامض على هيئة حزم في حالة نماذج الحامض النووي صغير الحجم مثل DNA البلازميدات أو على هيئة مسحة طويلة في حالة نماذج الحامض النووي الأكثر تعقيداً مثل DNA البكتيريا وغيرها) فأن النموذج يكون نقياً أما إذا ظهر الحامض النووي كحزمة واحدة فأنه عندئذ يعتبر ملوثاً ببعض المواد التي ثبطت عمل الأنزيمات القاطعة ويتوجب تنقيته مرة أخرى .

في معظم نماذج الحامض النووي المستخلصة لأجل الهندسة الوراثية يكون النموذج ملوثاً .

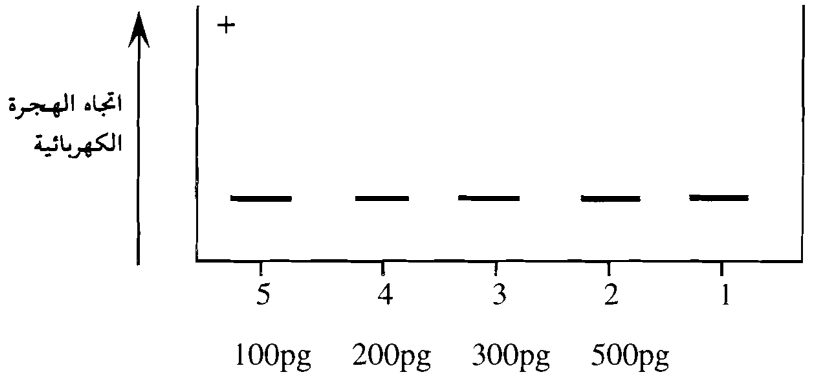
بالحامض النووي الريبوزي RNA ولا يؤثر وجود هذا الحامض في التفاعلات مع الأنزيمات القاطعة . كما لا يعتبر وجوده تلوثاً . ولكن يمكن التخلص منه عند الاستخلاص بإضافة أنزيم الارانيز RNase A قبل استخدام الفينول والكلوروفورم أو طرد النموذج مركزياً بواسطة الطرد المركزي الفائق مع ملح كلوريد السيزيوم .

بعد التأكد من عدم تكسر الحامض النووي DNA وعدم تلوثه يتم حساب تركيزه وذلك بأخذ حجم معلوم من النموذج الأصلي وتخفيفه بالماء المقطر وتقدر كمية الحامض النووي الموجودة في النموذج باستخدام جهاز قراءة الطيف الضوئي Spectrophotometry عند الطول الموجي 260 أنكستروماً(260A) حيث إن القيمة الامتصاصية للطيف Absorbance واحد(1) عند هذا الطول الموجي تساوي 50 مايكروجراماً من تركيز الحامض النووي المزدوج الأشرطة DNA في السنتميترالمكعب الواحد (القراءة (1)عند الطول الموجي 260=50 مايكروجراماً/سم3) كما يمكن أستخدام هذا الجهاز للتأكد من نقاوة النموذج وذلك بقراءة النموذج عندالطول الموجي

260 و 280 أنكستروم ويعتبر نموذج الحامض النووي نقياً عندما تكون نسبة القراءة عندها تلك الاطوال الموجية تساوي 1.8 وملوثاً بالبروتين أو الفينول عندما تقل عن ذلك .

كما يمكن حساب تركيز الحامض النووي في النموذج بطريقة تقديرية عن طريق تهجير نموذج معلوم الحجم من الحامض النووي المجهول التركيز كهربائياً عبر هلام مع نماذج حامض نووي متعددة معروفة التراكيز وثم مقارنة التراكيز المعلومة مع النموذج المجهول لتقدير تركيزه (الشكل 8-3) .

بعد الانتهاء من عمليات التأكد من صلاحية الحامض النووي DNA وكذلك معرفة تركيزه . يتم اختيار الأنزيم أو الأنزيمات القاطعة المناسبة لعملية الكلونة وأهدافها ثم يوضع تركيز مناسب من نموذج الحامض النووي في أنبوبة التفاعل وتعتمد كمية الحامض النووي في هذا التفاعل على طبيعة التجربة . يضاف بعد ذلك محلول دارئ (البفر) الخاص بالأنزيم والذي يوفر الظروف المناسبة لنجاح التفاعل وعادة يتم توفير أنبوبة البفر مع الأنزيم في حالة شرائه من الشركات المتخصصة في هذا المجال . كما يمكن تحضيره مختبرياً حيث إن معظم بفرات الأنزيمات القاطعة يجب أن تحتوي على مصدر لتوفير أيونات المغنيسيوم $Mg^{+2}$ وعامل مختزل مثل الداي ثايوثيروتول Dithiothreitol لأجل جعل الأنزيم مستقراً ولمنع تثبيطه وكذلك وجود ملح كلوريد الصوديوم وتوفير أسس هيدروجيني PH مناسب للأنزيم . بعد ذلك يضاف الأنزيم بتركيز قدرة وحدة واحدة (1 unit) لكل مايكروجرام من الحامض النووي المستخدم في التجربة بحيث يكون الحجم الكلي للتفاعل 20 مايكروليتراً . ويمكن استخدام الماء المقطر لإكمال الحجم إلى الحجم الكلي اللازم للتفاعل . وعلى سبيل المثال يمكن إضافة 10 مايكروليتر من نموذج الحامض النووي بحيث يكون التركيز 10 مايكروجرامات و2 مايكروليتير من البفر الخاص بالأنزيم (10X) و 2 مايكروليتر من الأنزيم(10 وحدات) و 6 مايكروليترات ماء مقطر لإكمال الحجم .




1 : نموذج DNA مجهول التركيز

5.4.3.2.1 : نماذج DNA معلومة التركيز

**(الشكل 8-3): استخدام الهجرة الكهربائية عبر هلام الاجاروز لتقدير تركيز الحامض النووي DNA المجهولة عن طريق مقارنته مع تراكيز مختلفة معلومة من DNA اخر**

إن درجة الحرارة 37.5 م تعتبر الدرجة المناسبة لحضانة معظم تفاعلات الأنزيمات القاطعة ولكن هناك عدداً قليلاً من هذه الأنزيمات تحتاج لدرجات حرارة مختلفة مثل الأنزيم القاطع TaqI الذي يحتاج درجة حرارة 65°م . إن بقاء التفاعل لمدة ساعة يعتبر كافياً حيث أن وحدة واحدة من الأنزيم قادرة على إنجاز مهمتها في تقطيع مايكروجرام واحد في ساعة واحدة عند درجة حرارة مناسبة . ومع ذلك فأنه من الأفضل إضافة وحدات إضافية من الأنزيم للتفاعل وكذلك حضانة النموذج لفترة أطول نسبياً لضمان نجاح التفاعل . وبعد الانتهاء من الحضانة يتم إيقاف التفاعل بإضافة قطرة صغيرة من محلول EDTA الذي يتآصر مع أيونات المغنيسيوم حيث يقف التفاعل من دونها . يتم بعد ذلك التأكد من نجاح التفاعل وذلك بأخذ 1 مايكروليتر من محلول التفاعل وتهجيره كهربائياً عبر هلام الاجاروز حيث يعتبر وجود مسحة ضبابية طويلة (في حالة استخدام نموذج حامض نووي معقد) أو عدة حزم (في حالة استخدام حامض نووي صغير) نجاحاً للتفاعل (الشكل 8-4) .

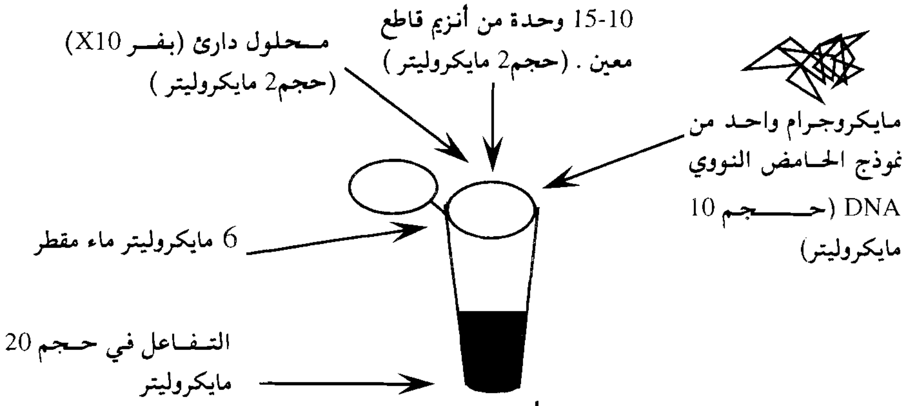
في التجارب التي يستخدم فيها نموذج حامض نووي معقد يعود للحيوانات أو النباتات الراقية فأن عملية الهضم الكلي بالأنزيمات القاطعة قد لا تناسب الهدف من الكلونة وخصوصاً عندما يتعلق الأمر بعزل مورثات كبيرة الحجم . حيث إن الهضم الكلي يؤدي إلى الحصول على قطع صغيرة من الحامض النووي ويؤدي ذلك إلى تقطيع المورثات المستهدفة إلى قطع متعددة مما يجعل عملية عزلها عملية شاقة وشبه مستحيلة . لذلك فأن أفضل طريقة هو تهيئة التفاعل ليتم جزئياً وذلك بإضافة كمية قليلة من الأنزيم أو حضانة التفاعل لفترة وجيزة لعدم إعطاء الأنزيم الفرصة الكافية لتقطيع الحامض النووي كلياً . وبذلك فأنه يتم الحصول على نماذج من قطع الحامض النووي مختلفة الحجم .

بعد الانتهاء من إجراء التفاعل مع الأنزيم القاطع المناسب والتأكد من نجاحه يتم تهجير النموذج كهربائياً عبر هلام (لأجل عزل قطع الحامض النووي أعتماداً على وزنها الجزيئي) بوجود قطع حامض نووي معلومة الوزن الجزيئي (Marker) ولفترة زمنية كافية لذلك . يصبغ الهلام ببيروميد الاثيديوم (50 مايكروجرام/لتر) لنصف ساعة ثم يفحص الهلام بالأشعة فوق البنفسجية لتحديد موقع قطع الحامض النووي المناسبة للهندسة (الشكل 8-5) .

## عزل واستخلاص قطع الحامض النووي DNA من الهلام

يتم عزل قطع الحامض النووي المناسبة للهندسة الوراثية بإحدى الطرق التالية :

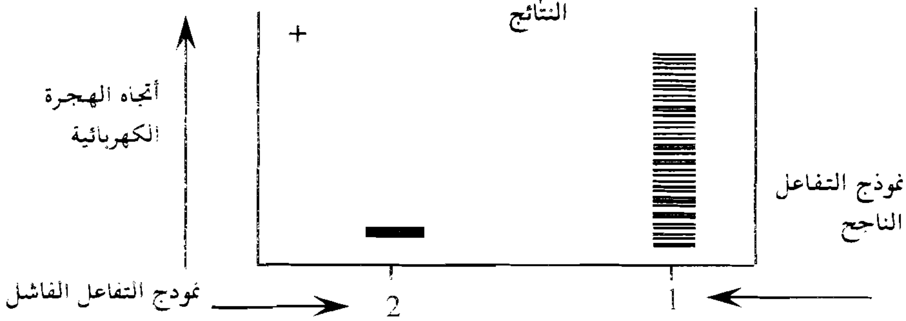
أ-قص موقع الهلام المحتوي على قطع الحامض النووي المطلوبة ونقله إلى أنبوبة مناسبة وثم إضافة أنزيم الأجاريز Agarase للأنبوبة للتخلص من الهلام ثم تستخلص القطع المطلوبة باستخدام عمود السفيدكس G50 أو طريقة الجين-كلين التي تم الحديث عنهما في فصل استخلاص الأحماض النووية . وترسب قطع الحامض النووي باستخدام الايثانول المثلج (شكل 8-6) .




حضانة التفاعل لمدة ساعة -ساعتين أو لنصف ساعة بدرجة حرارة مناسبة للأنزيم .

أضافة قطرة صغيرة من محلول EDTA لايقاف التفاعل

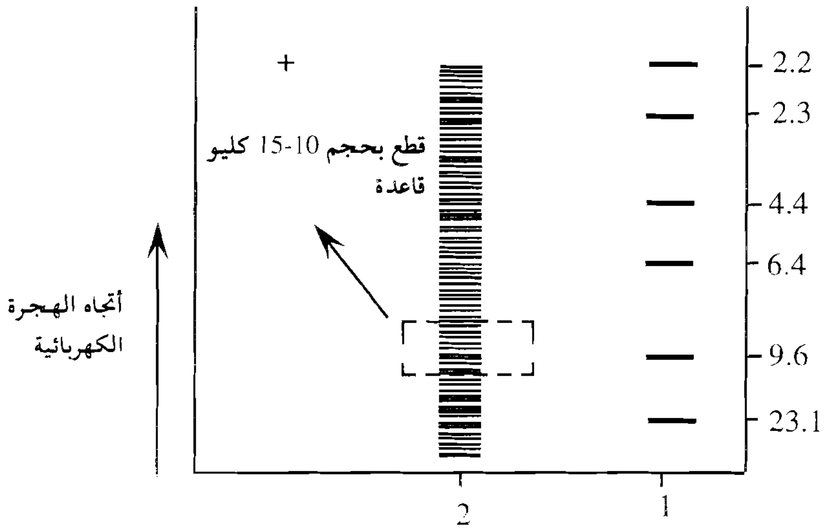
يؤخذ نموذج من التفاعل (واحد مايكروليتر) للهجرة الكهربائية .




**(الشكل8-4) : طريقة إعداد التفاعل الأنزيمي للحامض النووي DNA مع أنزيم قاطع والتأكد من نجاح أو فشل التفاعل**

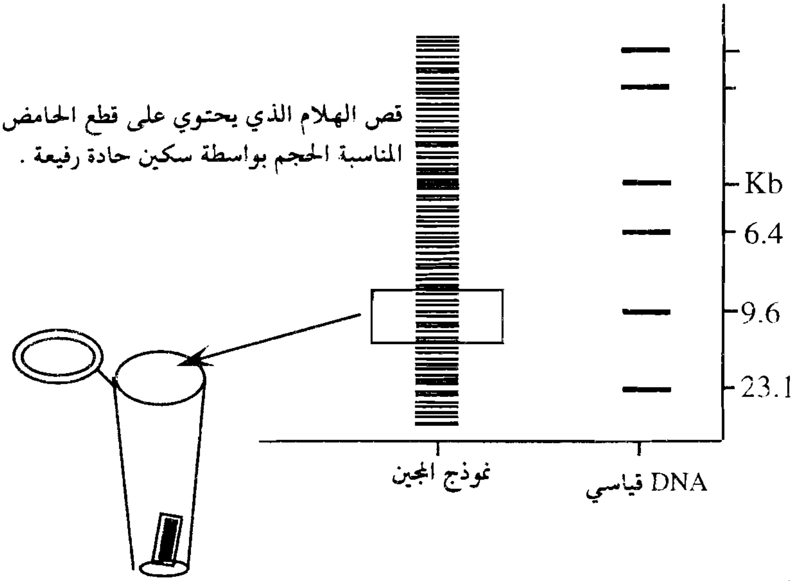
ب-عمل حفرة أمام موقع قطع الحامض النووي المطلوبة Trough وملؤها بالمحلول TE ثم الاستمرار بالهجرة الكهربائية حيث تزحف قطع الحامض النووي باتجاه الحفرة حتى تنتقل إلى محلول TE ويتم تجميع المحلول بين الحين والآخر حتى الحصول على جميع القطع المطلوبة ثم تتم تنقية المحلول من بروميد الاثيديوم والأملاح كما سبق الحديث عنه في فصل استخلاص الأحماض النووية ثم ترسب القطع بإضافة الكحول المثلج (شكل8-7) .

يحسب بعد ذلك تركيز قطع الحامض النووي بعد ترسيبها وتجفيفها وإذابتها بعدة مليلتيرات من محلول TE أو الماء المقطر .




1 : نموذج DNA قياس ذو قطع مختلفة الحجم (Marker) .
(DNA لامبدا معامل بالأنزيم Bam HI مثلاً) .
2 : نموذج DNA الجين .

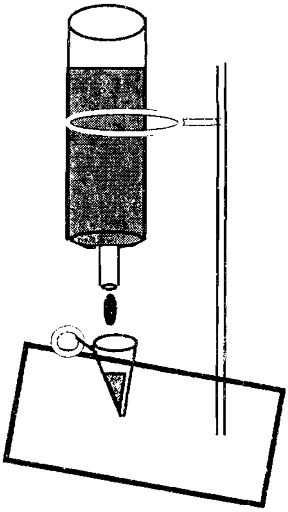
(الشكل8-5): تحديد موقع قطع الحامض النووي DNA المناسبة لبناء المكتبة الوراثية




1- هجرة كهربائية عبر هلام الاجاروز الخفيف

3- نقل قطعة الهلام إلى أنبوبة .

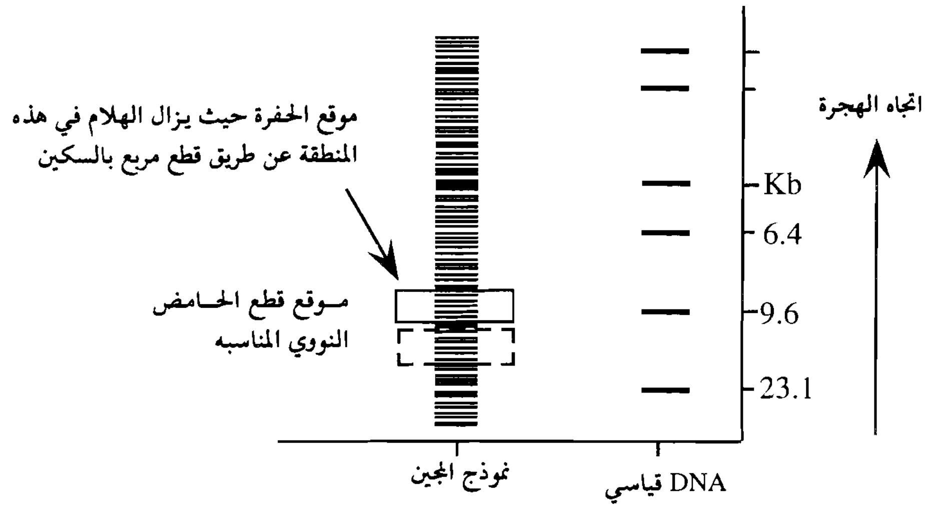
4- أضافة أنزيم الاجاريز والبفر المناسب للانبوبة لهضم الاجاروز والتخلص منه وأطلاق قطع الحامض النووي في المحلول .



5- أستخدام عمود الفيدكس G50 لاجل فصل قطع الحامض النووي عن محلول التفاعل . يتم أولاً غسل العمود بمحلول ملحي ثم يوضع النموذج وتترك القطرات الاولى ثم يجمع نموذج قطع الحامض النووي بأستخدام محلول ملحي بتركيز معين .

يضاف الكحول الاثيلي المثلج لترسيب قطع الحامض النووي- طرد مركزي- تجفيف الراسب ثم أذابة راسب قطع الحامض النووي بخمسة مايكروليترات ماء مقطر .

**(الشكل6-8): استخلاص قطع الحامض النووي DNA المناسبة لبناء المكتبة الوراثية عن طريق قص هلام الاجاروز الذي يحتوي هذه القطع ثم تصفى بعد ذلك عن طريق انزيم الاجاريز وعمود السفيدكس**




1- يتم تفريغ جزء من حوض الهجرة الكهربائية من محلول الهجرة بحيث يصبح مستوى المحلول أقل من مستوى السطح العلوي للهلام .

2- تضاف كمية من محلول TE إلى الحفرة ويسمح بعد ذلك للتيار الكهربائي بالمرور لمدة خمسة دقائق . يوقف التيار الكهربائي ويجمع محلول TE من الحفره في أنبوبة ويضاف محلول TE جديد للحفرة ويسمح للتيار الكهربائي مرة أخرى بالمرور وهكذا يتم في كل مرة جمع محلول TE من الحفرة لمدة 20-25 دقيقة .

↓

يضاف كحول البروبانول لحلول القطع للتخلص من بروميد الاثيديوم وترسب قطع الحامض النووي بالكحول ثم ترسب بالطرد المركزي تجفف وتذاب بخمسة مايكروليترات من الماء المقطر .

**(الشكل 8-7): طريقة استخدام الحفرة Trough لأجل استخلاص قطع الحامض النووي المناسبة لبناء المكتبة الوراثية**

**استخدام الحامض النووي المتمم cDNA :**

يفضل بعض الباحثين استخدام الحامض النووي المرسال mRNA لبناء مكتبة المورثات لسبب رئيس هو أن هدف الهندسة الوراثية هو عزل مورثات نشيطة أيضاً . لذلك فأنه ليست هنالك أهمية في تمثيل جميع المورثات في المكتبة بل تقتصر على تمثيل المورثات التي لها القدرة على التعبير عن نفسها بينما تبقى المورثات الكامنة أو المثبطة خارج هذا التمثيل . وهكذا يتم الحصول على مكتبة وراثية صغيرة الحجم سهلة التصفية* . لا يستخدم الحامض النووي المرسال مباشرة في بناء مكتبة المورثات بل يتم استخدامه في تفاعلات أنزيمية معينة للحصول على نسخة حامض نووي DNA متممة له cDNA . وتستخدم هذه النسخة في عملية بناء المكتبة .

لأجل عزل الحامض النووي المرسال فأنه يتطلب عزل الحامض النووي الريبوزي الكلي Total RNA من نموذج الخلايا المتوفرة . ان أفضل وسيلة لاستخلاص الحامض النووي الريبوزي الكلي هو أستخدام طريقة الطرد المركزي الفائق بوجود ملح كلوريد السيزيوم حيث يترسب الحامض النووي الريبوزي في قعر أنبوبة الطرد . وبعدالتخلص من محتويات الأنبوبة الاخرى يتم تجفيف الحامض ثم إذابته بعدة مليليترات من الماء المقطر المعقم لينقل بعد ذلك إلى عمود الفصل من النوع Oligo dT Cellulose حيث يتم فصل الحامض النووي المرسال حسب الطريقة التي تحدثنا عنها في فصل استخلاص الأحماض النووية . يتوجب الحفاظ على الحامض النووي الريبوزي الكلي أو المرسال من التلوث حيث يتحطم كلياً في حالة وجود خلايا جلدية أو بكتيرية أو غيرها لذلك فأنه يجب استخدام قنانٍ وأدوات معقمة كلياً لذلك .

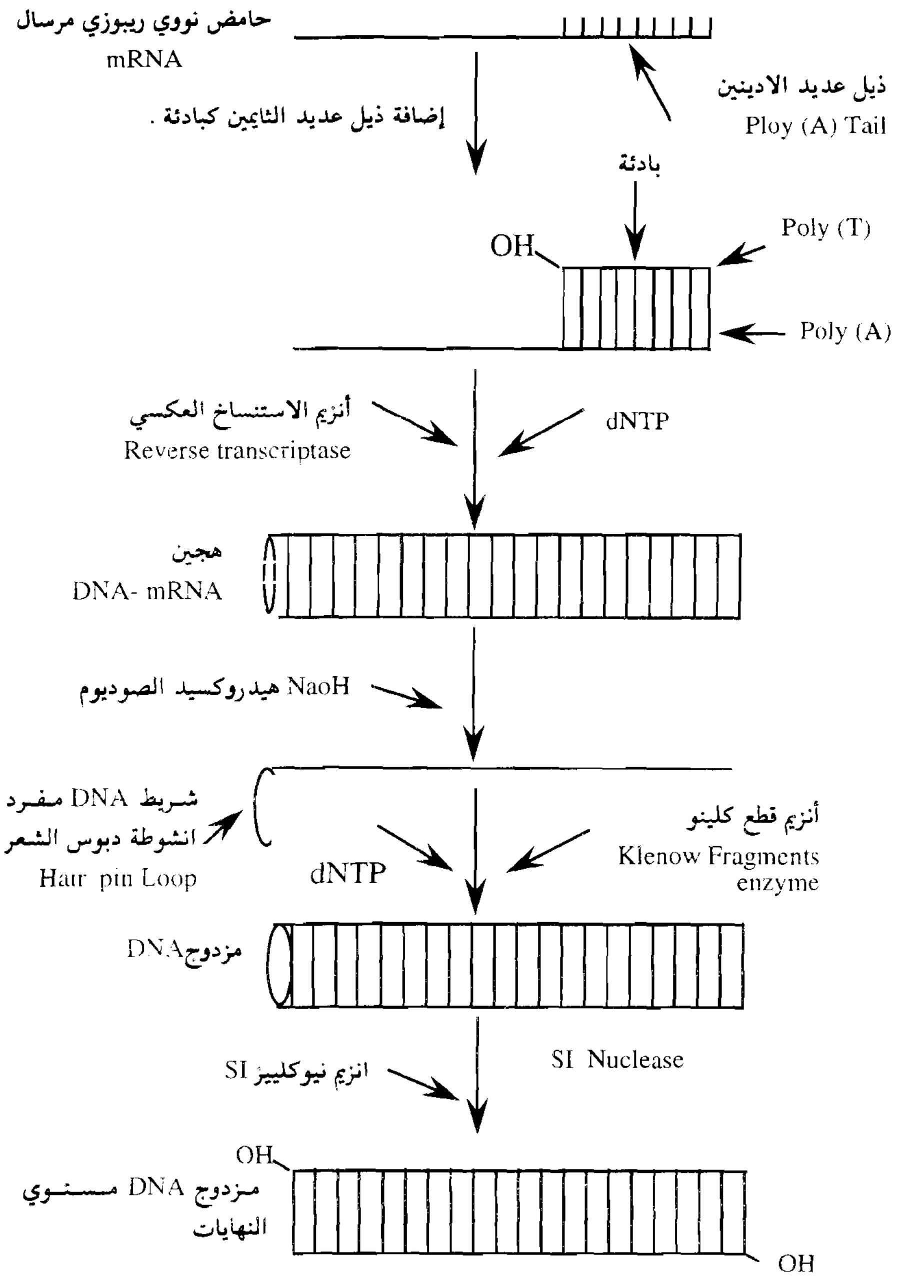
يتم تصنيع نسخ حامض نووي DNA متمم من قالب حامض نووي مرسال اعتماداً على قدرة أنزيم الاستنساخ العكسي (طريقة إضافية) الذي تم الحديث عنها في فصل الانزيمات . يتمكن هذا الأنزيم من البقاء عندما توجد بادئة ملتصقة مع القالب وذات نهاية هيدروكسيلية . ويتم ذلك اعتماداً على وجود ذيل من عديد

---

* ذات مورثات خالية من الانترونات .

الادنين "Poly A" في نهاية القالب حيث تضاف بادئه مؤلفة من عديد الثايمين "Poly T" ذات نهاية هيدروكسيلية إذ ترتبط هذه البادئة مع ذيل عديد الادنين لتوفير نهاية هيدروكسيلية حرة مناسبة لعمل الأنزيم . يقوم بعدها أنزيم الاستنساخ العكسي بوجود النيوكليوتيدات الاربعة dNTP المناسبة لتصنيع الحامض النووي DNA بتصنيع نسخة مفردة من الحماض النووي DNA المتمم . يتم بعد ذلك التخلص من قالب الحامض النووي المرسال بإضافة هيدروكسيد الصوديوم إلى التفاعل حيث يتحطم الحامض النووي المرسال وينفصل عن نسخة الحامض المتمم . تستخلص نسخة الحامض النووي المتمم ويضاف إليها أنزيم قطع الكلينو مع النيوكليوتيدات الأربعة حيث يستخدم الأنزيم بادئة أنشوطة دبوس الشعرHair Pin Loop المتوفرة في قالب المتمم طبيعياً لتصنيع نسخة ثانية من الحامض DNA المتمم -يتم التخلص بعد ذلك من الترددات التي تمثل انشوطة دبوس الشعر بإضافة أنزيم النيوكلييز SI Nu-clease SI لنتمكن في النهاية من الحصول على شريط مزدوج مستوي النهايات من الحامض النووي المتمم DNA (شكل 8-8) . تأتي قدرة أنزيم النيوكلييز SI على إزالة ترددات أنشوطة دبوس الشعر من قدرته على تحطيم النيوكليوتيدات غير المزدوجة الموجودة في انحناءة هذه المنطقة .

كما تأتي أهمية الحامض النووي المتمم من أنه لا يمثل سوى محاور (اكسونات)المورثات فقط ولذلك أهمية كبيرة في التعبير عن هذه المورثات في حالة استخدام البكتريا كمضائف للمواد المهندسة . إذ تفشل المورثات التي تحتوي على المحاور و المتداخلات من التعبير عن نفسها في البكتريا لعدم امتلاك البكتريا لانزيمات التخلص من الترددات المناظرة للمتداخلات في الحامض النووي المرسال الناتج عن استنساخ Transcription هذه المورثات وبالتالي فأنه لا تتم ترجمة Translationهذا الحامض النووي .




(الشكل8-8): طريقة تصنيع مزدوج حامض نووي DNA مكمل من شريط حامض نووي مرسال باستخدام انزيم الاستنساخ العكسي وقطع كلينو

**ثانياً: إختيار الناقل المناسب وهندسة قطع الحامض النووي معه**

يتوقف إختيار الناقل على حجم قطع الحامض النووي المراد هندستها . إذ تختلف السعة الاستيعابية في النواقل . فالبلازميدات على سبيل المثال لا تستطيع استيعاب قطع الحامض النووي التي يزيد حجمها على عشرة كيلو قاعدة وإذا ما تمكنا من زرع قطع حامض نووي أكبر من ذلك في البلازميد فأن البلازميد سيفقد استقراريته في الخلايا المضيفة ثم تبدأ هذه الخلايا بالتخلص منه ، هذا إضافة إلى زيادة فرصة تحلل هذا النوع من البلازميدات المكلونة . كما أنه في حالة استخدام البلازميدات في بناء مكتبة المورثات لجين كبير الحجم مثل مجين الإنسان الذي يبلغ حجمه $4 X 10^9$ زوج قاعدي فأننا سنحتاج عند استخدام قطع حامض نووي ذات حجم10 كيلو قاعدة إلى أكثر من نصف مليون بلازميد مكلون لتمثيل معظم هذا الجين ومن الصعب الحصول على مثل هذه الكفاءة في البلازميدات . لذلك فأن هذه النواقل تعتبر مناسبة جداً عند استخدام قطع حامض نووي تتراوح أحجامها بين 10- 5 كيلو قاعدة (تمثيل مجينات صغيرة الحجم أو عند أستخدام مكتبة المورثات لدراسات تطورية وأيجاد علاقات القرابة وإثبات الأبوة وتوفير الادلة الجرمية . أما القدرة الاستيعابية في العاثيات فتزيد الى الضعف عما هي عليه لدى البلازميدات . وتستطيع العاثيات استيعاب قطع حامض نووي يتراوح حجمها بين 20-30 كيلو قاعدة دون أن يؤثر ذلك في حيويتها . أما الكوزميدات فأن لها أكبر سعة استيعابية من جميع النواقل الأخرى إذ تزيد سعتها الاستيعابية عن 40 كيلو قاعدة . وترجع قدرة الكوزميدات الاستيعابية العالية إلى صغر حجم الكوزميد إذ يبلغ أقصى حجم للكوزميد حوالي 8 كيلو قاعدة وهو حجم مناسب لاحتواء الكوزميد على مواقع لزجة Cos ومورث انتخابي ومنطقة تضاعف بلازميدية .

ولأجل معرفة أهمية القدرة الاستيعابية للناقل فأننا سنضرب هذا المثال لتوضيح ذلك ؛ يبلغ حجم الجين الكامل للخميرة حوالي 14,000 كيلو قاعدة ولأجل تمثيل جميع مورثاته في المكتبة الوراثية فأنه يتطلب أن تتم هندسته في حوالي 3000 بلازميد pBR 322 أو 1000 عاثي لامبدا أو 300 كوزميد وذلك عند استخدام قطع حامض نووي يبلغ حجمها 30,20,10 كيلو قاعدة على التوالي .

## اختيار البلازميدات كنواقل

لنفترض أن مجموعة قطع الحامض النووي DNA التي تم عزلها في المرحلة الأولى يتراوح حجمها بين 5-10 كيلو قاعدة وهي أحجام تناسب استخدام البلازميد كنواقل هندسة لهذه القطع . لذلك فأنه يتوجب اختيار بلازميد مناسب لعملية الهندسة الوراثية . تقع البلازميدات المستخدمة في الهندسة الوراثية في مجموعتين هما مجموعة البلازميدات ذات الغرس التثبيطي والبلازميدات الانتقائية المفردة وقد تم الحديث عنهما في فصل نواقل الهندسة الوراثية .

ففي حالة استخدام بلازميد من المجموعة الأولى مثل البلازميد P BR322 الذي يحتوي على موقعين لمقاومة المضادات الحيوية الأول لمقاومة الامبسلين والثاني لمقاومة التتراسايلكين فأنه عند كلونة قطع الحامض النووي فيها فأن هذه القطع في حالة نجاح الكلونة ستستقر بين جنبات مورث مقاومة التتراسايكلين و بينما يبقى مورث مقاومة الامبسلين سليماً . ويسبب ذلك تدمير مورث مقاومة التتراسايكلين .

بينما تبقى البلازميدات التي فشلت كلونتها تحتفظ بالمورثين سالمين . ولأجل استخدام مثل هذا الناقل يجب أن يتم عزل قطع الحامض النووي المراد هندستها من مجين معامل بالأنزيم القاطع Bam H1 لتوفير نهايات لزجة متكاملة مع نهايات البلازميد PBR 322 المفتوح بواسطة نفس الأنزيم وحتى تستطيع قطع الحامض النووي الالتصاق مع نهايات البلازميد عند إضافة أنزيم اللحام لهما .

تتم عملية هندسة قطع الحامض النووي مع البلازميد عن طريق أخذ تركيز معين مناسب من قطع الحامض النووي مع البلازميد عن طريق أخذ تركيز معين مناسب من قطع الحامض النووي المراد هندسته في أنبوبة تفاعل وإضافة تركيز مناسب من البلازميد المفتوح مع وحدات مناسبة من أنزيم اللحام وبفرة وثم حضانة التفاعل بدرجة حرارة مناسبة بعد الانتهاء من فترة الحضانة يتم ادخال البلازميدات الناتجة عن التفاعل في خلايا مضيف معين كما سيأتي لاحقاً .

أما في حالة استخدام بلازميد ذي صفة انتقائية مفردة كما هي الحال في البلازميد PSP65 الذي يحتوي على مورث مقاومة الامبسلين فأن قطع الحامض النووي المراد هندستها ستلتحم في موقع بعيد عن مورث مقاومة الامبسلين .

إن الصعوبة التي تكمن في عملية استخدام البلازميدات الانتقائية المفردة هو في كيفية تمييز المستعمرات التي تحتوي على البلازميدات الهجينة من غير الهجينة بعد إدخال هذه البلازميدات في مضائف مناسبة . وعلى أية حال تبقى عملية استخدام هذه النواقل في بناء مكتبات وراثية اقل قيمة من استخدام البلازميدات ذات الغرس التثبيطي .

## اختيار العاثيات كنواقل

تعتبر العاثيات من أكثر النواقل استخداماً في بناء مكتبات المورثات بسبب قدرتها الاستيعابية المعقولة ووجود العديد من المواقع المفردة الخاصة بالأنزيمات القاطعة مما يعطي حرية في اختيار الأنزيم اللازم لقطع الجينات . هذا إضافة لوجود مميزات أخرى عديدة . فلو أفترضنا أن حجم قطع الحامض النووي التي تم عزلها في المرحلة الأولى يتراوح ما بين 20 إلى 37 كيلو قاعدة فأنه عندئذ يصبح خيار العاثيات هو الأفضل في الكلونة . تقع العاثيات المستخدمة كنواقل في مجموعتين مماثلة لتلك الموجودة في البلازميدات . فهناك عاثيات غرس تثبيطي وأخرى ذات صفة أنتقائية مفردة .

ففي حالة استخدام ناقل غرس تثبيطي مثل الناقل لامبدا CI فأن قطع الحامض النووي الناتجة عن الهضم بأنزيم Eco R1 ستلتحم بين جنبات المورث CI المفتوح بواسطة الأنزيم السابق وهذا ما يؤدي إلى إتلاف المورث CI المسؤول عن تعكر لون المستعمرات ويجعلها غير رائقة . لذلك فأنه عند إدخال العاثيات الهجينة في مضائف فأنه يصبح من السهولة تمييز المستعمرات الهجينة من غير الهجينة .

أما في حالة استخدام عاثيات ذات صفة انتقائية مفردة مثل العاثي لامبدا $SP^+$ فان التحام قطعة الحامض النووي مع هذا العاثي يؤدي الى تحوله الى عاثي $SP^-$ له القدرة على أصابة بكتيريا القولون E. coli المحتوية على البلازميد الاندماجي P2 . لذلك فأنه عند إدخال هذه العاثيات لهذه السلالة من البكتيريا فأن العاثيات الهجينة ($Sp^-$) فقط ستصيب البكتريا بينما تفشل العاثيات غير الهجينة $SP^+$ من

ذلك . كما يمكن إجراء تجارب الكلونة مع نوع ثالث من مشتقات العاثيات وهي العاثيات الاحلالية حيث تتميز هذه العاثيات بفقدانها لمنطقة مركزية من مجينها لذلك فأنها تكون غير نشطة وغير قادرة على إصابة بكتريا القولون . ولكن في حالة التحام قطعة حامض نووي مساوية للمنطقة المفقودة مع أذرع هذا العاثي فأنها ستستعيد نشاطه . وعند ادخاله في المضائف فأنه يمكن الحصول بكل سهولة على العاثيات الهجينة من خلال تحلل المستعمرات البكتيرية المصابة به فقط .

وإضافة إلى ما سبق من الأمثلة على استخدام العاثيات فأنه هناك المزيد منها في الفصل الخاص بالنواقل المستخدمة في الهندسة الوراثية .

## اختيار الكوزميدات كنواقل

الكوزميدات كما ذكرنا سابقاً هي جزيئات هجينة مؤلفة من حامض نووي عاثٍ وآخر بلازميدي . وتسلك عند إدخالها إلى المضائف كبلازميدات .

ترجع قابليتها للاستخدام في أعمال الهندسة الوراثية لبناء مكتبات وراثية إلى احتوائها على الموقع cos الذي يعطي نهايات لزجة عند فتحها بالأنزيم القاطع المناسب . تتميز الكوزميدات بعدم قدرتها على النمو وإصابة الخلايا في حالتها قبل إجراء الكلونة لها . لذلك فأنه عند لحام قطع حامض نووي كبيرة الحجم في الموقع cos وإدخال الهجائن إلى المضائف وتنميتها على وسط غذائي انتقائي (مثلا الأمبسلين في حالة استخدام الكلوزميدات Pj88 الذي يحتوي على مورث مقاومة الامبسلين) فأن جميع البكتيريا المحتوية على الكوزميدات الهجينة ستنمو بينما تفشل المضائف التي لم يتم إدخال الهجائن فيها .

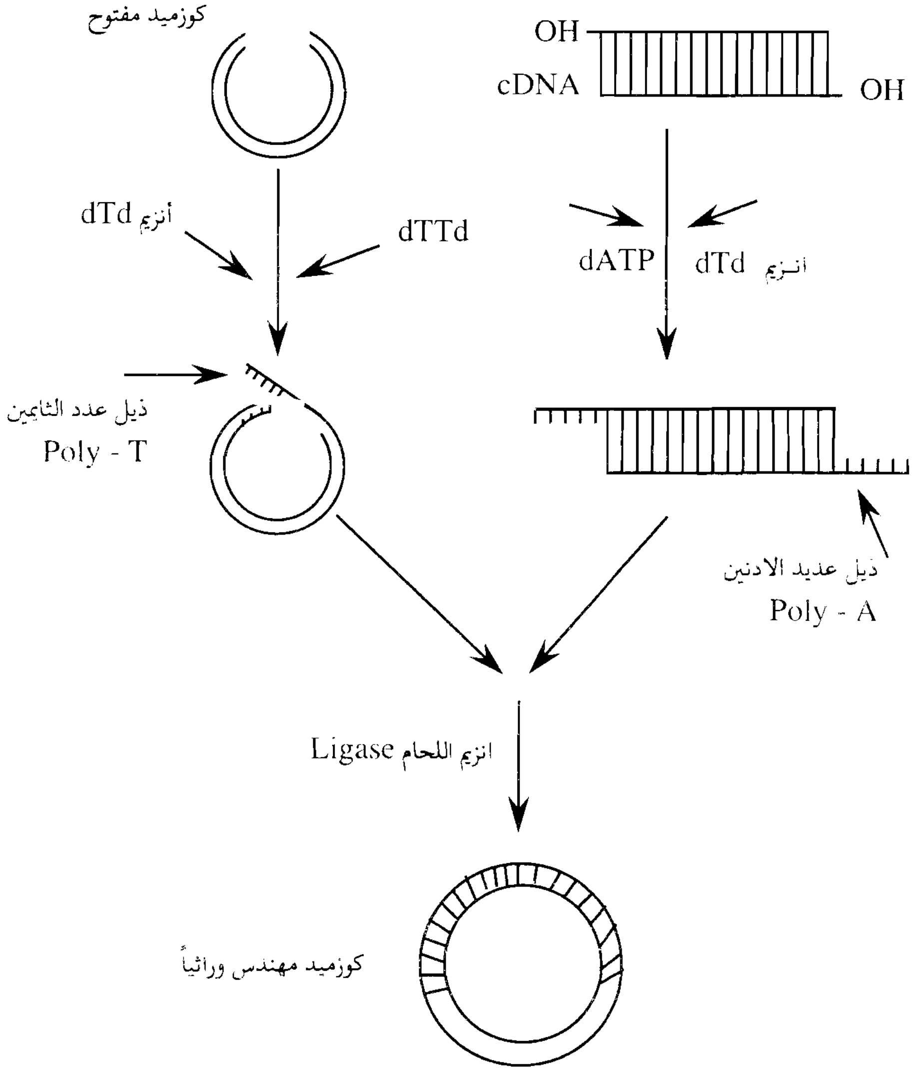
تعتبر الكوزميدات مثالية تماماً عن استخدام قطع حامض نووي يزيد حجمها عن 30 كيلو قاعدة ،كما أنها الناقل المناسب عند استخدام الحامض النووي المتمم cDNA . ونظراً لأن قطع الحامض النووي المتمم مستوية النهايات فأنه لا بد من تحويرها لجعلها مناسبة للالتصاق مع الكوزميد .يتم ذلك عن طريق إضافة ذيل من عديد الادنين أو الجوانين أو السايتوسين أو الثايمين بواسطة الأنزيم dTd الذي سبق

الحديث عنه في فصل الأنزيمات . يستخدم هذا الأنزيم النهاية الهيدروكسيلية الحرة في نهايتي قطع الحامض النووي المتمم لإضافة النيوكليوتيدات . كما يستخدم نفس الأنزيم السابق لاضافة ذيل متعدد متكامل للكوزميد بعد فتحه بالأنزيم القاطع المناسب . بعد الحصول على النهايات اللزجة اللازمة لكل من قطع الحامض النووي المتمم والبلازميد يتم هندسة هذه القطع مع الكوزميد باستخدام انزيم اللحام ثم يتم إدخال الهجائن الى مضيف مناسب (الشكل 8-9) .

**ثالثاً: إدخال النواقل المهندسة وراثياً إلى المضائف (البكتيريا):**

في الخطوات السابقة تم تهيئة النواقل المهندسة وراثياً مع قطع الحامض النووي DNA المرغوب فيها . أما في هذه الخطوة فيتم إدخال جزيئات النواقل المكلونة إلى البكتيريا التي تمثل خلايا المضيف . تؤدي عملية إدخال نواتج الهندسة الوراثية من النواقل الهجينة إلى البكتريا إلى تحقيق عدة أهداف . أول هذه الأهداف هو لمعرفة كفاءة الهندسة الوراثية وكذلك لمعرفة حجم مكتبة المورثات التي تم بناؤها . ولذلك أهمية كبيرة في تقييم استراتيجية الكلونة المستخدمة ومدى الاستفادة من المكتبة الوراثية . فكلما زادت سعة المكتبة الوراثية زادت أهميتها وزادت احتمالية تمثيلها لمعظم مورثات المجين والعكس صحيح . وعلى الرغم من أن هذا الهدف يرتبط أصلاً بنوع الهدف الذي من أجله تم بناء المكتبة الوراثية فأن سعة المكتبة الوراثية تصبح أقل أهمية في حالة أن هدف بنائها هو لأجل دراسات تطورية وإيجاد علاقات القرابة وما إليها من دراسات .

وكذلك في حالة استخدام الحامض النووي المتمم في الهندسة . ذلك أن دراسات التطور والقرابة لا تستهدف سوى الحصول على قطعة واحدة أو عدة قطع عشوائية من الحامض النووي لأجل استخدامها كمجس أو مجسات لايجاد مثل هذه العلاقات . كما أن نسبة تمثيل مورثات معينة نشيطة في المكتبات الوراثية التي تستخدم فيها نواقل هجينة مع حامض نووي متمم يكون عالياً حتى في المكتبات ذات الحجم البسيط .




**(الشكل 8-9) : ستراتيجية استخدام الحامض النووي المتمم cDNA والكوزميد لبناء مكتبة مورثات**

أما الهدف الثاني هو لأجل تضخيم قطع الحامض النووي المهندسة مع النواقل . إن معظم نواقل الهندسة الوراثية المستخدمة لها قابلية ذاتية على التضاعف المستقل عن المضيف . وتعتمد معظم هذه النواقل على أنزيمات المضيف في ذلك . لهذا فأن إدخال النواقل الهجينة إلى المضائف سوف يتيح فرصة تضاعف هذه النواقل داخل خلايا المضائف وبالتالي فأنه تبعاً لذلك تتم مضاعفة قطع الحامض النووي المهندسة مع النواقل .

إن تركيز قطع الحامض النووي المستخدمة في عملية الكلونة يكون عادة قليل ولا يزيد في أفضل حالات الكلونة عن 50 نانوجراماً . ويمكن تضخيم هذه الكمية داخل المضيف لتصل إلى أكثر من مايكروجرام . وعند استخدام طرق تربية جيدة كما في حالة استخدام المرق المغذي المقوى بالكورومفينيكول فأنه يمكن الحصول على كمية أكبر تصل إلى مليجرام .

الهدف الثالث هو التنقية . إذ أن عملية الكلونة تؤدي إلى الحصول على أنواع مختلفة من جزيئات الناقل . فبعض النواقل مهجنة بقطع حامض نووي في وضع صحيح وهي المطلوبة في المكتبة الوراثية والبعض الآخر مهجن بقطع حامض نووي في وضع غير صحيح . هذا إضافة إلى وجود قطع حامض نووي حرة لم تتمكن من الالتحام مع جزيئات الناقل وكذلك وجود نواقل التحمت أذرعها مع بعضها دون أن تتمكن من الحصول على قطعة حامض نووي لتهجينها . لذلك فأن إدخال النواقل إلى المضائف سوف يسمح لنا بالتخلص من جميع أو معظم الجزيئات غير المرغوب فيها . وتساعدنا طرق انتقاء الهجائن في ذلك كثيراً وحسب نوع الناقل المستخدم .

إن المضائف التي تستخدم هنا هي ليست المضائف النهائية لعملية الهندسة الوراثية بل هي مضائف تستخدم للتأكد من نجاح بناء المكتبة الوراثية وكذلك من أجل تحقيق الأهداف التي تم الحديث عنها .

هناك عدة طرق لإدخال النواقل الهجينة إلى بكتيريا القولون* وأهم هذه الطرق هي التحول Transformation والتعبئة خارج الخلايا Invitro Packaging .

---

* تعتبر بكتريا القولون E.coli بسلالاتها المختلفة من أشهر وأفضل المضائف المستخدمة في تنمية هجائن المكتبات الوراثية وتستخدم في اكثر من 95 ٪ من المكتبات الوراثية التي انشئت لحد الآن .

## التحول *Transformation*

إن معظم الأنواع البكتيرية لها القابلية على استقبال جزيئات الحامض النووي الموجودة في وسطها الغذائي ولكنها تعمل على تحليل هذه الجزيئات بواسطة أنزيماتها المحطمة إلى نواتج مختلفة . يحصل في بعض الأحيان ان بعض جزيئات الحامض النووي هذه تنجح بالنجاة من التحطم . أذ تتعامل الخلايا البكتيرية مع مثل هذه الجزيئات على أنها جزيئات ذاتيه . إن مثل هذه الجزيئات تكون على هيئة قطع حامض نووي ذات أصل تضاعفي مشابه لما هو في البكتيريا . لذلك فأن هذه القطع ستتمكن من الالتحام مع DNA المضيف أو تعيش وتتضاعف داخل الخلايا إذا كانت على هيئة بلازميدات دون أن تحللها الأنزيمات القاطعة البكتيرية . وبطبيعة الحال فأن مثل هذه الأنواع ستكتسب صفات جديدة نتيجة وجود البلازميد . وعلى ذلك فأن هناك أنواعاً مختلفة من البكتيريا لها القدرة الطبيعية على التحول واستقبال البلازميدات أو قطع حامض نووي .

إن أول الملاحظات التي سجلت حول التحول في البكتيريا كان في عام 1928 من قبل جرفت Griffith وعام 1931 من قبل دواسن وسيا Dawson & Sia على كرويات ذات الرئة Diplococcus و Streptococus. استخدم هؤلاء الباحثون سلالتين من هذه البكتيريا هي سلالة (R) غير المرضية وسلالة(S) المرضية . قام الباحثون بقتل بكتيريا ذات الرئة المرضية (السلالة S) عن طريق الحرارة العالية ثم خلطوا رماد هذه البكتيريا مع البكتيريا الحية من السلالة غير المرضية (R) ثم حقنوها في الفئران ولاحظوا بعد ذلك إصابة حيوانات التجربة بذات الرئة ، وعندما عزلوا البكتيريا من الفئران المصابة وجدو أنها من السلالة (S) . استنتجوا من ذلك بأن السلالة غيرالمرضية (R) تحولت إلى السلالة المرضية(S)بعد خلطها مع رماد السلالة (S) . ولم تستطع هذه التجارب تقديم تفسير حول دور الحامض النووي DNA في التحول إلا أنّ تجارب لاحقة أثبتت هذه الحقيقة .

توالت بعد هذه التجارب النتائج التي تؤكد حصول التحول في أنواع عديدة من البكتيريا ، وتعتبر الآن أنواع مختلفة من البكتيريا التي تنتمي للأجناس البكتيريا

من Neisseria, Moraxella, Haemophilus ، Streptococcus, Bacillus البكتيريا المتحولة طبيعياً . كما سجلت العديد من الأنواع البكتيرية التي ليس لها القابلية على التحول مثل بكتيريا القولون E.coli . هذا إضافة إلى ان قابلية التحول في المجموعة الأولى ضعيفة جداً . كما ان بعض الأنواع ذات القدرة على التحول الطبيعي تفشل في التحول عند استخدام حامض نووي حلقي مثل DNA البلازميدات أو العاثيات . لذلك فقد جرت العديد من المحاولات لأجل تحويل البكتريا غير المتحولة طبيعياً . وعلى الرغم من فشل معظم هذه المحاولات لاصطدامها بالنشاط الحاد للأنزيمات القاطعة وغير ذلك إلا أنه في عام 1970 نجح العالمان ماندل وهيغا Madel & Higa في ايجاد طريقة لتحقيقه ذلك . تلتها بعد ذلك محاولات ناجحة عديدة استخدمت نفس الأساس في طريقة التحول للعالمان ماندل وهيغا مع بعض التحويرات لزيادة كفاءة التحول .

استخدم ماندل وهيغا محلول كلوريد الكالسيوم Cacl2 المثلج عيارية O.1 مولاري في معاملة خلايا بكتيريا القولون E.coli لعدة دقائق لجعلها قادرة على استقبال أجزاء من الحامض النووي العاثي لامبدا . كما نجحا باستخدام نفس الطريقة في ادخال بلازميد PBR322 إلى نفس البكتيريا .وقد تم تحوير هذه الطريقة مراراً لزيادة كفاءة التحول حتى أصبح الآن بالإمكان الحصول على كفاءة تحول عالية تصل إلى أكثر من $10^7$ خلية/مايكروجرام من الحامض النوويDNA .

تستخدم طريقة التحول كثيراً في إدخال البلازميدات الهجينة المستخدمة في بناء مكتبات المورثات إلى المضائف البكتيرية . يتم في هذه الطريقة تأهيل البكتيريا التي لا يزيد عمرها عن 24 ساعة . بمعاملتها بمحلول كلوريد المغنيسيوم المثلج عيارية O.1مولاري لمدة خمس دقائق . تصفى البكتيريا بعد ذلك بالطرد المركزي وتعامل مع محلول كلوريد الكالسيوم المثلج عياريه O.1 مولاري لمدة عشرين دقيقة . يتم بعدها حساب حيوية الخلايا المؤهلة Competent Cells Viability بزراعة كمية معلومة لعدة تخافيف على وسط زرعي صلب وحساب عدد المستعمرات في تخفيف معين .

تمزج كمية معروفة من الخلايا المؤهلة مع محلول الناقل الهجين 10-20 نانوجراماً من الناقل) ويترك المزيج في الثلج لمدة نصف ساعة . ينقل المزيج بعدها لحمام مائي بدرجة حرارة 42 لمدة دقيقتين ثم يعاد إلى الثلج مرة أخرى لعدة دقائق .يؤخذ حجم معين من محلول البكتيريا المتحولة Transformed ويحضر منه عدة تخفيفات $10^{-1}$-10-$10^{-10}$ . تزرع كمية محددة من ثلاثة تخافيف وسطية على وسط غذائي صلب انتقائي وتحضن بدرجة حرارة مناسبة لمدة 24-48 ساعة . تحسب بعدها كفاءة التحول كما في حالة حساب حيوية الخلايا . إن آلية تأثير المحاليل الملحية على تأهيل الخلايا البكتيرية غير معروف لحد الآن . إلا أنه يعتقد أن هذه الاملاح تؤدي بطريقة ما الى زيادة نفاذية جدران الخلايا البكتيرية أو زيادة كفاءة بروتينات الغشاء الناقلة . كما أن استخدام درجة حرارة عالية 42مْ بعد تبريد الخلايا هو لإحداث صدمة فسلجية في الغشاء تؤدي إلى زيادة استقبال الخلايا للبلازميدات . كما تستخدم هذه الطريقة أيضاً لإدخال النواقل الهجينة للعاثي لامبدا .

إذ يمثل مجين العاثي لامبدا بهيئة حلقة مزدوجة دائرية مشابهة لما هو في البلازميدات . تبدأ العاثيات بالتضاعف داخل خلايا المضيف وتعمل في نهاية الأمر إلى تحليل مستعمرات البكتيريا المضيفة منتجة بقع رائقة تمثل مستعمراتها . وعلى الرغم من أهمية استخدام مجين العاثي في بناء مكتبات المورثات إلا أن كفاءتها قليلة ولا تتعدى في أفضل الأحوال 10 بقعة/ مايكروجراماً من الحامض النووي العاثي مما يجعلها غير ملائمة لبناء المكتبات الوراثية للأحياء الراقية التي تتطلب كفاءة لا تقل عن $10^7$ .

## التعبئة خارج الخلايا *Invitro Packaging*

نظراً لأهمية العاثي لامبدا في الهندسة الوراثية فقد اتجهت أنظار الباحثين لأجل زيادة كفاءة تحوله . وانتهت هذه التجارب بتوفير الطريقة التي يطلق عليها الآن بالتعبئة خارج الخلايا . اذ نجح هون وموراي Hohn & Murray عام 1977 بإطلاقها . تمكن هذان الباحثان في الحصول على سلالتين من عاثيات لامبدا ذات

طفرات وراثية في المورثات D.E حيث تفشل السلالة الأولى (طفرة E) في تصنيع البروتين E الذي يمثل بروتين تصنيع الرؤوس الأولية للعاثي بينما تفشل السلالة الثانية (الطفرة D) في تصنيع البروتين D الذي يقوم بغلق الرؤوس الأولية بعد دخول جزيئات الحامض النووي إليها . ونتيجة لهذه الطفرات فأنهما لا يتمكنا من إنتاج عاثيات ناضجة داخل بكتيريا المضيف (بكتيريا القولون E.cloli) .

قام الباحثان باستخلاص البروتينات التي تنتجها هاتان السلالتان كل على انفراد .ثم تمكنوا بعد ذلك من إنتاج عاثيات ناضجة خارج الخلايا بعد مزج جزيئات حامض نووي عاثٍ مع البروتينات المستخلصة .

وتتوفر الان سلالتان من بكتيريا القولون E.cloli تحتوي كل منهما على سلالة طافرة من العاثي لامبدا تدعى سلالة البكتريا الأولى E.cloli BHB 2688 وتحتوي على العاثي الطافر في المورث E و السلالة E.coli BHB 2690 التي تحتوي على العاثي الطافر في المورثD . كما تتوفر مستخلصات بروتينات هذه العاثيات بهيئة عبوتين تجاريتين هما Sonic extracts و Freeze-Thaw extracts .

تختلف هذه الطريقة عن التحول باستخدام مجين العاثي لامبدا(الذي سبق الحديث عنه في طريقة التحول) في أنه تمت تهيئة العاثيات الناضجة خارج الخلايا بينما تقوم خلايا البكتريا بهذه المهمة عند ادخال مجينات العائيات الهجينة بطريقة التحول .

## استخدام العبوات التجارية في التعبئة خارج الخلايا

كما ذكرنا سابقاً فأن بروتينات العاثي لامبدا يمكن تجهيزها كمستحضرات تجارية على هيئة عبوتين إحداهما Freeze / Thaw extracts تمثل الرؤوس الأولية للعاثي والعبوة الثانية Sonic extracts تمثل البروتينات الأخرى وتحفظ عادة بدرجة انجماد 70° -م . فلو افترضنا أن الناقل الهجين المستخدم في الهندسة الوراثية هو العاثي EMBL4 وهو جاهز للتعبئة خارج الخلايا عندئذ تذاب عبوتا الخلاصات البروتينية بوضعها بين أصابع اليد حتى بداية ذوبانهما ثم توضعان في كأس ثلج .

ينقل 4 مايكروليترات من محلول العاثي الهجين EMB L4 إلى عبوة Freeze/ Thaw ثم يضاف إلى هذا المزيج 15 مايكروليتراً من عبوة Sonic extracts . يخلط المزيج جيداً بالطرد المركزي لعدة ثوان ثم يحضن بدرجة حرارة 22م لمدة ساعتين . ويذكر أنه يجب إتمام عملية التعبئة بأسرع مايمكن للحصول على كفاءة عالية جداً (2-4 دقائق) . بعد الحضانة يؤخذ 10مايكروليترات من مزيج التعبئة وتحضر منه سلسلة تخافيف $10^{-1}$ - $10^{-5}$ . يؤخذ200 مايكروليتر من كل تخفيف بصورة مستقلة ويخلط مع 200 مايكروليتر من محلول البكتيريا E.cloli P2392 (عمر 24 ساعة) وتعاد عملية الخلط . يحضن مزيج العاثيات والبكتيريا لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة 37ْم ثم تزرع البكتيريا المصابة بالعاثيات على أوساط غذائية صلبة ويستخدم ثلاثة أطباق لكل تخفيف .

إن عملية التعبئة خارج الخلايا لا تكون ناجحة تماماً حتى ولو أجريت من قبل خبير بمثل هذه العملية وذلك لعدم نقاوة المستخلصات البروتينية المستخدمة في هذه العملية . لذلك فأنه لأجل الحصول على أعلى كفاءة يجب الإسراع تماماً في إجراء عملية التعبئة . إذ أن ارتفاع درجة حرارة المستخلصات إلى أكثر من 5 م لدقائق قليلة جداً يؤدي إلى تثبيط عمل البروتينات وبالتالي تفشل عملية التعبئة برمتها .

إن العاثي EMBL4 المستخدم في التعبئة خارج الخلايا هو مزيج من العاثيات الهجينة التي نجحت في الحصول على قطع حامض نووي من المجين المطلوب بناء مكتبة وراثية له وأخرى التحمت أذرعها مع بعضها وفشلت في الكلونة .

لذلك فإن استخدام سلالتين من بكتريا القولون P2393 و Q358 تمكننا من معرفة كفاءة الكلونة وكذلك حساب عيارية المكتبة Library titer . إذ أن العاثيات الهجينة الناضجة فقط هي التي ستنجح في التضاعف داخل السلالة P2392 بينما تتمكن كلا من العاثيات الهجينة وغير الهجينة الناضجة من إصابة السلالة Q358 .

ومن خلال حساب عدد البقع الرائقة لكل منهما فأننا سنتمكن من معرفة كفاءة الهندسة الوراثية للعاثي وكذلك معرفة عيارية المكتبة .

وتستخدم البقع الرائقة النامية من السلالة P2392 لتجميع مادة المكتبة الوراثية حيث أن هذه البقع تمثل فقط العاثيات الهجينة المطلوبة للمكتبة .

أن طريقتي التحول والتعبئة خارج الخلايا تعتبر مناسبة جداً في حالة استخدام بكتيريا القولون E.coli كمضائف . لكن هذه الطرق قد لا تناسب بكتريا أو مضائف أخرى . لذلك فأنه يتم اللجوء إلى طرق إدخال أخرى مثل طريقة تحول البروتوبلاست والحقن الجهري Microinjection . ونظراً لصعوبة هاتين الطريقتين فأنها لا تستخدم عند الإعداد لبناء مكتبة المورثات ولكن يمكن استخدامها في المراحل المتقدمة في الهندسة الوراثية .

## حساب عدد الكلونات الممثلة في مكتبة المورثات

تعطي عملية حساب عدد الكلونات الممثلة في المكتبة صورة عن سعة المكتبة ومدى تمثيلها لمعظم مورثات مجين الكائن الحي الذي بُنيت من مادته الوراثية المكتبة . وتستخدم في طريقة الحساب هذه طريقة كلارك وكاربون 1976 وحسب المعادلة التالية :

$$N=\frac{\text{In }(1\text{-}P)}{\text{In }(I\text{-}n)}$$

حيث إن :

N= عدد الكلونات التي يجب اختيارها لتمثيل معظم مورثات الجين في المكتبة .

n= نسبة حجم قطع الحامض النووي المهندسة وراثياً الى مجين الكائن .

p= احتمالية وجود أي مورث في المكتبة .

فمثلاً يبلغ حجم الجين البشري $3 \text{X} 10^9$ كيلو قاعدة (Kb) فلو أفترضنا أن حجم القطع المهندسة وراثياً هو 20 كيلو قاعدة.

فإن n عندئذ تساوي :

$$n = \frac{20}{10^9 X 3} = 1.4 X 10^8$$

فأذا كانت الاحتمالية المطلوبة هي 95٪ فأن قيمة N تساوي :

$$N = \frac{In (1-0.95)}{In (1-1.4 X10^8)} = 4.2 X 10^8$$

وهذا يعني وجوب اختيار $X4.2\ 10^8$ كلون لأجل الحصول على احتمال 95٪ بوجود المورث المطلوب في المكتبة .

وكلما زادت درجة الاحتمال زادت أحتمالية العثور على المورث .

وبمقارنة قيمة (N) مع سعة المكتبة الوراثية والتي تم حسابها سابقاً فأننا نستطيع أن نعرف حجم المكتبة الوراثية التي تم بناؤها وكذلك أهميتها وفائدتها لأغراض الهندسة الوراثية . إذ أنه كلما قلت سعة المكتبة عن قيمة (N) انخفضت قيمتها لعدم تمثيلها لمعظم مورثات الجين والعكس صحيح .

# 9

# عزل المورثات

**مقدمة**

**عزل المورثات بالانتخاب المباشر**

**عزل المورثات من مكتبة المورثات**

**أولاً- عزل المورثات بأستخدام مجس حامض نووي**

- عزل مورث معين من مكتبة cDNA

-عزل مورث معين باستخدام مجس قصير التردد

-عزل مورث معين باستخدام مجس من مورث نظير

-عزل مورث ينتمي إلى عائلة

**ثانياً- عزل المورثات باستخدام مجس مناعي**

-العزل المناعي للمورثات

**تشخيص المورثات المعزولة من مكتبة المورثات**

-الترجمة خارج الخلايا

-ترجمة الهجين الحر

-ترجمة الهجين المعزول

## مقدمة

إن استخلاص الحامض النووي DNA من خلايا معينة وتقطيعه بالأنزيمات القاطعة وهندسة القطع الناتجة بنواقل معينة لاتستهدف سوى الحصول على قطعة حامض نووي صغيرة تمثل مورثاً معيناً مطلوباً لأجل تطبيقات الهندسة الوراثية. لذلك فأن عملية بناء مكتبة مورثات ليست هدفاً بحد ذاتها ولكنها الوسيلة التي سيتم من خلالها الحصول على قطعة الحامض النووي التي تمثل المورث المطلوب. لذلك فأنه في سبيل الوصول إلى هذه الغاية فأنه يتطلب منا العمل الشاق لأجل تصفية الالاف من النواقل المهندسة وراثياً الممثلة في مكتبة المورثات حتى العثور على الناقل الهجين ذي المورث المطلوب.

وعلى الرغم من الأهمية الكبيرة لمكتبة المورثات في عزل مورث معين إلا أنها ليست الطريقة الوحيدة لبلوغ ذلك الهدف. اذ يمكن استخدام ما يدعى بطريقة الانتخاب المباشر Direct selection في عزل المورثات أيضاً.

إن طريقة الانتخاب المباشر طريقة محدودة ولا تستخدم إلا في نطاق ضيق ولكنها ناجحة جداً وسريعة في هذا المدى. سيتم في هذا الفصل الحديث عن تفاصيل استخدام طريقة الانتخاب المباشر ومكتبة المورثات في عزل المورثات.

## عزل المورثات بالانتخاب المباشر

الانتخاب المباشر طريقة يتم فيها هندسة قطع حامض نووي DNA لكائن معين في جزيئات ناقل معين بحيث تتوفر بعد الانتهاء من عمليات الهندسة جزيئات معينة من الناقل تحمل المورث المطلوب عزله. ويمكن تمييز النواقل الهجينة ذات المورث المطلوب بعد تنمية مضائف الناقل على وسط غذائي انتخابي بحيث لا تنمو عليه سوى الخلايا التي تحتوي على النواقل الهجينة مع المورث المطلوب.

يتم بعد ذلك عزل المستعمرة المطلوبة وتكثيرها ثم يستخلص الناقل منها ويتم عزل المورث المطلوب بعد تقطيع الناقل بأنزيم قاطع مناسب.

ولأجل توضيح طريقة الانتخاب المباشر اكثر فأننا سنأخذ مثالين لأجل عزل مورث مقاومة الكنامايسين من بلازميد R6.5 والمورث trp A(المشفر لانزيم Tryptophan synthetase) من بكتريا القولون E.coli .

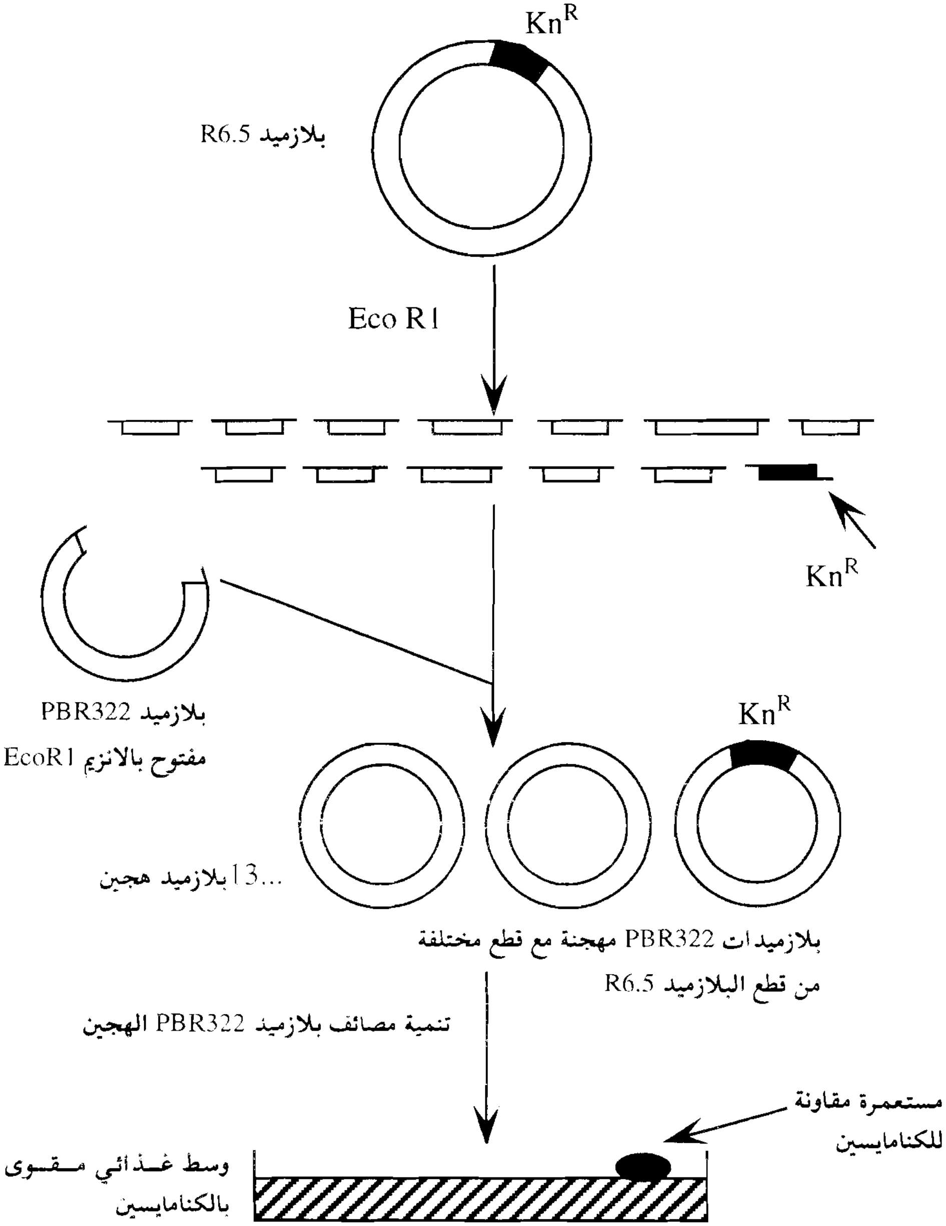
لغرض عزل مورث مقاومة الكنامايسين فأنه يتم أولاً تقطيع البلازميدR6.5 بواسطة الأنزيم القاطع Eco R1 حيث يؤدي استخدام هذا الأنزيم إلى إنتاج ثلاث عشرة قطعة إحداها تمثل مورث مقاومة الكنامايسين . يتم لحام هذه القطع مع ناقل مناسب مثل البلازميد PBR322 ثم يتم إدخال جزيئات الناقل الهجين إلى بكتيريا القولون بطريقة التحول التي سبق الحديث عنها .

تنمى البكتيريا على وسط غذائي مقوى بالمضاد الحيوي كنامايسين حيث تفشل البكتيريا التي تحمل جزيئات ناقل هجين من النمو باستثناء تلك التي تحتوي على ناقل هجين مع مورث مقاومة الكنامايسين . وهكذا وبكل سهولة يتم عزل الناقل المرغوب والذي يحتوي على المورث المستهدف (الشكل 1-9) . ويمكن استخدام هذه الطريقة في عزل مورثات مقاومة المضادات الحيوية أو المورثات التي يمكن تشخيصها وعزلها باستخدام أوساط غذائية انتخابية .

أما في حالة عزل مورث trp A من بكتريا القولون فأنه يتم أولاً استخلاص الحامض النووي البكتيري ومعاملته بأنزيم معين مثل الأنزيم Eco R1 مثلاً لتقطيعه إلى قطع مختلفة الأطوال ثم تتم هندسة هذه القطع مع ناقل مناسب مثل البلازميد PBR 322 .

يتم إدخال النواقل الهجينة بطريقة التحول إلى بكتيريا القولون ذات عوز للأنزيم trpA ويطلق على مثل هذه السلالة من البكتيريا $trp\ A^-$ E.coli .

بسبب ووجود طفرة وراثية في المورث trp A لهذه السلالة فأنها تنتج أنزيم تربتوفان سنشيز غير نشط وغير فعال ولا تتمكن تبعاً لذلك من تصنيع التربتوفان . لذلك فأنها تموت عند تنميتها على وسط غذائي خال من التربتوفان (Minimal medium) .




(شكل 1-9): عزل مورث مقاومة الكنامايسين من بلازميد R6.5 بطريقة الانتخاب المباشر

تنمى بكتريا القولون trp A المتحوله بالنواقل الهجينة على وسط غذائي خالٍ من التربتوفان حيث تفشل خلايا البكتريا من النمو باستثناء تلك التي أستلمت ناقلٌ هجين بالمورث trp A (الشكل 9-2) .

لا يقتصر استخدام طريقة الانتخاب المباشر على عزل المورثات المشفرة للأنزيمات الايضية أو مقاومة المضادات الحيوية من بكتيريا القولون ولكن تستخدم أيضاً في عزل مثل هذه المورثات من الخمائر والفطريات الخيطية .

## عزل المورثات من مكتبة المورثات

تختلف طريقة عزل المورثات من مكتبة مورثات عن طريقة الانتخاب المباشر .

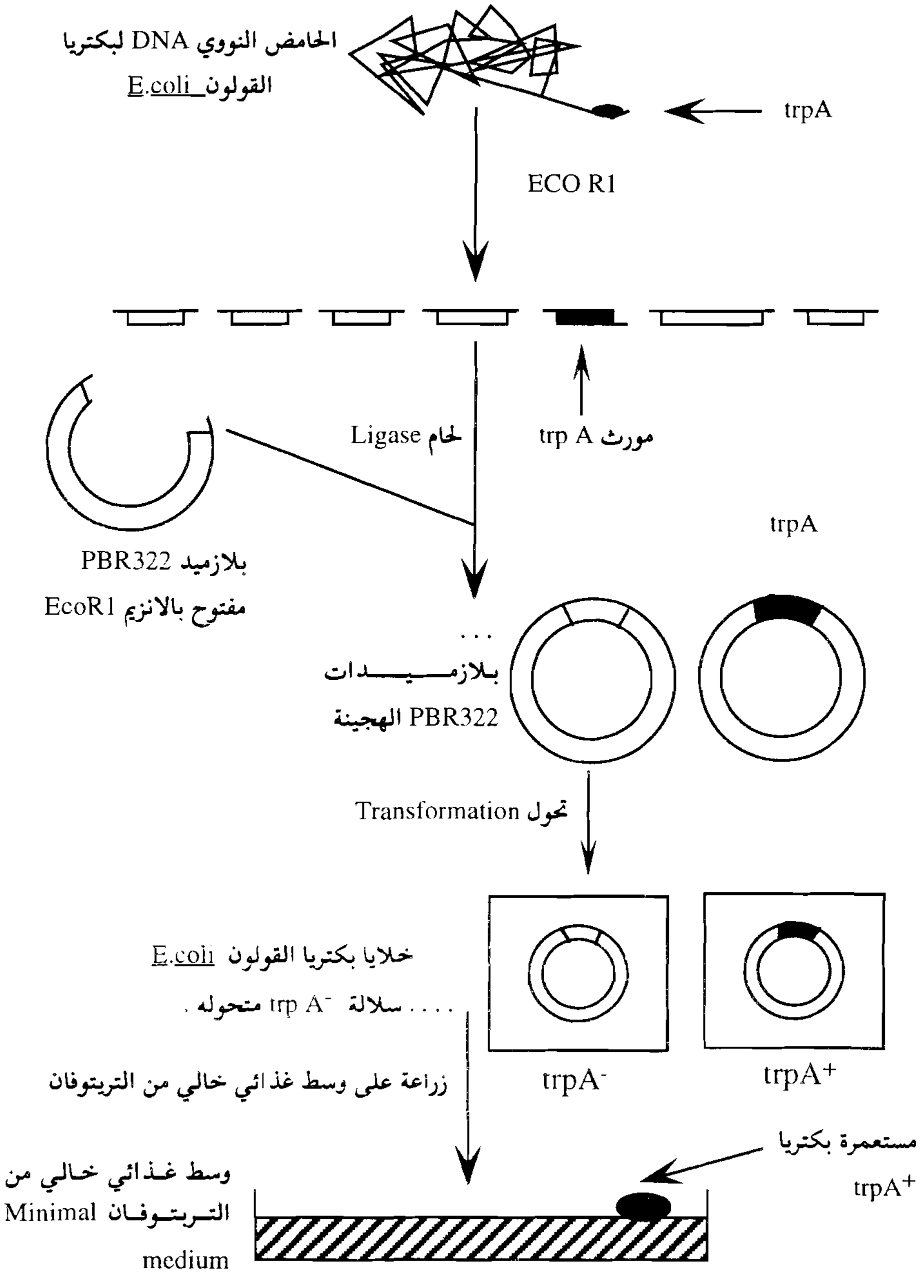
**إذ أن الطريقة الأولى** : محدودة جداً مقارنة باستخدام مكتبة المورثات لعزل عدد كبير جداً من المورثات منها . هذا إضافة إلى تنوع أهداف بناء مكتبة المورثات .

إن هناك عدة طرق لعزل مورثات مختلفة من مكتبة المورثات تبعاً لطبيعة الهدف من بنائها . ومن هذه الطرق ما يعتمد على استخدام مجس حامض نووي أو صناعي أو بروتيني وسنتناول جميع هذه الطرق في هذا الجزء .

### أولاً: عزل المورثات باستخدام مجس حامض نووي

من المعروف أن كل زوج من أشرطة الحامض النووي المفردة لها القدرة على الأرتباط تحت ظروف معينة لإنتاج مزدوج حامض نووي .

يعتمد استقرار مزدوج أشرطة الحامض النووي على عدد الاتحادات التي تحصل بين أزواج القواعد النتروجينية الموجودة في نيوكليوتيدات كل منهما . فكلما زادت عدد الاتحادات زاد استقرار الشريط المزدوج والعكس صحيح . يعتمد عدد الاتحادات هذه على تكامل النيوكليوتيدات في هذه الأشرطة . فزيادة نسبة التكامل بين هذه النيوكليوتيدات يؤدي الى زيادة استقرار مزدوج الحامض النووي كنتيجة بديهية .




(الشكل 9-2): عزل مورث trp A من بكتريا القولون E.coli بطريقة الانتخاب المباشر

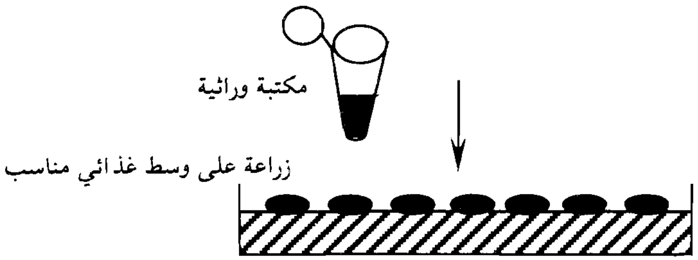
وما ينطبق على مزدوج الحامض النووي DNA يمكن أن ينطبق أيضاً على هجين الأحماض النووية RNA-DNA .

لذلك فأن هذه الطريقة تعتمد على استخدام مجس مؤلف من أشرطة حامض نووي مفردة موسمة بالنظائر المشعة ذات تردد جزئي أو كلي متمم لترددات أشرطة المورث المطلوب عزله . التقنية حول هذه الطريقة موضحة بشكل مفصل في فصل تهجين الحامض النووي . بشكل عام فأن الطريقة تتطلب تنمية مضائف نواقل المكتبة الوراثية على وسط غذائي مناسب . تنقل بعدها مستعمرات البكتيريا أو العاثيات إلى ورق نتروسليلوز أو نايلون بطريقة طبع المستعمرات ثم تعامل هذه الأوراق مع قاعدة كيميائية لفصل أشرطة الحامض النووي للنواقل الهجينة ثم يثبت الحامض النووي جيداً على الورق عن طريق تعريضه لدرجة حرارة 80م مع تفريغ للهواء باستخدام مضخة خاصة لذلك . تصبح الأوراق بعدها جاهزة لعملية التهجين .تعامل الأوراق الحاملة للأحماض النووية بمحلول التهجين الذي يحتوي على المجس المناسب الموسم بالنظير المشع لفترة 18-24 ساعة بدرجة حرارة مناسبة (يستخدم لذلك حمام مائي هزاز) . تغسل بعدها الأوراق بمحاليل الغسيل لإزالة المواد المشعة الزائدة .

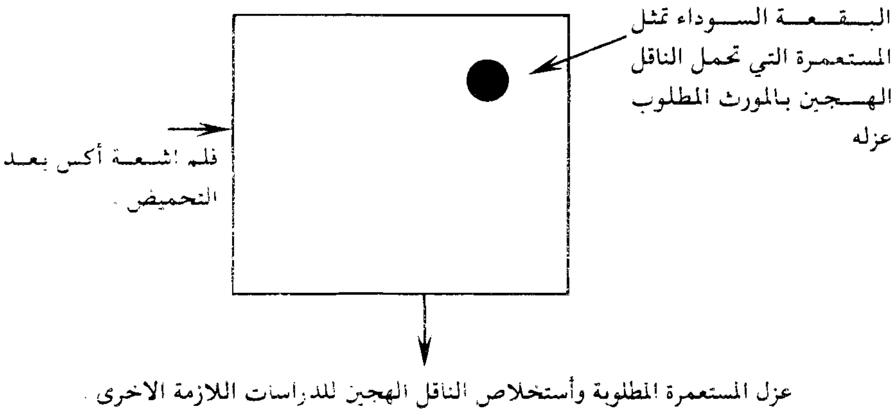
تجفف الأوراق من الماء الزائد وتغطى بفلم أشعة أكس وتحفظة داخل محفظة معدنية خاصة بدرجة حرارة 70°-م لمدة أسبوع أو أكثر .

يزال الفلم بعد ذلك ويحمض وتظهر المستعمرة أو المستعمرات التي تحتوي على المورث المطلوب عزله كبقعة أو بقع سوداء على غشاء الفلم . تعزل المستعمرة المطلوبة وتنمى على وسط غذائي سائل ويستخلص بعد ذلك منها الناقل باستخدام أنزيم قاطع مناسب ثم يستخدم المورث أو قطعة الحامض النووي لأغراض الهندسة الوراثية الأخرى (الشكل 9-3) .

إن عملية توفير مجس ذي ترددات متممة للمورث المطلوب عزله غير متوفرة دائماً . إذ أن هناك الالاف من المورثات التي لا يعرف عنها إلا القليل من المعلومات وبعضها لا يزال مجهولاً كلياً .




- نقل المستعمرات على ورق نايتروسليلوز أو نايلون .
- تحليل المستعمرات بواسطة بخار الكلوروفورم .
- معاملة الورق مع قاعدة كيميائية لفصل اشرطة الحامض النووي DNA .
- تثبيت أحماض المستعمرات بالحرارة العالية 80°م .
- تهجين الورق بمجس موسم اشعاعياً .
- غسيل الورق بعد التهجين لازالة المواد الزائدة .
- تغطية الورق بفلم اشعة أكس ويحفظ لفترة في درجة حراره منخفضة .
- تحميض الفلم وقراءة النتيجة .




(الشكل 9-3): الطريقة العامة في عزل مورث معين باستخدام مجس حامض نووي موسم إشعاعياً

لذلك فأن عملية إعداد مجس مناسب لعزل المورثات يعتمد أساساً على المعلومات المتوفرة حولها فكلما كانت المعلومات المتوفرة عن المورث أو بروتينية جيدة كانت فرصة الحصول على مجس مناسب جيدة أيضاً . ومع ذلك فأنه يتوفر لدينا الآن العديد من الطرق الخاصة بعزل المورثات من مكتبة وراثية معينة باستخدام مجسات حامض نووي موسمة إشعاعياً .

## عزل مورث معين من مكتبة مورثات مؤلفة من حامض نووي متمم *cDNA* .

يؤخذ بنظر الاعتبار عند بناء مثل تلك المكتبات بأن المورثات المطلوب عزلها هي مورثات ذات نشاط أيضي عالٍ بحيث أن الحامض النووي المرسال لها يمثل نسبة عالية من كمية الحامض النووي المرسال المستخلص من الخلايا . فعلى سبيل المثال تبلغ نسبة الحامض النووي المرسال لمورث الجلايدين Gliadin 30٪ من مجموع الحامض النووي المرسال المستخلص من حبوب الحنطة . وكذلك نتوقع وجود نسبة عالية من الحامض النووي المرسال لمورثات الأنسولين في حالة استخلاص الحامض النووي المرسال من خلايا جزر لانكر هانس في البنكرياس . وهكذا بالنسبة لبقية المورثات ذات النشاط الايضي العالي الأخرى .

لذلك فأننا نتوقع وجود مثل تلك المورثات بأعداد كبيرة في مكتبة المورثات التي يستخدم فيها حامض نووي متمم cDNA إن وجود مثل تلك المورثات بنسبة عالية في المكتبات الوراثية يساعدنا في عزل الهجائن التي تحتويها بطريقة سهلة وبسيطة .

في هذه الطريقة يتم اختيار مستعمرة عشوائية من مستعمرات المكتبة ويستخلص منها الناقل الهجين بكمية مناسبة ثم يتم بعد ذلك فصل قطعة الحامض النووي cDNA عن النواقل بأنزيم قاطع مناسب .

وعن طريق الهجرة الكهربائية عبر هلام الاجاروز الخفيف يتم عزل واستخلاص قطع الحامض النووي المتمم . توسم قطع الحامض النووي هذه بنظير مشع وتستخدم كمجس البحث هذه مرة أخرى باستخدام قطع حامض نووي متمم أخرى معزولة من مستعمرات أخرى حتى الحصول على مجس يؤدي إلى وجود نسبة عالية عن

مستعمرات المكتبة الوراثية ذات الإشارات الإشعاعية التي تدل على وجود تكامل بين قطع الحامض النووي cDNA الموجودة في هذه المستعمرات و المجس المستخدم (الشكل 4-9) . عندئذٍ يحتمل وبشكل كبير أن تلك المستعمرات تحتوي على المورث المطلوب .

يعزل بعد ذلك المورث من النواقل الهجينة لهذه المستعمرات ويتم تحليله بشكل أوسع مثل استخدام قراءة تردد هذا المورث وإنتاج البروتين المشفر عن طريق الترجمة خارج الخلايا لأجل التأكد من المورث .

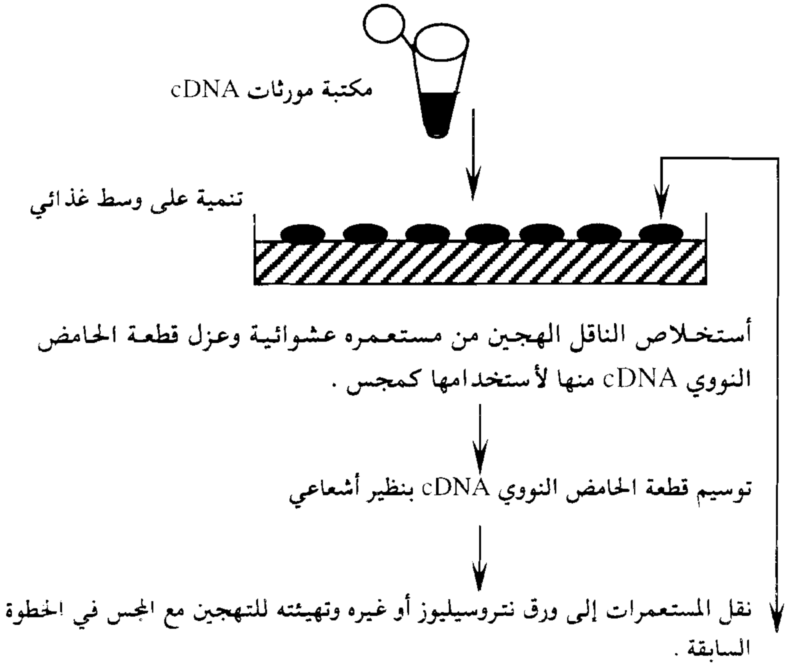
## عزل مورث باستخدام مجس قصير التردد *Oligonucleotide Probe*

يمكن استخدام مثل هذا المجس في عزل مورثات معينة نشيطة من أي نوع من المكتبات الوراثية . يشترط في المورثات المراد عزلها بواسطة هذه الطريقة أن تكون المعلومات الخاصة بالبروتين المشفر لها معروفة تماماً .

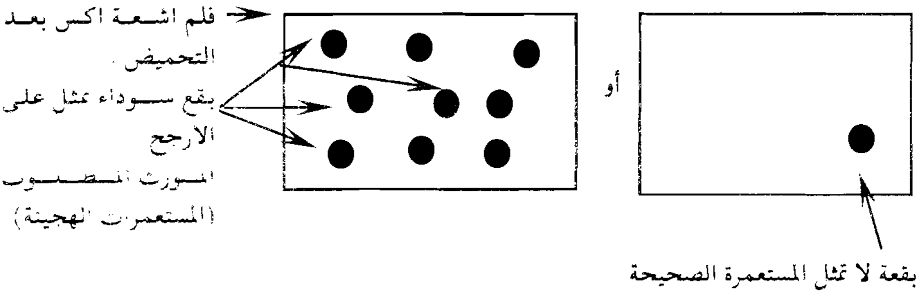
ترجع أهمية معرفة البروتين المشفر من مورث معين إلى إمكانية معرفة تردد الأحماض الأمينية لهذا البروتين وبالتالي تساهم هذه في توفير المعلومات المحتملة عن تركيب وترددات المورث .

ولهذه المعلومات أهمية كبيرة في تهيئة وتصنيع مجس DNAقصير التردد مشابه لبعض ترددات المورث المطلوب عزله . ذلك أنه يمكن توقع تردد الشفرات الوراثية للمورث من خلال معرفة تردد الأحماض الأمينية في البروتين المشفر له .

وعلى الرغم من أن مثل هذا الأمر ليس سهلاً حيث يمكن لكثير من الأحماض الأمينية أن تشفر بأكثر من شفرة وراثية واحدة . فمثلاً الحامض الأميني الالسنين يشفر بواسطة أربع شفرات وراثية وهي GCC, GCG, GCT, GCA . لكن مع ذلك يمكن إيجاد تردد أحماض أمينية معينة ضمن تردد أحماض البروتين تعطي احتمالات لشفرات وراثية قليلة يتم من خلالها بناء قطع حامض نووي DNA قصيرة التردد بنفس عدد الاحتمالات وتستخدم هذه فيما بعد كمجسات بعد توسيمها بنظير إشعاعي معين لعزل المورث .




- تهجين المستعمرات المنقوله على ورق النايتروسليلوز بالمجس العشوائي .
- غسيل الورق لازالة المواد الزائدة ، تغطيته بفلم اشعة اكس ، حفظ بدرجة حرارة منخفضة ، تحميض وقراءة النتائج .




(الشكل 9-4): استخدام مجس عشوائي معزول من مكتبة مورثات cDNA إن وجود أعداد كبيرة من الإشارات الإشعاعية على فلم أشعة أكس يؤكد إحتمالية كبيرة بأنها تمثل المستعمرات التي تحتوي على المورث النشيط أيضاً المطلوب عزله

ولأجل توضيح الأمر لنفترض بأن البحث يجري لعزل مورث السايتوكروم -C من مكتبة مورثات الخميرة . أن البروتين المشفر من قبل هذا المورث قد تم معرفة تركيبه منذ فترة طويلة . إذ وجد بأنه يتألف من حوالي 103حامض أميني (الشكل9-5) .

ومن خلال نظرة طويلة ومتفحصة لتركيب ترددات البروتين سنرى أن هناك العديد من ترددات الأحماض الأمينية التي يمكن أن تعطي احتمالات توقع قليلة وجيده لبناء قطع حامض نووي قصيرة . فمثلاً تردد الأحماض الأمينية الذي يبدأ في الموقع 59 لغاية الموقع 64 (64) TRP- ASP- GLU-ASN -ASN-MET يمكن أن يعطي توقعاً لترددات الحامض النووي DNA في هذا الموقع كالتالي :

ATG- AAT(C) AAT(C)- GAA (G)- GAT (c)- TGG

وهذا يعني أن هناك احتمالاً لبناء 16 قطعةحامض نووي قصيرة يتألف كل منها من 18 نيوكليوتيداً .

أما في حالة أختيار تردد الأحماض الأمينية في الموقع الذي يبدأ بالحامض الأميني 65 وينتهي بالحامض الأميني 70 .

((65) SER-GLU- TYR-LEU-THR-ASN-(70)) والذي يلي الموقع السابق فأنه يؤدي إلى توقع وجود عدة الآلاف من الاحتمالات لبناء قطع حامض نووي قصيرة مؤلفة من 18 نيوكليوتيداً .

لذلك فأن عملية إختيار تردد الأحماض الأمينية ليس سهلاً ويحتاج تأملاً وصبراً طويلاً حتى أختيار الترددات التي تؤدي إلى الحصول على أقل الأحتمالات لبناء قطع حامض نووي قصيرة بأعداد معقولة مناسبة لتكاليف البحث .

وفي كل الأحوال فأنه ليس ضرورياً تصنيع جميع القطع الست عشرة (وهي أحتمالات الموقع الأول)وأستخدامها كمجسات للبحث عن مورث السايتوكروم -C .بل يمكن تصنيع واستخدام أربعة أو خمس منها فقط . إذ أنه يكفي وجود إشارة إشعاعية متكررة لمستعمره معينه عند استخدام مجسين أو ثلاثة لأعتبار أن هذه المستعمرة تحتوي على مورث السايتوكروم C بشكل شبه قطعي .

إذ يمكن عندئذ استخلاص النواقل الهجينة في هذه المستعمرة وعزل قطعة الحامض النووي منها والتي تمثل عندئذ مورث السايتوكروم -C.

15
GLY- SER- ALA- LYS-LYS - GLY- ALA-THR-LEU-PHE - LYS-THR-ARG-CYS- GLU-
30
LEU- CYS- HIS- THR- VAL- GLU - LYS- GLY - GLY-PRO- HIS - LYS-VAL - GLY- PRO-
45
ASN-LEU- HIS- GLY- ILE- PHE- GLY-ARG- HIS- SER- GLY- GLN- ALA- GLN- GLY-
60
TYR- SER- TYR- THR- ASP-ALA- ASN- ILE- LYS-LYS- ASN- VAL- LEU-TRP- ASP-
75
GLU-ASN-ASN- MET- SER-GLU- TYR- LEU-THR- ASN- PRO-LYS- LYS- TYR- ILE-
90
PRO-GLY-THR-LYS- MET-ALA- PHE- GLY-GLY- LEU- LYS- LYS-GLU- LYS- ASP-
103
ARG-ASN- ASP- LEU0 ILE- THR- TYR- LEU- LYS- LYS- ALA CYS- CLU

**(الشكل 9-5): تردد الأحماض الأمينية لبروتين السايتوكروم -C المستخلص من الخميرة**

## عزل مورث معين باستخدام مجس من مورث نظير

لقد دلت الدراسات التي أجريت على ترددات مورثات متشابهة مأخوذة من كائنات مختلفة وكذلك دراسات ترددات بروتيناتها وجود تماثل كبير في بعض مواقعها . فمثلاً وجد أن هناك نسبة لا تقل عن 40٪ في بعض ترددات مورثي الأنسولين الخاص بالفأر شبيهة لترددات موجودة في مورثي الأنسولين الخاصة بالإنسان . كما أن هناك نسبة مماثلة من التشابه بين ترددات بعض مواقع بروتيناتها . لذلك فأنه من الممكن أستخدام مورثات الأنسولين المستخلصة من خلايا بنكرياس الفئران في البحث عن نفس المورثات في مكتبة مورثات بشرية وعزلها .

لقد ساهمت هذه الطريقة في تشخيص العديد من المورثات في مجينات العديد من الكائنات . كما أنها ساهمت أيضاً في الكشف عن وجود المورثات السرطانية الابتدائية Proto- oncogenes في الخلايا الطبيعية عندما أستخدمت

المورثات السرطانية الراشحية Viral Oncogenes المستخلصة من الرواشح المرتدة Retroviruses كمجسات . وقد أدى ذلك إلى خلق ثوره كبيرة في أبحاث السرطان والكشف عن العديد من الآليات التي تتحكم في تحول الخلايا الطبيعية إلى خلايا سرطانية .

وأستناداً إلى ذلك فأنه يمكن استخدام مورث السايتوكروم C المعزول من الخميرة كمجس للبحث عن المورث النظير له في مجين بشري .

## عزل مورث ينتمي إلى عائلة *Multigene Family*

إن استخدام مجسات مؤلفة من مورثات نظيرة كما في طريقة العزل السابقة أدى إلى الكشف أيضاً عن مايسمى اليوم بالعوائل متعددة المورثات .

جاء هذا الكشف من خلال ملاحظة أن استخدام بعض المورثات النظيرة كمجسات أدى إلى الحصول على أكثر من إشارة إشعاعية على حامض نووي DNA مستخلص من مكتبة مورثات . وعند تحليل ترددات قطع الحامض النووي DNA ذات الإشارات الإشعاعية وجد بأنها تختلف تركيبياً عن المجس ولكنها تحتوي على ترددات مماثلة وفي مواقع مختلفة لترددات مواقع من المجس وهو ما يفسر وجود الإشارة الإشعاعية لها .

ومن خلال دراسات تعبير هذه المورثات وجد بأنها مورثات مختلفة . وقد وجد بأن معظم هذه المورثات ذات أهمية وظيفية أو تطورية متقاربة وضمت بعد ذلك مع بعضها على هيئة عوائل من المورثات مثل عائلة مورثات السايتوكروم وعائلة مورثات الجلوبيولين المناعي وعائلة مورثات أضداد Antigenes فصائل الدم وغيرها .

لذلك فأنه بالامكان استخدام مورث معين من عائلة كمجس للبحث عن أفراد نفس العائلة من المورثات في مكتبة وراثية لنفس الكائن أو الكائنات أخرى .

في مثل هذه الطريقة يجب استخدام طريقة تهجين مناسبة وكذلك محاليل غسيل (لإزالة المواد الإشعاعية الزائدة ) مناسبة . ذلك أن الهجين الناتج من ارتباط

المجس الموسم إشعاعياً مع ترددات الحامض النووي لا يكون مستقراً بسبب الاختلاف الكبير بين ترددات المجس وترددات المورثات ذات العلاقة .لذلك فأن استخدام مثل هذه الطريقة يحتاج إلى خبرة جيدة لأجل تمييز الإشارات الإشعاعية الحقيقية عن تلك الناتجة عن مواد إشعاعية زائدة .

### ثانياً: عزل المورثات باستخدام مجس مناعي

إن الطرق السابقة التي يستخدم فيها مجس مؤلف من حامض نووي طرق كثيرة الاستخدام وشائعة كثيراً في المختبرات العلمية . إلا أنه ومع ذلك فأن هناك عدداً من الصعوبات التي يمكن أن تجعل من هذه الطرق مكلفة وتأخذ وقتاً أطول إضافة إلى أن بعضها قد لايؤدي الى نتائج دقيقة مما يؤدي إلى الاستعانة بطرق تحليل أضافية للتأكد منها وهو ما يحتاج إلى مال ووقت أكثر . لذلك فأن بعض الباحثين يلجأ الى الطرق المناعية للوصول إلى نفس الهدف .

تعتمد عملية عزل المورثات باستخدام مجس مناعي على توفر البروتين المشفر لهذا المورث . إن مثل هذا البروتين يمكن أن يتم تصنيعه خلوياً داخل خلال المضيف أو يمكن تصنيعه خارج الخلايا . إن خلايا المضائف يمكن أن تسمح للمورثات المهندسة مع النواقل بأن تعبر عن نفسها عن طريق إنتاج البروتينات الخاصة بهذه المورثات . وتعتمد عملية التعبير هذه على نوع المورث والكائن المستخلصة منه .

فكما هو معروف بأنه لا يمكن لجميع المورثات أن تعبر عن نفسها في آن واحد في خلايا معينة . بل أن هناك كبتاً لعدد كبير من هذه المورثات لعدم حاجة الخلايا لبروتينات مثل هذه المورثات .

بينما تسمح نفس الخلايا لمورثات أخرى على التعبير عن نفسها لأهمية بروتيناتها لحياتها . ومع ذلك فأن قوة التعبير هذه تختلف من مورث الى آخر . إذ أن بعض المورثات يتميز بقوة التعبير وارتفاع مستوى بروتيناتها في الخلية مقارنة بقوة تعبير محدوده لمورثات أخرى . وكل ذلك يعتمد على حاجة الخلايا لهذه البروتينات . إن الاختلاف في قوة التعبير هذه يعتمد أصلاً على نوع المحفز Promoter المرتبط مع

المورث . فهناك محفزات قوية تدفع بالمورثات لأن تعبر عن نفسها بقوه .بينما توجد محفزات أخرى معتدلة القوة وأخرى ضعيفة . لهذا السبب فأنه ليس لجميع المورثات المهندسة وراثياً القدرة على التعبير في خلايا معينة مضيفة لها .

السبب الآخر الذي يمكن أن يؤدي إلى توقف المورث عن التعبير عن نفسه في خلايا المضيف هو الاختلاف بين المورث والخلايا المضيفة . فمورثات الخلايا حقيقية النوى لا يمكن لها التعبير في خلايا البكتريا . ويعود ذلك للاختلاف في تركيب المورث وكذلك لعدم احتواء خلايا البكتريا على نظم تقطيع الحامض النووي الريبوزي المرسال غير الناضج الخاص بمورثات الأحياء حقيقية النوى .

إن مورثات البكتريا مؤلفة من محاور فقط (Exones) بينما تتألف مورثات الأحياء حقيقية النوى من محاور ومتداخلات وتقوم الخلايا حقيقية النوى عادة بالتخلص من الشفرات الخاصة بالمتداخلات في الحامض النووي المرسال غير الناضج ودمج شفرات المحاور فقط لإنتاج جزيئة الحامض النووي المرسال التي تكون عندئذ جاهزة للترجمة . وترجع قابلية هذه الخلايا على تقطيع الحامض النووي المرسال ودمج شفرات المحاور الى وجود نظام أنزيمي خاص بذلك غير متوفر في خلايا البكتيريا .

هذا إضافة لاختلاف تركيب محفز مورثات الخلايا حقيقية النوى عن محفزات مورثات البكتيريا . ويمنع مثل هذا الاختلاف تصنيع الحامض النووي المرسال أصلاً لمثل هذه المورثات . إذ لا تتمكن جزيئة بلمرة الحامض النووي الريبوزي RNA Polymerase البكتيري من تمييز منطقة محفز مورث الخلايا حقيقية النوى لاختلاف تردد نيوكليوتيداته عن تردد محفز مورثات البكتيريا ويمكن الرجوع حول هذه الاختلافات لفصل الوراثة الجزيئية .

لهذه الاسباب وغيرها فأن هناك احتمالين لدينا . الأول : إن خلايا البكتيريا المضيفة للنواقل الهجينة تسمح للمورث المرتبط مع الناقل الهجين بالتعبير عن نفسه وتصنيع البروتين الخاص به وذلك عندما يكون هذا المورث يعود لنفس البكتيريا أو لأنواع متقاربة تطورياً .

وفي هذه الحالة فأنه يمكن تنمية خلايا المكتبة الوراثية على وسط غذائي صلب مناسب ثم تنقل المستعمرات إلى ورق نتروسليلوز أو بولي فنيل . تحلل خلايا المستعمرات المنقولة إلى الورق بتعريض الأوراق إلى بخار الكلوروفورم لفتره زمنية حيث تتحلل الخلايا مطلقة البروتينات المختلفة لها على الورق . تثبت البروتينات عن طريق تجفيف الأوراق بالحرارة . تحفظ الأوراق بعد ذلك للمعاملة المناعية .

**أما الاحتمال الثاني :** فهو عدم قدرة المورث على التعبير عن نفسه في الخلايا البكتيريا لكون المورث أو المورثات تعود إلى أحياء حقيقية النوى أو لعدم تناسب محفزاتها .

لهذا السبب فأنه يفضل في حالة إعداد مكتبة مورثات لخلايا حقيقية النوى استخدام حامض نووي متمم (cDNA) ونواقل تعبير تحتوي على محفزات بكتيرية للتغلب على هذه الصعوبة . حيث لا يحتوي الحامض النووي المتمم شفرات المتداخلات مما يجعل البكتيريا تتقبل الحامض النووي المرسال الناتج منه . كما أن وجود محفز بكتيري في ناقل التعبير الذي يحمل الحامض النووي المتمم يساعد في عملية بناء الحامض النووي المرسال للحامض النووي المتمم .

## العزل المناعي للمورثات

تعتمد طريقة العزل المناعي للمورثات على توفر البروتينات المشفرة لها . وحالما يتوفر بروتين خاص بمورث معين فأنه يصبح من السهولة عزل من مكتبة المورثات .

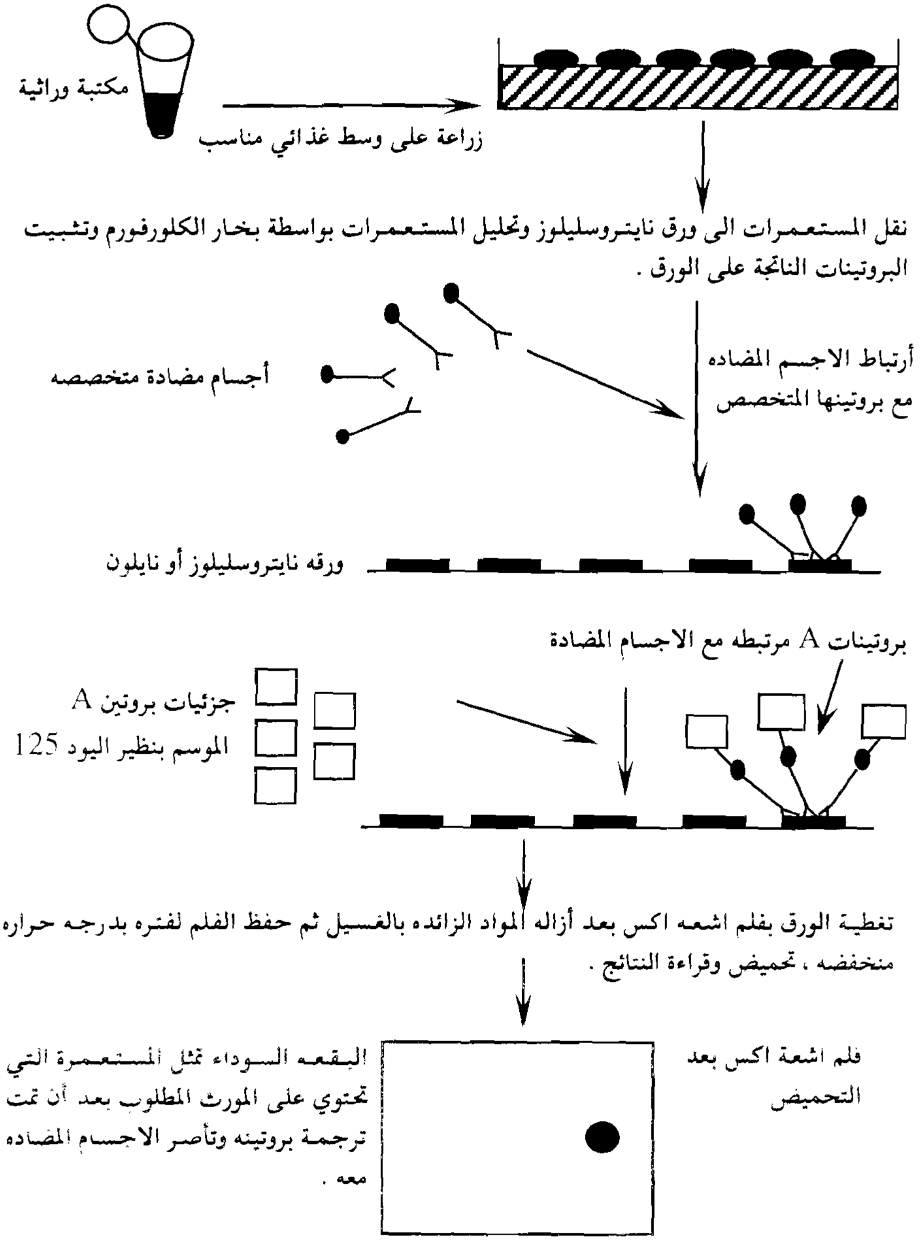
إن أول خطوة في هذا المجال هو استخلاص الأجسام المضادة (Antibodies) لهذا البروتين . يتم ذلك من خلال حقن كمية من محلول البروتين في المجرى الدموي للأرانب على سبيل المثال . ونظراً لاعتبار مثل هذا البروتين مادة غريبة بالنسبة لجسم الأرانب لذلك فأن الجهاز المناعي لها يعمل على توليد أجسام مضادة متخصصة تعمل على إعاقة البروتين أو تدميره . ويمكن توليد مثل هذه الأجسام بتركيز عالٍ بعد ثلاثة أيام من الحقن ويمكن استخلاصها عن طريق تجميع مصل الدم بعد الطرد

المركزي لنموذج10-20 سم3 من دم الارانب . تؤخذ بعد ذلك أوراق النتروسليلوز أو البولي فنيل التي تحتوي على مستعمرات المكتبة المتحللة (التي سبق الحديث عنها أنفاً) وتغمر في محلول الاجسام المضادة . ترتبط الأجسام المضادة الحرة مع البروتين المتخصص في المستعمرات المتحللة التي عبرت عنه . تغسل الأوراق بعد ذلك بالماء المقطر لإزالة المحلول الزائد ثم تعامل مع البروتين Protein A)A) الموسم بنظير اليود 125 ($^{125}$I ) حيث يقوم هذاالبروتين بالارتباط مع معقد الاجسام المناعية – البروتين المتخصص . تغطي بعدها الأوراق بفلم أشعة أكس وتحفظ لفترة زمنية ثم يحمض الفلم حيث تظهر المستعمرة التي تحتوي على المورث المطلوب كبقعه سوداء على الفلم (الشكل9-6) .

## تشخيص المورثات المعزولة من مكتبة المورثات

إن عملية عزل مورث معين بالطرق السابقة قد لا تكون الخطوة النهائية في هذا الموضوع . فكثير من الطرق التي سبق الحديث عنها تعطي أرجحية كبيره على وجود المورث المطلوب لكنها لا تقدم ضمانة 100% على أن هذا المورث هو المورث المطلوب . لذلك يتم اللجوء إلى طرق تحليل إضافية لأجل تغطية الموضوع والتأكد تماماً من المورث . من هذه الطرق قراءة تردد المورث باستخدام طريقه ماكسام وجلبرت وغيرها من الطرق التي سبق الحديث عنها في فصول سابقة . هناك طرق أخرى تعتمد على تحليل المورث باستخدام بروتينه الذي يتم تصنيعه خارج الخلايا أو ما يدعى بالترجمة خارج الخلايا In virtro translation .

وتتوفر أكثر من طريقة لاستخدام مثل هذا البروتين أشهرها طريقتا ترجمة الهجين الحرة Hybrid-release translation وترجمة الهجين المعزول Hybrid-arrest translation لأجل زيادة تحليل المورثات .




(الشكل9-6) : استخدام الأجسام المضادة المتخصصة في تشخيص البروتين المشفر من مورث معين مطلوب عزله من مكتبة مورثات.

## الترجمة خارج الخلايا *In vitro translation*

يمكن ترجمة الأحماض النووية المرسالة الخاصة بالمورثات خارج الخلايا الحية وذلك باستخدام ما يدعي بنظام الترجمة الخلوية الحرة Cell-Free translation system . يتألف هذا النظام من خلاصة خلوية للخلايا الجنينية لحبوب الحنطة أو لخلايا الدم الحمراء للأرانب Rabbit Reticulocyte Cells . تحتوي هذه الخلاصة على أعداد كبيرة من الريبوسومات والأحماض النووية الريبوزية الناقلة t RNAs وجميع جزيئات البروتينات اللازمة لعملية الترجمة .

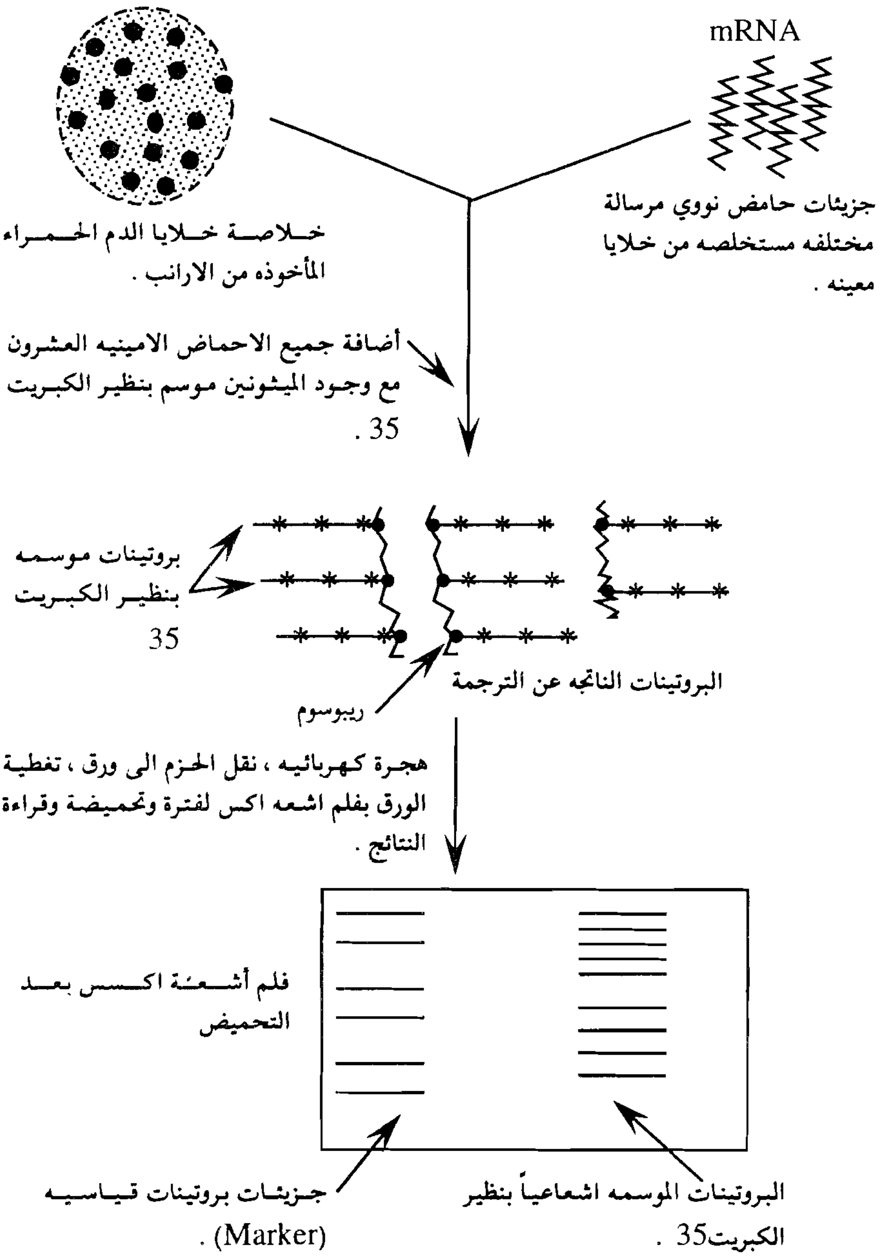
تتم عملية الترجمة خارج الخلايا عن طريق مزج جزيئات الحامض النووي المرسال mRNAs مع خلاصه النظام بعد إضافة جميع الأحماض الأمينية العشرين اللازمة لتصنيع البروتين مع وجود الحامض الأميني الميثونين الموسم بنظير الكبريت ($S^{35}$) . يتم في هذا النظام ترجمة جميع جزيئات الحامض النووي المرسال لإنتاج جزيئات بروتينية متنوعة موسمة بنظير الكبريت 35 .

تفصل جزيئات البروتين هذه عن طريق الهجرة الكهربائية عبر هلام ويتم تصويرها عن طريق استخدام فلم أشعة X حيث تمثل كل حزمة بروتين معين . ويمكن معرفة أوزانها الجزيئية باستخدام بروتينات قياسية معروفة الأوزان عند الهجرة الكهربائية (الشكل9-7 ) .

## ترجمة الهجين الحر *Hybrid-release translation (HRT)*

تستخدم هذه الطريقة والتي تليها في تحليل المورثات التي تكون في مكتبة المورثات على هيئة حامض نووي متمم cDNAs

يعزل الناقل الهجين الذي يحتوي على المورث المعني (الذي تم عزله في الطرق السابقة) من مستعمرة المضيف بعد تنميتها لفترة زمنية . يرحل بعد ذلك خلال هلام الاجاروز بطريقة الهجرة الكهربائية ثم يعامل الهلام بمحلول قاعدي لأجل فصل أشرطة الحامض النووي للناقل والحامض النووي المتمم (الذي يمثل المورث) المهندس معه .




(الشكل9-7) : الترجمة خارج الخلايا In vitro translation .

ينقل الحامض النووي إلى ورق نتروسليلوز أو نايلون بطريقة ساوثرن . تجفف الورقة بعد ذلك بدرجة حرارة 80مْ مع تفريغ الهواء لأجل تثبيت الحامض النووي للناقل الهجين جيداً على الورقة ثم تحضن الورقة مع محلول الحامض النووي المرسال mRNA (يستخلص الحامض النووي المرسال من الخلايا التي تحتوي على المورث المطلوب والنشيط أيضاً بالطرق السابقة) حيث ترتبط جزيئة الحامض النووي المرسال الخاصه بالمورث مع أشرطته المفردة . تغسل الورقة لإزالة جزيئات الحامض النووي المرسال الأخرى والتي لم ترتبط مع المورث ثم تتم إزالة جزيئات الحامض النووي المرسال المرتبطه مع المورث بأستخدام قطرات قليلة من محلول قلوي وتجميعها بعد ذلك . يستخلص الحامض النووي المرسال الخاص بالمورث وتتم ترجمته لانتاج البروتين المشفر للمورث بطريقة الترجمة خارج الخلايا .

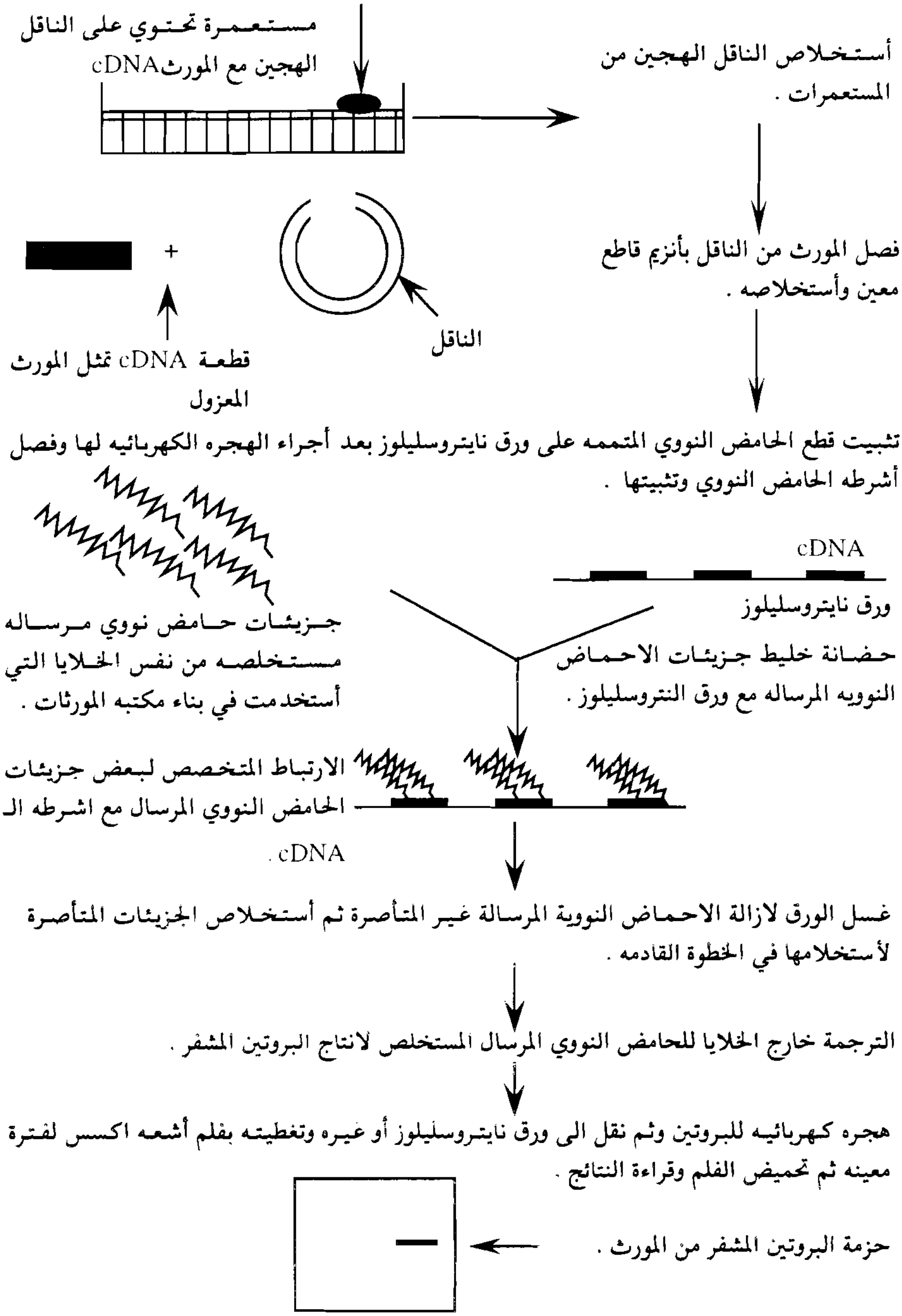
يرحل البروتين عبر هلام باستخدام الهجرة الكهربائية وينقل بعد ذلك إلى ورق نتروسليلوز ويغطى الورق بفلم أشعه أكس ويحفظ لفترة بدرجة حرارة 70 -م ثم يحمض حيث يظهر البروتين المطلوب كحزمة سوداء على الفلم (الشكل9-8 ) . وباستخدام جزيئات بروتين قياسية يمكن معرفة الوزن الجزيئي له . ويمكن استخدام البروتين الناتج في إجراء تحليلات أخرى .

### ترجمة الهجين المعزول *Hybrid -arrest translation (HART)*

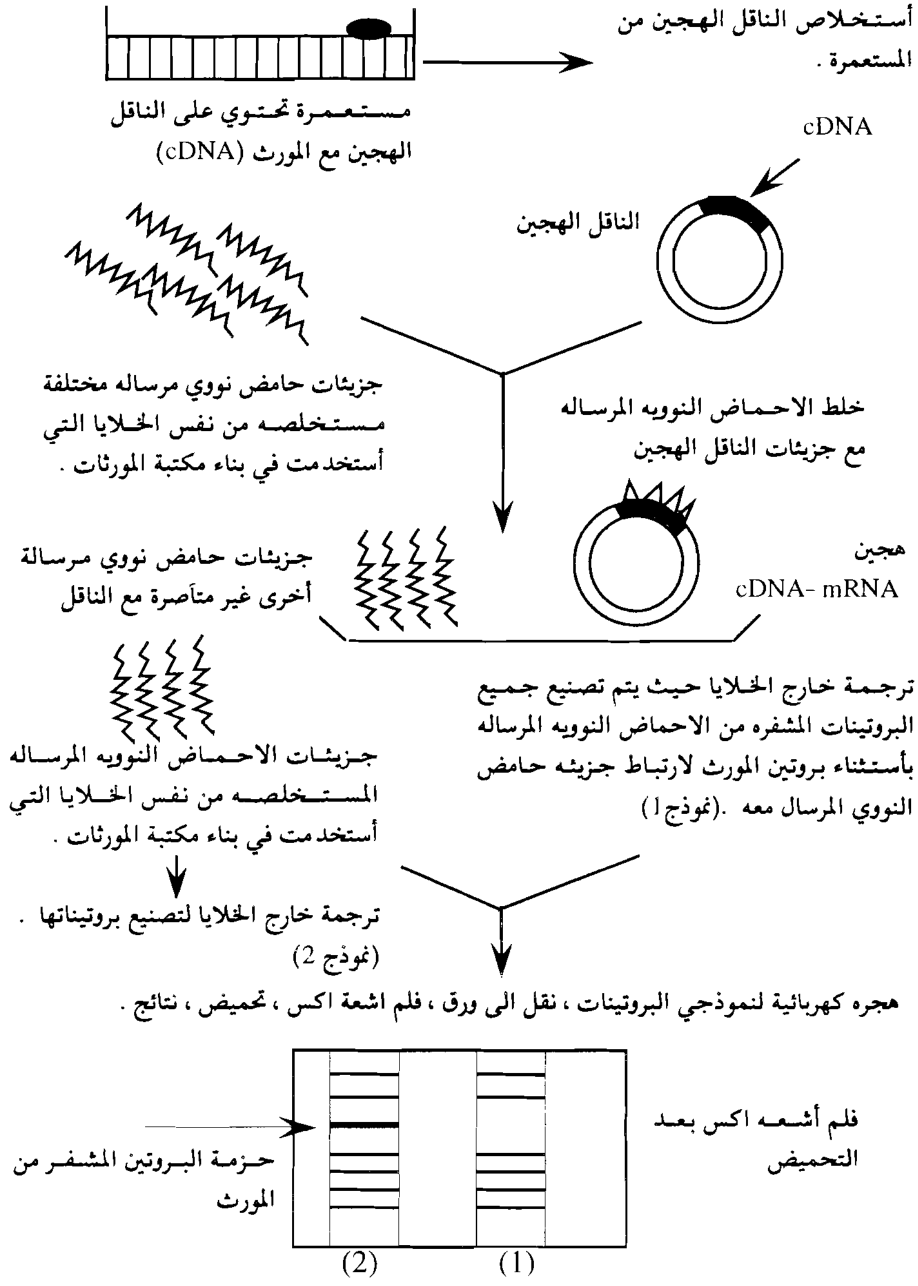
تختلف هذه الطريقة قليلاً عن سابقتها حيث يتم تشخيص البروتين المشفر لمورث معين معزول من مكتبة مورثات cDNA بصورة غير مباشرة . هناك خطوتان لهذه الطريقة . الأولى يتم فيها استخلاص جزيئات الأحماض النووية المرسالة من الخلايا التي استخدمت في بناء المكتبة الوراثية ثم تتم ترجمتها وتصنيع البروتينات المشفرة لها خارج الخلايا . الخطوة الثانية هي عزل الناقل الهجين بالمورث من مستعمرات المضيف بعد تنميتها لفترة ثم مزج محلول الناقل الهجين مع خليط جزيئات الأحماض النووية المرسالة الذي سبق استخلاصها في الخطوة الأولى . يؤدي هذا المزج الى ارتباط جزيئات الحامض النووي المرسالة الخاصة بالمورث مع أشرطة المورث المهجن مع الناقل .

يمزج خليط جزيئات الأحماض النووية المرسالة - الناقل الهجين مع خلاصة الترجمة خارج الخلايا حيث يتم ترجمة جميع الاحماض النووية المرساله باستثناء الحامض النووي المرسال الخاص بالمورث بسبب ارتباطه مع مورثه . تستخلص البروتينات الناتجة من الترجمة خارج الخلايا وترحل كهربائياً مع نموذج البروتينات الناتجة من الخطوة الأولى . تنقل البروتينات إلى ورقة نايتروسليلوز أو نايلون ثم تغطى بفلم أشعة اكس وتحفظ لفترة بدرجة حرارة 70-م تحمض بعدها حيث يمكن مقارنة البروتينات الناتجة عن الخطوة الأولى مع البروتينات الناتجة من الخطوة الثانية (الشكل9-9 ) . يشخص بروتين المورث من خلال نموذج بروتينات الخطوة الأولى حيث توجد جميع البروتينات المشفرة لجزيئات الأحماض النووية المرسالة المستخلصة من الخلايا بما فيها بروتين المورث المطلوب بينما يختفي هذا البروتين من نموذج بروتينات الخطوه الثانية لعدم ترجمته بسبب ارتباطه مع المورث .

إن طريقتي الترجمة السابقة تعتبران من الطرق المهمة والتي تستخدم كثيراً في المختبرات لتحليل نتائج تعبير المورثات . ولكن مع ذلك فأن هناك طرقاً أخرى مثل التطفير خارج الخلايا In vitro mutagenesis وغيرها الا أنها قليلة الاستعمال لأنها تحتاج لمواد كثيرة ومكلفة للغاية .




(الشكل8-9) : **ترجمة الهجين الحر**(Hybrid -release translation (HRT.




(الشكل 9-9): ترجمة الهجين المعزول (HART) Hybrid -arrest translation.

# 10

# تطبيقات الهندسة الوراثية في الأبحاث العلمية والتقنيات الحياتية

**مقدمة**

**تطبيقات الهندسة الوراثية في مجال البحث العلمي**

أولاً: تشخيص المورثات

ثانياً: أيجاد العلاقات التطورية بين الأنواع

ثالثاً: أبحاث الأدلة الجرمية وتشخيص المجرمين

رابعاً: تحديد تتابعات المورثات على الصبغي أو المشية على الصبغي

**الهندسة الوراثية والتقنية الحياتية (البايوتكنولوجي)**

- انتاج الهرمونات البشرية في الأحياء الدقيقة
- ستراتيجية أنتاج الأنسولين
- ستراتيجية أنتاج الهرمونات البشرية المنظمة للنمو
- انتاج هرمون السوماتوستاتين
- انتاج هرمون السوماتوتروبين
- انتاج الهرمونات البشرية من الحيوانات النقيلة
- انتاج البروتينات البشرية المختلفة من الحيوانات النقيلة

- انتاج هرمون الساماتوتروبين من الفئران

استخدام الحيوانات النقيلة للأغراض العلاجية وزراعة الأعضاء

انتاج حيوانات نقيله مقاومة للحشرات

انتاج اللقاحات الراشحية الطبية

استخدام الهندسة الوراثية في أنتاج المضادات الحيوية

-الاستراتيجية العامة لإنتاج الاكتينورودين

التقنية الحياتية في النبات

-استخدام البلازميد Ti لأدخال مورثات جديدة في النبات

# مقدمة

إن الثورة التي أحدثها ظهور الهندسة الوراثية بتقنياتها المختلفة أدى إلى دخولها في مجالات بحثية مختلفة و في معظم فروع المعرفة التطبيقية . لقد أدت طرق الهندسة الوراثية إلى زياده تفهمنا للعديد من الأمور مثل النشاط الأيضي والانقسامات وظهور الاتحادات الجديدة في الأحياء وكذلك تطور الأنواع وعمل المورثات وغيرها الكثير . ومما لاشك فيه أن مثل هذا الفهم أثر بشكل إيجابي ومتسارع في تصوراتنا للكثير من الأمور بحيث أصبح الأن بأمكاننا الولوج إلى أقدس ما تمتلكه الخلايا إلا وهو مادتها الوراثية أو الكأس المقدسة وتغيير الكثير مما نشاء أن نغيره لخلق تطورات حياتية تخدم مسيرة الإنسانية والمعرفة على حدٍ سواء .

وكنتيجة لذلك فأن ما كان حلماً قبل عام 1976 أصبح الآن حقيقة وأصبح العالم يسمع يومياً خبراً عن توصل العلماء إلى اكتشاف جديد في أحد حقول المعرفة باستخدام طرق الهندسة الوراثية أو تطبيقاتها حتى أصبحنا اليوم لا نستطيع إحصاء ما تقدمه هذه التكنولوجيا من فوائد .

وعلى الرغم من أننا الآن نستطيع تصور الكثير مما ستفعله تقنيات الهندسة الوراثية إلا أننا لا نستطيع تقدير المدى الذي يمكن أن تصله هذه التقنيات في المستقبل البعيد . وقد لا يصبح مفاجئاً يوماً ما أن تصبح البطاقة الشخصية للافراد مجموعة من ترددات الحامض النووي DNA المشفرة والتي يستطيع المجتمع أو الدول من خلالها معرفة وتمييز كل فرد عن الأخر ولربما المساهمة في خلق مجتمع قوي وصحي من خلال إعادة البناء الوراثي للأفراد باستخدام هذه التقنيات .

إن التطور الهائل الذي شهدته تقنيات الهندسة الوراثية والقائمة على الحامض النووي DNA خلال السنين الأخيره أدى إلى توفير عُدّة فعالة ومتقدمة لدراسة الوقائع البايولوجية . كما أنها تعد أيضاً بتغير مثير في ممارستنا في حقول الطب والزراعة والصناعة .

وتبعاً لذلك فأنه يستلزم انتقال هذه التكنولوجيا الذي لابد أن يحدث أن نرفع من المستوى العلمي والثقافي لطلبتنا وباحثينا عبر تعريفهم بتطبيقات هذه التقنيات

وأهميتها في تطوير النواحي المختلفة لمجتمعاتنا العربية لكسر الاحتكار الأجنبي لهذه التقنيات وكذلك لتوفير قاعدة لتطبيقاتها حتى لا نصبح يوماً ما عرضة للابتزاز .

## تطبيقات الهندسة الوراثية في مجال البحث العلمي

إن من الصعب وضع جميع التفاصيل الخاصة بالبحث العلمي المتعلق بتطبيقات الهندسة الوراثية في فصل من كتاب . بل يحتاج مثل هذا الأمر وضع كتاب خاص به يتضمن هذه الأبحاث بكل تفصيلاتها وطرقها ومجالاتها واحتياجاتها وطرق تحليل نتائجها وسنعمل بأذن الله على وضع مثل هذا الكتاب في المستقبل القريب . لذلك فأنه سيتم التعرض للخطوط العامة لهذه الأبحاث لغرض توجيه الأنظار إليها .

**أولاً : تشخيص المورثات** *Genes Identification*

يمكن تشخيص المورثات وتحديد موقعها على الصبغيات أو الحامض النووي DNA المقطع بأنزيم معين والمهجر كهربائياً عبر هلام من خلال استخدام مجس موسم إشعاعياً يمثل المورث المطلوب تشخيصه بهيئته الكلية أو الجزئية .

تشخص المورثات وتحدد مواقعها على الصبغيات من خلال ما يدعى بالتهجين خارج الخلايا In situ Hybridization . يتم في هذه الطريقة تحضير شرائح زجاجية تحتوي على الخلايا المطلوب تشخيص مورث ما على صبغياتها وهي في مرحلة الاستواء Metaphase .

ويمكن الحصول على هذه الخلايا في هذه المرحلة من خلال معاملة الخلايا الحية المنقسمة بمادة الكولجسين Colchesin التي تعمل على إيقاف الخلايا عند مرحلة الاستواء بسبب إتلاف ألياف المغزل بواسطة هذه المادة . تثبت الخلايا جيداً على الشرائح الزجاجية عن طريق معاملتها بسلسلة من الكحولات المتدرجة التركيز وكذلك مع حامض الخليك الثلجي Glacial acetic acid ثم تفصل أشرطة الحامض النووي DNA عن طريق المعاملة مع قاعدة كيميائية أو درجة عالية .

تحفظ شرائح الخلايا مع محلول التهجين الذي يحتوي على المجس الموسم إشعاعياً في ظروف معينة لمدة 18-24 ساعة تغسل بعدها الشرائح بمحاليل غسيل خاصه لإزالة المواد الزائدة عن التهجين .

تغطى الشرائح الزجاجية (السطح الذي يحتوي الخلايا) بالهلام الفوتوغرافي Photographic emulsion في غرفة مظلمة وتحفظ الشرائح في صندوق أسود جيد الغلق وتوضع بدرجة حرارة 70-م لمدة 7-14 يوماً . تحمض الشرائح الزجاجية بعد ذلك وتصبغ بصبغة جمزا أو أية طريقة من طرق تصبيغ الصبغيات الأخرى . تفحص الشرائح مجهرياً لأجل البحث عن موقع المورث على الصبغيات (الشكل10-1) .

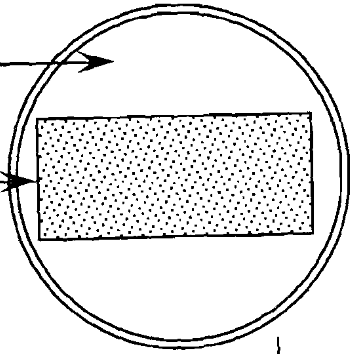
تؤدي عملية التهجين بالمجسس إلى ارتباط المجس مع الموقع المتمم له والذي يمثل المورث المطلوب تشخيصه وتحديد موقعه وبعد تغطية الخلايا بالهلام الفوتوغرافي فأن مواقع الارتباط أو هجين المورث- المجس الإشعاعي سوف تؤدي إلى تكوين بقع سوداء أو فضية على الهلام مناظره لمواقعها على الصبغيات . لذلك فأننا سنرى عند الفحص المجهري مثل هذه البقع على مواقع مختلفة من الصبغيات . كما يساعدنا تصبيغ الصبغيات على تحديد مواقع البقع الفضية على الصبغي ومن خلال الاستفادة من الخرائط الصبغية للكائنات فأننا نستطيع معرفة موقع المورث على الصبغي .

إن عملية غسل الشرائح الزجاجية بعد التهجين هي لإزالة جزيئات المجس غير المرتبطة أو الزائدة وكذلك لإزالة الارتباطات غير النوعية (Non- specific hybridizaton) التي يمكن أن تحصل نتيجة لارتباط المجس مع مواقع أخرى غير صحيحة . إن أفضل محاليل الغسيل هذه لا تتمكن من إزالة جميع الارتباطات غير النوعية للمجس .

لذلك فأن هناك بقعاً فضية أو سوداء تظهر على الصبغيات عند الفحص المجهري لا تمثل الموقع الصحيح للمورث المطلوب تشخيصه . كما أنه من الصعوبة التمييز بين هذه الإشارات الكاذبة من الإشارات الصحيحة .

ورق فلتر مشبعة بالفورماميد 70 %
ومحلول ملحي مخفف جداً .

شريحة الخلايا مغطاة بمحلول التهجين
الذي يحتوي على مجس موسم أشعاعياً
. ($H^3$)



تغلق الاطباق وتحضن بدرجه حرارة37مْ لمدة12 ساعة .

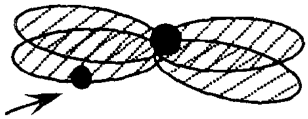
غسل بمحاليل ملحيه لازالة المواد الزائده عن التهجين .

غسل الشرائح بتراكيز مختلفة من كحول الايثانول70-95% .

تجفيف الشرائح وتغطيتها في الهلام الفوتوغرافي بواسطه الغمس في محلول الهلام . ثم تحفظ في صندوق اسود بدرجه حرارة 70-مْ لمدة اسبوع - اسبوعين .

تحميض وأظهار الهلام ثم صباغتها بصبغة التحزم G .

الفحص المجهري للصبغيات



البقعة الفضية أو السوداء .

**(الشكل10-1) : تشخيص مورث معين على صبغي كوسيلة من وسائل الهندسة الوراثية.**

لذلك فأنه يتم اللجوء الى حساب جميع البقع الفضية ولكل صبغي وتحليل النتائج بعد ذلك إحصائياً حيث يظهر الصبغي الذي يحتوي على موقع المورث ذي نتائج إحصائية معنوية بشكل عالٍ .

ويمكن استخدام طريقة الإحصاء Intransic hypothesis أو طريقة Extrinsic hypothesis لتحليل هذه النتائج .

ولأجل توضيح كيف يتم تحليل نتائج مثل هذه الأبحاث سنأخذ البحث التالي كمثال لأجل ذلك .

استخدم مجساً إشعاعياً مؤلف من مورث السرطان الابتدائي N-ras Proto-oncogene البشري في تهجين تجمعات صبغية لخلايا الهامستر السوري لتحديد موقع نفس المورث عليها وكانت النتائج كالتالي (جدول 10-1) .

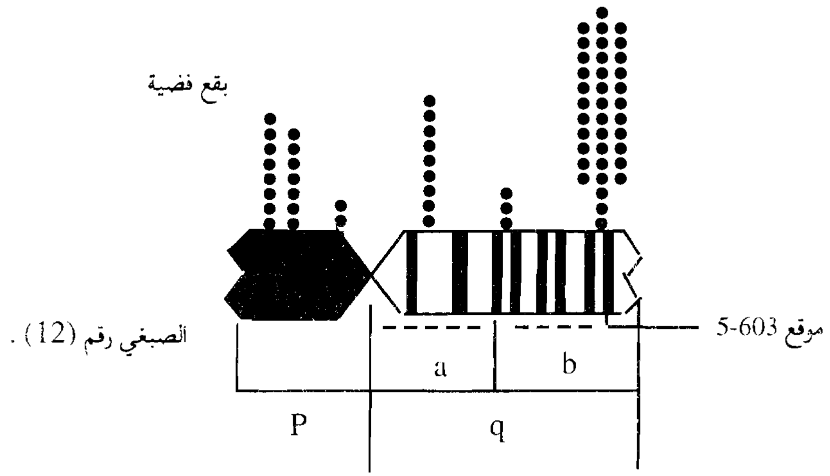
| Number of grains | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Chromosom number | mean% length | genom (um) | Observed (0) | Expected (E) | (O-E)2 | $X^2$ |
| 1 | 9.44 | 7.07 | 11 | 12.726 | 2.979 | 0.234 |
| 2 | 8.81 | 6.60 | 10 | 11.88 | 3.534 | 0.297 |
| 3 | 6.55 | 4.91 | 5 | 8.838 | 14.73 | 1.666 |
| 4 | 7.27 | 4.45 | 9 | 8.01 | 0.980 | 0.122 |
| 5 | 5.88 | 4.40 | 1 | 7.92 | 47.886 | 6.04 |
| 6 | 6.97 | 5.22 | 10 | 9.396 | 0.364 | 0.038 |
| 7 | 6.62 | 4.96 | 7 | 8.928 | 3.717 | 0.416 |
| 8 | 6.39 | 4.79 | 11 | 8.622 | 5.654 | 0.655 |
| 9 | 5.94 | 4.45 | 6 | 8.01 | 4.040 | 0.504 |
| 10 | 4.58 | 3.43 | 10 | 6.174 | 14.638 | 2.370 |
| 11 | 5.64 | 4.22 | 14 | 7.596 | 41.011 | 5.399 |
| 12 | 5.45 | 4.08 | 41 | 7.344 | 1132.72 | 154.238** |
| 13 | 5.28 | 3.98 | 3 | 7.164 | 17.338 | 2.420 |
| 14 | 4.99 | 3.74 | 1 | 6.732 | 32.855 | 4.880 |
| 15 | 4.36 | 3.26 | 2 | 5.868 | 14.961 | 2.549 |
| 16 | 4.01 | 3.00 | 3 | 5.4 | 5.76 | 1.066 |
| 17 | 4.18 | 3.13 | 3 | 5.634 | 6.937 | 1.231 |
| 18 | 3.76 | 2.81 | 8 | 5.058 | 8.655 | 1.711 |
| 19 | 4.34 | 3.25 | 6 | 5.85 | 0.176 | 0.030 |
| 20 | 3.03 | 2.30 | 1 | 4.14 | 9.859 | 2.381 |
| 21 | 2.03 | 1.52 | 3 | 2.736 | 0.069 | 0.025 |
| X | 10.12 | 7.58 | 11 | 13.644 | 6.990 | 0.512 |
| Y | 7.68 | 5.75 | 4 | 10.35 | 40.322 | 3.895 |
| Total | 133.37 | 100 | 180 | | | |

**: Staistically significant at P<O.001. df=1.

**جدول10-1 : التحليل الإحصائي باستخدام مربع كاي للبقع الفضية المنتشرة على صبغيات مجاميع صبغية عديدة مهجنة بمجس مؤلف من مورث N-ras البشري الموسم إشعاعيا بنظير الهيدروجين 3($H^3$).**

لقد دلت نتائج هذا البحث إلى أن المورث N-rasيقع على الصبغي رقم (12) نظراً لوجود نتائج إحصائية معنوية عالية .

كما يمكن تحديد الموقع المضبوط لهذا المورث من خلال معرفة توزيع البقع الفضية على طول الصبغي (12) وقراءة النسبة المئوية لتوزيعها حيث يعتبر الموقع الذي يحتوي على نسبة عالية من البقع هو الموقع الصحيح للمورث على الصبغي(الشكل 10-2) .




**(الشكل 10-2): موقع المورث N-ras على الصبغي رقم (12). ويلاحظ وجود تجمع للبقع الفضية في الموقع qb5-6.3 حيث يمثل هذا الموقع وجود المورث N-ras**

ويمكن تطبيق هذه التقنية في تحديد مواقع المورثات لأية تجمعات صبغية وللكائنات الحية جميعاً .

كما يمكن استخدام تهجين الأحماض النووية لتحديد مورث معين على قطعة حامض نووي DNA بالطرق التي سبق الحديث عنها في فصل تهجين الأحماض النووية وعزل المورثات . ولنأخذ البحث التالي لتحديد قطعة الحامض النووي DNA مستخلصاً من كريات الدم البيضاء البشرية ومجس موسم إشعاعياً مؤلف من المورث السرطاني الفايروس V-abl .

يقطع الحامض النووي البشري بأنزيم Eco RI مثلاً وتهجير قطع الحامض النووي كهربائياً عبر هلام الأجاروز . تنقل حزم الحامض النووي بعد معاملة الهلام بمحلول قاعدي لفصل أشرطة الحامض النووي إلى ورقة نتروسليلوز أو نايلون حسب طريقة وذمة ساوثرن (أنظر فصل الانزيمات) .تثبت قطع الحامض النووي جيداً على الورقة بواسطة الحرارة العالية (80م) مع تفريغ الهواء وتصبح الورقة عندئذٍ جاهزة للتهجين .

يضاف محلول التهجين الى الورقة باستخدام كيس نايلون يمكن غلقه حرارياً . بعد مرور 18-24 ساعة من التهجين تغسل الورق] من المواد الزائدة جيداً وتغطى بفلم أشعة أكس وتحفظ في غلاف خاص عند درجة حرارة 70-م لمدة 7-14يوماً . يحمض الفلم بعد ذلك وتحلل النتائج . تظهر النتائج في مثل هذا البحث كحزم أو حزمة واحدة . في مثل هذا البحث فأن قطعة الحامض النووي التي تحمل المورث السرطاني البشري c-able ستظهر عند حجم 2.9 كيلو قاعده Kb (شكل10-3) .

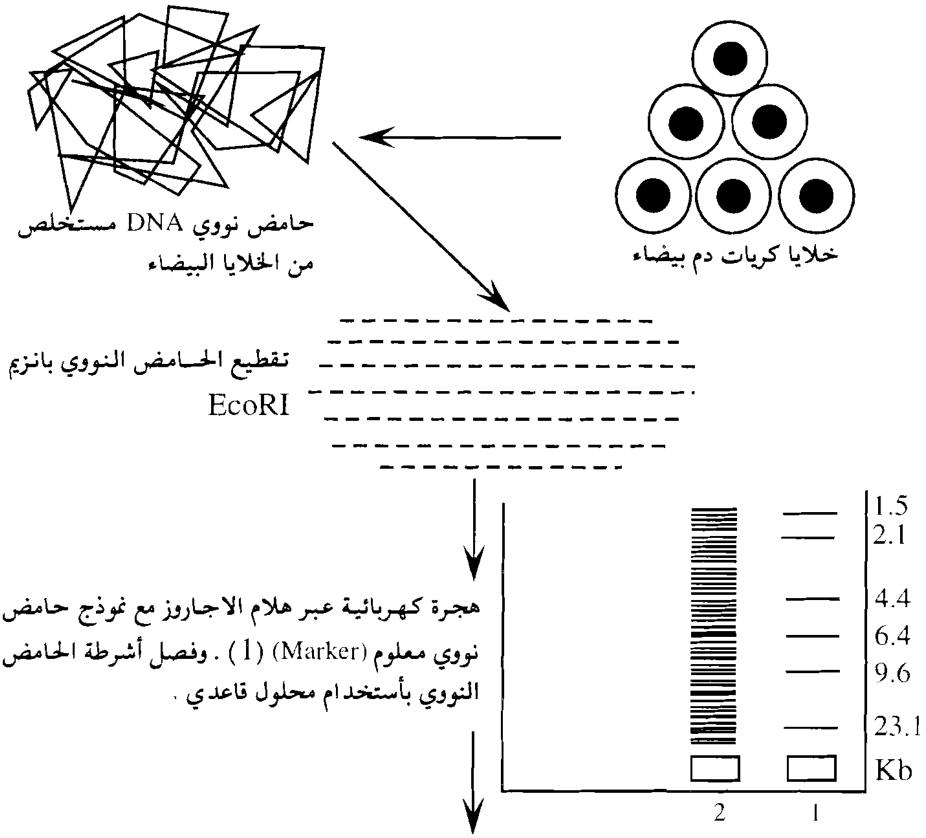
## ثانياً: ايجاد العلاقات التطورية بين الأنواع:

*Polymorphism or Evolutionary releatednes between species.*

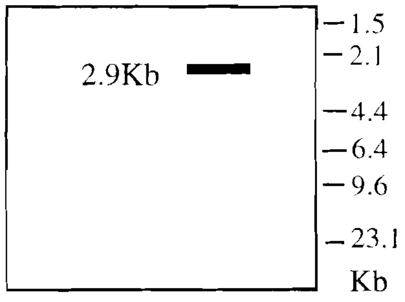
يمكن ايجاد العلاقات التطورية لأنواع معينة موجودة في أماكن مختلفة باستخدام طرق الهندسة الوراثية . إذ توفرت نتائج مثل هذه الأبحاث المعلومات اللازمة لبناء ما يدعى بالأشجار التطورية التي توضح العلاقات التطورية بين هذه الأنواع . ولنأخذ مثلاً أحد هذه الأبحاث العلمية التي تهدف ايجاد العلاقات التطورية بين نوعين من المحار يدعى الأول **Mytilus edulis** . والثاني **M. gallopro-vincidlis** تنتشر على السواحل البريطانية والإيطالية واليونانية وهناك خلاف علمي حول تصنيفهما .

استخدم الحامض النووي DNA المستخلص من المحار **M.edulis** والذي جمع من سواحل مدينة سوانزي في بريطانيا لأجل بناء مكتبة مورثات باستخدام الناقل EMBL4 . ويمكن مشاهدة تخطيط لعملية بناء هذه المكتبة الوراثية في الشكل .

اختيرت مستعمرة عشوائية من هذه المكتبة لأجل استخلاص الناقل الهجين لاستخدامه كمجس بعد توسيمه بنظير مشع للبحث عن ترددات النيوكليوتيدات المتممة له في نماذج أحماض نووية للأنواع السابقة والمجموعة من أماكن مختلفة بعد معاملتها أنزيمياً وتهجيرها كهربائياً عبر هلام ونقلـــها إلى ورقة نتروسليـــلوز أو نايلون .




- نقل نماذج الحامض النووي الى ورقة نايترو سليلوز أو نايلون بطريقة وذمه ساوثرن .
- تثبيت نماذج الحامض النووي على الورقة وتهجينها مع المجس $^{32}$P-V-ab .
- تغطية الورقة بعد غسلها بفلم اشعة اكس وحفظها لمدة 7-14 يوماً ثم تحميضه .
- تحليل النتائج .




**(شكل 10-3) : تشخيص المورث c-abl البشري على قطعة حامض نووي DNA معينة باستخدام مجس V-abl موسم بنظير الفوسفور 32 ($^{32}$P) .**

بعد تهجين الورقة التي تحمل نماذج الأحماض النووية DNA بالمجس السابق كانت النتائج التي ظهرت على فلم أشعة أكس بعد تحميضها كالتالي (جدول 2-10) .

| M.edulis Mumbles | M.edulis Mumbles | M.edulis Mumbles | M.gallo Provinvialis Padstow | M.gallo Padstow | M.gallo Padstow |
|---|---|---|---|---|---|
| 14.45 | 15.13 | 11.2 | 9.12 | 14.79 | 11.74 |
| 12.58 | 14.45 | 8.70 | 8.70 | 13.48 | 10.00 |
| 11.74 | 12.58 | 7.76 | 7.31 | 8.70 | |
| 10.00 | 9.12 | | | | |
| 4.030 | | | | | |
| 2.70 | 2.70 | 2.70 | 2.70 | 2.70 | 2.70 |
| 1.69 | 1.69 | 1.69 | 1.69 | 1.69 | 1.69 |

| M.gallo Provinvialis Greek | M.gallo Greek | M.gallo Provinvialis Italy | M.gallo Italy | M.gallo Italy | M.gallo Italy |
|---|---|---|---|---|---|
| 16.59 | 15.84 | 20.41 | 15.13 | 15.84 | 15.84 |
| 11.74 | 11.74 | 16.98 | 9.45 | 12.30 | 13.80 |
| 8.51 | 9.33 | 12.30 | 8.91 | 8.91 | 10.47 |
| 7.76 | 5.51 | 8.91 | | 6.76 | 8.91 |
| 6.76 | 6.40 | 5.12 | | 6.02 | 5.51 |
| 5.75 | | 4.26 | | 5.37 | |
| 4.78 | | | | 3.31 | |
| 4.30 | | | | | |
| 3.31 | | | | | |
| 2.70 | 2.70 | 2.70 | 2.70 | 2.70 | 2.70 |
| 1.69 | 1.69 | 1.69 | 1.69 | 1.69 | 1.69 |

**جدول 2-10: حزم الحامض النووي المماثلة (Homologous) للمجس في نماذج حامض نووي DNA تعود لنوعين في المحار الذي جمع من مناطق مختلفة من العالم.**

كما يمكن من بناء جدول آخر (جدول 10-3) من الجدول الأول يتم من خلاله بيان قطع الحامض النووي المشتركة بين الأنواع .

من خلال نتائج جدول رقم 10-2 فأنه يظهر بأن قطعة الحامض النووي التي استخدمت كمجس مؤلفة من حامض نووي متكرر Repititive DNA حيث ظهرت حزم حامض نووي كثيرة جداً مما جعل النتائج معقدة جداً ومع ذلك فأن حزم الحامض النووي المشتركة توضح بأنْ هناك علاقة تطورية بين محار الشواطئ البريطانية ومحار شواطئ البحر المتوسط .

كما تظهر النتائج الابتعاد التطوري بين نوعي محار الشواطئ المتوسطية مقارنة بالقرابة الواضحة بين نوعي محار الشواطئ البريطانية .

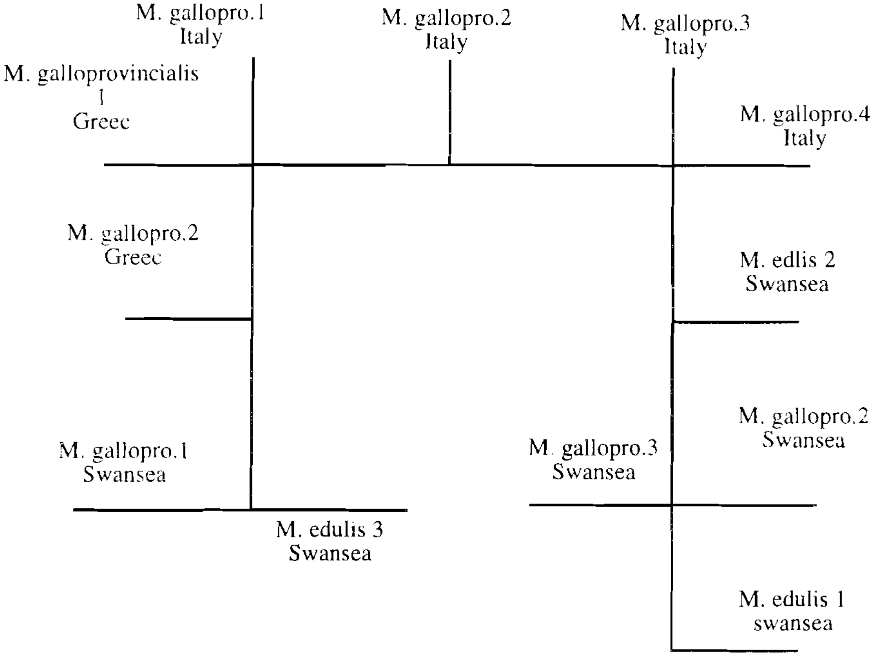
ونستطيع أيضاً من خلال قطع الحامض النووي المشتركة بين نماذج الأحماض النووية لنوعي المحار بناء شجرة تطورية توضح العلاقات التطورية بين أحياء المواقع المختلفة من المحار (الشكل 10-4) .

كما يمكن استخدام نفس طريقة البحث لايجاد علاقات القرابة بين الأفراد وكذلك توضيح علاقات الأبوة والنسب ، وأسوق في هذا المجال مثالاً حقيقياً يوضح أهمية مثل هذه الأبحاث في حل المشاكل الاجتماعية .

حصل في بريطانيا في أن امرأة أفريقية مقيمة في بريطانيا بشكل مستمر قدمت من بلدها وهي ترافق ابنا لها إلى هذا البلد وحصل ابنها إستناداً إلى إقامة أمه على الإقامة الدائمة في بريطانيا . إلا أن الشرطة البريطانية حصلت على معلومات تبين لها بأن الصبي الذي أدخلته السيدة الأفريقية ليس سوى ابن أختها وليس ولدها كما هو مثبت في وثيقة سفره أو كما أدعت السيدة . وقد نفت السيدة الأفريقية نفياً قاطعاً ما ذكرته الشرطة البريطانية حول ولدها إلا أنه تم ترحيله إلى بلده بسبب إصرار الشرطة .

| Band (Kb) | M.edulis Mumbles | M.edulis Mumbles | M.edulis Mumbles | M.gallo Provinvialis Padstow | M.gallo Padstow | M.gallo Padstow | M.gallo Provinvialis Greek | M.gallo Greek | M.gallo Provinvialis Italy | M.gallo Italy | M.gallo Italy | M gallo Italy |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 15.84 | | | | | | | | + | | | + | + |
| 15.13 | | + | | | | | | | | + | | |
| 14.45 | + | + | | | | | | | | | | |
| 12.58 | + | + | | | | | | | | | | |
| 12.30 | | | | | | | | | + | | + | |
| 11.74 | + | | | | | + | + | + | | | | |
| 10.00 | + | | | | | + | | | | | | |
| 9.12 | | + | | + | | | | | | | | |
| 8.91 | | | | | | | | | + | + | + | + |
| 8.70 | | | + | + | + | | | | | | | |
| 8.51 | | | | | | | + | + | | | | + |
| 7.76 | | | + | | | | + | | | | | |
| 6.76 | | | | | | | + | | | | | |
| 4.30 | + | | | | | | + | | | | + | |
| 3.31 | | | | | | | + | | | | + | |

جدول 10-3 : قطع الحامض النووي المشتركة بين نوعي المحار المستخدمة في الدراسة والتي تم جمعها من مناطق مختلفة من العالم.




(الشكل 10-4): بناء الشجره التطورية استناداً إلى قطع الحامض النووي المتماثلة بين نماذج نوعين من المحار الذي جمع من مناطق مختلفة من العالم.

وأقامت هذه السيدة الجليلة دعوى قضائية ضد الشرطة البريطانية أمام إحدى المحاكم البريطانية وطالبت بضم ابنها إليها وتسهيل مهمة عودته إلى بريطانيا ، لقد درس القاضي أوراق القضية واستمع إلى الأم ومحاميها وقرر أخيراً اللجوء إلى العلماء والباحثين لتقديم أدلة طبيبة وعلمية حول الموضوع لإصدار الحكم . إضافة لفحوصات مجاميع الدم كلفت المحكمة عدداً من الباحثين لتقديم أدلة إضافية .

تم استخلاص الأحماض النووية DNA من الأم والصبي واستخدمت طريقة تهجين الحامض النووي باستخدام مجس عشوائي من مكتبة وراثية تم بناؤها من الحامض النووي المستخلص من الأم مرة و باستخدام مجسات بشرية مرة أخرى .

بينت نتائج حزم الحامض النووي بوجود علاقة وطيدة جداً بين السيدة والصبي تسمح وبشكل كبير اعتبارهما أم وولدها . طابقت هذه النتيجة ما توصلت إليه نتائج إختبارات فصائل الدم واستناداً إلى هذه النتائج أصدرت المحكمة حكماً باعتبار الصبي ابناً للسيدة والسماح له بالإقامة في الأراضي البريطانية .

وشاءت الأقدار أن يموت الصبي مدهوساً بسيارة طائشة قبل يوم واحد من ظهور الحكم . وهكذا ساهم العلم في حل مشكلة اجتماعية أنهتها الأقدار بطريقة درامية خيالية .

**ثالثاً: الأبحاث الخاصة بالأدلة الجرمية وتشخيص المجرمين**

وهي أبحاث تجري لأجل تقديم أدلة جنائية باستخدام طرق الهندسة الوراثية . تعتمد طريقة البحث على استخدام ما يعرف اليوم ببصمة الحامض النووي DNA DNA Fingerprint وهي بصمة مميزة لكل فرد ،يمكن من خلالها تمييز حتى التوأم المتطابقة . تعتمد هذه الطريقة على وجود ترددات فريدة Uniqe sequences في كل فرد بحيث تختلف من فرد إلى آخر .

تدعى مثل هذه الترددات بالترددات التابعية Satellite DNA ويمكن مشاهدتها عند تقطيع الحامض النووي بأنزيمات معينة وترحيلها كهربائياً عبر هلام الأجاروز .

وقد قام العلماء بعزل عشرات المواقع التي تمثل هذه الترددات الفريدة لاستخدامها كمجسات في الأبحاث الخاصة بالأدلة الجرمية أو غيرها . وأسوق في هذا المجال الحادثة الحقيقية التالية التي حصلت في مقاطعة ويلز في بريطانيا حيث استخدمت مثل هذه الأبحاث لحل لغز جريمة مروعة هزت منطقة ريفية في المقاطعة .

تعرضت شابة في مقتبل العمر إلى اغتصاب وحشي مقترن بالعنف أثناء عودتها من سهرة مع أصدقائها ، قام الأصدقاء بعد الانتهاء من السهرة بمرافقة صديقتهم بالسياره وأنزلوها بالقرب من الطريق العام الذي يؤدي إلى قرية قريبة حيث يقع منزل والديها بعيداً عن الشارع . وكان على الشابة الضحية أن تقطع مسافة من الأراضي الزراعية التي تعج بالنباتات البرية الطويلة للوصول إلى منزلها . قام المجرم بمفاجأة الضحية في تلك المنطقة وتمكن من السيطرة عليها وأغتصابها بعنف أدى إلى فقدانها الوعي لمدة ساعة كاملة . قامت الضحية بعدها بطلب النجدة واستجاب لها عدد من الفلاحين الذين كانوا مارين بالقرب من منطقة الحادث وقاموا بنقلها الى مركز صحي قرب القرية .

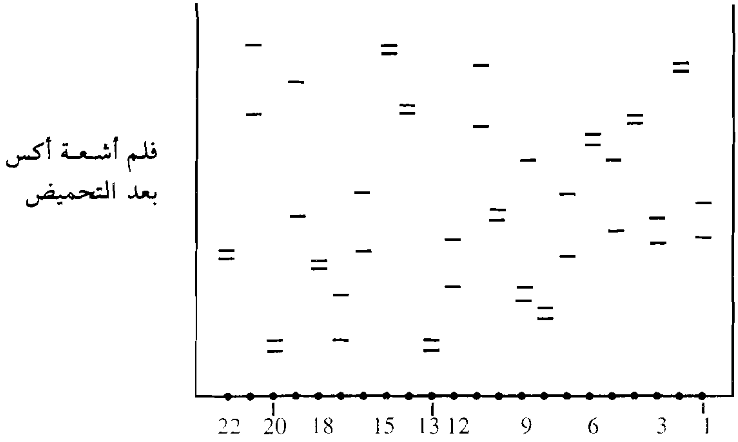
استدعى طبيب المركز الصحي الشرطة التي طلبت منه استخلاص السوائل المنوية من الضحية وحفظها بطريقة علمية لاستخدامها فيما بعد . قامت الشرطة بعد ذلك باستدعاء ذوي الضحية واستجوبت الضحية أمامهما واستناداً إلى المعلومات التي قدمتها الفتاة فأن المجرم هو شاب يتراوح عمره بين 30-35 سنة وليست هناك معلومات أخرى عن أوصافه وطوله وغير ذلك . قام أفراد الشرطة بالبحث في كل مكان حول موقع الجريمة واستناداً إلى المعلومات التي توفرت لديهم تأكدوا بأن المجرم هو أحد شباب القرية المجاورة . وفي صباح اليوم التالي استطاعت الشرطة أن تحصر الشبهات في أحد وعشرين شاباً تقع أعمارهم ضمن عمر 30-35 سنة ولم يتوفر لدى الشرطة أي دليل لتوجيه الاتهام لأي منهم . لذلك لجأت إلى مجموعة من الباحثين للمساعدة في تقديم أدلة علمية للقبض على الجاني . قامت مجموعة الباحثين باستخلاص نماذج حامض نووي تعود لواحد وعشرين شخصاً .

ثم قاموا بمعاملتها أنزيمياً لتقطيعها ثم تهجيرها كهربائياً عبر هلام ونقلها بعد ذلك إلى ورق نتروسليلوز أو نايلون .

قام الباحثون باستخدام عدة قطع بشرية فريدة كمجسات لفحص الأحماض النووية للمشتبه بهم . كانت النتائج في كل مرة تبين بعدم وجود تشابه بين نماذج الحامض النووي الأحد والعشرين ونموذج الحامض النووي المستخلص من الحيوانات المنوية المعزولة من الفتاة الضحية والمهجن بنفس المجسات . ولاحظ الباحثون وجود نموذجين من نماذج الأحماض النووية المشتبه بأصحابها متشابهة تماماً في الإشارة ولجميع المجسات المستخدمة .

استنتج هؤلاء الباحثون وبكل سهولة بأن هذين النموذجين يعودان لشخص واحد . وهكذا وبالعودة إلى معلومات الشرطة التي احتفظت بأسماء المتهمين مقابل كل رقم من أرقام نماذجهم تعرفت على صاحب النماذج المكررة التي ظهرت عند التحليل الوراثي وألقت القبض عليه وعند مواجهته بحقيقة تبرعه بنموذجين من الدم للتستر على الجاني اعترف بذلك وقام بإخبار الشرطة باسم الشخص المطلوب للعدالة التي سارعت في القبض عليه وأخذت بعدها العدالة مجراها في محاكمة الجاني والشخص الذي حاول التستر عليه (الشكل 10-5) .

إن مثل هذه الجريمة تعتبر جريمة سهلة الكشف عن غموضها ذلك لتوفر معلومات مفيدة من الضحية التي بقيت على قيد الحياة إضافة إلى المعلومات التي وفرها موقع الجريمة نفسه . ولكن هناك جرائم قتل واعتداء تؤدي إلى الوفاة ويصعب الحصول على معلومات من موقع الجريمة لحصر الشبهات . لذلك فأنه في مثل هذه الحالة فأن وجود بقع دموية أو بقايا أنسجة جلدية أو خصل شعر في موقع الجريمة أو ملتصقة في جسم الضحية مثل وجود بقايا الجلد في أظافر يد الضحية نتيجة المقاومة أو إصابة الجاني قبل موت الضحية يمكن أن تساعد هذه في استخلاص الحامض النووي DNA والاحتفاظ به لأجل مقارنته مع أي مشتبه يمكن أن تصل إليه يد العدالة . ويمكن الآن الاستفادة حتى من 10 خلايا فقط لتهيئة مثل هذه النماذج ولو كانت هذه الخلايا ضمن بقعة دموية صغيرة جداً وجافة . أذ يتم تصنيع نسخ مكررة من هذا الحامض النووي مختبرياً باستخدام تقنية تضخيم الجين أو تفاعل سلسلة البوليمريز Polymerase chain reaction (PCR) .




نماذج الحامض النووي المعاملة بأنزيم قاطع معين بعد تهجينها
بمجس مؤلفا من تردد ثنائي النسخة .

**(الشكل 10-5): استخدام تقنية بصمة الحامض النووي DNA للتعرف على المجرمين. النماذج 2-22 تعود لنماذج حامض نووي DNA للمشتبه بهم بينما يعود النموذج رقم (1) لنموذج الحامض النووي DNA المستخلص من الحيوانات المنوية المأخوذه من الضحية. يلاحظ بأن النموذج رقم (13) ورقم (20) يعودان لشخص واحد ولا يوجد تشابه بين النماذج الخاصة بالمشتبه بهم والنموذج رقم (1)، استخدم في هذا المثال قطعة حامض نووي ثنائية النسخة كمجس موسم بنظير الفوسفور 32 ($P^{32}$).**

## رابعاً: تحديد تتابع المورثات على الصبغي أو المشية على الصبغي

*Chromosome walking or Overlap hybridization*

يمكن أن تستخدم تقنيات الهندسة الوراثية في تحديد تتابع المورثات على الصبغيات وعلى الرغم من أن هذه التقنية محصورة بالجينات الصغيرة والمتوسطة مثل مجينات البلازميدات أو العاثيات أو البكتيريا إلا أنها تستخدم على نطاق ضيق فيما يتعلق بمجينات الأحياء الراقية للصعوبة الكبيرة الناشئة عن وجود ترددات متكررة جداً بين مورثات هذه الأحياء .

تتم في هذه الطريقة تهيئة مكتبتين وراثيتين لجين البكتريا مثلاً باستخدام أنزيمين قاطعين مثل Hind III و Sau 3A لتهيئة قطع متراكبة Overlaped .

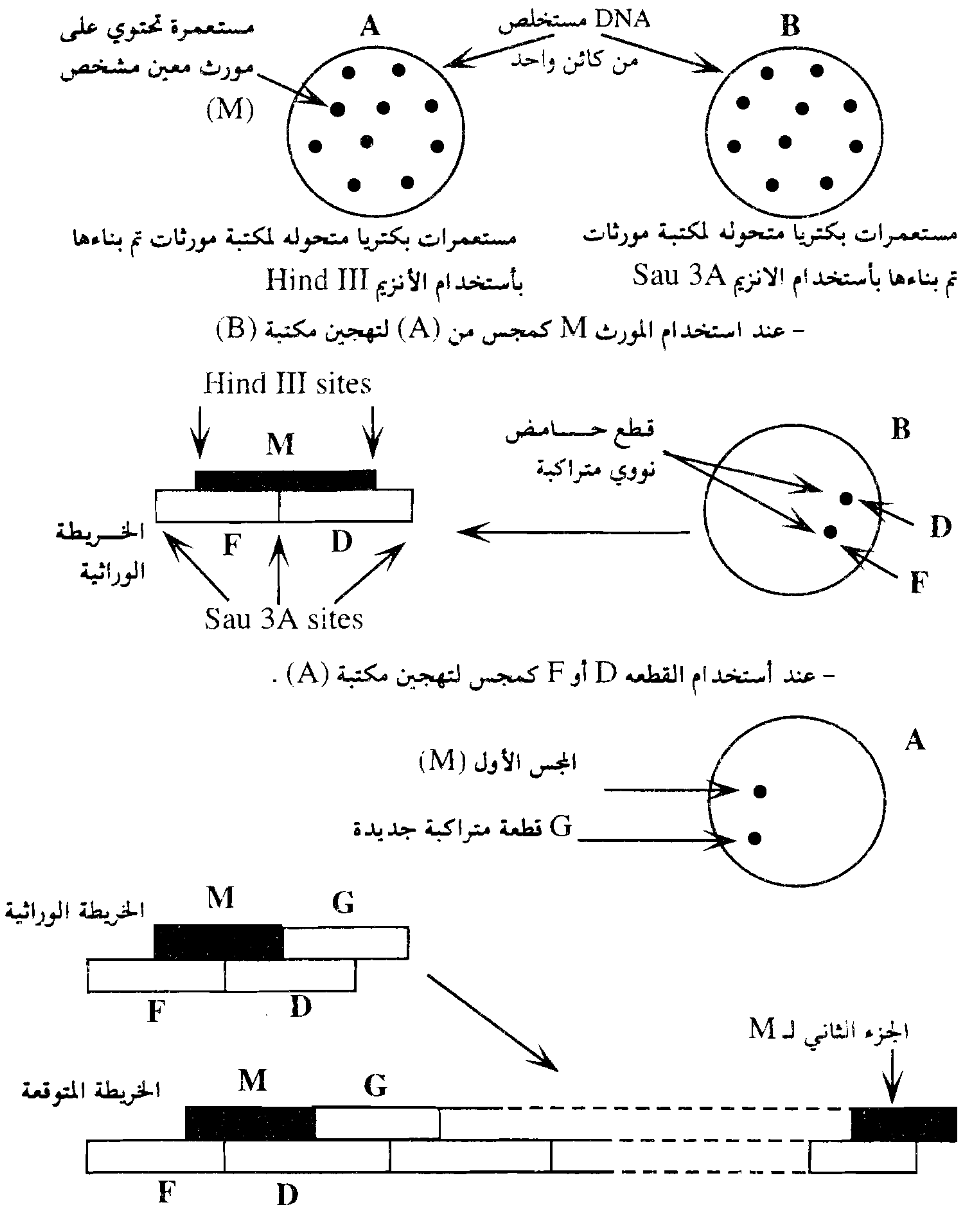
يتم اختيار قطعة حامض نووي من المكتبة التي استخدم فيها الأنزيم Hind III مثلاً ولنرمز لهذه المكتبة بالحرف A على أن تمثل هذه القطعة مورث معين سبق تعيينه وتشخيصه ولنفترض أنه المورث (M) . يستخدم المورث M بعد توسيمة إشعاعياً كمجس لتهجين المكتبة (B) .

يظهر من خلال هذا التهجين أن هناك على الأقل مستعمرة واحدة تحمل إشارة إشعاعية توضح وجود نفس المورث في قطعة الحامض النووي DNA المحمولة في الناقل الهجين لهذه المستعمرة .

تستخدم هذه المستعمرة أو المستعمرات الأخرى إن وجدت لاستخلاص مجس أو مجسات لأجل تهجين المكتبة (A) . أذ تظهر إشارة إشعاعية واحدة وربما أكثر مع كل مجس مستخدم . تعاد عملية التهجين بشكل متناوب بين المكتبة (A) و (B) في كل مرة تظهر مستعمرة جديدة . ومن خلال تسجيل المعلومات يمكن بناء تتابع المورثات أو قطع الحامض النووي DNA (الشكل 10-6) .

تعتبر أبحاث تحديد تتابع قطع الحامض النووي لصبغي معين مهم جداً في تحديد مواقع أنزيمات القطع على هذا الصبغي مما يساعد في بناء خريطة أنزيمية ذات فائدة كبيرة في حالة الحاجة إلى عزل مورثات جديدة من نفس الصبغي .

وإضافة إلى ما سبق من مجالات البحث العلمي التي يمكن فيها استخدام تطبيقات الهندسة الوراثية فقد وردت في الفصول السابقة العديد من الأهداف العلمية المختلفة التي يمكن أن تكون إضافة إلى ما ذكر هنا وأخص بالذكر تعيين تركيب المورثات عن طريق استخدام طريقة ماكسام وجلبرت وغيرها لقراءة ترددات نيوكليوتيدات أي مورث . ويذكر بأن هناك مشروعاً علمياً ضخماً يجري إعداده منذ سنوات يدعى بمشروع خرطنة الجين البشري الذي يستهدف وضع خرائط وراثية مفصلة عن جميع مورثات الإنسان باستخدام تقنية قراءة ترددات الحامض النووي DNA إضافة إلى حواسيب ضخمة تستطيع قراءة أكثر من 100 ألف تردد في اليوم .




**(الشكل 10-6): رسم الخرائط الوراثية لمجينات الكائنات من خلال تقنية المشية على الصبغي Chromosome Walking حيث يتم في هذه التقنية معرفة القطع المتراكبة الخاصة بمورث معين عند أستخدام أكثر من أنزيم قاطع في بناء عدة مكتبات وراثية لمجين نفس الكائن.**

وسيأتي اليوم الذي يكون فيه لدينا كشاف كامل عن المورثات التي يحملها كل صبغي أو ربما جميع الترددات التي يحملها كل صبغي من صبغيات الإنسان لأجل استخدامها في الارتقاء بالمستوى الصحي للبشرية .

## الهندسة الوراثية والبايوتكنولوجي (التقنية الحياتية)

لقد اعتبرت تقنيات الهندسة الوراثية ثورة حقيقية منذ بزوغها في أوائل سبعينات هذا القرن . وإلى الآن فأننا نستطيع أن نجد آثار هذه الثورة واضحة في حقول المعرفة الاخرى المختلفة حتى أصبح الآن وجود ترابط كبير بين هذه التقنيات والصناعة والزراعة بحيث أدى ذلك إلى ظهور ما يطلق عليه اليوم بالتقنية الحياتية أو البايوتكنولوجي . والتقنية الحياتية علم قائم من ترابط الأحياء المجهرية والوراثة والكيمياء والهندسة الكيميائية وهندسة الإنتاج . ولكل من هذه الفروع دور حيوي جزئي في هذه التقنية .

لقد أدت الطرق الكثيرة للهندسة الوراثية إلى توفير الإمكانية الآن للحصول على أحياء دقيقة متحوله أمتلكت القابلية على تصنيع بروتينات حيوانية . أن الكثير من هذه البروتينات هو ذات أهمية طبية أو صيدلانية ويتم تصنيعها من قبل الحيوانات ولكن بكمية قليلة جداً يصعب استخلاصها إضافة إلى تكاليف الكبيرة التي تستهلكها عملية الاستخلاص هذه .

وأصبح الآن عن طريق التقنية الحياتية الحصول على مثل هذه البروتينات بكميات جيدة وبطرق رخيصة تعتمد على هندسة المورثات المشفرة لهذه البروتينات في أحياء دقيقة مثل الخميرة أو البكتيريا حيث يمكن تربيتها بأعداد كبيرة في حيز صغير من المواد الغذائية .

كما يمكن إنتاج بروتينات كائن معين مثل الإنسان في كائنات أخرى مثل الفئران والأرانب والماشية وغيرها .

وسنستعرض في هذا الجزء ما يمكن استعراضه عن تطبيقات الهندسة الوراثية في مجال التقنية الحياتية .

**إنتاج الهرمونات البشرية في الأحياء الدقيقة:**

إن العديد من الأمراض البشرية تعزى إلى نقص في بروتين وظيفي مهم أو وبسبب خمول وظيفي في هذا البروتين . وافضل الامثلة على ذلك هو مرض السكري Diabetes الذي ينشأ من نقص في كمية الأنسولين الذي تفرزه خلايا جزر لانكرهانس في البنكرياس B-cells يعمل الانسولين على السيطرة على مستوى الجلوكوز في الدم ويبقيه في مستوى طبيعي 80-120 ملغم/100سم3 . وينشأ تحكمه هذا من قدرته على السماح لجزيئات الجلوكوز الزائدة في المرور عبر أغشية خلايا الأنسجة من خلال الدم مما يؤدي إلى التخلص من الكمية الزائدة من الجلوكوز . ويؤدي نقص مستوى الأنسولين أو عدم افرازه إلى زيادة مستوى الجلوكوز في الدم الذي يؤدي إلى اضطرابات عديدة قد تؤدي بالمريض إلى الموت . وعلى الرغم من نقص الأنسولين هو السبب الوحيد في ظهور مرض السكري إلا أنه النوع الأكثر شيوعاً .

لذلك فأن مرضى السكري يلجأون إلى حقن الأنسولين في مجرى الدم لتعويض الكمية الناقصة منه . أن معظم الأنسولين المستخدم في مثل هذه الحالات هو أنسولين غير بشري يأتي من خلال استخلاصه من بنكرياس حيوانات مثل الخنازير والأبقار . أن الأنسولين المستخلص من هذه الحيوانات يعتبر هرموناً مناسباً للاستعمال البشري ولكن يمكن أن تنشأ من استعماله مشاكل مختلفة لبعض المرضى .

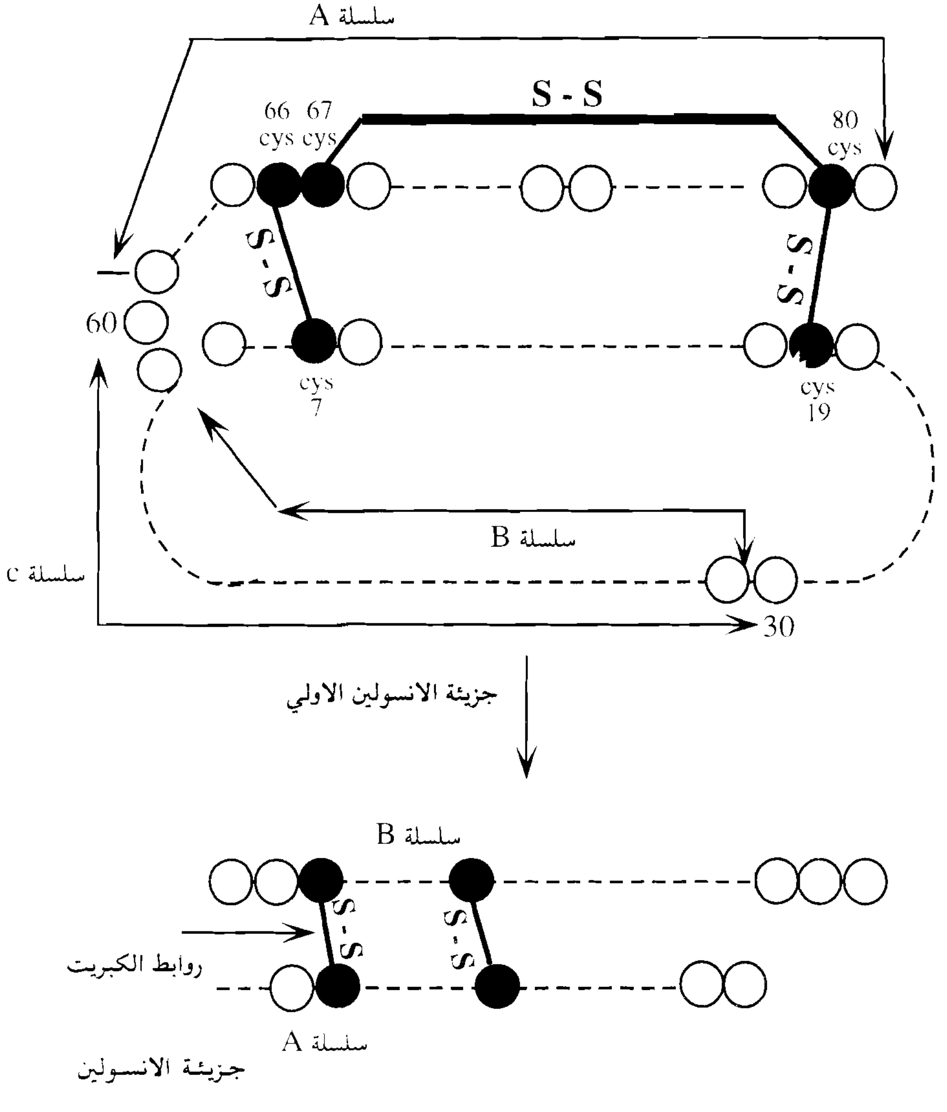
تأتي هذه المشاكل من الاختلاف بين تركيب الأنسولين البشري والحيواني مما يؤدي ذلك الى ردة فعل مناعية ضد الانسولين الحيواني . إضافة إلى ذلك فأن الأنسولين الحيواني غير نقي تماماً ويمكن أن يحتوي على مواد ملوثة بايولوجية خطرة لا يمكن ازالتها تماماً كما هي الحال في الفايروسات أو غيرها . لذلك فأن أفضل طريقة لتجنب مثل هذه المشاكل هو استخدام الأنسولين البشري . وحيث إن مثل هذا الانسولين لا يمكن الحصول عليه لذلك فأنه تم التفكير باستخدام تقنيات الهندسة الوراثية لإنتاجه في أحياء دقيقة مثل البكتيريا .

ونظراً لأن الأنسولين لا يتم تحويره بعد ترجمة الاحماض النووية المرسالة لمورثاته في الريبوسومات لذلك فأنه في حالة هندسة هذه المورثات ونقلها إلى البكتيريا فأن البروتين الذي تقوم البكتريا بصناعته سيكون نشيطاً .

هذا إضافة إلى أن بروتين الأنسولين من البروتينات صغيرة الحجم نسبياً إذ يتألف من سلسلتين عديد الببتيد مرتبطتين بأواصر كبريتية . يبلغ حجم السلسلة الأولى التي تدعى بسلسلة الفا أو (A) حوالي 21 حامضاً أمينياً بينما يبلغ حجم سلسلة بيتا أو (B) حوالي 30 حامضاً أمينياً ويمكن للأحياء الدقيقة بناء مثل هذه الجزيئات دون عرقلة تذكر .

في التصنيع الطبيعي للأنسولين في خلايا بيتا البنكرياسية فأنه يتم إنتاج سلسلتي A وB ترتبطان بسلسلة ثالثة تدعى بسلسلةC الرابطة ويدعى مثل هذا الأنسولين بالأنسولين الأولى Poinsulin . تلتف بعد ذلك جزيئة الأنسولين الأولى بطريقة معينة مستخدمة قطعة بروتينية صغيرة تدعى بالقائد Leader حيث تلتقي سلسلة A مع سلسلةB وترتبطان بروابط كبريتية تتم بعدها إزالة سلسلةC وقطعة القائد (شكل 10-7) لإنتاج جزيئة الأنسولين الطبيعيه .

مختبرياً تتوفر الآن طرق مختلفة لإنتاج جزيئة الانسولين الطبيعية وسنتحدث عن التقنية المستخدمة في صناعة هذه السلاسل وإنتاج الجزيئة الكاملة للأنسولين في الجزء التالي .




**(الشكل 10-7): الصوره الاولية والنهائية لهرمون الأنسولين البشري**

**استراتيجية إنتاج الأنسولين عن طريق الهندسة الوراثية:**

إن بروتين الأنسولين مشفر من قبل مورثين معروفين وسبق الكشف عن تردد نيوكليوتيداتهما . لذلك فأنه وبكل سهولة يمكن عزلهما من مكتبة مورثات مؤلفة من قطع DNA وعند استخدام هذه المورثات كمجسات . كما يمكن استخدام مورثات الأنسولين الخاصة بالفئران أو الأرانب كمجسات أيضاً في عزل مورثات الأنسولين من مكتبة مورثات بشرية . ونظراً لأن مثل هذا العمل يأخذ وقتاً غير قليل لأجل تهيئة هذه المورثات فأنه تم اللجوء إلى تقنية حديثة سبق الحديث عنها وهي تفاعل سلسلة البوليمريز (PCR) . نظراً لعزل مورثات الأنسولين من قبل العديد من الباحثين والشركات فأنه يمكن الحصول على هذه المورثات عن طريق الشراء أو كهدية . تفصل أشرطة المورثات بعد ذلك كل على إنفراد عن طريق وضع محلول هذه الأشرطة في حمام مائي ساخن (غليان) لمدة عشر دقائق وترك محاليل المورثات بدرجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة أخرى . يؤدي الغليان إلى تدمير الأواصر الهيدروجينية التي تربط القواعد النتروجينية لأشرطة المورثات ويؤدي التبريد بدرجة حرارة الغرفة إلى الإبقاء على هذه الأشرطة مفصولة .

تستخدم الأشرطة المفردة لهذه المورثات في تفاعل سلسلة البوليميريز .تفاعل سلسلة البوليميريز هو تفاعل أنزيمي يستخدم فيه أنزيم قطع الكلينوKlenow fragments enzyme أو انزيم Taq ومحلول النيوكليوتيدات الأربعة لأجل بناء أشرطة متممة لكل شريط مفرد من أشرطة المورثات . ويمكن بهذه الطريقة مضاعفة أعداد المورثات . كما يمكن زيادة العدد أكثر وأكثر عن طريق فصل الأشرطة المزدوجة الناتجة من التفاعل بواسطة الحرارة والتبريد كما سبق وإعادة التفاعل مرة أخرى

كما تستخدم اليوم تقنيات متطورة أخرى لأجل تصنيع مورثات الانسولين مختبرياً دون الحاجة إلى وجود مورث حقيقي .

تستند هذه التقنية إلى وجود حاسوب مرتبط مع جهاز تفاعل أنزيمي . يحتوي الجهاز الانزيمي على ست قنانٍ مرتبطة معه تمثل هذه القناني النيوكليوتيدات الأربعة

اللازمة وقنينة لأنزيم قطع الكلينو وأخرى لمحلول البفر اللازم للتفاعل ويتم تزويد جهاز التفاعل من مكونات هذه القناني آلياً واعتماداً على برنامج الحاسوب . نظراً لمعرفة تردد نيوكليوتيدات مورثات الأنسولين فأنه يمكن من خلال هذه التقنية تغذية الحاسوب بالمعلومات الخاصة بتردد مورث A مثلاً ثم إعطاء الأمر لأجل إيصال هذه المعلومات بجهاز التفاعل الأنزيمي المرتبط مع الحاسوب حيث يبدأ عندها تفاعل بناء شريط للمورث صناعياً اعتماداً على تردد نيوكليوتيدات المورث التي تم برمجتها بالحاسوب .

ويستغرق الحصول على مورث صناعي بواسطة هذه التقنية حوالي 2-5 ساعات . يجمع محلول الأشرطة الصناعية الخاصة بالمورث وتضخم باستخدام تفاعل PCR . وسواء تم الحصول على مورثات B وA بالطريقة الأولى أو الطريقة الثانية فأنه تتم هندسة هذه المورثات إلى ناقل تعبير مناسباً . ونواقل التعبير هي نواقل تسمح للمورث المهندس معها بالتعبير عن نفسه عبر إنتاج البروتين أو سلسلة عديد الببتيد المشفر لها .

تأتي قدرة هذه النواقل على السماح بتعبير المورث على احتوائها على مواقع تحفيزية Promoters قوية تعود لمورثات بكتيرية غالباً مثل البادئ التحفيزي الخاص بالمورث Lac . Lac Promoter أو موقع تحفيز الميتالوثيونين Met -Promoter أو غيرها من المحفزات .

ولنفترض أنه استخدم في الهندسة الوراثية ناقل تعبير يحتوي على المحفز Lac . تنقل النواقل الهجينة إلى بكتيريا القولون E.coli باستخدام طريقة التحول التي سبق الحديث عنها وتنمى البكتيريا المتحولة في أوساط غذائية سائلة بدرجة حرارة مناسبة .

تستخلص بعد ذلك سلاسل عديد الببتيد من كل وسط زرعي تم يتم التخلص من القطع الخاصة بأنزيم بيتا جلاكتوسايديز B-glactosidase المرتبطة مع سلاسل B وA عن طريق إضافة مادة بروميد السيانوجين Cyanogen Bromide .

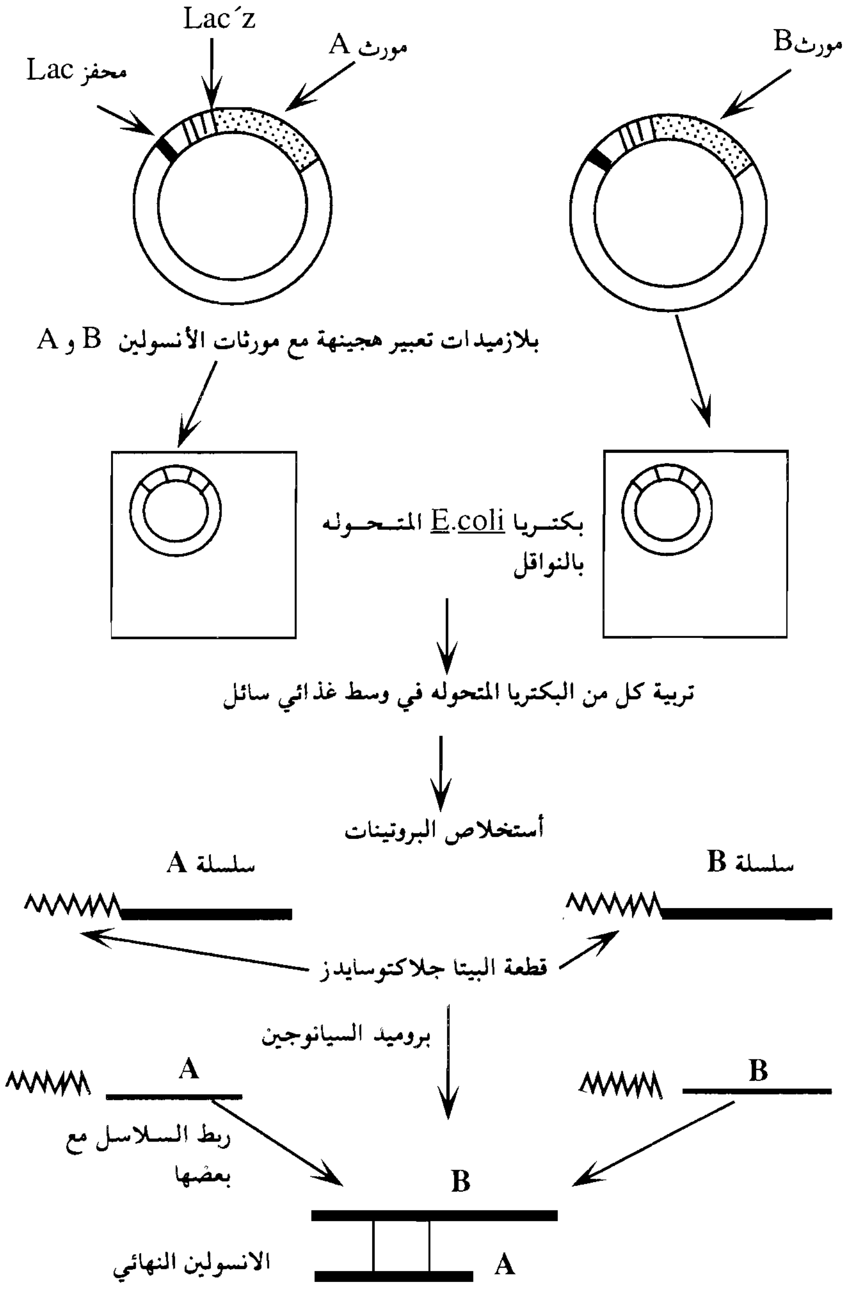
ترتبط سلسلة A مع B بواسطة الأواصر الكبريتية تلقائياً عند وجودهما معاً في محلول واحد (شكل10-8) أو عن طريق تفاعل . إن سلاسل عديد الببتيد الناتجة عن التعبير في البكتريا تكون هجينة مع قطعة صغيره تمثل أنزيم بيتا جلاكتوسايديز . وتفصل هذه القطع عن تردد سلاسل عديد الببتيد الخاصة بالأنسولين بواسطة الميثونين . وينتج هذا الهجين بسبب وجود مورث(A) أو (B) بجوار جزء من مورث LacZ المرتبط مع المحفز . يعمل بروميد السيانوجين على فصل سلاسل عديد الببتيد A وB عن القطع الزائده الخاصة ببروتين المورث Lacz من موقع وجود الميثونين .

## استراتيجية إنتاج الهرمونات البشرية المنظمة للنمو

يخضع نمو الإنسان إلى عدد مختلف من الهرمونات إلا أن أكثرها تأثيراً هما هرمون السوماتوتروبين Somatotropin الذي يطيل العظام البشرية وهرمون السوماتو ستاتين Somatostatin الذي يؤدي إلى عرقلة نمو العظام الطولي وهو بذلك الهرمون المسيطر على عمل الهرمون الأول . ويعتبر هذان الهرمونات من الهرمونات ذات الأهمية الطبية الفائقة في مجال اختلال النمو الطولي للأفراد . فهرمون السوماتوستاتين يستخدم طبياً لمعالجة حالات الطول الفائق لدى الأطفال بينما يستخدم هرمون السوماتوتروبين لمعالجة حالات التقزم لدى الاطفال .

تختلف ستراتيجية إنتاج هذين الهرمونين بسبب الاختلاف في تعقيدهما فيبلغ طول هرمون السوماتوستاتين حوالي 14 حامضاً أمينياً وهو بذلك يمثل سلسلة عديد ببتيد قصيره جداً تشفر من مورث صغير الحجم لا يتجاوز 50 زوجاً قاعدياً ويمكن بكل سهولة بناء مورث صناعي شبيه له مختبرياً باستخدام تقنية PCR السابقة .

بينما يبلغ طول بروتين هرمون السوماتوتروبين حوالي 191 حامضاً أمينياً تشفر من مورث كبير يبلغ حجمه حوالي 600 زوج قاعدة . ونظراً لسعة حجم المورث المشفر لهرمون السوماتوتروبين لذلك فأن أفضل طريقة لهندسته هو باستخدام مكتبة مورثات cDNA مستخلصة من الغدة النخامية التي هي مصدر إفراز هذا الهرمون .




(الشكل 10-8): ستراتيجية انتاج الانسولين عن طريق الهندسة الوراثية

## إنتاج هرمون السوماتوستاتين

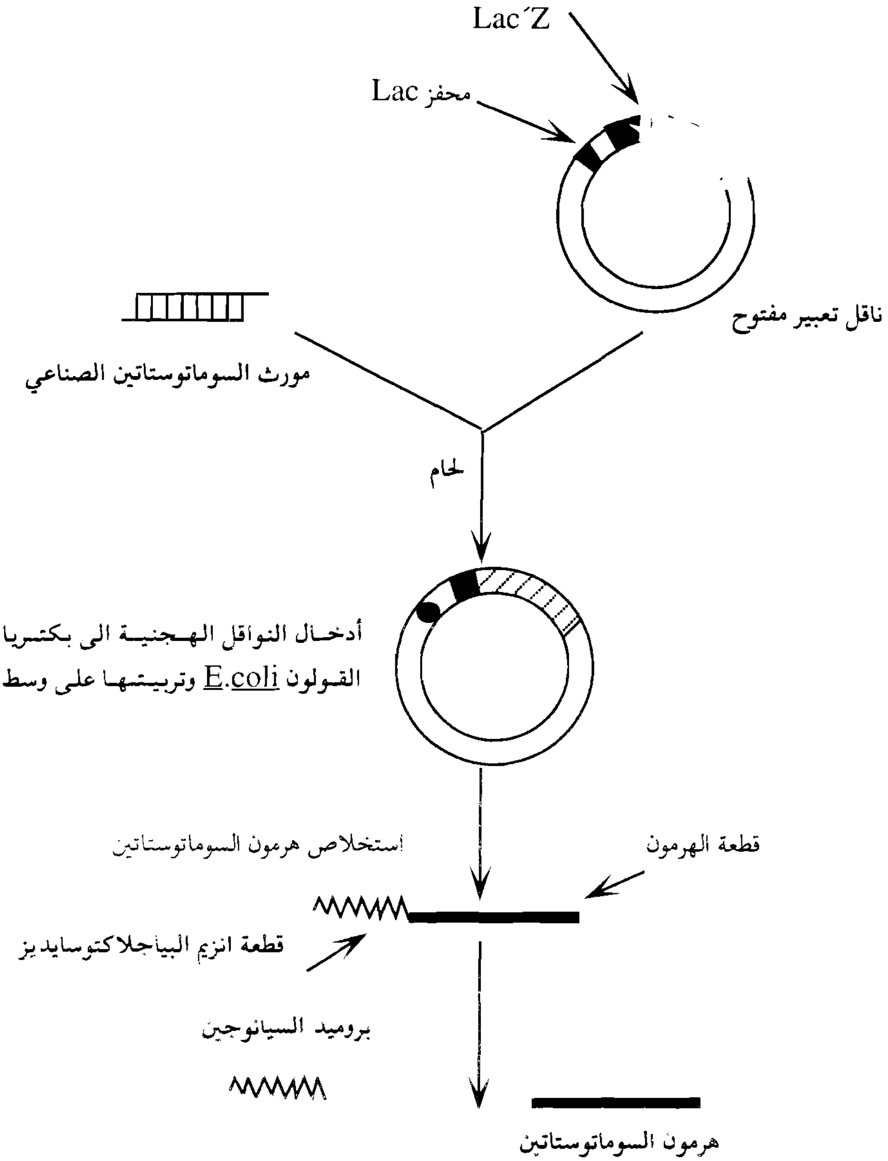
تستخدم في أنتاج هرمون السوماتوستاتين نفس التقنية المستخدمة في إنتاج الأنسولين من قبل بكتيريا القولون E.coli التي سبق الحديث عنها . يهندس المورث الصناعي النظير لمورث هرمون السوماتوستاتين الطبيعي في ناقل يحتوي على محفز Lac وتدخل النواقل الهجينة إلى بكتيريا القولون بطريقة التحول . تنمى البكتيريا المتحولة في وسط غذائي سائل تحت ظروف مناسبة حيث يتم التعبير عن المورث وإنتاج الهرمون المطلوب يستخلص الهرمون بالطرق الكيميائية ويتم التخلص بعد ذلك من القطعة الزائدة التي تمثل جزءاً من انزيم بيتاجلاكتوسايديز عن طريق قطع سلسلة عديد الببتيد الهجينة من موقع الحامض الاميني ميثونيين باستخدام بروميد السيانوجين . ينقى بعد ذلك الهرمون ليتم تجريبه وإجراء الدراسات عليه (شكل10-9) .

## إنتاج هرمون السوماتوتروبين :

نظراً لسعة حجم المورث المشفر لهذا الهرمون فأنه يتم استخدام مكتبة مورثات cDNA مبنية من مزيج لحوامض نووية مرسالة مستخلصة من خلايا الغدة النخامية Pituitary gland .

تعزل قطعة الحامض النووي المتمم cDNA التي تمثل المورث المطلوب من الناقل الهجين بعد استخلاصه من المستعمرة المناسبة من مكتبة المورثات . **تحتوي قطعة** الحامض النووي cDNA على تردد يتراوح معدله حوالي 23 زوجاً قاعدياً **يقع في** مقدمة هذه القطعة يمثل ترددات منطقة الدال Leader **في الحامض النووي** المرسال .

**ولاختلاف هذه الترددات في الأحياء حقيقية النوى عن ما هي في الأحياء بدائية النوى فأنه لا يمكن ترجمة الحامض النووي المرسال الناتج عن قطعة cDNA التي تمثل المورث هرمون السوماتوتروبين في البكتريا . لذلك فأنه لا بد من التخلص أولاً من القطعة التي تمثل تردد القائد في الحامض النووي cDNA واستبدالها بقطعة قائد مصنع مختبرياً مناسبة لظروف التعبير في البكتيريا .**




(الشكل 10-9): الاستراتيجية العامة لإنتاج هرمون السوماتوستاتين باستخدام تقنيات الهندسة الوراثية

يتم التخلص من تردد القائد في قطعة الحامض النووي المتمم cDNA باستخدام أنزيم Hae III الذي يمتلك موقع قطع وحيد يقع بعد 25 نيوكليوتيداً من بداية قطعة الحامض المتمم مما يؤدي إلى فصل قطعة الحامض النووي الى قطعة طويلة تمثل شفرات المورث وقطعة صغيرة تمثل منطقة القائد .

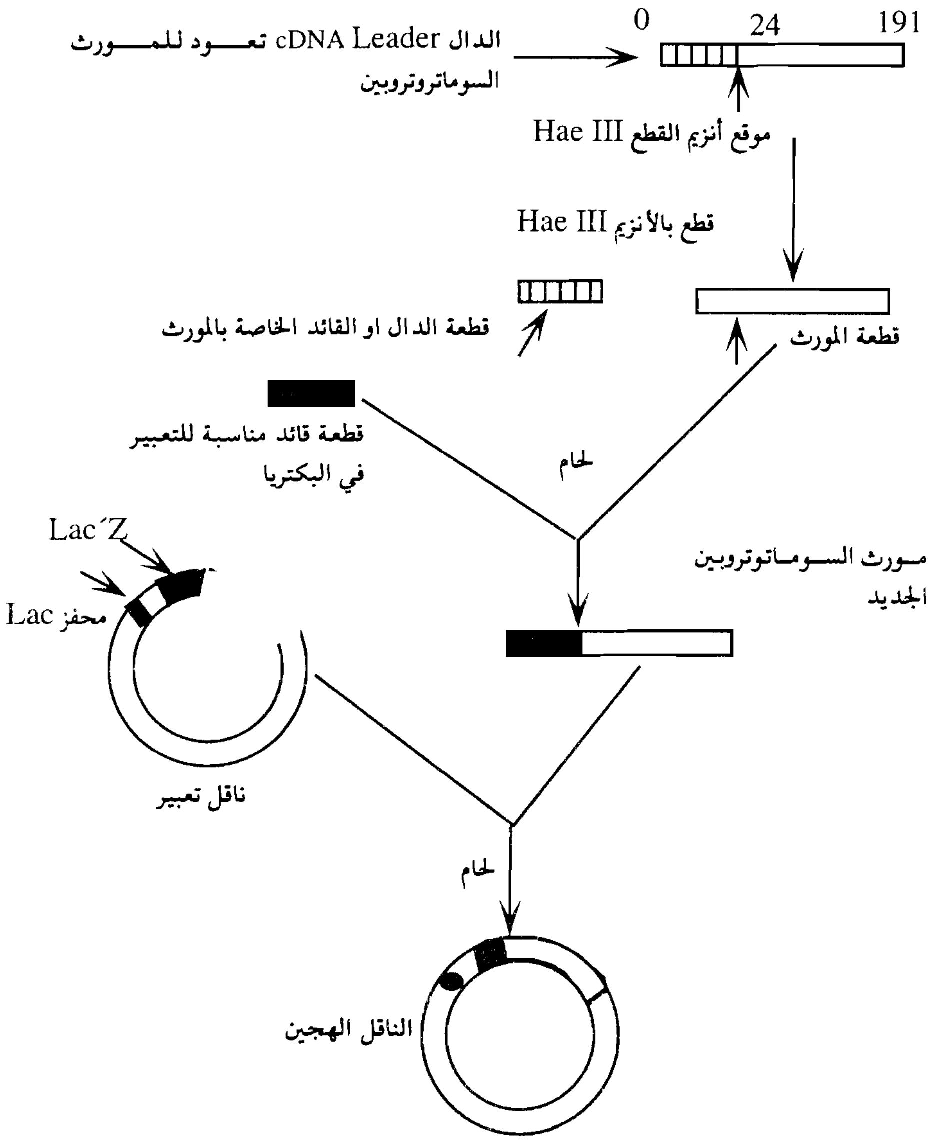
تستخلص القطع الطويلة الحجم باستخدام الهجرة الكهربائية عبر هلام وتهيىء للهندسة مع الناقل المناسب .

إن أنزيم القطع Hae III يؤدي إلى إنتاج قطع ذات نهايات مستوية (عمياء) لذلك فأنه يتم لحام قطعة رابط Linker على سبيل المثال في النهاية العمياء من القطع الطويلة وكذلك قطع رابطة متممة مع قطعة القائد الصناعية التي يراد لحامها مع المورث بدلاً من القطعة التي تم حذفها .

تربط قطع القائد الصناعية المناسبة للتعبير في البكتيريا مع القطع الطويلة التي تمثل شفرات مورث السوماتوتروبين وتهندس القطع الجديدة مع ناقل تعبير مناسب مثل الناقل المستخدم في إنتاج الأنسولين أو السوماتوستاتين وتُدخل النواقل الهجينة إلى بكتيريا القولون بطريقة التحول . تنمى البكتيريا المتحولة في وسط غذائي سائل تحت ظروف مناسبة حيث يتم التعبير عن المورث وإنتاج هرمون السوماتوتروبين .

يستخلص الهرمون ويتم التخلص من القطعة الزائدة التي تمثل جزءاً من أنزيم بيتاجلاكتوسايديز والمرتبطة مع بروتين الهرمون عن طريق المعاملة مع بروميد السيانوجين (شكل 10-10) .

ينقي الهرمون ويستخدم في التجارب والدراسات اللازمة . واضافة إلى استخلاص وإنتاج هرمون السوماتوتروبين من بكتريا القولون فانه يمكن استخدام نفس الاستراتيجية السابقة في إنتاج أنواع مختلفة من الهرمونات مثل الانترفيرون وغيره .




- ادخال النواقل الهجينة الى بكتريا القولون E.coli وتربيتها في وسط زرعي سائل واستخلاص الهرمون الهجين سوماتوتروبين -بيتا جلاكتوسايديز .
- معامل الهرمون الهجين مع بروميد السيانوجين للتخلص من البيتاجلاكتوسايديز .

(الشكل 10-10 ): الاستراتيجية العامة لإنتاج هرمون النمو البشري-السوماترونبين- باستخدام تقنيات الهندسة الوراثية

**إنتاج الهرمونات البشرية من الحيوانات النقيلة *Transgenic*:**

إن هناك صعوبات ليست باليسيرة ترافق عملية إنتاج الهرمونات البشرية من الأحياء الدقيقة . فلا يمكن على سبيل المثال استخدام المورثات المعزولة من مكتبة وراثية بشرية مؤلفة من الجين البشري في إنتاج هرمون معين في البكتريا ويعود ذلك للاختلافات التركيبية بين المورثات البشرية والأحياء حقيقية النواى عموماً ومورثات الاحياء بدائية النواة مثل البكتيريا حيث تتألف المورثات البشرية من محاور متبادلة مع متداخلات ، وتتطلب عملية إنتاج حامض نووي مرسال لهذه المورثات نظاماً أنزيمياً خاصاً لأجل التخلص من الترددات التي تمثل المتداخلات (لعدم قدرة الريبوسومات على ترجمتها) ولحام الترددات التي تمثل المحاور فقط . ولا تمتلك البكتيريا أو غيرها من الأحياء بدائية النوى مثل هذا النظام لعدم وجود المتداخلات في مورثاتها . لذلك فأن البكتيريا تفشل في استنساخ حامض نووي مرسال ناضج للمورثات البشرية أو غيرها من مورثات الأحياء حقيقية النوى .

وهذا ما يحد من قابلية العمل مع الأحياء الدقيقة بحيث يقتصر إنتاج الهرمونات البشرية من هذه الأحياء فقط عند استخدام مورثات صناعية أو مورثات معزولة من مكتبة وراثيهة مؤلفة من حامض نووي متمم cDNA . بينما تتمكن الحيوانات اللبونة النقيلة وبكل سهولة من التعبير عن هذه المورثات لامتلاكها نظاماً أنزيمياً للتخلص من الترددات التي تمثل المتداخلات في الحامض النووي المرسال غير الناضج مشابهاً لما في الخلايا البشرية . هذا إضافة إلى الصعوبات التي تتعلق بتلوث الهرمونات المنتجة بشوائب بكتيرية مختلفة وكذلك صعوبات فصل هذه الهرمونات وكمية الهرمونات المنتجة وغير ذلك .

لهذه الأسباب وغيرها فأنه يتم اللجوء إلى إنتاج الهرمونات البشرية من حيوانات لبونة نقيلة .

الحيوانات النقيلة Transgeric : هي حيوانات تمتلك صفة جديدة مثل إنتاج هرمون بشري معين ولها القدرة على تمرير هذه الصفة إلى ذريتها . يتم الحصول على

الحيوانات النقيلة عن طريق زراعة مورث بشري معين مرتبط بناقل تعبير مناسب في النواة الأولية الذكرية أو الانثوية لبيضة حديثة الاخصاب عن طريق الحقن المجهري وثم نقلها إلى رحم انثى حاضنة من نفس النوع أو زراعة الناقل الهجين مع المورث البشري عن طريق الحقن المجهري في خلايا جنينية جذعية Embryonic stem cells ونقل الخلايا جيدة التعبير الى أرحام إناث حاضنة من نفس النوع ثم إجراء تضريباتMatings بين الأفراد النقيلة الناتجة للحصول على سلالة نقيلة نقية Ho-mozygous للمورث المطلوب التعبير عنه . ولا يقتصر استخدام الحيوانات النقيلة لأجل إنتاج الهرمونات البشرية بل هناك العديد من الاهداف العلمية الاخرى التي سيتم الحديث عنها لاحقاً من هذا الفصل .

يعود إنتاج أول حيوان نقيل إلى عام 1980 حيث أنتجت فئران نقيلة لمورث هرمون . السوماتوتروبين البشري . تلى ذلك إنتاج أنواع مختلفة من الحيوانات النقيلة مثل الخراف والشياه و الخنازير والدواجن وغيرها . وتعج الآن المختبرات العلمية الكبيرة والمتطورة بأنواع مختلفة من الحيوانات النقيلة بأشكال المورثات .

## إنتاج البروتينات البشرية المختلفة من الحيوانات النقيلة

يعود السبب في إنتاج البروتينات البشرية من الحيوانات النقيلة إلى الأعراض الجانبية التي تظهر عند استخدام البروتينات النظيرة للبروتينات البشرية والمستخلصة من الغدد والأنسجة الحيوانية المختلفة . كما أن طريقة الإنتاج الجديدة توفر بروتينات بشرية وليست ذات مصدر حيواني وبكميات تجارية لا يمكن الحصول على مثيلها من المصادر الحيوانية . إضافة إلى سلامة المنتجات من الملوثات البايولوجية المختلفة .

فمثلاً يعتبر الأنسولين المنتج بطرق الهندسة الوراثية باستخدام البكتيريا أو الحيوانات النقيلة أكثر أماناً من الأنسولين المستخلص من غدد البنكرياس التي تعود لحيوانات مختلفة ذلك لقلة أعراضه الجانبية لأنه الأكثر شبهاً بالأنسولين البشري أذ لم يكن هو كذلك .

من جانب آخر فأن هناك أنواعاً من البروتينات البشرية لا يمكن الحصول عليها بطرق غير الهندسة الوراثية واستخدام الأحياء النقيلة كما هي الحال في

الانترفيرونات التي تفرزها الخلايا البشرية عند الإصابة بالرواشح مثل رواشح الانفلونزا والتهاب الكبد وغيرها من الرواشح وبكميات ضئيلة جداً يصعب استخلاصها .

أما من ناحية السلامة الصحية للمنتجات البروتينية من حيوانات نقيلة فأنه على سبيل المثال يتم الحصول على عامل التخثر الدموي VIII الضروري للمرضى المصابين بالنزيف الوراثي-الهيموفيليا- Haemophilia عبر استخلاصه من الدماء المتبرع بها في بنوك الدم . ومع أن طريقة أستخلاص هذا العامل سهلة ورخيصة إلا أنها ليست قادرة على منع تلوث المنتج البروتيني برواشح خطرة مثل راشح التهاب الكبد الوبائي أو راشح متلازمة العوز المناعي المكتسب (الأيدز AIDS) .

لذلك فأن منتجات الهندسة الوراثية من البروتينات البشرية تبقى الأكثر أماناً وسلامة من البروتينات المستخلصة من الأنسجة الحيوانية أو الدم البشري .

إضافة لكل هذا وذاك فأننا نستطيع من خلال استخدام حيوانات نقيلة اختيار العضو أو النسيج الذي يقوم بإفراز البروتين البشري المطلوب وذلك باختيار محفزات معروفة بقوتها في العضو أو النسيج المطلوب استخدامه . فمثلاً يستخدم ناقل تعبير يحتوي على محفز مورث الميتالوثيونين لأجل هندسة مورث بشري معين والتعبير عنه في الخلايا الكبدية فقط أو استخدام ناقل تعبير يحتوي على محفز مورث بيتا لاكتوجلوبيولين لأجل هندسة مورث بشري معين والتعبير عنه في الخلايا الفارزة للحليب في الأثدية وغير ذلك الكثير .

وسنستعرض باختصار إنتاج بروتينات بشرية مختلفة من حيوانات نقيلة مثل الفئران والخراف والخنازير والدواجن .

## إنتاج هرمون النمو البشري (سوماتوتروبين) من الفئران

تُعد سلالة نقية من الفئران النقيلة مع مورث السوماتروبين وذلك عن طريق الحقن المجهري باستخدام ماصة دقيقة ذات نهاية شعرية يبلغ قطر نهايتها حوالي 0.1

مايكروميتر لناقل تعبير يحتوي على قطعة cDNA تمثل المورث أو المورث الصناعي مرتبطة مع محفز المورث المشفر لبروتين الميتالوميثونين في نواة أولية ذكرية أو أنثوية لبيضة فأرة مخصبة منذ وقت قصير أو في نوى خلايا جنينية جذعية ثم زرع النقيلات في أرحام فئران حاضنة وإجراء تضريبات متكررة بين الأفراد النقيلة الناتجة لأجل الحصول على السلالة النقيلة للمورث البشري المشفر لبروتين السوماتوتروبين .

تتميز الفئران النقيلة للمورث المشفر للسوماتروبين بأنها اسرع نمو من الفئران الاعتيادية . إضافة إلى أن وزنها عند البلوغ ضعف الوزن الطبيعي عند هذه المرحلة . كما يتميز مستوى بروتين السوماتوتروبين في هذه الفئران بأنه أعلى500 مرة عن مستواه في الفئران الطبيعية .

يتميز استخدام محفز مورث الميتالوثيونين بسهولة السيطرة عليه من خلال تركيز أيونات المعادن الثقيلة في مجرى الدم . أذ يقوم المحفز بالعمل على التعبير عن المورث المشفر للسوماتوتروبين المرتبط معه عندما يكون هناك مستوى عالٍ من المعادن الثقيلة في مجرى الدم ويتوقف عن العمل عند عودة هذه المعادن إلى مستواها الطبيعي . وهكذا فأننا نستطيع فتح تعبير المورث أو غلقه من خلال التحكم بمستوى المعادن الثقيلة في ماء الشرب المستخدم لري الحيوانات .

وترجع قابلية هذا المحفز على العمل اعتماداً على مستوى المعادن الثقيلة في الدم إلى المورث المشفر لبروتين الميتالوثيونين المرتبط طبيعياً مع المحفز . وتقوم الخلايا الكبدية بإنتاج بروتين الميتالوثيونين عند وجود مستوى عالٍ من المعادن الثقيلة في الدم حيث يقوم هذا البروتين بالارتباط مع أيونات المعادن الثقيلة الزائدة لأجل التخلص من سميتها .

كما يمكن استخدام ناقل تعبير أخر يحتوي على محفز المورث المشفر لبروتين بيتا لاكتوجلوبيولين لبناء ناقل هجين لمورث السوماتوتروبين وإنشاء سلالات نقية من الفئران أو الشياه النقيلة القادرة على إنتاج بروتين السوماتوتروبين في حليبها حيث يتم التعبير عن المورث المطلوب في الخلايا الفارزة في الحليب .

كما أنه يمكن إنتاج سلالات نقية من المواشي ذات قدرة على إنتاج حليب قليل اللاكتوز عن طريق ربط مورث مشفر لبروتين تمثيل اللاكتوز مع محفز لأحد المورثات المشفرة لبروتينات الحليب بنفس الستراتيجية السابقة .

## استخدام الحيوانات النقيلة للاغراض العلاجية وزراعة الأعضاء:

يمكن الاستفادة من الحيوانات النقيلة للأغراض العلاجية بطرق مختلفة . أهم هذه الطرق هو إنتاج عوامل تخثر الدم VIII و VII وغيرها الضرورية لمعالجة حالات الهيموفيليا المرتبطة بفقدان هذه العوامل .

فمثلاً يمكن استخلاص هذه العوامل من الحليب المنتج من الشياه النقيلة بالمورثات البشرية المشفرة لهذه العوامل والمرتبطة مع محفز المورث المشفر لبروتين بيتا لاكتوجلوبيولين والذي يتم التعبير عنه في الخلايا الفارزة للحليب .

كما تم إنشاء سلالات حيوانات نقيلة يأمل منها العلماء الحصول على أعضاء وأنسجة يمكن استخدامها في زراعة الأعضاء بدلاً من الأعضاء البشرية المعطوبة وغير الفعالة . فمثلاً تم الحصول على خنازير نقيلة قامت بالتعبير عن البروتينات البشرية المسؤولة عن الرفض المناعي في أسطح خلايا أنسجتها وأعضائها بحيث أصبحت هذه الاعضاء من الناحية النظرية والعلمية ممكنة الاستخدام في زراعة الأعضاء في البشر دون الخوف من رفضها . وينتظر العلماء الآن التجارب النهائية حول هذا الموضوع للبت النهائي في أهميته .

## إنتاج حيوانات نقيلة مقاومة للحشرات

لقد تم تشخيص وعزل مورث نباتي مشفر لبروتين الكايتينيز Chitinase . يقوم هذا الأنزيم بالهضم الطبيعي لمادة الكايتين وعن طريق استخدام تقنيات الهندسة الوراثية فأنه أصبح الآن بالإمكان إنتاج مواشٍ نقيلة تقوم بإفراز هذا الأنزيم من خلاياها الجلدية . إذ يقوم هذا الأنزيم بتحليل الأجزاء الخارجية للحشرات التي تقف

على هذه المواشي مما يؤدي الى موت هذه الحشرات وذلك يتيح لهذه الحيوانات مقاومة طبيعية ضد الحشرات .

كما يمكن باستخدام نفس التقنية السابقة في إنتاج حيوانات نقيلة لمورثات مطفرة لدراسة تعبير هذه المورثات وتأثير الطفرات على منتجاتها من البروتينات .

وبشكل عام حظي إنتاج البروتينات البشرية في حيوانات نقيلة بأهمية كبيرة حتى أن قائمة البروتينات المنتجة بالأساليب الوراثية أصبحت طويلة (جدول 10-4) .

**جدول 10-4: الهرمونات البشرية المنتجة بأساليب الهندسة الوراثية.**

| الهرمون المنتج | الفائدة منه |
|---|---|
| الانسولين | لعلاج مرض السكر |
| الانترفيرونات | لعلاج الأمراض الراشحية والسرطان |
| Human Chorionic gonadoropin | لعلاج اضطرابات المبيض |
| السوماتوتروبين | لعلاج التقزم |
| الانكيفالين والاندورفين | لعلاج الالام |
| الكاليستسونين | لعلاج اضطرابات العظام |
| Nerve growth Factor | لعلاج تلف الأعصاب |
| الارثروبيوتين | لعلاج فقر الدم والبواسير |
| عوامل التخثر المختلفة | لعلاج نزف الدم الوراثي |
| اليوروكاينيز | لعلاج تخثر الدم |
| السوماتوستاتين | للسيطرة على النمو |

## إنتاج اللقاحات الراشحية الطبية

تعتبر اللقاحات الطبية من المواد المهمة التي ساهمت كثيراً في وقاية البشرية من العديد من الأمراض الفتاكة حتى أن البعض يعزو سبب الزيادة الهائلة في سكان الأرض إلى الدور المهم لهذه اللقاحات في حصانة الأطفال ضد الأمراض مما ساهم إضافة إلى عوامل أخرى في إطالة معدل العمر البشري وزيادة إنتاجه من الأفراد .

تنتج اللقاحات الراشحية عن طريق إضعاف رواشح مرضية بالحرارة العالية أو بطرق أخرى تصبح بعدها هذه الرواشح غير قادره على الأصابة بالأمراض . ويمكن استخدامها كلقاحات لتحفيز الجسم البشري على توليد أضداد Antibodies لها تساهم في التصدي للرواشح في حالة الأصابة بها . وعلى الرغم من الأهمية البالغة لهذه اللقاحات في وقاية الإنسان والحيوان من شرور الأمراض إلا أن إنتاجها ارتبط دائماً في مشاكل جعلت الباحثين يفكرون في الهندسة الوراثية كتقنية يمكن أن تحل هذه المشاكل . ومن هذه المشاكل أن وجود جزيئة راشحية سليمة واحدة قد تؤدي إلى الأصابة بالمرض . كما أن إنتاج معظم اللقاحات يتم من خلال استخدام الخطوط الزرعية Tissue Culture وهي غير مناسبة لإنتاج لقاحات معينة مثل لقاح ضد التهاب الكبد الوبائي لعدم قدرة راشح هذا المرض من النمو في مثل هذا الوسط .

هذا إضافة إلى التكاليف العالية لعملية الإنتاج والتنقية والضمان الصحي للمنتج . لذلك فأن الهندسة الوراثية يمكن أن تساهم كثيراً في حل معظم هذه المعضلات . ويبلغ الآن حجم إنتاج لقاح مضاد لراشح ثأليل القدم والفم Foot & mouth wart virus الذي يصيب المواشي والمصنع بطرق الهندسة الوراثية ما قيمته اكثر من 500 مليون دولار .

تتم عملية إنتاج اللقاحات الراشحية بطرق الهندسة الوراثية بنفس الأسلوب الذي يتم فيه إنتاج الأنسولين من البكتريا . إذ يربط المورث المشفر لبروتين غلاف راشحي مع محفز مناسب في ناقل تعبير معين ثم تدخل النواقل الهجينة إلى بكتيريا

القولون E.coli أو الخميرة على سبيل المثال . تنمى الأحياء النقيلة في وسط غذائي سائل و تستخلص البروتينات الراشحية من الوسط الغذائي . تنقى البروتينات أو اللقاحات من الشوائب الراشحية من الوسط الغذائي . تنقى البروتينات المستخلصة من الشوائب وتخلط مع محلول مناسب لتهيئة اللقاح أو اللقاحات . والجدير بالذكر هنا بأنه ليس لجميع بروتينات الرواشح أهمية في إنتاج اللقاحات فمثلاً يعتبر البروتين المشفر من المورث VP3 الخاص براشح مرض القدم والفم الذي يصيب المواشي لقاح جيد للوقاية من الإصابة بالراشح بينما لا يعتبر البروتين المشفر من المورث Vp4 لنفس الراشح ذا أهمية في ذلك .

كما أن بروتينات سطح راشح التهاب الكبد الوبائي ذات أهمية كبيرة كلقاحات بينما لا فائدة من بروتينات قلب الراشح نفسه .

ويجري الآن تطوير لقاحات عديده أخرى مثل لقاح التراخوما والملاريا والانفلونزا والنكاف والحصبة والتايفوئيد والكوليرا والدايزنتري والبلهارزيا وغيرها الكثير .

## استخدام الهندسة الوراثية في إنتاج المضادات الحيوية:

يعتبر حقل إنتاج المضادات الحيوية حقلاً صناعياً ضخماً تبلغ مبيعاته المليارات من الدولارات . لذلك فأن مثل هذا الحقل بأمس الحاجة إلى تقنيات الهندسة الوراثية لزيادة إنتاجه وتقليل تكاليف الإنتاج .

إن معظم المضادات الحياتية المستخدمة اليوم في المستشفيات هي عبارة عن مركبات طبيعية وصناعية شبيهه لها . تستخلص هذه المركبات طبيعياً من الأحياء الدقيقة خصوصاً الفطريات أو الأعفان والبكتريا التي تنمو طبيعياً في التربة أو على الفضلات . ويعود أول اكتشاف لهذه المضادات الحيوية إلى عام 1928 عندما اكتشف العالم الكسندر فلمنج المضاد الحيوي البنسلين الذي يفرزه فطر البنسليوم Penicilli-um notatum . وتضم اليوم قائمة المضادات الحيوية التي تفرزها الأحياء الدقيقة طبيعياً أكثر من خمسين نوعاً من المضادات هذا إضافة إلى مئات المشتقات الكيميائية منها .

إن استخدام الهندسة الوراثية من أجل إنتاج هذه المضادات يعتبر نقلة نوعيهة وكمية في مثل هذا الحقل . ومع ذلك فأن تطبيق هذه التقنية لهذا الهدف يحتاج إلى عناء شديد أكثر بكثير من العناء الذي نقدمه عند إنتاج الهرمونات أو غيرها من البروتينات .

يعود سبب ذلك إلى أن جميع المضادات الحيوية تنتج طبيعياً عن طريق سلسلة من التفاعلات الكيميائية الطويلة التي يقوم بها أكثر من أنزيم ويسيطر عليها أكثر من بروتين بينما لا يوجد مثل هذا التعقيد عند إنتاج هرمون أو بروتين .

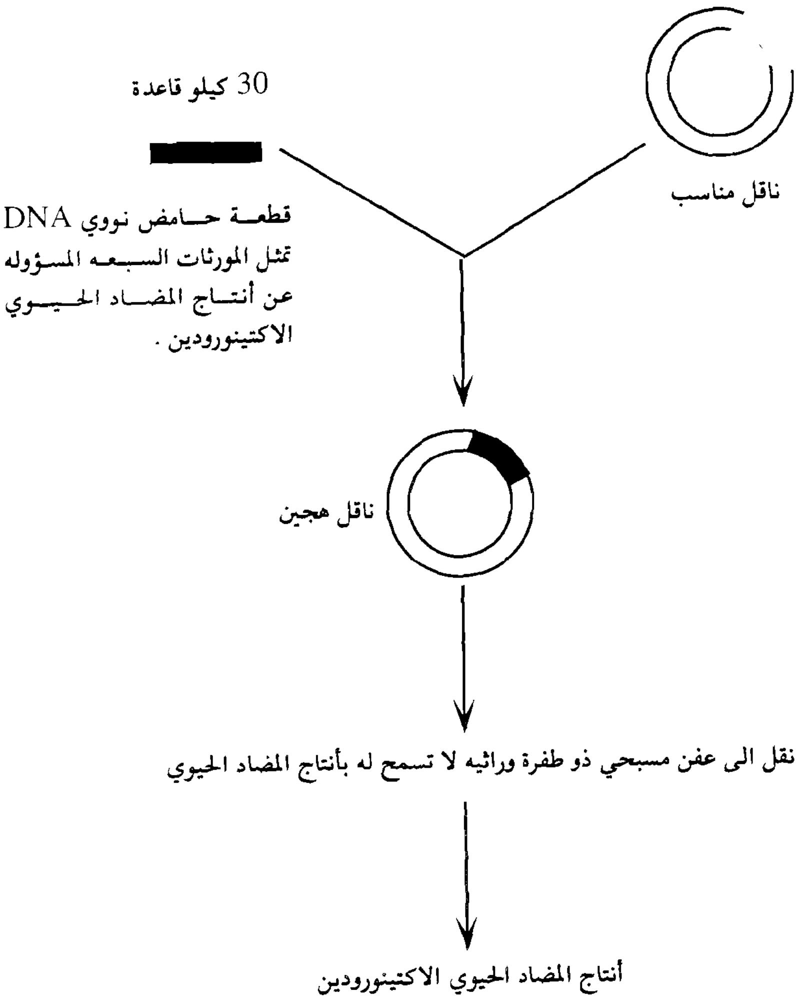
لذلك فأننا في سبيل إنتاج البنسلين نحتاج إلى هندسة عدة مورثات سوية في قطعة حامض نووي DNA واحدة . ثم ربطها مع ناقل تعبير مناسب ونقلها إلى مضيف مناسب .

ويمكن تصور الصعوبة عندما تكون هذه المورثات منتشرة على مواقع متباعدة أو على صبغيات مختلفة . ومع ذلك فأن كبريات شركات الأدوية مستعدة دائماً لتمويل مثل هذه المشاريع لمردوداتها الاقتصادية الكبيرة . ولأجل تقديم صورة واضحة عند إنتاج المضادات الحيوية عن طريق تقنيات الهندسة الوراثية فأننا سنأخذ إنتاج المضاد الحيوي الاكتينور ودين Actinorhodin الذي تفرزه طبيعياً أعفان مسبحية تدعى Streptomyces coelicolor كمثال على ذلك .

**الأستراتيجية العامة لإنتاج الاكتينورودين:**

ينتج الاكتينورودين طبيعياً من المسبحيات عن طريق سلسلة تفاعلات كيميائية تحكمها نواتج سبعة مورثات تقع جميعها بصورة متجاورة على صبغي واحد .

إن قطعة الحامض النووي DNA الكاملة التي تحتوي هذه المورثات السبعة يبلغ حجمها حوالي 30 كيلو قاعدة ويمكن ربطها إلى ناقل مناسب ونقلها الى مسبحيات S.coelicolor ذات طفرة وراثية لا تسمح لها بإنتاج المضاد الحيوي . تنمى البكتيريا المتحوله في وسط غذائي سائل مناسب تحت ظروف مناسبة لإنتاج المضاد الحيوي (شكل 10-11) .




(الشكل 10-11): انتاج المضاد الحيوي الاكتينورودين بتقنيات الهندسة الوراثية

## التقنية الحياتية في النبات

إن تطبيقات الهندسة الوراثية في مجال التقنيات الحياتية الطبية والصحية أخذت حيزاً واسعاً للأهمية الكبيرة للمواد المنتجة منها لحياة الإنسان .

ولكن يبقى للنبات والزراعة أهمية كبيرة أخرى في مجال التقنيات الحياتية للارتباط الواضح بين الانسان وصحته وغذائه . ونستطيع عبر تطبيق تقنيات الهندسة الوراثية توفير الغذاء بشكل أفضل كماً ونوعاً هذا إضافة إلى استنباط أصناف جديدة من النبات ذات القيمة الغذائية والاقتصادية العالية .

إن النقص الغذائي الذي تعاني منه كثير من بلدان الأرض لا يرجع بالدرجة الأولى لعدم توفر الأرض اللازمة للزراعة بل إلى أسباب أخرى بعضها يرجع إلى الإنسان المزارع والآخر لأصناف النباتات الملائمة لزراعتها وأخيراً للظروف الطبيعية . وقد ساهم التطور الكبير في العلم والمعرفة الى أبتكار وسائل جديدة لرفع إنتاج الأرض تركزت في بداية هذا القرن على توفير المكائن والمعدات الآلية للزراعة لتطوير أساليب الإنتاج وكذلك توفير الأسمدة الكيميائية لرفع خصوبة الأرض . كما ساهمت الحملات الدعائية و الإعلامية التي تقوم بها البلدان والمنظمات الدولية ذات العلاقة بالزراعة في رفع المستوى الثقافي للمزارعين إلا أن كل ذلك ربما وبلا شك يؤدي إلى رفع مستوى الأرض من الانتاج الزراعي . إلا أنه ومع كل هذه الوسائل فأن الإنتاج العالمي من المحاصيل الزراعية لم يصل إلى حد الطموح . ويعود الكثير من ذلك إلى نوع الأصناف النباتية التي يتعامل معها المزارعون في أنحاء العالم والتي بقيت ( مع زيادة طفيفة) على حالها من الإنتاج .

لذلك فقد لجأ العلماء والباحثون لاستنباط أصناف جديدة ذات مردود اقتصادي أعلى من تلك المتوفرة . وساهمت الوراثة كثيراً في توفير مثل تلك الأصناف عن طريق التضريب بين الأصناف مختلفة الجودة .

وأحدثت تلك الأساليب العلمية ثورة حقيقية في المجال الزراعي حتى أصبح هكتاراً واحداً من الأراضي الزراعية ينتج من المحاصيل الجديد أضعاف مضاعفة عما

كان نفس الهكتار ينتجه قبل عشرات من السنين وازداد الإنتاج في بعض مناطق العالم إلى أكثر من 200 مرة حتى أصبحت الوفره في بعض هذه المحاصيل ذات ضرر اقتصادي عليها .

ومع ظهور الهندسة الوراثية وتطور أساليبها فكر العلماء مرة أخرى في استخدام هذه التقنيات لإنتاج نباتات أكثر مقاومة للأمراض وللأملاح إضافة إلى استنباط أصناف نباتية جديدة ذات صفات غذائية غير معتادة سابقاً . وهكذا ظهرت للوجود نباتات جديده مثل البوماتوPo mato الهجينة بين البطاطا والطماطة وكذلك ونباتات منتجة للزيوت ذات إنتاج عالٍ جداً مثل الزيتون ونخيل جوز الهند إضافة إلى نباتات الأخشاب المختزلة النمو (تنمو خلال نصف الفترة اللازمة لها طبيعياً) .

ويجري العمل الآن حثيثاً لإنتاج البروتينات الحيوانية ذات الأهمية الغذائية العالية في النباتات . ولا نعرف إلى أي مدى ستصل إليه تقنيات الهندسة الوراثية في تطوير الزراعة ولكن ما تم أنجازه لحد الأن لا يمثل من أحلام الإنسان سوى غيض من فيض .

وسنتطرق إلى بعض الأساليب المستخدمة في تطوير النباتات .

**استخدام البلازميدات Ti لإدخال مورثات جديدة في النباتات**

البلازميد Ti هو بلازميد طبيعي ويتوفر كجزء من خلايا بكتيريا التربة التي تدعى بالاكروبكتريتم Agrobacterium tumefaciens . تصيب هذه البكتريا عدد من أنواع النباتات ذات الفلقتين وتؤدي هذه الأصابة إلى ظهور ورم سرطاني في الكتلة الجذرية ، يدعى هذا الورم بالمرارة التاجية Crown gall . يظهر هذا الورم كنتيجة لانتقال جزء من بلازميد Ti (Transorming DNA . T-DNA,) إلى صبغيات الخلايا النباتية عند موقع الإصابة مما يدفع بهذه الخلايا إلى الانقسام السرطاني لتكوين المراره التاجية وتتكاثر خلايا البكتريا لتشغل حيزاً لا بأس به من

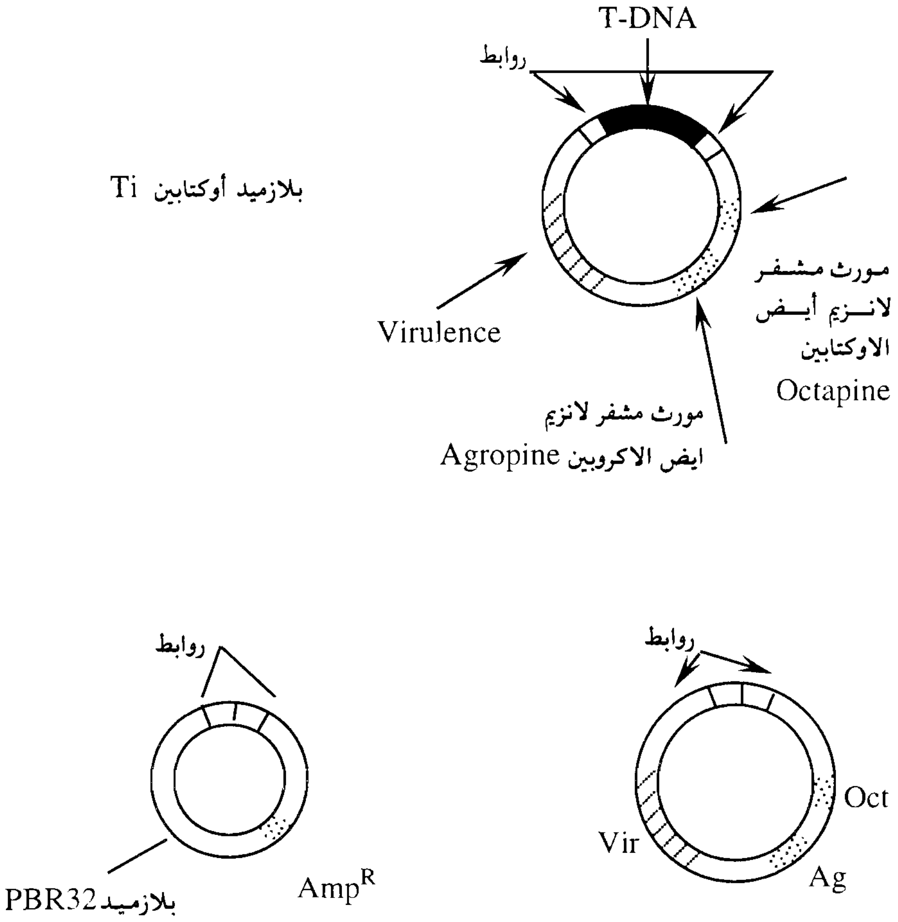
يتراوح حجم بلازميدات Ti بين 150-200 زوج قاعدي ويحتوي البلازميد عادة على منطقة مشفرة لمرضية البلازميد Virulence وأخرى تمثل القطعة المسرطنة T-DNA التي يرتبط معها محفز إنتاج الاوبين أو النوبالين أو الاكروبين (اعتماداً على نوع البلازميد) .

ومورث مشفر لانزيم تمثيل أو أيض مشتقات الاحماض الأمينية السابقة (شكل 10-12) . يعمل محفز إنتاج مشتقات الاحماض الامينية على تحفيز النبات على إنتاجها وتقوم البكتريا بتمثيل هذه المشتقات والاستفادة منها . وعلى ذلك فأن هذه البلازميدات غير مفيدة للنبات ولكنها مفيدة جداً للنبات .

تأتي أهمية هذه البلازميدات في إمكانية زراعة مورث معين مرتبط مع قطعة T-DNA ونقل هذا المورث الى الخلايا النباتية والتعبير عنه . أن قطعة T-DNA تمثل مورثاً سرطانياً محاطاً بموقعين للارتباط مع صبغيات النبات . لذلك فقد تم تطوير هذا البلازميد عن طريق حذف المورث السرطاني عن طريق الأنزيمات القاطعة والابقاء على مواقع الارتباط . وقد تم بواسطة هذه الطريقة اشتقاق العديد من البلازميدات Ti كما تم اشتقاق بلازميدات هجينة من البلازميد Ti وبلازميدات أخرى مثل البلازميد PBR 322 .

ولأجل نقل مورث معين مثل مورث مقاومة الاعشاب الى نبات ذي فلقتين باستخدام البلازميد Ti المحور . يتم أولاً عزل المورث المطلوب من مجين النبات الأصلي المقاوم للأعشاب بإحدى الطرق السابقة ثم ربطه في موقع بحيث تكون مواقع الارتباط البلازميدية على جانبي المورث .

ينقل البلازميد الهجين إلى بكتريا الاكروبكتريم عن طريق التحول ثم تصاب الكتلة الجذرية للنبات بالبكتريا المتحولة لإنتاج المرارات التاجية .




بعض مشتقات البلازميد Ti

**(الشكل 10-12): تخطيط لتركيب الناقل البلازميدي Ti ولبعض مشتقاته.**

إن استخدام هذه الطريقة لا يؤدي إلا إلى إنتاج أعداد محدودة من النباتات أملاً في الحصول على أجيال مقاومة للأعشاب . كما أنها طريقة محدودة لأنواع معينة من النباتات . فمثلاً لا يمكن استخدام بلازميدات Ti لتطوير نباتات اقتصادية مهمة مثل الحنطة والشعير والشوفان والأرز وغيرها . لذلك فقد عكف العلماء على تطوير هذه الطريقه لجعلها مناسبة تماماً للعديد من النباتات الاقتصادية . إضافة لإنتاج أعداد غفيرة من النباتات ذات الصفة الجديدة .

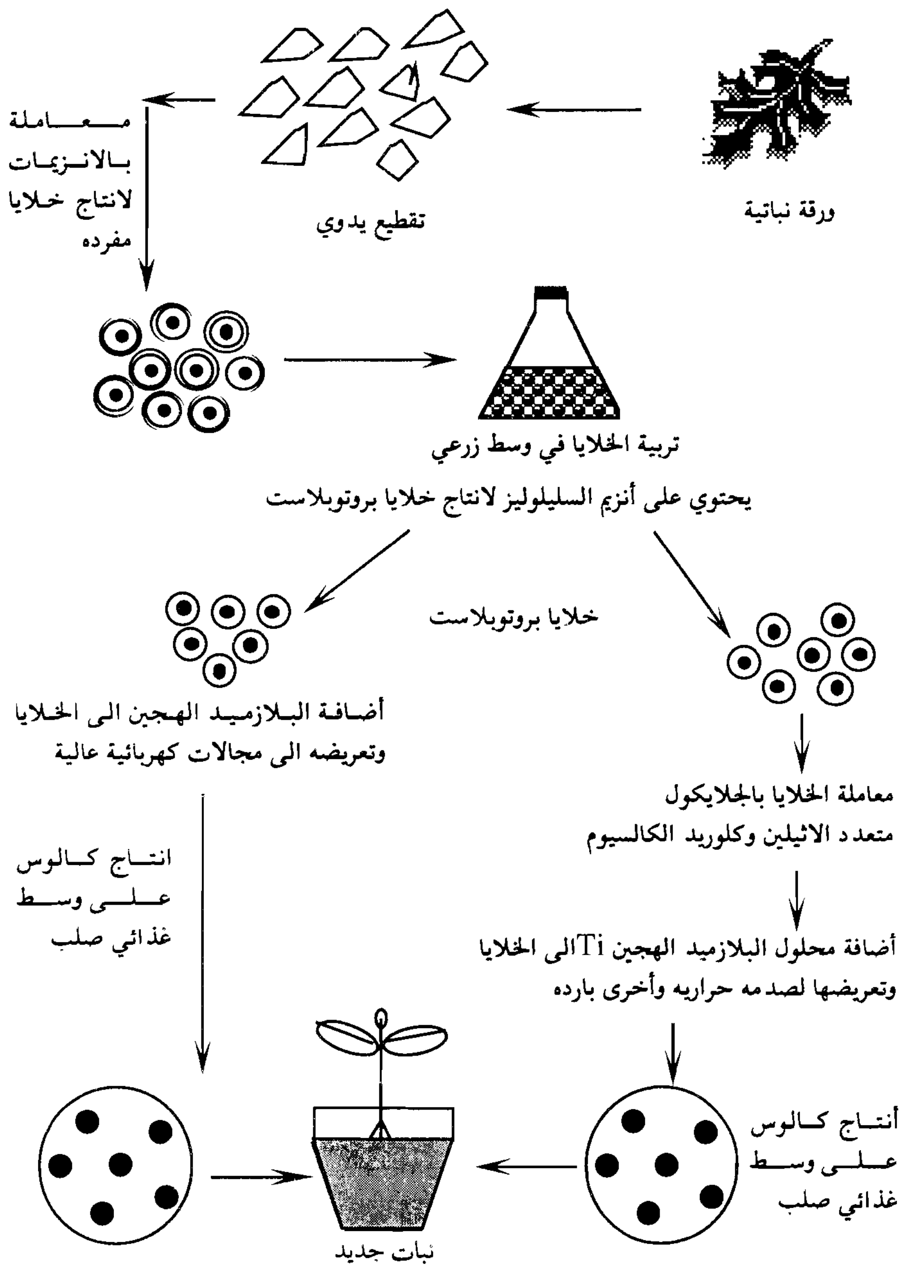
لقد تم في هذا التطوير الاستغناء عن استخدام بكتيريا الاكروبكتريم في العملية وذلك بإيلاج البلازميد Ti الهجين مباشرة إلى الخلايا النباتية . تم ذلك بإدخال ما يعرف بتقنية البروتوبلاست Protoplasts والزراعة النسيجية Tissu culture .

تؤخذ أجزاء نباتية (الأوراق عادة) وتحول إلى محلول خلايا مفردة عن طريق المعاملة بالانزيمات .تنمى الخلايا النباتية في وسط غذائي سائل لفترة ثم تعامل بأنزيم السليلوليز لإزالة الجدران الخلوية .

تنقل الخلايا النباتية المؤلفة من بروتوبلاست محاط بغشاء خلوي رقيق إلى صحون زجاجية معقمة وتعامل مع محلول ملحي مؤلف من الجلايكول متعدد الاثيلين وكلوريد الكالسيوم . يضاف البلازميد الهجين إلى الخلايا حيث تتمكن خلايا نباتية مختلفة العدد من الحصول عليه .

وتستخدم الآن تقنية أكثر كفاءة من الأملاح لإيلاج البلازميدات الهجينة إلى خلايا البروتوبلاست . تعتمد هذه على تعريض خلايا البروتوبلاست بوجود البلازميد الهجين إلى مجالات كهربائية شديدة لزيادة نفاذية أغشية الخلايا ورفع كفاءة تحولها . تسمى هذه التقنية بالانفاذ الكهربائي Electroporation (شكل10-13) .

تنمى الخلايا المتحولة بعد السماح لها بتكوين الجدران الخلوية مجدداً لتكوين الكالوس (كتل خلوية) . ينقل كل كالوس بعد معاملته هرمونياً إلى وسط غذائي صلب لأجل النمو وإعطاء نبات صغير . تنقل النباتات هذه بعد ذلك الى الحقل لمراقبة نموها وكشف التعبير عن المورث الجديد .




(الشكل:10-13) ستراتيجية استخدام خلايا البروتوبلاست لانتاج نباتات بصفات جديدة.

كما طورالباحثون طريقة أخرى لهندسة النباتات تعتمد على استخدام بكتيريا الاكروبكتريم . تتم في هذه الطريقة هندسة مورث معين مع بلازميد Ti المحور ونقله إلى البكتريا .تقطع أوراق نباتية على هيئة قطع صغيرة الحجم وتعقم جيد ثم تخلط مع البكتريا المحولة .

تنمى القطع بعد ذلك على أوساط غذائية مناسبة لإنتاج نباتات حيث يحدث الاخلاف من الخلايا الموجودة على حافة القطع بتحفيز من البلازميد Ti .

وإضافة لاستخدام البلازميد Ti ومشتقاته فأنه يتوفر الآن عدد من الرواشح النباتية المناسبة في الهندسة الوراثية الخاصة بالنبات ويمكن الرجوع إلى فصل نواقل الهندسة الوراثية للتعرف عليها .

وأخيراً فأن هناك محاولات عديدة لانجاح تطبيقات الهندسة الوراثية على النباتات بعضها حالفه النجاح والآخر لا يزال في المحاولة وأذكر على سبيل المثال المحاولات الناجحة لعزل مورثات جهاز ناف NEF system من بكتيريا عقد البقوليات (الرايزوبيون Rhizobium) والتي تستخدم لاجل تثبيت النتروجين الجوي عن طريق تصنيع الجلوتامين وتمريره إلى النبات . وتستهدف هذه المحاولة نقل هذه المورثات إلى النباتات الأخرى لاستخدام النتروجين الجوي كسماد طبيعي . كما أن هناك محاولات مختلفة أخرى تستهدف الحصول على محاصيل زراعية ذات بروتينات حيوانية وغير ذلك .

# المراجع

# قائمة بالمراجع الأجنبية

-**Albert, B., Bary ,D. Lewis , J., Raff. M . et al** . 1994. Molecular biology of the cell , 3rd ed., Garland Publishing, USA.

-**Al-Faisal, A.H.M.** 1998.Detection of abnormal allele of N-ras proto-oncogene in Syrian hamste embryo cells (SHE)induced by Benzo-a-Pyrene (B(a) P).Cancer Molecular Biology. Vol 5 No.3. "In Press".

-**Al-Faisal** ,A.H.M.1998.Abnormal chromosome locations of c-k-ras and c-H-ras proto-oncogenes in Syrian hamster embryo cells (SHE) treated with a single exposure to Benzo- a-pyrene. Cancer Molecular Biology .Vol 5 No.3. "In Press".

-**Al-Faisal ,A.H.M.** 1998.Effect of DNA concentration and Plasmid Size on the transformation of bacteria Staphylococus aureus.

Al-Tahadi Univ.Scientific J.No .2 1-7.

**Al-Faisal, A.H.M.** 1997.Effect of Plasmid size on the transformation efficeincy of the bacteria E.coli. 1st conference of the Biology Science . Bengazi-Libya,6-8May.

-**Al- Faisal , A.H.M** 1990. Studies on the molecular analysis of eukaryotic DNA. Ph.D. Thesis -University of Wales ,Uk.

- al. 1993. Recent developments in Veterinary Vaccines. Immunology and cell Biology. 71: 355-508.

-Barch,M.J.et. 1991. The ACT cytogenetics Laboratory manual, 2nd ed, Raven Press. USA.

-Berg, P. 1992. Dealing with genes. Black well Scientific publicetions , Oxford,UK.

-Brown, T.A. 1994. DNA sequencing the basics. IRL press. Oxford. UK.

-Brown. T.A. 1986. Gene cloning , An introduction. Van Nostr and Reinhold,UK.

-Cameron, E.R, Harvey ,M.J.A. and Onions , D.E. 1994. Transgenic Science. British Veterinary J. 150: 9-24.

-Capecchi, M.R. 1994. Targeted gene replacement. Scientific American , 270: 52-9.

-Carter.N.P. 1994.Cytogenetic analysis by chromosome painting. Cytometry 18:2-10.

-Cohen,J. 1994. Molecular biology-long PCR leaps into Large DNA sequences. Sciences, 263: 1564-5.

-Dawson,M.H. and Sia, R.P.H. 1931. In vitro transformation of pneumococcocal types. I. A technique for inducing transformation of pneumocoocal types in vitro. J. Exp.Med .54: 681-691.

-Dibb, N,J. 1993. Why do genes have intons. FEBS letters, 325: 135-9.

-Dussoix.D. and Arber ,W. 1962. Host specificity of DNA produced by E. coli II. Control over acceptance of DNA from infecting phage Lambda. J. Mol. Biol. 5: 37-49.

-Elbert. K.M. and Schindler, J.E.S. 1993. Transgenic farm animals , Progress report. Theriogenology 39: 121-35.

-Feinberg, A. P. and Vogelstein ,B. 1983. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity .Anal. Biochem 132: 6-13.

-Griffin. H.G. and Griffin, A.M. 1994. PCR technology .CRC press . Boca Raton.

-Grunstein. M. and Hogness. D.S. 1975. Colony hybridization : A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad .Sci. 72: 3961-3965.

-Hohn. B. and Murray, K. 1977.Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage Particles in Vitro. Proc. Natl. Acad . Sci. USA. 74: 3259-3263.

-Honheisei .J.D 1994. Application of hybridization techniques to genome mapping and sequencing. Trends in Genetics, 10: 79-83.

-Hutchinson, C.R. 1994.Drug Synthesis by genetically engineered micro-oganisms. Biotechnology, 12: 375-80.

-Kevles. D.J.and Hood, L.1992. The code of cods. Harvard University Press. USA.

-Kimman . T.G. 1992. Risks connected with the use of conventional and genetically engineered vaccines, Veterinary Quarterly, 14: 110-8.

-Lewin. B. 1994. Genes . Oxford University Press, USA.

-Lu,M. 1989.Construction of representative genomic DNA libraries using one microgram of DNA.Nucl. Acids Res. 17:818.

-Libert,F. Lefort ,A. etal. 1993. construction of a bovine genomic Library of Large Yeast artificial chromosome Clones . Genomics, 18:270-6.

-Mandel, M. and Higa. A. 1970. Calcium dependent phage DNA infection. J.Mol. Biol. 53:159-162.

-Maniatis, T. . Fritsch, E.F. and Sambrook , J. 1982. Molecular cloning , Cold Spring Harbor. N.Y. Cold Spring Harbor , Laboratory USA. Maniatis, T., Hardison, R.C. Lacy, E.etal. 1978.The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. Cell 15:687-701.

-Mark. H.F.L. 1994.Fluorescent in situ hybridization as an adjunct to conventional cytogenetics. Annals of clinical and laboratory science, 24:153-63.

-Martinez, M.L. and Wiess. R.C. 1993. Applications of genetic engineering technology in feline medicine. Veterinary Clinics of North American - Small Animal . Practice 23: 213-26.

-Maxam. A.M. and Gilbert, W. 1977. A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:560- 564.

-Miller, N. and Vile . R.G 1994. Gene transfer and antisense nucleic acid technology . Parasitology Today 10:92-7.

-Mirzabekov. A.D. 1994. DNA sequencing by hybridization -a mega sequencing method and a diagnostic tool. Trends in Biotechnology 12: 27-32.

-Murray. R.K. Granner ,D.K. Mayes ,P.A. and Rodwell , V.W. 1990. Harpers Biochmesity. Prentice- Hall international Inc. USA.

-Nicholas , F.W. 1996.Introduction to veterinary genetics, Oxford university Press. USA.

-O'Halloran. T.V. 1993. Transition metals in control of gene expression. Science 261: 715-25

-Prosser, J. 1993. Detecting Single -base mutations . Trends in Biotechnology, 11.:238-46.

-Reed, K.C. and Mann, D.A. 1985. Rapid transfer of DNA from agarase gel to nylon membrane. Nucl , Acids Res. 13: 7206-7221.

-Rigby, P.W.J. Dieckmann , M. Rohdes, C. and Berg. P. 1977. Labelling DNA to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J.Mol. Biol. 113:237-251.

-Roberts, R.J. 1984. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. Nucl. Acids Res. 12:167-191.

-Sambrook ,J.Fristch , E.F. and Manistais. T. 1989. Molecular cloning : a Laboratory manual. Vol.3. Cold Spring Harbor Laboratory press , Cold spring Harbor. USA.

-Sanger, F., Coulson. A. R. Hong. G.F. Hill , D.F. and Peterson, G.B. 1982. Nucleotide sequence of bacteiophage Lambda DNA.J.Mol.Biol. 162:729-773.

-Sanger. F. Nicklen , S. and Coulsoni,A.R. 1997. DNA sequencing with chain- terminating inhibitors. Proc. NAtl. Acad .Sci. USA. 74: 5463-5467.

-Southern., E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separtaed by gel electrophoresis. J.Mol. Biol. 98: 503-517.

-Strike ,P. Humphreys, G.O. and Roberts. R.J. 1979. Nature of transforming DNA in calcium treated E. coli. J.Bacteriol 138:1033-1035 .

Struhl,K.Cameron, J.R. and Davis, R.w.1976. Functional genetic expression of eucaryotic DNA in E. coli .Proc. Natl . Acad. Sci. 73: 1471-1475.

-Sunders, J.R Docherty, A. and Humphreys , G.O. 1984 .Transformation of bacteria by plasmid DNA. Methods in Miorobiology . 17: 61-95.

-Watson. J.D. , Hopkins. N.H. Roberts, J.W.etal; 1987.Molecular Biology of the gene .(4th ed). The Benjamin/ Cummings Publishing Company Inc. USA.

-Waston, J.D. Tooze , J.and Kurtz, D.T. 1983. Recombinant DNA. A short course , Freeman. USA.

-Young R.A. and Davies ,R.W. 1983.Efficient isolation of genes using antibody probes. Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 1194-1198.

## العربية

1-الفيصل ، عبد الحسين مويت 1999 . التقنيات المعملية في الهندسة الوراثية . الدار الاهلية للنشر والتوزيع - عمان -المملكة الأردنية الهاشمية .

2 - الفيصل ، عبد الحسين مويت 1999 . الوراثة العامة . الدار الأهلية للنشر والتوزيع - عمان - المملكة الأردنية الهاشمية .

3 - الفيصل ، عبد الحسين مويت 1999 . الخلية - التركيب الدقيق والوظائف . الدار الأهلية للنشر والتوزيع • عمان - المملكة الأردنية الهاشمية .

4- الفيصل ، عبد الحسين مويت 1998 ، الوراثة الجزيئية ، منشورات جامعة التحدي-سرت-الجماهيرية الليبية العظمى .

5- المفتي ، محمد محمد ، 1985 ، المضادات الحيوية ، منشورات الهيئة القومية للبحث العلمي- الجماهيرية الليبية العظمى .

6- المتيني ، أحمد يوسف ، 1994 ، مدخل الوراثة الجزيئية ، نشر وتوزيع منشأة المعارف-الإسكندرية -مصر .

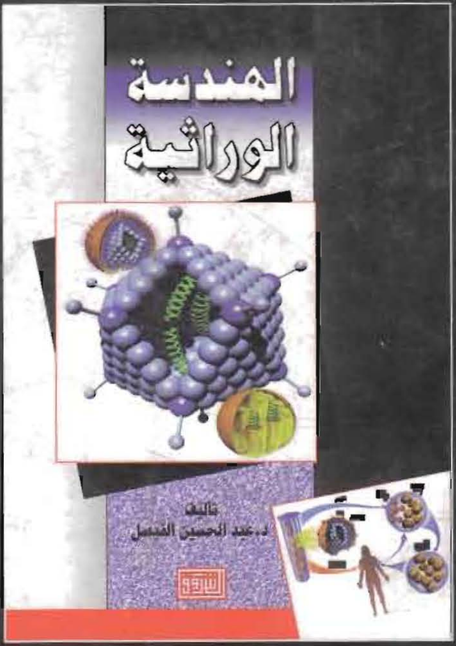
7- السهريجي ، محمد أحمد وجماعته ، 1990 ، علم الوراثة ، دار المطبوعات الجديدة .

8- جاردنر ، أ .ج وسنستاد ، د .ب 1987 مبادئ علم الوراثة ، ترجمة د . أحمد شوقي وجماعته ، الدار العربية للنشر والتوزيع .

9- عماش ، هدى صالح مهدي . 1987 ، الهندسة الوراثية تقنية جديدة أم خطر كوني ، سلسلة كتب الثقافة العلمية ، دائرة الإعلام الداخلي- وزارة الثقافة والإعلام- بغداد .

10- كيفلس ، دانييل وليروي هود ، 1997 ، الشفرة الوراثية للإنسان ، القضايا العلمية والاجتماعية لمشروع الجينوم البشري ، ترجمة د . احمد مستجير ، عالم المعرفة- الكويت .

11- يوسف ، محمد خليل وجماعته ، 1994 ، الوراثة وأمراض الإنسان -منشأة المعارف - الإسكندرية -مصر .




الناشر

**دار الشروق للنشر والتوزيع**

عمان - تلفون: ٤٦٢٤٣٢١ - ٤٦١٨١٩٠ - فاكس ٤٦١٠٠٦٥

رام الله - المنارة - الشارع الرئيسي - تلفاكس ٢٩٨٧٠٣٢

(ردمك) ISBN 9957-00-063-2