الفصل الحادى عشر

الهندسة الوراثية : الأسس العلمية وتقنيات الدنا

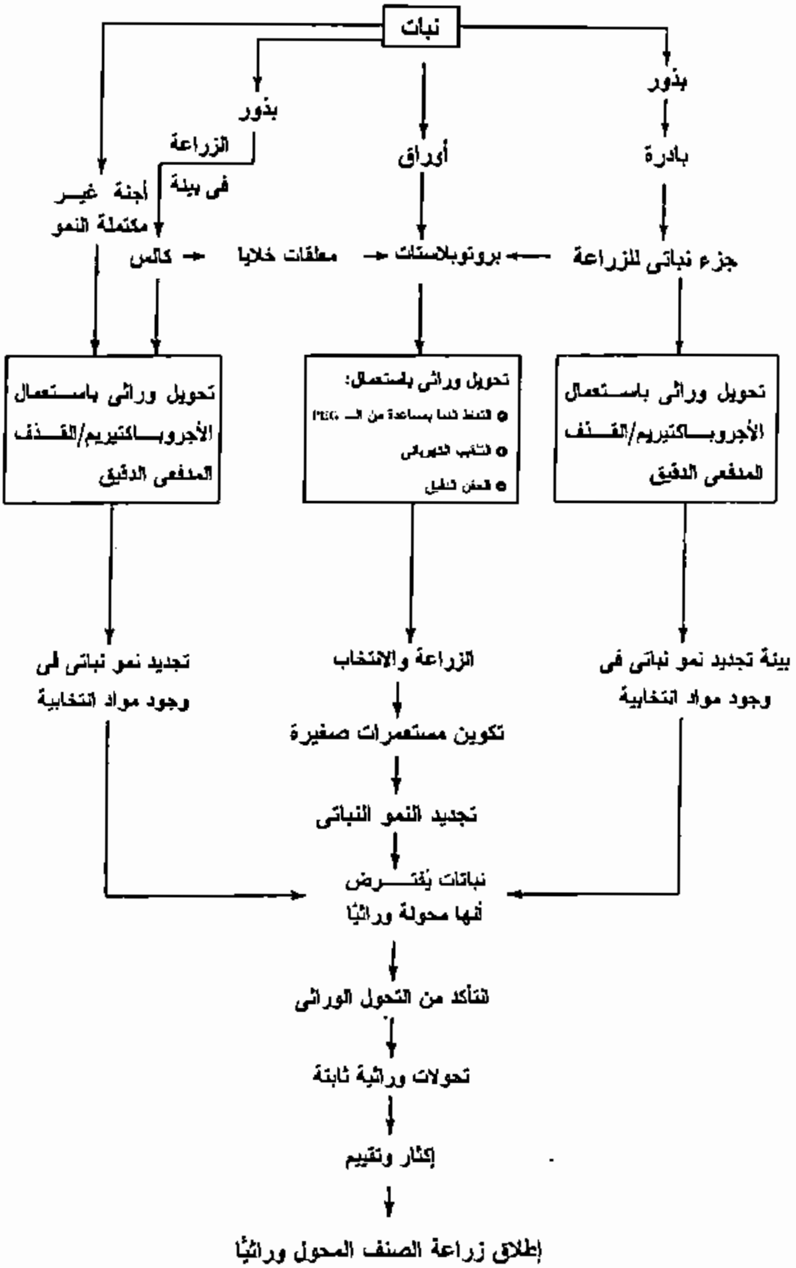
تمهيد

ينصبُّ اهتمامنا فى هذا الفصل والفصل التالى (الثانى عشر) على كيفية تداول الجينات gene manipulation لأغراض الهندسة الوراثية. ومن التعريفات الدقيقة لهذه العملية (تقنيات تداول الجينات gene manipulation) أنها تكوين توافقات جديدة من المادة الوراثية بإيلاج جزيئات حامض نووى - أُنتج بأى طريقة خارج الخلية - فى أى فيرس، أو بلازميد بكتيرى، أو أى ناقل آخر؛ بما يسمح بدمجه فى جينوم عائل لا يحتوى على تلك الجزيئات بصورة طبيعية، ولكنها تكون قادرة على التكاثر المستمر مع جينوم العائل بعد دمجها فيه (عن Chawla ٢٠٠٠). هذا .. إلاّ أننا نقصر اهتمامنا فى هذا الفصل على عملية عزل المادة الوراثية - المتمثلة فى تتابعات نيكليوتيدية معينة - وتضخيمها (لأجل استعمالها فى عمليات التحول الوراثى)، وهو ما أصبح يعرف باسم gene cloning.

هذا .. ويلخص شكل (١١-١) المخطط العام لاستراتيجيات عمليات التحول الوراثى لأجل إنتاج النباتات المحولة وراثيًا.

عزل وإكثار الجينات Gene Cloning : المبادئ العامة

يعرف المصطلح gene cloning بأنه عملية عزل وإكثار أو تضخيم أو مضاعفة التتابعات النيكليويدية لجين ما بإيلاج تلك التتابعات فى خلية بكتيرية، حيث "يتكاثر" معها. وعند زراعة cloning جزء من الدنا فإن ذلك يسمح بإنتاج كميات غير محدودة من ذلك الجزء.



شكل (١١-١): مخطط عام لعمليات التحول الوراثى لأجل إنتاج النباتات المحولة وراثيًا (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

وتتضمن تقنيات زراعة الجينات تكوين جزيئات دنا جديدة تمامًا عن طريق وصل تتابعات دنا من مصادر مختلفة، ويطلق على الدنا المنتج بتلك الطريقة - غالبا - اسم الدنا المعاد تركيبه recombinant DNA. كذلك يطلق على عملية تكوين الدنا بتلك الكيفية اسم الهندسة الوراثية، أو معالجة الجين gene manipulation.

الدنا كمصدر للتتابعات النيكليوتويدية

لا يكون الجين مجرد سلسلة متتابعة من النيكلوتيدات التى تشكل الشفرة الخاصة ببروتين معين، ولكن ذلك التسلسل يعترضه غالبًا تتابعات عديدة من النيكلوتيدات لا تشفر لهذا البروتين، ولا تظهر فى الرنا الرسول mRNA، الذى يفترض أنه يمثل نسخة مقابلة لتتابعات الدنا فى الجين. تعرف تلك الظاهرة باسم split gene، وهى تصف وجود نوعين من تتابعات النيوكليوتيدات التى تنتشر على امتداد كل جين، يطلق على أحدهما اسم exons، وهو يُمثل التتابعات التى تستنسخ فى صورة mRNA، وعلى الجزء الآخر اسم introns، وهو يمثل التتابعات التى لا تستنسخ. وجدير بالذكر أن هذا الجزء - الـ introns - يكثر وجوده بشدة فى النبات والحيوان، ولا يعرف دوره الحقيقى إلى الآن

وبذا . فإن الرنا الرسول لا يمثل نسخة كاملة من تتابعات النيكلوتيدات في الجين، ولكنه يمثل ذلك الجزء من الجين الذى يشفر لتتابعات الأحماض الأمينية فى البروتين الناتج، بالإضافة إلى تتابعات إضافية من النيكلوتيدات تمثل كل طرف من الجزء الجينى الخاص بالشفرة الوراثية. وتعرف بعض تتابعات النيكلوتيدات التى تسبق الشفرة الوراثية باسم promoter region، وهى التى تحدد متى يكون التعديل الجينى، وأين يحدث، وبأى معدل يكون. تتفاعل تتابعات النيكلوتيدات فى الـ promoter region ببروتينات خاصة لتنظيم الحالة التى يكون عليها نشاط الجين. ويعرف نوعان من هذه الـ promoters، هما: الـ constitutive، والـ inducible. ويفيد النوع الأول (الـ constitutive) فى جعل الجين قادر على التعبير طول الوقت. وترتبط تلك الـ constitutive regions بما يعرف بإنزيمات الـ house keeping التى تلزم - على الدوام - للعمليات التى لا غنى عنها بالكائنات الحية، مثل الأيض وإنتاج الطاقة. وبديهى أن هذه الـ promoters تختص بالجينات التى تعبر عن ذاتها فى كل خلايا الكائن أو فى

أنسجة أو خلايا معينة فقط، مثل جينات البروتينات التي تخزن بالبذور أما الـ inducible promoters فإنها تجعل الجينات نشطة فقط تحت تأثير بعض المحفزات الخاصة للـ promoter. ويرجع إلى هذا النوع من الـ promoters خاصية تعبير بعض الجينات عن ذاتها في مراحل معينة فقط من تطور الكائن، أو عند الاستجابة لهرمونات نباتية معينة. كما تُستحث بعض الجينات إلى التعبير عن ذاتها استجابة لمركبات كيميائية معينة، مثل الجينات الخاصة بالتفاعل بين الكائن الحي والمسببات المرضية (Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

الرنا كمصدر للتتابعات النيكليوتويدية

عند التعامل مع الكائنات الـ eukaryotic مثل النباتات، فإن أول الأمور التي يجب حسمها قبل الشروع في عزل جين ما (gene cloning) هو ما إذا كان من الأفضل البدء بالرنا الرسول (mRNA)، أم بالدنا الجينومي. وعلى الرغم من أن الدنا يمثل - كما أسلفنا - الجينوم الكامل للكائن، فإنه قد يحتوي على دنا لا يشفر (non-coding DNA)، مثل الـ introns، ومناطق التحكم control regions، والتتابعات المتكررة، الأمر الذي قد يسبب - أحيانًا - مشاكل، وخاصة إذا ما كان الجينوم كبيرا. هذا إلاّ أنه إذا كان المطلوب هو التحكم في التعبير الجيني، فإنه سيكون من الضروري عزل التتابعات المتحكمة في ذلك التعبير، وبذا لا يكون هناك مفر من حتمية التعامل مع الدنا الجينومي

وفي المقابل .. فإن الرنا الرسول Messenger RNA يتميز على الدنا - كمصدر للنيكليوتيدات، بما يلي:

١ - يمثل الرنا الرسول المعلومات الوراثية المعبر عنها بالفعل بواسطة الخلايا المستعملة في التحضير، الأمر الذي يمكن أن يشكل وسيلة انتخابية أولية قوية، نظرا لعدم تمثيل كل الدنا الجينومي في عشيرة الرنا الرسول

٢ - إن كان الجين المرغوب فيه مُعَبّرًا عنه بشكل جيد، فإن ذلك قد يترتب عليه وفرة في الرنا الرسول الخاص بهذا الجين، مما قد يجعل عملية عزل الجين أكثر سهولة

٣ – نظرًا لأن الرنا الرسول لا يمثل سوى تتابعات الجين التى يُشفر لها؛ فإن جميع الـ introns تكون مستعدة – تلقائيًّا – أثناء تكوين الرنا. وبذا .. فإن عملية إنتاج البروتين الناتج من عملية الهندسة الوراثية تكون دقيقة وعلى نحو مستقيم إذا ما استخدم الرنا الرسول فى التحويل الوراثى.

التخليق المعملى كمصدر للنيكليوتويدات

على الرغم من أن الدنا الجينومى والرنا الرسول هما المصدران الرئيسيان لجزيئات الأحماض النووية التى يُراد عزلها وإكثارها، فإن من الممكن تخليق الدنا معمليًّا إذا ما عرف ترتيب الأحماض الأمينية الخاصة بالبروتين. وبينما تعد تلك الطريقة شديدة الصعوبة بالنسبة لأجزاء الدنا الطويلة، فإنها تفيد فى بعض الحالات، وخاصة إذا ما رغب فى تخليق أجزاء قصيرة من الجين لاستكمال التتابعات قبل عزل الجين وإكثاره (عن Nicholl وآخرين ١٩٩٤).

خطوات الـ gene cloning

تتكون الأحداث الأساسية لعملية الـ gene cloning من الخطوات التالية:

١ – عزل الجين المرغوب فيه.

٢ – دمج الدنا المرغوب فيه فى جزئ دنا صغير قادر على الانقسام (يكون عادة حلقى الشكل) يطلق عليه اسم الناقل vector. يمكن أن يكون هذا الناقل بلازميد البكتيريا *E. coli*، أو فيرس، أو كوزميد cosmid ... إلخ. ويطلق على الناقل الذى أدمج فيه الجين المعنى اسم الناقل المعاد تركيبه recombinant vector.

٣ – يتم إدخال الناقل المعاد تركيبه فى عائل مناسب بعملية تحول وراثى transformation.

٤ – انتخاب خلايا العائل التى حصلت على جزيئات الدنا المعاد تركيبها recombinant DNA molecule.

٥ – إكثار جزيئات الدنا المعاد تركيبها داخل خلايا العائل لإنتاج عدد من النسخ المتماثلة للجين المزروع.

وفى عملية زراعة الجينات تجب إزالة جزء الدنا الذى يشفر لتمثيل ناتج الجين المرغوب فيه من الكائن العائل ونقله إلى الناقل (البلازميد، أو الفيرس البكتيرى phage أو الكوزميد) لتكوين جزئ دنا جديد recombinant DNA molecule، ويعنى ذلك قطع جزئ الدنا فى مواقع محددة ووصلهم معًا بطريقة متحكم فيها

هذا .. ويتطلب إنجاز عملية التحول الوراثى فهم ودراسة كيفية تداول وإجراء أربعة أمور أساسية هى كما يلى:

١ – وسائل زراعة الجينات cloning vehicles، أى النواقل vectors

٢ – الإنزيمات التى تقوم بقطع جزيئات الدنا من الكائنات الحاملة لها، وتلك التى تقوم بلصقها فى جزيئات النواقل.

٣ – جزيئات الدنا أو مكتبات الجينات gene libraries.

٤ – انتخاب سلالة من الخلايا المحولة وراثيًا، أى من تلك التى تلقت الدنا المركب (عن Chawla ٢٠٠٠).

هذا .. ويلخص شكل (١١–٢) استراتيجيات عملية الـ gene cloning.

عزل وإكثار الجينات Gene Cloning: الوسائل والتقنيات

تمهيد

إن الهدف الرئيسى من إكثار الجينات ومضاعفة أعدادها هو عزل وتوصيف الجينات لأجل استعمالها فى البحوث البحتة والتطبيقية، وخاصة لأغراض الهندسة الوراثية.

لقد بدأت عملية إكثار الجينات ومضاعفة أعداد النسخ الخاصة بها (gene cloning) باكتشاف الإنزيم reverse transcriptase فى الفيروسات. يقوم الرنا الفيروسى بتحضير الدنا من قالب template الرنا بمساعدة ذلك الإنزيم، الذى يستعمل الآن فى تحضير الدنا المقابل (المكمل) complementary DNA باستعمال الرنا الرسول mRNA كقالب template